



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2015 00008**

(22) Data de depozit: **13.01.2015**

(41) Data publicării cererii:  
**30.07.2015** BOPI nr. **7/2015**

(71) Solicitant:  
• **ROMVAC COMPANY S.A.**,  
ȘOS. CENTURII NR. 7, VOLUNTARI, IF, RO

(72) Inventatori:  
• **PĂTRAȘCU IONEL VICTOR**,  
CALEA DOROBANȚI NR. 136-138, AP. 3,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;  
• **CHIURCIU VIORICA**, STR. CIOCÂRLIEI  
NR. 32, BL.24, AP. 36, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;

• **CHIURCIU CONSTANTIN**,  
STR. MIHAI BRAVU NR. 17, AFUMAȚI, IF,  
RO;  
• **OPORANU MARIANA**, DRUMUL TABEREI  
NR. 92, BL. C7, SC. F, AP. 233,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• **TOPILESCU GEORGIANA**,  
STR. MAIOR VASILE BĂCILĂ NR. 13,  
BL. 19, AP. 63, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• **MIHAI IULIANA**, STR. LANTERNEI NR. 95,  
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PRODUCEREA ȘI UTILIZAREA OVOTRANSFERINEI PC2  
(OTF-PC2)**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de obținere a ovotransferinei utilizată ca produs biologic cu proprietăți imunogene. Metoda conform invenției constă în imunizarea unor găini outoare convenționale, cu un amestec de proteine purificate, preparate din corpi bacterieni inactivați, virusuri inactivate sau ciuperci inactivate, în amestec cu un adjuvant, prin administrare intramusculară, și un imunomodulator, prin administrare orală în amestec cu furajul, inocularea cu antigen având loc de trei ori la un interval de 14 zile, după care se recoltează ouăle, se

separă albușurile, care se diluează 1:1 cu apă deionizată, se ajustează pH la 4,5..5, se precipită succesiv cu sulfat de amoniu și acid citric, din care rezultă ovotransferină care este supusă dializei față de o soluție de NaCl 0,15 M, sau se purifică și se concentrează prin filtrare.

Revendicări: 14  
Figuri: 19



## DESCRIEREA INVENȚIEI

### Titlul

## PRODUCEREA ȘI UTILIZAREA OVOTRANSFERINELOR ACTIVE IMUNOLOGIC (OTF-PC-2)

### DOMENIUL TEHNIC:

Imunologie, medicină, tratamente, prevenție, aplicații în biotehnologie

Prezenta invenție descrie producerea și caracterizarea ovotransferinei specifice imunologic OTF-PC2 pentru unul sau mai mulți antigeni pentru care au fost imunizate găinile. Ouăle din care se extrage ovotransferina specifică OTF-PC2 provin de la păsări (*Gallus domesticus*) imunizate cu antigene preparate din bacterii, virusuri, ciuperci, paraziți, venin, alergeni. Prezenta invenție se referă la prepararea OTF-PC2 folosind bacterii rezistente la antibiotice izolate de la pacienți cu semne clinice internați în spitalele din România. Invenția se referă la prepararea unor ovotransferine specifice monovalente sau polivalente din ouă provenite de la găini imunizate cu un antigen sau cu un antigen preparat din mai multe specii de microorganisme. Prezenta invenție se referă la prepararea OTF-PC2 față de antigenele preparate din bacterii, virusuri și ciuperci izolate de la pacienții din spitalele din România rezistente sau nu la antibiotice.

Prezenta invenție caracterizează din punct de vedere imunologic OTF-PC2.

Prezenta invenție este complementara cererii de invenție depusă la OSIM Nr. A/00653 din 28.08.2014.

## PREZENTAREA STADIULUI TEHNICII INCLUSIV

### BIBLIOGRAFIE

Ovotransferina este sintetizată de gena transferin aviara din oviduct. Ca membru al familiei transferinelor, OTF are doi lobi globulari, fiecare conținând câte un loc de cuplare a fierului localizat în inter domeniul despăcat al fiecărui lob.

Pentru a avea activitate antimicrobiană, are funcția de a transporta ioni de fier către embrionul în dezvoltare. Recent s-a dovedit că acest rol este o componentă esențială a

sistemului de apărare antimicrobiană a oului care este dependent de fier. Această proprietate antimicrobiană se poate folosi ca un ingredient la bebeluși, ca un aditiv alimentar și un agent anti microbian pentru îmbunătățirea stării de sănătate a animalelor.

Un spectru larg de bioactivități ca anti fungic, antiviral, anti cancer, anti oxidativ, anti hipertensiv și imunomodulator au fost raportate recent pentru OTF sau peptidele derivate din OTF (8).

În urmă cu mai mult de 60 de ani, o serie de cercetători au arătat că ovotransferina este o proteină care fixează fierul, având efect bacteriostatic [7]. În dezvoltarea lor, bacteriile au nevoie de fier și, datorită proprietăților de legare, OTF este în măsură să împiedice utilizarea fierului de către bacterii [3]. OTF acționează sinergic și cu alte proteine bacteriene, ca lizozimul, prezent în cantitate mare în albuș.

Chiar și forma saturată de fier este activă, iar inhibiția rezultă din aglutinarea de către OTF a bacteriei ai cărei pereți celulari au fost scindați de către lizozim (1).

Până la această dată, până la înregistrarea acestei cereri de brevet nu s-a descris sau semnalat nici o activitate imunologică specifică a OTF.

### **1. Caracteristicile ovotransferinei (14)**

OTF cuprinde două domenii (capătul N- și C- terminal) și fiecare domeniu conține locusuri de fixare. Fiecare domeniu este împărțit în două părți, conținând 160 aminoacizi. OTF conține 15 punți disulfidice care stabilizează structura terțiară a proteinei. OTF transportă fierul, putând fixa ionii de Fe (3+) în asociere cu un anion, de obicei bicarbonat. Fiecare moleculă de OTF poate lega doi atomi de fier, strâns, dar reversibil. Cele două locusuri de legare a fierului sunt asemănătoare, dar nu identice.

Există două tipuri de ovotransferină: apo- și holo-. Apo-transferina nu conține fier, putând fi distrusă prin tratamente fizice și chimice. Holo-transferina este saturată cu fier, complexul fier-ovotransferină, fiind stabil la hidroliza proteolitică și la denaturarea termică [4].

OTF aparține grupului de proteine numite metaloproteinaze care induc formarea de compuși responsabili de șocul termic. Datorită acestei caracteristici, OTF poate fi utilizată în creme și unguente de protecție contra stresului la frig sau la alți factori de mediu.

### **OTF – ca imunomodulator**

Activitatea OTF demonstrează că rolul acestei molecule este strâns legat de importanța fierului. El este un element esențial necesar dezvoltării bacteriilor patogene și celulelor

tumorale. Celulele sistemului imun protejează țesuturile împotriva toxicității, jucând un rol primordial în controlul concentrației acestui metal. Existența de proteine care leagă fierul, ca transferina și ovotransferina, capabile să neutralizeze fierul, duc la eliminarea toxicității metalului prin legarea acestuia [2].

Până la această dată moleculei de OTF i s-a atribuit funcției de legate a fierului și nu cu privire la activități imunologice specifice de a se cupla cu epitopi de pe bacteriile, virusurile și ciupercile din care s-a preparat imunomodulatorul inoculat găinilor pentru imunizare și al căror răspuns se găsește în imunoglobulinele extrase din gălbenuș (IgY) și care, în acest caz la OTF-PC2 se manifestă și la molecula de OTF.

### 1. Funcțiile biologice ale ovotransferinei

#### Activitatea antimicrobiană

Mulți cercetători au demonstrat efectul bacteriostatic, dar și efectul bactericid al lactoferinei și OTF în *vitro* asupra unei game largi de microorganisme incluzând bacterii gram-pozitive și gram-negative aerobe, anaerobe, ciuperci și virusuri ca de exemplu citomegalovirusul uman (HCMV) virusul herpes simplex (HSV1) sau virusul imunodeficienței umane (HIV).

Ellison (1989) a demonstrat că transferinele distrug membrana externă a enterobacteriaceelor gram negative. A fost testată proprietatea lactoferinei și a transferinei de a elibera lipopolizaharide (LPS) marcate radioactiv din peretele celular al bacteriilor *Escherichia coli* și *Salmonella typhimurium*. În plus transferina sporește efectul antibacterian al concentrației de rifampicină, o substanță ce nu penetrează membrana externă a bacteriei. Acest experiment demonstrează că proteine care leagă fierul distrug membrana bacteriilor gram-negative și afectează permeabilitatea acestora [1].

Efectul bacteriostatic al transferinelor a fost asociat cu abilitatea de a lega fierul. Aproape toate bacteriile au nevoie de fier și datorită proprietăților de sechestrare, transferinele sunt în măsură să împiedice utilizarea fierului de către bacterii. De asemenea, ele intervin în blocarea metabolismului carbohidraților la bacterii sau în distrugerea peretelui celular, prin legarea calciului și magneziului. Lactoferina acționează sinergic cu alte proteine antibacteriene precum lizozimul prezent în secreții [6,7].

Proprietatea unor transferine de a dona fier mucoasei duodenale a fost studiată cu ajutorul unei tehnici de incubație în *vitro*.

