

Применение птичьих желточных антител для лечения поражений, вызванных агентами биологического оружия и возбудителями особо опасных инфекций


В.С. Каплин

Федеральный Исследовательский Центр Фундаментальной и Трансляционной медицины, Научно-исследовательский институт биохимии, 630117, Российская Федерация, г. Новосибирск, ул. Тимакова, д. 2

Поступила 12.05.2022 г. Принята к публикации 27.06.2022 г.

В настоящее время западные фармацевтические компании освоили выпуск лицензированных препаратов на основе трансвариальных специфических антител кур (IgY-антител), предназначенных для лечения и профилактики инфекций, вызванных *Helicobacter pylori*, вирусом гриппа и другими патогенами. Особый интерес представляет возможность применения IgY-антител в качестве недорогого специфического антидота для экстренной специфической профилактики инфекций, вызванных возбудителями опасных и особо опасных инфекций. Цель работы – обобщить результаты исследований, показавших высокий терапевтический потенциал трансвариальных специфических иммуноглобулинов в лечении и профилактике опасных вирусных, бактериальных инфекций и поражений биологическими токсинами – потенциальными агентами биологического оружия (БО). Преимуществом использования IgY-технологий для пассивной иммунизации является неинвазивный способ получения антител, а также большое их количество – 20–30 г иммуноглобулинов, которое можно получить от одной курицы-несушки в год. Важным преимуществом IgY перед иммуноглобулинами, получаемыми из сыворотки млекопитающих, является то, что они не взаимодействуют ни с компонентами комплемента, ни с ревматоидным фактором, ни с Fc-рецепторами иммунокомпетентных клеток млекопитающих, что существенно снижает проявление нежелательных реакций, в частности, антителозависимого усиления инфекции (ADE). Эксперименты, проведенные *in vivo* и *in vitro*, показали высокую активность IgY-антител при подавлении поражающего действия возбудителей особо опасных инфекций и биологических токсинов. В работе показано, что замена IgG млекопитающих на птичьи трансвариальные IgY позволяет получать коммерчески значимые количества термостабильных специфических антител, не вызывающих ADE, и расширяет возможности методов специфической профилактики и лечения поражений, вызываемых вирусами, бактериями и токсинами – потенциальными агентами БО.

Ключевые слова: IgY-технологии; биологические угрозы; биологическое оружие; биотерроризм; желточные антитела; инактивация токсина; пассивная иммунизация; трансвариальные иммуноглобулины.

Библиографическое описание: Каплин В.С. Применение птичьих желточных антител для лечения поражений, вызванных агентами биологического оружия и возбудителями особо опасных инфекций // Вестник войск РХБ защиты. 2022. Т. 6. № 2. С. 137–151.  [s://doi.org/10.35825/2587-5728-2022-6-2-137-151](https://doi.org/10.35825/2587-5728-2022-6-2-137-151).

В настоящее время существует опасность как биологической войны и биотеррористических атак в отношении Во-

оруженных сил и населения Российской Федерации, так и заноса на ее территорию опасных патогенов из сопредельных

стран^{1,2,3} [1–2]. Поражения многими инфекционными агентами – потенциальными агентами биологического оружия (БО), можно лечить антибиотиками и противовирусными препаратами, однако для их экстренной специфической профилактики, лечения поражений токсинами (рицин, ботулинический и стафилококковый токсины) или инфекционными агентами с искусственно приданной резистентностью к препаратам, обычно используемым в схемах неспецифической профилактики и лечения, они не могут быть использованы [3]. Единственная возможность противодействия таким агентам – это специфическая иммунопрофилактика и лечение. Но вакцинация – длительный процесс, она может занять несколько недель или месяцев. В условиях уже осуществленного биологического нападения проводить вакцинацию населения и войск будет уже поздно. Поэтому в распоряжении медицинских учреждений должны быть запасы недорогих специфических иммуноглобулинов для экстренной пассивной иммунопрофилактики и лечения⁴ возможных поражений.

Цель работы – обобщить результаты исследований показавших высокий терапевтический потенциал трансвариальных специфических иммуноглобулинов в специфическом лечении и профилактике вирусных, бактериальных инфекций и поражений биологическими токсинами – потенциальными агентами биологического оружия.

Предыстория проблемы. В конце XIX в., в лабораториях Роберта Коха (нем. Heinrich Hermann Robert Koch; 1843–1910), Эмиля Беринга (нем. Emil Adolf von Behring; 1854–1917) в Германии и японского бактериолога Китадзато Сибасабура (1855–1931) был разработан метод пассивной иммунизации животных и людей [4]. А в 1892 г. Эмиль Беринг с сотрудниками приготовили первую лечебную специфическую противодифтерийную сыворотку, выделенную из крови барана, и применили ее для лечения больных дифтерией детей. Позже за эту работу в 1901 г. Эмиль Беринг получил Нобелевскую премию по физиологии и меди-

цине. Эта терапия получила название «сывороточная терапия». Впоследствии бараны были заменены на лошадей, сыворотку стали фракционировать до F(ab')₂-фрагментов и получать антитела против бешенства, столбняка и змеиных ядов, то есть тогда, когда промедление в начале лечения недопустимо. Открытие антибиотиков в середине XX в. положило начало отказу от пассивной иммунизации.

Следующим революционным шагом в развитии новых иммунологических технологий является открытие G. Köhler, C. Milstein возможности слияния клеток миеломы, продуцирующих непрерывную культуру клеток с антителами с заданной специфичностью – моноклональные антитела [5]. За это открытие авторы получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине за 1984 г. Появление антител для терапии является результатом эволюции технологии моноклональных антител за последние десятилетия от 100 % мышинового белка через химерные и гуманизированные белки до полностью человеческих антител. Эта техника была использована для получения моноклональных антител против *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, ботулинических нейротоксинов, вируса натуральной оспы и некоторых других патогенов [6, 7]. Стоимость производства таких антител довольно высока, а одного моноклонального антитела бывает недостаточно, чтобы подавить действие патогена. Возникает необходимость использования нескольких гибридом, направленных на разные эпитопы патогена, что повышает и без того высокую стоимость защиты.

F. Klemperer в 1893 г. взял на вооружение идею Эмиля Беринга о сывороточной терапии, иммунизировал кур столбнячным токсином и показал, что в сыворотке крови и в яичном желтке появляются специфические к токсину антитела, защищающие подопытных мышей от летального исхода [8]. Эта работа F. Klemperer осталась незамеченной научным сообществом того времени. Из отечественных ученых на эту статью ссылались С.К. Дзержговский и И.И. Мечников [9, 10].

Когда благополучие лабораторных животных стало серьезной этической проблемой

¹ Иванова-Зуан А. Лаборатории смерти: как США превратили Украину в военно-биологический полигон // Звезда. URL: <https://tvzvezda.ru/news/201810121240-oytj.htm> (дата обращения: 12.10.2018).

² Юрицын В. Биологическая пентагона в Алматы – радиобуй или троянский конь? // Интернет-газета ZONAKZ, 28.09.2020. URL: <https://zonakz.net/2020/09/28/biolaboratoriya-pentagona-v-almaty-radiobuj-ili-troyanskij-kon/> (дата обращения: 10.04.2022)

³ Куденко А. Биологические лаборатории США охватили весь мир — Минобороны России // Ташкент, Sputnik, 07.04.2022. URL: <https://uz.sputniknews.ru/20220407/biolaboratorii-ssha-oxvatili-ves-mir---minoborony-rossii-23826658.html> (дата обращения: 08.04.2022)

⁴ **Пассивный иммунитет** – введение специфических антител к каким-либо антигенам патогенного микроорганизма. С помощью пассивной иммунизации можно создать временный иммунитет продолжительностью 1–6 нед. Хотя пассивная иммунизация вызывает кратковременное повышение устойчивости к возбудителю, ее действие проявляется немедленно.

