



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00473**

(22) Data de depozit: **11/08/2021**

(41) Data publicării cererii:
28/02/2023 BOPI nr. **2/2023**

(71) Solicitant:
• **ROMVAC COMPANY S.A.**,
ȘOS. CENTURII NR. 7, VOLUNTARI, IF,
RO;
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE ÎN DOMENIUL
PATOLOGIEI ȘI ȘTIINȚELOR
BIOMEDICALE "VICTOR BABEȘ"**,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 99-101,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **CHIRCIU VIORICA**, STR.CIOCÂRLIEI,
NR.32, BL.D24, SC.1, ET.6, AP.36,
BUCUREȘTI, B, RO;

• **IBRAM ALEF**, STR.POPORULUI, NR.74A,
CONSTANȚA, CT, RO;
• **NEAGU MONICA**, STR.ALECU MATEEVICI
NR.5, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• **TÂNASE CRISTIANA**,
CALEA 13 SEPTEMBRIE NR.126, BL.P 34,
SC.1, AP.30, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;
• **CONSTANTIN CAROLINA**,
STR.ȚEIUL DOAMNEI NR.13, BL.36, SC.1,
AP.27, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• **SURCEL MIHAELA**,
ALEEA BARAJUL ROVINARI, NR.12,
BL.Y12, SC.A, AP.3, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **MUNTEANU ADRIANA**,
BD.THEODOR PALLADY, NR.21, BL.P1,
SC.B, ET.9, AP.75, SECTOR 3, BUCUREȘTI,
B, RO

(54) **METODA DE PURIFICARE A PREPARATULUI IgY OBȚINUT
DIN OUĂ HIPERIMUNE (ROMVAC) CU AJUTORUL
SISTEMULUI AUTOMAT DE CROMATOGRAFIE DE LICHIDE
DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ ȘI TESTAREA ACTIVITĂȚII
BIOLOGICE A FRAȚIILOR OBȚINUTE ASUPRA LINIEI
CELULARE STANDARD CAL-27**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de purificare a unui preparat de IgY obținut din ouă hiperimune. Metoda, conform invenției, utilizează un sistem automat de cromatografie de lichide de înaltă performanță, Next Generation Chromatography (NGC) cu parcurgerea etapelor: echilibrarea cu cel puțin 2CV (volum coloană=24 ml) tampon de lucru PBS a coloanei de înaltă rezoluție de tip Size Exclusion ENrich SEC 650, care separă biomolecule cu greutate moleculară de 500...650 KDa, stabilă la pH 2...12, fiind compatibilă cu soluții apoase de guanidină-HCl 6M de 10 μm și uree 8M, detergenți și solvenți organici, cu un debit de

0,75...1,25 ml/min la temperatura camerei, injecția a 1 ml standarde/probe de tip fracțiune IgY izolată din ou hiperimun în concentrație 1,13 mg/ml sau Standard IgY, în concentrație de 10 mg/ml, eluția standardului/probei, rezultând 4 fracții din preparat de IgY care au fost colectate separat și testate individual pe cultura de celule CAL 27 în prezența IgY standard, cu rezultate îmbunătățite privind efectele biologice ale componentelor purificate.

Revendicări: 2
Figuri: 6



OFICIUL NAȚIONAL PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2021 0473
Data depunerii 11-08-2021

RO 137295 A2

57

DESCRIEREA INVENȚIEI

4663/10-08-2021

Prezenta invenție cu titlul **Metoda de purificare a preparatului IgY obținut din ouă hiperimune (ROMVAC) cu ajutorul sistemului automat de cromatografie de lichide de înaltă performanță și testarea activității biologice a fracțiilor obținute asupra liniei celulare standard CAL-27** face referire la o metodă de purificare cromatografică a preparatului IgY (imunoglobulină Y) obținut din ouă hiperimune și testarea componentelor obținute în sistem experimental celular pentru caracterizarea efectelor biologice ale componentelor purificate și îmbunătățirea preparatelor de tip IgY obținute din ouă hiperimune ale companiei ROMVAC.

IgY este produs de păsări, reptile și amfibieni cu o funcție similară cu cea a IgGs mamiferelor ⁽¹⁾. IgY circulă în ser ca și imunoglobulinele de tip IgGs, dar în plus se acumulează de 100 de ori mai concentrat în gălbenușul de ou și sunt transmise embrionului ⁽²⁾. Anticorpii IgY extrași din ouă de găină au fost utilizați în terapia anti-bacteriană ⁽³⁾ și anti-virală ⁽⁴⁾.

