



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00632

(22) Data de depozit: 03/09/2015

(41) Data publicării cererii:  
29/01/2016 BOPI nr. 1/2016

(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;  
• MIHAI IULIANA, STR. LANTERNEI NR. 95,  
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;  
• DINU ANDREEA, STR. PRIMĂVERII  
NR. 29, HUNEDOARA, HD, RO;  
• BĂDICĂ SILVIU IONUȚ, STR. CARPAȚI,  
BL. 409, SC. A, ET. 1, AP. 2, ROȘIORII DE  
VEDE, TR, RO;  
• SIMA LUCICA, BD. BASARABIA NR. 92,  
BL. D1, ET. 3, AP. 12, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO

(54) PRODUCEREA ȘI UTILIZAREA OULUI HIPERIMUN  
PERSONALIZAT (OVOPACH) ÎN TRATAMENTUL DE  
URGENȚĂ AL PACIENȚILOR INFECTAȚI CU GERMI  
PATOGENI

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de obținere a unui produs imunologic și la utilizarea acestuia în tratamentul pacienților infectați cu germeni patogeni. Metoda conform invenției constă în imunizarea rapidă a unor găini convenționale de peste 24 săptămâni cu antigenul rezultat din materialul patologic prelevat de la pacienții bolnavi, în amestec cu un adjuvant QS21, masa antigenică fiind administrată intramuscular găinilor de 3 ori, la interval de 14 zile, concomitent cu un imunomodulator

P, administrat oral, în amestec cu furajele, după care se recoltează ouăle de la găinile imunizate, la 14 zile după a treia inoculare, din care se extrag imunoglobuline specifice. Produsul se utilizează sub formă condiționată la pacienții de la care s-a prelevat material patologic.

Revendicări: 5  
Figuri: 1



45

# DESCRIEREA INVENȚIEI

## PRODUCEREA ȘI UTILIZAREA OULUI HIPERIMUN PERSONALIZAT OVOPACH ÎN TRATAMENTUL DE URGENȚĂ AL PACIENȚILOR INFECTAȚI CU GERMEI PATOGENI

### Inventatori:

**Pătrașcu Ionel Victor, Viorica Chiurciu, Chiurciu Constantin, Iuliana Mihai, Andreea Dinu, Badica Silviu Ionut si Lucica Sima**

### DOMENIUL TEHNIC

Imunologie, medicină, tratamente, prevenție, aplicații în biotehnologie.

Prezenta invenție descrie producerea oului hiperimun OVOPACH și a proteinelor extrase din acesta pentru tratamentul individualizat, de urgență al pacienților infectați cu germeni patogeni.

Din experiența pe care o avem până la aceasta dată, utilizarea unei imunoglobuline personalizate sau a unui amestec de proteine personalizate extrase din oul OVOPACH, poate reprezenta ultima șansă pentru fiecare pacient în parte, atunci când este infectat cu germeni patogeni specifici rezistenți la toate antibioticele. În astfel de cazuri opțiunile sunt diferite, de la menținerea nemotivată pe un tratament susținut cu antibiotice până la externarea pacienților și asigurarea asistenței medicale fără succes și cu un prognostic defavorabil.

Prezenta invenție se referă la prepararea oului OVOPACH, a IgY și a proteinelor extrase din oul hiperimun personalizat OVOPACH folosind ca inocul un produs patologic prelevat de la pacient din care s-a preparat o cultură brută de 24 sau 48 de ore de bacterii, rezistente sau sensibile la antibiotice, izolate de la pacientul cu semne clinice de boală.

Prezenta invenție se referă la prepararea oului hiperimun personalizat OVOPACH față de antigene preparate din agenți patogeni, floră oportunistă modificată, celule structural și antigenic diferite de normal prezente în materialul patologic prelevat de la pacient, urmând ca

testările ulterioare de laborator să identifice germeni patogeni și rezistența acestora la antibiotice.

Administrarea antingenului preparat din mediul de cultură la 24 sau 48 de ore de cultivare la 37 °C a materialului patologic prelevat de la pacient poate fi completată și cu alte tulpini patologice izolate din acest produs patologic și identificate ulterior primei administrări la găină.

În cazul pacienților infectați cu diferite microorganisme (bacterii, levuri, fungi) rezistente sau sensibile la antibiotice, tratamentul cu imunoglobuline specifice reprezintă o șansă importantă pentru vindecare. Pentru a realiza un tratament eficient cu imunoglobuline (IgY) extrase din galbenușul ouălor provenite de la găini imunizate cu antigene specifice în amestec cu adjuvant QS21, aceste IgY trebuie să fie specifice, adică să prezinte o acțiune directă asupra germeilor patogeni prezenți în organismul pacientului. Din punct de vedere științific oul hiperimun OVOPACH conține anticorpi idiotipici anti-anti-complex patogen individualizat (AIAACPI) care recunosc epitopii definiți de peptidele existente în produsul patogen individualizat (15).

Pentru aceasta se pot folosi și IgY specifice existente în colecție. În cazurile în care nu se cunoaște agentul sau agenții patogeni, iar evoluția infecției este gravă, se poate folosi o metodă nouă de preparare a unei IgY personalizate. În acest scop se poate folosi pentru imunizare un produs obținut după 24 - 48 ore de cultivare a unui inocul reprezentat de un material patologic prelevat de pe suprafața afectată, din diferite lichide biologice sau din fecale.

