(19) OFICIUL DE STAT
PENTRU INVENŢII ŞI MĂRCI
Bucureşti

ROMÂNIA

(11) **RO 135591 A0**
(51) **Int.Cl.**
C07K 16/24 (2006.01);
A61K 39/395 (2006.01);
A61P 17/06 (2006.01)

(12) # CERERE DE BREVET DE INVENŢIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00678**

(22) Data de depozit: **11/11/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2022 BOPI nr. **3/2022**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAŢIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE ÎN DOMENIUL PATOLOGIEI ŞI ŞTIINŢELOR BIOMEDICALE "VICTOR BABEŞ"**, *SPLAIUL INDEPENDENŢEI NR. 99-101, SECTOR 5, BUCUREŞTI, B, RO;*
• **ROMVAC COMPANY S.A.**, *ŞOS. CENTURII NR. 7, VOLUNTARI, IF, RO*

(72) Inventatori:
• **TĂNASE CRISTIANA**, *CALEA 13 SEPTEMBRIE NR.126, BL.P 34, SC.1, AP.30, SECTOR 5, BUCUREŞTI, B, RO;*
• **NEAGU MONICA**, *STR.ALECU MATEEVICI NR.5, SECTOR 2, BUCUREŞTI, B, RO;*
• **CODRICI ELENA**, *STR. CÂMPIA LIBERTĂŢII NR. 4, BL. PM 51, SC. 3, ET. 7, AP. 117, SECTOR 3, BUCUREŞTI, B, RO;*
• **POPESCU IONELA DANIELA**, *BD.THEODOR PALLADY, NR.4, BL.M2, SC.A, AP.28, SECTOR 3, BUCUREŞTI, B, RO;*
• **ENCIU ANA-MARIA**, *STR.PLUGARILOR, NR.1, BL.94, SC.A, AP.15, SECTOR 4, BUCUREŞTI, B, RO;*
• **ISVORANU GHEORGHITA**, *STR.URANUS, NR.102-104, BL.A7, SC.B, ET.1, AP.40, SECTOR 5, BUCUREŞTI, B, RO;*
• **SURCEL MIHAELA**, *ALEEA BARAJUL ROVINARI, NR.12, BL.Y12, SC.A, AP.3, SECTOR 3, BUCUREŞTI, B, RO;*
• **MUNTEANU ADRIANA**, *BD.THEODOR PALLADY, NR.21, BL.P1, SC.B, ET.9, AP.75, SECTOR 3, BUCUREŞTI, B, RO;*
• **CHIRCIU VIORICA**, *STR.CIOCÂRLIEI, NR.32, BL.D24, SC.1, ET.6, AP.36, BUCUREŞTI, B, RO;*
• **IBRAM ALEF**, *STR.POPORULUI, NR.74A, CONSTANŢA, CT, RO*

(54) # METODĂ DE STABILIRE A UNUI SET DE INTERLEUKINE-CITOKINE-CHEMOKINE IMUNOLOGIC RELEVANTE, ÎN MODEL ANIMAL DE PSORIAZIS TRATAT CU IgY OBŢINUT DIN OUL HIPERIMUN

(57) **Rezumat:**

Invenţia se referă la o metodă de stabilire a unui set de interleukine-citokine-chemokine imunologic relevante în model animal de psoriazis tratat cu IgY obţinut din oul hiperimun. Metoda, conform invenţiei, constă în determinarea simultană a concentraţiilor serice, din probe de la animale cu model de psoriazis (netratat, tratat cu IgY sau remis natural), versus control, al unui complex de citokine şi chemokine IL-17, IL-5, IL-6, IL-9, CXCL9/MIG, KC/CXCL1, MIP-1alfa/CCL3, MIP-1beta/CCL4 şi IL-1a, care, în urma tratamentului cu IgY au prezentat valori comparabile cu lotul control şi care demonstrează influenţa imunobiologică a componentelor izolate din oul hiperimun în modele *in vivo* cu patologii experimentale.

Revendicări: 1
Figuri: 7

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

RO 135591 A0

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2021 00678
Data depozit 11 -11- 2021

63

METODĂ DE STABILIRE A UNUI SET DE INTERLEUKINE-CITOKINE-CHEMOKINE IMUNOLOGIC RELEVANTE, ÎN MODEL ANIMAL DE PSORIAZIS TRATAT CU IgY OBȚINUT DIN OUL HIPERIMUN

DESCRIERE

Stadiul cunoașterii

Psoriazisul este o boală inflamatorie cronică mediată de celulele T helper care afectează în principal tegumentul, deși sunt observate și efecte patologice sistemice. Interacțiunea mediată de citokine între limfocitele T și keratinocite determină proliferarea excesivă a keratinocitelor, care la rândul său duce la formarea unui mediu proinflamator și în cele din urmă la apariția plăcii psoriazice [1].

În cererea de brevet WO1998058671A1 – *Topical tratment of psoriasis using neutralizing antibodies to IL-8* – se descrie o metodă de tratament a psoriazisului și a altor afecțiuni inflamatorii cutanate prin aplicarea topică a unei compoziții ce conține ca ingredient activ un anticorp ce neutralizează activitatea biologică a Interleukinei-8 (IL-8). Compoziția farmaceutică conține cel puțin unul din anticorpii I8-60, I8-S2, 3C6 și un excipient farmaceutic corespunzător. Pe scurt, invenția prezintă două metode de a obține anticorpi monoclonali și, respectiv, policlonali, ce neutralizează activitatea IL-8 umane. Astfel, anticorpii monoclonali I8-60, I8-S2, 3C6 se obțin prin imunizarea șoarecilor cu IL-8 umană recombinantă purificată, recoltarea celulelor splinei și fuzionarea cu celele de miolon de șoarece în raport de 5:1 și împreună cu un promotor de fuzionare (PEG). Celulele fuzionate sunt cultivate pe mediu selectiv HAT care susține creșterea celulelor hidridom. De îndată ce mediul a început să devină acid și coloniile de celule sunt vizibile, supernatantul culturilor celulare a fost testat pentru a determina prezența anticorpilor IL-8. Trei linii celulare de hibridom au produs anticorpi murini cu abilitate de neutralizare ridicată. Testele de neutralizare au presupus un test de chimiotaxie a neutrofilelor pentru I8-60 și 3C6 și analiza citometriei de flux pentru I8-S2. Anticorpii I8-60, I8-S2 și 3C6 care se leagă de diferiți determinanți antigenici ai IL-8 se pot utiliza într-un amestec pentru imunoterapia psoriazisului și a altor afecțiuni cutanate inflamatorii. Anticorpii policlonali au fost preparați prin injectarea găinilor cu IL-8 umană recombinantă purificată folosind un protocol standard de imunizare. După o perioadă de timp corespunzătoare, ouăle au fost recoltate și IgY din gălbenuș a fost purificată. Testele de specificitate au arătat că anticorpii policlonali obținuți nu exercită nicio reactivitate incrucișată detectabilă cu albumina serică umană și cu alte citokine testate. IgY purificată din gălbenușul ouălor a prezentat o activitate de neutralizare ridicată a IL-8. S-au

