



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00138

(22) Data de depozit: 29/03/2021

(41) Data publicării cererii:
30/09/2022 BOPI nr. 9/2022

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
TEHNOLOGII IZOTOPICE ȘI
MOLECULARE, STR.DONAT NR.67-103,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE
MEDICO-MILITARĂ "CANTACUZINO",
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.103,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
- DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI
INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA
HULUBEI"(IFIN-HH), STR. REACTORULUI,
NR.30, MĂGURELE, IF, RO

(72) Inventatori:
• COMAN CRISTIN, STR.PANTAZICA
GABRIEL NR.13A, POPEȘTI- LEORDENI,
IF, RO;
• ONU ADRIAN, PIAȚA NAȚIUNILOR UNITE
NR.3-5, BL.A, AP.75, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;

• CODIȚĂ IRINA, CALEA MOȘILOR NR.217,
BL.23, SC.B, ET.1, AP.35, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• DINU ANGELICA, STR.BROSCARI NR.11,
SAT BALOTEȘTI, COMUNA BALOTEȘTI, IF,
RO;
• DOROBANȚU IOAN, ALEEA CÂMPUL CU
FLORI NR.1, BL.OD 2, SC.C, AP.110,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• NEACȘU LIVIA, ALEEA POIANA VADULUI
NR.1, BL.ODB, SC.1, AP.10, ET.2,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• STOICA RALUCA-DIANA,
STR.VISCOLULUI NR. 60-62, BL.C2, SC.1,
AP.12, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• MUSTĂCIOȘU COSMIN-CĂTĂLIN,
STR.SAMOILĂ DUMITRU NR.5, BL.117,
SC.1, AP.39, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO;
• PORAV SEBASTIAN, STR. TINERETULUI
NR.7, AP.18, FLOREȘTI, CJ, RO;
• BOCĂNEALĂ MARICEL,
STR.MIHAI VITEAZU NR.96, SAT LIEȘTI,
COMUNA LIEȘTI, GL, RO

(54) **PROCEDEU ÎMBUNĂȚĂȚIT DE OBTINERE A UNOR
ANTISERURI HIPERIMUNE POLICLONALE
ANTIFICOERITRINĂ ȘI ANTIFICOCIANINĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor imunoreactivi utilizați pentru separarea ficobilinelor (ficoeritrina și ficocianina) din amestecuri proteice rezultate din procesarea algelor roșii și cianobacteriilor. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: obținere și purificare a conjugatelor imunogene ficobiliproteine-albumină serică de bovină, imunizarea animalelor

de experiență în vederea obținerii anticorpilor anti-ficobiliproteine, separarea γ -globulinelor IgG din restul de proteine serice din antiser prin metoda precipitării cu sulfat de amoniu.

Revendicări: 15

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



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 2021 00138
Data depozit	29-03-2021

12

Titlul invenției: Procedeu îmbunătățit de obținere a unor antiseruri hiperimune policlonale antificoeritrină și antifiocianină

Descrierea invenției

Solicitarea de depunere a cererii de brevet de invenție este realizată în baza:

unui contract de cercetare, nr. 74PCCDI/2018, cod proiect :PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0010, cu titlul Tehnologii moleculare emergente bazate pe sisteme micro si nano-structurate cu aplicații biomedicale, având următorii parteneri : Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Tehnologii Izotopice și Moleculare, Cluj-Napoca, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza”, Iași, Institutul Național de Cercetare=Dezvoltare pentru Fizică și Inginerie Nucleară „Horia Hulubei”, măgurele, Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare Medico-Militară „Cantacuzino”, București, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, Universitatea Babeș Bolyai, Cluj-Napoca.