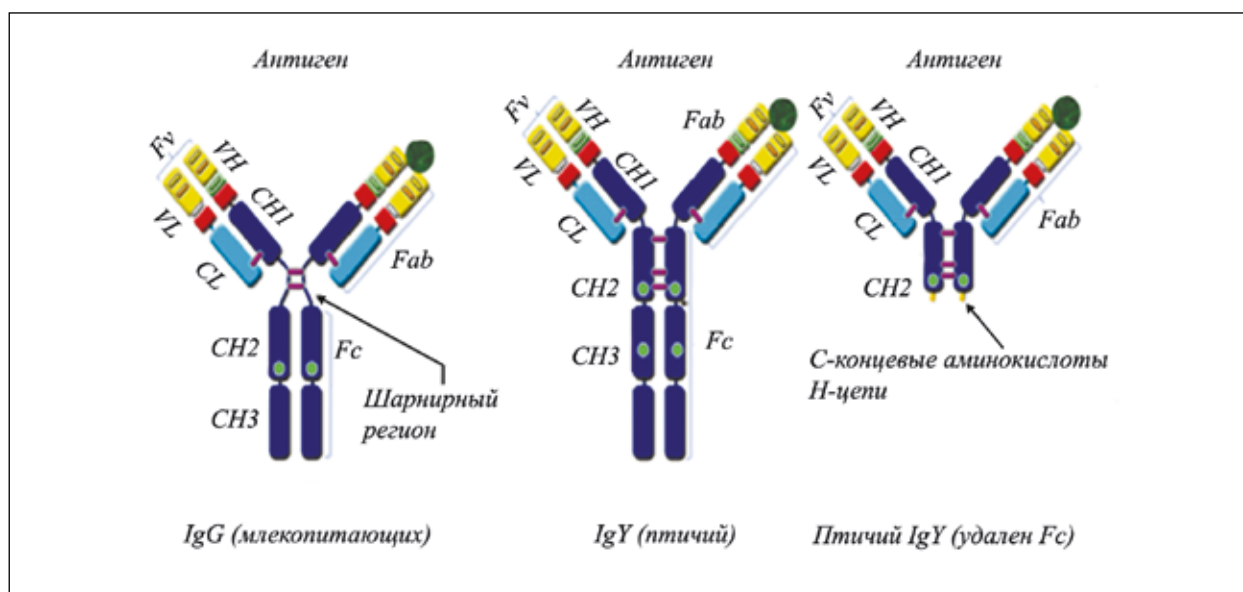


Рисунок 1 – Сравнительное изображение иммуноглобулина млекопитающих (IgG), птиц (IgY) и усеченной формы IgY (ΔFc), свойственной водоплавающим птицам.

IgG млекопитающих состоит из четырех полипептидных цепей – двух одинаковых тяжелых цепей и двух легких цепей. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельного домена (VH) и трех константных доменов (CH1, CH2, CH3) с одним углеводным сайтом (обозначен зеленым цветом). Каждая легкая цепь содержит вариабельный домен (VL) и константный домен (CL). VL и VH являются связывающим доменом антигена. По сравнению с IgG, IgY состоит из четырех константных доменов на тяжелую цепь (CH1–CH4), с двумя углеводными участками. Гибкая шарнирная область, присутствующая в IgG, отсутствует в IgY, что может ограничивать его гибкость по сравнению с IgG. Усеченная молекула IgY (ΔFc) водоплавающих птиц не имеет доменов CH3 или CH4, а две ее C-концевые аминокислоты тяжелой (H)-цепи не кодируются в доменах CH2 или CH3 полноразмерной изоформы [11]

для научного сообщества, работа F. Klemperer о неинвазивном извлечении желточных антител приобрела значимость и признание. Детальное изучение птичьих антител открыло новые возможности использования экстренной неспецифической иммунопрофилактики опасных инфекций.

Основные отличия трансовариальных специфических иммуноглобулинов от специфических иммуноглобулинов млекопитающих. Птицы не производят молозиво, как это происходит у млекопитающих, а используют желток своих яиц в качестве эффективного источника антител, с помощью которых они передают гуморальный иммунитет своему потомству, пока последние не разовьют полностью зрелую иммунную систему. Птицы обладают репертуаром антител, отличным от репертуара антител млекопитающих, и спектр эпитопов птичьих антител больше, чем у IgG млекопитающих. В отличие от иммуноглобулинов млекопитающих, куриные иммуноглобулины (IgY) имеют большую молекулярную массу: IgG ~150 кДа⁵; а IgY ~180 кДа. Из-за значительной филогенетической дистанции,

отделяющей птиц от млекопитающих, иммунологические свойства IgY сильно отличаются от IgG. Так, IgY не взаимодействуют с компонентами комплемента млекопитающих, ревматоидным фактором и Fc-рецепторами млекопитающих, следовательно, IgY-антитела не взаимодействуют с эффекторами иммунной системы млекопитающих и не вызывают системных осложнений. Куриные антитела не взаимодействуют ни с белком A *Staphylococcus aureus*, ни с белком G *Streptococcus* sp., ни с белком L *Peptostreptococcus magnus*, что может быть использовано для снятия проблем интерференции Fc-рецепторов в аналитической практике. Сывороточные иммуноглобулины птиц полностью идентичны желточным. Концентрация IgY в желтке сравнима с концентрацией IgY в сыворотке и составляет 6–13 мг/мл (рисунок 1).

Благодаря высокой иммунореактивности птиц по отношению к чужеродным белкам инфекционного происхождения (бактериальным, вирусным, паразитарным), аффинность IgY-антитела выше аффинности антител млекопитающих. Возможность получения большого

⁵ кДа (килодальтон) – единица измерения массы, равная 1000 атомных единиц массы.

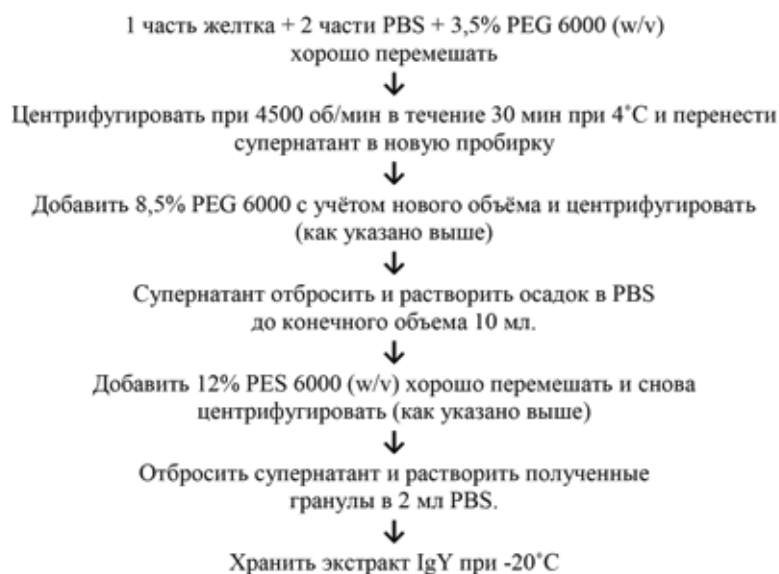


Рисунок 2 – Схема выделения IgY из яичного желтка с помощью улучшенного метода осаждения полиэтиленгликолем (PEG 6000). PBS – фосфатный буфер [16]

количества дешевых куриных антител дало новый импульс в развитии способов пассивной иммунизации [12, 13].

Статьи о применении IgY-технологий стали появляться с 1980 г., но наиболее серьезный прирост публикаций приходится на последние 2011–2021 гг. Лидерами по количеству публикаций являются: Китай, США, Канада, Япония и Германия. Однако с точки зрения исследовательской значимости в первую пятерку стран вошли США, Германия, Канада, Китай и Индия. Кроме того, по сравнению со странами Европы и Америки, исследования IgY в Китае, Индии и Бразилии, в основном, были сосредоточены на последние десять лет [14].

В статьях об использовании IgY-технологий описаны способы выделения и очистки желточных антител, применение их в аналитических направлениях, в терапии в медицине и в ветеринарии, а также в качестве защиты при угрозе применения биологического оружия. Если F. Klempner в своем эксперименте использовал желтки яиц кур без специальной обработки [8], то впоследствии авторы публикаций описывали множество способов очистки желточных иммуноглобулинов, но наиболее удачным, простым и часто цитируемым является способ выделения и очистки IgY, описанный A. Polson с соавт. [15] и дополненный C.N.B. Hussain [16] (рисунок 2).

Рицин и ботулинический нейротоксин. D. Pauly с соавт. [17] провели мониторинг яйценоскости кур, иммунизированных токсинами рицином и нейротоксинами *Clostridium*

botulinum типа А и В. Целью исследования было определить количество IgY, которое можно выделить из яиц одной курицы за период исследования и определить титры антител. А также оценить эффективность IgY-технологий для производства антител в качестве антидотов.

