



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00727**

(22) Data de depozit: **15/11/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2024 BOPI nr. **5/2024**

(71) Solicitant:

- **NICOLESCU MARIA- ANCA**,
ȘOS.PANTELIMON, NR.227, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
- **TĂROIU NICUȘOR**, STR.TEILOR, NR.5,
COMUNA COBADIN, CT, RO;
- **GIUGLEA CARMEN**, STR.MUNTELE
MARE, NR.2, BUCUREȘTI, B, RO;
- **PENESCU MIRCEA**, BD.IULIU MANIU,
NR.53, BUCUREȘTI, B, RO;
- **DONISAN ADRIANA- ELENA**,
STR.NICOLAE TITULESCU, NR.1,
BUCUREȘTI, B, RO;
- **NICULESCU CIPRIAN- MITUȘ**,
STR. DRUMUL SĂRII, NR.18, BUCUREȘTI,
B, RO;
- **MOCANU LIVIA**, STR.SFÂNTA VINERI,
NR.29, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

- **NICOLESCU MARIA- ANCA**,
ȘOS.PANTELIMON, NR.227, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
- **TĂROIU NICUȘOR**, STR.TEILOR, NR.5,
COMUNA COBADIN, CT, RO;
- **GIUGLEA CARMEN**, STR.MUNTELE
MARE, NR.2, BUCUREȘTI, B, RO;
- **PENESCU MIRCEA**, BD.IULIU MANIU,
NR.53, BUCUREȘTI, B, RO;
- **DONISAN ADRIANA ELENA**,
STR.NICOLAE TITULESCU, NR.1,
BUCUREȘTI, B, RO;
- **NICULESCU CIPRIAN-MITUȘ**,
STR.DRUMUL SĂRII, NR.18, BUCUREȘTI,
B, RO;
- **MOCANU LIVIA**, STR.SFÂNTA VINERI,
NR.29, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **UTILIZAREA IMUNOGLOBULINELOR Y ÎN TRATAMENTUL
FIBROZEI CHISTICE- INFECȚIA CU PSEUDOMONAS
AERUGINOSA, A INFECȚIEI CU MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS ȘI INFECȚIEI CU HELICOBACTER PYLORI**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la utilizarea imunoglobulinelor IgY mono- sau poli-specifice pentru obținerea unei soluții buvabile pentru tratamentul infecțiilor pulmonare. Utilizarea constă în asocierea a 50...70% IgY anti- *Pseudomonas Aeruginosa*, respectiv, anti- *Mycoplasma*

tuberculosis cu 1...2% Lizozim, 5% Xilitol, 0,5% gumă xantan și apă purificată/ deionizată până la 30 ml.

Revendicări: 3

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



42

UTILIZAREA IMUNOGLOBULINELOR Y IN TRATAMENTUL FIBROZEI CHISTICE- INFECTIA CU PSEUDOMONAS AERUGINOSA, A INFECTIEI CU MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS SI INFECTIEI CU HELICOBACTER PILORII.

Autori : Dr. Maria Anca Nicolescu, ing. Nicusor Taroiu, Conf.Dr. Carmen Giuglea, Prof.Mircea Penescu, Dr. Adriana Donisan. Dr. Andrei Marin, expert Livia Mocanu, ec.Ciprian Niculescu.

Prezentul brevet reprezinta inventia legata de crearea unor game de produse biologice active avand ca principal component activ Imunoglobulinele Y (mono-specifice sau poli-specifice), pentru utilizare orala.

Fenomenul rezistentei la antibiotice sau la antivirale a multor microorganisme, bacterii sau virusi, reprezinta o problema de interes mondial, considerata de catre OMS ca fiind un pericol extrem pentru pierderea de vietii omenesti in urmatoarele decenii.

Aplicarea Tehnologiei IgY in domeniul sanatatii umane este functionala, practica, eficienta, fara consecinte negative asupra organismului uman, si respecta toate principiile etice ale profesiei.

DESCRIERE

Infectia cu Pseudomonas aeruginosa în fibroza chistică.

Fibroza chistică este o boală comună, ereditară și care pune viața în pericol, asociată cu leziuni ale plămânilor, pancreasului și organelor sexuale masculine. Pacienții cu fibroză chistică sunt în special predispuși la infecții pulmonare cronice debilitante cauzate de bacterii precum Pseudomonas aeruginosa. Din cauza pericolului de a dezvolta tulpini rezistente la antibiotice, au fost studiate tratamente alternative la terapia cronică cu antibiotice, inclusiv utilizarea IgY împotriva P. aeruginosa ca metodă de imunizare pasivă. Anti-P. aeruginosa IgY a crescut semnificativ explozia respiratorie mediată de neutrofile și uciderea bacteriană ulterioară a P. aeruginosa in vitro. Anti-P. aeruginosa IgY a inhibat, de asemenea, pneumonia murină atunci când a fost administrată intranasal, după cum se dovedește prin

