



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2017 00042**

(22) Data de depozit: **26/01/2017**

(41) Data publicării cererii:
28/07/2017 BOPI nr. **7/2017**

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

(72) Inventatorii:
• OPORANU MARIANA, DRUMUL TABEREI
NR. 92, BL. C7, SC. F, AP. 233,
BUCUREŞTI, B, RO;

• DIMULESCU ALINA IOANA,
STR. SOLDAT TOMOVICI STELIAN NR. 19,
SECTOR 2, BUCUREŞTI, B, RO;
• CHIURCIU CONSTANTIN,
STR. MHAI BRAVU NR. 17, AFUMAȚI, IF,
RO;
• TIPLEA DANIELA, CALEA GIULEŞTI
NR. 113, BL. 21, SC. B, ET. 1, AP. 25,
SECTOR 6, BUCUREŞTI, B, RO;
• ROMEO TEODOR CRISTINA,
STR. SEMENICULUI 12B, DUMBRĂVIȚA,
TM, RO

(54) PRODUCEREA ȘI UTILIZAREA PULBERII DIN MEMBRANA COCHILIERĂ A OULUI HIPERIMUN HPC2

(57) Rezumat:

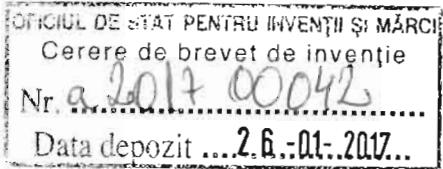
Invenția se referă la un procedeu de obținere a pulberii din membrana cochilieră a oului hiperimun HPC2, și utilizarea acesteia pentru prepararea unui supliment alimentar pentru sistemul osteo-articular. Procedeul conform inventiei constă în imunizarea unor găini din rasa Rhode Island Red, aflate la începutul perioadei de ouat, cu un antigen preparat din tulpini bacteriene și fungice inactivate. Amestecul a fost emulsionat într-un volum egal de adjuvant QS-21, și s-a inoculat în musculatura pieptului, în patru locuri diferite (0,25 ml în fiecare punct). Inoculările de rapel s-au făcut la 14 zile, respectiv, 28 de zile de la prima inoculare. Ouăle hiperimune au fost colectate zilnic, după 14 zile de la ultima inoculare. Din aceste ouă s-au extras IgY din

gălbenuș, fracțiunile proteice din albuș și membranele cochiliere care se prelucrează în vederea obținerii unei pulberi. Membranele cochiliere se separă de coajă prin menținere în apă deionizată în care s-a adăugat acid acetic diluat 4%, timp de 12 h la temperatură de 4°C, se usucă timp de 4 h la temperatură de 50°C, și se prelucrează prin măcinare, din care rezultă o pulbere care conține colagen, acid hialuronic, condroitină și alte proteine specifice. Pulberea din membrană cochilieră este utilizată pentru prepararea unui supliment natural sub formă de comprimate, prin amestecare cu acid ascorbic și excipienti de tabletare uzuali.

Revendicări: 5

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 INVENTIEI:

PRODUCEREA ȘI UTILIZAREA PULBERII DIN MEMBRANA COCHILIERĂ A OULUI HIPERIMUN HPC2

AUTORI:

**Mariana Oporanu, Alina Ioana Dimulescu, Constantin Chiurciu, Daniela Țiplea,
Romeo Teodor Cristina**

Domeniul tehnic

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

Prezenta inventie descrie prepararea și utilizarea pulberii din membrana cochilieră a oului hiperimun HPC2. Membrana cochilieră provine din ouă de la găini imunizate cu antigene bacteriene și fungice inactivate. Prezenta inventie se referă la izolarea membranei cochiliere și utilizarea acesteia în obținerea produsului ROdia-HPC2 comprimate. Prezenta inventie descrie separarea membranei cochiliere, deshidratarea și mărunțirea acesteia. Metoda de obținere a membranei cuprinde următoarele etape:

Etapa de separare: se face prin desprinderea membranelor de pe cojile în prealabil spălate și menținute într-o soluție de acid acetic 4%.

Etapa de uscare: se realizează în etuvă la temperatură de 50°C timp de 4 ore.

Etapa de mărunțire: se realizează cu ajutorul unei mori de măcinare; se obține o pulbere fină.

Prezenta inventie caracterizează și compoziția membranei cojii de ou hiperimun PC2. Membrana conține colagen, acid hialuronic, condroitină, glucozamină, ovotransferină, ovoalbumină, lizozim, ovomucină, aminoacizi etc. Produsul ROdia-HPC2 – comprimate, conține aceste ingrediente și acid ascorbic (factorul vitaminic), agenți de încărcare, agenți de îngroșare; agenți antiaglomeranți. Comprimatele sunt ambalate în flacoane de polietilenă cu 30 comprimate x 500 mg.

Descrierea invenției

Prezentarea stadiului tehnic incluiv bibliografie

Prezenta invenție se referă la prepararea pulberii din membrană cochilieră din ouăle hiperimune HPC2. Aceasta provine de la găini imunizate cu antigene bacteriene și fungice (antigen multiplu). Membrana cochilieră este compusă din două straturi individuale situate între ovoalbumina și coaja de ou. Membranele sunt compuse din fibre de proteine sub forma unei rețele de colagen de tip I, încapsulate într-o manta continuă de proteoglicani și alte macromolecule. Grosimea celor două membrane este cuprinsă între 73-114 μm la ouăle de găini din rasa White Leghorn [12]. Membrana externă are o grosime cuprinsă între 53,2 μm și 65,5 μm în timp ce membrana internă ajunge de la 19,5 μm până la 24,3 μm . Colagenul se regăsește în stare nativă, sub formă nedenaturată cu structura triplu helicală nedistrusă (tropocolagen)[19]. Membrana externă este formată din trei straturi de mucină, iar cea internă dintr-un strat de mucină și unul de cheratină. Acidul hialuronic este un alt component de o mare valoare prezent în membrană. Acesta poate fi utilizat în diferite domenii inclusând industria cosmetică, farmaceutică, nutraceutică și în alte aplicații medicale [3].

Britton și K. K. Hale jr. au demonstrat că proteinele din membrana cochilieră au un conținut ridicat de arginină, acid glutamic, metionină, histidină, cistină și prolină [5]. De asemenea, membrana conține hidroxiprolină, prolină și acid glucozaminic [15].

Cea mai importantă funcție a membranei este aceea de a acționa ca o structură de menținere pentru ou, înainte de depunerea calciului în coajă și de a oferi o matrice organică pentru fixarea acestuia [8]. Membrana este necesară și în dezvoltarea embrionului prin secretarea unor factori de creștere; conține cantități ridicate de proteine și cantități moderate de glucozamină (până la 1% din greutatea uscată), condroitina (până la 1%), acid hialuronic (până la 2%) și colagen (până la 5%) [11].

Studiile lui Woung și colab. au demonstrat prezența tipului I și V de colagen în membrana cojii de ou [19]. Arias și colab. au identificat prezența colagenului de tip X în membrana cochilieră cu funcția de a inhiba mineralizarea și de a stabiliza zona de depunere a mineralelor [3]. Membrana cochilieră conține acid glucozaminoglican inclusând dermatan sulfat și condroitină [13]. Picard și colab. au izolat și caracterizat glicoproteinele din membranele cochiliere. Acestea includ hexamine, hexose și fructoză [14]. Recent, au fost

raportate cantități semnificative de acid hialuronic în membrana cochilieră (Brevet 6946551). Alte componente identificate în membrană sunt ovotransferina, desmozina și isodesmozina, lizil oxidază și lizozimul [7 și 9]. Unele dintre acestea, de exemplu lizozimul și ovotransferina sunt proteine specifice având proprietăți antibacteriene [10]. Lizozimul scindează peretele celular al bacteriilor, iar ovotransferina acumulează fierul, făcându-l inaccesibil dezvoltării microorganismelor [Brevet A00653/2014]. Membrana cochilieră acționează ca o veritabilă barieră antibacterienă.

