



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENTIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00735**

(22) Data de depozit: **16/10/2015**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2016 BOPI nr. **3/2016**

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

(72) Inventatori:
• CHIURCIU CONSTANTIN,
STR. MIHAI BRAU NR. 17, AFUMATI, IF,
RO;
• CHIURCIU VIORICA, STR. CIOCÂRLIEI
NR. 32, BL.24, AP. 36, SECTOR 2,
BUCURESTI, B, RO;

• SIMA LUCICA, BD. BASARABIA NR. 92,
BL. D1, ET. 3, AP. 12, SECTOR 2,
BUCURESTI, B, RO;
• MIHAI IULIANA, STR. LANTERNEI NR. 95,
SECTOR 2, BUCURESTI, B, RO;
• PĂTRAȘCU IONEL VICTOR,
CALEA DOROBANȚI NR. 136-138, AP. 3,
SECTOR 1, BUCURESTI, B, RO

(54) PRODUCEREA ȘI UTILIZAREA OULUI HIPERIMUN PERSONALIZAT (OVOPACH) ÎN TRATAMENTUL PSORIAZISULUI

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a ouălor hiperimune și a imunoglobulinelor din ouă de la găini imunizate, ouă utilizate pentru tratamentul psoriazisului. Procedeul conform inventiei constă în prelevarea, din leziuni cutanate ale unui pacient cu psoriazis, a unui material patogen, din care se prepară un imunogen care se administrează unor găini ouătoare convenționale, după care din ouăle găinilor care au răspuns

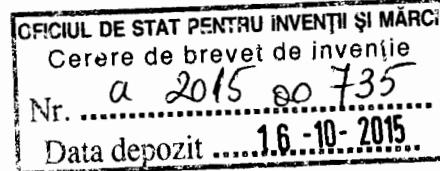
serologic se prepară imunoglobuline specifice, care, împreună cu oul hiperimun personalizat, se condiționează pentru utilizare sub formă de ou, lichid, spray, gel, cașete, comprimate sau gălbenuș liofilizat sau atomizat.

Revendicări: 5

Figuri: 12

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 inventie a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de inventie este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





DESCRIEREA INVENȚIEI

Titlul:

PRODUCEREA ȘI UTILIZAREA OULUI HIPERIMUN PERSONALIZAT (OVOPACH) ÎN TRATAMENTUL PSORIAZISULUI

Inventatori:

Chiurciu Constantin, Viorica Chiurciu, Lucica Sima, Iuliana Mihai, Pătrașcu Ionel Victor

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 al pacienților cu psoriazis. Psoriazisul este o boală cronică autoimună, în unele cazuri ereditară, care afectează circa 3% din populația globală, de regulă între vîrstele de 11 și 45 de ani. Psoriazisul este apreciat ca o boală incurabilă. Tratamentele cunoscute până la această dată se folosesc pentru a controla simptomele bolii. Experții susțin că nu se cunosc cauzele psoriazisului, dar boala rezultă din creșterea excesivă și reproducerea celulelor numite keratocite din straturile profunde ale pielii. Psoriazisul este considerat o boală autoimună. În acest caz limfocitele T din greșeală recunosc celule normale ale epidermului ca și cum ar fi antigene străine.

Din experiența pe care o avem până la această dată, utilizarea unei imunoglobuline personalizate sau a unui amestec de proteine personalizate extrase din oul Ovopach, poate reprezenta o șansă pentru fiecare pacient în parte, atunci când are psoriazis cu leziuni infectate cu germeni patogeni specifici, sensibili sau rezistenți la toate antibioticele. Este cunoscut faptul că în majoritatea afecțiunilor cronice țesuturile afectate au o rezistență naturală

diminuată, celulele modificate și deficitare din punct de vedere imunologic permitând dezvoltarea unei flore microbiene diverse ca natură și patogenitate (1).

Prezența în aceste cazuri a unor anticorpi specifici mulți anti agenți patogeni, floră oportunistă modificată, celule structurale și antigenic diferite de normal, reduce eficiența tratamentelor cu antibiotice (recidive frecvente și dobândirea rezistenței la acestea). Aceste date ne-au sugerat prepararea și administrarea de imunoglobuline de găină specifice (IgY-specifice) polivalente.

În acest program terapeutic s-a folosit metoda descrisă de Jerne (20) care se referă la prepararea unui anticorp Ab1 idiotipic care administrat pe gură și absorbit în sânge să fie tratat ca antigen de limfocitele T naive, să i se copieze informația modelului de antigen ca imagine negativă. Această informație o depozitează în ADN-ul propriu și se formează imediat o clonă care poartă acest mesaj imunologic. Limfocitele T activează limfocitele B cărora le transferă imaginea negativă sub forma unei informații negative la negativul limfocitului T și care, la structurarea anticorpilor de tip IgG, devine imagine pozitivă identică cu informația de pe IgY-idiotipic administrat oral la om și preparat pe găină.

Prezenta invenție se referă la prepararea oului hiperimun personalizat Ovopach față de antigenele preparate din agenți patogeni, flora oportunistă modificată, celule structurale și antigenic diferite de normal prezente în materialul patologic prelevat de la pacient, urmând ca testările ulterioare de laborator să identifice germenii patogeni și rezistența acestora la antibiotice. Produsul patologic prelevat de pe leziunile cutanate de la pacienți poate fi considerat un stimул imunologic celulo-microbial total (1).

Antigenul obținut în urma cultivării materialului patologic celular prelevat de la pacient în mediul de cultură timp de 24 sau 48 ore la 37 °C, se inactivă cu formol sau termic sau cu radiații gamma. Apoi se prepară imunogenul care se administrează la găină. Pentru a realiza un tratament eficient cu imunoglobuline extrase din gălbenușul (IgY) ouălor provenite de la găini imunizate cu antigeni specifici în amestec cu adjuvant QS21, aceste IgY trebuie să fie specifice, să prezinte o activitate directă față de germenii patogeni prezenti în organismul pacientului. Din punct de vedere științific, oul hiperimun Ovopach conține anticorpi idiopatici anti-anti-complex patogen individualizat (AIAACPI) care recunosc epitopii definiți de peptidele existente în produsul patogen individualizat (15).

Produsul antigenic inactivat în amestec cu adjuvantul QS21 se folosește pentru imunizarea rapidă a găinilor ouătoare. În acest scop se folosesc găini în plin ouat în vîrstă 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 germanilor patogeni prezenti în acest produs patologic. În funcție de speciile de germani patogeni, de rezistență sau sensibilitatea la antibiotice, se pot folosi în cursul tratamentului cu IgY personalizat.

Răspunsul imun al găinilor imunizate se va controla zilnic, prin evidențierea IgY în gălbenușul ouălor. Se va controla răspunsul imun specific calitativ și cantitativ față de antigenul administrat. Răspunsul imun al fiecărei găini în parte este diferit din punct de vedere cantitativ. Se preleveză ouăle de la găinile care produc IgY într-o cantitate mai mare de 1,500 OD în testul ELISA. Se face un amestec de gălbenușuri provenite de la găini la care există în ou cantitatea de peste 1,500 OD în testul ELISA, din care se extrage de urgență IgY folosind metoda Pătrascu. IgY extras se concentrează de douăzeci de ori prin filtrare tangențială. Se determină concentrația de IgY folosind testul ELISA și se diluează la cantitatea exprimată în mg/doză în funcție de conduită terapeutică. IgY personalizat se sterilizează prin filtrare prin filtre Millipore de 0,45 µm 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 proteine purificate.

