

## OBȚINEREA, PURIFICAREA ANTICORPILOR (IgY) DIN GĂLBENUȘ DE OU HIPERIMUN CU ACTIVITATE ÎMPOTRIVA UNOR AGENȚI VIRALI PATOGENI LA OM ȘI FORMULAREA UNOR PRODUSE TERAPEUTICE

### OBTAINING, PURIFICATION OF ANTIBODIES (IGY) FROM HYPERIMMUNE EGG YOLK WITH ACTIVITY AGAINST VIRAL PATHOGENS AND FORMULATION OF SOME THERAPEUTIC PRODUCTS

Teodora Supeanu<sup>1</sup>, Mariana Oporanu<sup>1</sup>, Lucica Sima<sup>1</sup>, Viorica Chiurciu<sup>1</sup>, C. Chiurciu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Romvac Company S.A., 7 Centurii Road, Voluntari, RO 77190 Ilfov, România

[constantinchiurciu@gmail.com](mailto:constantinchiurciu@gmail.com)

**Cuvinte cheie:** *Imunoglobulina Y, Ou hiperimun, Virusul Herpes simplex tip I, Papilomavirus uman (HPV), Virusul varicelo-zosterian, Rotavirus*

**Key-words:** *Immunoglobulin Y, Hyperimmune egg, Herpes simplex type I virus, Human papillomavirus (HPV), Varicella zoster virus, Rotavirus*

#### Rezumat

În ultimele decenii, tehnologia pe bază de anticorpi aviari a câștigat tot mai mult teren în domeniul medical, înlocuind cu succes imunoglobulinele obținute de la mamifere. Anticorpii Y (IgY) se extrag din gălbenușul ouălor hiperimune recoltate de la găini (*Gallus domesticus*) imunizate cu diferite antigene și au aplicabilitate deja dovedită în diferite arii medicale precum fabricarea de kituri de diagnostic și elaborarea protocoalelor de terapie pasivă a diferitelor afecțiuni de natură infecțioasă. Este binecunoscut faptul că terapia pe bază de imunoglobuline aviare este eficientă în prevenția și tratamentul unor afecțiuni bacteriene la om și animale, în special cu localizare gastro-intestinală. În studiul de față s-au urmărit obținerea de imunoglobuline aviare cu activitate antivirală, extracția și purificarea acestora, precum și formularea unor produse terapeutice în vederea administrării la pacienți umani cu infecții clinic simptomatice date de Rotavirus, Virusul Herpes Simplex tip 1, Papilomavirusul uman sau Virusul varicelo-zosterian. Acestea sunt virusuri înalt patogene, responsabile de numeroase cazuri de morbiditate și mortalitate, pentru care, în momentul de față, opțiunile terapeutice sunt destul de limitate.

#### Abstract

In recent decades, avian antibody technology has become more popular in the medical field, successfully replacing the immunoglobulins obtained from mammals. Y antibodies (IgY) are extracted from the yolk of hyperimmune eggs harvested from hens (*Gallus domesticus*) immunized with different antigens and have an already proven applicability in various medical fields such as the manufacture of diagnostic kits and the development of passive antibody therapy protocols for various infectious diseases. It is well known that avian immunoglobulin therapy is effective in the prevention and treatment of bacterial diseases in humans and animals, especially with gastrointestinal localization. In the present study, the production of avian immunoglobulins with antiviral activity, their extraction and purification, as well as the formulation of therapeutic products for administration to human patients exhibiting clinically symptomatic infections with rotavirus, Herpes simplex virus type 1, human papillomavirus or Varicella zoster virus. These are highly pathogenic viruses, leading to significant human morbidity and mortality, for which the therapeutic options are currently quite limited.

#### Introducere

**Imunoglobulina Y (IgY)** reprezintă corespondentul funcțional al imunoglobulinei G

de la mamifere (Guevarra și col., 2012). IgY este principalul anticorp (Munhoz și col., 2014) sintetizat de către organismul reptilelor,

păsărilor, amfibienilor (Guevarra și col., 2012), precum și al unor specii de pești (Munhoz și col., 2014).

La păsări, aceasta se eliberează în circuitul sanguin (Munhoz și col., 2014), de unde se depozitează în gălbenușul de ou pentru a asigura embrionului imunitatea pasivă.

Este utilizată în diferite arii din domeniul medical, precum diagnosticul unor afecțiuni și inducerea imunității pasive.