preparat compoziţii topice folosind o bază de cremă şi soluţiile de anticorpi monoclonali şi policlonali obţinuţi, care s-au aplicat pacienţilor umani cu psoriazis şi eczemă.

Cererea de brevet US7597892B2 - *Method for treating psoriasis by administering human antibodies specific for interleukin 15 (IL-15)* - se bazează pe generarea şi izolarea anticorpilor monoclonali umani care se leagă în mod specific la IL-15 umană şi care inhibă efectele proinflamatorii induse de IL-15, şi pe caracterizarea acestor anticorpi noi şi demonstrarea valorii terapeutice în tratarea unei varietăţi de boli mediate de IL-15. S-a demonstrat că anticorpii umani inhibă atât producţia TNFα, cât şi proliferarea celulelor T, ambele fiind implicate în mod integral în tulburările inflamatorii. Astfel, anticorpii umani oferă un mijloc îmbunătăţit pentru tratarea şi prevenirea unor astfel de tulburări. De asemenea, sunt descrise şi noi aplicaţii terapeutice, inclusiv tratamentul bolilor inflamatorii, cum ar fi artrita reumatoidă şi psoriazisul, pentru anticorpii care inhibă IL-15. Anticorpii umani anti-IL-15 şi compoziţiile care conţin anticorpi pot fi utilizaţi într-o varietate de aplicaţii diagnostice şi terapeutice *in vitro* şi *in vivo*.

Cererea de brevet WO2005/029091A2 – *Method of using cytokine assays to diagnose, treat, and evaluate inflamatory and autoimmune diseases* – descrie metode de diagnostic, tratament sau evaluare a bolilor inflamatorii sau autoimune prin prelevarea de probe de sânge periferic, ser, plasmă, ţesut, fluid cerebrospinal, sau alte fluide corporale de la pacienţi umani ce prezintă o suspiciune de diagnostic. Probele sunt analizate pentru a determina prezenţa şi cantitatea anumitor citokine, care oferă un diagnostic, o prognoză sau evaluare a răspunsului terapeutic. Astfel, se prezintă o metodă de diagnostic sau predicţie că un individ are sau va dezvolta o boală inflamatorie sau autoimună, ce constă în obţinerea unei mostre de la pacient, determinarea nivelului de expresie a citokinelor din probă, compararea expresiei de citokine cu niveluri predefinite a uneia sau mai multor citokine de referinţă şi determinarea dacă un pacient are sau va dezvolta o boală inflamatorie sau autoimună sau dacă pacientul va răspunde unui protocol de tratament sau unui agent farmaceutic prescris.

Citokina IL-17 joacă un rol deosebit de important în promovarea debutului şi a progresiei bolii psoriazice [2]. Inflamaţia psoriazică se caracterizează prin activarea axei Th17, aceste celule producând diverse citokine, inclusiv IL-17, citokină care la rândul ei induce nu numai proliferarea keratinocitelor, ci şi secreţia factorului de necroză tumorală (TNF)-a, IL-6, a ligandul chemokinei (motivul C-X-C): CXCL1 şi CXCL8. TNF-a accelerează infiltrarea celulelor inflamatorii, inclusiv a limfocitelor, monocitelor şi neutrofilelor, din sângele periferic în piele cu activare a celulelor dendritice [3]. Date din literatura de specialitate menţionează creşterea nivelului seric pentru IL-17 corelată cu psoriazisul, la bărbaţi [4].

Monokina indusă de interferon (IFN)-γ (MIG) / chemokină (motiv C-X-C) ligand 9 (CXCL) 9 este frecvent implicată în patogeneza psoriazică, fiind propusă ca un marker util pentru monitorizarea activității, precum și a progresiei psoriazisului [5]. MIP-1α și MIP-1β sunt molecule chemoatractante pentru eozinofile, monocite, celule B și celulele dendritice imature și activatoare pentru macrofage. CCL3 atrage selectiv limfocitele T-CD8+ și CCL4 limfocitele T-CD4+ [6].

În leziunile psoriazice, celulele T helper de tip 1 produc niveluri crescute de citokine precum γ-interferon (IFN-γ), factorul de necroză tumorală-a (TNF-a) și interleukina (IL)-12 [7], fapt relevat și în studiul nostru.

Într-un studiu recent, atât expresia pentru IFN-γ cât și pentru TNF-α a fost crescută în serul pacienților cu psoriazis moderat până la sever, receptorii specifici fiind la rândul lor crescuți în plăcile aterosclerotice. Prin urmare s-a sugerat că sinergia IFN-γ/TNF-α poate furniza o legătură proinflamatorie critică între inflamația psoriazică tegumentară și ateroscleroza vaselor îndepărtate, identificând blocarea potențială a IFN-γ și a TNF-α ca o nouă țintă terapeutică în aterogeneza asociată psoriazisului [8].