PREZENTAREA STADIULUI TEHNICII INCLUSIV BIBLIOGRAFIE

Anticorpii anti idiotipici au fost descriși inițial, independent, de Henry Kunkel și Jacques Oudin (1963). Aceștia au observat că un animal imunizat cu un antigen produce un răspuns prin anticorpi (Ab1). Dacă acești anticorpi Ab1 sunt izolați și injectați în alte animale naive, acestea produc anticorpi anti Ab1. Acești anticorpi Ab2 se numesc **anti-idiotypic antibodies** deoarece ei recunosc un epitop de pe Ab1 care este unic pentru Ab1. Oudin a observat că specificitatea antigenică a Ab1 trebuie să se coreleză cu expresia idiotipică a Ab1. Cu alte cuvinte, diferenți anticorpi au fost definiți ca anticorpi cu specificitate pentru Ab1, sau un grup de anticorpi Ab1, legați de un antigen specific. Mai târziu Alfred Nisonoff și alții au descris

două tipuri de Ab2, anume Ab2 α și Ab2 β , dacă Ab2 pot să se cupleze la Ab1 în prezența antigenului. Ab2 β anti anticorpi idiotipici nu se cuplează cu Ab1 în prezență în exces a antigenului, probabil deoarece Ab2 se cuplează pe siturile de cuplare Ab1. Anticorpii anti-idiotipici Ab2 α cuplează, cu toate acestea, un idiotip distinct de situl antigenului Ab1.

Anticorpii idiotipici au fost descriși în detaliu de către Niels Jerne de la Institutul Pasteur din Paris în 1976 (5), fenomenul fiind studiat în continuare în vederea utilizării acestor molecule imunoglobulinice la tratamentul diferitelor afecțiuni, dar și că o formă nouă de vaccin (1-12).

Studii privind Ab2, anticorpi anti anti idiotipici s-au realizat imunoglobuline anti rabice pe câine, anti gp120 HIV pe pisica și pe găină (date nepublicate).

Idiotipyc IgY anti- matrice celule T – copie celule B - IgG anti-idiotipyic

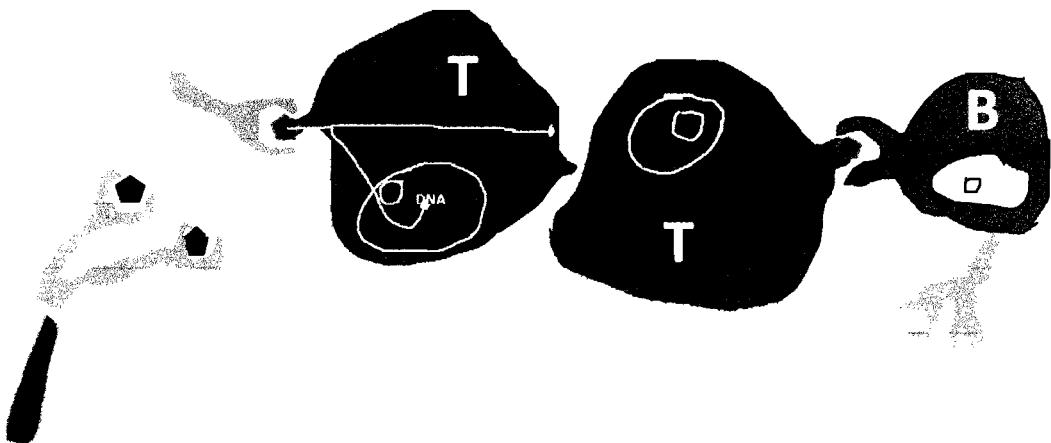


Figura 1. Mecanismul formării IgG anti-anti-idiotipic

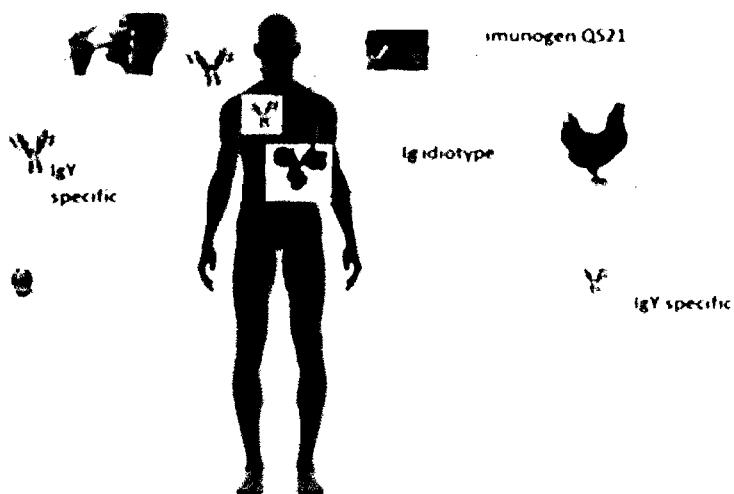
Transferul de informație imunologică se realizează de la găină la om, prin IgY (Ab1) către limfocitele T naive, de la clonele de limfocite T la limfocite B care preiau informația negativ – negativă și reproduce un IgG pozitiv aşa cum este IgY-idiotipic original (Pătrașcu I.V.).

Imunitatea pasivă artificială este produsă în general din sânge care conține cantități mari de anticorpi specifici. O altă formă modernă de imunitate pasivă artificială s-a realizat prin utilizarea imunoglobulinelor (Ig) extrase din gălbenușul de ouă (Y) care conține cantități mari de anticorpi specifici. Pentru a valorifica mai bine această variantă de producție și a valorifica

la maximum proprietățile imunologice, biochimice și morfofuncționale ale IgY, găinile (*Gallus domesticus*) sunt imunizate activ cu stimuli antigenici preparați în acest scop. Răspunsul imun la găină se regăsește 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 cu anticorpi împotriva microorganismelor față de care s-au format anticorpii. Acești anticorpi produși de găina care a fost imunizată activ, nu sunt produși de pacient, deoarece el nu poate să producă repede anticorpi sau nu are imunocompetență. Persoana care primește IgY va profita temporar de imunitatea pasivă, atât timp cât anticorpii persistă în organism. Acest tip de imunitate acționează imediat când pacientul are nevoie de protecție, anticorpii provenind de la altă persoană sau, în acest caz, de la găină.

Anticorpi anti-anti-idiotipici specifici epitopilor de pe proteinele antigenului original



În informațiile preluate de la CDC Atlanta, Georgia USA, care a analizat imunitatea de grup/de populație, se menționează că sunt persoane care pot primi produse din sânge, dintre care imunoglobulinele care le conferă o protecție imediată față de o boală specifică. Acesta este avantajul major al imunității pasive deoarece protecția este 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 germenii patogeni la om și animale s-a realizat prin administrarea orală a unor formule medicamentoase în care se găsesc anticorpi 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 pasarea 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 există 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 coprului (**schița nr. 2.** Patrascu I.V.)

Aceste lucrări au fost realizate pentru prima oară în România și fac subiectul acestui brevet în laboratoarele Romvac s-au preparat imunoglobuline IgY specifice prin imunizarea activă a găinilor cu un antigen obținut prin cultivarea materialului patologic direct în mediul de cultură la 37 °C timp de 24-48 ore; antigenul brut obținut a fost amestecat cu adjuvant QS21 și a fost administrat la găini în plină activitate de ouat. La intervale diferite de timp s-au recoltat ouă pentru a urmări evoluția răspunsului imun din galbenușul ouălor provenite de la aceste găini.

În literatura de specialitate se menționează faptul că ouăle, folosite integral sau pentru prepararea IgY specific, se colțează 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 mai sunt necesare încă 2-3 zile făcând posibilă utilizarea acestor produse la om după 45 de zile.

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

Aceste produse sunt folosite pentru prevenirea sau tratamentul infecțiilor cu germenii patogeni identificați, cunoscuți și pentru care există IgY specific. Aceasta metodologie acceptată pe plan internațional nu se poate folosi în cazul pacienților infectați cu germenii 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 (Ovopach) folosind un protocol nou de preparare și control al IgY specific produs de către găină la stimulul antingenic administrat împreună cu adjuvantul QS21. Stimulul antingenic multiplu este reprezentat de agenți patogeni, floră

oportunistă modificată, celule structural și antigenic diferite de normal (1) care au fost prelevate ce la pacienți.