Tehnologia IgY prezintă o serie de avantaje comparativ cu tehnicile de obținere și aplicare a IgG de la mamifere, precum costuri mult mai reduse de obținere, asigurarea bunăstării animalelor utilizate și lipsa reactivității față de factorul reumatoid (Guevarra și col., 2012).

**Virusul Herpes simplex tip I (HSV-1)** provoacă infecții cu localizare oro-facială la pacienți umani din întreaga lume.

Este un alpha-herpes virus cu neotropism și ciclu de replicare rapid. HSV-1 poate fi o cauză majoră de morbiditate și mortalitate; răspândirea virusului este întreținută de existența purtătorilor clinic sănătoși în întreaga lume. Deși principala manifestare clinică este infecția orofacială, HSV-1 poate provoca infecții genitale, cutanate, oculare și o serie de boli rare precum encefalită herpetică sau hepatită herpetică.

Deși în ultimele decenii au fost descoperite și eliberate pe piață mai multe substanțe antivirale cu activitate antiherpetică, există totuși riscul dezvoltării tulpinilor rezistente la medicamente, iar un vaccin eficient împotriva acestui virus nu a fost încă descoperit (Arduino și col., 2008).

**Papilomavirusurile umane (HPV)** sunt întrunite într-o familie ce cuprinde mai bine de 130 tulpini cu patogenitate la nivel cutanat și mucos. Cele cu localizare la nivelul mucoaselor pot provoca neoplazii cervicale la femei precum și veruci anogenitale la copii și adulți de ambele sexe (Mammas și col., 2009).

Infecția cu papilomavirus uman reprezintă cea mai comună infecție virală cu transmitere sexuală la nivel mondial.

Papilomavirusul uman este unul dintre cei mai puternici carcinogeni, fiind implicat în cancer cu diverse localizări. Acesta infectează exclusiv celulele epiteliale.

Deși există un vaccin eficient împotriva principalelor tulpini patogene ce declanșează cancerul de col uterin, succesul unei ample campanii de vaccinare ar fi evident de-abia peste câteva zeci de ani (Crosbie și col., 2013).

**Virusul varicelo-zosterian**, cunoscut și ca virusul herpes uman de tip 3, infectează în mod natural doar oamenii, având ca țintă limfocitele T, celulele epiteliale și cele gliale. Infecția primară provoacă varicelă (Gershon și col., 2015), cu replicarea virală în diverse organe, majoritar la nivel cutanat unde au loc și manifestările clinice majore (Baird și col., 2013). În timpul evoluției varicelei virusul se cantonează la nivelul ganglionilor neuronali, unde rămâne într-o stare latentă.

Pe măsură ce imunitatea scade odată cu vârsta sau în cazul pacienților imunosupresați, virusul se reactivează și declanșează zona zoster (Gershon și col., 2015). Aceasta se manifestă prin erupție cutanată și durere locală, care deseori se poate croniciza (Baird și col., 2013).

**Rotavirusul uman** este un organism ubicvitar, responsabil de gastroenterită severă manifestată prin diaree, vomă și deshidratare în formă gravă la copii mai mici de 5 ani (Tagbo și col., 2014; Ramig, 2004), fiind unul dintre principalii agenți cauzatori de mortalitate la pacienții din această categorie de vârstă, în special în țările în curs de dezvoltare (Diez-Valcarce și col., 2019).

Se răspândește de la persoană la persoană, în special pe cale fecalo-orală (Anderson și Weber, 2004).

Rotavirusul infectează în mod preferențial enterocitele mature de la nivelul intestinului subțire superior, însă mecanismul patogenetic nu este cunoscut cu exactitate (Vega și col., 2011).

În cadrul **Departamentului de Cercetare-Dezvoltare Imunoinstant al Companiei Romvac S.A.** se obțin imunoglobuline aviare cu specificitate pentru o largă paletă de agenți infecțioși, bacterieni, micotici și virali, cu patogenitate atât pentru om, cât și pe segmentul medicinei veterinare (Chiurciu și col., 2017; Topilescu și col., 2014).

În studiul de față, utilizând tulpini virale standard, s-au obținut imunoglobuline aviare de tip Y cu specificitate față de 4 virusuri patogene la om. Imunoglobulinele obținute au fost utilizate pentru elaborarea de produse terapeutice în vederea administrării pe cale orală, respectiv pentru aplicații cutanate.

## 1. Material și metodă

### Animalele incluse în studiu

Studiul a fost realizat în cadrul Laboratorului de Cercetare-Dezvoltare Imunoinstant al Companiei Romvac S.A.