OTF acționează ca un inhibitor al creșterii unei largi varietăți de microorganisme, mecanismul acțiunii antibacteriene fiind atribuit proprietății sale de a lega și reține Fe care este esențial pentru creșterea bacteriană. Autorii au demonstrat că apo-OTF, Cu-OTF și Zn-OTF au produs inhibiții considerabile asupra creșterii culturilor de *E. coli* și *Staphylococcus aureus*.

S-a studiat efectul OTF asupra creșterii bifidobacteriilor. Creșterea acestora este stimulată de adăugarea în mediu a apo-transferinei, Cu-ovotransferinei sau Fe-OTF. Dintre speciile testate, *B. breve* și *B. bifidum* au fost cele mai sensibile.

Până la acesta dată nu a existat nici o lucrare de specialitate care să menționeze faptul ca moleculele de ovotransferina pot fi modulate pentru a răspunde imun la antigenii cu care a fost imunizata găină. Nu exista lucrări care să menționeze faptul că ovotransferina reacționează imun, simultan și specific, pentru fiecare în parte față de mai mulți antigeni care au fost folosiți pentru imunizarea găinilor de la care provin ouăle. În aceste condiții răspunsul imun al ovotransferinei este polispecific. Această reacție imună față de mai mulți antigeni odată este caracteristica găinilor și se regăsește în IgY. IgY se găsește numai în serul găinilor și în gălbenuș.

Nu exista nici o informare științifică potrivit căreia ovotransferinele pot inhiba specific creșterea „in vitro” a bacteriilor și ciupercilor.

### **Bibliografie**

- 1) ELISON R.T. (1994) – The Effects of Lactoferrin on Gram Negative Bacteria – Br. J. Exp. Path 70, 697-704
- 2) EVANS R. W., XIAOLE KONG, R.C. HIDER (2012) – Iron mobilization from transferrin by therapeutic iron chelating agents – Bioch. Bioph. Act, 1820, 282-290
- 3) GUO M., I. HARVER, W. YANG, L. COGHILL, D.J. CAMPOPIANO J., A. PARKINSON, R.R. MAC GILLIVRARY, W.R. MARRIS, P.J. SADLER (203) – Sinergic anion and metal binding to the ferric ion – binding protein from *Neisseria gonorrhoeae*. J. Biol. Chem. 278: 2490 – 2502.
- 4) PERRANDIN J. P. (1983) – Lactoferrin, J. of Pediatric Gastromicrobiology and Nutrition, Raven Press, New York
- 5) REITER B., J.H. BROCK and E.D. STEEL (1975) – Inhibition of *Escherichia coli* by bovine colostrum and post-colostral milk. II The bacteriostatic effect of lactoferrin on a serum susceptible and serum resistant strain of *E. coli*. Immunology, 28: 83-95

- 6) VACHIER M.C., M. PIOT, O.J. AWADE (1995) – Isolation of hen egg white lysozyme, ovotransferrin and ovoalbumin, using a quarternary ammonium bound to a highly crosslinked agarose matrix. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 664 : 201-210
- 7) WARNER R.C. (1954) – Egg proteins. în the Proteins. H. Neurath and K. Bailey, ed. Acad. Press, New York, NY.
- 8) Jianping Wu , Alexandra Acero-Lopez. Ovotransferrin: Structure, bioactivities, and preparation Food Research International. Volume 46, Issue 2, May 2012, Pages 480–487
- 9) Pătrașcu Ionel Victor, Viorica Chiurciu, Chiurciu Constantin, Mariana Oporanu si Georgiana Topilescu. PRODUCEREA ȘI UTILIZAREA OVOTRANSFERINEI MODERNE (OTF-M)
- 10) **Broșura 1: Începutul erei post-antibiotice.** Dr. Ionel Victor Pătrașcu, Dr. Viorica Chiurciu, Ing. Chim Constantin Chiurciu, Dr. Georgiana Topilescu, Biol. Mariana Oporanu, Dr. Bogdan Frunzăreanu, Dr. Mădălina Loredana Manea, Biotech. Andreea Dinu, Biochim. Gabriel Oltean.
- 11) **Broșura 2: Recomandări privind utilizarea ca mijloc de tratament, a produselor din gama Imunoinstant și a Oului Hipeimun PC2.** Dr. Ionel Victor Pătrașcu, Dr. Viorica Chiurciu, Ing. Chim Constantin Chiurciu, Dr. Georgiana Topilescu, Dr. Ionuț Bădică, Drd. Chim. Iuliana Mihai, Dr. Biol. Elena Popa, Dr. Victor Anghelescu Codruț.
- 12) **Broșura 3: Imunoinstant și Oul hiperimun PC2, un aport în dezvoltarea științifică medicală modernă.** Dr. Ionel Victor Pătrașcu, Dr. Viorica Chiurciu, Ing. Chim Constantin Chiurciu, Dr. Georgiana Topilescu, Dr. Ionuț Bădică, Drd. Chim. Iuliana Mihai, Dr. Biol. Elena Popa, Dr. Victor Anghelescu Codruț.
- 13) Dr. Ionel Victor Pătrașcu, Dr. Viorica Chiurciu, Ing. Chim Constantin Chiurciu, Biol. Mariana Oporanu, Dr. Georgiana Topilescu, Dr. Bădică Ionuț., Drd. Chim. Iuliana Mihai, Biotech. Andreea Dinu și Georgiana Radu. Oul hiperimun PC2 și imunosenescența. Forumul Internațional de Medicină Integrativă cu participare internațională MEDICINA INTEGRATIVĂ ȘI TERAPIILE ANTI-AGING ediția IV-a. București 26-29 noiembrie 2014 Amfiteatrul Academiei Române.

### **Patente privind prepararea ovotransferinei**

14. PRODUCEREA ȘI UTILIZAREA OVOTRANSFERINEI MODERNE (OTF-M)  
Inventatori: Pătrașcu Ionel Victor, Viorica Chiurciu, Chiurciu Constantin, Mariana Oporanu si Georgiana Topilescu. OSIM Nr. A/00653 din 28.08.2014.

## INVENȚIA PE SCURT

### Formularea pe scurt a soluțiilor tehnice

Obiectivul prezentei invenții este ovotransferina PC2 imunologic activă, specifică că produs și metoda de preparare a acesteia, OTF PC2 imunologic activa specifică față de antigene bacteriene sensibile sau rezistente la antibiotice, antigene virale, ciuperci. Tulpinile bacteriene sau virale provin de la pacienți cu semne clinice internați în spitale din România sau standarde internaționale provenite de la ATCC-USA.

Pentru prepararea OTF-PC2 specifice a fost realizat un program intensiv de cercetare care a urmărit: obținerea OTF-PC2 care să acționeze specific asupra mai multor epitopi și aplicarea unor metode de control care să permită evaluarea corectă a acțiunii acestora asupra antigenului dat (9, 10). Antigenul monovalent sau polivalent a fost utilizat în amestec cu adjuvant QS21 și a unui imunomodulator numit aici P, conform metodologiei prezentate în **brevetul de invenție depus la OSIM (14) față de care acest brevet de invenție este complementar.**

Folosind tehnici de laborator seroaglutinarea rapidă și seroaglutinarea lentă, testul de imunodifuziune în gel de agar, testul de identificare ELISA și testul de specificitate ELISA precum și testul de inhibiție a creșterii bacteriilor IMB-PaChi s-a reușit să se caracterizeze o formă nouă de ovotransferina a cărei moleculă acționează specific cu fiecare dintre antigenii folosiți la imunizarea găinilor. Răspunsul găinilor decelat la OTF - PC2 extrasă din albuș cu metoda clasică cu alcool poate fi monovalent sau multiplu și este similar răspunsului imun la imunoglobulinei (Ig) extrasă din gălbenuș (Y) numită IgY.

Cu aceasta ovotransferina PC2 se pot realiza diferite produse dintre care OTF-PC2 liciid, OTF-PC2 concentrat, OTF-PC2 liofilizat, OTF-PC2 gel, OTF-PC2 lichid pentru inhalatii precum și o formă de administrare orală care să acționeze în organism anti-tumoral, anti-oxidant, ca imunomodulator, factor de transfer sau peptide specifice.

Prezenta invenție se referă la producerea și caracterizarea OTF-PC2 din albuș de ou a căror etape de extragere sunt prevăzute în Brevetul de invenție (14). La această documentație se adaugă utilizarea unui imunomodulator numit P, administrat oral, care stimulează răspunsul imun al găinilor.

OTF-PC2 reacționează specific simultan pentru unu sau mai mulți antigeni cu care a fost imunizată găina.

Unul dintre obiectivele prezenței invenției este de a înregistra OTF-PC2 ca produs biologic și a înregistra metoda de preparare a acestuia.

## **DESCRIEREA SUMARĂ A PROCEDURILOR**

Acestui brevet se caracterizează ca produs OTF-PC2 în baza descrierii de mai jos:

### **Anexa # 1.**

Imunizarea găinilor se face cu un amestec de proteine purificate preparate din corpi bacterieni inactivați, virusuri inactivate sau ciuperci inactivate în amestec cu adjuvant Q-21, amestec administrat intra muscular și un imunomodulator P administrat oral în amestec cu furajele.

Proteinele microbiene în totalitatea, în amestec nu pot fi mai mult de 200 mg per ml diluate în PBS și în amestec cu adjuvant Q-21 mg per doza.