BIBLIOGRAFIE

1. C. Gh. Băcanu, Ş. A. Băcanu. Autovaccin celulomicobian total complex (AVCMTC). Geocities 2009.
2. LF 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 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
13. Cerere de brevet nr. A/00179 din 05.03.2014 – “Metode de evaluare imunologică a activității specifice a imunoglobulinelor de pasare (IgY)” Pătrașcu Ionel Victor, Viorica Chiurciu, Chiurciu Constantin și Georgiana Topilescu .
14. Cerere de brevet 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 Vaillant¹, Patrick Eberechi Akpaka^{1*}, Norma McFarlane-Anderson², Monica P. Smikle³ 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
16. Lin-Hui Wang; Xiao-Yu Li; Li-Ji Jin; Jian-Song You; Ye Zhou; Shu-Ying Li; Yong-Ping Xu. Characterization of chicken egg yolk immunoglobulins (IgYs) specific for the most prevalent capsular serotypes of mastitis-causing *Staphylococcus aureus*. *Veterinary microbiology* 2011;149(3-4):415-21
17. Angel Alberto Justiz Vaillant¹, Patrick Eberechi Akpaka, Norma McFarlane-Anderson, Monica P. Smikle and Wisdom Brian. The Chicken and Egg System for the Development of Anti-Idiotypic Vaccines. *J Vaccines Vaccin* 3:137 doi: 10.4172/2157-7560.
18. Ainsworth A.J., and J E Brown. Detection of în ovo derived idiotypic antibodies. I. A model for maternal-neonatal idiotype network studies. Anna Vangone, Safwat Abdel-Azeim, Ivana Caputo,
19. Daniele Sblattero, Roberto Di Niro, Luigi Cavallo, Romina Oliva. Structural Basis for the Recognition în an Idiotype-Anti-Idiotype Antibody Complex Related to Celiac Disease. *PLOS ONE*: July 2014, Volume 9 Issue 7 pag. 1-12.

20. Jerne N K. Towards a network theory of the immune system. Ann Inst Pasteur Immunol 1974; 125C:373-389
21. Angel A Justiz Vaillann Sehlue Vuma. The Chicken Egg: "A Nature's Miracle". Cell & Developmental Biology. 2015; 4:1.
22. Patent WO1994014469 A1 Jul 7, 1994. Rodkey L.S., Seferian P.G. Multivalent ab1 antibodies as vaccines.
23. Anna Vangone, , Safwat Abdel-Azeim, Ivana Caputo, Daniele Sblattero, Roberto Di Niro, Luigi Cavallo, Romina Oliva. (2014) Structural Basis for the Recognition in an Idiotype-Anti-Idiotype Antibody. PLoS ONE 9(7):
24. Angel Alberto Justiz Vaillant1, Patrick Eberechi Akpaka1*, Norma McFarlane-Anderson2, Monica P. Smikle3 and Wisdom Brian The Chicken and Egg System for the Development of Anti-Idiotypic Vaccines. Journal of Vaccines & Vaccination, April 26, 2012
25. Shofi qur Rahman, Sa Van Nguyen, Faustino C. Icatlo Jr. Kouji Umeda and Yoshikatsu Kodama. Oral passive immunotherapeutics.A novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases. Human Vaccines & Immunotherapeutics 9:4, 1–10; April 2013;
26. A.J. Ainsworth and J.E. Brown Detection of in ovo derived idiotypic antibodies. I. A model for maternal-neonatal idiotype network studies. The Journal of Immunology (Impact Factor: 4.92). 09/1991; 147(3):910-4
27. Alberto Justiz Vaillant, Patrick Eberechi Akpaka, Norma McFarlane-Anderson, Monica P. Smikle and Wisdom Brian. Chicken and Egg System for the Development of Anti-Idiotypic Vaccines. J Vaccines Vaccin 2012, 3:137
28. Viorica Chiurciu, I.V. Patrascu, C.Chiurciu, Georgiana Topilesu. Specific Chicken Immunoglobulins (IgY) for Prevention and Treatment and Human Bacterial Infections. European Biotechnology Congress Lecce 2015
29. Patrascu I.V., Viorica Chiurciu, Chiurciu C., Georgiana Topilesu, Maria Oporanu, Iulia Mihai, Georgiana Radu, Andreia Dinu, Badica I., Stoica C., Angelescu C., Alina Gheor, Oltean G. Ovotransferina PC2 (4). O forma noua immunogenic active la nivel molecular. Sesiunea Academiei Romane din 28 februarie 2015
30. Patrascu I.V., C. Chiurciu. Oul hiperimun. Sesiunea Academiei Romane din 28 februarie 2015
31. Cerere de brevet nr. A/00156 din 25.02.2014 – "Procedeu de obtinere și utilizare a imunoglobulinelor de găină (IgY)" Pătrașcu Ionel Victor, Viorica Chiurciu, Chiurciu Constantin și Georgiana Topilesu
32. Angel Alberto Justiz Vaillant, Norma McFarlane-Anderson, Patrick Eberechi Akpaka, Monica P Smikle, Niurka Ramirez and Armando Cadiz. Use of Dot Blots Analysis in the Separation of Anti-HIV Antibodies in Animals. J Chromat Separation Techniq 2013, 4:5
33. Kphler G, Milstein C. Continous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256:495-497
34. Oudin J., Michel M. Une nouvelle forme d'allotype des globulines gama du serum de lapin, apparemment liee a la specificite anticorp. RC. Acad. Sci. Paris 1963; 255:805-808
35. Ban, N., Escobar, C., Garcia, R., Hasel, K., Day, J., Greenwood, A., McPherson, A. Crystal structure of an idiotype-anti-idiotype Fab complex. (1994) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91: 1604-1608

INVENTIA PE SCURT

Formularea pe scurt a soluțiilor tehnice

Obiectivul prezentei invenții este obtinerea oului hiperimun Ovopach ca produs și metodă de preparare a acestuia, Ovopach activ specific imunologic față de antigene bacteriene, levuri, ciuperci, structuri celulare prezente în materialul patologic prelevat de la pacient de pe leziunile cutanate provocate de psoriazis.

Pentru prepararea ouălor Ovopach specifice a fost realizat un program intensiv de cercetare care a urmărit: obținerea Ovopach 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, 14). Antigenul monovalent sau polivalent a fost utilizat în amestec cu adjuvant QS21 și a unui imunomodulator numit aici P, conform metodologiei prezentate în cererile de brevet de invenție depuse la OSIM (12, 13, 14).

Folosind ca tehnici de laborator testul de imunodifuziune în gel de agar, testul de imunodifuziune radiară, testul de identificare ELISA și testul de specificitate ELISA s-a reușit caracterizarea răspunsului imun al găinilor care produc Ovopach, prin evidențierea și cuantificarea efectorilor imuni care se regăsesc în extractul apos din gălbenușul oualor 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 foloseste în laborator și pentru izolarea, identificarea și caracterizarea diferitelor microorganisme prezenta în acest produs. Aceasta activitate inclusiv antibiograma contribuie la caracterizarea infecțiilor acuzate de pacient în leziunile produse de psoriazis.

Din oul hiperimun Ovopach se pot realiza diferite produse care pot fi folosite de urgență în tratamentul psoriazisului la pacientul de la care s-a prelevat produsul patogen. Dintre acestea IgY soluție la concentrația de 200 mg/80 ml, IgY soluție la concentrația de 25 mg/ml în

flacoane de 2 ml, oul intergal, ou integral liofilizat, IgY unguent la concentrația de 20 mg/ml, IgY spray la 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 pentru tratamentul psoriazisului a caror etape de extragere sunt prevazute în Brevetul de invenție (14).

Oul hiperimun Ovopach reactioneaza specific simultan pentru unul sau mai multe antigene cu care a fost imunizată găina.

Oul hiperimun Ovopach anti psoriazis se obține de la găinile imunizate cu antingenul obtinut de materialul patologic de la pacient, în amestec cu adjuvant Q care s-a administrat o singura data intra muscular, în patru puncte diferite în pieptul găinilor ouatoare în varsta de peste 24 de spătamani. Ouale pot fi folosite ca atare sau din ou se prepara oul intergal liofilizat sau atomizat, se poate extrage IgY după ce se decelează un nivel de anticopri specific de 1500 OD sau mai mare prin testul ELISA în gălbenuș. În acest scop se folosesc ouale găinilor care au răspuns corespunzător.