Au fost descrise o serie de proteine obținute din surse naturale care au fost utilizate în aplicații terapeutice și cosmetice. Astfel, pudra obținută din corn de cerb a fost utilizată în aplicații nutraceutice. Aceasta a fost inclusă în capsule sau folosită ca ingredient în batoanele nutritive. Fracțiunea lipidică obținută din castravetele de mare poate fi folosită ca supliment nutraceutic pentru stimularea sistemului imun. Aceste fracțiuni izolate pot fi utilizate în tratamentul bolilor alergice, inflamatorii și de piele [18]. Preparatele pot fi administrate oral sau aplicate ca loțiuni topice. Proteina hidrolizată obținută din picioare de pui și procesată sub formă de pulbere sau gel, se folosește în tratamentul arsurilor, dezvoltarea musculaturii și pentru piele [16].

Metodele de separare a membranei cochiliere de pe coaja oului pot fi mecanice prin desprinderea membranelor, după spălarea cojilor și înlăturarea albușului și gălbenușului [Brevet US7584.909]. O combinare a metodelor mecanice și chimice pentru separarea membranei, include agitarea cojilor cu membrane în prezența unui acid diluat până ce acestea se desprid [Brevet 258838]. Metoda cea mai utilizată include mărunțirea membranelor sub formă de pudră cu particule cuprinse între 100-500 microni [Brevet 20140346261]. În altă metodă, membranele mărunțite sunt supuse hidrolizei enzimaticе folosind o enzimă din drojdie. Suspensia rezultată conține o fracțiune solubilă în care predomină acidul hialuronic și o altă fracțiune insolubilă conținând colagen [Brevet 496946551/B2]. Extractele și hidrolizatele sunt obținute fără alterarea ingredientelor naturale prezente în membrana cochilieră, putând fi utilizate în aplicații biotehnologice.

Au fost descrise și alte preparate topice obținute din surse naturale pentru protecția, tratamentul și vindecarea rănilor [17]. De exemplu, un produs injectabil și oral cuprinde glucozamină, condroitin sulfat, colagen hidrolizat sau nativ, hialuronat de sodiu, ascorbat de mangan și acid malic. Produsul acționează ca un agent condroprotector, îmbunătățește sinteza condrocitelor, contribuie la vindecarea rănilor și la menținerea sănătății țesuturilor [Brevet

7007806]. Dale Paul DeVore a descris beneficiile membranei cochiliere native și hidrolizate [Brevet US 8580,315 B2/2013].

Un număr de mediatori ai inflamației acționează și ca mediatori ai durerii; o serie de autori prezintă mai multe citokine eliberate de celulele sistemului imunitar, care sunt capabile să inducă hiperalergie [17 și 20]. Aceste citokine includ IL-10, IL-6, IL-8 și TNF α . Unele citokine activează inflamația (pro-inflamatorii), iar altele reduc inflamația și contribuie la vindecarea rănilor (anti-inflamatorii); citokinele pro-inflamatorii includ IL-1 α , IL-1 β , IL-11, IL-12, IL-17, IL-18, TNF α , proteine monocitare chemoattractante (MCP-1, MCP-3, MCP-5) și proteine inflamatorii elaborate de macrophage (MIP-1 β , MIP-2, MIP-3 β)[Brevet US 8580315 B2]. Citokinele anti-inflamatorii includ IL-6, IL-10, IL-12 și IL-13 [Brevet US 8580315 B2].

Tratamentul inflamației cuprinde o varietate de agenți anti-inflamatorii (inhibitori ai enzimei COX), care acționează lent, agenți de modificare a bolii, inclusiv nutriceutele cum ar fi glucozamin, condroitina și un număr de plante medicinale (Articulin F, Avocado, Capsaicini, ghimbir, Reumalex, Gheara diavolului)[17].

Brevetul US.Nr. 8580315 descrie o metodă și un produs pentru tratamentul și prevenirea inflamației și a tulburărilor asociate inflamației. Produsul conține glucozamină în combinație cu o proteină din ou. Aceasta s-a obținut prin hiperimunizarea găinilor cu un imunogen care conține și/sau un antiinflamator. Invenția se referă la o metodă de reducere a inflamației la pacienți la care se administrează produsul. Aceasta reduce durerea și inflamația articulară legată de osteoartrită, artita reumatoidă sau alte tulburări articulare.

NaKKarike și colab. [Brevet 258838] au obținut membrane din coji umede prin menținerea acestora în soluție EDTA-Na 5%, apoi la temperatura camerei ($26\pm2^{\circ}\text{C}$) timp de 24h; s-a adăugat hexan și s-a omogenizat timp de 3 minute. Amestecul a fost lăsat în repaus timp de 5 minute pentru a separa stratul organic de cel aproape. Stratul de hexan conținând membrane sub formă de emulsie a fost decantat și filtrat pentru a separa membranele ca reziduu. Reziduul a fost spălat cu apă deionizată timp de 5 minute, apoi cu acetona, filtrat, deshidratat la 50°C timp de 30 minute, pentru a obține membrane uscate. Noutatea acestei invenții constă în separarea membranei de coaja oului, prin tratamente blânde cu EDTA și hexan. Acestea nu afectează calitatea proteinelor din membrane iar contaminarea cu particule din coajă este minimă.

Metoda elaborată de Snyder [Brevet 20140346261] constă în ajustarea umidității cojilor cu membrane înainte de procesul de separare. Ajustarea include uscarea cojilor la un conținut

de umiditate mai mic de 24% din greutatea lor. Uscarea cojilor se produce la temperatura de 48-77°C, timp de 60-90 min.

Pătrașcu și colab. a demonstrat capacitatea de modulare a ovotransferinei PC2 pentru a răspunde imun față de antigenele cu care au fost imunizate găinile [Brevet A/00008]. Invenția caracterizează răspunsul imun specific al ovotransferinei PC2 în funcție de structura antigenului monospecific sau polispecific folosit. Aceiași autori au caracterizat oul hiperimun Ovopach, care are capacitatea de a reacționa specific cu epitopii bacteriilor și fungilor cu care au fost imunizate găinile [Brevet A00810].

Bibliografie

1. **Arias JL, Fernández MS, Dennis JE, Caplan AI (1991)**, Collagens of the chicken eggshell membranes, Connect Tissue Research 26(1-2):37-45.
2. **Arias JL, Fernández MS, Dennis JE, Caplan AI (1991)**, The fabrication and collagenous substructure of the eggshell membrane în the isthmus of the hen oviduct, 11(5):313-2.
3. **Arias JL, Nakamura O, Fernández MS, Wu JJ, Knigge P, Eyre DR&Caplan AI (1997)**, Role of Type X Collagen an Experimental Mineralization of Eggshell Membranes, Connective Tissue Research Overseas Publishers Association 36(1):21-32.
4. **Baker JR, Balch DA (1962)**, A Study of the Organic Material of Hen's-Egg Shell Biochem. J, 82: 352-61.
5. **Britton WM, Hale JJ Jr. (1997)**, Amino Acid Analysis of Shell Membranes of Eggs from Young and Old Hens Varying în Shell Quality, Poultry Science, 56:865-871.
6. **Carrino DA, Dennis JE, Wu TM, Arias JL, Fernández MS, Rodriguez JP, Fink DJ, Heuer AH, Caplan AI (1996)**, The Avian Eggshell Extracellular Matrix aş a Model Biomineralization, Connective Tissue Research, 35(1-4):325-29.
7. **Gautron J, Hinke MT, Panheleux M, Garcia-Ruiz JM, Boldicke T, Nys Y (2001)**, Ovotransferrin îs a matrix protein of the eggshell membranes and basal calcified layer, Connective Tissue Research, 42:255-67.
8. **Gautron J, Bain M, Solomon S, Nys Y (1996)**, Soluble matrix of hen's eggshell extracts changes în vitro the rate of calcium carbonate precipitation and crystal morphology, British Poultry Science, 37:853-66.
9. **Harris ED, Blount JE, Leach RM Jr. (1980)**, Localization of lysyl oxidase în hen oviduct: implication în egg shell membrane formation and composition, Science 208(4439):55-6.