Yawalkar *et al* au fost găsit IL-12p70 și IL-23p19/p40 ca fiind supra-exprimate în diferite subseturi de celule dendritice și macrofage, iar producția lor a fost crescută *in situ*, sugerând faptul că ambele citokine au un rol patogen crucial în psoriazis [9].

Un studiu recent a raportat că în psoriazis IL-17A accelerează proliferarea keratinocitelor epidermice, care produc o multitudine de peptide antimicrobiene și chemokine, cum ar fi CXCL1/KC, CXCL2, CXCL8 și CCL20 [10], fapt relevat și în studiul nostru. În leziunile psoriazice, celulele T helper de tip 2 produc niveluri crescute de citokine precum IL-5, IL-6, IL-9, fapt relevat și în studiul nostru.

IL-6 a fost mult timp asociat cu patogeneza psoriazisului, creșterea nivelului seric de IL-6 fiind o caracteristică a acestuia [11]. Nivelurile serice ale IL-6 sunt considerate marker al activității inflamatorii în psoriazis, precum și un indicator al răspunsului la tratament [12]. O corelație pozitivă a fost descrisă între nivelurile serice de IL-6 și severitatea clinică a psoriazisului înainte de tratament; în plus, s-a raportat că nivelurile serice de IL-6 scad după tratamentul eficient [13].

Singh TP et al a remarcat implicarea IL-9 în inflamația asociată cu Th17 și în angiogeneza psoriazisului, sugerând rolul pe care îl poate avea această citokină în formarea psoriazisului prin calea Th17 [14]. *Midde HS et al* a demonstrat că IL-9 servește ca o legătură cheie între inflamația sistemică și angiogeneză în psoriazis, sugerând că existența unui mediu proinflamator în psoriazis, cu niveluri crescute de IL-9, IL-17 și VEGF este asociată cu creșterea severității bolii și afectarea calității vieții [15].

Prima citokină detectată la nivelul tegumentului a fost IL-1 și joacă un rol important în direcționarea răspunsurilor celulare și moleculare [16]. Tamilselvi E *et al* in 2013 au identificat un nivel redus al IL-1a în

biopsia cutanată şi în plasmă, în probele provenite de la pacienţii cu psoriazis, nivel care a crescut semnificativ (P <0,001) după tratamentul cu metotrexat [17].

CXCL10 este implicată în patogeneza psoriazisului, receptorii de suprafaţă ai chemokinei (CXCR3) fiind detectaţi în keratinocite şi în infiltratul dermic obţinut din plăcile psoriazice active, în timp ce tratamentul cu succes al plăcilor active a scăzut expresia de CXCL10. În serul pacienţilor cu psoriazis au fost găsite niveluri crescute ale CXCL10, cu o predominanţă a celulelor T helper de tip 1 la începutul bolii, în timp ce scăderea acestei chemokine a fost evidenţiată mai târziu, în psoriazisul de lungă durată [18].

Invenţia va fi în continuare ilustrată prin exemple, care au un caracter ilustrativ şi nicidecum limitativ.

Figuri:

Figura 1. Raportul profilului de expresie pentru IL-17 în ser. Raportul expresiei IL-17 la şoarecii din grupul psoriazis (4,4), grupul psoriazis remis natural (1,9), grupul psoriazis tratat cu IgY (0,8) şi grupul psoriazis tratat cu IgY purificat (0,7), *versus* grupul control. Rezultatele sunt exprimate ca raport tratat/control; n=9 pentru grupul psoriazis tratat cu IgY, n=3 pentru grupul psoriazis remis natural, n=5 pentru grupul psoriazis tratat cu IgY purificat, n=7 pentru grupul control şi n=7 pentru grupul psoriazis; unde n=număr de şoareci.

Figura 2. Raportul profilului de expresie pentru CXCL9/MIG în ser. Raportul expresiei MIG la şoarecii din grupul psoriazis (1,7), grupul psoriazis remis natural (1,4), grupul psoriazis tratat cu IgY (1,3) şi grupul psoriazis tratat cu IgY purificat (0,9), comparativ cu şoarecii din grupul control. Rezultatele sunt exprimate ca raport tratat/control; n=9 pentru grupul psoriazis tratat cu IgY, n=3 pentru grupul psoriazis remis natural, n=5 pentru grupul psoriazis tratat cu IgY purificat, n=7 pentru grupul control şi n=7 pentru grupul psoriazis; unde n=număr de şoareci.

Figura 3. Raportul profilului de expresie pentru MIP1a şi MIP1b în ser. Raportul expresiei MIPa la şoarecii din grupul psoriazis (2,6), grupul psoriazis remis natural (0,6), grupul psoriazis tratat cu IgY (1,1) şi grupul psoriazis tratat cu IgY purificat (1,05), comparativ cu şoarecii din grupul control. Raportul expresiei MIPb la şoarecii din grupul psoriazis (4,2), grupul psoriazis remis natural, grupul psoriazis tratat cu IgY şi grupul psoriazis tratat cu IgY purificat (0,3), comparativ cu şoarecii din grupul control. Rezultatele sunt exprimate ca raport tratat/control; n=9 pentru grupul psoriazis tratat cu IgY, n=3 pentru grupul psoriazis remis natural, n=5 pentru grupul psoriazis tratat cu IgY purificat, n=7 pentru grupul control şi n=7 pentru grupul psoriazis; unde n=număr de şoareci.

Figura 4. Raportul profilului de expresie pentru CXCL1/KC în ser. Raportul expresiei CXCL1 la şoarecii din grupul psoriazis (1,4), grupul psoriazis remis natural (1,4), grupul psoriazis tratat cu IgY (1) şi grupul psoriazis tratat cu IgY purificat (0,7), comparativ cu şoarecii din grupul control. Rezultatele sunt exprimate ca raport tratat/control; n=9 pentru grupul psoriazis tratat cu IgY, n=3 pentru grupul psoriazis remis natural, n=5 pentru grupul psoriazis tratat cu IgY purificat, n=7 pentru grupul control şi n=7 pentru grupul psoriazis; unde n=număr de şoareci.