Unul dintre obiectivele prezentei invenții este de a înregistra Ovopach anti psoriazis ca produs biologic, a înregistra metoda de preparare a acestuia și metoda de tratament a psoriazisului.

DESCRIEREA SUMARĂ A PROCEDURILOR

Acest brevet caracterizează produsul biologic numit Ovopach anti psoriazis și a metodei de tratament a psoriazisului în baza descrierii de mai jos:

Pentru a se obține oul hiperimun numit Ovopach anti psoriazis, imunizarea găinilor se face la vîrstă de 24-30 săptămâni, în plin ouat, cu un produs patologic recoltat de la pacient. Acest produs cuprinde germeni patogeni specifici, germeni care reprezintă un amestec de proteine prezente la 24-48 de ore în mediul de cultură menținut la 37 °C, inactivat cu formol, termic sau cu radiații gamma, în amestec cu adjuvant QS21, amestec administrat intra muscular. Cantitatea de proteină în amestec cu adjuvantul QS21 nu poate fi mai mare de 200 mg per ml diluat în PBS per doză.

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 face cu 2 ml inocul, în 4 puncte diferite în muculatura pectorală. În cazul când la 14 zile de la inoculare nu se constată un răspuns imun specific față de antingenul 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 anticoprilor prin filtrare tangențială.

În toată perioada de timp se administrează furaje combinate pulbere *ad libitum*.

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 aceeași 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, ID radiar și ID Outcherlony.

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 INVENTIEI

Obținerea oului hiperimun Ovopach anti psoriazis 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 prepară din materialul patologic prelevat de pe leziunile produse de psoriazis de la pacient. Acest produs conține agenți patogeni, flora oportunistă modificată, celule structural și antigenic diferite de normal.

În acord cu prezenta inventie, materialul patogen este prelevat de la fiecare pacient în parte, iar produsul finit este personalizat și este reprezentat de oul hiperimun sau produsele secundare. Produsul patologic care se găsește în mediul de transport este cultivat pe medii de cultură lichide timp de 24 sau 48 de ore. Separat se pregătește și materialul celular prin centrifugare la 5000 rpm la +4 °C. Amestecul acestor produse se inactivează cu formol sau termic sau cu radiații gamma, 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 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. 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.

2. Controlul răspunsului imun al găinilor ouătoare imunizate cu antingenul personalizat

Începând cu cea de a zecea zi de la administrarea antigenului se controleaza individual prezența imunoglobulinei specifice față de antingenul 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 INVENTIEI

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

Exemplul 1

Prepararea antigenului personalizat

Prepararea antingeului personalizat se face prin prelevarea produsului patologic de la pacientul bolnav. Acesta poate fi material patologic de pe suprafața pielii (cruste). Produsul 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 în amestec cu detriturile celulare se inactivează cu formol, termic sau prin radiații gama și se purifică prin spălare. Sedimentul se folosește ca material antingenic în amestec cu adjuvantul QS21. După prepararea masei antingenice se face și controlul inactivării microorganismelor.

Imunizarea găinilor ouătoare

Găinile, în plină activitate de ouat, crescute în cuști individuale, se imunizează prin administrarea a 2 ml antigen în patru locuri în musculatura pectorală. Dacă răspunsul imun controlat în perioada 10-14 zile de la prima administrare a antingenului este corespunzător (2,000-3,000 OD în testul ELISA) se trece la utilizarea ouălor de la aceste găini fie prin administrarea lor integrală, fie prin extragerea imunoglobulinelor din gălbenuș. Programul de imunizare se poate continua, iar ouale 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 cerecerea de brevet nr. A/00156 din 25.02.2014 (12)

Exemplul 2

Condiționarea oului hiperimun Ovopach

Conditionarea oului hiperimun Ovopach se face după metodologia descrisă în cerecerea de brevet nr. A/00156 din 25.02.2014 (12).

Pentru utilizarea cât mai eficientă, acest produs biologic personalizat se condiționează în următoarele moduri:

1. Oul Ovopach integral care se administrează crud în lapte cald sau alte lichide;
2. Oul Ovopach gălbenuș uscat prin atomizare sau liofilizare(umiditate reziduală maximum 5%)
3. Imunoglobuline (IgY) extrase din gălbenușul oualor Ovopach (lichid 200 mg/80 ml, 50 mg/ml, spray, veselina, granule, capsule)
4. Amestec de proteine purificate extrase din Ovopach respectiv din gălbenuș (IgY) și albus (ovotransferina, ovomucina, lisozimul).

Exemplul 3

Controlul final al oului personalizat Ovopach.

- a) Pentru admiterea oului personalizat Ovopach anti psoriazis, forma finală pentru administrare în soluție pentru administrații cutanate, oro-faringo-gastro-intestinal 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 ciupercile din produsul pathologic prelevat de la pacient, cu care au fost imunizate găinile, asemanatoare cu a imunoglobulinelor (IgY) extrase din gălbenușul acelorași ouă.

Experimentul nr. 4

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 locul de contact se combina 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 subetaloanul Romvac. Aceste controale fac parte din prima categorie de controale care au fost folosite pentru identificarea moleculelor de IgY-Ovopach și confirmarea că sunt imunoglobuline.

Comentariul pentru fiecare reacție este sub poză.



Testul ID cu IgG de iepure anti IgY.

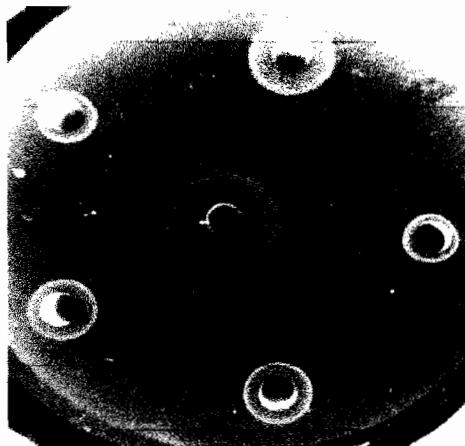
IgG a fost pus în godeul central și în godeurile nr. 1 și 4. În godeurile 2 și 6 s-a repartizat subetalonul Romvac IgY anti *S. aureus* subetalon. În godeurile 3 și 5 s-a pus IgY Ovopach. Se vede clar că liniile de precipitare realizate de subetalon și IgY Ovopach se unesc, acestea dovedind că produsele sunt din aceeași grupă proteică și antigenică.

În acest control folosind testul 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 IgY-PC2 subetalon ROMVAC, în godeul 3 s-a repartizat IgY-ABCAM-USA, în godeul 5 s-a repartizat IgY-PC2 sediment din precipitat cu PEG, iar în godeul 6 supernatant

din Tf-PC2 precipitat cu PEG. Se constată că toate probele de IgY au reacționat pozitiv cu IgG anti-găină. Se constată că liniile de precipitare dintre godeul 2 și 3 se unesc, sunt duble. Liniile de precipitare dintre godeurile 5 și 6 se unesc. Pe această imagine obținuta în microreacție se vede ca IgY extras prin precipitare cu PEG este mai concentrat și a împins linia de reacție către godeul central.

Test de identificare a Ovopach folosind imunodifuziunea radiară

În gelul de agar se amestecă IgG anti-IgY la o concentrație optimă de 2 ml 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. Se pune la incubat placa de reacție la +22 °C timp de 20-24 ore, după care se citește reacția la lumină indirectă. Prezența unui disc de precipitare dovedește că reacția antingen/anticorp s-a realizat. Măsurarea diametrului,



scăderea diametrului godeului și valoarea împărțită la doi reprezintă valoarea de migrare a fiecarui produs în parte. Când diametrul reacției este mai mic decât a martorului atunci produsul se concentrează. În cazul cand reacția Ovopach este mai mare decât a martorului, produsul se poate dilua.