Imunizarea fiecărei găini se face cu 2 ml de inocul, în 4 puncte diferite în musculatura pectorală. Imunizarea de mai repeta de două ori la intervale de 14 zile.

În toată perioada de timp se administrează furaje combinate pulbere ad libitum în care se adaugă 0.5g de imunomodulator uscat la 1.000g furaj, amestecat uniform.

Controlul răspunsului imun se face prin prelevare de sânge sau direct prin controlul ouălor recoltate de la găinile imunizate. Albușul și gălbenușul de la un amestec de 10 (zece) ouă se folosește la control.

Din amestecul de albuș de la 10 ouă și respectiv gălbenuș de la aceleași ouă se preleva 5 ml de amestec din care extrage IgY și respectiv OTF fiecare după metoda menționată în tehnologia brevetată (1,2). Extrasul din gălbenuș numit IgY și respectiv extrasul din albuș numit OTF sunt controlate pentru răspunsul imun folosind testul ELISA.

La un interval de 14 zile de la ultima imunizare începe să se recolteze ouă hiperimune PC2 care se vor folosi în diferite scopuri.

### **Anexa nr 2.**

**Prepararea ovotransferinei PC2 după tehnica de precipitare cu sulfat de amoniu și acid citric.**



Prezintă obținerea ovotransferinei specifice prin diluarea albușului și precipitarea în două etape cu sulfat de amoniu și acid citric în diferite concentrații (2) și caracterizarea acesteia prin metode biochimice și imunologice:

- a) Identificarea și măsurarea conținutului în proteină totală prin metoda Bradford și spectrofotometric.
- b) Identificarea OTF-PC2 prin testul de imunodifuzie în gel de agar, față de ser de iepure anti-pasăre în comparație cu OTF-substandard Romvac
- c) OTF-PC2 specifică identificată prin testul ELISA folosind conjugat monoclonal anti OTF
- d) OTF-PC2 specifică identificată prin testul de inhibiție a multiplicării bacteriene (IMB-PaChi) folosind culturi bacteriene standard ATCC.

## DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

Extragerea ovotransferinei din albușul ouălor provenite de la găini imunizate cu un antigen dat are și rațiune economică, având un cost redus. În acord cu prezenta invenție, prepararea ovotransferinei specifice cuprinde o serie de etape dintre care: prepararea antigenului (1), imunizarea găinilor ouătoare convenționale sau SPF (2), extragerea și purificarea parțială a ovotransferinei (3), evaluarea calitativă și cantitativă a anticorpilor (4).

### 1. Prepararea antigenului

În acord cu prezenta invenție, sunt din colecțiile de referință ATCC s-au izolate de la pacienți tulpini bacteriene rezistente la antibiotice, ciuperci sau virusuri. Celulele bacteriene sau ciupercile sunt cultivate pe medii selective, se recoltează, se inactivează cu formol sau termic, se spală cu tampon fosfat (PBS) de trei ori și se centrifughează la 4000 rpm timp de 15 minute. Sedimentul se resuspendă în PBS la concentrația predeterminată. Suspensia virală se inactivează cu BPL 6000 și se concentrează prin precipitare. Se centrifughează la 6000 rpm timp de 30 minute la +4°C și se resuspendă în PBS la concentrația de 40mg/ml.

### 2. Imunizarea găinilor ouătoare convenționale sau SPF

Antigenul se administrează prin inocularea intramusculară a câte 0,5 ml în patru puncte diferite în musculatura pieptului la găinile ouătoare convenționale sau SPF. Antigenul se inoculează de trei ori la interval de 14 zile. După a doua administrare se testează Prezenta anticorpilor specifici în sânge și ou prin testele ELISA și ID. Recoltarea ouălor se face la un interval de 14 zile de la a treia inoculare de antigen, când titrul anticorpilor se evaluează periodic din ouă provenind de la găinile imunizate cu antigenul dat.

Obținerea ovotransferinei din albușul care provine de la găinile imunizate cu antigenul dat se poate face la volume mari fără investiții considerabile.

Tehnica de imunizare a găinilor ouătoare cu un anumit antigen este bine cunoscută. Prezenta invenție poate folosi orice fel de metoda de imunizare a găinilor care permite administrarea antigenului dat prin orice cale de administrare: subcutanată, intracutanată, intramusculară, intravenoasă.

În prezenta invenție s-a folosit ca adjuvant QS21. Se pot folosi și alte tipuri de adjuvanți, cum ar fi adjuvantul Freund complet sau incomplet sau o combinație a acestora.

Folosirea adjuvantului QS21 în amestec cu antigenul dat. Crește răspunsul imun, nu produce reacții locale și s-a dovedit foarte eficient în producerea și menținerea unui titru mare pentru o lungă perioadă de timp. Pentru un răspuns complex al găinilor la antigenul dat se folosește și un imunomodulator de tip P administrat în furaje pe toată perioada de imunizare.

## 1. Prepararea ovotransferinei din albuș

În acest brevet s-a urmărit o procedură simplă care să permită conservarea cantitativă și calitativă a ovotransferinei obținută din ouă provenite de la găini imunizate cu un anumit antigen. După imunizarea găinilor se extrage albușul.

În prezenta invenție, gălbenușul se separă de albuș. Albușul se diluează 1:1 cu apă deionizată, se omogenizează și se ajustează pH-ul la 4,5-5,0; ovomucina este înlăturată prin menținerea albușului diluat timp de 12 h la 4 °C. Ovotransferina a fost obținută prin precipitare cu sulfat de amoniu 5% (w/v) urmată de precipitare cu acid citric 2% (w/v). Precipitatul colectat în urma centrifugării se dizolva în apă deionizată și reprecipitat cu sulfat de amoniu 2% (w/v) și acid citric 1,5% (w/v). Depozitul rezultat în urma centrifugării este supus dializei față de o soluție de NaCl 0,15M sau se purifica și se concentrează prin filtrare tangentială pe carete de 30kDa.

Ovotransferina este testată din punct de vedere calitativ și cantitativ. Determinările cantitative se referă la testarea conținutului în proteina totală prin metoda Bradford, spectrofotometric, imunodifuzie radială și ELISA. Determinările calitative se fac prin testul ELISA și IMB-specific PaChi.

Prin această metodă de extragere a OTF-PC2 se menține structura naturală și stabilitatea ovotransferinei. Metoda este simplă, iar ciclul de extracție scurt.

## **MODELE RECOMANDATE DE FOLOSIRE ȘI CARACTERIZARE A INVENȚIEI**

Exemplele de mai jos au drept scop ilustrarea și nu au intenția de a limita scopul prezenței invenției.

### **Exemplul 1**

#### **Prepararea OTF-PC2**

**Prepararea OTF-PC2 este descrisă în cererea de brevet de invenție Nr. A/00653 din 28.08.2014.**

Găinile vor fi hrănite cu furaje în care se adaugă și un imunomodulator de tip P pe toată perioada de imunizare.

### **Exemplul 2**

#### **Condiționarea OTF – PC2M**

Condiționarea OTF-PC2 se face după metoda descrisă în cererea de brevet Nr. A/00653 din 28.08.2014.

### **Exemplul 3**

#### **Controlul final al OTF-PC2**

- a) Pentru forma finală a OTF-PC2 în soluție pentru administrări cutanate, intranazale, oro-faringo-gastro-intestinal se folosesc următoarele metode de control:
- Sterilitate microbiologică;
  - Stabilirea activității specifice a OTF-PC2 folosind testul ELISA, RSAR sau RSAL.
  - Stabilirea conținutului de OTF folosind testul ELISA;
  - Stabilirea activității de inhibare a multiplicării bacteriene folosind testul IMB-specific PaChi
- b) Se admit în consum uman numai seriile de OTF-specific care corespund controalelor efectuate.

OTF preparat din oul hiperimun PC2 s-a dovedit a avea capacitatea de a reacționa specific cu epitopi de pe bacteriile, virusurile și ciupercile cu care au fost imunizate găinile, asemănătoare cu a imunoglobulinelor (IgY) extrase din gălbenușul aceluiași ouă.

### **Experimentul nr. 4.**

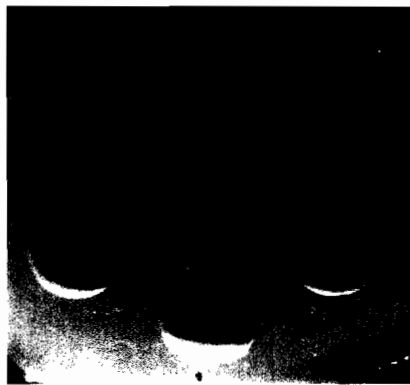
#### **Testul de imunodifuziune în gel de agar Oucelony pentru evidențierea IgY nespecific**

##### **Principiu:**

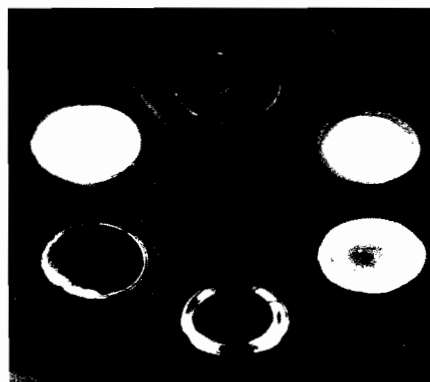
- c) Testul ID se bazează pe migrarea în gelul de agar a antigenului (IgY) și anticorpilor (ser de iepure anti IgY) care la locul de contact se combina specific și formează un precipitat care se vizualizează sub forma unei linii de precipitare.