Acest produs inactivat în amestec cu adjuvantul QS21 se folosește pentru imunizarea rapidă a găinilor ouătoare. În acest scop se folosesc găini în plin ouăt, în vârstă de 24 - 50 săptămâni. Inoculul este evaluat în funcție de proteina totală determinată spectrofotometric sau prin ID radiar, metoda Pătrașcu (date nepublicate). În paralel cu imunizarea se continuă programul de izolare a germeilor patogeni prezenți în produsul patologic. În funcție de speciile de germeni patogeni, de rezistența sau sensibilitatea lor la antibiotice, aceștia se pot folosi în cursul tratamentului cu IgY personalizat.

Răspunsul imun al găinilor imunizate se va controla zilnic, prin evidențierea IgY în galbenușul ouălor depuse. Se va controla răspunsul imun specific calitativ și cantitativ față de antigenul administrat. Răspunsul imun la fiecare găină în parte este diferit din punct de vedere

cantitativ. Se prelevă ouăle de la găinile care produc IgY în cantitate mai mare de 1500 OD în testul ELISA. Se face un amestec de gălbenușuri provenite de la aceste găini, se adaugă conservant și se extrage de urgență IgY folosind metoda Pătrașcu. IgY extras se concentrează 20X prin filtrare tangențială. Se determină concentrația de IgY folosind testul ELISA și se diluează la cantitatea exprimată în mg/doza în funcție de conduita terapeutică. IgY personalizat se sterilizează prin filtrare prin filtre Millipore de 0,45μm și respectiv 0,22 μm.

În următoarele zile se pot recolta ouă în cantități mai mari urmând să se folosească ca atare, să se liofilizeze ca ou integral sau imunoglobuline și/sau alte proteine purificate.

## STADIUL TEHNICII INCLUSIV BIBLIOGRAFIE

În 1890, Shibasaburo Kitasato (1852-1931) și Emil von Behring (1854-1917) (2) au imunizat cobai față de difterie (*Corynebacterium diphtheriae*) cu produse din sângele animalelor imunizate cu sângele tratat termic care provenea de la animale care au supraviețuit infecției. Preparatele care conțineau anticorpi anti toxina difterică, care protejaseră cobaii când au fost inoculați cu doze letale de toxină difterică, au reușit să trateze difteria produsă experimental cu bacterii și toxină la animale. În continuare au constatat că pot vindeca animalele cu difterie, dacă au fost inoculate cu produse din sângele animalelor imunizate. Când au încercat pe om, au constatat că produsele din sângele animalelor imunizate pot trata difteria la om. Aceste produse, așa numiți anticorpi, care se găsesc în substanțe derivate din sânge și au fost numite anatoxine difterice. Cercetătorii au continuat studiile preparând seruri specifice pentru tratatea altor infecții la om și animale.

Imunitatea pasivă artificială este obținută în general plecând de la sânge care conține cantități mari de anticorpi specifici. O altă formă modernă de imunitate pasivă artificială s-a realizat prin utilizarea imunoglobulinelor extrase din gălbenușul de ou (Ig Y) care conține cantități mari de anticorpi specifici. Pentru a valorifica mai bine aceasta variantă de producție și a valorifica la maximum proprietățile imunologice, biochimice și morfofuncționale ale IgY, găinile (*Gallus domesticus*) sunt imunizate activ cu antigene preparate în acest scop. Efectorii răspunsului imun al găinii se regăsesc în sânge și în gălbenușul ouălor care sunt recoltate după ce nivelul de anticorpi este decelabil în sânge.

Imunitatea pasivă artificială asigură o protecție imediată împotriva microorganismelor față de care s-au format anticorpii. Acești anticorpi produși de găina care a fost imunizată activ, nu sunt produși de recipient. Persoana care primește IgY va profita temporar de imunitatea pasivă atâta timp cât anticorpii persistă în organism. Acest tip de imunitate acționează imediat, când pacientul are nevoie de protecție, deoarece el nu poate să producă rapid anticorpi sau nu este imunocompetent.

În informațiile preluate de la CDC Atlanta, Georgia USA, pe baza analizei imunității de grup/ de populație, se menționează că sunt persoane care pot primi produse din sânge, printre care se numără și imunoglobulinele, care să le confere o protecție imediată față de o boală specifică. Acesta este avantajul major al imunității pasive, protecția fiind imediată, în timp ce imunitatea activă conferită de vaccinuri necesită timp, eventual mai multe săptămâni, ca să se atingă un nivel de protecție corespunzător (14).

Utilizarea IgY pentru prevenirea și combaterea infecțiilor cu germeni patogeni la om și animale s-a realizat prin administrarea orală a unor formule medicamentoase în care se găsesc anticorpii activi. Cercetările realizate în acest scop din 1893 și până în 2015 au urmărit administrarea la om și animale, preventiv sau curativ, a unor IgY obținute pe pasărea care a fost imunizată cu tulpini bacteriene, micotice, levuri sau virusuri de referință (diferite) sau cu tulpini bacteriene izolate direct de la pacienți (12).

Nu exista nici un fel de informație publică cu privire la prepararea unor imunoglobuline de găină după imunizarea acestora cu produse care reprezintă materialul patologic prelevat de pe suprafața corpului, de pe mucoase sau din produsele biologice și fecale.

Aceste lucrări au fost realizate pentru prima oară în România și fac subiectul acestui brevet. În laboratoarele Romvac s-au preparat imunoglobuline Y specifice prin imunizarea activă a găinilor aflate în plină activitate de ouă cu un antigen adjuvantat obținut din cultura de 24 - 48 ore a materialul patologic inoculat direct în mediu de cultură și incubat la 37 °C. La intervale diferite de timp s-au recoltat ouă pentru urmărirea evoluției răspunsului imun.