В эксперименте было задействовано 4 курицы породы Lohmann Brown. Количество яиц, снесенных за 2 года, составляло примерно 600 штук на курицу, что дало от 20 до 40 г общего IgY на курицу. Снижение яйценоскости в течение второго года компенсировалось большим количеством дополнительных IgY, полученных от зрелых кур. Количество яиц, снесенных одной курицей, имеет четкую возрастную кинетику: около 30 г/яйцо в начале яйцекладки и до 80 г/яйцо в течение второго года. Стабильный титр антител от 1:100000 до 1:1000000, измеренный с помощью ELISA, был получен после 11 инъекций от 10 до 20 мкг иммобилизованного нативного токсина. Вестерн-блот анализ показал, что полученные IgY-антитела специфически взаимодействуют с соответствующими антигенами.

В случае с рицином авторы проверяли цитотоксичность специфических IgY-антител *in vitro* на клеточной модели Vero. Было показано, что от 3,7 до 7,4 мкг/мл IgY полностью предотвращали вызванную рицином гибель клеток Vero. Было также показано, что IgY-антитела блокируют токсичность рицина *in vivo*. Мышам BALB/c внутрибрюшинно вводили 200 мкл смеси, содержащей 1 мкг рицина и 200 мкг

IgY-антител либо от иммунизированного животного, либо от контрольного. Все животные, получавшие рицин в сочетании с IgY-антителами, выжили, тогда как контрольные мыши пали в течение 24 часов после инъекции.

Нейтрализующие свойства антител против ботулинических токсинов проверяли на мышинной модели *in vivo*. Мышам BALB/c внутрибрюшинно вводили 200 мкл смеси, содержащей 100 мкг ботулинического нейротоксина А (BoNT/A) либо В и 100 мкг IgY-антител, против соответствующего антигена, либо от контрольного животного. Все животные, получавшие антигены в сочетании с IgY-антителами, выжили, тогда как контрольные мыши пали в течение 24 часов после инъекции [17].

IgY-антитела, специфичные к рицину, BoNT/A или BoNT/B, способны нейтрализовать функциональную активность соответствующего токсина *in vivo* и, следовательно, могут иметь потенциальную терапевтическую ценность при разработке средств защиты от возможных террористических актов.

Ботулинические нейротоксины. Ботулизм у человека – опасное отравление, вызываемое ботулиническими нейротоксинами типов А, В и Е. Наиболее эффективное лечение ботулизма – введение антисыворотки к токсинам в первые 24 часа. Ботулинические нейротоксины, продуцируемые *Clostridium botulinum*, содержат семь структурно схожих, но различных по структуре белков, разделенных на серотипы от А до G. Эти токсины кодируются одиночной полипептидной цепью 150 кДа, а затем расщепляются на тяжелую цепь (100 кДа) и легкую цепь (50 кДа), соединенные одной дисульфидной связью, в результате чего образуется наиболее токсичное из веществ – ботулинический нейротоксин. В настоящее время наиболее эффективным противоядием от ботулизма являются поликлональные антитела лошади. Однако антитоксическая сыворотка, предназначенная для защиты от токсинов, может привести к серьезным осложнениям, таким как сывороточная болезнь, индукция комплемента и иногда анафилактический шок. Кроме того, способ приготовления антитоксической сыворотки трудоемок и опасен при детоксикации большого количества токсина.

Z. You с соавторами [18] разработали и приготовили рекомбинантную С-концевую тяжелую цепь токсина BoNT/B, экспрессируемую в *E. coli*, и использовали для иммунизации кур. Животных иммунизировали с полным адъювантом Фрейнда, а на 14, 28 и 42 сутки проводили ревакцинацию с не полным адъювантом Фрейнда. Титр специфических антител в желтках яиц кур к 42 суткам иммунизации достиг 1:100000. Эффект нейтрализации очищенного

IgY против токсина тестировали на модели мыши. У мышей, зараженных токсином внутрибрюшинным путем, через 12–48 часов наблюдалась гибель. Группы, получавшие увеличивающиеся дозы IgY (от 2,5 до 8 нг/мышь), демонстрировали частичную защиту от токсина. Доза 10 нг/мышь защищала животных от комплексной интоксикации полностью. Аналогичный результат был обнаружен в группах животных, получавших IgY в желудок через зонд. Мыши, получавшие IgY-антитела в дозе 25 и 50 мкг на мышь, были лишь частично защищены от токсина. Все мыши, получавшие IgY-антитела в дозе 100 мкг/мышь, выжили. После последовательного введения IgY-антител и комплекса BoNT/B смертность и симптомы интоксикации при ботулизме выглядели по-разному. Все мыши выжили в группах, в которых введение антител и токсина проводилось одновременно или через 1,5 часа после заражения. Но в группах, в которых введение IgY-антител и комплекса BoNT/B проводилось после 3 часов и более, наблюдалась гибель животных.

Известно, что лошадиная сыворотка, используемая для клинического применения против ботулизма, представляет собой 5500 МЕ антитоксин В в 10 мл [18]. Авторы определили, что нейтрализующая способность IgY-антител, выделенных из одного иммунного яйца, составила примерно 1760 МЕ. Следовательно, антитела, выделенные из 3,1 иммунных яиц, составляют одну терапевтическую дозу для человека. Эта доза IgY-антител может быть рассмотрена в качестве замены лошадиных антител против BoNT/B.

Авторы продемонстрировали, что куры, иммунизированные рекомбинантной С-концевой тяжелой цепью BoNT/B (BHc), продуцируют IgY-антитела против BoNT/B, которые нейтрализуют биологическую активность нейротоксинов посредством внутрибрюшинной инъекции и могут помочь снизить риск ботулизма при внутрижелудочном введении. Анти-BHc IgY потенциально могут быть использованы в биозащите гражданского населения.

Стафилококковые энтеротоксины представляют собой семейство бактериальных суперантигенов, продуцируемых *Staphylococcus*. Эти белковые токсины связываются с молекулами главного комплекса гистосовместимости и с меньшим сродством с рецепторами антигенов Т-клеток, что приводит к интенсивной стимуляции иммунной системы, вызывая острые патологические эффекты [19, 20]. Процесс интоксикации зависит от способности бактериальных суперантигенов активировать большое количество Т-клеток, вызывая массивный выброс воспалительных цито-

кинов [21, 22]. Один из этих токсинов – энтеротоксин В *Staphylococcus aureus* – является суперантигеном, участвующим в индукции atopического дерматита и пищевых отравлений. Поскольку энтеротоксины могут вызывать серьезные патологии и считаются потенциальными агентами биологического оружия, существует большая потребность в разработке вакцин и терапевтических подходов, способных устранить их токсичность.

R.D. LeClaire с соавторами [23] показали, что куриные антитела, против интактных молекул стафилококкового энтеротоксина В, существенно снижают количество переносимых с кровью воспалительных цитокинов в мышинной модели и защищают их от летального воздействия токсина. Авторы протестировали очищенные IgY-антитела против токсина на модели макак-резусов летального шока, вызванного токсином после аэрозольного заражения. Была показана 100 % защита макак-резусов от стафилококкового энтеротоксина В. Таким образом, IgY-антитела против энтеротоксина В *S. aureus* могут иметь потенциальную терапевтическую ценность в рамках терапевтического применения после контакта с токсином.

В другом исследовании изучалась возможность получения IgY-антител против рекомбинантного стафилококкового энтеротоксина В. Кур иммунизировали внутримышечно в грудную мышцу путем инъекции 3 раза с интервалом в две недели. Титры антител кур против токсина в яичном желтке были самыми высокими через 4 недели после первой иммунизации и составили 1:550000 определенными в ИФА. Анализ в вестерн-блоттинге показал наличие специфических IgY-антител. Эти результаты говорят о том, что рекомбинантный антиген может быть использован для выявления IgY-антител против токсина и может рассматриваться в качестве антитоксина для нейтрализации стафилококкового энтеротоксина В [24].

Натуральная оспа. Ортопоксвирусы. Благодаря глобальной программе ВОЗ, общими усилиями удалось постепенно побороть это заболевание. В октябре 1977 г. в Сомали был зарегистрирован последний случай оспы в мире, поэтому в 1980 г. ВОЗ официально объявила о ликвидации этой инфекции. Плановая вакцинация населения США от оспы прекратилась в 1972 г., а в СССР вакцинация продолжалась до 1982 г.

X.Y. Zhang с соавт. [25] изучали ортопокс вирусы (в том числе вирус коровьей оспы VACV штамм Lister-Elstree). Кур иммунизировали инактивированным вирусом в дозе 200 мкг на курицу с полным адъювантом Фрейнда с интервалами 3–5 недель. Выделение и очистка IgY проводилось общепринятым методом с ис-

пользованием полиэтиленгликоля (PEG 6000) [18]. Оценку вирус нейтрализующих IgY-антител проводили в 50% тесте нейтрализации бляшек в клеточной культуре VeroE6-7. Авторы определили максимальные титры нейтрализации, которые составили 1:80.