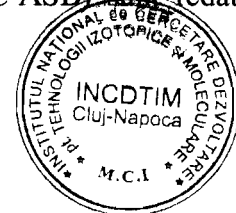
Prezentarea soluției:

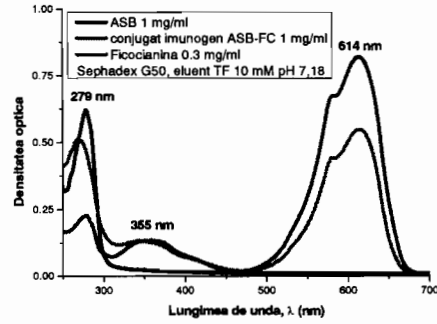
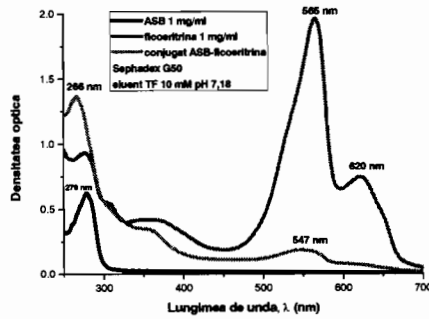
Invenția cu titlul **Procedeu îmbunătățit de obținere a unor antiseruri hiperimune policlonale antificoeritrină și antifiocianină** propune un procedeu cu randament îmbunătățit de obținere a unor imunoreactivi utilizabili în scopul separării prin cromatografie de afinitate a ficobilinelor (ficoeritrină și ficocianină) din amestecuri proteice rezultate din procesarea algelor rosii și a cianobacteriilor.

Metoda presupune următorii pași:

1. Obținerea și purificarea conjugatelor imunogene ficobiliproteine-albumină serică de bovină

Procedura de obținere a imunogenului ficobiliproteina-proteina necesar în procedura de imunizare a animalelor de experiență astfel: 4 ml ficocianina respectiv ficoeritrina având concentrația de 2,2 mg/ml au fost puse în reacție cu 6 ml proteina albumina serică de bovină (ASB) de concentrație 2 mg/ml și 40 μl glutaraldehidă (GA) 25 % sub agitare continuă timp de minim 12 h la temperatura camerei adăugându-se apoi 50 μl etanol amină pentru blocarea glutaraldehydei nereactionate sub agitare continuă timp de 4 ore. Produsul astfel obținut, ficocianina-ASB respectiv ficoeritrina-ASB a fost purificat prin cromatografie pe coloana de Sephadex G50 cu înălțimea de 23,5 cm având ca solvent de eluție tamponul fosfat (TF) 10 mM, pH 7,18, caracterizat din punct de vedere al concentrației proteice și depozitat la 4°C în vederea utilizării sale ca imunogen în procedurile de imunizare. Spectrele de absorbție ale compusilor utilizați în sinteze și a produsilor finali (FE-ASB și FC-ASB) sunt redate în figurile 1 și 2:





Această etapă s-a efectuat la Institutul National de Cercetare-Dezvoltare pentru Fizica si Inginerie Nucleara „Horia Hulubei”, Str. Reactorului, nr. 30, oras Magurele, judetul Ilfov, cod postal 077125

2. Imunizarea animalelor de experienta in vederea obtinerii anticorpilor antificobiliproteine.

Conjugatul imunogenic in faza apoasa purificat a fost utilizat la obtinerea imunogenului prin amestecare cu ficobiliproteina si adjuvant Freund complet sau incomplet pentru cresterea raspunsului imun.

Imunogenul utilizat la imunizarea animalelor in vederea obtinerii anticorpilor antificoianina a fost obtinut prin amestecarea a 7,2 ml Adjuvant Freund complet/incomplet cu 4,8 ml conjugat BSA-FC 1,131 mg/ml, 3,054 ml ficocianina 2,2 mg/ml si 1,0 ml ser fiziologic, concentratia proteica a imunogenului fiind de 0,8 mg/ml. In cazul imunogenului utilizat la imunizarea animalelor in vederea obtinerii anticorpilor antificoeritrina a fost obtinut prin amestecarea a 7,2 ml Adjuvant Freund complet/incomplet cu 4,8 ml conjugat BSA-FE 1,0 mg/ml, 3,26 ml ficoeritrina 2,2 mg/ml si 1,0 ml ser fiziologic, concentratia proteica a imunogenului fiind de 0,78 mg/ml.