În timp ce în literatura de specialitate se menționează faptul că ouăle folosite integral sau din care se prepară IgY specific au fost recoltate începând cu cea de a treia săptămână după ultima vaccinare, ceea ce reprezintă ca interval de timp de la prima inoculare de 6 săptămâni

respectiv 42 de zile, pentru utilizarea IgY specific la om, mai sunt necesare încă 2-3 zile făcând posibilă utilizarea acestor produse după 45 de zile.

Cu excepția condițiilor experimentale, aceste produse se găsesc comercial și pot fi folosite imediat ce sunt recomandate de medic.

Aceste produse sunt folosite pentru prevenirea sau tratamentul infecțiilor cu germeni patogeni identificați, cunoscuți și pentru care există IgY specific. Aceasta metodologie acceptată pe plan internațional nu se poate folosi în cazul pacienților infectați cu germeni patogeni la care tratamentul cu antibiotice nu a dat rezultate sau pentru care nu există IgY specific.

În aceste condiții s-a realizat un ou (superou) folosind un protocol nou de preparare și control al IgY specific produs de către găină față de preparatul antigenic administrat împreună cu adjuvantul Q. Stimulul antigenic multiplu este reprezentat de agenți patogeni, flora oportunistă modificată, celule structural și antigenic diferite de normal (1) care au fost prelevate ce la pacienți.

## BIBLIOGRAFIE

1. C. Gh. Băcanu, Ș. A. Băcanu. Autovaccin celulomicrobian total complex (AVCMTC). Geocities 2009.
2. L.F. Haas. Emil Adolph von Behring (1854–1917) and Shibasaburo Kitasato (1852–1931) *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;71:62 doi:10.1136/jnnp.71.1.62
3. Fox JP, Elveback L, Scott W, et al. Herd immunity: basic concept and relevance to public health immunization practices. *Am J Epidemiol* 1971; 94:179–89.
4. Anderson RM, May RM. Vaccination and herd immunity to infectious diseases. *Nature* 1985; 318:323–9.
5. Fine PEM. Herd immunity: history, theory, practice. *Epidemiol Rev* 1993; 15:265–302.
6. Fine PEM, Mulholland K. Community immunity. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA eds. *Vaccines*. 5th ed. Chapter 71. Philadelphia, PA: Elsevier Inc., 2008:1573–92.
7. John TJ, Samuel R. Herd immunity and herd effect: new insights and definitions. *Eur J Epidemiol* 2000; 16:601–6.

8. Stephens DS. Vaccines for the unvaccinated: protecting the herd. J Inf Dis 2008; 197:643–45.
9. Heymann D, Aylward B. Mass vaccination în public health. In: Heymann D, ed. Control of communicable diseases manual. 19th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2008.
10. Topley WWC, Wilson GS. The spread of bacterial infection: the problem of herd immunity. J Hyg 1923; 21:243–9
11. Vaccines and Immunisations. Center for Diseases Control and Prevetnion 1600 Clifton Road Atlanta, GA 30329-4027, USA. 19.05.2014
12. Cerere Brevet Invenție nr. A/00156 din 25.02.2014 – **“Procedeu de obținere și utilizare a imunoglobulinelor de găină (IgY) “** Pătrașcu Ionel Victor, Viorica Chiurciu, Chiurciu Constantin și Georgiana Topilescu
13. Cerere Brevet Invenție nr. A/00179 din 05.03.2014 – **“Metode de evaluare imunologică a activității specifice a imunoglobulinelor de pasăre (IgY)”** Pătrașcu Ionel Victor, Viorica Chiurciu, Chiurciu Constantin și Georgiana Topilescu .
14. Cerere Brevet Invenție nr. A/00810 din 29.10.2014 – **“Producerea și folosirea oului hiperimun PC2”** Pătrașcu Ionel Victor, Viorica Chiurciu, Chiurciu Constantin, Mariana Oporanu, Georgiana Topilescu și Iulia Mihai.
15. Angel Alberto Justiz Vaillant<sup>1</sup>, Patrick Eberechi Akpaka<sup>1\*</sup>, Norma McFarlane-Anderson<sup>2</sup>, Monica P. Smikle<sup>3</sup> and Wisdom Brian. The Chicken and Egg System for the Development of Anti-Idiotypic Vaccines. Vaccines & Vaccination. Vaillant et al., J Vaccines Vaccin 2012, 3:2

## INVENȚIA PE SCURT

### Formularea pe scurt a soluțiilor tehnice

Obiectivul prezentei invenții este obținerea oului hiperimun OVOPACH ca produs și metoda de preparare a acestuia. OVOPACH este un produs specific, activ imunologic față de antigene bacteriene, levuri, fungi, structuri celulare prezente în materialul patologic prelevat de la pacient din lichidele biologice, piele, mucoase sau excreții. Materialul patologic provine de la pacienți cu semne clinice de boală.

Pentru prepararea ouălor OVOPACH specifice a fost realizat un program intensiv de cercetare care a urmărit, pe de o parte, obținerea lor și a derivatelor acestora care să acționeze specific asupra mai multor epitopi, iar pe de altă parte aplicarea unor metode de control care să permită evaluarea corectă a acțiunii acestora asupra antigenului dat (9, 10, 14). Antigenul monovalent sau polivalent a fost inoculat în amestec cu adjuvant QS21, iar furajul suplimentat cu un imunomodulator numit aici P, conform metodologiei prezentate în cererile de Brevet de invenție depuse la OSIM (12, 13, 14).