Figura 5. Raportul profilului de expresie pentru IL-5, IL-6 şi IL-9 în ser. Raportul expresiei IL-5 (5,4), IL-6 (1,9) şi IL-9 (1,7) la şoarecii din grupul psoriazis, comparativ cu şoarecii din grupul control. Rezultatele sunt exprimate ca raport tratat/control; n=9 pentru grupul psoriazis tratat cu IgY, n=3 pentru grupul psoriazis remis natural, n=5 pentru grupul psoriazis tratat cu IgY purificat, n=7 pentru grupul control şi n=7 pentru grupul psoriazis; unde n=număr de şoareci.

Figura 6. Raportul profilului de expresie pentru IL-1a în ser. Raportul expresiei IL-1a la şoarecii din grupul psoriazis (0,6), grupul psoriazis remis natural (1,7), grupul psoriazis tratat cu IgY (1,3) şi grupul psoriazis tratat cu IgY purificat (1,3), comparativ cu şoarecii din grupul control. Rezultatele sunt exprimate ca raport tratat/control; n=9 pentru grupul psoriazis tratat cu IgY, n=3 pentru grupul psoriazis remis natural, n=5 pentru grupul psoriazis tratat cu IgY purificat, n=7 pentru grupul control şi n=7 pentru grupul psoriazis; unde n=număr de şoareci.

Figura 7. Raportul profilului de expresie pentru IP-10/CXCL10 în ser. Raportul expresiei IP-10/CXCL10 la șoarecii din grupul psoriazis (1,13), grupul psoriazis remis natural (1,03), grupul psoriazis tratat cu IgY (0,81) și grupul psoriazis tratat cu IgY purificat (0,77), comparativ cu șoarecii din grupul control. Rezultatele sunt exprimate ca raport tratat/control; n=9 pentru grupul psoriazis tratat cu IgY, n=3 pentru grupul psoriazis remis natural, n=5 pentru grupul psoriazis tratat cu IgY purificat, n=7 pentru grupul control și n=7 pentru grupul psoriazis; unde n=număr de șoareci.

Se dau în continuare exemple de aplicare a invenţiei

Exemplul 1.

Metodologia de obţinere a preparatului IgY (ROMVAC) din ouă hiperimune

Imunoglobulina Y (IgY) s-a obţinut conform metodologiei prezentate în cererea de brevet de invenţie depusă la OSIM (Pătraşcu Ionel Victor, Viorica Chiurciu, Chiurciu Constantin, Georgiana Topilescu Procedeu de obţinere şi utilizare a imunoglobulinelor de găină (IgY), RO129645 A0). Imunoglobulina (Ig) Y obţinută din gălbenuşul ouălor hiperimune este un preparat original al companiei ROMVAC şi face parte din gama IMUNOINSTANT.

IMUNOINSTANT este o marcă înregistrată europeană (EUIPO) ce reprezintă gama de produse ce au la bază oul hiperimun (care fac obiectul unor cereri de brevet depuse de Romvac pe plan naţional şi internaţional) şi derivate din acesta.

Metodologia de obţinere a IgY din gălbenuşul de ou hiperimun cuprinde următoarele etape:

- Prepararea unui antigen complex folosind tulpini bacteriene rezistente la antibiotice, în amestec cu adjuvant QS21
- Imunizarea găinilor cu antigenul preparat conform unei scheme de vaccinare
- Evaluarea periodică a titrului de anticorpi din gălbenuşul ouălor
- Procedura de extracţie a fracţiunii solubile în apă, astfel:
    - Gălbenuşul se separă de albuş şi se diluează cu apă deionizată (1:8 v/v) la +4^{0}C sau soluţie apoasă tamponată la pH 5.
    - Amestecul de gălbenuş se congelează rapid la -22^{0}C/-50^{0}C şi apoi se decongelează rapid la +20^{0}C.
    - După separarea celor două fracţii, extracţia fazei apoase se face prin absorbţie folosind o pompă peristaltică, apoi se filtrează şi se conservă la +4^{0}C.

Exemplul 2.

MODEL EXPERIMETAL *IN VIVO*

Determinările au fost realizate pentru patru grupuri experimentale murine, astfel:

- **grup psoriazis** şi **grup control**, pentru stabilirea valorilor normale, respectiv patologice.
    - **Grup psoriazis (7 şoareci)** - şoareci C57BL/6 (3 masculi şi 7 femele, vârsta 10-11 săptămâni, greutatea medie 20.4±2.9 g, fără medicaţie în ultimele 72 ore) cărora li s-a aplicat dorsal, zilnic, timp de şase zile consecutiv, o doză de 62,5 mg cremă pe bază de IMQ (5% Aldara Cream, MEDA AB Sweden). Doza zilnică conţine 3,125 mg compus activ. Şoarecii au fost sacrificaţi în ziua a 7-a a experimentului.
    - **Grup control (6 şoareci)** - şoareci C57BL/6 sănătoşi (3 masculi şi 3 femele, vârsta 10-11 săptămâni, greutatea medie 20.26±1.36 g) cărora nu le-a fost aplicat niciun tratament.
- **grup psoriazis tratat IgY** şi **grup psoriazis remis în mod natural**, pentru a evidenţia modificările induse în fenotipul celulelor NK în urma tratamentului cu componenta proteică IgY izolată din oul hiperimun de către partenerul ROMVAC COMPANY SA.

- **Grup psoriazis tratat cu IgY (12 şoareci)** - şoareci C57BL/6 (6 masculi şi 6 femele, vârsta 11 săptămâni, greutatea medie 21.33±2.14 g, fără medicaţie în ultimele 72 ore) cărora li s-a indus dermatita psoriziformă experimentală. În ziua 7, şoarecilor li s-a administrat prin gavaj o doză de 37.5 μg IgY (corespunzătoare dozei de IgY administrată unui om adult), timp de 5 zile consecutiv, şi au fost sacrificaţi în ziua 20 - ziua în care s-a apreciat macroscopic că s-a remis dermatita psoriaziformă experimentală.
- **Grup psoriazis remis în mod natural (3 şoareci)** - şoareci C57BL/6 (3 femele, vârsta 11 săptămâni, greutatea medie 17.87±0.81 g, fără medicaţie în ultimele 72 ore) cărora li s-a indus dermatita psoriziformă experimentală. Şoarecii au fost lăsaţi să se vindece în mod natural şi au fost sacrificaţi în ziua 22 – ziua în care s-a apreciat macroscopic remisia naturală.