INVENTIA PE SCURT

Formularea pe scurt a soluțiilor tehnice

Prezenta invenție se referă la producerea unei pulberi din membrana cochilieră, obținută printr-un proces de producție natural fără utilizare de substanțe chimice, fiind extrasă din ouă hiperimune HPC2. Membrana conține ingrediente importante (colagen, acid hialuronic, condroitină, glucozamină, aminoacizi, ovotransferină, lizozim etc.), care contribuie la funcționarea normală a sistemului osos. Pentru prepararea pulberii s-a realizat un program de cercetare care a urmărit prepararea antigenului multiplu (obținut din tulpini bacteriene și fungice) imunizarea găinilor convenționale sau SPF, controlul răspunsului imun al găinilor ouătoare prin teste ELISA și IDGA, separarea membranelor cochiliere, obținerea pulberii din membrane și utilizarea acesteia în realizarea produsului ROdia-HPC2 comprimate. Evaluarea principalelor componente active prezente în membrane se face prin identificarea collagenului și a fracțiunilor cu activitate antibacteriană (OTf, lizozim, OVA, ovomucina) față de antiseruri specific prin testul IDGA.

Produsul ROdia-HPC2 comprimate x 500 mg conține ingrediente active din membrana cochilieră, care împreună cu acidul ascorbic asigură buna funcționare a sistemului osteo-articular.

DESCRIEREA SUMARĂ A PROCEDURILOR

Obiectele acestui brevet se vor evidenția în baza descrierii de mai jos:

Acest brevet se referă la obținerea pulberii din membrane cochiliere a ouălelor hiperimune și utilizarea acesteia la obținerea unui produs biologic ROdia-HPC2 comprimate. Produsul conține componente active din membrana cochilieră (colagen, acid hialuronic, glucozamină, condroitină, ovotransferină, lizozim, ovomucină și ovoalbumină) obținută în mod natural, la care se adaugă acid ascorbic (vitamina C).

Pentru obținerea membranei cochiliere, utilizată la prepararea produsului ROdia-HPC2, se imunizează găini ouătoare, din rasa Rhode-Island Red, aflate la începutul perioadei de ouat în vîrstă de 23 de săptămâni. Antigenul cu care se face imunizarea reprezintă un amestec de tulpini bacteriene și fungice, inactivate cu formol, în amestec cu adjuvant QS-21. Antigenul se inoculează intramuscular. Cantitatea de proteine în amestec cu adjuvantul este de 200 mg/ml. Imunizarea fiecărei găini se face cu 2 ml inocul în 4 puncte diferite în musculatura pectorală.

Inoculările de rapel se fac la 14 zile, respectiv 28 de zile de la prima inoculare. În toată această perioadă găinile sunt hrănite cu furaje combinate în care se adaugă 0.5 g imunomodulator uscat la 1000 g furaj, amestecat uniform. Evaluarea răspunsului imun se face direct prin controlul ouălor recolatare de la găinile imunizate, prin teste ELISA și de imunodifuzie în gel de agar. La un interval de 14 zile de la ultima inoculare se începe colectarea de ouă hiperimune. De la acestea se înlătură conținutul oului, se rețin cojile care se spală din abundență cu apă deionizată. Se separă membranele cochiliere de coji prin menținerea într-un volum mare de apă deionizată, care conține acid acetic 4%, se deshidratează în etuvă la 50°C, timp de 3 ore și se mărunțesc cu ajutorul unei mori de măcinare; se depozitează în sticle etanș și se condiționează sub formă de comprimate ROdia-HPC2. Carecterizarea pulberii obținute se face prin următoarele teste:

- metoda colorimetrică pentru identificarea colagenului;
- identificarea componentelor active din pulberea de membrană cochilieră prin testul IDGA față de antiseruri specifice;
- determinarea cantitativă a OTf HPC2 prin testul ELISA direct;
- contaminarea microbiană se efectuează conform standardelor prevăzute de Farmacopeea Europeană ediția 7 (capitolele 2.6.12.2.6.13.5.1.4 preparate orale neapoase).

Produsul ROdia-HPC2 conținând pulbere din membrană cochilieră și vitamina C se procesează sub formă de comprimate x 500 mg și se ambalează în flacoane de polietilenă x 50 ml.

DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENTIEI

Pulberea din membrana cochilieră a ouălor hiperimune HPC2 se obține printr-un proces de producție natural, fără utilizare de substanțe chimice. În acord cu prezența inventie, prepararea pulberii din membrană cochilieră cuprinde o serie de etape: prepararea antigenului (1), imunizarea găinilor ouătoare convenționale sau SPF (2), controlul răspunsului imun al găinilor imunizate (3), extragerea și prepararea membranei cochiliere din ouă hiperimune (4), evaluarea componentelor prezente în pulberea obținută din membrană cochilieră (5), procesarea pulberii sub formă de comprimate ROdia-HPC2 (6).

1. Prepararea antigenului

În acord cu prezenta invenție, antigenele s-au preparat din tulpini bacteriene din colecția ROMVAC COMPANY S.A. (Salmonella enteritidis Ro-TL 248, Salmonella typhimurium RO-05 TL 312014) sau obținute în Spitale din România (Streptococcus pneumoniae, Clostridium difficile, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Escherichia coli și Candida albicans). Tulpinile de referință au fost Streptococcus mutans ATCC 55677 și Helicobacter pylori ATCC 49503. Tulpinile bacteriene s-au cultivat pe bulion nutritiv, iar Candida albicans pe mediu Sabouraud lichid. Clostridium difficile (anatoxina) s-a obținut pe mediu Thioglycollate. Culturile s-au incubat la 37°C timp de 24-48 h, s-au spălat de două ori cu PBS steril, pH = 7.2 și s-au inactivat cu formaldehidă 0.5% timp de 18 h; suspensiile s-au ajustat la valoarea 0.05 la DO 600, corespunzând unei densități celulare de aproximativ 1×10^5 UFC/ml.

2. Imunizarea găinilor ouătoare convenționale sau SPF

S-au format loturi de găini ouătoare convenționale sau SPF din rasa Rhode Island Red, aflate la începutul perioadei de ouat, în vîrstă de 23 săptămâni. S-a preparat un amestec de antigene bacteriene și fungice, conform pct.1 (antigen multiplu), care a fost emulsificat în adjuvant QS 21. Găinile s-au inoculat de 3 ori cu antigenul multiplu în patru locuri diferite în musculatura pieptului (0.25 ml în fiecare punct). Inoculările de rapel s-au făcut la 14 zile, respectiv la 28 zile de la inocularea inițială. Colectarea ouălor se face la un interval de 14 zile de la ultima inoculare, iar în titrul anticorpilor s-a evaluat periodic prin teste ELISA și IDGA.

Utilizarea adjuvantului QS 21 în amestec cu antigenul multiplu, crește răspunsul imun, nu produce reacții locale și s-a dovedit foarte eficient în producerea și menținerea unui titru mare de anticorpi, pentru o lungă perioadă de timp. Pe toată perioada experimentului s-au administrat furaje combinate în care s-a adăugat 0.5 g imunomodulator uscat la 1000 g furaj.

3. Controlul răspunsului imun al găinilor ouătoare imunizate cu antigen multiplu

Controlul răspunsului imun s-a făcut prin colectare de ouă la un interval de 14 zile de la ultima inoculare. Acestea s-au testat prin ELISA și IDGA. Gălbenușul recoltat individual s-a precipitat cu polietilenglicol 6000 pentru extragerea imunoglobulinei (IgY). S-au identificat găinile al căror răspuns imun s-a situat la un nivel de peste 1.500 DO în testul ELISA. Aceste

ouă se pot folosi pentru obținerea IgY și a fracțiunilor din albuș. Din aceste ouă hiperimune se extrage membrana cochilieră care se prelucrează în vederea obținerii pulberii.