C. Yue [26] изучал ортопоксвирусы, в частности, *Calpox virus*. Кур иммунизировали этим вирусом и получали желточные антитела с титрами 1:4000 – 1:512000. Полученные IgY-антитела были испытаны на мышинной модели. При заражении животных *Calpox virus* наблюдалось снижение веса и их гибель. При лечении мышей специфическими к вирусу IgY-антителами, после кратковременного снижения веса, наблюдалось выздоровление животных. Результаты показывают, что иммунизация кур-несушек *Calpox virus* может вызывать выработку высококачественных IgY-антител, пригодных для терапии.

В другом эксперименте кур иммунизировали штаммом ЛИВП вируса осповакцины внутримышечно в дозе 6,0 Ig БОЕ/животное с полным адъювантом Фрейнда. Бустер вводили через месяц. После второй иммунизации титр желточных антител по результатам ИФА достигал более 1:10000. Нейтрализующую активность IgY-антител определяли путем титрования бляшек в культуре клеток Vero. Титр в реакции вируснейтрализации составил 1:25. Таким образом, было показано, что желточные антитела кур могут нейтрализовать вирус осповакцины штамма ЛИВП [27].

Холера – острая кишечная, антропонозная инфекция, вызываемая бактериями вида *Vibrio cholerae*. Характеризуется поражением тонкого кишечника, водянистой диареей, рвотой, быстрой потерей организмом жидкости, а без своевременной терапии может привести к обезвоживанию вплоть до гиповолемического шока и смерти. Холера относится к особо опасным инфекциям. Штаммы *V. cholerae*, которые вызывают эпидемии, принадлежат к серогруппам O1 и O139. Компонентом, определяющим патогенность холеры, является холерный энтеротоксин, состоящий из одной субъединицы А, являющейся ферментом и пятью субъединицами В, которые осуществляют связывание с клеткой хозяина. Ингибирование субъединицы В может блокировать активность всего холерного токсина [28].

Во многих странах разрабатываются и выпускаются пероральные вакцины против холеры [29]. Пассивная иммунизация куриными желточными иммуноглобулинами показала высокую эффективность в лечении диареи, вызванной холерным вибрионом. IgY обладают высокой термостабильностью до 65 °C в водных условиях и сохраняют антиген-

связывающую активность в условиях лабораторий при температуре 25 °C в течение одного года [30, 31].

К. Hirai с соавт. [32] изучали возможность получения желточных антител кур против *V. cholerae* и «В» субъединицы холерного токсина. Кур иммунизировали подкожно смесью раствора антигена и полного адъюванта Фрейнда (1:1) в обе грудные мышцы курицы. В качестве антигена использовали либо смесь штаммов *V. cholerae* серогруппам O1 и O139 (V.C), либо рекомбинантный В токсин холерного вибриона (CTB). Повторные инъекции проводили тем же способом через 6 нед. после первой иммунизации. Через 4 нед. начали сбор иммунных яиц. На мышинной модели было показано, что смесь анти-V.C и анти-CTB IgY может быть использована для профилактики или лечения холеры. Введение только анти-V.C IgY также показало терапевтический эффект в то время, как только анти-CTB IgY был не столь эффективен. Таким образом, уничтожение бактерий в кишечнике с помощью IgY-антител было более важным и эффективным, чем нейтрализация токсина. Терапевтический эффект введения IgY мышам после заражения был сходным во всем диапазоне интервалов введения, от 2 до 8 ч. При смешивании живых бактериальных клеток штаммов O1 или O139 с анти-V.C антителами наблюдалось почти полное подавление активности патогена. Авторы считают, что лучший метод введения IgY-антител – это подмешивание их в молочные продукты, продукты питания, воду или пероральный регидратационный раствор для профилактики или лечения холеры, так как они могут поставлять воду в организм человека [32]. P.U. Megha, R. Sentila с соавторами [33] оценивали протективную активность IgY-антител против *V. cholerae* штамма O1 *in vitro*. Полученные ими данные полностью подтвердили результаты К. Hirai, Н. Arimitsu с соавт. [32].

Эксперименты В. Barati, F. Ebrahimi с соавт. [34] проводились с целью определить эффект анти-CTB-IgY-антител против перорального заражения *V. cholerae* у мышей-сосунков. Связывающий домен холерного токсина был амплифицирован и лигирован в вектор pET28a. Экспрессия рекомбинантного CTB *V. cholerae* проводилась в *E. coli*. После иммунизации кур рекомбинантным CTB, IgY были очищены методом разбавления водой и осаждением NaCl, а их чистота была подтверждена ИФА. Способность связывать и нейтрализовать была эффективной при условии, что они применялись одновременно или через 1 ч после воздействия *V. cholerae*. Когда мыши получали анти-CTB IgY с пищей, бактерии и IgY проходили через желудочно-кишечный тракт и связывали анти-CTB

IgY-антитела с холерным токсином, снижая бактериальную инфекционность *V. cholerae* и демонстрируя пассивную защиту против *V. cholerae* инфекции у мышей-сосунков при использовании летальных доз бактериальных клеток.

М. R. Akbari с соавт. [35] изучали вопрос об использовании IgY-антител против липополисахарида (LPS) *V. cholerae* в лечении диареи. Эксперименты проводились на мышах-сосунках. IgY-антитела очищали и серийно разводили в фосфатно-солевом буфере, смешивали с *V. cholerae* и затем вводили через зонд нескольким группам мышей-сосунков. Результаты показали, что 75 нг IgY могут специфически взаимодействовать с антигенами *V. cholerae*. Самая низкая защитная доза анти-V. *cholerae* LPS IgY-антител составила 2,5 мкг. Полученный анти-Vibrio LPS IgY-антитела показали хорошую реактивность с антигеном. Их можно использовать в качестве дополнительной пероральной иммунотерапии при лечении холеры.

Ф. Taheri с соавт. [36] искали антигены *V. cholerae* которые могли бы быть использованы для пассивной иммунизации кур. Для этой работы были получены: белковый рекомбинантный токсин CtxB (ответственный за связывание токсина с эукариотическими клетками), токсин ворсинок TcrA (усиливает прикрепление бактерий к энтероцитам) и, наконец, мембранный белок OmpW, полученный в виде мономера, слитной или комбинированной форме для оценки и сравнения их протективной способности. Иммунореактивность IgY исследовали с помощью белкового и цельноклеточного ИФА, их специфичность подтверждали вестерн-блоттингом, а их нейтрализующее действие на токсин оценивали в культуре клеток Y1. Результаты показали, что IgY, полученные против CtxB, имели самые высокие титры и были способны нейтрализовать эффекты цитотоксичности *in vitro*. Самая высокая защита при заражении мышей *V. cholerae* была получена при использовании IgY-TcrA. Полученные IgY-антитела проявили высокую специфичность в отношении CtxB, что может быть использовано в пассивной иммунотерапии против холеры.

Эти эксперименты на животных могут быть использованы как для контроля, так и для профилактики холеры у людей. Технология IgY может быть применена в качестве пероральной добавки для профилактики, а также в качестве патоген-специфических антимикробных агентов для борьбы с инфекционными заболеваниями.

Вирус Эбола. Вирус Эбола (Ebola virus disease, EVD) принадлежит к семейству Filoviridae и является причиной тяжелой ге-

моррагической лихорадки. Повторяющиеся вспышки с высоким уровнем летальности все еще происходят в Африке.

Наиболее эффективной стратегией лечения является, как показали исследования, иммунотерапия моноклональными антителами [37]. Однако из-за низкой термостабильности антител млекопитающих их применение в тропиках остается не оправданным. Поэтому Y. Zhang с соавт. [38] использовали куриные IgY-антитела в пассивной иммунизации мышей и морских свинок, зараженных вирусом Эболы. Куры-несушки были иммунизированы различными вакцинами-кандидатами для получения IgY-антител против EVD. В результате были получены IgY-антитела с высоким титром против вируса. Терапевтическая эффективность иммунных антител *in vivo* была проверена на новорожденных мышках Balb/c. Мышей, предварительно инфицированных смертельной дозой псевдовirusа, лечили различными дозами IgY-антител против EVD. Группа, получавшая высокую дозу нейтрализующих антител, продемонстрировала полную защиту без симптомов заболевания, в то время как группа с низкими дозами антител была защищена лишь частично. Мыши, получавшие контрольные IgY (не иммунные), погибали в течение 10 суток. Для дальнейшего подтверждения защитной функции анти-EVD IgY-антител необходимо было оценить метаболический уровень антител в организме. Биодоступность IgY оценивали *in vivo*, для этого группе самок морских свинок подкожно вводили анти-EVD IgY-антитела. Сыворотки крови морских свинок тестировали ежедневно. Титры антител в сыворотках морских свинок достигли высокого уровня, а затем быстро снижались до уровня ниже предела обнаружения – на 4–5 сутки. Эти результаты позволяют предположить, что пассивный перенос IgY может обеспечить защиту морских свинок на 2–3 сут.