Exemplul 3

EVALUAREA GENERĂRII DE INTERLEUKINE-CITOKINE-CHEMOKINE IMUNOLOGIC RELEVANTE

Din probele prelevate au fost analizate sub-probe (alicote) prin metoda xMAP – platforma Luminex200 (Luminex Corp, Austin, TX 78727, USA). În vederea analizei, s-a utilizat kitul multiplex Milliplex MAP Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel, HCYTOMAG-60K (Merck-Millipore, Billerica, MA 01821, USA) cu următorii analiţi: citokine (IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17a, RANTES/CCL5, LIF/Interleukin 6 Family Cytokine), factori stimulatori ai coloniei (G-CSF, GM-CSF, M-CSF), interferoni (IFN-γ), tumor necrosis factor (TNF-α), factori de creştere (vascular endothelial growth factor [VEGF]), şi familia de chemokine (eotaxin, IFN-γ inducible protein-10 [IP-10], monocyte chemoattractant protein-1 [MCP-1], macrophage-inflammatory protein [MIP-1α], MIP-1β, MIP-2, MIG/CXCL9, LIX/CXCL5, KC/CXCL1). Probele de ser au fost preluate şi analizate conform instrucţiunilor producătorului. Cuantificarea analitilor a fost realizata pe platforma de multiplexare Luminex200 pregătită în prealabil, cu softul dedicat xPONENT 4.2;

Au fost analizate intensităţile fluorescente medii (MFI) utilizând curba 5-Parameter Logistics pe platforma multiplex Luminex200. Nivelul de expresie a moleculelor analizate simultan a fost obţinut prin interpolarea valorilor MFI rezultate în urma achiziţiei probelor pe curbe generate de software-ul xPONENT 4.2. Pentru toate curbele 5-PL, coeficientul de regresie (R2) a prezentat valori apropiate de 1.

Citokina IL-17

Analiza expresiei serice pentru IL-17 a relevat diferenţe statistic semnificative între masculii din grupul psoriazis şi masculii control (53,6 versus 9,01 pg/mL, P=0,004), diferenţe care nu se observă în cazul femelelor. De asemenea, au existat diferenţe de expresie pentru IL-17 între grupul psoriazis (26,8 pg/mL) şi grupul control (6 pg/mL). În cazul grupurilor psoriazis tratat cu IgY şi psoriazis tratat cu IgY purificat expresia IL-17 a fost scăzută (4,9, respectiv 4,4 pg/mL), fiind comparativă cu cea obţinută în grupul control, subliniind astfel efectul indus de componenta proteică IgY izolată din oul hiperimun, precum şi de fracţia purificată (Figura 1).

Chemokina CXCL9/MIG

În studiul nostru, analiza expresiei CXCL9/MIG a relevat o creştere în grupul cu psoriazis (474,9 pg/mL) comparativ cu grupul control (282,3 pg/mL, P<0,001). Un nivelul scăzut ale expresiei MIG a fost înregistrat în cazul grupului psoriazis tratat cu IgY (374 pg/mL), respectiv psoriazis remis natural (396 pg/mL), în comparaţie cu grupul psoriazis. În cazul grupului cu psoriazis tratat cu IgY purificat expresia MIG a fost semnificativ statistic scăzută (252 pg/mL, P<0.001) în comparaţie cu grupul psoriazis, fiind comparată cu expresia obţinută în grupul control (Figura 2).

Macrophage Inflammatory Proteins: MIP-1α/MIP-1β (CCL3/CCL4)

Analiza profilului de expresie pentru chemokinele MIP-1α şi MIP-1β a evidenţiat o creştere a acestora în psoriazis şi o scădere după tratamentul cu componenta proteică IgY izolată din oul hiperimun. Astfel, expresia MIP1a a fost crescută în grupul cu psoriazis (126,5 pg/mL) comparativ cu grupul control (48 pg/mL). După tratament, expresia pentru MIP1a a scăzut atât în cazul grupului psoriazis tratat cu IgY (52 pg/mL), precum şi în cazul grupului cu psoriazis tratat cu IgY purificat (47 pg/mL). De asemenea a fost înregistrată o scădere a expresiei pentru MIP1a şi în grupul psoriazis remis natural (27 pg/mL). Chemokina MIP1b a prezentat creştere în grupul cu psoriazis (70,6 pg/mL) comparativ cu grupul control (17 pg/mL, P=0,02). După tratament, expresia pentru MIP1b a scăzut atât în grupul cu psoriazis tratat cu IgY, cât şi în grupul cu psoriazis tratat cu IgY purificat (~6 pg/mL) (Figura 3).

CXCL1/KC (keratinocyte-derived chemokine)

A fost identificată o creştere serică a expresiei pentru CXCL1 la nivelul grupului psoriazis (230 pg/mL), faţă de grupul control (161 pg/mL, P=0.05). După tratamentul cu fracţia de IgY purificată, expresia CXCL1 a înregistrat o scădere semnificativ statistică (113,7pg/mL, P<0,001), faţă de grupul psoriazis, scădere remarcată şi în cazul grupului psoriazis tratat cu IgY (161,4 pg/mL) (Figura 4).

Interleukine: IL-5, IL-6, IL-9, IL-1a

Expresia IL-6 a fost crescută în serul şoarecilor proveniţi din grupul psoriazis (22.7 pg/mL), comparativ cu grupul control (11,7 pg/mL, P=0,05); după tratament, expresia pentru IL-6 a scăzut atât în cazul grupului psoriazis tratat cu IgY, precum şi în cazul grupului cu psoriazis tratat cu IgY purificat (Figura 5).