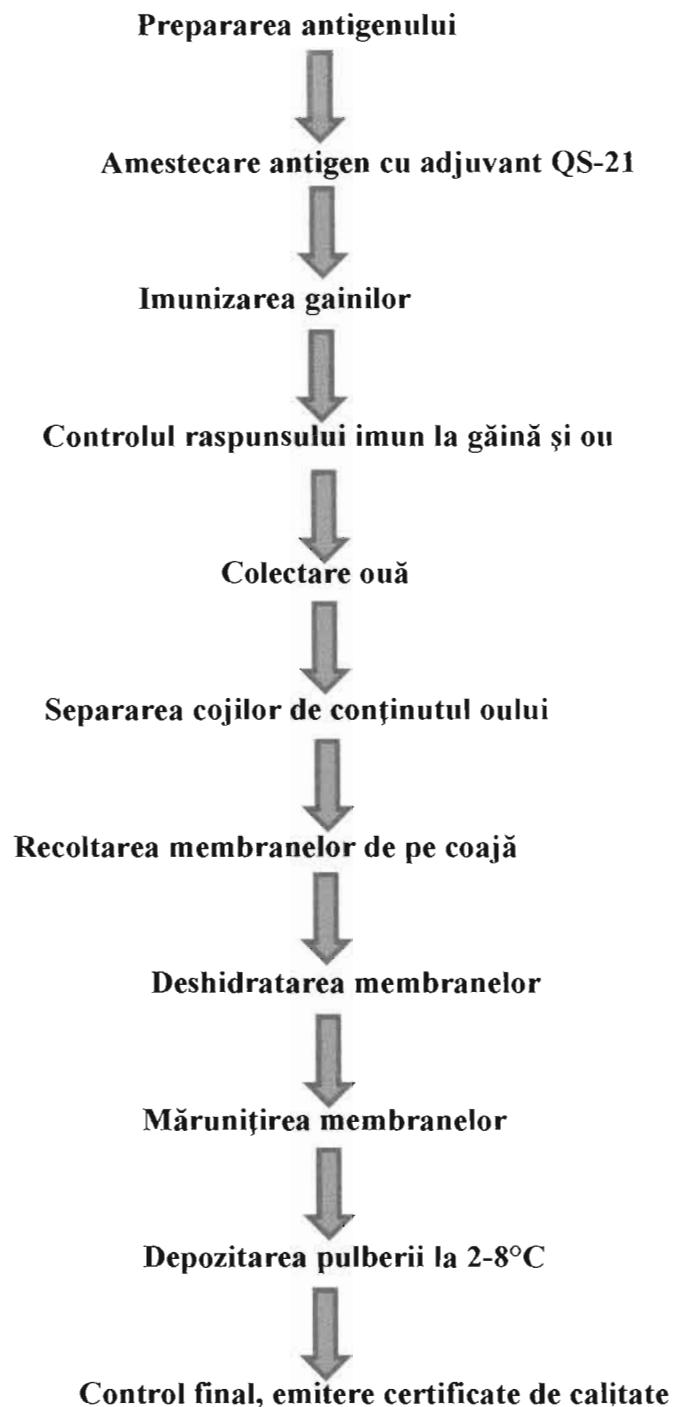
4. Prepararea membranei cochiliere

În acest brevet s-a aplicat o procedură simplă care să permită obținerea unei pulberi din membrana cochilieră 100% naturală, provenită din ouă de la găini imunizate cu un antigen multiplu (tulpini bacteriene și fungice). Obținerea membranelor cochiliere cuprinde următoarele etape:

Etapa de separare: în prezenta invenție, cojile de ou se separă de conținutul oului. Acestea se spală de trei ori cu apă deionizată din abundență. Metoda de separare a membranelor este manuală. Se desprind ușor prin menținerea cojilor într-un volum mare de acid acetic diluat 4%, timp de 12 ore la 4°C.

Etapa de deshidratare: membranele cochiliere se usucă în etuvă timp de 4 ore la temperatura de 50°C. Din 2000 ouă hiperimune s-au obținut 900 g membrane umede, respectiv 250 g membrane uscate.

Etapa de mărunțire: membranele deshidratate se mărunțesc cu ajutorul unei mori de măcinare până la obținerea unei pulberi fine (schema 1).

SCHEMA 1: OBȚINEREA PULBERII DIN MEMBRANE COCHILIARE

Evaluarea principalelor componente prezente în pulberea de membrană cochilieră se face prin următoarele teste:

- a) Identificarea colagenului prin metoda colorimetrică
- b) Determinarea calitativă a componentelor active din membrană (ovotransfina, ovoalbumina, lizozim și ovomucina) față de antiserurile specific prin testul IDGA
- c) Determinarea cantitativă a OTf HPC2 prin testul Elisa direct
- d) Controlul contaminării microbiene

5. Utilizarea pulberii în realizarea produsului ROdia-HPC2 comprimate

Produsul ROdia-HPC2 comprimate este un supliment alimentar ce conține pulbere din membrana cochilieră provenită din ouă hiperimune la care se adaugă acid ascorbic. Vitamina C intervine în producția de colagen care grăbește cicatrizarea plăgilor, favorizează depunerea calciului în oase și vindecarea fracturilor, crește rezistența capilarelor, mărește rezistența la infecții. Vitamina C este un puternic antioxidant, înălță radicalii liberi și previne astfel, oxidarea membranelor celulare. Este esențială pentru sinteza colagenului, a matricei oaselor și dintilor și în creșterea rezistenței peretelui vaselor capilare. În plus, vitamina C este implicată în biosintезa hormonilor de tip catecolamine și steroizi, în conversia acidului folic în acid folinic și în metabolismul tirosinei. Membrana conține colagen, acid hialuronic, condroitină, glucozamină, ovotransferină, ovomucină, lizozim, ovoalbumină etc. Acestea sunt ingrediente active care contribuie la funcționarea normală a sistemului osteo-articular.

Produsul este recomandat ca supliment alimentar, în medicina clasică, la pacienții cu afecțiuni osteo-articulare și ale țesutului conjunctiv. Se condiționează în flacoane de propilenă care conțin 30 comprimate x 500 mg sau 60 comprimate x 500 mg.

MODELE RECOMANDATE DE FOLOSIRE ȘI DE CARACTERIZARE A INVENTIEI

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

Exemplul 1

Prepararea antigenului

În prezenta invenție, antigenul s-a preparat dintr-un amestec de tulpini bacteriene și fungice. Celulele bacteriene și ciupercile s-au cultivat pe medii selective, s-au incubat la 37°C timp de 24-48 ore, s-au spălat de două ori cu PBS steril, pH=7.2 și s-au inactivat cu formaldehidă 0.5% timp de 18 h; suspensiile obținute s-au ajustat la valoarea 0.05 la DO 600, corespunzând unei densități celulare de aproximativ 1×10^5 UFC/ml. Sedimentul s-a folosit ca imunogen (antigen multiplu) în amestec cu adjuvantul QS 21, pentru inocularea găinilor.

Imunizarea găinilor ouătoare convenționale sau SPF

Găinile aflate la începutul perioadei de ouat din rasa Rhode Island Red, s-au imunizat prin administrare pe cale intramusculară a 2 ml antigen, în patru locuri, în musculatura pectorală. Se fac trei inoculați la interval de 14 zile, respectiv 28 zile. La 14 zile de la ultima inoculare, se colectează ouă pentru extragerea imunoglobulinelor (IgY) din gălbenuș, a fracțiunilor proteice din albuș și a membranelor cochiliere.

Exemplul 2

Prepararea membranelor cochiliere

Cojile de ou se separă de conținutul oului, apoi se spală de trei ori cu apă deionizată din abundență. Membranele se separă manual; se desprind ușor prin menținerea cojilor într-un volum mare de apă deionizată în care s-a adăugat acid acetic diluat 4%, timp de 12 ore la 4°C; se usucă în etuvă timp de 4 ore la temperatura de 50°C; se mărunțesc cu ajutorul unei mori de măcinare până la obținerea unei pulberi fine.

Exemplul 3

Condiționarea pulberii de membrana cochilieră

Produsul RODIA-HPC2 conține pulbere din membrana cochilieră provenită din ouă hiperimune la care se adaugă acid ascorbic; pulberea se condiționează în flacoane din polietilena x 50 ml. Cantitatea per flacon este 30 comprimate x 500 mg pulbere sau 60 comprimate x 500 mg pulbere. Comprimatele sunt neacoperite, rotunde, de culoare albă, cu miros slab caracteristic.

Acstea conțin pe lângă ingrediente active (pulbere din membrane cochilieră, acid ascorbic) și excipienți de tabletare.