Imunoglobulina IgY are o serie de caracteristici importante, și anume tolerabilitate ridicată fiind un component al dietei umane, poate fi utilizat la persoanele care sunt alergice la ou deoarece IgY purificat nu conține ovalalbumină alergenă ⁽⁵⁾. În plus, administrarea sistemică a demonstrat capacitatea IgY specifice anti-virale de a proteja împotriva infecțiilor virale sau bacteriene ⁽⁶⁾. Administrarea sistemică și locală a IgY la mamifere a arătat că a fost generat un răspuns anti-IgY, anticorpii generați constând în principal din subclasa IgG. Aceste studii demonstrează faptul că IgY este antigenic, dar această moleculă nu se poate lega de receptori Fc exprimați de celule, astfel încât efectele adverse sunt minime ⁽⁷⁾. Cu mai mult de 20 de ani în urmă, s-a demonstrat în modele murine că administrarea de IgY purificată nu a indus un răspuns IgE, deci nu a indus un răspuns alergic ⁽⁸⁾. În plus, datorită faptului că IgY nu se leagă de sistemul complement uman sau de receptori Fc, inflamația secundară generată la administrare este minimă ⁽⁹⁾.

Acțiunea IgY este de a neutraliza bacteriile sau virusurile, și de a facilita eliminarea agentului oprind replicarea bacteriană/virală și implicit răspândirea agentului infecțios ⁽¹⁰⁾. Imunizarea pasivă cu IgY poate fi administrată la om cu infecție activă, deoarece dezvoltă un răspuns rapid. În plus, sugarii imaturi sau pacienții suprimați imun pot beneficia, de asemenea, de această imunizare pasivă ^(11, 12). În ultimul deceniu, IgY a câștigat o atenție științifică deosebită datorită acțiunilor sale biologice distincte generate de particularitățile sale amintite mai sus ⁽¹³⁾.

Tehnicile de purificare a IgY din ou sunt multiple, dar în cadrul invenției ne-am propus îmbunătățirea acestei fracționări utilizând o tehnică nouă în sistem automat de cromatografie de lichide de înaltă performanță, Next Generation Chromatography (NGC). Printre sistemele de

cromatografie utilizate până acum pe scară largă se numără sistemele de cromatografie Aekta (GE Healthcare), la care se pot adăuga cu succes platformele NGC Bio-Rad, care pot rula purificarea multistep. O metodă de purificare în două etape folosind proteina A și cromatografia cu schimb de ioni a fost descrisă de Winters și colab [¹⁴]. Aici, proba finală de proteine a fost eluată dintr-o coloană de schimb de ioni, însă poate fi necesară o etapă suplimentară de schimb de tampon pentru anumite experimente. În plus, combinarea purificatorului cromatografic cu un sistem de auto-încărcare probe poate crește debitul de procesare. O asemenea configurație este capabilă să gestioneze, în funcție de dimensiunea eșantionului, până la 240 de probe. Dar pentru a realiza acest lucru, sunt necesare *elemente de soft* personalizate și accesorii de cablaj realizate la comandă folosite pentru a permite comunicarea sistemului cu automatizatorul de probe. Recent a fost descris un sistem automatizat de purificare pe scară medie, bazat pe un sistem de extracție cu fază solidă pe patru canale, iar pentru construirea acestui sistem au fost utilizate mai multe materiale personalizate. Pe lângă sistemele de cromatografie clasice, sistemele de cromatografie NGC sunt cele mai recent disponibile comercial. Versatilitatea acestui sistem pentru purificarea automată de proteine multidimensionale a fost demonstrată folosind o proteină fluorescentă verde (GFP) marcată de His. Sistemul de cromatografie NGC se poate adapta astfel încât să poată purifica până la cinci probe printr-o strategie de purificare în trei etape. Cu această configurație, pot fi purificate 150–200 mg proteine, în funcție de proteina distinctă. Cantitatea și puritatea proteinei obținute sunt suficiente și pentru experimente mai solicitante, respectiv când urmează să se efectueze și teste funcționale cu culturi celulare. Procedurile de purificare automată de proteine menționate mai sunt de asemenea capabile să purifice proteinele în intervalul de 100mg. În plus, trebuie avută în vedere colaborarea cu producătorul pentru configurarea sistemului în demersurile personalizate de separare, a unor proteine rare, de exemplu. În sistemul nostru, toate componentele tehnice necesare pentru configurarea metodei de purificare automată a proteinelor au fost obținute de la furnizorul sistemului de cromatografie, aspect care la rândul său, ușurează programarea sistemului.

Concluzionând, purificarea proteinelor la scară medie reprezintă adesea un blocaj în industria farmaceutică care se ocupă de bioterapie. Pentru a scăpa de acest punct nodal, purificarea automată de proteine este capabilă să purifice până la 5 probe în același timp.

Literatura de brevete privind metodele de purificare ale IgY din produse aviare este extinsă. Astfel, există brevete în care purificarea IgY se face cu **cromatografiei pe apatită** (¹⁵) sau **cromatografia hidrofobă** (¹⁶).