Toate controalele executate folosind testul de imunodifuziune în gel de agar au avut drept scop identificarea ovotransferinei PC2 față de etaloane internațional, formarea subetalonului Romvac. Aceste controale fac parte din prima categorie de controale care au fost folosite pentru identificarea moleculelor de OTF-PC2 și confirmarea dacă sunt sau nu parte din transferine.

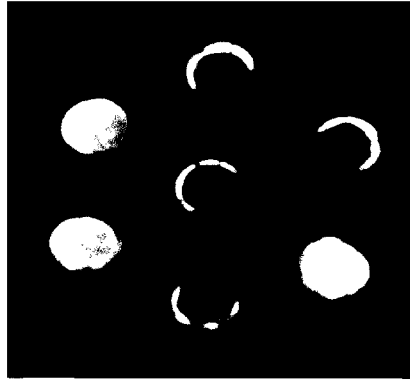
Comentariul pentru fiecare reacție este sub poză.



Testul ID cu IgG de iepure anti găină. IgG a fost pus în godeul central. În godeurile 1-6 s-a repartizat OTF -PC2 anti S.aureus subetalon ROMVAC în diluții binare. Pe această placă sunt diluțiile de la 1:64 în sus. Se constată linii de reacție de precipitare la diluțiile 1:64, 1:128 și 1: 256 și o slabă reacție la diluția următoare de 1:512. Reacția pozitivă în ID la diluția 1:256 ne arată o reactivitate puternică a OTF-PC2 seria declarată subetalon ROMVAC.



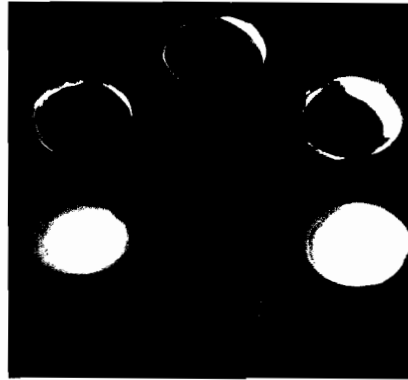
Reacția de ID a OTF-PC2 preparat după tehnica clasică descrisă în acest brevet și un preparat nou OTF-PC2 preparat cu extracție cu PEG. Serul IgG anti găină a fost repartizat în godeurile 1, 4 și central. În godeul 2 este OTF-PC2 extras cu PEG în supernatant, în godeurile 3 și 5 este OTF-PC2 subetalon ROMVAC iar în godeul 6 este OTF PC2 sediment din produsul extras cu PEG. Se vede din reacție ca liniile de precipitare de la ambele produse supernatant și sediment de la produsul OTF-PC2 și subetalonul de referință au reacționat asemănător și se unesc. Această linie de precipitare care se unește este dovada că aceste produse conțin aceleași proteine și au reacționat identic în spațiul de migrare.



Test de identificare OTF. În godeurile 1, 4 și central a fost repartizat IgG antipasăre. În godeul 5 a fost repartizat OTF-MyBiosource, USA. Iar în godeurile 2,3 și 5 OTF PC2 subetalon ROMVAC. În acest control se vede că toate probele de OTF au reacționat în testul ID față de IgG anti pasăre. Linia de precipitare a OTF My Biosource s-a unit cu linia de precipitare a OTF-PC2 anti S. aureus subetalon ROMVAC.



În acest control folosind testul de ID etalonul de referință internațional provine de la Abcam USA. În godeurile 1, 4 și central s-a repartizat IgY de iepure anti găină. În godeul 2 s-a repartizat OTF-PC2 subetalon ROMVAC, în godeul 3 s-a repartizat OTF-ABCAM-USA, în godeul 5 s-a repartizat OTF-PC2 sediment din precipitat cu PEG iar în godeul 6 supernatant din OTF-pc2 precipitat cu PEG. Se constată ca toate probele de OTF au reacționat pozitiv cu IgG anti găina. Se constată că linia de precipitare dintre godeul 2 și 3 se unesc, sunt duble. Linia de precipitare dintre godeurile 5 și 6 se unesc. Pe această imagine obținută în microreacție se vede că OTF extras prin precipitare cu PEG este mai concentrat și împins linia de reacție către godeul central.



Controlul comparativ al reacției cu IgG anti găină de iepure și IgY-multiplu PC2 și OTF-PC2 anti S. Aureus. În godeurile 1,4 și central a fost repartizat IgG anti găină. În godeurile 2 și 6 a fost repartizat OTF-PC2 subetalon Romvac iar în godeurile 3 și 5 IgY- Multiplu PC2. Reacția dintre IgG de iepure și OTF-PC2 subetalon este puternică, de culoare ușor roșiatică reacție care nu se unește cu reacția de precipitare a IgY care este de culoare albă și pe altă locație în placă. Acest test dovedește că în probele OTF-PC2 nu există imunoglobuline sau proteine identice cu IgY.

## Experimentul nr 5

### Testului rapid de seroaglutinare

Testul de seroaglutinare rapidă este, în acest caz, de o importanță științifică deosebită. Această metodă a fost descoperită de Max von Gruber în 1896 și îmbunătățită de Herbert Edward Durham (1945). Cercetătorii au descoperit că serul provenit de la subiecți trecuți prin boală sau de la animale imunizate aglutinează bacteriile dintr-o cultură proaspătă de 24 de ore sau dintr-o suspensie de bacterii inactivate termic sau cu formol și care a fost purificată prin spălare cu apă deionizată sau PBS.

Reacția de precipitare se datorează anticorpilor specifici sau a altor molecule care se comportă asemănător. Anticorpilor sau alte molecule se cuplează de bacterii și le unește între ele dând naștere la formațiuni mari de precipitare vizibile cu ochiul liber.

Seroaglutinarea rapidă se folosește în microbiologie pentru identificarea serului sau a bacteriilor. În acest scop trebuie să existe în laborator o componentă cunoscută. În cazul studiilor noastre s-a folosit în laborator cultură de S. enteritidis de referință inactivată cu formol și spălată cu PBS, conservată la +4°C.

Pentru studiul OTF-PC2 s-a luat în considerație că numai o activitate specifică față de epitopii de pe suprafața bacteriilor pot să producă o aglutinare așa cum produc anticorpilor și în cazul IgY-specific.

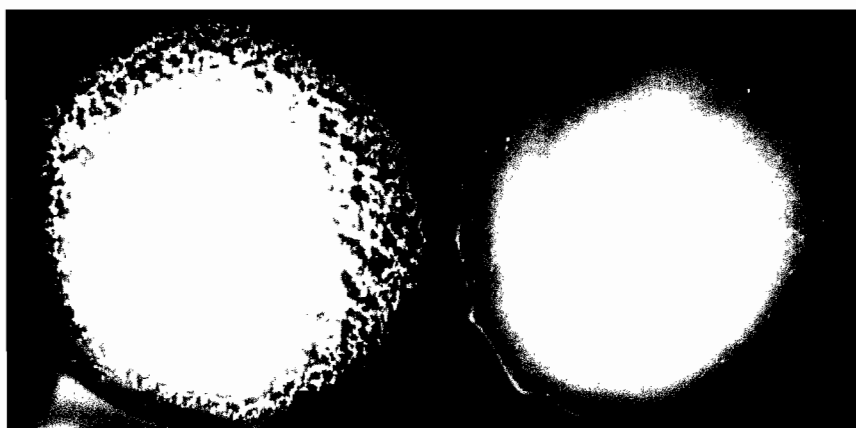


Reacția s-a produs după ce reagenții au fost păstrați 2 ore la temperatura camerei. Pe o placă de seroprecipitare s-au pus în godeul de reactivi câte două picături de antigen după care s-au pus separat câte două picături de OTF-SPF ca martor negativ și două picături de OTF-PC2 pozitiv S. enteritidis.

Reacția de aglutinare a fost evidentă după 2-3 minute de când s-au pus în reacție reagenții iar la probă martor negativ care este reprezentată de OTF-SPF extras din ouă care provin de la păsări SPF reacția a fost negativă.

Pozitiv

Negativ



În acest control serologic s-a folosit ca antigen, antigen purificat de Salmonella enteritidis peste care s-a pus OTF-PC2. În 3 minute a apărut reacția de seroaglutinare care s-a văzut cu ochiul liber. În godeul separat s-a folosit OTF preparat din albușul de la ouă SPF și care este negativ la acest test. OTF-SPF care nu conține anticorpi specifici pentru germeni care s-au folosit la imunizarea găinilor se folosește ca martor. Menționăm că OTF PC2 monospecific preparat pentru alți antigeni nu au reacționat pozitiv pentru S. enteritidis.