Imunogenul a fost utilizat la imunizarea animalelor de experienta: 5 iepuri adulti pentru fiecare tip de ficobiliproteina, (masculi si femele), rasa Noua Zeelanda, clinic sanatosi conform recomandarilor FELASA, varsta aproximativ (8-12) luni in greutate de peste 2,5 kg, apa si hrana ad libitum, prin injectare intradermic pe partea dorsala a gatului si trunchiului cu solutie omogenizata de conjugat imunogen amestecat adjuvant Freund (complet sau incomplet). Intervalul de imunizare a fost intre (14-35) zile. Primele doua imunizari au fost realizate cu imunogen amestecat cu adjuvant Freund complet (contine bacterii moarte, *Mycobacterium tuberculosis*) iar restul de imunizari, 6, au fost efectuate cu imunogen amestecat cu adjuvant Freund incomplet (fara micobacterii). Volumul de imunogen folosit a fost de 1,2 ml/animal/imunizare. Dupa cea de-a 8-a imunizare sangele a fost recoltat la

[Signature]



animale in vederea determinarii prezentei imunoglobulinelor specifice antigenului utilizat. Experimentele de imunizare au fost efectuate in cadrul INCDMM Cantacuzino, Statiunea Baneasa, Soseaua Gheorghe Ionescu Sisesti, nr. 14A, sector 1, Bucuresti, unitatea este autorizată sanitar-veterinar de către Direcția Sanitar-Veterinară a Municipiului București în data de 29.10.2018, iar autorizația are numărul 426 si au fost evaluate de către Comisia de etică a INCDMM Cantacuzino, avizul fiind favorabil, certificat nr. CE/327/04.03.2019, iar DSVSA București a autorizat proiectul, numar autorizatie 447/02.04.2019.

3. Separarea γ -globulinelor (IgG) de restul de proteine serice din antiser, care s-a efectuat prin metoda precipitarii cu sulfat de amoniu: 1 ml de antiser brut se amesteca cu 1 ml sulfat de amoniu 50 %, urmat de centrifugare la 1500 x g, timp de 15 min, se arunca supernatantul iar precipitatul se resuspenda in apa, randamentul de obtinere fiind de 85-95 % iar concentratiile obtinute sunt redate in tabelul de mai jos:

Antiser antificoeritrina nr. n	Concentratia de IgG specifica si nespecifica (mg/ml)
1	26.55
2	26.37
3	28.16
4	24.33
5	24.95

Antiser antifiocianina nr. n	Concentratia de IgG specifica si nespecifica (mg/ml)
1	28.02
2	24.89
3	25.49
4	22.62
5	20.90



Autori
INCDMM Cantacuzino:
Coman Cristin,
Onu Adrian,
Codiță Irina,
Dinu Angelica

Institutul National de Cercetare-Dezvoltare Medico-Militară Cantacuzino, Splaiul Independenței 103, Sector 2, București, cod postal 050096

IFIN-HH:
Dorobanțu Ioan
Neagu Livia
Stoica Raluca-Diana
Mustăciosu Cosmin-Cătălin

Locul de munca la data crearii inventiei:
Institutul National de Cercetare-Dezvoltare pentru Fizica si Inginerie Nucleara „Horia Hulubei”
Str. Reactorului, nr. 30, oras Magurele, judetul Ilfov, cod postal 077125

INCDTIM:
Sebastian Porav

Maricel Bocăneală

INSTITUTUL NATIONAL DE CERCETARE DEZVOLTARE PENTRU
TEHNOLOGII IZOTOPICE SI MOLECULARE I N C D T I M, cu sediul în CLUJ-
NAPOCA cod poștal 400293, str. Donat, nr. 67-103, județ Cluj tel. 0264 58 40 37, fax 0264
42 00 42, e-mail: itim@itimcj.ro

Aplicare în mediul socio-economic: Imunoreactivii obținuți pot fi utilizați pentru separarea unor cantități suficiente de ficoeritrină și ficocianină din amestecuri proteice rezultate din procesarea algelor rosii si a cianobacteriilor, în vederea utilizării acestora în aplicații industriale.