Exemplul 4

Identificarea colagenului din membrana cochilieră prin metoda colorimetrică

Principiu: proba de analizat evidențiază o reacție de culoare violetă în prezența soluțiilor de sulfat de cupru și hidroxid de sodium. Absorbanta probei se citește la un spectrofotometru în domeniul vizibil (400-800 nm). Intensitatea colorației violet a probei este direct proporțională cu cantitatea de colagen.

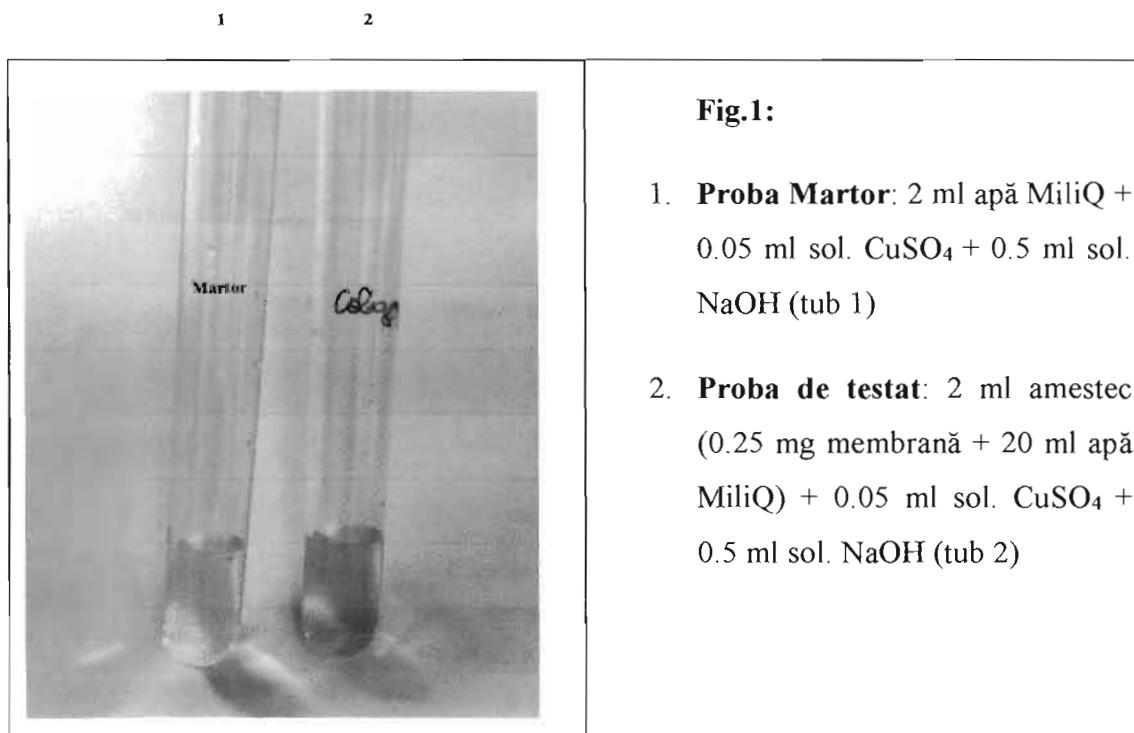
Reactivi

- sulfat de cupru (II) 50 g/l (R)
- hidroxid de sodiu 100 g/l (R)

Mod de lucru

Proba de testat: la 0,25 g membrană cochilieră se adaugă 20 ml apă MiliQ; amestecul se încălzește la 60°C, timp de 30 minute; soluția se filtrează prin filtru Millex de 0.45 μ m; 2 ml filtrat se amestecă cu 0,05 ml soluție sulfat de cupru (II). Se adaugă 0,5 ml soluție hidroxid de sodiu; după agitare, trebuie să apară o colorație violet.

Proba martor: la 2 ml apă MiliQ se adaugă 0,05 ml soluție sulfat de cupru și 0,5 ml soluție hidroxid de sodiu (Fig.1).



Interpretare:

În proba de testat apare culoarea violet, ceea ce indică prezența colagenului comparativ cu proba martor, care este de culoare bleu pal. Absorbanta probei de testat se măsoară la spectrofotometru în domeniul vizibil.

Rezultate:

Pentru a vedea dacă intensitatea colorației probei este direct proporțională cu cantitatea de membrană din probă, respectiv concentrația de colagen regăsibilă, s-au luat în testare mai multe probe obținute astfel:

1. 0.25 mg pulbere membrană + 6 mL apă MiliQ
2. 0.50 mg pulbere membrană + 6 mL apă MiliQ
3. 0.75 mg pulbere membrană + 6 mL apă MiliQ
4. 1.00 mg pulbere membrană + 6 mL apă MiliQ

Probele au fost centrifugate timp de 20 minute la 6000 rpm și filtrate prin filtre Millex de 0.45µm. S-a măsurat spectrul de absorbție în domeniul vizibil pentru fiecare probă în parte, față de o probă martor care conține toată matricea probei, cu excepția pulberii de membrana cochilieră. (Fig.2)

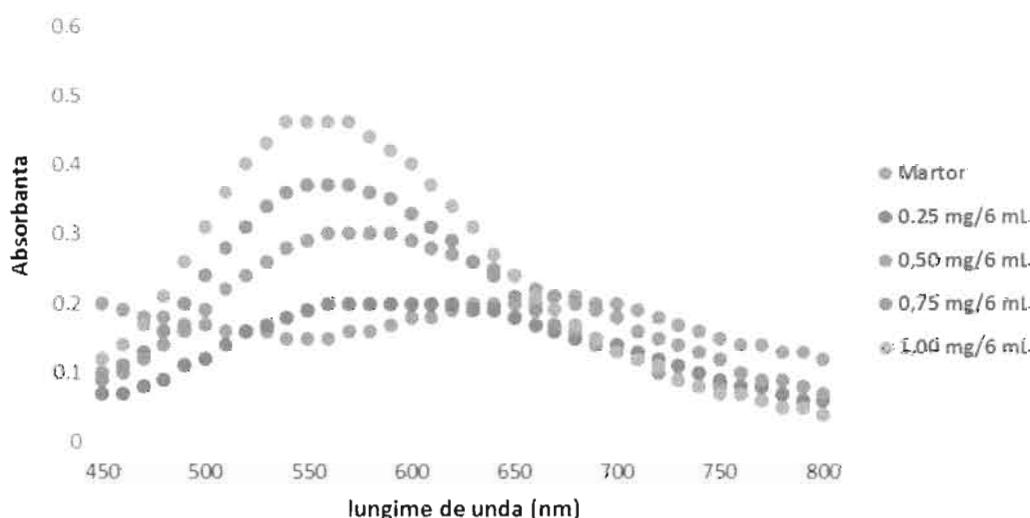


Fig. 2 Spectrul de absorbție pentru probe de membrană cochilieră (0.25,0.50,0.75,1.00 mg/6mL)

Absorbanta probelor diferă în funcție de cantitatea de pulbere de membrane din probele de testat. Spectrul de absorbție în vizibil este diferit pentru complexul colagen - sulfat de cupru, comparativ cu soluția de sulfat de cupru - martor. Maximul de absorbție al complexului colagen - sulfat de cupru este la lungimea de undă de 550 nm (Fig. 3 și fig. 4).