reducerea sarcinii bacteriene, citokine inflamatorii, inflamația țesutului pulmonar și simptomele clinice, un efect sporit de pretratamentul cu azitromicină. Beneficiul specific IgY anti-P. aeruginosa se crede că este împotriva proteinei flageline implicate în motilitatea, aderența și inflamația P. aeruginosa. La 17 pacienți cu fibroză chistică, tratamentul oral profilactic continuu (soluție făcută gargară timp de 2 minute și înghițită seara) cu IgY specifică împotriva P. aeruginosa pentru prevenirea infecțiilor pulmonare timp de până la 12 ani (114 pacient-ani) a arătat o reducere semnificativă a infecției cu P.aeruginosa comparativ cu 23 de pacienți de control cu fibroză chistică, fără evenimente adverse. Un studiu de fază 3 randomizat, dublu-orb, controlat cu placebo, pe 164 de pacienți cu vârsta de 5 ani și peste cu fibroză chistică, a fost efectuat în 47 de locații europene din 2011 până în 2015 pentru a evalua tratamentul oral cu anti-P aeruginosa IgY soluție de gargară (n=83) vs. placebo (n=81). Medicamentul de studiu urma să fie făcut gargară și apoi înghițit o dată pe zi, seara. Durata studiului (și măsurarea rezultatului primar) a fost până când a fost diagnosticată următoarea infecție cu P. aeruginosa sau 2 ani, oricare dintre acestea a apărut primul. A existat o diferență semnificativă între grupurile de tratament în timp până la prima recurență a infecției cu P. aeruginosa (mediană, 26,3 luni pentru grupul tratat cu IgY) sau obiectivele secundare ale numărului de exacerbări, numărului de zile de boală și utilizării antibioticelor.(1,4,8,9,10,11,12,13,14,15,16,46,48,50,55,56)

Infectia cu Mycobacterium Tuberculosis

Mycobacterium tuberculosis (MBTC) este responsabil pentru dezvoltarea tuberculozei, o boală respiratorie cu potențial fatală, care poate provoca și boli extrapulmonare (de exemplu, a sistemului urinar). MBTC devine din ce în ce mai dificil de tratat din cauza rezistenței la antibiotice. Într-un model de celule mononucleare din sângele periferic de șobolan, administrarea de concentrații mari de IgY anti-MBTC a crescut expresia interleukinei-2 și interferonului. IgY împotriva MBTC poate justifica evaluarea pentru utilizarea în combinație cu alte tratamente imunoterapeutice ale tuberculozei. În plus, IgY poate fi, de asemenea, de interes ca tratament nou al micobacteriilor pulmonare netuberculoase, considerate ca fiind mai

dificil de tratat din cauza intoleranței frecvente la antimicrobiene, toxicităților, rezistenței și interacțiunilor medicament-medicament. (19,20,21,17,18,55)

Infectia cu Helicobacter Pylori

Helicobacter pylori (H. pylori) este o bacterie foarte raspandita care se dezvolta in tractul digestiv si care, ataca mucoasa stomacului. Aproximativ 60% dintre adultii din intreaga lume se confrunta cu aceasta infectie, iar circa 10% dintre acestia dezvolta un ulcer peptic (Mayo Clinic, USA).

Infectia cu Helicobacter Pylori reprezinta o cauza majora a cancerului de stomac.

Perturbarea mecanismelor digestive si imunologice produsa de colonizarea stomacului, cat si necesitatea administrarii de antibiotice in mod repetat, produc efecte nocive asupra pacientilor, motiv pentru care, rezultatele pozitive ale studiilor clinice privind imunizarea pasiva cu IgY specifice anti-Helicobacter Pylori, justifica pe deplin utilizarea acestora in tratarea acestei infectii. (22-29, 30-34, 49, 52).

Proprietățile fizico-chimice ale IgY de pasare.

IgY consumat pe cale orală este considerat a fi GRAS („General Recognized as Safe”) de către U.S. Food and Drug Administration. La nivel biochimic, acest lucru se poate datora faptului că IgY, spre deosebire de IgG, nu are o regiune balama, ci conține o regiune scurtă între segmentele Fa și Fc ale stocului de anticorpi. Această regiune scurtă este bogată în reziduuri de prolină și glicină, permițând doar o flexibilitate limitată. Datorită acestei diferențe, IgY nu este capabilă să se lege de receptorii Fc de la mamifere și, prin urmare, nu provoacă cu ușurință activarea celulelor T. În plus, datorită caracteristicilor sale unice Fc, IgY nu provoacă rezultate fals pozitive sau agregare în imunotestele adesea observate cu utilizarea anticorpilor monoclonali și policlonali de mamifere. Atunci când este utilizat ca agent terapeutic, IgY - spre deosebire de anticorpii de mamifere - de asemenea, nu poate activa cascada complementului de mamifer care

poate provoca liza celulară, chiar și după injecții subcutanate repetitive in vivo. (39,40,38,41,43)