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 decesată de Ovopach este 10 nanograme în materialul testat. Datorită specificității și reproductibilității reacției imunoenzimaticice 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 triplițat câte 150 µl IgY-M specific sau IgY SPF (25, 12,5, 6,25 µg/ml) în PBS;
- h) În paralel se adaugă în triplițat 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 temperatură camerei, la întuneric
- m) Se blochează reacția cu 150 µl HCl;
- n) Reacția se citește la spectrofotometru cu filtru DO₄₅₀;
- 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 replicate fiecare, în diluții 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 absorbanța 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 standardul 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 OD600 și respectiv 2,300 OD600 care confirmă existența a 420 nanograme și respectiv 400 nanograme per ml de IgY-PC2.

.

Exemplul 5

C. Determinarea conținutului de IgY în sângele pacienților tratați cu IgY-specific, prin testul ELISA

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

Proba: Ser MD (pacient din Constanța suplimentat cu ouă hiperimune + tratament cutanat local cu IgY personalizat soluție) – 3 mL ser primit de la clinica Romar Constanta – repartizat 250 mL ser/tub, stocat la -20 °C.

Martor negativ: IgY SPF (26.01.2012)

Martor pozitiv: Chicken IgY, DEAE Purified – Lampire Laboratories

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

Cromogen: TMB W USA

Soluție stop S7 / 2014

TEHNICA DE LUCRU

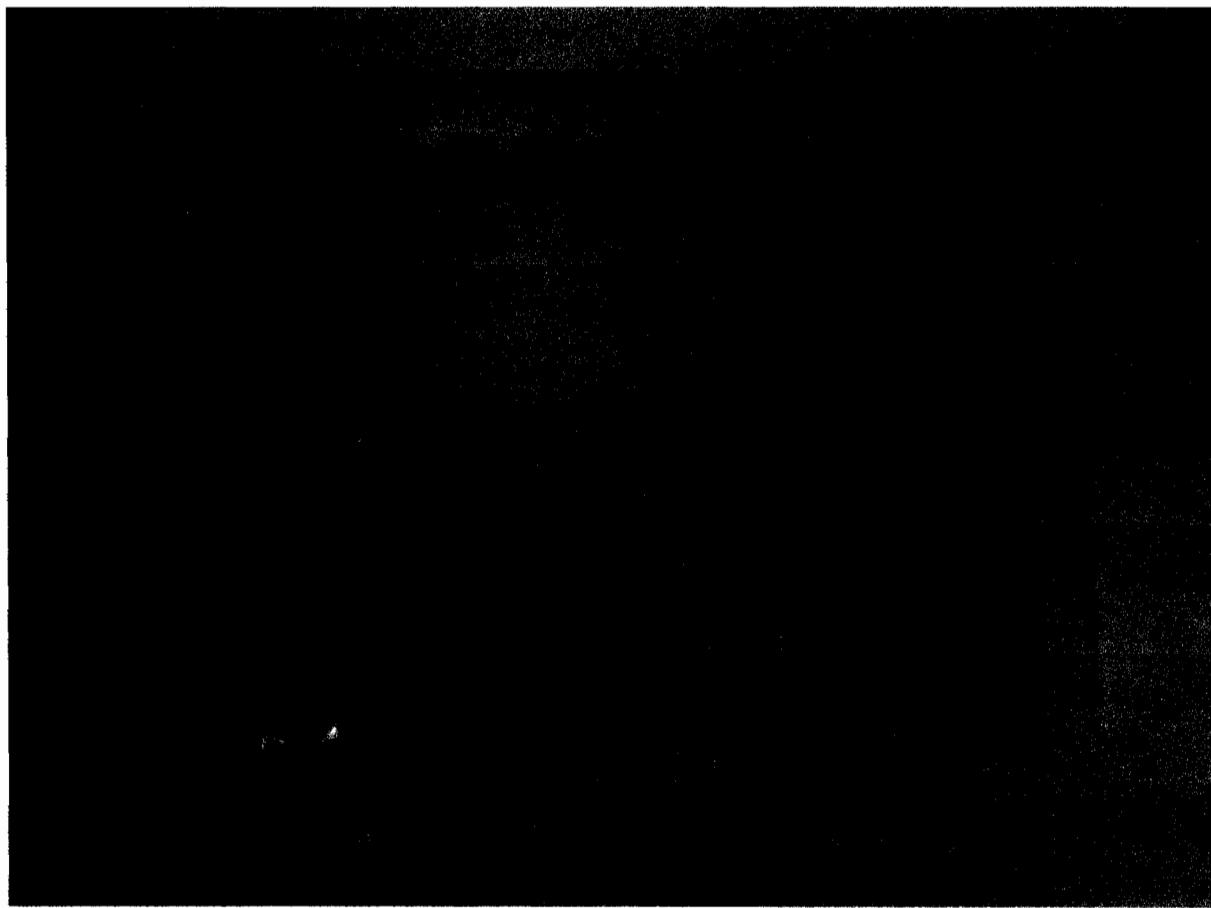
A. Pregătirea plăcii ELISA

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

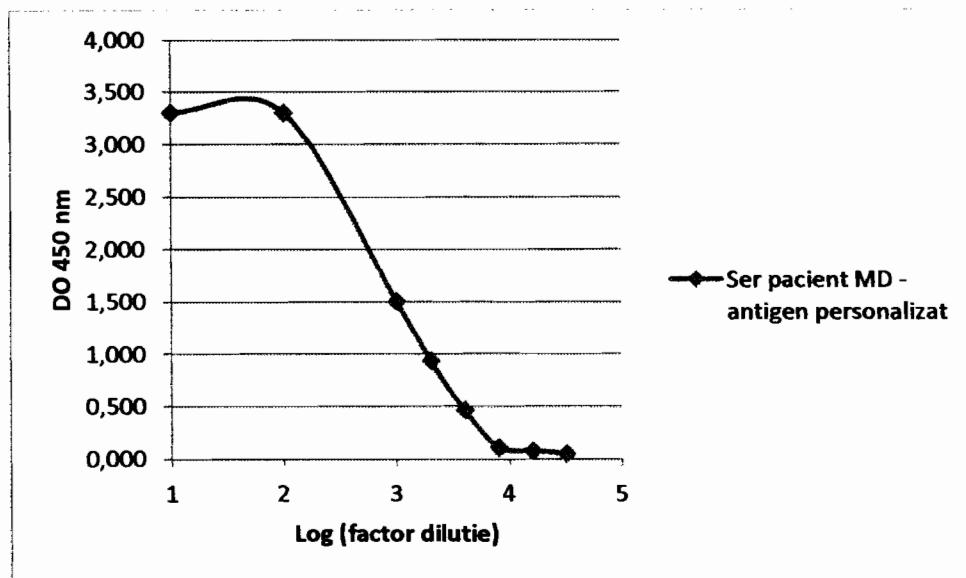
- Blocarea reacției cu tampon de fixare, câte 300 µl / godeu și se incubează 30 minute la temperatura camerei;
- Se înlătură lichidul de blocare.

B. Reacția primară cu anticorpii

- Se repartizează în fiecare godeu 100 µl conjugat anti IgY 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 µl TMB și se lasă la temperatura camerei 5-15 min.
- Se adaugă 100 µl soluție de stopare.
- Se citește absorbanța 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 pasari SPF a reaționat negativ (godeurile C1, D1 și D1). Martorul pozitiv IgY și, respectiv, IgY de la pacient a reaționat specific la intensitatea de 3,340 OD₄₅₀. Intensitatea răspunsului imun, în acest experiment este în funcție de concentrația de antigen cu care s-a captușit placa de reacție de 10 µg per godeu.



Reprezentarea grafică dovedește prezența IgY AP în sânge la un nivel mare tratamentului cu IgY-specific AP.

Exemplul 6

Tratamentul psoriazis cronic de 16 ani folosind IgY-personalizat și oul Ovopach personalizat.

Tratamentul psoriazisului

Pacient: F/65 ani diagnosticată cu psoriasis eritrodermic în urma cu 14 ani. Leziunile cutanate au existat pe tot corpul. A efectuat tratament cu antibiotice și alte tipuri de medicație alopatică, fără rezultat. La un interval de 60 de zile de tratament s-a constatat căderea crustelor și dispariția zonelor inflamate. Au dispărut pruritul și durerile locale la 48-72 zile de tratament. Pe piele se văd zonele afectate care au culoare roz și se delimitizează clar de pielea normală.