În cererea US 005976419 A – "Yolk antibody-containing hair care product" – Nojiri Hiroshi și colab. se referă la un produs de îngrijire al părului, obținut cu anticorpi din gălbenușul

ouălor de găină imunizate cu keratină extrasă din păr uman degradat și normal. Anticorpii de gălbenuș s-au obținut din fracția solubilă în apă, diluând gălbenușul cu o soluție apoasă de polizaharidă (o soluție apoasă de caragenan) și prin centrifugarea amestecului astfel diluat pentru a îndepărta coagulatele lipoproteinelor.

În cererea US 4550019 A - "Manufacture and use of fowl egg antibodies" – Alfred Polson descrie o metodă de extracție a IgY prin care anticorpii din gălbenușul de ou au fost precipitați cu ajutorul unui precipitant polimeric filamentar liniar solubil neîncărcat, cum ar fi PEG și recuperați. Această precipitare a anticorpilor a fost precedată de o precipitare a proteinelor cazeinice și particulelor de lipide.

În cererea US 005420253 A - "Method for purifying egg yolk immunoglobulins" – Darull Emery și Darren Straub descrie o metodă pentru purificarea imunoglobulinelor IgG dintr-un gălbenuș de ou printr-o etapă de separare cu o singură fază, folosind un detergent neionic.

Astfel, metoda propusă prin prezenta invenție contribuie la lărgirea instrumentelor inovative de purificare a compusilor biologici și caracterizarea activității lor biologice. Cu ajutorul acestei metode propuse se obține rapid o purificare a compusilor de origine proteică din amestecuri complexe. De asemenea, fluxul de testare în model experimental celular oferă rezultate complexe privind siguranța produselor obținute în urma purificării NGC.

Aspectele tehnice pe care invenția prezintă urmărește să le rezolve au în vedere următoarele:

- Metodă de purificare rapidă și eficientă a imunoglobulinei IgY din amestecuri complexe utilizând tehnologia în sistem automat de cromatografie de lichide de înaltă performanță ca o alternativă mai puțin laborioasă față de tehnicile anterioare și care, poate fi configurată la scară industrială.
- Datele din literatura de specialitate recentă vin în sprijinul invenției propuse, deoarece se conturează clar necesitatea de a contribui prin modele celulare la caracterizarea complexă a compușilor purificați prin tehnologia NGC.

Prin urmare, invenția urmărește să rezolve următoarele probleme:

- Obținerea unei metodologii optime de purificare a IgY utilizând un sistem automat de cromatografie de lichide de înaltă performanță;
- Metoda de purificare cu ajutorul NGC oferă rapiditate, înaltă reproductibilitate a compușilor izolați și o manipulare facilă;
- Modelul celular și fluxul metodologic utilizat oferă rezultate validate privind siguranța produsului izolat și metodologia poate fi extinsă la o gamă largă de produși biologici.

Detalii privind realizarea prezentei invenții sunt prezentate în exemplele următoare:

Exemplul 1**Metodologia de obținere a preparatului IgY (ROMVAC) din ouă hiperimune**

Imunoglobulina Y (IgY) s-a obținut conform metodologiei prezentate în cererea de brevet de invenție depusă la OSIM (¹⁷). Imunoglobulina (Ig) Y obținută din gălbenușul ouălor hiperimune este un preparat original al companiei ROMVAC și 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 național și internațional) și derivate din acesta.

Metodologia de obținere a IgY din gălbenușul 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 gălbenușul ouălor
- Procedura de extracție a fracțiunii solubile în apă, astfel:
 - Gălbenușul se separă de albuș și se diluează cu apă deionizată (1:8 v/v) la +4 °C sau soluție apoasă tamponată la pH 5.
 - Amestecul de gălbenuș se congelează rapid la -22 °C/-50 °C și apoi se decongelează rapid la +20 °C.
 - După separarea celor două fracții, extracția fazei apoase se face prin absorbție folosind o pompă peristaltică, apoi se filtrează și se conservă la +4 °C.

Exemplu 2**Purificarea preparatului IgY obținut din ouă hiperimune cu ajutorul metodei NGC**

Sistemul de cromatografie NGC, alcătuit din **cromatograful propriu-zis**, **colectorul de fracții** și **componenta electronică** (laptop dotat cu software-ul dedicat **ChromLab**) este prevăzut cu o coloana de înaltă rezoluție de tip **Size Exclusion ENrich SEC 650**, capabilă să separe biomolecule cu greutatea moleculară cuprinse între 500 Da și 650 KDa. Coloana conține *beads*-uri sferice (polimeri) de 10 μm și este stabilă la pH 2-12; este compatibilă cu soluții apoase de guanidină-HCl 6M și uree 8M, precum și cu detergenți și solvenți organici, ca metanol, etanol și izopropanol. Volumul coloanei (CV) este de 24 mL, debitul recomandat fiind 0.75 – 1.25 mL/min la temperatura camerei. Coloana este furnizată și se păstrează în etanol 20%.