La om, studiile clinice controlate, au arătat că IgY are un profil de siguranță favorabil cu administrarea sa neparentală cunoscută. Tratamentul profilactic continuu printr-o clătire zilnică de gură cu IgY specifică împotriva *P. aeruginosa* la 17 pacienți cu fibroză chistică timp de până la 12 ani (114 pacient-ani) a redus semnificativ infecțiile pulmonare cu *P. aeruginosa* comparativ cu 23 de pacienți controlați cu fibroză chistică, fără efecte adverse. Utilizarea orală a anti-*P. aeruginosa* IgY soluția de gargară de la 83 de pacienți cu fibroză chistică pentru o perioadă mediană de 26,3 luni a dus la un număr și o incidență similare a evenimentelor adverse în comparație cu 81 de pacienți cărora li sa administrat placebo. Studiile clinice suplimentare care arată siguranța favorabilă a IgY administrate pe cale orală includ tratamentul cu un gel care conține IgY anti-*Candida*, tratamentul cu pastile care conțin anti-*P. gingivalis* IgY, ingestia de IgY anti-rotavirus la copii și adolescenți cu diaree cu rotavirus și ingerarea iaurtului care conține anti-*H. pylori* IgY. Administrarea parenterală de IgY nu a fost evaluată, dar poate fi valoroasă ca o singură injecție în situații precum necesitatea tratamentului antivenin. Antiveninul pe bază de IgY administrat parenteral a dus la o protecție completă la modelele animale de mușcături și înțepături veninoase letale.

Stabilitate

Datorită proprietăților sale fizice și biochimice, IgY este protejată de inactivare până la pH 3 (8), căldură până la 60°C și enzime proteolitice. La un pH mai mic de 3, cum ar fi în tractul gastrointestinal, inactivarea IgY este similară cu alte imunoglobuline, dar poate fi redusă la minimum prin încapsulare. IgY poate fi, de asemenea, degradată de proteaza stomacală și pepsină, reducând astfel eficacitatea IgY în tratamentul bolilor gastrointestinale. Cu toate acestea, o varietate de ingrediente de formulare pot crește stabilitatea

IgY. De exemplu, o soluție de 50% de sorbitol este un poliol care este utilizat în mod obișnuit pentru a îmbunătăți stabilitatea proteinelor. Sorbitolul la această concentrație este suficient pentru a preveni inactivarea dependentă de pH a IgY prin întărirea interacțiunilor hidrofobe și prin înconjurarea și prevenirea expunerii aminoacizilor săi aromatici sau carboxilici, situsurile proteolizei pepsinei. Cuplarea polietilenglicolului îmbunătățește stabilitatea la căldură a IgG și, prin urmare, poate crește și rezistența la căldură a IgY. Concentrațiile mari de zaharoză au avut, de asemenea, un efect stabilizator asupra IgY: într-o soluție de zaharoză 50%, activitatea IgY a fost complet prezervată, chiar și atunci când este încălzită la 80°C. Mai mult, încapsularea IgY în lipozomi face IgY rezistentă la condiții acide și pepsină. Microcapsulele de chitosan-alginat administrate oral au protejat, de asemenea, degradarea prematură și au îmbunătățit bioactivitatea și direcționarea IgY către microorganismele din tractul intestinal inferior al porceilor nou-născuți și înțărcați timpurii. Procesul de producție IgY poate oferi o metodă ieftină și rapidă pentru dezvoltarea strategiilor de imunizare profilactică. Relația filogenetică dintre păsări și mamifere nu numai că permite adaptarea IgY ca alternativă la anticorpii de mamifere pentru uz clinic, dar crește și sensibilitatea IgY la antigenele umane pentru diagnostic. Astfel, imunizarea găinilor ouătoare de două ori cu antigenul de interes este suficientă pentru a produce un răspuns umoral care are ca rezultat producerea de cantități mari de molecule IgY specifice în ouăle lor timp de câteva luni. De obicei, găinile mai în vârstă produc un titru mai mare în comparație cu puii mai tineri. După cum s-a menționat anterior, colectarea IgY nu necesită sângerarea pasărilor ouătoare imunizate sau a descendenței acestora, reducând astfel suferința animală și alte considerații etice. Un ou tipic al unei găini imunizate conține aproximativ 100 mg de IgY și o singură găină imunizată depune aproximativ 325 de ouă pe an, rezultând un randament total de producție de până la 40 g de IgY per găină pe an. Estimăm ca fiecare ou poate produce aproximativ 10 doze de