Кроме того, авторы показали, что полученные ими анти-EVD IgY-антитела сохраняют свою нейтрализующую активность при температуре 25 °C в течение одного года, в то время как анти-EVD овечьи антитела и рекомбинантные mAb KZ52 антитела с той же специфичностью при той же температуре за две недели полностью потеряли свою активность. Таким образом анти-EVD IgY-антитела демонстрирует большие перспективы в плане внедрения новых схем лечения этого заболевания.

Антителозависимое усиление инфекции (antibody-dependent enhancement). ADE наиболее ярко проявляется при лихорадках Денге и Зика [39, 40].

Геморрагическая лихорадка Денге и шоковый синдром Денге являются серьезными

проявлениями заболевания, которые могут возникать после последовательного инфицирования различными серотипами вируса Денге. Вирус, вызывающий лихорадку Денге, передается комарами. Проявление заболевания варьирует от бессимптомной инфекции до более тяжелой геморрагической лихорадки Денге и шокового синдрома Денге. Во время первичного инфицирования у большинства людей наблюдается субклиническая инфекция. В этой ситуации возникает длительный иммунитет против первичного инфекционного серотипа. Во время вторичной инфекции патофизиология заболевания может резко измениться, особенно если вторичная инфекция относится к другому серотипу Денге. Гетеротипические вторичные инфекции являются причиной 90 % зарегистрированных случаев геморрагической лихорадки Денге и шокового синдрома Денге, что впоследствии приводит к развитию ADE. ADE возникает, когда субнейтрализующие антитела после первичной инфекции Денге связываются с заражающей вирусной частицей от вторичной гетеротипической инфекции. Эти комплексы антитело–вирус затем связываются с рецепторами Fcγ на макрофагах и дендритных клетках через Fc-фрагмент антител. Результатом ADE является большее количество инфицированных иммунных клеток, что приводит к усилению иммунного ответа на инфекцию и развитию цитокинового шторма [41].

Разработка вакцины проблематична из-за риска вызвать субоптимальные иммунные ответы, приводящие к ADE и тяжелому заболеванию после заражения гетерологичными вирулентными штаммами. Пассивная иммунотерапия нейтрализующими антителами может стать альтернативой лечению тяжелой формы лихорадки Денге, но эти антитела не должны связываться с Fc-рецепторами антител.

Обнадеживающий эффект лечения лихорадки Денге был продемонстрирован при использовании генно-инженерного варианта агликозилированных моноклональных IgG-антител, которые не взаимодействовали с FcγR, проявляли профилактическую и терапевтическую эффективность против ADE-индуцированного летального заражения [42].

Основываясь на этих данных, A.L. Fink с соавторами [43] предположили, что птичьи желточные антитела, которые по своей природе не взаимодействуют с Fc-рецепторами иммуноглобулинов млекопитающих, могут быть полезными в иммунотерапии лихорадки Денге. В качестве лабораторных животных использовали самок инбредных гусей. В отличие от кур, в сыворотке и в желтках водоплавающих птиц обнаружены не только обычная форма иммуноглобулинов (IgY), но и усеченная форма

IgYΔFc [44] (смотри рисунок 1), которая на два домена короче, и, следовательно, ее молекулярная масса составляет не 180 кДа, а 120 кДа, что важно при системном введении гетерогенных иммуноглобулинов. A.L. Fink с соавт. [43] иммунизировали самок гусей частицами вируса, инактивированными формальдегидом при комнатной температуре. Доза вакцинации составила 120 мкг антигена. Повторные вакцинации проводили на 2 и 4 неделях. Титры полученных гусиных антител колебались от 1:924 807 до 1:6 400 000. Наблюдалась терапевтическая защита при введении 1–2 мг анти-Денге IgY через 24 ч после инфицирования смертельной дозы мышам. Анти-денге IgY не индуцирует ADE. Это свойство IgYΔFc укороченных антител особенно выгодно, поскольку оно не требует какой-либо генетической модификации, что существенно скажется на снижении затрат на получение таких антител. Кроме того, авторы подтвердили, что репертуар антител, генерируемый против вируса Денге у гусей, отличается от репертуара, генерируемого млекопитающими [43]. Таким образом, использование гусиных антител может дать существенный прорыв в лечении пациентов, у которых проявляется ADE.

При изучении *лихорадки Зика* было установлено, что сыворотка выздоравливающих в условиях *in vivo* обладает нейтрализующей активностью из-за наличия большого количества специфических к вирусу антител [46], но из-за ADE антитела не могут выполнять протективную функцию в условиях *in vitro*. Чтобы противодействовать ADE при инфекции Зика, можно использовать моноклональные антитела с мутацией LALA (замена лейцина (L) на аланин (A) в положениях 234 и 235 в области Fc антитела IgG), поскольку они не могут связываться с Fc-γ рецептором клеток (FcγR). Следовательно, такие моноклональные антитела могут устранять ADE в условиях *in vitro* и *in vivo* [43]. Но антитела из желтков яиц водоплавающей птицы также не взаимодействуют с FcγR млекопитающих.

Поэтому K.L. O'Donnell с соавт. [47] проверяли возможность подавления ADE специфическими антителами, выделенными из гусиных яиц. Авторы показали, что олигоклональные IgY-антитела способны нейтрализовать вирус Зика у мышей. При концентрации специфического IgYΔFc 25 мкг/мл наблюдалась 50 % нейтрализация активности антител. Таким образом, авторы показали, что предлагаемые поликлональные специфические IgY ΔFc гусиные антитела могут обеспечивать эффективную пассивную иммунотерапию инфекции Зика без индукции ADE и без применения процедуры получения моноклональных антител, не

связывающихся с FcγR. Но вопрос передачи специфических антител зараженному плоду остается еще не решенным.

Таким образом, специфические IgY ΔFc антитела, полученные из яиц самок гусей, не взаимодействует с Fc-рецепторами млекопитающих и не активирует систему комплемента млекопитающих, поэтому они не запускают ADE и неблагоприятных воспалительных реакций.

Тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV). В Китае в 2003 г. был зарегистрирован новый штамм коронавируса, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром SARS-CoV с 10 % летальных исходов [48]. Одним из вариантов лечения этого заболевания была пассивная иммунизация с использованием сывороток крови выздоровевших пациентов, что давало положительные результаты. Поэтому C.Y. Fu с соавт. [49] изучали возможность получения желточных антител от кур, иммунизированных SARS-CoV. Полученные IgY-антитела имели высокую чистоту и хорошую биологическую активность. IgY-антитела были способны нейтрализовать коронавирус SARS-CoV в разведении до 1:640. Эффективность IgY не изменилась после лиофильной сушки, что облегчало транспортировку и обращение с препаратом, используемым для пассивной иммунизации. После оценки на экспериментально инфицированных животных моделях, антитела к коронавирусу, полученные в этом исследовании, могут быть хорошим кандидатом для массового производства в качестве иммунотерапевтического средства против этого вируса. Авторы уверены, что для эффективного контроля над SARS потребуется сочетание вакцины, пассивной иммунизации и лекарственной терапии.

Коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV). MERS-CoV был выявлен в 2012 г., он вызывает тяжелое и часто смертельное (до 35 %) острое респираторное заболевание у людей. A.T. Abbas с соавт. [50] изучали нейтрализующую эффективность куриных IgY-антител против белка S1 шипа вируса MERS-CoV. Специфические иммуноглобулины получали путем инъекции курам очищенного рекомбинантного белка S1 на седьмой неделе после иммунизации. Результаты вестерн-блоттинга показали, что IgY-антитела специфически связываются с белком S1. Эти антитела также были способны распознавать MERS-CoV внутри клеток, что было продемонстрировано иммунофлуоресцентным анализом. *In vivo* наблюдалось количественное снижение экспрессии вирусного антигена и заметное уменьшение воспаления в легочной ткани. В совокупности эти данные предпо-

лагают, что анти-MERS-CoV S1 IgY-антитела могут служить потенциальным кандидатом для пассивного лечения инфекции MERS-CoV. После оценки в клинических исследованиях IgY-антитела могут использоваться для лечения MERS-CoV, особенно в группах высокого риска с незрелым или ослабленным иммунитетом. Кроме того, эти антитела могут использоваться для лечения MERS-CoV у верблюдов, которые являются резервуаром, ответственным за передачу вируса человеку. Данные, полученные в этом исследовании, по мнению авторов, являются платформой для создания специфических и эффективных IgY-антител против других коронавирусов в будущих исследованиях.