Folosind tehnici de laborator ca: seroaglutinarea rapidă și seroaglutinarea lentă, testul de imunodifuziune în gel de agar, testul de imunodifuziune radiară, testul de identificare ELISA și testul de specificitate ELISA precum și testul de inhibiție a creșterii bacteriilor IMB-PaChi, s-a reușit caracterizarea răspunsului imun al găinilor care produc OVOPACH, prin testarea extractului apos din gălbenușul ouălor care provin de la găinile imunizate.

Materialul patologic folosit pentru imunizarea rapidă a găinilor în vederea obținerii unui răspuns imun specific corespunzător (1,500 OD sau mai mare folosind testul ELISA) se folosește în laborator și pentru izolarea, identificarea și caracterizarea diferitelor microorganisme prezente în acest produs. Aceasta activitate, inclusiv antibiograma, contribuie la caracterizarea infecției acuzate de pacient.

Din oul hiperimun OVOPACH se pot obține diferite sub-produse care pot fi folosite de urgență în tratamentul infecțiilor la pacientul de la care s-a prelevat produsul patogen. Dintre acestea: IgY soluție cu concentrația de 200 mg/80 ml, IgY soluție cu concentrația de 25



mg/ml în flacoane de 2 ml, ou intergal ca atare, ou integral liofilizat, IgY unguent cu concentrația de 20 mg IgY/ml, IgY spray cu concentrația de 20 mg/ml și care pot fi administrate local sau general.

Prezenta invenție se referă la producerea și caracterizarea oului hiperimun numit OVOPACH a căror etape de extragere sunt prezentate în cererea de Brevet de invenție nr. A/00810 din 29.10.2014 (14).

Oul hiperimun OVOPACH reacționează specific simultan cu unu sau mai multe antigene cu care a fost imunizată găina.

Oul hiperimun OVOPACH provine de la găinile imunizate cu antigenul obținut din materialul patologic de la pacient, în amestec cu adjuvant QS21, care s-a administrat intramuscular, în patru puncte diferite în pieptul găinilor ouătoare în vârstă de peste 24 de săptămâni. Ouăle pot fi folosite ca atare, se pot liofiliza sau atomiza intergal, se poate extrage IgY după ce se decelează în gălbenuș un nivel de anticorpi specifici de peste 1,500 OD prin testul ELISA.

## DESCRIEREA SUMARĂ A PROCEDURILOR

Acest brevet caracterizează ca produs biologic oul numit OVOPACH în baza descrierii de mai jos:

Pentru obținerea oului hiperimun numit OVOPACH imunizarea găinilor se face la vârsta de 24 - 30 săptămâni, în plin ouăt, cu un antigen obținut din produsul patologic recoltat de la pacient. Proba de la pacient, care conține germeni patogeni specifici, se incubează 24 - 48 de ore la 37 °C, iar suspensia obținută, care reprezintă un amestec de proteine, se inactivează cu formol și se amestecă cu adjuvant QS21. Masa antigenică astfel obținută se administrează intramuscular găinilor concomitent cu un imunomodulator P administrat oral în amestec cu furajele.

Conținutul în proteină al antigenului în amestec cu adjuvantul QS21 și diluat în PBS nu poate fi mai mare de 200 mg / ml.

Se folosesc 5 - 10 găini, identificate prin matricole puse la cele două aripi, care sunt menținute în cuști individuale, iar ouăle se recoltează separat, de la fiecare animal în parte.

Imunizarea fiecărei găini se cu 2 ml de inocul, în 4 puncte diferite în mușchii pectorali. În cazul când la 14 zile de la inoculare nu se constată un răspuns imun specific față de antigenul cu care s-a făcut imunizarea, la un nivel de minimum 1,500 OD în testul ELISA, se continuă imunizarea conform programului prezentat în cererea de Brevet de invenție nr. A/00810 din 29.10.2014 (14). În cazuri de urgență se poate realiza o concentrare a anticorpilor prin filtrare tangențială.

Pe toată durata imunizării și exploatării găinilor, se administrează *ad libitum* furaje combinate pulbere în care se amestecă uniform 0,5 g de imunomodulator uscat per 1000 g furaj.

Evaluarea răspunsului imun se face direct prin controlul ouălor recoltate de la găinile imunizate. Gălbenușul recoltat individual din ou se tratează cu PEG 6000 pentru extragerea IgY. IgY se testează individual și se identifică găinile al căror răspuns imun se situează la un nivel de peste 1,500 OD în testul ELISA.

Ouăle care au un nivel de sub 1,500 OD în testul ELISA se pot folosi pentru obținerea IgY efectuând concentrarea acestuia.

Din amestecul albușurilor de la 10 ouă și, respectiv, a gălbenușurilor de la aceleași ouă, se recoltează câte 5 ml de amestec din care extrage ovotransferina (OTf) și, respectiv, IgY, fiecare după metoda menționată în tehnologia brevetată (12, 13, 14). 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 recoltarea de ouă hiperimune OVOPACH care se vor folosi în diferite scopuri.

## DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

### **Obținerea oului hiperimun OVOPACH și a produselor biologice extrase din acesta.**

Acest produs biologic precum și derivatele sale sunt produse personalizate, antigenele cu care se imunizează găinile ouătoare fiind preparate din materialul patologic prelevat de la un singur pacient. Oul hiperimun OVOPACH precum și imunoglobulinele din gălbenuș conțin anticopri specifici față de germenii patogeni existenți în materialul patologic prelevat de la pacient, care conține implicit și una din principalele cauze care au declanșat boala.

Procedura de preparare a oului hiperimun OVOPACH și a subproduselor acestuia se realizează după o metodologie proprie, pentru prima dată în lume.