tratament/persoana, variind in functie de indicatie. Două până la 10% din IgY găsită în ouăle găinilor comerciale imunizate este specifică antigenului de interes. O cantitate mult mai mare, 500 mg de IgY per ou, este produsă la găinile lipsite de patogeni specifici, prin urmare procentul de anticorpi specifici este mai mare; nivelurile specifice de IgY pot fi menținute fără inoculare ulterioară a găinii ouătoare până la jumătate de an. IgY poate fi purificată printr-o varietate de metode netoxice, inclusiv diluarea cu apă și precipitarea indusă de pH scăzut, precum și precipitațiile induse de polietilen glicol, sulfat de dextran și gumă xantan sau extracția cu NaCl. Prin urmare, în ceea ce privește impactul asupra mediului, IgY poate fi colectată și procesată eficient la scară industrială fără utilizarea de substanțe chimice dure și producerea de subproduse toxice. Cantități foarte mari de anticorpi IgY pot fi recoltate din ouăle depuse de o singură găină imunizată, iar randamentul total este comparabil cu cantitatea care poate fi colectată de la mamifere mari, cum ar fi caprele și vacile, și de 18 ori mai mare decât cea colectată. de la iepuri. (44,45,47,54)

Observații, perspective.

Utilizarea anticorpilor IgY aviari are implicații importante pentru o gamă largă de aplicații clinice umane și veterinare. Ca instrument de diagnostic, inflexibilitatea structurii IgY previne legarea de factorul reumatoid, care se găsește în IgG de mamifere. Datorită acestui avantaj conferit de structura IgY, utilizarea anticorpilor IgY în imunotestele poate avea ca rezultat mai puțin zgomot de fond, mai puține rezultate false pozitive și scăderea agregării anticorpilor, care sunt probleme frecvente observate atât cu anticorpii monoclonali cât și cu cei policlonali de mamifere. Mai mult, anticorpii IgY au arătat, de asemenea, o specificitate mare de legare și o reactivitate încrucișată scăzută cu alți antigeni comparabile cu standardele actuale ale industriei și pot avea valoare într-o varietate de aplicații pentru detectarea agenților patogeni. IgY a fost explorată ca agent profilactic cu potențialul de a neutraliza agenții patogeni in vivo. Anticorpii IgY

6
Am
CG

Cell

Myra

Amci

36.

pot fi dezvoltați în produse extrem de stabile și concentrate care pot fi evaluate în condiții controlate la subiecți umani și veterinari, cu calea depinzând de ținta intenționată a profilaxiei. Produsele IgY administrate neparenteral, cum ar fi ingerabilele orale, spray-urile nazale și picăturile nazale, pot oferi protecție pe scară largă împotriva agenților patogeni care pot coloniza, infecta sau deteriora tractul gastrointestinal și respirator. Anticorpilor IgY neutralizanți pot justifica, de asemenea, evaluarea pentru a viza agenți patogeni specifici care circulă în fluxul sanguin sau localizați într-o anumită zonă. Deoarece administrarea IgY înainte de infectare s-a demonstrat că are efecte protectoare semnificative in vivo la modelele animale, evaluarea utilizării sale ca terapie profilactică la om este de interes deosebit.

Pe lângă utilizarea în imunoterapia pasivă, anticorpilor IgY s-au dovedit, de asemenea, promițători ca un potențial agent terapeutic pentru un spectru larg de aplicații clinice. IgY specifică a detectat și neutralizat atât antigenele patogene de suprafață, cât și cele interne atunci când sunt administrate după infecție sau consum în mai multe modele preclinice. În majoritatea acestor aplicații, IgY este curativă și are un beneficiu terapeutic mai mare cu o protecție mai mare atunci când este utilizată ca tratament profilactic sau împreună pentru a suplimenta tratamentele standard existente. Limitările IgY includ posibile răspunsuri ale anticorpilor anti-IgY ale gazdei. Administrarea parenterală are potențial pentru boala serului, o reacție de hipersensibilitate mediată de complexul imun. Din cauza distanței filogenetice dintre IgY și imunoglobulinele de la mamifere, IgY nu este capabilă să se lege și să activeze receptorii Fc, factorii reumatoizi și sistemul complement al mamiferelor.

M

H

A
CG

L

Myan

A

A

BIBLIOGRAFIE

1. Carlander D, Sundstrom J, Berglund A, Larsson A, Wretling B, Kollberg H. Immunoglobulin Y (Igy)—a New Tool for the Prophylaxis Against *Pseudomonas Aeruginosa* in Cystic Fibrosis Patients. *Pediatr Pulmonol [Suppl]* (1999) 28:241.
2. Larsson A, Karlsson-Parra A, Sjöquist J. Use of Chicken Antibodies in Enzyme Immunoassays to Avoid Interference by Rheumatoid Factors. *Clin Chem* (1991) 37:411–4. doi: 10.1093/clinchem/37.3.411
3. Ward DJ, Hammond E, Linden-Phillips L, Stevens AJ. Trends in Clinical Development Timeframes for Antiviral Drugs Launched in the UK, 1981–2014: A Retrospective Observational Study. *BMJ Open* (2015) 5:e009333. doi: 10.1136/bmjopen-2015-009333