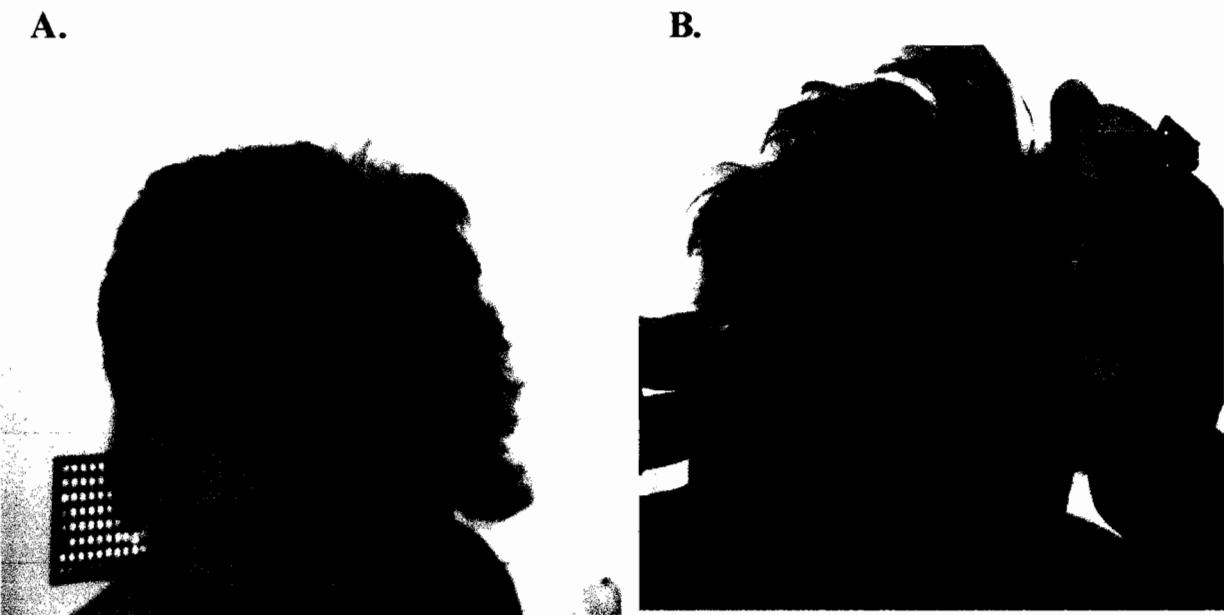


Figura 2: Evoluția leziunilor de la nivelul scalpului după administrarea de IgY personalizată; (A) Imagine realizată la data de 17.06.2015 la aproximativ 3 luni de tratament și (B) Imagine realizată pe data de 21.08.2015 la 5 luni de la începerea tratamentului

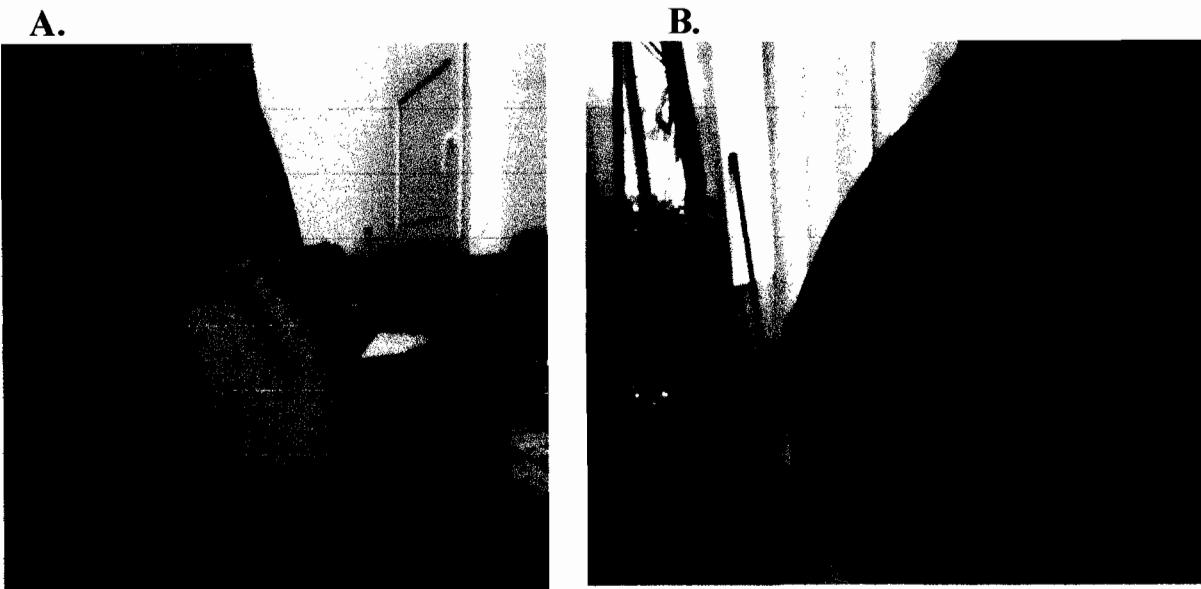


Figura 3: Evoluția leziunilor de la nivelul brațelor după administrarea de IgY personalizată; (A) Imagine realizată la data de 17.06.2015 la aproximativ 3 luni de tratament și (B) Imagine realizată pe data de 21.08.2015 la 5 luni de la începerea tratamentului

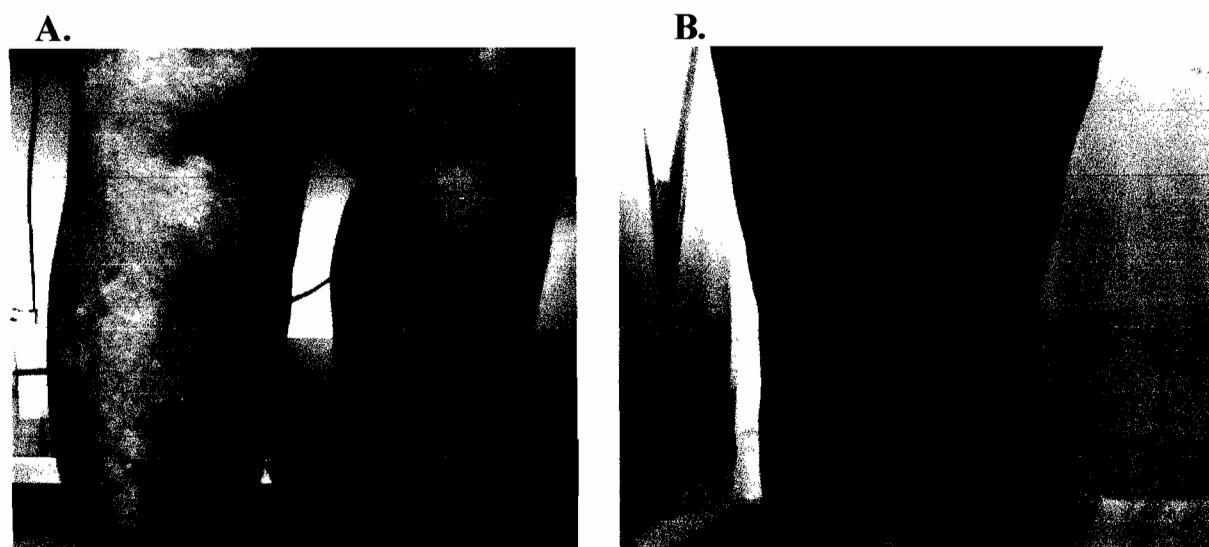


Figura 4: Evoluția leziunilor de la nivelul picioarelor după administrarea de IgY personalizată; (A) Imagine realizată la data de 17.06.2015 la aproximativ 3 luni de tratament și (B) Imagine realizată pe data de 21.08.2015 la 5 luni de la începerea tratamentului;