### **Prepararea antigenului**

Antigenul personalizat se prepara din materialul patologic prelevat de la pacient și care poate fi recoltat de pe suprafața pielii, mucoaselor, din lichidele biologice și excreții. Acest produs conține agenți patogeni, floră oportunistă modificată, celule structurale și antigenice diferite de normal.

În acord cu prezenta invenție, materialul patogen este prelevat de la fiecare pacient în parte, iar produsul finit este reprezentat de oul hiperimun sau produsele sale secundare. Produsul patologic, care se găsește în mediul de transport, este cultivat pe medii de cultură lichide timp de 24 sau 48 de ore, apoi 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.

### **1. 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 prezența

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 (12).

Tehnica de imunizare a găinilor ouătoare cu un anumit antigen este bine cunoscută. Prezenta invenție poate folosi orice fel de metodă 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. Adjuvantul QS21 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 toata perioada de imunizare.

## **2. Controlul răspunsului imun al găinilor ouătoare imunizate cu antigenul personalizat**

Începând cu cea de a zecea zi de la administrarea antigenului se controlează individual prezența imunoglobulinei specifice față de antigenul preparat și administrat. În ziua când peste 50% dintre găinile imunizate transferă în gălbenuș o cantitate suficient de mare de imunoglobulină, 2,500-3,000 OD în testul ELISA sau minimum 1,500 OD în testul ELISA, se recoltează ouăle care se folosesc pentru tratament crude, în amestec cu lapte călduț sau alte sucuri. Din oul hiperimun OVOPACH se poate extrage imunoglobulina specifică folosind metodologia de preparare și control brevetată anterior (12).

## MODELE RECOMANDATE DE FOLOSIRE ȘI CARACTERIZARE A INVENȚIEI

Exemplele de mai jos au drept scop ilustrarea și nu au intenția de a limita scopul prezentei invenții.

### Exemplul 1

#### Prepararea antigenului personalizat

Prepararea antingenului personalizat se face prin prelevarea produsului patologic de la pacientul bolnav. Acesta poate fi material patologic de pe suprafața pielii (cruste), din plăgi (puroi, sânge, celule), de pe mucoase (mucus, secreții etc.), lichide biologice sau direct din excreții.

Acest produs patologic, transportat la laborator în flacoane cu mediu de transport, se transferă în bulion nutritiv și se incubează 24 - 48 de ore la 37 °C. Produsul finit se inactivează cu formol sau termic și se purifică prin spălare. Sedimentul se folosește ca material antigenic în amestec cu adjuvantul QS21, în prezența unui imunomodulator administrat în furaj. După prepararea masei antigenice se face controlul inactivării microorganismelor.

#### Imunizarea găinilor ouătoare

Găinile, în plină activitate de ouat, cescute în cuști individuale, se imunizează prin administrarea a 2 ml antigen în patru puncte diferite din musculatura pectorală. Găinile vor fi hranite cu furaje în care se adaugă și un imunomodulator de tip P pe toată perioada de imunizare. Dacă răspunsul imun controlat în perioada 10 - 14 zile de la prima administrare a antigenului este corespunzător (2,000 – 3,000 OD în testul ELISA). Se trece la utilizarea ouălor de la găinile care au un astfel de răspuns imun, fie prin administrarea lor integrală fie prin extragerea imunoglobulinelor din gălbenuș. Programul de imunizare se poate continua, iar ouăle recoltate de la găinile imunizate vor fi utilizate pentru extragerea IgY, pentru purificarea proteinelor din gălbenuș și albuș și pentru prepararea unui complex proteic purificat.

Prepararea IgY personalizat se face conform descrierii din cererea de Brevet nr. A/00156 din 25.02.2014 – “Procedeu de obținere și utilizare a imunoglobulinelor de găină (IgY) “ Pătrașcu Ionel Victor, Viorica Chiurciu, Chiurciu Constantin și Georgiana Topilescu (12).

## Exemplul 2

### Prepararea OVOPACH din material patologic integral

Prepararea antigenului personalizat se face prin prelevarea produsului patologic de la pacientul bolnav. Acesta poate fi material patologic de pe suprafața pielii (cruste), din plăgi (puroi, sânge, celule), de pe mucoase (mucus, secreții etc.), lichide biologice sau direct din excreta. Acest material patologic se inactivează cu formol după care se amestecă cu adjuvant QS21 și se inoculează la găini ouătoare la vârstă de 24-56 săptămâni. Inoculul este reprezentat de un conținut proteic integral de 100-200  $\mu$ l și este administrat în patru puncte diferite în mucusulatura pectorală. La 10 și 14 zile de la inoculare se controlează individual răspunsul imun al găinilor în probele de sânge (ser) și din ouă. Ouăle care provin de la găini care au răspuns pozitiv față de antigenul administrat găinilor, la intensitatea de 2,000-3,200 OD în testul ELISA se folosesc pentru prepararea de produse specifice dintre care IgY, ovotransferina, ovomucina, lysozima, imunomodulatori, factori de contact. Aceste produse purificate vor fi condiționate în amestec prin liofilizare, atomizare sau se vor administra sub forma de soluție sterilă.

Ouăle provenite de la aceste găini se pot administra per os, crude în lapte sau alte lichide.

### **Exemplul 3**

#### **Condiționarea oului hiperimun OVOPACH**

Condiționarea oului hiperimun OVOPACH se face după metodologia descrisă în cererea de Brevet de invenție nr. A/00156 din 25.02.2014 (12).