## Exemplul 6

### A. Determinarea cantitativă a OTF-PC2 prin testul ELISA indirect

Testul ELISA se pregătește "în house" special pentru fiecare test în parte. Cantitatea minimă decelată de OTF-PC2 este 10 nanograme în materialul testat. Datorită specificității și reproductibilității reacției imunoenzimatică, testul ELISA se folosește în procesul de producție al OTF, pe faze de producție, în controlul calitativ și cantitativ.

a) Testul ELISA care urmează a fi folosit în controlul cantitativ al OTF se realizează prin comparație cu un etalon internațional OTF (USA) sau comparativ cu un subetalon OTF preparat la Romvac.

b) Godeurile se căptușesc cu 150  $\mu$ l IgG de iepure anti pasăre la concentrația de 3,75  $\mu$ m/ml în tampon carbonat-bicarbonat;

- c) Plăcile cu 96 de godeuri ELISA se incubează 90 minute la +37 °C;
- d) Se spală de patru ori cu câte 300 µl PBS-Tween folosind un spălător automat de plăci;
- e) În fiecare godeu se adaugă 200 µl de 1% BSA în PBS-Tween și se incubează 45 de minute la +37 °C;
- f) Placa de reacție se spală de patru ori cu PBS-Tween conform d);
- g) Se adaugă în triplicat câte 150 µl OTF-M specific sau OTF SPF (25, 12,5, 6,25 µg/ml) în PBS;
- h) În paralel se adaugă în triplicat câte 150 µl OTF standard SIGMA (25, 12,5, 6,25 µg/ml);
- i) Plăcile sunt incubate la +37 °C pentru 90 de minute;
- j) Plăcile se spală de patru ori cu PBS-Tween;
- k) Se adaugă 150 µl IgG anti IgY conjugat cu peroxidază la diluția 1:5000;
- l) Se adaugă 150 µl TMB și se incubează 5-15 minute la temperatura camerei, la întuneric
- m) Se blochează reacția cu 150 µl HCl;
- n) Reacția se citește la spectrofotometru cu filtru DO<sub>450</sub>;
- o) Se fac curbe standard comparative, considerându-se diluția maximă pozitivă 0,200 DO.

#### **A. Determinarea cantitativă a OTF-PC2 prin testul ELISA direct**

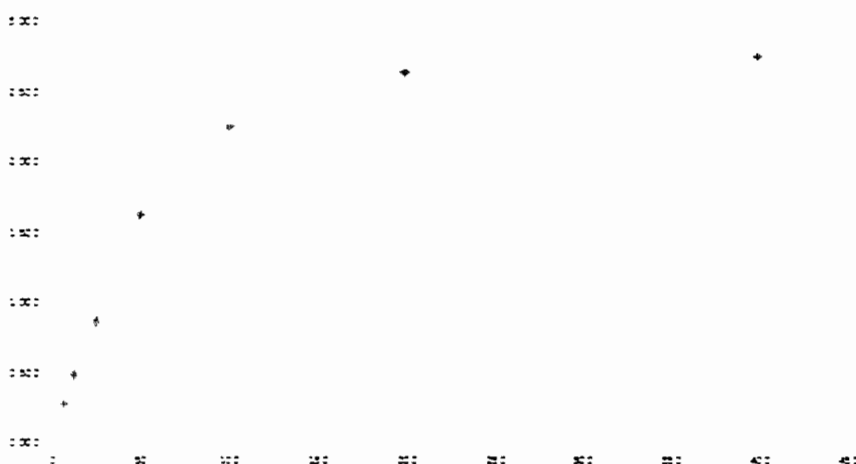
- a) Placa se căptușește peste noapte la +4°C sau în 2 ore la temperatura camerei cu OTF de testat și cu OTF etalon în trei replicat fiecare, în diluții binare începând cu diluția 1:1000 în soluție carbonat-bicarbonat;
- b) Godeurile A1 și H1 se păstrează ca martori pentru OTF;
- c) Se spală de 3 ori cu soluție de spălare;
- d) Se adaugă 100 µl de conjugat anti pasăre diluat 1:5000;
- e) Se incubează placa 2 ore la +37 °C;
- f) Se spală de 4 ori cu soluție de spălare;
- g) Se adaugă 100 µl TMB și se lasă la temperatura camerei 5-15 min;
- h) Se adaugă 100 µl soluție de stopare;
- i) Se citește absorbanta reacției la un spectrofotometru cu filtru de 450 nm.

j) Interpretarea reacției se face prin controlul godeurilor blank unde DO<sub>450</sub> trebuie să fie maximum de 0,060. În cazul când sunt alte valori reacția nu se validează.

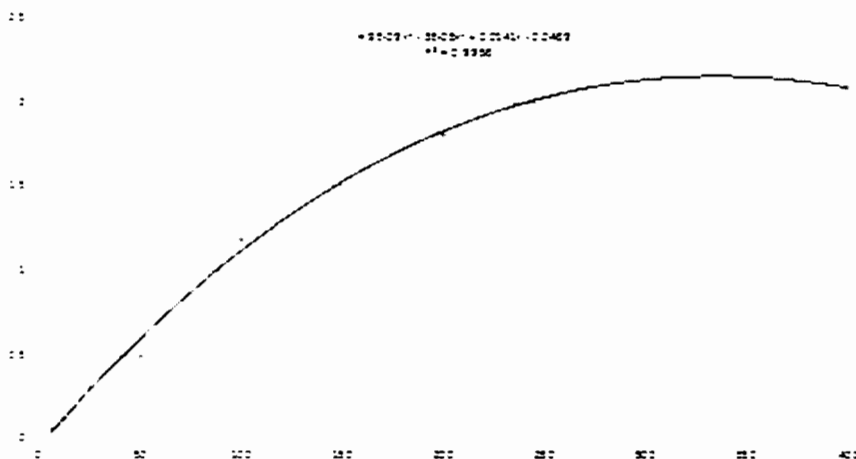
k) Se consideră ca reacție pozitivă pentru Prezentă OTF, diluția la care DO<sub>450</sub> este de 0,200 față de OTF standardul internațional.

l) Conținutul în μg/ml de OTF se face în raport cu OTF de referință, ținând cont de faptul că ELISA decelează minimum 10 ng/ml și se face prin comparație cu OTF standard.

### Evaluarea Otf-PC2 folosind testul ELISA,- OTf USA - MYBIOSOURCE



### OTf ELISA USA - MY BIOSOURCE OTf



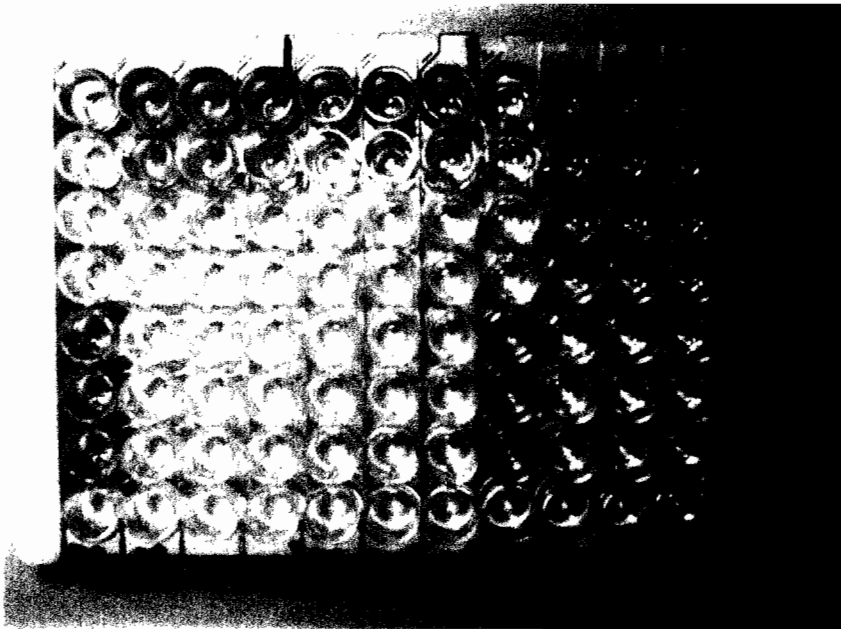
Ambele teste au fost executate folosind OTF-PC2 anti S.aureus subetalon ROMVAC. Se constată reacția înregistrată la intensitatea optică de 3.700 OD 600 și respectiv 2.300 OD 600 care confirmă existența a 420 nanograme și respectiv 400 nanograme per ml de OTF-PC2.

## Exemplul 5

### A. Determinarea conținutului de OTF-PC2 specific prin testul ELISA

Activitatea specifică OTF se determină cantitativ față de antigenul reprezentat de celulele întregi bacteriene inactivate și liofilizate.

#### EXPERIMENT: ELISA E.Coli și S. enteritidis 011.



#### Controlul reacției:

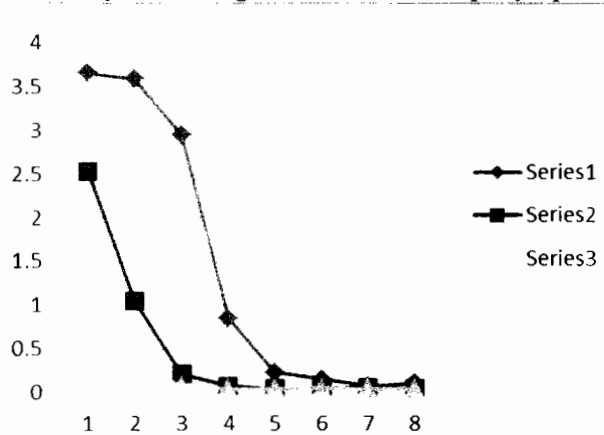
A1, A8, H1 și H8 (blank): OD 0.045

OTF-SPF (negativ) B1, C1, D1 și B8, C8 și D8: OD-0,065

Reacții pozitive la diferite OTF-M specifice:

Se constată că reacția a fost executată corect iar placa nu a influențat reacția enzimatică. Proba extrasă din oul provenit de la păsări SPF a reacționat negativ (godeurile C1, D1 și D1). Martorul pozitiv OTF specific anti E. coli (E, F, și G1) și respectiv S. enteritidis (E, F și G 8) au răspuns pozitiv au reacționat specific la intensitatea de 1.200 OD<sub>600</sub> și respectiv 1860 OD<sub>600</sub>. Intensitatea răspunsului imun, în acest experiment este în funcție de

concentrația de antigen cu care s-a căptușit placa de reacție respectiv 5μg și 10μg per godeu.