A fost identificată o creştere a expresiei serice pentru IL-9 la nivelul grupului psoriazis (312,5 pg/mL), faţă de grupul control (180,8 pg/mL). După tratament expresia IL-9 a înregistrat o scădere nesemnificativ statistică în grupul tratat cu fracţia de IgY (294 pg/mL), respectiv în grupul tratat cu fracţia de IgY purificată (277 pg/mL), faţă de grupul psoriazis (Figura 5).

Expresiei pentru IL-5 a fost crescută în serul animalelor din grupul psoriazis (180 pg/mL), în comparaţie cu expresia aceleiaşi molecule în grupul control (33,7 pg/mL, P<0,001). După tratament au fost înregistrate scăderi ale expresiei de IL-5 faţă de grupul psoriazis, atât in cazul grupului cu psoriazis tratat cu IgY (55 pg/mL, P<0,001), cît şi în cazul grupului cu psoriazis tratat cu IgY purificat (61 pg/mL, P=0,003). De asemenea, expresia pentru IL-5 a fost scăzută şi în grupul psoriazis remis natural (114 pg/mL, P<0,5) (Figura 5).

Rezultatele au evidențiat o expresie scăzută a IL-1a în grupul psoriazic (107 pg/mL), comparativ cu grupul control (169,5 pg/mL). În urma tratamentului cu componenta proteică IgY izolată din oul hiperimun au fost înregistrate creșteri ale expresiei IL-1a în comparație cu grupul psoriazis, atât în grupul tratat cu forma purificată a IgY (226,3 pg/mL, P=0,05), cât și în grupul tratat cu întreaga componenta proteică IgY izolată din oul hiperimun (218,8 pg/mL). De asemenea, grup remis natural a prezentat o creștere a expresiei IL-1a (281 pg/mL) (Figura 6).

IFN-γ inducible protein-10 /IP-10 / CXCL10

A fost evidențiată o creștere a expresiei pentru CXCL10 în serul animalelor din grupul psoriazis (346,7 pg/mL), în comparație cu expresia obținută în grupul control (307 pg/mL). În grupul psoriazis remis natural expresia pentru CXCL10 a fost ușor scăzută (316 pg/mL), față de grupul psoriazis. După tratament au fost înregistrate scăderi semnificativ statistice ale expresiei pentru CXCL10 față de grupul psoriazis, atât in cazul grupului cu psoriazis tratat cu IgY (250 pg/mL, P=0,005), cât și în cazul grupului cu psoriazis tratat cu IgY purificat (237,4 pg/mL, P=0,005) (Figura 7).

În concluzie, prin evaluarea citokinelor, chemokinelor, a factorilor de creștere s-a urmărit demonstrarea influenței imunobiologice a componentelor izolate din oul hiperimun în modele *in vivo* cu patologii experimentale.

REVENDICARE:

1. Metodă de stabilire a unui set de interleukine-citokine-chemokine imunologic relevante, ce se constituie într-o semnătură moleculară utilizabilă in model animal de psoriazis tratat cu IgY obţinut din oul hiperimun, care cuprinde determinarea simultană şi dozarea citokinelor **IL-17, IL-5, IL-6, IL-9**, chemokine **CXCL9/MIG, KC/CXCL1, MIP-1α/CCL3, MIP-1β/CCL4 şi IL-1a** în probe de ser prelevate de la animalele tratate şi, respectiv, în probe de ser prelevate de la control, şi obţinerea unui profil de expresie caracterizat prin:

- **supraexpresia citokinei IL-17 evidenţiată în grupul psoriazis** (în medie de peste 5 ori la masculii din grupul psoriazis faţă de masculii din grupul control, respectiv de peste 4 ori la grupul psoriazis faţă de grupul control) **ajunge la valori comparabile cu lotul control, după tratamentul cu IgY** (0,8 ori în grupul cu psoriazis tratat cu IgY, respectiv 0,7 ori psoriazis tratat cu IgY purificat);
- **supraexpresia chemokinei CXCL9/MIG evidenţiată în grupul psoriazis** (în medie de peste 1,7 ori la grupul psoriazis faţă de grupul control) **ajunge la valori comparabile cu lotul control, după tratamentul cu IgY** (1,3 ori în grupul cu psoriazis tratat cu IgY, respectiv 0,9 ori psoriazis tratat cu IgY purificat);
- **supraexpresia chemokinelor MIP-1α/MIP-1β (CCL3/CCL4) evidenţiate în grupul psoriazis** (în medie de peste 2,6 ori pt CCL3 şi 4,2 ori pt CCL4 la grupul psoriazis faţă de grupul control) **ajunge la valori comparabile cu lotul control, după tratamentul cu IgY** (valori apropiate de control pentru **MIP-1α** în grupul cu psoriazis tratat cu IgY şi în grupul psoriazis tratat cu IgY purificat, respectiv valori scăzute de 0,3 ori pentru **MIP-1β** în grupul cu psoriazis tratat cu IgY şi în grupul psoriazis tratat cu IgY purificat);
- **supraexpresia chemokinei CXCL1/KC evidenţiată în grupul psoriazis** (în medie de peste 1,4 ori la grupul psoriazis faţă de grupul control) **ajunge la valori comparabile cu lotul control, după tratamentul cu IgY** (valori apropiate de control în grupul cu psoriazis tratat cu IgY, respectiv 0,7 ori în grupul psoriazis tratat cu IgY purificat);
- **supraexpresia citokinelor IL-5 şi IL-9 evidenţiată în grupul psoriazis** (în medie de peste 5 ori /1,7 ori la grupul psoriazis faţă de grupul control) **ajunge la valori comparabile cu lotul control, după tratamentul cu IgY** (1,6 ori pt ambele citokine în grupul cu psoriazis tratat cu IgY, respectiv 1,8 ori /1,5 ori în grupul psoriazis tratat cu IgY purificat);
- **supraexpresia citokinei IL-6 evidenţiată în grupul psoriazis** (în medie de peste 1,9 ori la grupul psoriazis faţă de grupul control) **ajunge la valori comparabile cu lotul control, după tratamentul cu IgY** (0,3 ori în grupul cu psoriazis tratat cu IgY şi 0,1 ori în grupul psoriazis tratat cu IgY purificat);
- **supraexpresia chemokinei CXCL10/IP-10 evidenţiată în grupul psoriazis** (în medie de peste 1,1 ori la grupul psoriazis faţă de grupul control) **ajunge la valori comparabile cu lotul control, după tratamentul cu IgY** (0,8 ori în grupurile cu psoriazis tratat cu IgY, psoriazis tratat cu IgY purificat);
- **subexpresia IL-1a în grupul psoriazis faţă de control** ((în medie de peste 0,6 ori la grupul psoriazis faţă de grupul control) **ajunge la valori comparabile cu lotul control, după tratamentul cu IgY** (1,3 ori în grupurile cu psoriazis tratat cu IgY şi psoriazis tratat cu IgY purificat).