Pentru utilizarea cât mai eficientă a acestor produse biologice personalizate se pot utiliza următoarele forme de condiționare:

1. Oul OVOPACH integral care se administrează crud în lapte cald sau alte lichide;
2. Oul OVOPACH albuș și gălbenuș uscat prin atomizare sau liofilizare (umiditate reziduală maxim 5%)
3. Oul OVOPACH gălbenuș uscat prin atomizare sau liofilizare (umiditate reziduală maxim 5%)
4. Immunoglobuline (IgY) extrase din gălbenușul ouălor OVOPACH (lichid 200 mg/80 ml, 50 mg/ml, spray, veselină, granule, capsule)
5. Amestec de proteine purificate extrase din OVOPACH, respectiv din gălbenuș (IgY) și albuș (ovotransferină, ovomucină, lizozim).

## Exemplul 4

### Controlul final al oului personalizat OVOPACH

a) Pentru admiterea oului personalizat OVOPACH, forma finală pentru administrare în soluție, pentru administrări cutanate, intranasală, oro-faringo-gastro-intestinală se folosesc următoarele metode de control:

- Sterilitate microbiologică;
- Stabilirea activității specifice a OVOPACH folosind testul ELISA, ID, ID radiar, în funcție de compoziția inițială a produsului patologic prelevat de la pacient.
- Stabilirea conținutului de IgY folosind testul ELISA;
- Stabilirea activității de inhibare a multiplicării bacteriene folosind testul IMB-specific PaChi

b) Se admit în consum uman numai seriile de OVOPACH care corespund controalelor efectuate.

IgY preparat din oul hiperimun OVOPACH s-a dovedit a avea capacitatea de a reacționa specific cu epitopi de pe bacteriile și fungii din produsul patologic prelevat de la pacient cu care au fost imunizate găinile.

## Experiment

### Testul de imunodifuziune în gel de agar Ouchterlony pentru evidențierea IgY

Principiu: testul ID se bazează pe migrarea în gelul de agar a antigenului (IgY) și anticorpilor (ser de iepure anti-IgY) care la punctul de contact se combină specific și formează un precipitat care se vizualizează sub forma unei linii de precipitare.

Toate controalele efectuate folosind testul de imunodifuziune în gel de agar au avut drept scop identificarea IgY OVOPACH față de subetalonul Romvac. Aceste controale fac parte din prima categorie de controale utilizate pentru identificarea moleculelor de IgY-OVOPACH și confirmarea prezenței acestora în produsul testat.

În fotografia nr. 1 se observă că liniile de precipitare realizate de subetalonul Romvac și IgY ovopach se unesc, demonstrând că produsele fac parte din aceeași grupă proteică și antigenică. Se constată că toate probele de IgY au reacționat pozitiv cu IgG anti-găină.

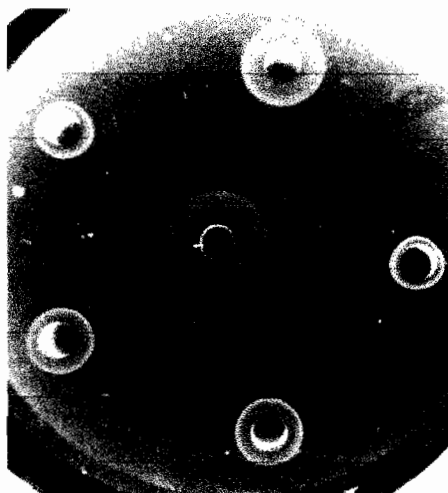




**Foto 1.** Testul ID cu IgG de iepure anti-IgY: godeu central, nr. 1 și nr. 4 – IgG iepure anti-găină; godeurile nr 2. și nr. 6 – subetalon Romvac IgY anti-*S. aureus*; godeurile nr. 3 și nr. 5 – IgY ovopach.

**Testul de identificare a ovopach folosind imunodifuzia radiară (IDR)**

În gelul de agar se amestecă IgG anti-IgY la o concentrație optimă de 2 ml ser intergal/g de agar. În gel se practică godeuri de 3 sau 6 mm. În aceste godeuri se repartizează IgY ovopach care poate fi de la diferite serii sau în diferite concentrații. Placa de reacție se pune la incubat la +22°C timp de 20-24 ore, după care se citește reacția la lumină indirectă. Prezența unui disc de precipitare dovedește că s-a produs reacția antigen-anticorp (Foto 2). Măsurarea diametrului, scăderea diametrului godeului și valoarea împărțită la doi reprezintă valoarea de migrare a fiecărui produs în parte. Când diametrul reacției este mai mic decât cel al matorului, atunci produsul se concentrează. În cazul când reacția ovopach este mai mare decât cea a matorului, produsul se poate dilua.



**Foto 2.** Testul IDR

## Exemplul 5

### A. Determinarea cantitativă a OVOPACH prin testul ELISA indirect

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

- a) Testul ELISA care urmează a fi folosit în controlul cantitativ al OVOPACH se realizează prin comparație cu un etalon internațional IgY (USA) sau comparativ cu un subetalon IgY preparat la Romvac.
- b) Godeurile se căptușesc cu 150 μl IgG de iepure anti-pasăre la concentrația de 3,75 μm/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 PBT-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 IgY-M specific sau IgY SPF (25, 12,5, 6,25 μg/ml) în PBS;
- h) În paralel se adaugă în triplicat câte 150 μl IgY 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.