**Interpretarea plăcii de reacție ELISA 011**

Seria 1 - linia albastră, OTF-M specific anti *S. enteritidis*

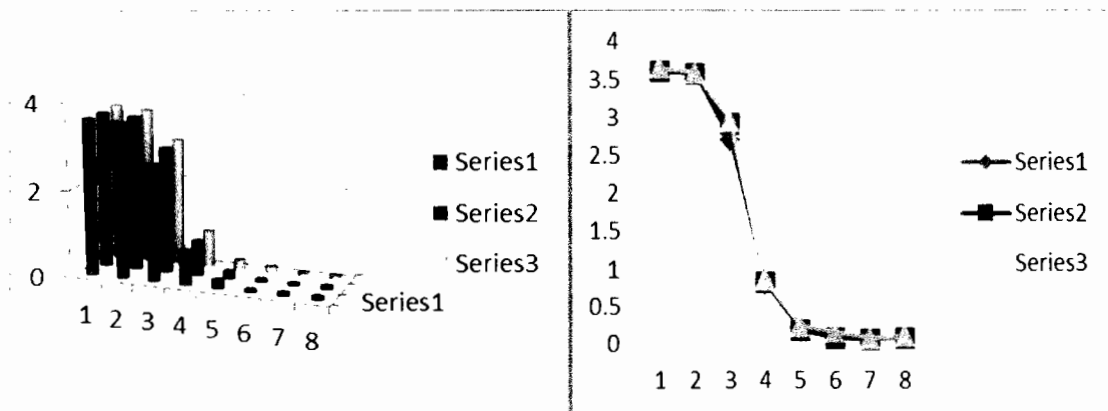
Seria 2 - linia roșie OTF-M specific anti *E. coli* seria #05

Serie 3 - linia verde OTF-M specific anti *E. coli* seria #0

**Experiment *S. enteritidis* 014**

Testul a fost realizat folosind antigen *S. enteritidis* și OTF-M anti *S. enteritidis* monovalent

Câte trei replicare per diluție.



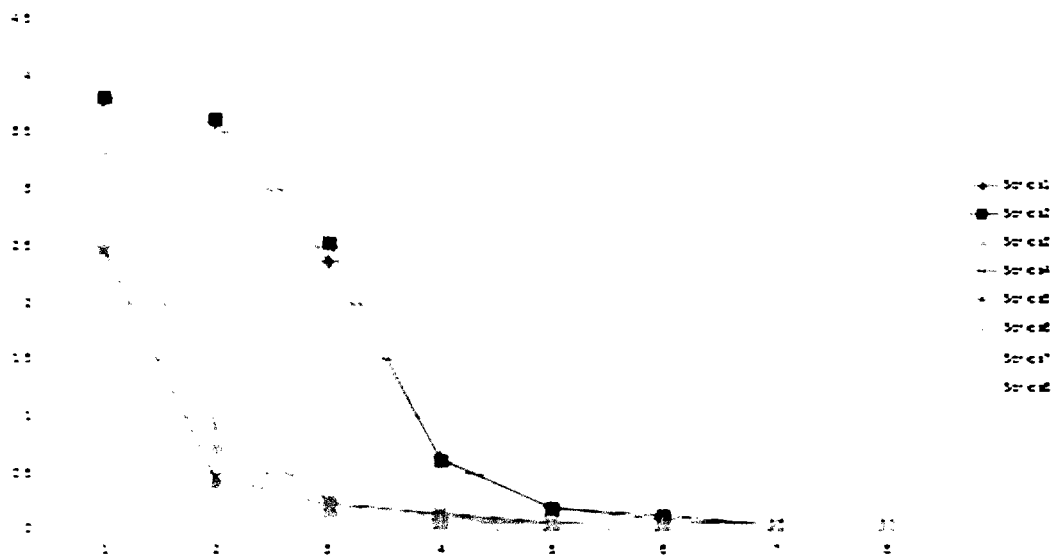
OTF-M anti *S. enteritidis* x 3 replicare. Reacția imunoenzimatică între *S. Enteritidis* și OTF-M monospecific, trei replicare prezentată spațial și grafic. Se observă valoarea identică a răspunsului imun a celor trei replicare.

### Experimentul ELISA 004.

S-a verificat prezența ovotransferinei în diferite probele de OTF-M monospecifice față de un etalon internațional provenit de la ABCAM USA.

Se constată reacția specifică anti OTF, în două replicare, atât la etalonul internațional, coloanele albastru și roșu cu pătrate. Reacția specifică OTF se înregistrează și față de OTF monospecific anti virus rabic tulpina CVS, Salmonella typhimurium și Staphilococcus aureus, la diluții diferite. Aceste reacții sunt realizate pe produsul „crud” înainte de concentrare.

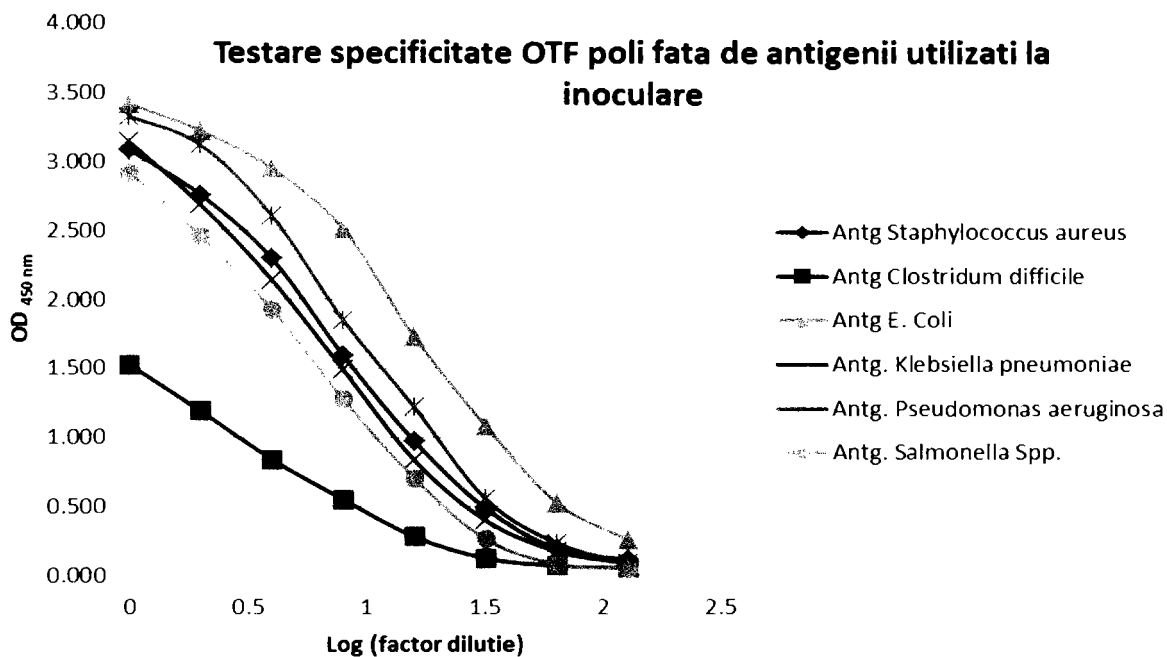
### OTf standard Intl si OTf anti CVS, St,Sa continutul in ovotransferina ELISA 004



Reacția de identificare a OTF realizată imunoenzimatic în condiții identice, pe aceeași placă de reacție confirmă identitatea din punct de vedere antigenic a ovotransferinelor extrase din gălbenușul ouălor imunizate față de etalonul internațional.

### Experimentul 00X

Acest test a fost realizat pentru a verifica răspunsul imun al găinilor la administrarea unui antigen complex, format din mai mulți antigeni specifici ai mai multor specii de bacterii și mai multor tulpini pentru fiecare specie de bacterie în parte. Această administrare are scop de a folosi imunomodulatori specifici pentru formarea unui răspuns imun specific în toate segmentele aparatului genital la găină și transferul acestuia în ou (gălbenuș și albuș).



Reacția imunoenzimatică a fost realizată pe aceeași placă de reacție și ne indică prezența unei reacții imunologice specifice a OTF-PC2 multiplu pentru fiecare antigen în parte. Acest experiment demontează că molecula de OTF care prin structura ei nu a fost evaluată a avea capacitatea de a se modifica și a prelua funcții specifice anticorpilor, s-a modificat. Răspunsul moleculelor de OTF, capacitatea acestor molecule de a se transforma, precum și capacitatea de a avea funcții de anticorpi care se cuplează specific cu antigenii care au stimulat sinteza lor, nu a fost descrisă până la această dată.