9
M
A
CG
L
mpu
Amani

33

4. Chang S-C. Clinical Findings, Treatment and Prognosis in Patients With Severe Acute Respiratory Syndrome (Sars). *J Chin Med Assoc* (2005) 68:106–7. doi: 10.1016/S1726-4901(09)70229-1
5. Hemmingsson P, Hammarström L. Nasal Administration of Immunoglobulin as Effective Prophylaxis Against Infections in Elite Cross-Country Skiers. *Scand J Infect Dis* (1993) 25:783–5. doi: 10.3109/00365549309008580
6. Giraudi V, Riganti C, Torales MR, Sédola H, Gaddi E. Upper Respiratory Infections in Children: Response to Endonasal Administration of IGA. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* (1997) 39:103–10. doi: 10.1016/S0165-5876(96)01472-3
7. Heikkinen TA, Ruohola A, Ruuskanen O, Waris M, Uhari M, Hammarström L. Intranasally Administered Immunoglobulin for the Prevention of Rhinitis in Children. *Pediatr Infect Dis J* (1998) 17:367–72. doi: 10.1097/00006454-199805000-00004
8. Collins FS. Cystic Fibrosis: Molecular Biology and Therapeutic Implications. *Science* (1992) 256:774–9. doi: 10.1126/science.1375392
9. Govan JR, Deretic V. Microbial Pathogenesis in Cystic Fibrosis: Mucoïd *Pseudomonas Aeruginosa* and *Burkholderia Cepacia*. *Microbiol Rev* (1996) 60:539–74. doi: 10.1128/MR.60.3.539-574.1996
10. Ulrich M, Worlitzsch D, Viglio S, Siegmann N, Iadarola P, Shute JK, et al. Alveolar Inflammation in Cystic Fibrosis. *J Cyst Fibros* (2010) 9:217–27. doi: 10.1016/j.jcf.2010.03.001
11. Thomsen K, Christophersen L, Bjarnsholt T, Jensen PØ, Moser C, Høiby N. Anti-*Pseudomonas Aeruginosa* Igy Antibodies Induce Specific Bacterial Aggregation and Internalization in Human Polymorphonuclear Neutrophils. *Infect Immun* (2015) 83:2686–93. doi: 10.1128/IAI.02970-14
12. Thomsen K, Christophersen L, Jensen PØ, Bjarnsholt T, Moser C, Høiby N. Anti-*Pseudomonas Aeruginosa* Igy Antibodies Promote Bacterial Opsonization and Augment the Phagocytic Activity of Polymorphonuclear Neutrophils. *Hum Vaccin Immunother* (2016) 12:1690–9. doi: 10.1080/21645515.2016.1145848
13. Thomsen K, Christophersen L, Lerche CJ, Holmgaard DB, Calum H, Høiby N, et al. Azithromycin Potentiates Avian Igy Effect Against *Pseudomonas Aeruginosa* in a Murine Pulmonary Infection Model. *Int J Antimicrob Agents* (2021) 57:106213. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106213
14. Nilsson E, Amini A, Wretlind B, Larsson A. *Pseudomonas Aeruginosa* Infections are Prevented in Cystic Fibrosis Patients by Avian Antibodies Binding *Pseudomonas Aeruginosa* Flagellin. *J Chromatogr B* (2007) 856:75–80. doi: 10.1016/j.jchromb.2007.05.029
15. Nilsson E, Larsson A, Olesen HV, Wejåker P-E, Kollberg H. Good Effect of Igy Against *Pseudomonas Aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis Patients. *Pediatr Pulmonol* (2008) 43:892–9. doi: 10.1002/ppul.20875