**B. Determinarea cantitativă a OVOPACH (IgY specific) prin testul ELISA direct**

- a) Placa se căptușește peste noapte la +4 °C sau în 2 ore la temperatura camerei cu IgY de testat și cu IgY etalon în trei replicare fiecare, în diluțiile binare începând cu diluția 1:1000 în soluție carbonat-bicarbonat;
- b) Godeurile A1 și H1 se păstrează ca martori pentru IGY;
- 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  $DO_{450}$  trebuie să fie maximum de 0,060. În cazul când sunt alte valori reacția nu se validează.
- k) Se consideră ca reacție pozitivă pentru prezența IgY, diluția la care  $DO_{450}$  este de 0,200 față de IgY standard internațional.
- l) Conținutul în μg/ml de IgY se face în raport cu IgY de referință, ținând cont de faptul că ELISA decelează minimum 10 ng/ml și se face prin comparație cu IgY standard.

Ambele teste au fost executate folosind IgY-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 IgY-PC2.

## Exemplul 6

### A. Determinarea conținutului de IgY în sângele pacienților tratați cu IgY-specific prin testul ELISA

Activitatea specifică a IgY se determină cantitativ față de antigenul reprezentat de materialul patologic inactivat și liofilizat.

#### Probe:

- Ser MD (pacient Constanța suplimentat cu ouă hiperimune + tratament cutanat local cu IgY personalizat soluție) – 3 mL ser primit de la clinica Romar Constanța – repatizat 250 mL ser/tub, stocat la -20 °C (vezi ANEXA 1 Tratament folosind ca principiu imunitatea pasivă personalizată).
- Ser PR (pacient Hunedoara suplimentat cu ouă hiperimune + tratament cutanat local cu IgY personalizat soluție) – stocat la -20 °C.

**Martor negativ:** IgY SPF (26.01.2012)

**Martor pozitiv:** Chicken IgY, DEAE Purified – Lampire Laboratories

#### Reactivi:

- Conjugat IgG-anti IgY pasăre ICL – preparat cu NaCl Sigma și apa MiliQ/ 2015
- Diluant conj. SurModics - StabilZyme HRP Conjugate Stabilizer
- Tampon carbonat S9/2015
- PBS-Tween 0,05% S16/2015.
- Soluție fixare PBS-Tween 20 (2%) S15/2015
- Tampon diluție ser S4/ 2015
- Soluție de spălare plăci căptușite S3-P /2015
- TMB W USA
- Soluție stop S7 / 2014

## TEHNICA DE LUCRU

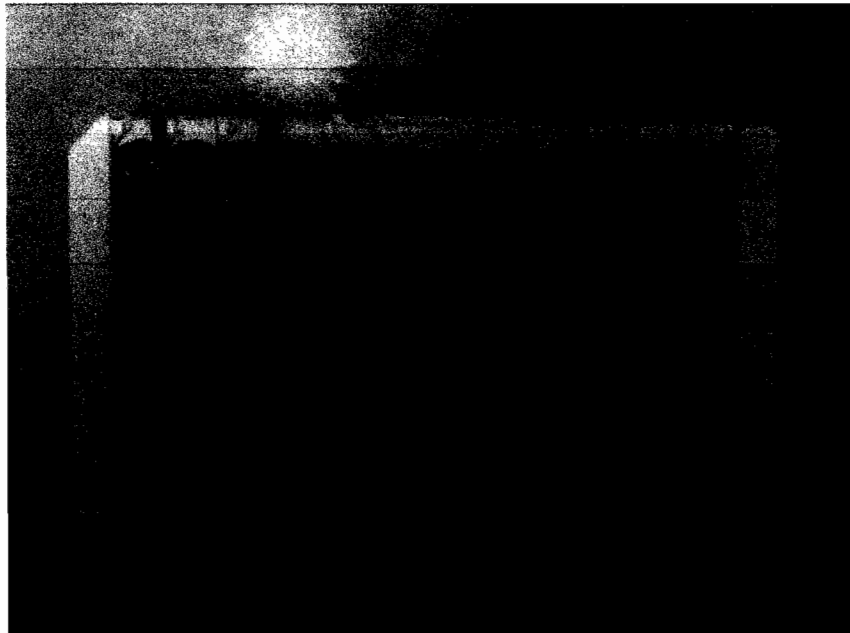
### A. Pregătirea plăcii ELISA:

- Se repartizează 100 μl / godeu din suspensia diluata, conform configurării plăcii;
- Placa se lasă pentru căptușire 2 ore la +37°C;
- După îndepărtarea lichidului, placa se spală de 3 ori cu soluția de spălare PBS-Tween 20 (2%).

- Blocarea reacției cu tampon de fixare, câte 300  $\mu$ l / godeu și se incubează 30 minute la temperatura camerei;
- Se înlătură lichidul de blocare.

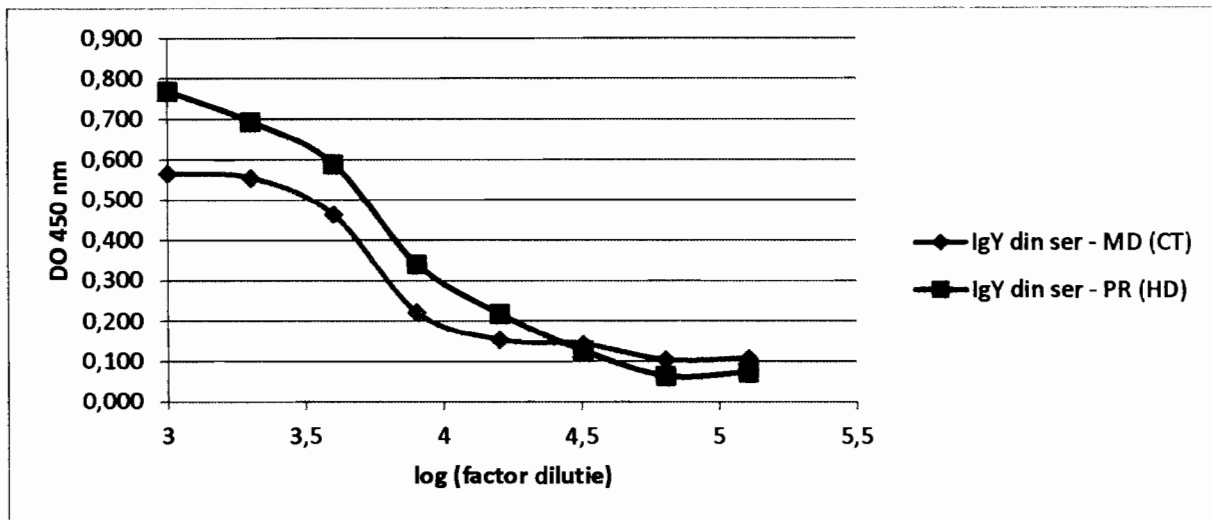
### **B. Reacția primară cu anticorpui:**