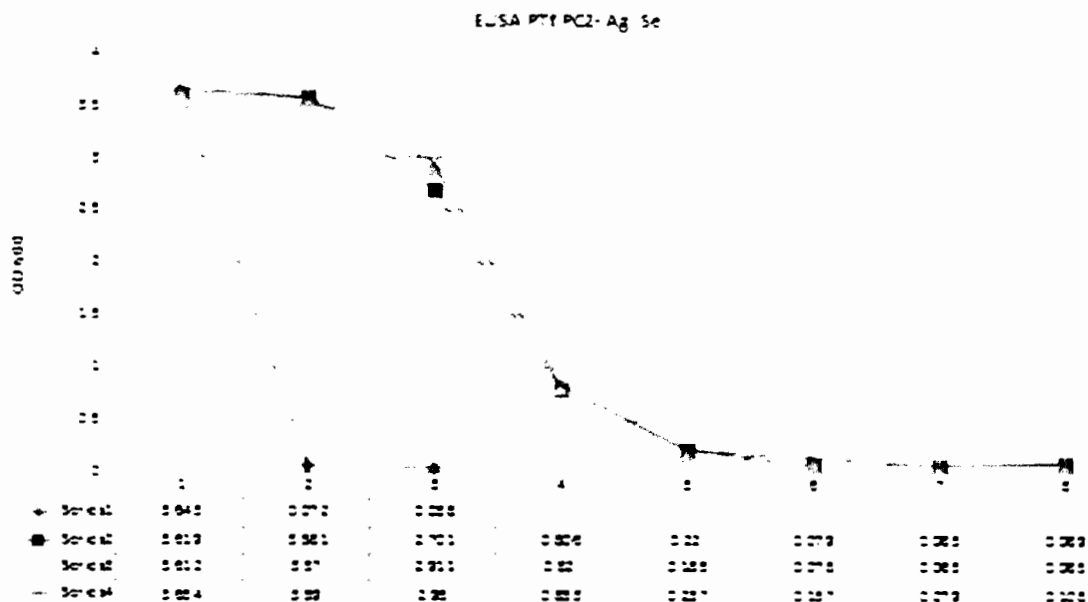
### Experiment OTF-PC2

Experimentul a fost realizat pentru a verifica specificitatea și sensibilitatea testului imunoenzimatic în care se folosesc antigenii bacterieni, virali și de la ciuperci preparați în Centrul de Producție și Cercetare VIP față de OTF - PC21 care are în compoziția lui molecule de OTF specializate, având un răspuns imun multiplu pentru fiecare antigen în parte.



### Reactia imunoenzimatica

OTf PC2 - Ag Salmonella enteritidis



Linia albastră reprezintă răspunsul martorilor de reacție. Punctul maxim de la 3.700 OD este pentru OTF-pozitiv martor preparat la CCP VIP. Următoarele două puncte de reacție sunt pentru OTF-SPF și respectiv pentru godeul blank martor de reacție al plăcii ELISA.

Răspunsul imun al OTF specific polivalent PC2 testat monospecific față de antigenul *S. enteritidis*, în diluții binare formează o linie de reacție considerată a fi standard pentru reacțiile imunoenzimatică și este recomandată pentru a fi evaluată de către producătorii de seturi ELISA pentru seturile comercializate.

În subsolul graficului sunt prezentate valorile punctelor de reacție din grafic în densitate optică  $DO_{600}$ .

## Exemplul 7

**Determinarea conținutului de proteine folosind testul spectrofotometric.**

## Exemplul 8

**Determinarea inhibiției multiplicării bacteriene folosind testul IMB-specific PaChi.**

(1). IMB PaChi este setul standard folosit pentru evaluarea activității de inhibare specifică a multiplicării bacteriene în *vitro* a imunoglobulinelor (OTF-OTF-PC2). La baza acestui test este capacitatea anticorpilor specifici de a inhiba, de a neutraliza multiplicarea bacteriilor. Testul IMB PaChi este monovalent și acționează asupra unui singur grup de epitopi care se găsesc pe o singură specie bacteriană. Testul IMB PaChi evidențiază și prezența acestor epitopi (15-50%) la alte specii de bacterii. Testul evidențiază capacitatea de inhibiție a OTF specific față de tulpini bacteriene sensibile sau rezistente la antibiotice.

(2). Conținutul trusei IMB PaChi.

(a) mediul de cultură pentru multiplicarea bacteriilor pentru testare.

(b) mediul de cultură cu OTF SPF martor negativ

(c) mediul de cultură cu OTF-PC2 specific monovalent sau polivalent specific pentru tulpina bacteriană de testat

(3). Protocolul de lucru.

(a) Suspensia bacteriană de testat se multiplică în mediul din tubul #1 cu etichetă neagră. În acest scop în 9,9 ml mediu de cultură se pun 0,1 ml din cultura bacteriană de testat. Cultură se incubează la +37 °C pentru 4, 6 sau 24 de ore.

(b) din suspensia bacteriană preluată de la termostat după 4, 6 sau 24 de ore se iau 0,1 ml și se amestecă cu 9,9 ml de mediu de cultură, se omogenizează și se citește densitatea optică la un spectrofotometru cu filtru 600 nm. Densitatea optică trebuie să fie aproximativ 0,05 DO<sub>600</sub>.

(c) din tubul de diluție se repartizează steril câte 2 ml suspensie bacteriană în fiecare din cele 2 tuburi rămase în trusă. Probele se incubează la 37 °C cu agitare permanentă. Citirea rezultatelor se poate face la 4 și 8 ore de incubație. Citirea finală se face după 24 ore de incubație. Citirea se poate face cu ochiul liber și/sau cu un spectrofotometru cu filtru de 600 nm.

(d) inhibarea specifică a creșterii bacteriilor se poate observa la 4 și 8 ore de incubație la 37°C. Citirea finală se face la 24 de ore de incubație la 37 °C. Efectul inhibitor specific al OTF-M de poate vedea cu ochiul liber când în proba cu OTF-M mediul de cultură rămâne transparent, iar în proba martor pozitiv mediul are o turbiditate din ce în ce mai mare la 4, 8 și respectiv 24 de ore.

(e) se consideră o probă pozitivă când există o diferență vizibilă cu ochiul liber între turbiditatea din proba martor față de proba care conține OTF specific. În cazul când densitatea optică se evaluează la un spectrofotometru probă este pozitivă când diferența între probele martor și proba cu OTF specific este mai mare de 0,1 DO 600 nm.

(f) se consideră un efect optim de inhibiție a multiplicării bacteriene când la 24 de ore de incubație la 37 °C este blocată creșterea bacteriilor, iar valoarea densității optice este de 0,060 DO<sub>600</sub>.

Se poate aprecia eficiența OTF-specific în funcție de cantitatea de germeni inhibată. În aceste condiții se poate organiza conduita terapeutică folosind o doză unică sau mai multe doze pe zi.

### **Experiment nr. 51/07.05.2014**

**1. Scopul experimentului:** Testarea inhibării multiplicării bacteriene de către OTF-PC2 specific față de culturi bacteriene de Ec și Kp

#### **2. Reagenți:**

##### **2.1. Tulpini bacteriene**

- *E. Coli 56637* din colecția de tulpini provenind de la spitalul Victor Babeș;
- *Klebsiella pneumoniae 55826* din colecția de tulpini provenind de la spitalul

Victor Babeș

- *Pseudomonas aeruginosa*

- *Escherichia coli*

##### **2.2. OTF-M specific**

**OTF-M Ec**, preparat în 31.03.2014, liofilizat (200 mg/2 ml)

**OTF-M Kp**, preparat în 17.01.2014, liofilizat (200 mg/2 ml).

**OTF-PC2**, preparat în 2014, liofilizat (200mg/2 ml)

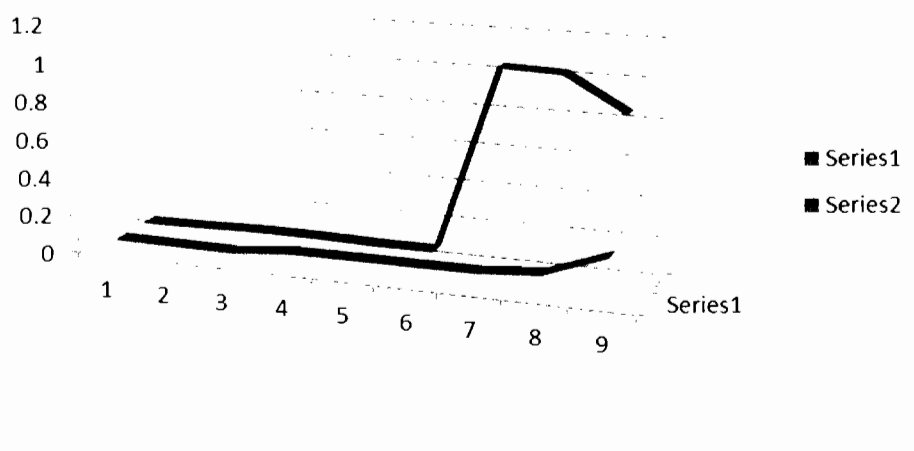
### 1.3. IgY SPF seria 04 preparat în 21.01.2014 (200 mg/2 ml)