16. EU Clinical Trials Register. Clinical Trial Results: Prospective Randomized, Placebo-Controlled, Double Blind, Multicenter Study (Phase III) to Evaluate Clinical Efficacy and Safety of Avian Polyclonal Anti-Pseudomonas Antibodies (Igy), in: *Prevention of Recurrence of Pseudomonas Aeruginosa Infection in Cystic Fibrosis Patients* .
17. Chauhan A, Kumar M, Kumar A, Kanchan K. Comprehensive Review on Mechanism of Action, Resistance and Evolution of Antimycobacterial Drugs. *Life Sci* (2021) 274:119301. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119301
18. Sudjarwo SA, Eraiko K, Sudjarwo GW, Koerniasari E. The Activity of Immunoglobulin Y Anti-Mycobacterium Tuberculosis on Proliferation and Cytokine Expression of Rat Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Pharmacognosy* (2017) 9:S5–8. doi: 10.4103/pr.pr_66_17
19. Sudjarwo SA, Eraiko K, Sudjarwo GW, Koerniasari E. The Potency of Chicken Egg Yolk Immunoglobulin (Igy) Specific as Immunotherapy to Mycobacterium Tuberculosis Infection. *J Adv Pharm Technol Res* (2017) 8:91–6. doi: 10.4103/japtrJAPTR_167_16
20. Shulha JA, Escalante P, Wilson JW. Pharmacotherapy Approaches in Nontuberculous Mycobacteria Infections. *Mayo Clin Proc* (2019) 94:1567–81. doi: 10.1016/j.mayocp.2018.12.011
21. Coleman M. “Using Egg Antibodies to Treat Diseases”. In: Sim JS, Nakai S, Guenter W, editors. *Egg Nutrition Biotechnology*. Wallingford: CABI International (1999). p. 351.
22. Suerbaum S, Michetti P. Helicobacter Pylori Infection. *N Engl J Med* (2002) 347:1175–86. doi: 10.1056/NEJMra020542
23. Wang D, Guo Q, Yuan Y, Gong Y. The Antibiotic Resistance of Helicobacter Pylori to Five Antibiotics and Influencing Factors in an Area of China With a High Risk of Gastric Cancer. *BMC Microbiol* (2019) 19:152. doi: 10.1186/s12866-019-1517-4
24. Marcus EA, Scott DR. Cell Lysis is Responsible for the Appearance of Extracellular Urease in Helicobacter Pylori. *Helicobacter* (2001) 6:93–9. doi: 10.1046/j.1523-5378.2001.00014.x
25. Nomura S, Suzuki H, Masaoka T, Kurabayashi K, Ishii H, Kitajima M, et al. Effect of Dietary Anti-Urease Immunoglobulin Y on Helicobacter Pylori Infection in Mongolian Gerbils. *Helicobacter* (2005) 10:43–52. doi: 10.1111/j.1523-5378.2005.00290.x
26. Shin JH, Yang M, Nam SW, Kim JT, Myung NH, Bang W-G, et al. Use of Egg Yolk-Derived Immunoglobulin as an Alternative to Antibiotic Treatment for Control of Helicobacter Pylori Infection. *Clin Diagn Lab Immunol* (2002) 9:1061–6. doi: 10.1128/CDLI.9.5.1061-1066.2002
27. Malekshahi ZV, Gargari SLM, Rasooli I, Ebrahimizadeh W. Treatment of Helicobacter Pylori Infection in Mice With Oral Administration of Egg Yolk-Driven

31

- Anti-Urec Immunoglobulin. *Microb Pathog* (2011) 51:366–72. doi: 10.1016/j.micpath.2011.06.002
28. Yang Y-H, Park D, Yang G, Lee SH, Bae DK, Kyung J, et al. Anti-Helicobacter Pylori Effects of Igy From Egg York of Immunized Hens. *Lab Anim Res* (2012) 28:55–60. doi: 10.5625/lar.2012.28.1.55
29. Dossumbekova A, Prinz C, Mages J, Lang R, Kusters JG, Van Vliet AHM, et al. Helicobacter Pylori Hoph (Oipa) and Bacterial Pathogenicity: Genetic and Functional Genomic Analysis of Hoph Gene Polymorphisms. *J Infect Dis* (2006) 194:1346–55. doi: 10.1086/508426
30. Franco AT, Johnston E, Krishna U, Yamaoka Y, Israel DA, Nagy TA, et al. Regulation of Gastric Carcinogenesis by Helicobacter Pylori Virulence Factors. *Cancer Res* (2008) 68:379–87. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0824
31. Evans DJ Jr, Evans DG, Takemura T, Nakano H, Lampert HC, Graham DY, et al. Characterization of a Helicobacter Pylori Neutrophil-Activating Protein. *Infect Immunol* (1995) 63:2213–20. doi: 10.1128/IAI.63.6.2213-2220.1995
32. Xun Z, Li-yuan G, Zhibang Y, Xiaoping C. Protective Effects of Sucralfate on Anti-H.Pylori Vaca Igy *in Vivo* and *In Vitro*. *Afr J Microbiol Res* (2010) 4:1091–9.
33. Xia L-J, Yang Z-B, Huang W, Zhang R-F, Jiang R-J, Jiang Y. Preventive Effect of Hpa- Vaca Igy on Intragastric Infection With Helicobacter Pylori in Mice. *Chin J Biol* (2011) 24:34–36+40. (article in Chinese).
34. Suzuki H, Nomura S, Masaoka T, Goshima H, Kamata N, Kodama Y, et al. Effect of Dietary Anti-Helicobacter Pylori-Urease Immunoglobulin Y on Helicobacter Pylori Infection. *Aliment Pharmacol Ther* (2004) 20:185–92. doi: 10.1111/j.1365-2036.2004.02027.x
35. Horie K, Horie N, Abdou AM, Yang JO, Yun SS, Chun HN, et al. Suppressive Effect of Functional Drinking Yogurt Containing Specific Egg Yolk Immunoglobulin on Helicobacter Pylori in Humans. *J Dairy Sci* (2004) 87:4073–9. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73549-3
36. Lee J, Kang H-E, Woo H-J. Stability of Orally Administered Immunoglobulin in the Gastrointestinal Tract. *J Immunol Methods* (2012) 384:143–7. doi: 10.1016/j.jim.2012.06.001
37. Lee KA, Chang SK, Lee YJ, Lee JH, Koo NS. Acid Stability of Anti-Helicobacter Pyroli Igy in Aqueous Polyol Solution. *J Biochem Mol Biol* (2002) 35:488–93. doi: 10.5483/BMBRep.2002.35.5.488
38. Suzuki T, Kanbara N, Tomono T, Hayashi N, Shinohara I. Physicochemical and Biological Properties of Poly (Ethylene Glycol)-Coupled Immunoglobulin G. *Biochim Biophys Acta* (1984) 788:248–55. doi: 10.1016/0167-4838(84)90268-1