Toate procedurile au fost conforme cu Directiva UE 2010/63 privind manipularea animalelor utilizate în scopuri științifice.

Studiul a fost aprobat de Comitetul de Etică al Companiei Romvac S.A.

Au fost incluse în studiu 4 loturi a câte 10 găini oăutoare (*Gallus domesticus*), clinic sănătoase, din rasa Rhode Island, în vârstă de 18 săptămâni și greutate corporală de 2,5 kg.

Păsările au fost cazate în sistemul de creștere în baterii, în spații cu temperatură, umiditate, zgomot și lumină controlate. Păsările au fost hrănite cu o dietă standardizată, ecologică, pe principiul *ad libitum*.

### Antigenele utilizate

S-au achiziționat tulpini virale standard, respectiv Virusul Herpes Simplex tip 1 (HSV 1), tulpina Oka vie, atenuată a Virusului varicelo-zosterian, Rotavirus și Papilomavirus uman (HPV) 9-valent - tipurile 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 și 58.

În cadrul laboratorului de microbiologie, aceste tulpini au fost utilizate pentru prepararea a patru antigene separate.

### Imunizarea găinilor și colectarea ouălor

Fiecărui lot i s-a administrat câte unul dintre cele 4 imunogene preparate.

S-au efectuat trei inoculări pe cale intramusculară cu câte 0.5 ml antigen în două puncte separate în musculatura pieptului.

Colectarea ouălor s-a realizat începând cu a 14-a zi de la cea de-a treia imunizare, când titrul anticorpilor din gălbenuș atinge un nivel maxim. În plus, se consideră momentul optim de colectare al ouălor atunci când din gălbenuș

se pot extrage 100-250 mg IgY/ou.

Ouăle colectate sunt păstrate la 2-8 °C.

### **Elaborarea de produse pe bază de imunoglobuline Y cu specificitate antivirală**

Ouăle hiperimune recoltate de la cele 4 loturi de găini au fost depozitate în condiții de refrigerare, în funcție de cele 4 antigene folosite la inoculare.

Din cele 4 categorii de ouă hiperimune s-au preparat produse cu valoare terapeutică, astfel:

- Ouăle cu IgY anti-HSV-1 au fost utilizate pentru prepararea a două categorii de produse. O parte dintre ele a fost utilizată pentru extragerea de imunoglobuline prin metode fizice, obținându-se IgY înalt purificat în soluție apoasă, sterilă. Soluția respectivă a fost repartizată în flacoane cu o compoziție de 80 mL pentru o singură utilizare zilnică. Pentru obținerea de unguent pentru aplicații locale s-au utilizat ouă integrale (gălbenuș+albuș), din care s-a obținut o pulbere liofilizată. Conform unei rețete standardizate Romvac, pulberea a fost utilizată pentru prepararea unui unguent cu aplicare pe leziunile specifice de la nivel oro-facial.
- Ouăle cu IgY anti-HPV au fost utilizate pentru prepararea unei soluții apoase, sterile cu IgY, similar celei de la punctul anterior.
- Ouăle cu IgY anti-Virusul varicelo-zosterian, au fost utilizate în mod similar cu cele cu IgY anti-HSV-1.
- Ouăle cu IgY anti-Rotavirus au fost utilizate pentru prepararea unei soluții apoase, sterile cu IgY, similar celor de la punctele

anterioare. Însă, ținând cont de categoria de pacienți-țintă pentru care a fost concepută, respectiv copii mai mici de 5 ani, soluția a fost concentrată și repartizată în flacoane de 2 ml pentru o unică utilizare.

### **Evaluarea calitativă și cantitativă a anticorpilor IgY din ouăle recoltate și produsele preparate**

În cadrul Departamentului de Cercetare-Dezvoltare ouăle hiperimune recoltate se testează privind specificitatea imunoglobulinelor conținute față de antigenele utilizate pentru imunizare prin testul ELISA indirect, test conceput *in house*.

În plus, se determină și concentrația de IgY totală prin testul ELISA direct, test conceput de asemenea *in house*.

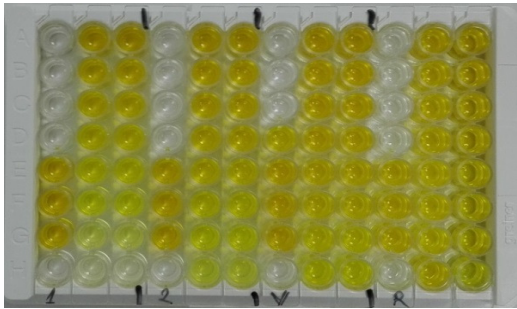
Pentru produsele obținute din ouăle hiperimune, se testează concentrația de imunoglobuline Y totale prin aceeași tehnică, respectiv concentrația de proteină totală prin tehnica Kjeldahl.