Proprietate intelectuală:

- INCDMM Cantacuzino – 40%
- INCDFIN – Horia-Hulubei – 40%
- INCDTIM – 20%

Nivel de maturitate tehnologică

TLR4



The image shows a handwritten signature in black ink, which appears to be 'Maricel Bocăneală'. To the right of the signature is a circular official stamp. The stamp contains the text: 'INSTITUTUL NATIONAL de CERCETARE DEZVOLTARE PENTRU TEHNOLOGII IZOTOPICE SI MOLECULARE' around the perimeter, 'INCNTIM Cluj-Napoca' in the center, and 'M.C.I.' at the bottom.

Titlul invenției: Procedu îmbunătățit de obținere a unor antiseruri hiperimune policlonale antificoeritrină și antificocianină

Revendicări:

1. Un produs caracterizat prin aceea că reprezintă un amestec de anticorpi policlonali purificați cu concentrație înaltă de γ -globuline (IgG) care reacționează cu ficoeritrina
2. Un produs caracterizat prin aceea că reprezintă un amestec de anticorpi policlonali purificați cu concentrație înaltă de γ -globuline (IgG) care reacționează cu ficocianina
3. Un produs caracterizat prin aceea că reprezintă un conjugat imunogen ficoeritrină-albumină serică bovină purificat
4. Un produs caracterizat prin aceea că reprezintă un conjugat imunogen ficocianină-albumină serică bovină purificat
5. Un procedeu caracterizat prin aceea că este un procedeu de obținere a conjugatelor imunogene ficobiliproteine-albumină serică bovină purificate
6. Un procedeu conform cu revendicarea 5, caracterizat prin aceea că ficobiliproteina poate fi ficoeritrina sau ficocianina
7. Un procedeu conform cu revendicarea 5, cuprinzând următoarele etape:
 - a. tratarea cu glutaraldehidă a amestecului ficobiliproteină-albumină serică bovină, în proporții definite
 - b. purificarea amestecului prin cromatografie pe coloana de Sephadex G50
8. Un procedeu caracterizat prin aceea că este un procedeu de obținere a imunogenului utilizat pentru imunizarea iepurilor
9. Un procedeu conform cu revendicarea 8, caracterizat prin aceea ca imunogenul se obține prin amestecul între conjugatul imunogen și Adjuvantul Freund complet/incomplet, în proporții definite
10. Un procedeu caracterizat prin aceea ca este un procedeu de imunizare a animalelor de experiență cu imunogenul, pentru obținerea serurilor hiperimune brute anti-ficobiliproteine
11. Procedeu conform cu revendicarea 10, caracterizat prin aceea că animalele de experiență sunt iepuri
12. Procedeu conform cu revendicarea 10, în care imunogenul este administrat printr-un număr definit de inoculări intradermice la intervale definite, în cantități definite



13. Procedeu conform cu revendicarea 10, în care primele 2 inoculări sunt efectuate cu imunogen preparat cu adjuvant Freund complet în proporții definite, iar următoarele cu imunogen preparat cu adjuvant Freund incomplet în proporții definite
14. Procedeu caracterizat prin aceea că este un procedeu de separare a γ -globulinelor (IgG) din serurile hiperimune brute anti-ficobiliproteine pentru obținerea amestecului de anticorpi policlonali purificați cu concentrație înaltă de γ -globuline (IgG) care reacționează cu ficobiliproteinele
15. Procedeu conform cu revendicarea 14, cuprinzând separarea γ -globulinelor (IgG) de restul de proteine serice prin metoda precipitării cu sulfat de amoniu