#### Rezultate:

#### Interpretare prin citire spectrofotometrică DO<sub>600</sub>.

#### OTF-M *K. pneumoniae* OTF-SPF la 24 de ore de incubație la 37C cu agitare.

4h incubație	de	24 ore de incubație
0,549		1,130
0,552		1,109
0,755		0,951

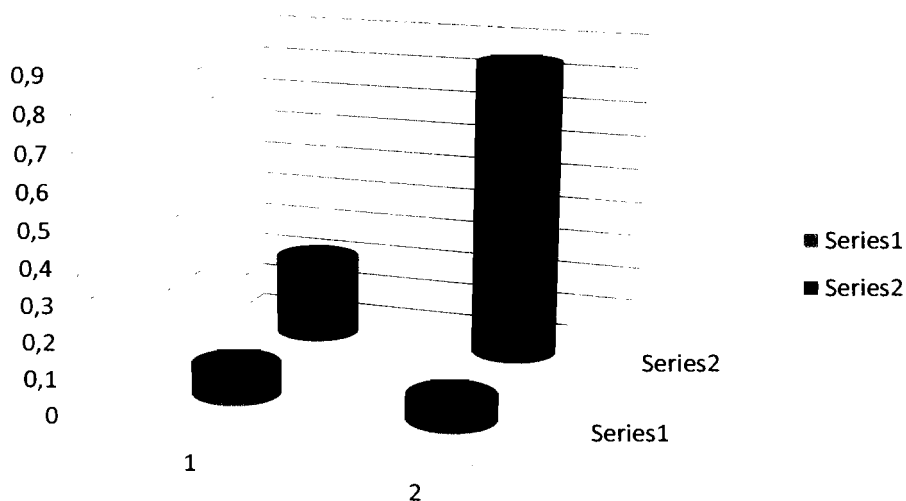


Banda roșie x 3 replicate - OTF-SPF martor

Banda albastră x 3 replicate - OTF-M specific *K. pneumoniae*

Se constată o inhibiție totală la intervalul de timp 4 ore și o ușoară creștere la 24 ore, ceea ce demonstrează capacitatea de inhibiție specifică a OTF-M specific *K. pneumoniae*. Un astfel de rezultat ne indică faptul că medicul trebuie să aibă o conduită terapeutică specială, să scurteze intervalul dintre administrările de OTF pentru a menține constantă activitatea maximă de inhibiție specifică.

Exprimarea grafică a exp. 51

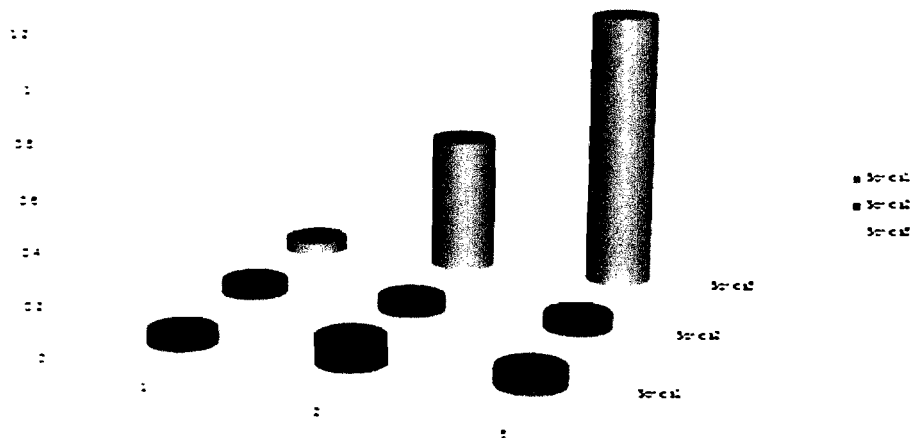


**Coloana 2:** OTF SPF martor

**Coloana 1:** OTF-M specific *E. coli*

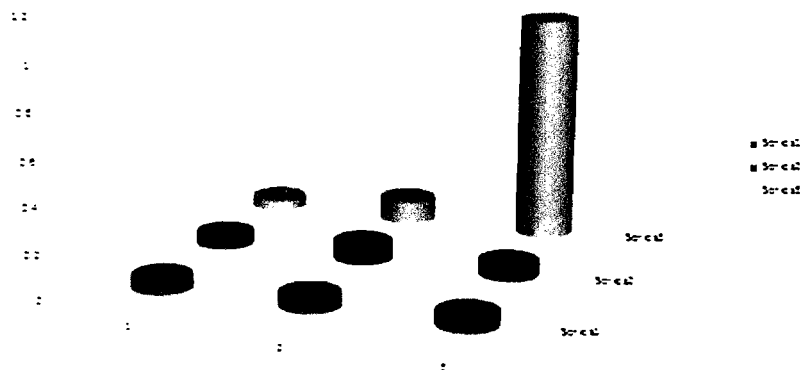
Se observă inhibiția specifică a creșterii bacteriilor de către OTF-M anti *E.coli* la 4 și respectiv 24 de ore de incubație la +37°C cu agitație.

Inhibarea creșterii bacteriene PaChi IMB  
*Pseudomonas aeruginosa* + IgY-PC2  
OTf

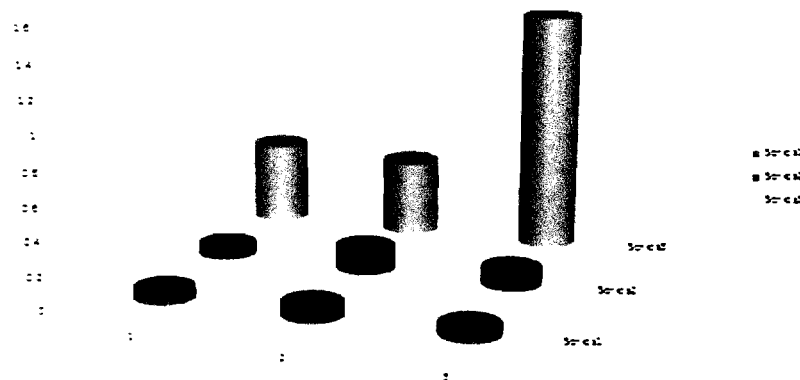


Inhibarea creșterii P.aeruginosa cu testul IMB PaChi

**Inhibarea creșterii bacteriene PaChi IMB  
Klebsiella pneumoniae + IgY-PC2  
OTf**



**Inhibarea creșterii bacteriene PaChi IMB  
E coli + IgY PC2  
OTf**



Controalele efectuate folosind testul IMB PaCi pentru inhibarea specifică a creșterii bacteriene au dovedit că OTF-PC2 reacționează pozitiv și inhibă creșterea bacteriilor.

# REVENDICĂRI

## Titlul

### **PRODUCEREA ȘI UTILIZAREA OVOTRANSFERINEI-PC2 (OTF-PC-2)**

1. Metoda de preparare a OTF-PC2, este o metodă care se referă la obținerea acestei proteine prin imunizarea găinilor (*Gallus domesticus*) ouătoare cu un antigen format dintr-un amestec de tulpini bacteriene rezistente sau nu la antibiotice din cadrul aceleiași specii de bacterii sau un antigen format dintr-un amestec de specii de bacterii rezistente sau nu la antibiotice izolate de la pacienți din România și din tulpini de *Candida Albicans*.
2. Revendică OTF-PC2 ca produs biologic care are proprietăți imunogene care îi permit să se cupleze selectiv la epitopii existenți pe suprafața celulelor bacteriene, ciupercilor și virusurilor folosite la imunizarea activă a găinilor.
3. Revendică OTF-PC2 ca produs biologic care are proprietăți imunogene care îi permit să se cupleze selectiv la epitopii existenți pe suprafața celulelor bacteriene, ciupercilor și virusurilor izolate de la pacienți sensibile sau rezistente la antibiotice.
4. Revendică OTF-PC2 ca produs care acționează mono sau poli specific față de fiecare dintre germenii cu care s-au imunizat găinile și de la care provin oul din care s-a extras ovotransferina.
5. Revendicarea metodei prin care în același ou sunt imunoglobuline (IgY) și ovotransferine OTF-PC2 care se comportă identic din punct de vedere imunologic față de antigenii folosiți la imunizarea găinilor.
6. Revendicarea produsului TF-PC2 care poate fi folosit ca mijloc de prevenire sau tratament al infecțiilor bacteriene, virale, micotice.
7. Revendicarea produsului OTF-PC2 care are efect antitumoral specific creat prin imunizarea găinilor.
8. Revendicarea produsului OTF-PC2 care se poate folosi ca vector pentru transportul în organism al medicamentelor.

9. Revendicarea produsului OTF-PC2 care poate fi folosit ca antiinflamator al mucoasei tubului digestiv pentru subiecții care folosesc medicamente antiinflamatoare administrate oral.
10. Revendicarea produsului OTF-PC2 pentru care în testul de imunodifuziunea dublă Ouchterlony linia de precipitare se unește specific cu linia de precipitare a ovotransferinei etalon internațional.
11. Revendicarea produsului OTF-PC2 care în testul se seroaglutinare rapidă și seroaglutinare lentă reacționează specific cu bacteria care a fost folosită pentru imunizarea găinilor.
12. Revendicarea produsului OTF-PC2 care în testul imuno enzimatic (ELISA) reacționează specific cu fiecare dintre antigenii folosiți pentru imunizarea găinilor.
13. Revendicarea produsului OTF-PC2 prin care „în vitro” inhibă specific creșterea bacteriilor și ciupercilor.
14. Revendicarea produsului OTF-PC2 care reacționează specific cu bacterii rezistente sau sensibile la antibiotice.