Analiza cromatografică constă în parcurgerea a trei etape: **Echilibrarea coloanei**; **Injectia standardului / probei**; **Eluția standardului / probei**. Eluția este un proces unde un component care urmează să fie separat dintr-un amestec complex se deplasează prin coloană și astfel este

separat de celelalte componente. În Figura 1 este prezentată schema principiului de separare NGC. **Echilibrarea coloanei** (păstrată în etanol 20%) se face cu cel puțin 2 CV (volum coloană) de tampon de lucru, în cazul nostru - aproximativ 50 mL PBS - Phosphate Buffered Saline; coloana se consideră echilibrată când nu mai există variații ale pH-ului la un volum rulat de minim 5 mL. **Injectia standardului/probelor** – standardele și probele se introduc în cromatograf prin portul de injecție (1 mL standard/probă).

Standarde utilizate:

- **Gel Filtration Standard** - Bio-Rad, mixtură de markeri cu masa moleculară (M) cuprinsă între 1350 și 670000 Da. Acest standard se folosește pentru coloanele de cromatografie de tip *gel filtration* și *size exclusion* și conține mixtură liofilizată de tiroglobulină (M=670.000), γ -globulină bovină (M=158.000), ovalbumină aviară (M=44.000), mioglobină cabalină (M=17.000) și vitamina B12 (M=1.350). Pentru reconstituire se adaugă 0.5 mL apă deionizată (aproximativ 18 mg proteină/flacon), se agită flaconul ușor și se ține pe gheață 2-3 minute. Pentru coloanele cu capacitatea de 25-50 mL se folosește un volum de 125 μ L standard, care se aduce la 1 mL cu apă deionizată. Soluția standard astfel preparată se filtrează (Puradisc 25PP, Whatman).
- **Standard IgY** (Chicken IgY DEAE Purified from Mixed Breed Chicken Eggs, Lampire Biological Laboratories) – concentrație 10 mg/mL; se diluează cu PBS pentru concentrația de lucru 1 mg/mL.

Probe:

1. **Fracțiunea IgY izolată din oul hiperimun** – concentrație 1.13 mg/mL
2. **Standard IgY** (Chicken IgY DEAE Purified from Mixed Breed Chicken Eggs, Lampire Biological Laboratories) – concentrație 10 mg/mL; se diluează cu PBS pentru concentrația de lucru 1 mg/mL.

După optimizarea separării s-au obținut 4 fracții din produsul IgY (ROMVAC); fracțiile au fost colectate separat și testate individual pe culturile de celule. Exemplificarea separării la trecerea repetată prin coloană este prezentată în Figura 2.

Exemplul 3

Testarea viabilității celulare a culturii standard de carcinom scuamocelular uman CAL-27 în prezența fracțiilor purificate

Pentru evaluarea componentelor biologice izolate și purificate prin cromatografie NGC a fost folosită linia celulară CAL-27 (CRL-2095™). Linia celulară standard furnizată de colecția internațională ATCC a fost menținută în condițiile specificate de producător [18]. Pentru evaluarea fracțiilor izolate în sisteme celulare, celulele au fost desprinse din flask prin tratament cu tripsină

EDTA; celulele se spală prin centrifugare, la 4°C iar sedimentul celular a fost reluat în mediu suplimentat cu FBS. Sistemele experimentale cu CAL-27 au fost introduse în plăci de cultură cu 96 godeuri, în triplicat în concentrație de 5000 celule per godeu. Celulele au fost lăsate la aderat 24h în plăcuțele de 96 godeuri și după 24h au fost adăugate fracțiile izolate și purificate prin NGC, la concentrațiile selectate dintr-o curbă de doze, utilizată de asemenea în experimentele de citotoxicitate.

Viabilitatea celulară a fost testată utilizând testele standard de eliberare a lactat dehidrogenazei (LDH) [19] și de reducere a compusului tetrazolic sare de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximethoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium (MTS) [20]. Testul LDH măsoară integritatea membranară a celulelor cultivate, iar testul MTS este un test indirect de proliferare celulară pentru că evidențiază activitatea metabolică celulară.

Culturile de celule CAL-27 au fost incubate cu compușii de testat timp de 24h, respectiv 48h, în triplicate. După cei doi timpi de incubare, 50 μL de supernatant a fost testați pentru eliberarea de LDH. Testul înregistrează densitățile optice (DO) ale probelor experimentale/controalelor la 490 nm la cititorul de plăci. A fost testată cultura de celule CAL27 în prezența IgY standard (concentrația de 75 μg/mL), IgY (Romvac) (concentrația de 75 μg/mL) fracțiile 1, 2, 3 și 4 separate prin cromatografie NGC din preparatul IgY (Romvac). Se observă din rezultatele prezentate, că preparatele analizate au un efect protectiv asupra membranei celulare, efect care se reflectă într-o eliberare redusă de LDH comparativ cu celulele control. În Figura 3 este exemplificat testul eliberării LDH în prezența compușilor de testat.