M

A

A

12

L

CG

M

A

A

250

39. Shimizu M, Nagashima H, Hashimoto K, Suzuki T. Egg Yolk Antibody (Ig Y) Stability in Aqueous Solution With High Sugar Concentrations. *J Food Sci* (1994) 59:763–5. doi: 10.1111/j.1365-2621.1994.tb08122.x
40. Shimizu M, Miwa Y, Hashimoto K, Goto A. Encapsulation of Chicken Egg Yolk Immunoglobulin G (Igy) by Liposomes. *Biosci Biotechnol Biochem* (1993) 57:1445–9. doi: 10.1271/bbb.57.1445
41. Chang HM, Lee YC, Chen C, Tu YY. Microencapsulation Protects Immunoglobulin in Yolk (Igy) Specific Against Helicobacter Pylori Urease. *J Food Sci* (2002) 67:15–20. doi: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb11351.x
42. Trott D, Yang M, Utterback P, Utterback C, Koelkeback K, Cook M. Utility of Spent Single Comb White Leghorn Hens for Production of Polyclonal Egg Yolk Antibody. *J Appl Poult Res* (2009) 18:679–89. doi: 10.3382/japr.2008-00142
43. Pauly D, Dorner M, Zhang X, Hlinak A, Dorner B, Schade R. Monitoring of Laying Capacity, Immunoglobulin Y Concentration, and Antibody Titer Development in Chickens Immunized With Ricin and Botulinum Toxins Over a Two-Year Period. *Poult Sci* (2009) 88:281–90. doi: 10.3382/ps.2008-00323
44. Schade R, Bürger W, Schöneberg T, Schniering A, Schwarzkopf C, Hlinak A, et al. Avian Egg Yolk Antibodies. The Egg Laying Capacity of Hens Following Immunisation With Antigens of Different Kind and Origin and the Efficiency of Egg Yolk Antibodies in Comparison to Mammalian Antibodies. *ALTEX* (1994) 11:75–84.
45. Akita E, Nakai S. Production and Purification of Fab' Fragments From Chicken Egg Yolk Immunoglobulin Y (Igy). *J Immunol Methods* (1993) 162:155–64. doi: 10.1016/0022-1759(93)90380-P
46. Kubickova B, Majerova B, Hadrabova J, Noskova L, Stiborova M, Hodek P. Effect of Chicken Antibodies on Inflammation in Human Lung Epithelial Cell Lines. *Neuro Endocrinol Lett* (2014) 35:99–104.
47. Pereira EPV, van Tilburg MF, Florean EOPT, Guedes MIF. Egg Yolk Antibodies (Igy) and Their Applications in Human and Veterinary Health: A Review. *Int Immunopharmacol* (2019) 73:293–303. doi: 10.1016/j.intimp.2019.05.015
48. Thomsen K, Christophersen L, Lerche CJ, Holmgaard DB, Calum H, Høiby N, et al. Azithromycin Potentiates Avian Igy Effect Against Pseudomonas Aeruginosa in a Murine Pulmonary Infection Model. *Int J Antimicrob Agents* (2021) 57:106213. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106213
49. Shin JH, Yang M, Nam SW, Kim JT, Myung NH, Bang W-G, et al. Use of Egg Yolk-Derived Immunoglobulin as an Alternative to Antibiotic Treatment for Control of Helicobacter Pylori Infection. *Clin Diagn Lab Immunol* (2002) 9:1061–6. doi: 10.1128/CDLI.9.5.1061-1066.2002
50. Kollberg H, Carlander D, Olesen H, Wejåker PE, Johannesson M, Larsson A. Oral Administration of Specific Yolk Antibodies (Igy) may Prevent Pseudomonas

The bottom of the page contains several handwritten signatures and initials. From left to right, there is a signature that looks like 'M', a signature that looks like 'A', a signature that looks like 'CG', a signature that looks like 'LH', a signature that looks like 'M', and a signature that looks like 'A'. Above the 'A' signature, there is a small number '13'.