Тяжелый острый респираторный синдром – коронавирус 2 (SARS-CoV-2). Вирус впервые был обнаружен в декабре 2019 г. в Китае. Он вызывает опасное инфекционное заболевание COVID-19, которое может протекать в форме острой респираторной вирусной инфекции как в легкой, так и в тяжелой формах. Наиболее частым осложнением заболевания является вирусная пневмония, способная приводить к острому респираторному дистресс-синдрому и последующей острой дыхательной недостаточности.

Гетерологичные сыворотки крови лошадей использовались бразильскими и аргентинскими учеными при терапии SARS-CoV-2. Антитела, выделенные из сыворотки крови иммунизированных белком рецептор-связывающего домена (receptor-binding domain (RBD)) лошадей, были использованы для получения очищенных фрагментов F(ab')₂. Титры антител, полученные в конкурентном методе ИФА, превышали 1:1000000, а нейтрализующие титры определяли по способности антител подавлять псевдовирuses SARS-CoV-2 с использованием клеток Hela. Нейтрализующие титры достигали уровня 1:14604 [51, 52].

Кроме лошадиных антител, в последнее время стали широко использовать куриные желточные антитела для пассивной иммунизации. W. Jingchen с соавт. [53] использовали RBD шиповидного (S) белка (S-RBD) коронавируса SARS-CoV-2 в качестве антигена для иммунизации кур. Извлечение IgY из желтков проводили водным способом с замораживанием. Чистота препарата составила 85 %. Результаты этого исследования подтвердили, что эти антитела могут распознавать антиген SARS-CoV-2 S-RBD и специфически связываются с ним, блокируя взаимодействие между белком S и ACE2 и предотвращая инфекцию, вызванную взаимодействием между белком S и ACE2. S-IgY может не только блокировать попадание SARS-CoV-2 в клетки-мишени, но и эффективно ингибировать репликацию SARS-CoV-2 в клетках.

S. Wei с соавт. [54] оценивали потенциальную эффективность антител яичного желтка (IgY) в качестве нейтрализующего агента против SARS-CoV-2. SARS-CoV-2 Spike-S1 белок был экспрессирован в клетках насекомых Sf9 с использованием системы экспрессии бакуловирусов/клеток насекомых. Чистота экстрагированных IgY составила более 80 %. Анализ нейтрализации псевдовирuses оценивали с помощью люминесцентного анализа. Таким образом, IgY против Spike-S1 показали значительную нейтрализующую способность против псевдовирuses SARS-CoV-2, различных мутантов S и даже SARS-CoV *in vitro*. Использование IgY в составе аэрозолей или спреев для дыхательных путей, ротовой полости и даже пищеварительного тракта может быть целесообразной стратегией. Это может предотвратить вторжение вируса SARS-CoV-2 естественным путем. Однако для долгосрочного контроля над SARS-CoV-2 потребуется сочетание активных и пассивных средств иммунизации, лекарственной терапии и других профилактических мер.

H. Shen с соавт. и Ge S. с соавт. [55, 56] описали эксперимент, в котором они выделили IgY против SARS-CoV-2 из желтков яиц кур, иммунизированных инактивированным SARS-CoV-2, и оценили их ингибирующую активность против инфекции SARS-CoV-2 *in vitro*. Было показано, что анти-SARS-коронавирус-2 IgY антитела связываются с белком S1 и RBD в зависимости от дозы, в то время как контрольные антитела IgY не могли взаимодействовать с S1 или RBD. Кроме того, Shen, H. с соавт. проверили, являются ли анти-SARS-коронавирус-2 IgY-антитела полезными при использовании назального или орального распыления в качестве профилактической меры. Для этого мышам BABL/c вводили антитела IgY против SARS-CoV-2, меченные флуоресцентными молекулами, через назальную капельницу или оральный спрей. Результаты оценивали с помощью системы визуализации IVIS флуоресцентными красителями. Антитела против SARS-CoV-2-IgY сохранялись на обнаруживаемом уровне в носовой и ротовой полости в течение 2–4 и 12–24 ч после введения соответственно. Эти результаты показывают, что IgY к SARS-CoV-2 могут оставаться в верхних дыхательных путях в течение нескольких часов, в зависимости от используемого метода введения. Авторы делают вывод, что культивированный в лабораторных условиях и инактивированный формальдегидом SARS-CoV-2 можно использовать для иммунизации кур для крупномасштабного производства IgY-антител из яичного желтка, обладающих мощной ингибирующей активностью против живой и

псевдотипированной инфекции SARS-CoV-2 *in vitro*. Учитывая, что антитела IgY безопасны для использования человеком и могут производиться в больших масштабах с низкими производственными затратами, эти антитела IgY к SARS-CoV-2 имеют хороший потенциал для дальнейшего развития в качестве иммунопрофилактического средства с помощью назального или перорального спрея для предотвращения пандемии.

Таким образом, в технологии IgY достигнут значительный прогресс за последние два десятилетия и ее можно применять в диагностических, профилактических или лечебных целях. Эта технология вызвала большой интерес у исследователей, особенно за последние 10 лет.

Кроме того, развитие лабораторных методов и применение других технологий в этой области привело к тому, что технология IgY стала более зрелой для промышленного производства специфических антител и коммерциализации [14]. IgY-технологии – относительно новое направление в иммунологии, основанное на технологии пассивной иммунизации Эмиля Беринга, но недостаточно оцененное в России. Замена IgG млекопитающих на птичьи трансвариальные IgY позволяет нарабатывать коммерчески значимые количества специфических антител, не вызывающих ADE, расширяет возможности методов пассивной иммунизации для лечения поражений, вызываемых вирусами, бактериями и токсинами – потенциальными агентами биологического оружия.

Вклад авторов / Authors Contribution:

Идея и концепция статьи, поиск и анализ литературы, написание статьи, цифровая обработка изображений / Idea and concept of an article, search and analysis of literature, writing an article, digital image processing.

Информация о конфликте интересов

Автор заявляет, что исследования проводились при отсутствии любых коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

Сведения о рецензировании

Статья прошла открытое рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала и в РИНЦе.

Финансирование. Обзорная статья выполнена в рамках выполнения государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (регистрационный номер 122032300152-3).

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

Список источников/References

1. Сандахчиев Л.С., Мартынюк Р.А. Необходимость международного сотрудничества для успеха борьбы с инфекционными заболеваниями и биотерроризмом // Химическая и биологическая безопасность. 2004. № 1–2. С. 13–14.

Sandakhchiev L.S., Martynyuk R.A. The need for international cooperation for success in combating infectious diseases and bioterrorism // Chemical and Biological Safety. 2004. №. 1–2. С. 13–14 (in Russian).

2. Меринова О.А., Топорков А.В., Меринова Л.К. и др. Биологическая безопасность: анализ современного состояния системы подготовки специалистов в Российской Федерации // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2018. № 3. С. 87–96. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-3-87-96>

Merinova O.A., Toporkov A.V., Merinova L.K. et al. Biological safety: analysis of the current state of training in the Russian Federation // Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2018. №. 3. С. 87–96 (in Russian).

3. Ramasamy S., Liu C.Q., Tran H. et al. Principles of antidote pharmacology: an update on prophylaxis, post-exposure treatment recommendations and research initiatives for biological agents. // British journal of pharmacology. 2010. V. 161. № 4. P. 721-748. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00939.x>

4. Bebring E., Kitasato S. Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. // 1890. Deutsche Medizinische Wochenschrift, V. 16. P. 1113-1114. <https://doi.org/10.17192/eb2013.0164>

5. Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // Nature. 1975. V. 256. №. 5517. P. 495-497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>

6. Froude J.W., Stiles, B.G., Pelat T., Thullier P. Antibodies for biodefense. // MAb. – Taylor & Francis. 2011. V. 3. № 6. P. 517-527. <https://doi.org/10.4161/mabs.3.6.17621>

7. Hu W.G., Nagata L.P. Opportunities and challenges of therapeutic monoclonal antibodies

as medical countermeasures for biodefense // J. Bioterrorism Biodefense. 2016. V. 7. P. 1000149. <https://doi.org/10.4172/2157-2526.1000149>

8. Klemperer F. Archiv für experimentelle pathologie und pharmacologie // Ueber Natürliche Immunität Und Ihre Verwerthung Für Die Immunisirungstherapie. 1893. V. 31. P. 356-382. <https://doi.org/10.1007/BF01832882>

9. Мечников И.И. Невосприимчивость в инфекционных болезнях. М., 1903. 519 с.