Controlul microbiologic urmărește sterilitatea pentru soluțiile înalt purificate cu IgY, respectiv contaminarea pentru unguente, conform normelor Farmacopeei Române, ediția a X-a.

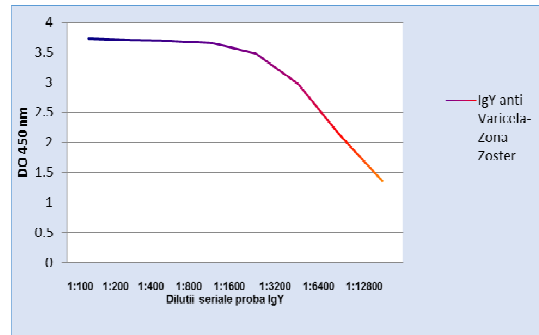
## **2. Rezultate și discuții**

Ouăle hiperimune recoltate la 2 săptămâni de la ultima inoculare se testează prin testul ELISA indirect privind specificitatea față de tulpinile utilizate la prepararea imunogenelor (Figura 1).

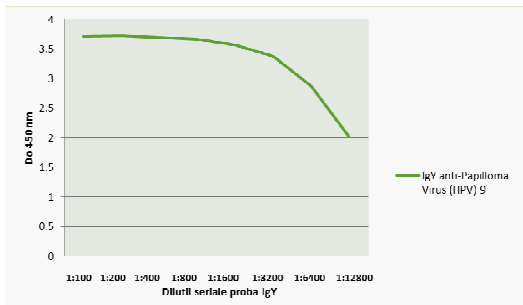
La citirea spectrofotometrică la DO<sub>450nm</sub> se obțin valori numerice mari, descrescătoare pe măsura creșterii diluțiilor probei cu IgY testată pe placă ELISA (Figurile 2, 3, 4, 5).



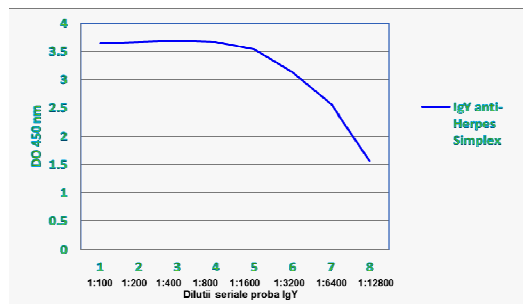
**Fig. 1.** Testarea specificității probelor cu IgY extras din ouă hiperimune recoltate de la găini imunizate cu virus Herpes simplex tip 1 (1), papilomavirus uman (HPV) 9-valent (2), virus varicelo-zosterian (V) și rotavirus uman (R)



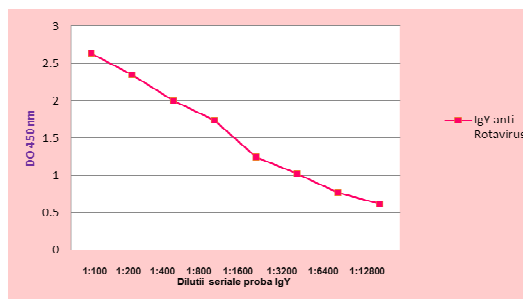
**Fig. 5.** Evoluția valorilor numerice la DO<sub>450nm</sub> în funcție de diluțiile probei cu IgY anti-Virusul varicelo-zosterian testată calitativ prin metoda ELISA direct



**Fig. 2.** Evoluția valorilor numerice la DO<sub>450nm</sub> în funcție de diluțiile probei cu IgY anti-Papilomavirus, testată calitativ prin metoda ELISA direct



**Fig. 3.** Evoluția valorilor numerice la DO<sub>450nm</sub> în funcție de diluțiile probei cu IgY anti-Herpes Virus tip 1 testată calitativ prin metoda ELISA direct



**Fig. 4.** Evoluția valorilor numerice la DO<sub>450nm</sub> în funcție de diluțiile probei cu IgY anti-Rotavirus testată calitativ prin metoda ELISA direct

S-au preparat produse terapeutice, conținând imunoglobulină Y purificată sub formă de soluții apoase, sterile, în vederea administrării pe cale orală, respectiv unguente pe bază de ou integral (gălbenuș+albuș) liofilizat în vederea aplicării locale, în jurul leziunilor.