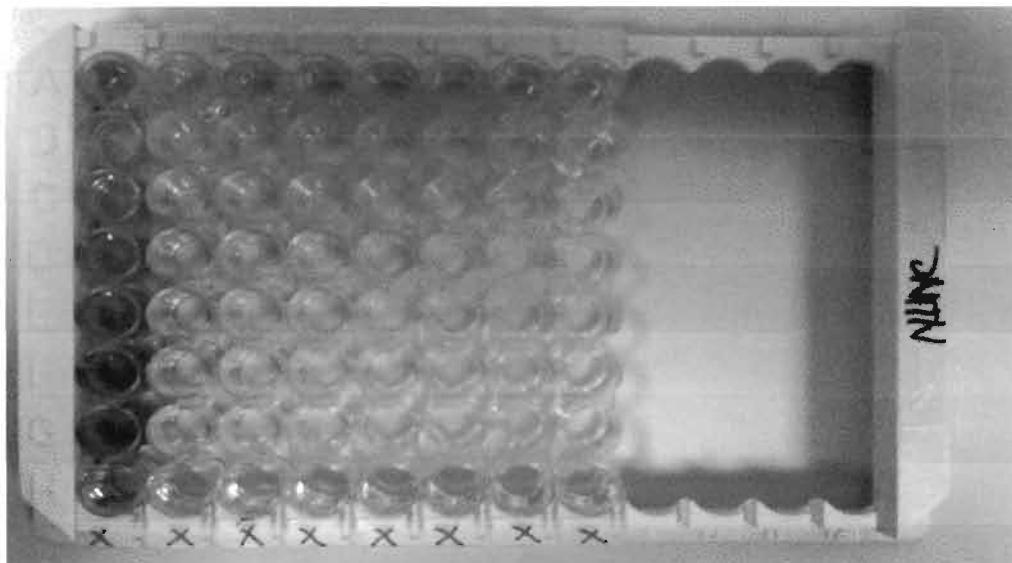


Fig. 3 Măsurarea intensității absorbantei la 550 nm pentru probele din membrană (godeurile A și B proba martor; godeurile C, D, E, F, G probele din membrană cochilieră)

S-a măsurat intensitatea absorbantei la 550 nm pentru toate probele de testat și s-a reprezentat grafic variația acesteia în funcție de cantitatea de pulbere de membrană cîntărită per probă.

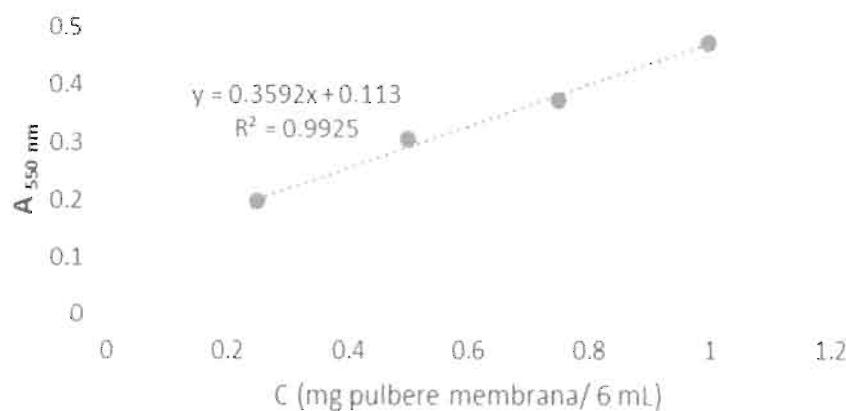


Fig. 4 Reprezentarea grafică a dependenței liniare dintre intensitatea absorbantei măsurată la 550 nm și cantitatea de pulbere din probe.

Dependența dintre cele două mărimi măsurate este liniară.

Exemplul 5

Testul de imunodifuzie în gel de agar (IDGA)

Principiu: testul se bazează pe migrarea într-un gel de agar a antigenului și a anticorpului, care la locul de contact se combină specific și formează o linie de precipitat. Aceasta se vizualizează prin proiecțarea unui fascicul de lumină puternic pe fundul plăcii de reacție. Testul se utilizează în mod obișnuit pentru detectarea anticorpilor serici la animalele infectate, precum în caracterizarea anticorpilor de tip IgY și a fracțiunilor proteice conținute de ou.

Modul de lucru

Prepararea gelului de agar

Se prepară un gel de agar 1% în soluție (tampon borat). Amestecul se fierbe pe baie Marie până la completa dizolvare a agarului.

Pregătirea plăcilor pentru reacție

Testul de imunodifuzie se execută în plăci Petri, cu diamentrul de 90 mm, în care se repartizează 17 ml agar la t^0 de 45-60°C. Plăcile se lasă cu capacul întredeschis pe o suprafață orizontală, aproximativ 1 oră pentru solidificare. Cu o matră se taie seturi de câte 7 godeuri (1 central și 6 periferice), cu diameatrul de 6 mm la o distanță de 3 mm între ele. Se îndepărtează rondelele de agar din fiecare godeu cu ajutorul unei pipete Pasteur montată la o trompă de vid;

Obținerea extractului apos din membrana cochilieră: la 2 g pulbere membrană cochilieră se adaugă 20 ml apă deionizată; se menține la 4°C, sub agitare, timp de 24 ore; se centrifughează la 3500 rpm și se testează supernatantul rezultat.

Repartizarea reagenților și incubarea plăcilor de agar

Se repartizează câte 40 μ l în godeurile: 1, 4 și central din serurile anti Ovotransferină (OTf), anti lizozim, anti ovomucină (OVM), anti ovoalbumină (OVA) și anti IgY; în godeurile 2 și 6 se repartizează câte 40 μ l probă subetalon (martor), iar în godeurile 3 și 5, câte 40 μ l extract apos din membrană cochilieră de testat. Plăcile sunt menținute la temperatura camerei (20-25°C) în atmosferă umedă, timp de 24-48 ore.

Interpretarea rezultatelor

La 24 ore liniile de precipitare sunt examineate cu ajutorul unui fascicul intens de lumină, pe un fond întunecat. Reacțiile de precipitare date de probele subetaloane trebuie să fie clar vizibile. **Reacția pozitivă** se evidențiază printr-o linie de precipitare clară, obținută între proba subetalon (martor) și antiserul corespunzător.

Reacția slab pozitivă se evidențiază printr-o linie de precipitare tangentă la proba de analizat.

Reacția negativă se consideră atunci când între godeul cu antiser și godeurile cu probele de testat nu apar linii de precipitare.

Rezultate:

Evidențierea ovotransferinei din membrană cochilieră: în godeurile 2 și 6 s-a repartizat OTf subetalon, în godeurile 3 și 5 extract apos din pulberea de membrană cochilieră; în godeurile 1, 4 și central s-a repartizat serul anti OTf (Fig.1).

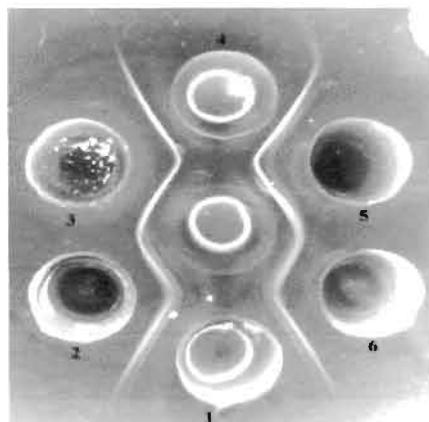


Fig. 1: Evidențierea prin IDGA a OTf din extractul apos obținut din pulberea de membrană cochilieră (godeurile 3 și 5), comparativ cu OTf subetalon (godeurile 2 și 6), față de ser anti OTf (godeurile 1, 4 și central)

Evidențierea ovomucinei din membrana cochilieră: în godeurile 2 și 6 s-a repartizat OVM subetalon (martor), în godeurile 3 și 5 extract apos din pulberea de membrană cochilieră; în godeurile 1, 4 și central s-a repartizat serul anti OVM (Fig.2).

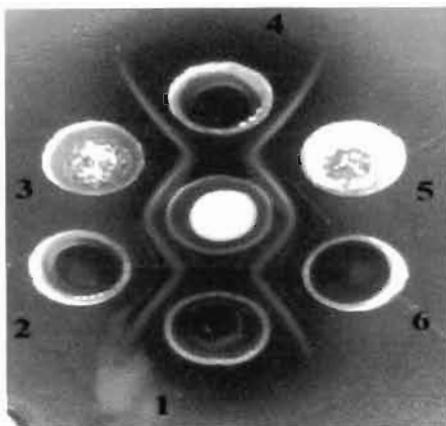


Fig. 2: Evidențierea prin IDGA a OVM din extract apos obținut din pulberea de membrană cochilieră (godeurile 3 și 5), comparativ cu OVM subetalon (godeurile 2 și 6), față de ser anti OVM (godeurile 1, 4 și central)

Evidențierea lizozimului din membrană cochilieră: în godeurile 2 și 6 s-a repartizat lizozim subetalon (martor), în godeurile 3 și 5 extract apos din pulberea de membrană cochilieră; în godeurile 1, 4 și central s-a repartizat serul anti lizozim (Fig.3).