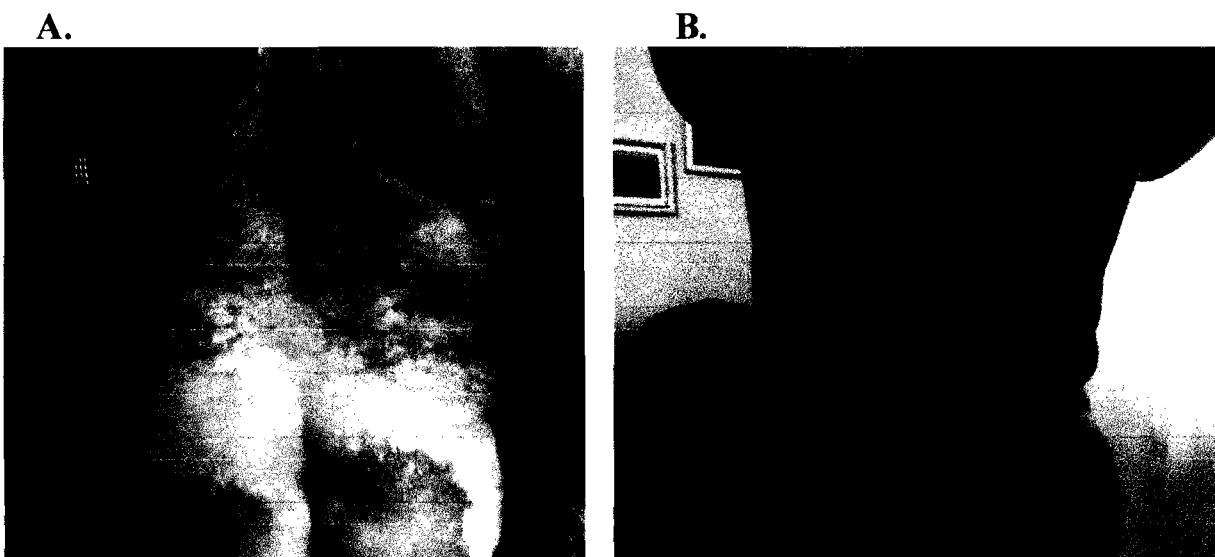


Figura 4: Evoluția leziunilor de la nivelul regiunii lombare după administrarea de IgY personalizată; (A) Imagine realizată la data de 17.06.2015 la aproximativ 3 luni de tratament și (B) Imagine realizată pe data de 21.08.2015 la 5 luni de la începerea tratamentului

Exemplul 7

Studiu de caz numărul 4

- Pacient 45 ani /M
- Psoriazis vulgaris de 6 ani cu localizari diferite
- S-au prelevat probe biologice
- S-a început tratamentul cu Imunoinstant poly lichid, ou crud care contine IgY-polivalent și gel cu IgY-polivalent.
- Pacientul face tratament local de două ori pe zi prin spalarea leziunilor cu sapun, spalarea leziunilor cu IgY-poli lichid și lasat să se usuce. De două ori pe zi se aplică pe leziuni gel cu IgY-poly.
- Dimineața consumă un ou crud în lapte iar seara face gargara 2 minute cu IgY-polivalent după care înghite continutul. Dupa 3 zile de tratament pacientul nu mai prezinta prurit și usturimi. La 19 zile de tratament se vede ca leziunile au inceput sa dispara, crustele alb-argintii au cazut iar starea generala a pacientului este buna. Sunt prezentate fotografii de la inceputul tratamentului și la 19 zile de tratament.

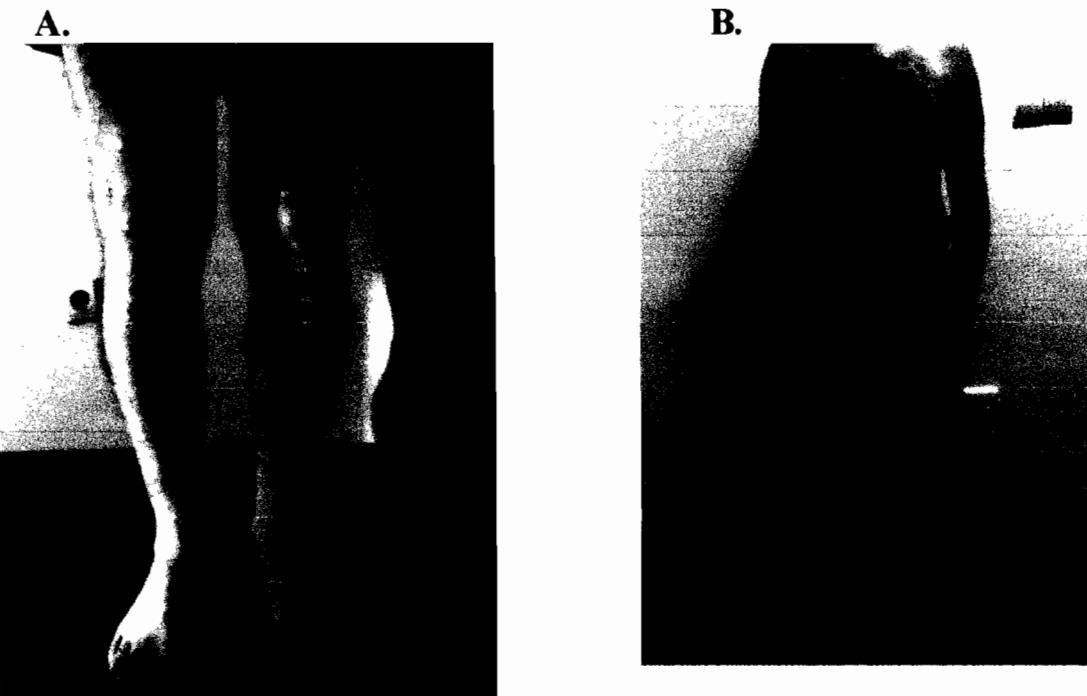


Figura 6: Evoluția leziunilor de la nivelul picioarelor după administrarea de IgY personalizată; (A) Imagine realizată la începerea tratamentului și (B) Imagine realizată după 19 zile de tratament

A.



B.



Figura 7: Evoluția leziunilor de la nivelul membrului superior stâng după administrarea de IgY personalizată; (A) Imagine realizată la începerea tratamentului și (B) Imagine realizată după 19 zile de tratament

A.**B.**

Figura 8: Evoluția leziunilor de la nivelul membrului superior drept după administrarea de IgY personalizată; (A) Imagine realizată la începerea tratamentului și (B) Imagine realizată după 19 zile de tratament

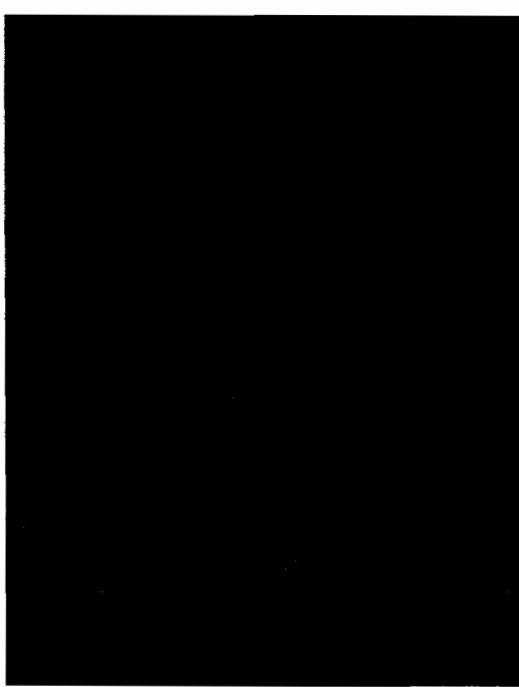
Studiul de caz nr 7

Pacient în varstă de 65 de ani diagnosticat cu psoriazis de 14 ani. I s-a admnistrat ou integral, imunoglobulină polivalentă oral și gel cu IgY-polivalentă local. După 30 de zile de tratament leziunile nu mai supurează, nu mai prezintă prurit și nici leziuni sanguinolente. Crustele albaștine s-au detașat, iar zonele roșiatice ale pielii au dispărut.