Produsele sub formă de soluție sterilă s-au testat prin testul ELISA direct pentru determinarea concentrației în IgY, respectiv prin tehnica Kjeldahl pentru determinarea concentrației în proteină totală.

Valorile obținute pentru IgY sunt cuprinse între 57,12mg/100 mL – 540,20 mg/100mL și se încadrează în intervalul de referință de 50 - 250 mg IgY/100 ml (Figura 6).

Valorile proteinei totale a fost cuprinse între 222,27 – 466,84 mg/100 ml, cu încadrare în intervalul de referință 200 - 500 mg/mL, conform normelor interne (Figura 7).

Produsele sub formă de unguente s-au testat prin testul ELISA direct pentru determinarea concentrației în IgY.

Valorile obținute pentru IgY sunt cuprinse între 122,23 mg/100 g – 235,79 mg/100g și se încadrează în intervalul de referință de 50 - 250 mg IgY/100 g.

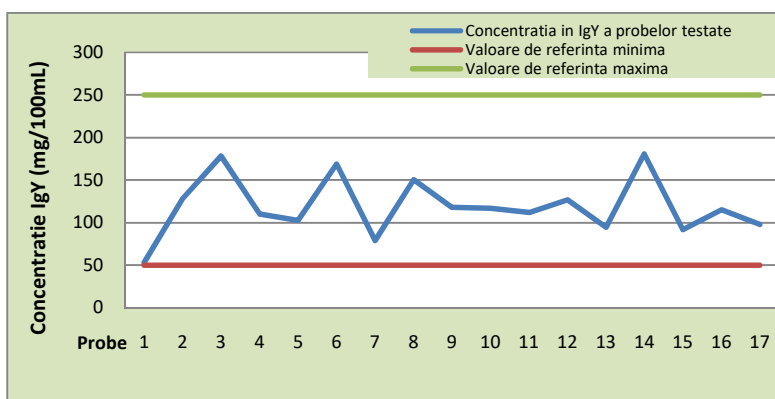


Fig. 6. Variația concentrației de IgY totală din produsele obținute

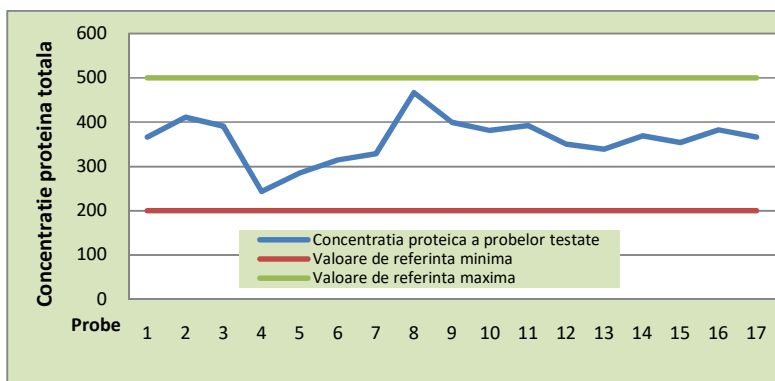


Fig. 7. Variația concentrației de proteină totală din produsele pe bază de IgY

### 3. Concluzii

S-au preparat antigene monovalente utilizând tulpini virale standard, cu care s-au imunizat 4 loturi de găini ouătoare.

Din ouăle hiperimune recoltate, s-au izolat și purificat proteine imunologic active din gălbenuș (imunoglobulina Y), pe baza cărora s-au preparat produse sub formă de soluții apoase, sterile pentru administrare pe cale orală. În plus, din ouăle cu IgY specific, anti-Herpes Simplex tip I, respectiv anti-Virusul Varicelo-Zosterian, s-au preparat unguente pentru aplicații locale.

Produsele terapeutice s-au administrat pe loturi de pacienți umani. Evoluția clinică a acestora a fost una favorabilă.

Urmează a fi elaborate studii pentru a identifica impactul imunoglobulinelor specifice

anti-virale asupra organismului pacientului luat în studiu, respectiv evoluția histo-patologică a leziunilor și modificările la nivel celular și umoral din intimitatea sistemului imunitar.