După expirarea celor doi timpi de incubare, 100 μL de supernatant a fost îndepărtat (din care 50 μL a fost utilizat pentru testarea eliberării LDH) și peste culturile celulare a fost adăugat reactivul MTS și incubat 2h. Testul înregistrează densitățile optice (DO) ale probelor experimentale/controalelor la 490 nm la cititorul de plăci. Si în acest sistem experimental a fost testată cultura de celule CAL27 în prezența IgY standard (concentrația de 75 μg/mL), IgY (Romvac) (concentrația de 75 μg/mL), fracțiile 1, 2, 3 și 4 separate prin cromatografie NGC din preparatul IgY (Romvac). Compușii testați influențează diferit capacitatea proliferativă a celulelor investigate, dar cu același aspect, atât la 24, cât și la 48h de incubare. Astfel, față de control, IgY standard crește capacitatea proliferativă a celulelor investigate cu aproximativ 75% la 24h și cu 60% la 48h. De remarcat că celulele control sunt în plină proliferare logaritmică, dublându-se la 24h. Același efect de proliferare este întâlnit și la preparatul IgY (Romvac), dar cu procente mai reduse, respectiv cu 50% și 12,5%. Este evident că acest efect proliferativ scade în timp și probabil este datorat internalizării receptorilor membranari care s-au cuplat cu produsele pe bază de imunoglobulină. În Figura 4 este exemplificat testul MTS în prezența compușilor de testat.

Validarea testelor de viabilitate LDH și MTS a fost realizată folosind citometria în flux. Astfel evaluarea prin citometrie în flux a celulelor care suferă fenomenul de apoptoză s-a folosit Anexina V (conjugată cu FITC) și iodura de propidiu (PI). Anexina V se leagă de resturile de fosfatidilserină (PS) expuse în partea externă a bistratului lipidic al celulelor, în stadiile incipiente ale apoptozei. Marcarea celulelor cu Anexina V evidențiază stadii precoce ale apoptozei pentru celulele negative la colorarea cu PI. Pe măsură ce fenomenul de apoptoză avansează, crește permeabilitatea membranei plasmatică, iar PI poate să traverseze membrana și să se lege de ADN-ul celulei, permițând identificarea celulelor care și-au pierdut integritatea membranară. Se identifică astfel 4 populații celulare distincte: celule viabile (negative atât pentru Anexina V cât și pentru PI), celule apoptotice timpurii (pozitive pentru Anexina V și negative pentru PI), celule apoptotice tardive (pozitive pentru PI și Anexina V) și celule necrotice (pozitive pentru PI și negative pentru Anexina V). Pe baza acestui protocol publicat de co-inventorii acestui brevet ⁽²¹⁾ a fost evaluat prin citometrie în flux efectul pe care îl pot avea fracțiile proteice de IgY izolate și purificate prin cromatografie NGC asupra viabilității celulelor tratate. A fost testată cultura de celule CAL27 în prezența IgY standard (concentrația de 75 μg/mL), IgY (Romvac) (concentrația de 75 μg/mL), fracțiile I, II, III și IV separate prin cromatografie NGC din preparatul IgY (Romvac). Analizele s-au efectuat după incubări de 24h, respectiv 48h. Testele de citometrie în flux validează rezultatele de viabilitate celulare în prezența compușilor și subliniază siguranța produselor obținute. În Figura 5 sunt exemplificate rezultatele obținute privind testarea apoptozei în prezența compușilor de testat.

Exemplul 4

Evaluarea capacității proliferative a fracțiilor obținute prin utilizarea analizei în timp real cu ajutorul tehnologiei xCELLigence

Investigarea efectului diferiților compuși asupra culturilor celulare, culturi primare sau celulare standard, utilizând o tehnologie inovativă de tipul impedanței celulare cu ajutorul echipamentului xCELLigence, poate dezvălui noi mecanisme de influențare a fiziologiei celulare. Investigarea efectelor unor compuși asupra liniilor celulare standard cu ajutorul acestei tehnologii, poate îmbunătăți valoarea predictivă a testelor cu punct final unic de tipul testelor LDH sau MTS. Tehnologia monitorizează în timp real comportamentul celular și a fost standardizată în diverse sisteme experimentale de către co-inventorii ^(22, 23).