Mechnikov I.I. Immunity in infectious diseases // I.I. Mechnikov. Moscow, 1903. 519 p. (in Russian).

10. Дзерзговский С.К. К вопросу о наследственности истинного иммунитета против дифтерита // Архив биологических наук. Т. VIII. Вып. 1–5. СПб., 1901. С. 421–432.

Dzerzhgovsky S.K. On the question of heredity of artificial immunity against diphtheria. S.K. Dzerzhgovsky // Archives of Biological Sciences. VOL. VIII. V. 1–5. St. Petersburg. 1901. P. 421-432 (in Russian).

11. Zhang X.Y. et al. IgY-Technology: Production and Application of Egg Yolk Antibodies. Springer International Publishing, 2021. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-030-72688-1>

12. Каплин В.С., Каплина О.Н. IgY-технологии. Желточные антитела птиц // Биотехнология. 2017. Т. 33. № 2. С. 29–40.

Kaplin V.S., Kaplina, O.N. IgY-technologies. Avian yolk antibodies // Biotechnology. 2017. T. 33. № 2. С. 29–40. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2017-33-2-29-40> (in Russian).

13. Karachaliou C.E., Vassilakopoulou V., Livaniou E. IgY technology: Methods for developing and evaluating avian immunoglobulins for the in vitro detection of biomolecules // World Journal of Methodology. 2021. V. 11. № 5. P. 243. <https://doi.org/10.5662/wjm.v11.i5.243>

14. Wu R., Yakhkeshi S., Zhang X. Scientometric analysis and perspective of IgY technology study // Poultry Science. 2022. P. 101713. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101713>

15. Polson A., von Wechmar M.B., Van Regenmortel M.H. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens // Immunological communications. 1980. V. 9. № 5. P. 475–493. <https://doi.org/10.3109/08820138009066010>

16. Hussain C.N. Isolation and Estimation of Chicken Immunoglobulins (IgY) from Egg Yolk by Optimizing Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation Method // Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences. 2017. V. 4. P. 286–292. <https://doi.org/10.21276/sjavs>

17. Pauly D., Dorner M., Zhang X. et al. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period // Poultry Science. 2009. V. 88. № 2. P. 281–290. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00323>

18. You Z., Yang H., Xin W. et al. Preparation of egg yolk antibodies against BoNT/B and their passive protection in mouse models // Human vaccines & immunotherapeutics. 2014. V.10, № 8. P. 2321–2327. <https://doi.org/10.4161/hv.29433>

19. Fast D., Schlievert P., Nelson R. Toxic shock syndrome-associated staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins are potent inducers of tumor necrosis factor production // Infect Immun. 1989. V. 57. P. 291–294. <https://doi.org/10.1128/iai.57.1.291-294.1989>

20. Marrack P., Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives // Science. 1990. V. 248, №. 4956. P. 705–711. <https://doi.org/10.1126/science.2185544>

21. Ulrich R.G., Bavari S., Olson M.A. Bacterial superantigens in human disease: structure, function and diversity // Trends in microbiology. 1995. V. 3. № 12. P. 463–468. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)89011-3](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)89011-3)

22. Fraser J., Arcus V., Kong P. et al. Superantigens – powerful modifiers of the immune system. // Molecular medicine today. 2000. V. 6. № 3. P. 125–132. [https://doi.org/10.1016/S1357-4310\(99\)01657-3](https://doi.org/10.1016/S1357-4310(99)01657-3)

23. LeClaire R.D., Hunt R.E., Bavari S. Protection against bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B by passive vaccination. // Infection and immunity. 2002. V. 70. № 5. P. 2278–2281. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.5.2278-2281.2002>

24. Lee S., Lee S.R., Jung K.M., Kim J.W. Production of Immunospecific Egg Yolk Antibody with Recombinant Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) Protein. // Korean Journal of Poultry Science. 2012. V. 39, № 4. P. 273–278. <https://doi.org/10.5536/KJPS.2012.39.4.273>

25. Zhang X.Y., Kurth A., Pauly D. et al. Application of high-titred IgY antibodies in orthopox virus diagnostics // J. Chin. Pharm. Sci. 2008. V. 17. P. 183–191.

26. Yue C. Präventions-und Therapiestrategien gegen Orthopockenviren. 2013. <https://doi.org/10.25646/5289>

27. Каплин В.С., Зайковская А.В., Каплина О.Н. и др. Куриные желточные антитела – перспективный препарат для иммунотерапии // В кн.: Дни иммунологии в Сибири: материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием / Под ред. акад. РАН, проф. Козлова В.А., проф. Смирновой С.В. Новосибирск, Красноярск. 2015. С. 93–94.

Kaplin V.S., Zaikovskaya A.V., Kaplina O.N. et al. Chicken yolk antibodies – a promising drug for immunotherapy // In: Days of immunology in Siberia: materials of XII All-Russian Scientific-Practical Conference with international participation / Eds Academician of the Russian Academy of Sciences, Prof. Kozlov V.A., Prof. Smirnova S.V. Novosibirsk, Krasnoyarsk. 2015. P. 93-94. (in Russian).