- Se repartizează în fiecare godeu 100  $\mu$ l de conjugat anti-IgG pasăre diluat 1:10.000, folosind ca diluant tamponul de diluție conjugat.
- Se incubează 2 ore la +37 °C.
- Se spală de 4 ori cu soluție de spălare PBS-Tween 20 (2%).
- Se adaugă 100  $\mu$ l TMB și se lasă la temperatura camerei 5-15 min.
- Se adaugă 100  $\mu$ l soluție de stopare.
- Se citește absorbanta la 450 nm.



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 IgY și respectiv IgY de la cei doi pacienți au răspuns pozitiv și au reacționat specific la intensitatea de 0,566 OD<sub>600</sub> și respectiv 0,735 OD<sub>600</sub>. Intensitatea răspunsului imun în acest experiment este în funcție de concentrația de antigen cu care s-a captușit placa de reacție de 5  $\mu$ g și respectiv 10  $\mu$ g per godeu.

Martori	Ser CT/ 2	Ser CT/ 3	Ser HD/ 4	Ser HD/ 5
	0.566	0.543	0.735	0.802
0.052	0.555	0.450	0.698	0.690
0.054	0.463	0.407	0.627	0.551
0.068	0.222	0.188	0.331	0.351
3.577	0.207	0.153	0.213	0.221
3.907	0.142	0.122	0.133	0.120
3.953	0.104	0.070	0.071	0.057
	0.107	0.067	0.085	0.059
	2	3	4	5



Reprezentarea grafică ne dovedește prezența IgY în sânge la un nivel de 0,570-0,780 OD ceea ce reprezintă cantitatea de aproximativ 250 ng/ml și respectiv 450 ng/ml ser provenind de la pacienții tratați cu IgY-specific.

**ANEXA I****Tratament folosind ca principiu imunitatea pasivă pesonalizată.**

În acest scop s-a folosit oul și IgY extras din oul de la găinile imunizate cu produsul patologic prelevat de la pacient. În cazul prezentat mai jos, produsul patogen a fost un raclaj de pe piele de pe leziuni cu cruste.

Pacienta M în vârstă de 76 de ani a suferit de psoriazis vulgaris. La controlul bacteriologic efectuat la Spitalul Victor Babeș din București în leziunile cutanate s-au găsit: *Staphylococcus aureus* și *Acinetobacter baumani*.

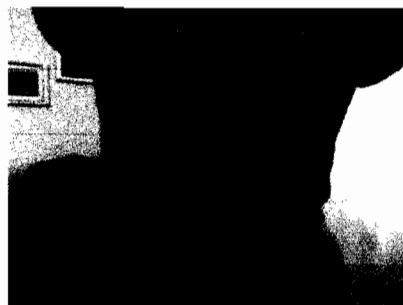
Pozele prezentate mai jos sunt făcute comparativ la începutul tratamentului și la data când pacienta a considerat că se simte bine și nu mai are psoriazis. În data de 22 08 2015 pacienta a fost examinată clinic și s-a constatat dispariția leziunilor provocate de psoriazis.

Pacienta M a beneficiat de un tratament intensiv cu ou hiperimun integral, IgY-specific lichid cu 200mg per 80 ml de soluție tampon și gel cu 200 mg IgY –specific/g. Pacienta a făcut tratament oral folosind oul integral, tratament local folosind IgY lichid și gel.

Pacienta continuă tratamentul pentru încă 30 de zile pentru a distruge colonizările cu *Staphylococcus aureus* din corp.

**Leziuni dupa 30 de zile de tratament**

**Pielea la sfârșitul tratamentului**





## REVENDICĂRI

### Titlul

### **PRODUCEREA ȘI UTILIZAREA OULUI HIPERIMUN PERSONALIZAT ÎN TRATAMENTUL DE URGENȚĂ AL PACIENȚILOR INFECTAȚI CU GERMEI PATOGENI**

1. Revendică metoda de preparare a antigenului care se folosește pentru imunizarea găinilor.
2. Revendică metoda de control a răspunsului imun al găinilor cărora li s-a administrat antigenul personalizat.
3. Revendică prepararea imunoglobulinelor specifice inoculului ca produs biologic care are proprietăți imunologice ce îi permit să se cupleze selectiv la epitopii existenți pe suprafața bacteriilor, fungilor și virusurilor folosite la imunizarea activă a găinilor.
4. Revendică oul hiperimun din care se extrag imunoglobuline specifice fiecărui antigen existent în proba prelevată de la pacient și din care s-a preparat inoculul.
5. Revendică oul hiperimun preparat față de inoculul obținut de la pacient și care este monospecific sau polispecific.