Tehnologia xCELLigence utilizează plăci E-16 care sunt acoperite pe partea inferioară cu electrozi care sunt capabili să înregistreze modificarea rezistivității electrice induse de aderența celulară. Primele 2 ore de la însămânțarea culturilor celulare înregistrează aderența reală a celulelor, în timp ce ulterior creșterea impedanței înregistrează proliferarea celulară. Softul *RTCA*

2.0 prelucrează rezultatele obținute ca și curbe ale dinamicii comportamentului celular în prezența compușilor studiați și ca indici celulari (CI) înregistrați automat funcție de timpul de cultivare. Linia celulară CAL-27 aflată în perioada logaritmică de proliferare a fost însemănată în plăci E-16 în concentrație de 5000 celule/godeu. După 2h de la însemănțare, compușii de testat au fost introduși în triplicate. Au fost testate următoarele componente: IgY standard (75, 37, 17 $\mu\text{g/mL}$), IgY (Romvac) (75, 37, 17 $\mu\text{g/mL}$), fracții purificate prin cromatografie NGC (fracția I - 19 $\mu\text{g/mL}$; fracția II - 37, 17 $\mu\text{g/mL}$; fracția III - 19 $\mu\text{g/mL}$; fracția IV - 14 $\mu\text{g/mL}$). Evaluarea a fost realizată timp de 96h de la introducerea compușilor în sistemul celular. Rezultatele prezintă celulele CAL-27 cu o proliferare activă fiind în creștere logaritmică. De asemenea, se remarcă numărul optim de celule utilizate având în vedere că nici la 96h de la cultivarea celulară, acestea nu epuizează nutrienții din mediul de cultură. Efectele înregistrate asupra proliferării celulare în prezența compușilor studiați pot fi remarcate după 24h de incubare. După 24h se remarcă o diferențiere a efectelor compușilor de tip IgY. Astfel, IgY standard și fracția I testată au comportamente celulare identice, în timp ce IgY (Romvac) induce efecte asemănătoare fracțiilor II, III, IV. Se observă de asemenea că IgY (Romvac) are efecte cumulative ale fracțiilor I, II, III, IV. Aceste efecte sunt perfect omogene timp de 96h și peste 72h comparabilitatea acestor produse se accentuează. Fracția I din preparatul IgY (Romvac) purificată prin cromatografie NGC este identică, ca și efect celular, cu IgY standard. Rezultatele sunt prezentate în Figura 6.

În exemplele prezentate este prezentată o metodă eficientă și automată de purificare prin cromatografie de tip NGC a produselor IgY obținute din ouă hiperimune (Romvac) și un flux de testare a produselor obținute în sistem experimental celular. Utilizarea cromatografiei NGC se poate extinde la izolarea și purificarea compușilor din amestecuri biologice complexe. Utilizarea fluxului de testare celulară este important pentru testarea compușilor biologic activi în general.

DESCRIERE FIGURI

Figura 1. Schema principiului de separare NGC. Cele 5 etape generale parcurse sunt reprezentate de umplerea coloanei cu eluent, injectarea probei biologice, separarea probei biologice, eluția analitului

Figura 2. Cromatograme obținute prin purificarea NGC; standard IgY și fracțiunea IgY (volum total probă) – debit de 1 mL/min, absorbanta 280 nm; suprapunerea cromatogramelor obținute în urma a zece rulări consecutive.

Figura 3. Testul de eliberare LDH în cultură de celule CAL27 în prezența IgY standard (concentrația de 75 $\mu\text{g/mL}$), IgY Romvac (concentrația de 75 $\mu\text{g/mL}$), fracțiile 1, 2, 3 și 4 separate prin cromatografie NGC din preparatul IgY Romvac față de control timp de 24h (A) și 48h (B).

Figura 4. Testul MTS al culturii de celule CAL27 în prezența IgY standard (concentrația de 75 $\mu\text{g/mL}$), IgY Romvac (concentrația de 75 $\mu\text{g/mL}$), fracțiile 1, 2, 3 și 4 separate prin cromatografie NGC din preparatul IgY Romvac față de control timp de 24h (A) și 48h (B) (media triplicate).

Figura 5. Investigarea markerilor apoptotici cu ajutorul citometriei în flux. Procente de celule apoptotice timpurii Anexină V FITC (Anexina V+), PI-; Celulele apoptotice târzii Anexina V+, PI+; Celulele necrotice Anexina V-, PI+; Celulele vii Anexină V FITC-, PI-.

Figura 6. A. Index celular (CI) celule CAL-27 control, proliferare înregistrată timp de 72h (media CI triplicate); Index celular (CI) înregistrat automat pentru culturile de celule CAL-27 tratate cu compuși IgY standard (concentrațiile de 37, 15 $\mu\text{g/mL}$), IgY Romvac (concentrațiile de 75, 37, 15 $\mu\text{g/mL}$), fracțiile 1, 2, 3 și 4 separate prin cromatografie NGC din preparatul IgY Romvac față de control, proliferare înregistrată timp de 5h(B), 24h(C), 48h(D), 72h(E); (media CI triplicate).