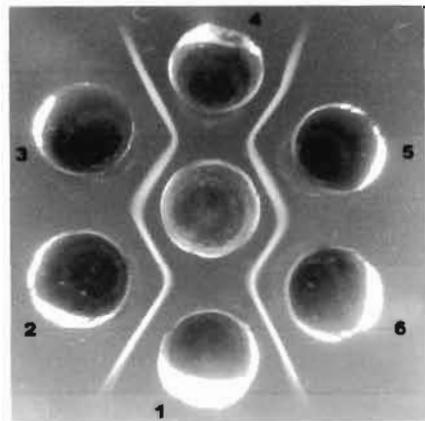


Fig. 3: Evidențierea prin IDGA a lizozimului din extractul apos obținut din pulberea de membrană cochilieră (godeurile 3 și 5), comparativ cu lizozim (subetalon) (godeurile 2 și 6), față de ser anti lizozim (godeurile 1, 4 și central)

Evidențierea ovoalbuminei din membrană cochilieră: în godeurile 2 și 6 s-a repartizat ovoalbumina subetalon (martor), în godeurile 3 și 5 extract apos din pulberea de membrană cochilieră; în godeurile 1, 4 și central s-a repartizat serul anti ovoalbumină (Fig.4).

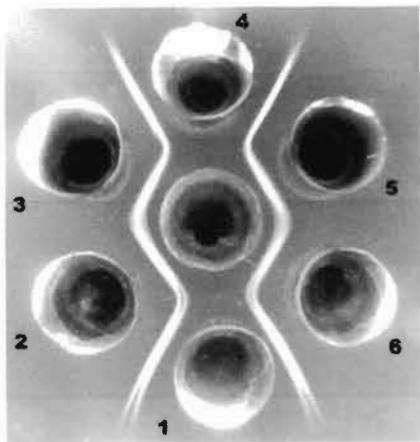


Fig.4: Evidențierea prin IDGA a OVA din extractul apos obținut din pulberea de membrană cochilieră (godeurile 3 și 5), comparativ cu ovoalbumina subetalon (godeurile 2 și 6), față de ser anti ovoalbumină (godeurile 1, 4 și central)

Evidențierea imunoglobulinei Y(IgY) din membrană cochilieră: în godeurile 2 și 6 s-a repartizat IgY subetalon, în godeurile 3 și 5 extract apos din pulberea de membrană cochilieră; în godeurile 1, 4 și central s-a repartizat serul anti IgY (Fig. 5).

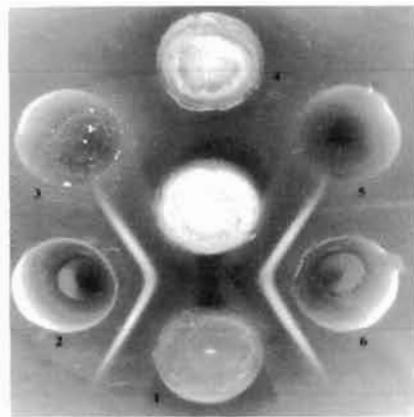


Fig. 5: Evidențierea prin IDGA a IgY din extractul apos obținut din pulberea de membrană cochilieră (godeurile 3 și 5), comparativ cu subetalon IgY (godeurile 2 și 6), față de ser anti IgY (godeurile 1, 4 și central)

EXEMPLUL 6

Determinarea cantitativă a ovotransferinei (OTf) din probe de membrană cochilieră prin testul ELISA

Testul imunoenzimatic (ELISA) s-a folosit în controlul cantitativ al OTf din membrană cochilieră, utilizând kitul de reagenți pentru ovotransferină (Chicken Ovotransferrin ELISA Kit - Abcam). Testul se realizează prin comparație cu etalonul OTf internațional (400-6.25mg/ml) sau cu subetalon intern OTf

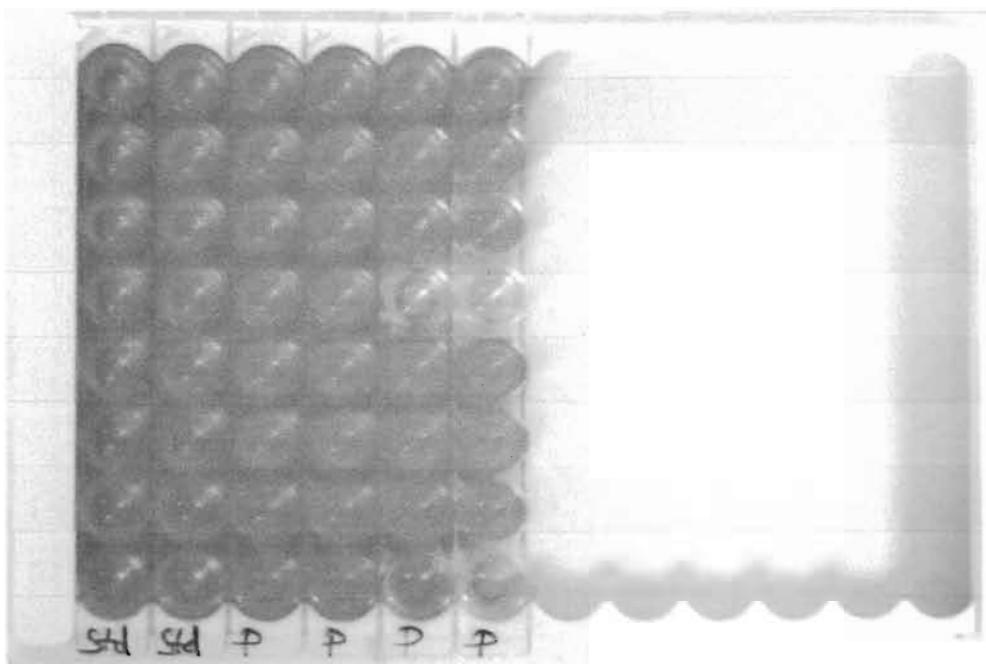
- a) Se repartizează câte 100 µl/ godeu OTf standard, respectiv probe de extract apos obținut din membrană cochilieră de testat seria 1, seria 2, seria 3) în diluții zecimale (1/10 - 1/10000) în tampon carbonat- bicarbonat, conform configurației plăcii (Fig.1)
- b) Godeurile A1-H1 reprezintă standardul OTf din kit (400ng/ml - 6.25ng/ml)
- c) Godeurile A3- D3 și A4-D4 reprezintă OTf subetalon
- d) Godeurile E3- H3 și E4-H4 reprezintă extract apos membrană cochilieră seria 1
- e) Godeurile A5- D5 și E5-H5 reprezintă extract apos membrană cochilieră seria 2
- f) Godeurile A5- D5 și E5-H5 reprezintă extract apos membrană cochilieră seria 3
- g) Placa se spală de 3 x cu tampon de spălare
- h) Se adaugă 100 µl conjugat imunoenzimatic marcat cu peroxidază (Abcam) diluat de 100 x.
- i) Placa se incubează timp de 20 minute la temperatura camerei, acoperită și la întuneric
- j) După îndepărțarea lichidului, placa se spală de 3 x cu tampon de spălare diluat de 20 x
- k) Se adaugă 100 µl TMB și se lasă 10 minute la temperatura camerei
- l) Se adaugă 100 µl soluție de stopare.
- m) Se citește absorbanta reacției la un spectrofotometru cu filtru de 450 nm
- n) Se consideră reacție pozitivă pentru prezența OTf diluția la care DO_{450} este de 0.200 față de OTf standart internațional.
- o) Conținutul în µg/ml OTf de referință se face în raport cu OTf standard, ținând cont de faptul că testul ELISA decelează minim 10 ng/ml.