Pe baza acestui profil de expresie sunt selectate ca relevante pentru boala psoriazică în model animal, inregistrandu-se scăderi ale expresiei pentru moleculele IL-17, IL-5, MIG/CXCL9, KC/CXCL1, CXCL10/IP-10, MIP-1α/CCL3 şi MIP-1β/CCL4, respectiv creşteri ale expresiei citokinei IL-1a, după tratamentul cu IgY total sau purificat, atunci când expresia lor a fost comparată cu cea a grupului psoriazis.

52

Figura 1.

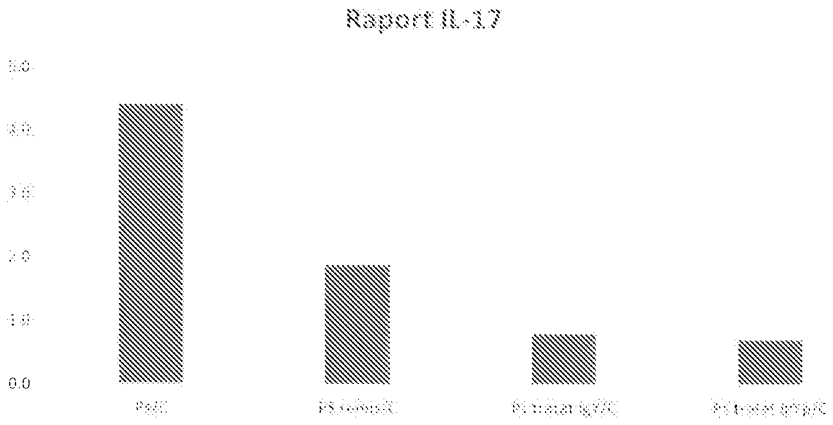


Figura 2.

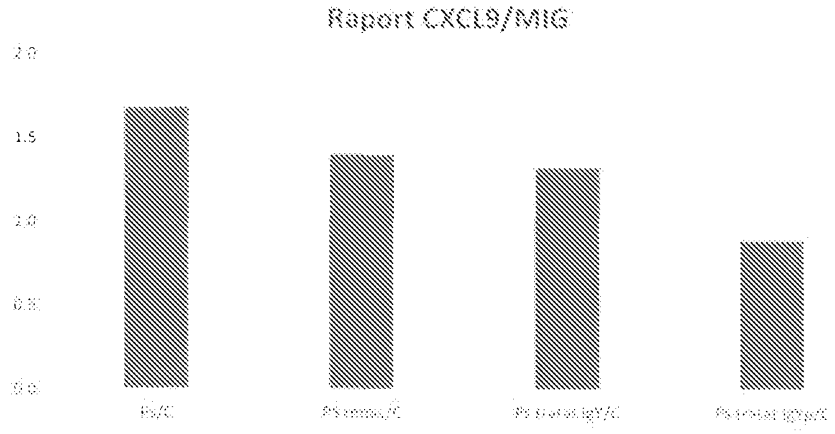


Figura 3.

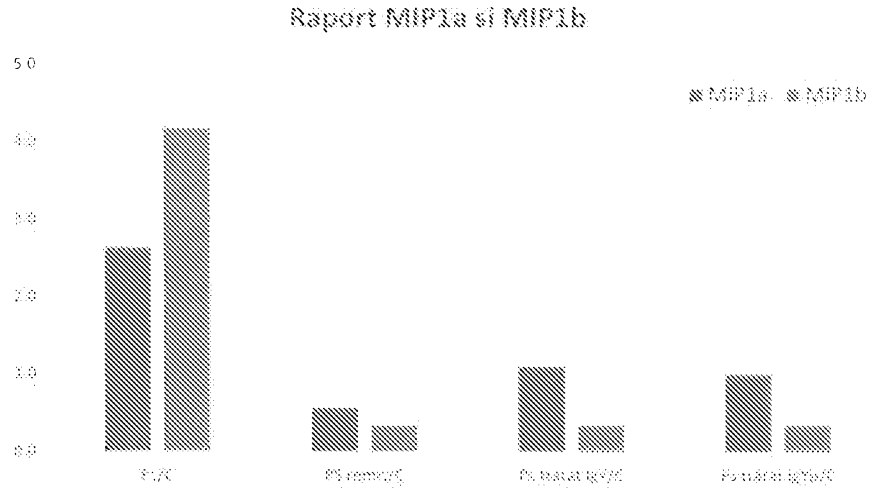


Figura 4.