### Bibliografie

1. **ANDERSON, E.J., WEBER, S.G. (2004).** Rotavirus infection in adults, *The Lancet Infectious Diseases*, **4**, 91-99.
2. **ARDUINO, P.G., PORTER, S.R. (2008).** Herpes Simplex Virus Type 1 Infection: Overview on Relevant Clinico-pathological Features. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, **37**, 107-121.
3. **BAIRD, N.L., YU, X., COHRS, R.J., GILDEN, D. (2013).** Varicella Zoster Virus (VZV)-Human Neuron Interaction, *Viruses*, **5**, 2106-2115.
4. **CROSBIE E.J., EINSTEIN, M.H., FRANCESCHI, S., KITCHENER, H.C. (2013).** Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, **382**, 889-99.

5. DIEZ-VALCARCE, M., LOPEZ, M.R. LOPEZ, B., MORALES, O., SAGASTUME, M., CADENA, L., KAYDOS-DANIELS, S., JARQUIN, C., MCCRACKEN, J.P., BRYAN, J.P., VINJÉ, J. (2019). Prevalence and genetic diversity of viral gastroenteritis viruses in children younger than 5 years of age in Guatemala, 2014–2015. *Journal of Clinical Virology*, **114**, 6-11.
6. GUEVARRA, L.A., LEAÑO, M.B. DALMACIO, L.M., FE YU, B.G., DESTURA, R.V., LIBRANDA-RAMIREZ, B., ESTACIO, R.C. (2012). Production of Immunoglobulin Y (IgY) against Synthetic Peptide Analogs of the Immunogenic Epitopes of the Hepatitis B Surface Antigen. *Acta medica Philippina*, **46** (1), 14-21.
7. GERSHON, A.A., BREUER, J., J.I. COHEN, COHRS, R.J., GERSHON, M.D., GILDEN, D., GROSE, C., HAMBLETON, SOPHIE., KENNEDY, P.G.E., OXMAN, M.N., SEWARD, J. F., YAMANISHI, K., (2015). Varicella zoster virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 1:15016, doi: 10.1038/nrdp.2015.16
8. MAMMAS, I.N., SOURVINOS, G., SPANDIDOS, D.A., (2009). Human papilloma virus (HPV) infection in children and adolescents. *European Journal of Pediatrics*, **168**, 267–273.
9. SILVEIRA MUNHOZ, L., D'ÁVILA VARGAS, G., FISCHER, G., DE LIMA, M., ESTEVES, P.A., DE OLIVEIRA HÜBNERI, S. (2014). Avian IgY Antibodies: Characteristics and Applications in Immunodiagnostic. *Ciência Rural*, **44**(1), 153-160.
10. RAMIG, R.F. (2004). Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection. *Journal of Virology*, **78** (19), 10213–10220.
11. TAGBO, B.N., MWENDA, J.M., ARMAH, G., BIDIKE, E.O., OKAFOR, U.H., OGUONU, T., OZUMBA, U.C., EKE, C.B., CHUKWUBUIKE, C., EDELU, B.O., EZEONWU, B.U., AMADI, O., OKEKE, I.B., NNANI, O.R., ANI, O.S., UGWUEZEONU, I., BENJAMIN-PUJAH, C., UMEZINNE, N., UDE, N., NWODO, C., EZEONYEBUCHI, M.C., UMESIE, E., OKAFOR, V., OGUDE, N., OSAROGBORUM, V.O., EZEBILO, S.K., GOITOM, W.G., ABANIDA, E.A., ELEMUWA, C., NWAGBO, D.F. (2014). Epidemiology of Rotavirus Diarrhea among Children Younger than 5 Years in Enugu, South East, Nigeria. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, **33** (1), Suppl. 1, 19-22.
12. VEGA, C., BOK, M., CHACANA, P., SAIF, L., FERNANDEZ, F., PARREÑO, V (2011). Egg Yolk IgY: Protection against Rotavirus induced Diarrhea and Modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **142** (3-4), 156–169.
13. CHIURCIU, C., CHIURCIU, V., OPORANU, M., PĂTRAȘCU, I.V., MIHAI, I., TABLICĂ, M., CRISTINA, R.T. (2017). PC2 Ovotransferrin: Characterization and Alternative Immunotherapeutic Activity. *Ev-Based Complement Alternat Med*. Volume 2017, Article ID 8671271, 11 pages. <https://doi.org/10.1155/2017/8671271>
14. TOPILESCU, G., CHIURCIU, V., PATRASCU, I.V. CHIURCIU, C., CRISTINA, R.T. (2014). Growth Inhibition of antibiotic resistant bacteria by neutralizing IgY antibodies, *J. Biotechnol.*, vol. 185, Suppl., pp. S91–S92.