	Kit OTF/ OTF standard	Kit OTF/ OTF standar d	Probe	Probe	Probe	Probe							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	400 ng/mL	400 ng/mL	P1-1:10	P1-1:10	P3-1:10	P3-1:10							A
B	200 ng/mL	200 ng/mL	P1-1:100	P1-1:100	P3-1:100	P3-1:100							B
C	100 ng/mL	100 ng/mL	P1-1:1000	P1-1:1000	P3-1:1000	P3-1:1000							C
D	50 Ng/mL	50 Ng/mL	P1-1:10000	P1-1:10000	P3-1:10000	P3-1:10000							D
E	25 Ng/mL	25 Ng/mL	P2-1:10	P2-1:10	P4-1:10	P4-1:10							E
F	12.5 Ng/mL	12.5 Ng/mL	P2-1:100	P2-1:100	P4-1:100	P4-1:100							F
G	6.75 Ng/mL	6.75 Ng/mL	P2-1:1000	P2-1:1000	P4-1:1000	P4-1:1000							G
H	Blank	Blank	P2-1:10000	P2-1:10000	P4-1:10000	P4-1:10000							H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Fig. 1 Configurare placă – Determinare cantitativă OTF

În figura 2 sunt prezentate valorile densității optice la lungimea de undă 450 nm pentru standardul OTf (Abcam), subetalonul OTf intern cât și pentru probele, reprezentând extractele apoase obținute din membranele cochiliere (seriile 1, 2 și 3). În figura 3 este evidențiată imaginea plăcii.

	Kit OTF/ OTF standard	Kit OTF/ OTF standar d	Probe	Probe	Probe	Probe							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	3.232	3.239	3.635	3.632	3.174	3.221							A
B	3.099	3.073	3.586	3.598	2.330	2.389							B
C	2.726	2.769	3.515	3.512	0.549	0.548							C
D	2.130	2.051	2.985	3.032	0.161	0.188							D
E	1.482	1.392	3.441	3.430	3.204	3.218							E
F	1.004	1.181	3.223	3.226	2.266	2.307							F
G	0.553	0.521	1.603	1.588	1.245	0.615							G
H	0.144	0.139	0.330	0.322	0.188	0.175							H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Fig. 2 Determinare cantitativă OTf – Valori ale DO**Fig. 3 Determinare cantitativă OTf – imagine placă**

Godeurile A1-H1 OTf standard (Abcam)

Godeurile A3- D3 și A4-D4 OTf subetalon

Godeurile E3- H3 și E4-H4 extract apos membrană cochilieră seria 1

Godeurile A5- D5 și E5-H5 extract apos membrană cochiliera seria 2

Godeurile A5- D5 și E5-H5 extract apos membrană cochilieră seria 3

S-a realizat curba de calibrare pentru OTf standard reprezentand grafic valoarea absorbantei masurate în funcție de concentrația acestuia (**Fig. 4**)

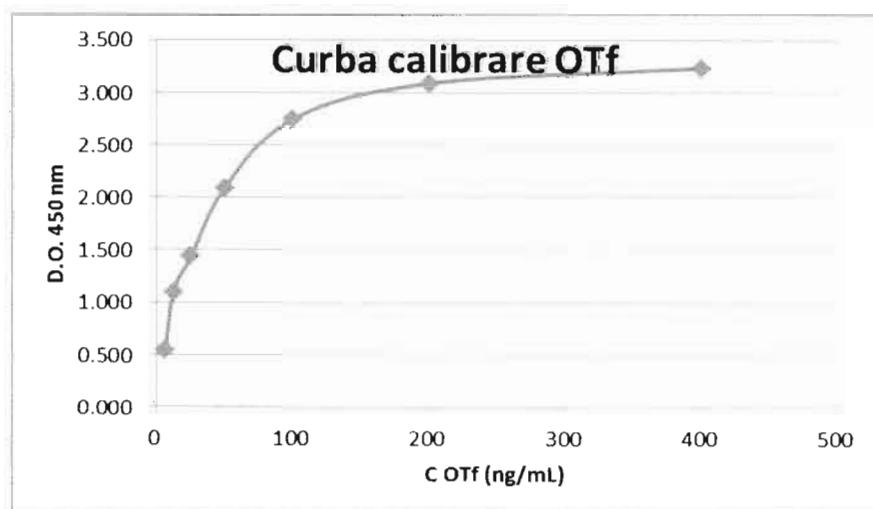


Fig. 4 Curba de calibrare pentru standardul OTf (Abcam)

Determinarea cantitativă a OTf din extractele apoase obținute din membranele cochiliere serii 1, 2 și 3 este prezentată în **figura 5**.

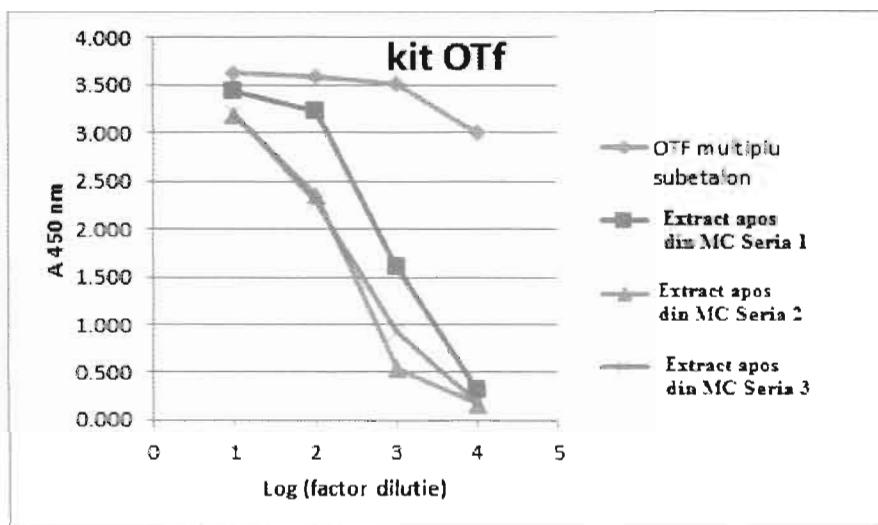


Fig. 5 Determinarea cantitativă (DO) a OTf din probe din extract apos din membrane

Se remarcă prezența unui răspuns pozitiv în ceea ce privește conținutul OTf al probelor testate. Cele mai evidente sunt reprezentate de OTf subetalon (concentrația = 36.49 mg/100 ml la diluția 1/1000) și extract apos seria 1 (concentrația = 3.15 mg/100 ml la diluția 1/100). Seria 2 prezintă un răspuns pozitiv de 1.69 mg/100 ml la diluția 1/100, iar seria 3 de 1.57 mg/100 ml la diluția 1/100.

EXEMPLUL 7

Contaminarea microbiană

Se efectuează conform standardelor prevăzute de Farmacopeea Europeană ediția 7 (capitolele 2.6.12.2.6.13.5.1.4- preparate orale neapoase)

Limite admise:

TAMC $\leq 10^3$ UFC/g

TYMC $\leq 10^2$ UFC/g

E.coli- absent: /g

Rezultate:

- pulbere de membrana cochiliera serile 1, 2 si 3

TAMC = 0 UFC/g

TYMC = 0 UFC/g

E.coli- absent: /g

REVENDICĂRI

Titlul

PRODUCEREA ȘI UTILIZAREA PULBERII DIN MEMBRANA COCHILIERĂ A OULUI HIPERIMUN HPC2

1. Prezenta invenție descrie o metodă de separare, prelucrare și utilizare a membranei cochiliere obținută din ouă hiperimune HPC2.
2. Revendicarea metodei de la punctual 1 se caracterizează prin obținerea membranei din ouă hiperimune (HPC2), provenind de la găini imunizate cu un amestec de tulpini bacteriene și fungice inactivate în amestec cu adjuvant QS21.
3. Revendicarea metodei de la punctul 1 se referă la faptul că pulberea obținută din membrana cochilieră conține ingrediente active de mare valoare biologică (colagen, acid hialuronic, glucozamină, condroïdină, ovotransferină, lizozim, ovoalbumină, ovomucină).
4. Revendicarea metodei de la punctual 1 se referă la faptul că pulberea obținută din membrana cochilieră reprezintă componentele active ale produsului RODIA-HPC2 comprimate. Acest produs conține și acid scorbic (Vitamina C), un puternic antioxidant care grăbește vindecarea plăgilor și recuperarea în cazul fracturilor.
5. Revendicarea metodei de la punctual 1 se caracterizează prin faptul că, se identifică colagenul și proteinele specifice din membrana cochilieră.