28. Pal P. Role of cholera toxin in *Vibrio cholerae* infection in humans-A Review // International Letters

- of Natural Sciences. 2014. V. 22. P. 22–32. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ILNS.22.22>
29. Беспалова И.А., Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Филиппенко А.В., Труфанова А.А. Современное состояние специфической профилактики холеры. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2018. Т. 17. № 98. С. 55–61. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-1-55-61>
- Bespalova I.A., Ivanova I.A., Omelchenko N.D., Filippenko A.V., Trufanova A.A. Modern state of specific prevention of cholera. // Epidemiology and vaccine prophylaxis. 2018. V. 17. P. 55–61 (in Russian).
30. Abbas A.T., El-Kafrawy S.A., Sohrab S.S., Azhar E.I.A. IgY antibodies for the immunoprophylaxis and therapy of respiratory infections. // Human vaccines & immunotherapeutics. 2019. V. 15. № 1. P. 264–275. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1514224>
31. Zhang Y., Wei Y., Li Y. et al. IgY antibodies against Ebola virus possess post-exposure protection in a murine pseudovirus challenge model and excellent thermostability // PLoS Neglected Tropical Diseases. 2021. V. 15. e0008403. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008403>
32. Hirai K., Arimitsu H., Umeda K. et al. Passive oral immunization by egg yolk immunoglobulin (IgY) to *Vibrio cholerae* effectively prevents cholera // Acta Medica Okayama. 2010. V. 64. P. 163–170. <https://doi.org/10.18926/AMO/40008>
33. Megha P.U., Sentila R., Michael A. Generation and Characterization of specific Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY) against microbial bio-terroristic Agent (*Vibrio cholerae*) // Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences. 2014. V. 2. P. 9–12.
34. Barati B., Ebrahimi F., Nazarian S. Production of chicken egg yolk antibody (IgY) against recombinant cholera toxin B subunit and evaluation of its prophylaxis potency in mice // Iranian Journal of Immunology. 2018. V. 15. P. 47–58. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29549232/>
35. Akbari M. R., Ahmadi A., Mirkalantari S., Salimian J. Anti-*Vibrio cholerae* IgY Antibody Inhibits Mortality in Suckling Mice Model // Journal of the National Medical Association. 2018. V. 110. P. 84–87. <https://doi.org/10.1016/j.jnma.2017.04.001>
36. Taheri F., Nazarian S., Ahmadi T.S., Gargari S.L. Protective effects of egg yolk immunoglobulins (IgYs) developed against recombinant immunogens CtxB, OmpW and TcpA on infant mice infected with *Vibrio cholerae* // International Immunopharmacology. 2020. V. 89. P. 107054. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107054>
37. Levine M.M. Monoclonal antibody therapy for Ebola virus disease // New England Journal of Medicine. 2019. V. 381. P. 2365–2366. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMe1915350>
38. Zhang Y., Wei Y., Li Y. et al. IgY antibodies against Ebola virus possess post-exposure protection in a murine pseudovirus challenge model and excellent thermostability // PLoS Neglected Tropical Diseases. 2021. V. 15. № 3. e0008403. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008403>
39. Миронов А.Н., Супотницкий М.В., Лебединская Е.В. Феномен антитело-зависимого усиления инфекции у вакцинированных и переболевших // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2013. № 3 (47). С. 12–25.
- Mironov A.N., Supotnitskiy M.V., Lebedinskaya E.V. The phenomenon of antibody-dependent enhancement of infection in vaccinated and convalescents // Biopreparats (Biopharmaceuticals). 2013. No. 3. P. 12–25 (in Russian).
40. Agumadu V. C., Ramphul K. Zika virus: a review of literature // Cureus. 2018. V. 10. <https://doi.org/10.7759/cureus.3025>
41. Rodenhuis-Zybert I.A., Wilschut J., Smit J.M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity // Cellular and molecular life sciences. 2010. V. 67. P. 2773–2786. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0357-z>
42. Balsitis S.J., Williams K.L., Lachica R. et al. Lethal antibody enhancement of dengue disease in mice is prevented by Fc modification // PLoS pathogens. 2010. V. 6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000790>
43. Fink A.L., Williams K.L., Harris E. et al. Dengue virus specific IgY provides protection following lethal dengue virus challenge and is neutralizing in the absence of inducing antibody dependent enhancement // PLoS neglected tropical diseases. 2017. V. 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005721>
44. Каплина О.Н., Каплин В.С. Использование желточных антител птиц (IgY) для пассивной иммунизации сельскохозяйственных и домашних животных // Ветеринария Кубани. 2018. № 4. С. 19–23.
- Kaplina O.N., Kaplin V.S. Use of avian yolk antibodies (IgY) for passive immunization of farm and domestic animals. // Veterinary medicine of Kuban. 2018. № 4. P. 19–23 (in Russian).
45. Wang Q., Yang Y.A.N.G., Zheng H. et al. Genetic and biological characterization of Zika virus from human cases imported through Shenzhen Port // Chinese Science Bulletin. 2016. V. 61. P. 2463–2474. <https://www.sciengine.com/CSB/article?doi=10.1360/N972016-00665&scroll=>
46. Williams K.L., Sukupolvi-Petty S., Beltramello M. et al. Therapeutic efficacy of antibodies lacking FcγR against lethal dengue virus infection is due to neutralizing potency and blocking of enhancing antibodies // PLoS pathogens. 2013. V. 9. № 2. e1003157. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003157>
47. O'Donnell K.L., Meberg B., Schiltz J. et al. Zika virus-specific IgY results are therapeutic following a lethal zika virus challenge without inducing antibody-dependent enhancement // Viruses. 2019. V. 11. P. 301. <https://doi.org/10.3390/v11030301>
48. Rota P.A., Oberste M.S., Monroe S.S. et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome // Science. 2003. V. 300. P. 1394–1399. <https://doi.org/10.1126/>

science.1085952

49. Fu C.Y., Huang H., Wang X.M. et al. Preparation and evaluation of anti-SARS coronavirus IgY from yolks of immunized SPF chickens // J. Virol. Methods. 2006. V. 133. P. 112–115. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.10.027>

50. Abbas A.T., El-Kafrawy S.A., Sohrab S.S. et al. Anti-S1 MERS-COV IgY specific antibodies decreases lung inflammation and viral antigen positive cells in the human transgenic mouse model // Vaccines. 2020. V. 8. P. 634. doi: <https://doi.org/10.3390/vaccines8040634>

51. Cunha L.E.R., Stolet A.A., Strauch M.A. et al. Potent neutralizing equine antibodies raised against recombinant SARS-CoV-2 spike protein for COVID-19 passive immunization therapy // bioRxiv. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.08.17.254375>

52. Pan X., Zhou P., Fan T. et al. Immunoglobulin fragment F (ab')₂ against RBD potently neutralizes SARS-CoV-2 in vitro // Antiviral research. 2020. V. 182. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104868>

53. Jingchen W., Yunfei L., Ying R. et al. A chicken IgY can efficiently inhibit the entry and replication of SARS-CoV-2 by targeting the ACE2 binding domain in vitro // bioRxiv preprint: <https://doi.org/10.1101/2021.02.16.430255>

54. Wei S., Duan S., Liu X. et al. Chicken Egg Yolk Antibodies (IgYs) block the binding of multiple SARS-CoV-2 spike protein variants to human ACE2 // International immunopharmacology. 2021. V. 90. P. 107172. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107172>

55. Shen H., Cai Y., Zhang H. et al. Anti-SARS-CoV-2 IgY isolated from egg yolks of hens immunized with inactivated SARS-CoV-2 for immunoprophylaxis of COVID-19 // Virologica Sinica. 2021. V. 36. P. 1080–1082. <https://doi.org/10.1007/s12250-021-00371-1>

56. Ge S., Wu R., Zhou T. et al. X. Specific anti-SARS-CoV-2 S1 IgY-scFv is a promising tool for recognition of the virus // AMB Express. 2022. V. 12. № 1. P. 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01355-4>

Об авторе

Федеральный Исследовательский Центр Фундаментальной и трансляционной медицины, Научно-исследовательский институт биохимии. 630117, Российская Федерация, г. Новосибирск, ул. Тимакова, д. 2.

Каплин Владимир Сергеевич. Старший научный сотрудник отдела, канд. биол. наук.

Контактное лицо: kaplinvladimir22@gmail.com

The Use of Avian Yolk Antibodies in the Inactivation of Highly Toxic Components of Biological Weapons and Especially Dangerous Infections

V.S. Kaplin

Federal Research Center Fundamental and Translational Medicine, Research Institute of Biochemistry, 630117, Timakova St. 2, Novosibirsk 630117, Russian Federation

Received May 12, 2022. Accepted June 27, 2022

Currently, Western pharmaceutical companies have mastered the production of licensed drugs based on transovarial chicken specific antibodies (IgY antibodies) intended for the treatment and prevention of infections caused by *Helicobacter pylori*, influenza virus and other pathogens. Of particular interest is the possibility of using IgY antibodies as an inexpensive specific antidote for emergency specific prevention of infections caused by pathogens of dangerous and especially dangerous infections. The purpose of this work is to summarize the results of studies that have shown a high therapeutic potential of transovarial specific immunoglobulins in the treatment and prevention of dangerous viral, bacterial infections and injuries by biological toxins – potential agents of biological weapons (BW). The advantage of using IgY technologies for passive immunization is a non-invasive method for obtaining antibodies, as well as a large amount of them – 20–30 g of immunoglobulins, which can be obtained from one laying hen per year. An important advantage of IgY over immunoglobulins derived from mammalian serum is that they do not interact with complement components, nor with rheumatoid factor, nor with Fc receptors of mammalian immunocompetent cells, which significantly reduces the manifestation of adverse reactions, in particular, antibody-dependent enhancement of infection (ADE). Experiments carried out in vivo and in vitro showed a high activity of IgY antibodies

in suppressing the damaging effect of pathogens of especially dangerous infections and biological toxins. It is shown in the article, that the replacement of mammalian IgG with avian transovarial IgY allows obtaining commercially significant amounts of thermostable specific antibodies that do not cause ADE, and expands the possibilities of methods for specific prevention and treatment of lesions caused by viruses, bacteria, and toxins – potential agents of biological weapons.

Keywords: *biological threats; bioterrorism; passive immunization; IgY-technologies; yolk antibodies; toxin inactivation; transovarian immunoglobulins.*

For citation: *Kaplin V.S. The Use of Avian Yolk Antibodies in the Inactivation of Highly Toxic Components of Biological Weapons and Especially Dangerous Infections // Journal of NBC Protection Corps. 2022. V. 6. No 2. P. 137–151. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2022-6-2-137-151>*

Conflict of interest statement

The author declares that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

Peer review information

The article has been peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board and from Russian Science Citation Index database.

Funding. The review article was prepared as part of the state task of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (registration number 122032300152-3).

The work was performed using the equipment of the Center for Collective Use «Proteomny Analysis», supported by financing of the Ministry of Education and Science of Russia (agreement No. 075-15-2021-691).

References

See P. 147–150.

Author

Federal Research Center Fundamental and Translational Medicine, Research Institute of Biochemistry, Timakova st. 2, Novosibirsk 630117, Russian Federation.

Vladimir Sergeevich Kaplin. Senior Researcher of the Department. Candidate of Biological Sciences.

Contact person: Vladimir Sergeevich Kaplin; kaplinvladimir22@gmail.com