48
2015 - 00735-

10.10.2015

A.



B.



Figura 9: Evoluția leziunilor de la nivelul pielii după administrarea de IgY personalizată; (A) Imagine realizată la începerea tratamentului și (B) Imagine realizată după 30 de zile de tratament

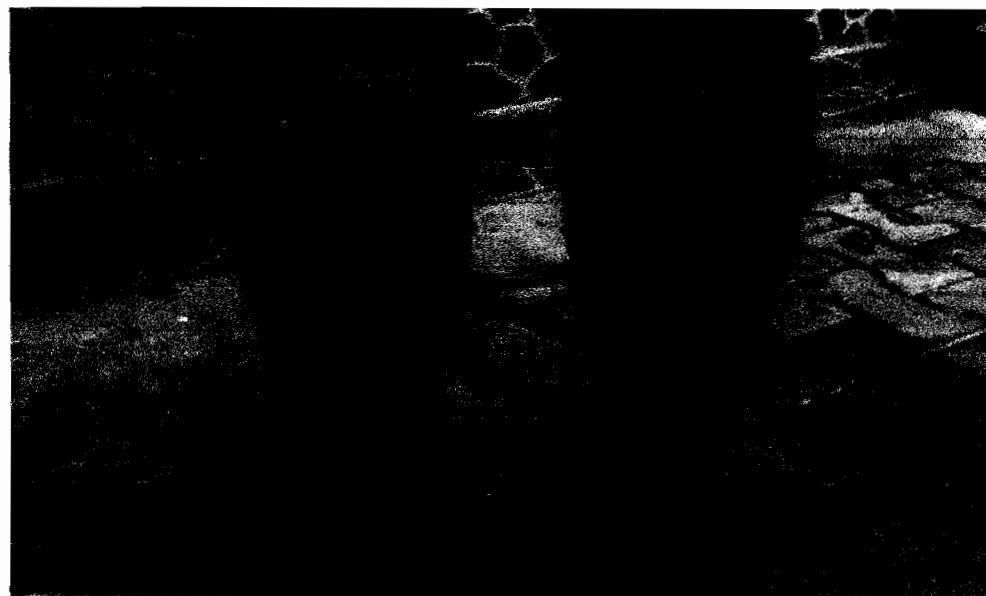


Figura 10: Leziunile de la nivelul piciorului înainte de începerea tratamentului

92015--00735-

13.10.2015

74

35



Figura 11: Evoluția leziunilor de la nivelul piciorului după administrarea de IgY personalizată timp de 30 de zile;

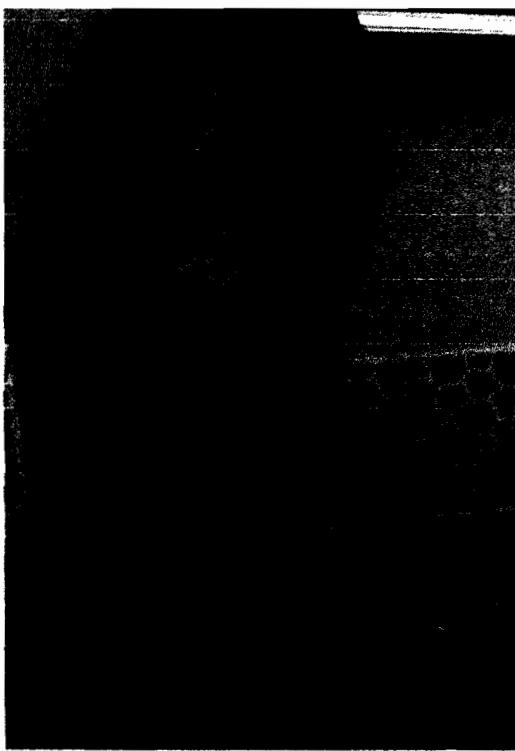
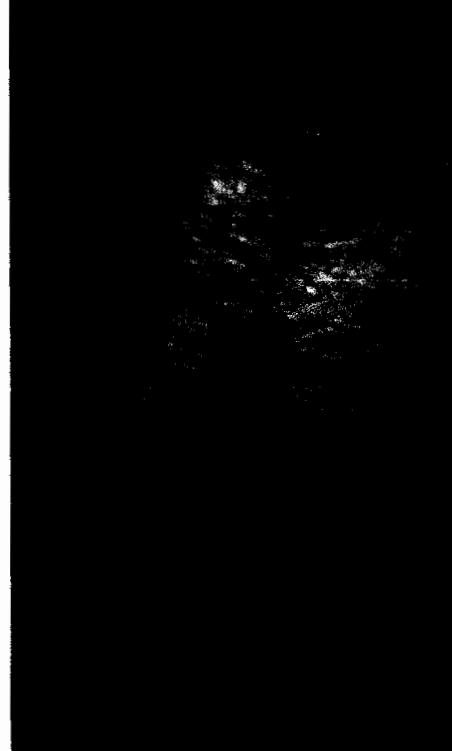
A.**B.**

Figura 12: Evoluția leziunilor de la nivelul membrului superior stâng după administrarea de IgY personalizată; (A) Imagine realizată la inceperea tratamentului și (B) Imagine realizată după 30 de zile de tratament

REVENDICĂRI

Titlul:

PRODUCEREA ȘI UTILIZAREA OULUI HIPERIMUN PERSONALIZAT (OVOPACH) ÎN TRATAMENTUL PSORIAZISULUI

Inventatori:

Chiurciu Constantin, Viorica Chiurciu, Lucica Sima, Iuliana Mihai, Pătrașcu Ionel Victor

1. Revendică metoda de preparare a imunogenului prelevat de la pacientul cu psoriazis care se folosește pentru imunizarea găinilor;
2. Revendică prepararea imunoglobulinelor specifice inoculului (IgY specific idiotipic numit și IgY1) ca produs biologic care în organismul pacientului transferă informația pe care o deține, pe fragmentul Fab, către celulele T naive care reproduc o imagine negativă care se clonează. Celulele T din această clonă de tip IgG2 comandă celulelor de tip B să producă anticorpi identici cu informația pe care o dețin și o transferă. Reproducerea de către celulele B a informației de la celula de tip T este identică cu negativul negativului de pe IgY-idiotipic ceea ce reprezintă o imagine pozitivă, adică IgG specific imunogenului prelevat de la fiecare pacient în parte. Acest mecanism se poate explica ca un fenomen imunologic în care antigenul inițial prelevat de la pacientul cu psoriazis se administrează că imunogen la găină. Găina răspunde imun și formează IgG1, adică IgY-specific idiotipic care devine matrice pentru celulele T naive. Celulele T se clonează și transferă informația de tip IgG2 la celulele de tip B care formează o imagine negativă a negativului de pe celulele T și produc IgG identic cu IgY-specific idiotipic de la găini.
3. Revendicăoul hiperimun din care se extrag imunoglobuline specifice fiecărui antigen existent în proba prelevată de la pacientul cu psoriazis și din care s-a preparat imunogenul administrat la găină.

4. Revendică metoda de tratament potrivit căreia se recoltează de pe leziunile cutanate ale pacientului cu psoriazis un material care conține microorganisme și structuri celulare din care se prepară un imunogen care se administrează la găini. Din ouăle găinilor care au răspuns serologic se prepară imunoglobuline specifice sub formă de lichid (20 µg/ml de IgY specific), sub formă de spray (50 µg/ml), sub formă de gel (30 µg/ml), casete cu 200 µg de IgY specific/bucată, comprimate cu 100 și respectiv 200 µg/bucată sau gălbenuș liofilizat sau atomizat 6 g/plic.
5. Revendică metoda de tratament care folosește imunoglobuline extrase din gălbenușul provenit de la găini imunizate cu imunogen preparat de la fiecare pacient în parte prezentate la punctul 4 și oul integral crud în amestec cu lapte la temperatura de 24-30°C.