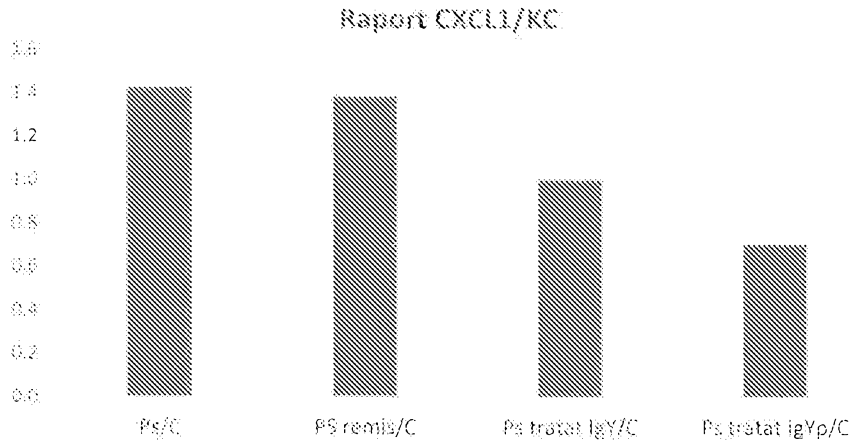

Raport CXCL1/KC
1.2
Ps/C
PS remis/C
Ps tratat IgY/C
Ps tratat igYp/C

Figura 5.

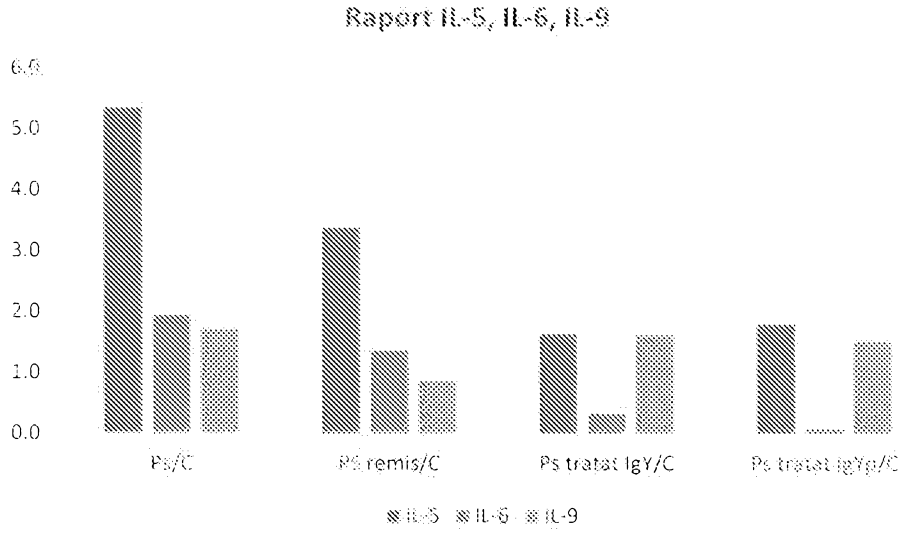

Raport IL-5, IL-6, IL-9
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
Ps/C
Ps remis/C
Ps tratat IgY/C
Ps tratat IgYp/C
IL-5
IL-6
IL-9

Figura 6.

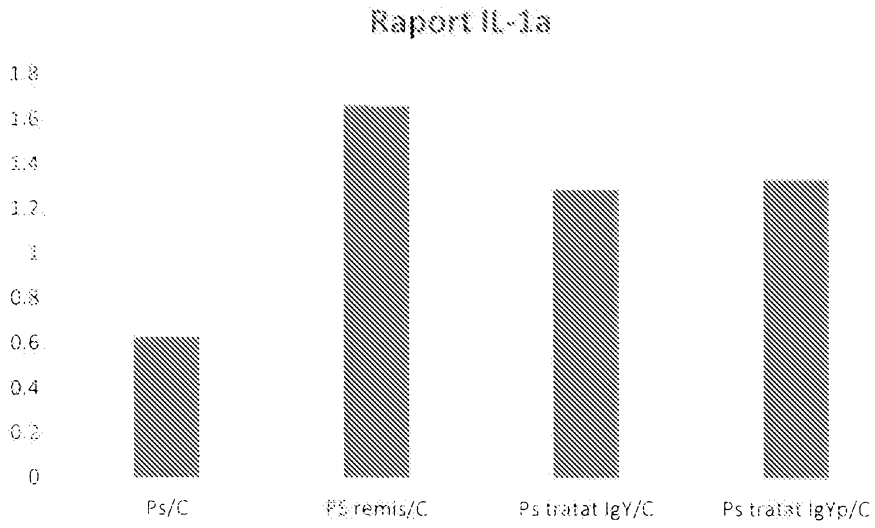
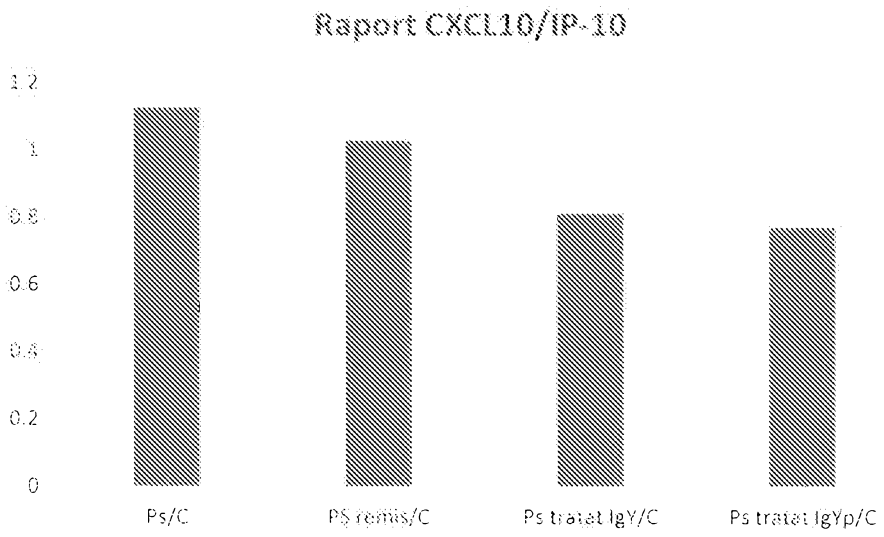

Raport IL-1a
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Ps/C
PS remis/C
Ps tratat IgY/C
Ps tratat IgYp/C

Figura 7.


Raport CXCL10/IP-10
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Ps/C
PS remis/C
Ps tratat IgY/C
Ps tratat IgYp/C