Aeruginosa Infections in Patients With Cystic Fibrosis: A Phase I Feasibility Study. *Pediatr Pulmonol* (2003) 35:433–40. doi: 10.1002/ppul.10290

51. Carrillo, W.; Lucio, A.; Gaibor, J.; Morales, D.; Vásquez, G. Isolation of antibacterial hydrolysates from hen egg white lysozyme and identification of antibacterial peptides. *J. Med. Food*. 2018, 21, 808–818.
52. Malekshahi ZV, Gargari SLM, Rasooli I, Ebrahimizadeh W. Treatment of *Helicobacter Pylori* Infection in Mice With Oral Administration of Egg Yolk-Driven Anti-Urec Immunoglobulin. *Microb Pathog* (2011) 51:366–72. doi: 10.1016/j.micpath.2011.06.002
53. Thomsen K, Christophersen L, Bjarnsholt T, Jensen PO, Moser C, Hoiby N. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgY antibodies augment bacterial clearance in a murine pneumonia model. *J Cyst Fibr*. 2016;15:171–178. doi:10.1016/j.jcf.2015.08.002.
54. Kovacs-Nolan J, Mine Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2012;3:163–182. doi:10.1146/annurev-food-022811-101137.
55. Kubickova B, Majerova B, Hadrabova J, Noskova L, Stiborova M, Hodek P. Effect of Chicken Antibodies on Inflammation in Human Lung Epithelial Cell Lines. *Neuro Endocrinol Lett* (2014) 35:99–104.
56. Kollberg H, Carlander D, Olesen H, Wejåker PE, Johannesson M, Larsson A. Oral Administration of Specific Yolk Antibodies (Igy) may Prevent *Pseudomonas Aeruginosa* Infections in Patients With Cystic Fibrosis: A Phase I Feasibility Study. *Pediatr Pulmonol* (2003) 35:433–40. doi: 10.1002/ppul.10290

35

REVENDICARI

1.1. Solutie buvabila sub forma de suspensie/spray nazal sau oral/capsule, administrabila per os, continand Anticorpi Specifici IgY, pentru infectia pulmonara cu Pseudomonas Aeruginosa, combinate cu IgY specifice pentru bacteriile cunoscute a produce infectii pulmonare acute/cronice:

Imunoglobuline Y anti-PSEUDOMONAS AERUGINOSA, (+/- IgY Anti-Stafilococ MRSA, Pneumoniae, Mycobacterium netuberculoase, Acinetobacter baumanii)	50-70%
Lizozim	1 %
Xilitol	5%
Xantan Gum	0,5%
Apa purificata/deionizata	ad 30 ml

1.2. Solutie buvabila sub forma de suspensie/spray nazal sau oral/capsule, administrabila per os, continand Anticorpi Specifici IgY, pentru infectia cu Mycoplasma tuberculosis:

Imunoglobuline Y anti-Mycoplasma tuberculosis	50-70%
Lizozim	2 %

M

A

A

DG

L

M

A

A

Xilitol	5%
Xantan Gum	0,5%
Apa purificata/deionizata	ad 30 ml

1.3. Solutie buvabila sub forma de suspensie/spray nazal sau oral/capsule, administrabila per os, continand Anticorpi Specifici IgY, pentru infectia cu Helycobacter pilori:

Imunoglobuline Y anti-Helycobacter pilori	50-70%
Lizozim	1 %
Xilitol	5%
Xantan Gum	0,5%
Apa purificata/deionizata	ad 30 ml

Justificare Lizozim: enzima formata din 129 de aminoacizi, avand capacitatea de a sparge peretele celulei bacteriene. Este antibacterian pe bacteriile gram + si gram -, prin hidrolizarea proteazei si generarea de peptide antibacteriene, care inhiba cresterea bacteriana. In afara de aceasta, inhiba enzima angiotensin-converting enzyme, antihipertensiv, anti-tumoral, antioxidant, antiviral.

BIBLIOGRAFIE

1. Carlander D, Sundstrom J, Berglund A, Larsson A, Wretling B, Kollberg H. Immunoglobulin Y (Igy)—a New Tool for the Prophylaxis Against Pseudomonas Aeruginosa in Cystic Fibrosis Patients. *Pediatr Pulmonol [Suppl]* (1999) 28:241.
2. Larsson A, Karlsson-Parra A, Sjöquist J. Use of Chicken Antibodies in Enzyme Immunoassays to Avoid Interference by Rheumatoid Factors. *Clin Chem* (1991) 37:411–4. doi: 10.1093/clinchem/37.3.411
3. Ward DJ, Hammond E, Linden-Phillips L, Stevens AJ. Trends in Clinical Development Timeframes for Antiviral Drugs Launched in the UK, 1981–2014: A Retrospective Observational Study. *BMJ Open* (2015) 5:e009333. doi: 10.1136/bmjopen-2015-009333

9

Handwritten signatures and initials are present at the bottom of the page, including a large signature on the left, a signature in the middle, and several other initials and signatures on the right, including one that appears to be 'Amari'.