BIBLIOGRAFIE

- ¹ Warr GW, Magor KE and Higgins DA: IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today* 16: 392–398, 1995
- ² Carlander D, Stalberg J and Larsson A: Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. *Ups J Med Sci* 104:179–189, 1999
- ³ Thomsen K, Christophersen L, Bjarnsholt T, Jensen PO, Moser C and Hoiby N: Anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgY antibodies augment bacterial clearance in a murine pneumonia model. *J Cyst Fibr* 15:171–178, 2016
- ⁴ Nguyen HH, Tumpey TM, Park HJ, Byun Y-H, Tran LD, Nguyen VD, Kilgore PE, Czerkinsky C, Katz JM, Seong BL, *et al*: Prophylactic and therapeutic efficacy of avian antibodies against influenza virus H5N1 and H1N1 in mice. *PLoS One* 5: e10152, 2010
- ⁵ Rahman S, Van Nguyen S, Icatlo FC Jr., Umeda K and Kodama Y: Oral passive IgY-based immunotherapeutics: a novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases. *Hum Vaccin Immunother* 9:1039–1048, 2013
- ⁶ Vega CG, Bok M, Vlasova AN, Chattha KS, Fernández FM, Wigdorovitz A, Parreño VG, Saif LJ and Salmon H: IgY antibodies protect against human Rotavirus induced diarrhea in the neonatal gnotobiotic piglet disease model. *PLoS One* 7:e42788, 2012
- ⁷ Torche AM, Le Dimna M, Le Corre P, Mesplede A, Le Gal S, Cariolet R and Le Potier MF: Immune responses after local administration of IgY loaded-PLGA microspheres in gut-associated lymphoid tissue in pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 109: 209–217, 2006
- ⁸ Akita E, Jang C, Kitts D and Nakai S: Evaluation of allergenicity of egg yolk immunoglobulin Y and other egg proteins by passive cutaneous anaphylaxis. *Food Agric Immunol* 11: 191–201, 1999
- ⁹ Kovacs-Nolan J and Mine Y: Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annu Rev Food Sci Technol* 3:163–182, 2012
- ¹⁰ Xu Y, Li X, Jin L, Zhen Y, Lu Y, Li S, You J, Wang L. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. *Biotechnol Adv* 29: 860–868, 2011
- ¹¹ Zhang X, Calvert RA, Sutton BJ and Dore KA: IgY: a key isotype in antibody evolution. *Biol Rev Camb Philos Soc* 92: 2144– 2156, 2017.
- ¹² Muller S, Schubert A, Zajac J, Dyck T and Oelkrug C: IgY antibodies in human nutrition for disease prevention. *Nutr J* 14 (Article no.109): 1-7, 2015
- ¹³ Michael A, Meenatchisundaram S, Parameswari G, Subbraj T, Selvakumaran R and Ramalingam S: Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. *Indian J Sci Technol* 3(4): 468–474, 2010.
- ¹⁴ D. Winters, C. Chu, K. Walker. Automated two-step chromatography using an ÄKTA equipped with in-line dilution capability. *J. Chromatogr. A*, 1424 (2015), pp. 51-58
- ¹⁵ Peter S. Gagnon, Enhanced purification of antibodies and antibody fragments by apatite chromatography, US20090187005A1,
- ¹⁶ Henderson TA, Sumbramanian V.Iyer, Jeremy Vrchota, James Schlitz Methods for purifying IgY antibodies, US2014/0073766 A1,
- ¹⁷ Pătrașcu Ionel Victor, Viorica Chiurciu, Chiurciu Constantin, Georgiana Topilescu Procedeu de obținere și utilizare a imunoglobulinelor de găină (IgY), RO129645 A0
- ¹⁸ CAL 27 | ATCC
- ¹⁹ CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit – Promega Corporation, cat. No. G1780
- ²⁰ CellTiter 96R AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Technical Bulletin #TB112, Promega Corporation
- ²¹ Clara Matei, Mircea Tampa, Constantin Caruntu, Rodica-Mariana Ion, Simona-Roxana Georgescu, Georgiana Roxana Dumitrascu, Carolina Constantin and Monica Neagu, Protein

microarray for complex apoptosis monitoring of dysplastic oral keratinocytes in experimental photodynamic therapy, *Biol Res*, 2014, 47(1): 33-41

²² Mircea Tampa, Clara Matei, Constantin Caruntu, Teodor Poteca, Dana Mihaila, Catalin Paunescu, Gabriel Pitigoi, Simona-Roxana Georgescu, Carolina Constantin, Monica Neagu, Cellular impedance measurement – novel method for *in vitro* investigation of drug efficacy, *Farmacia*, 64(3), 430-434, 2016

²³ Neagu M, Constantin C, Tampa M, Matei C, Lupu A, Manole E, Ion RM, Fenga C, Tsatsakis AM, Toxicological and efficacy assessment of post-transition metal (Indium) phthalocyanine for photodynamic therapy in neuroblastoma. *Oncotarget*. 2016 Oct 25;7(43):69718-69732. doi: 10.18632/oncotarget.11942

REVENDICĂRI

Metoda de purificare a preparatului IgY obținut din ouă hiperimune (ROMVAC) cu ajutorul sistemului automat de cromatografie de lichide de înaltă performanță (NGC) caracterizată prin aceea că descrie o alternativă de ultimă generație, eficientă și automată a proceselor de purificare a produselor IgY Romvac.

Flux de testare a activității biologice a fracțiilor obținute asupra liniei celulare standard CAL-27 caracterizat prin aceea că prezintă o metodologie rapidă de stabilire în model celular (*in vitro*) a eficienței fracțiilor obținute prin purificare utilizând cromatografia de tip NGC.

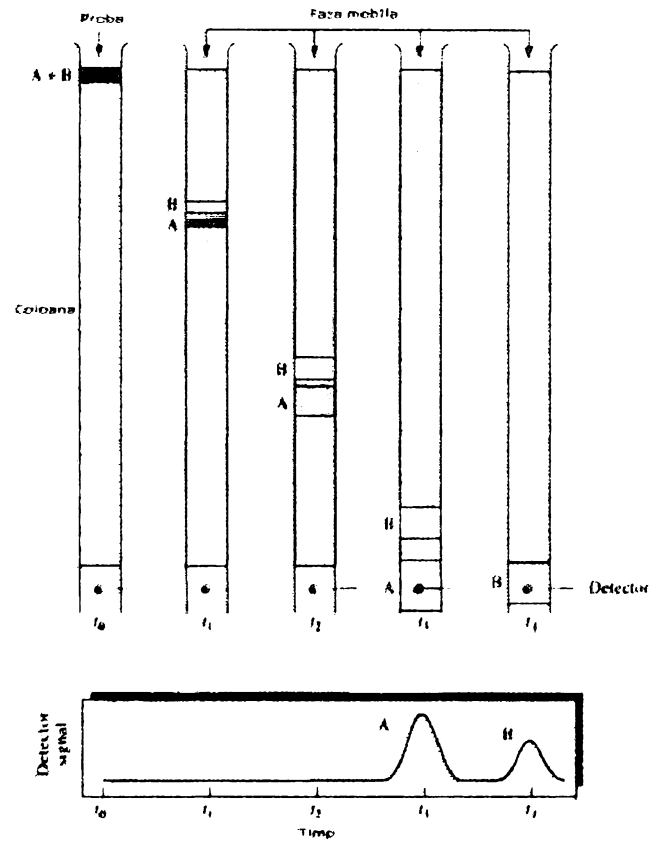


FIGURA 1

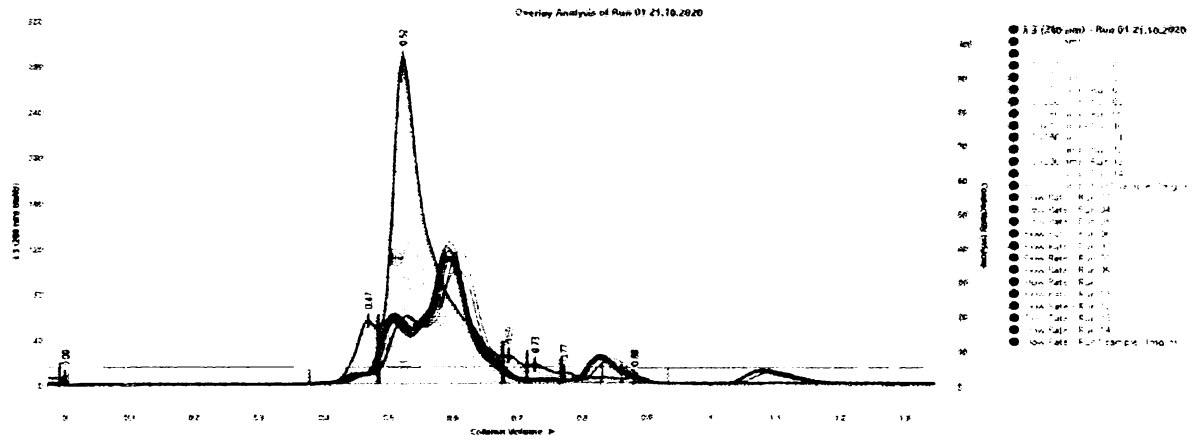


FIGURA 2

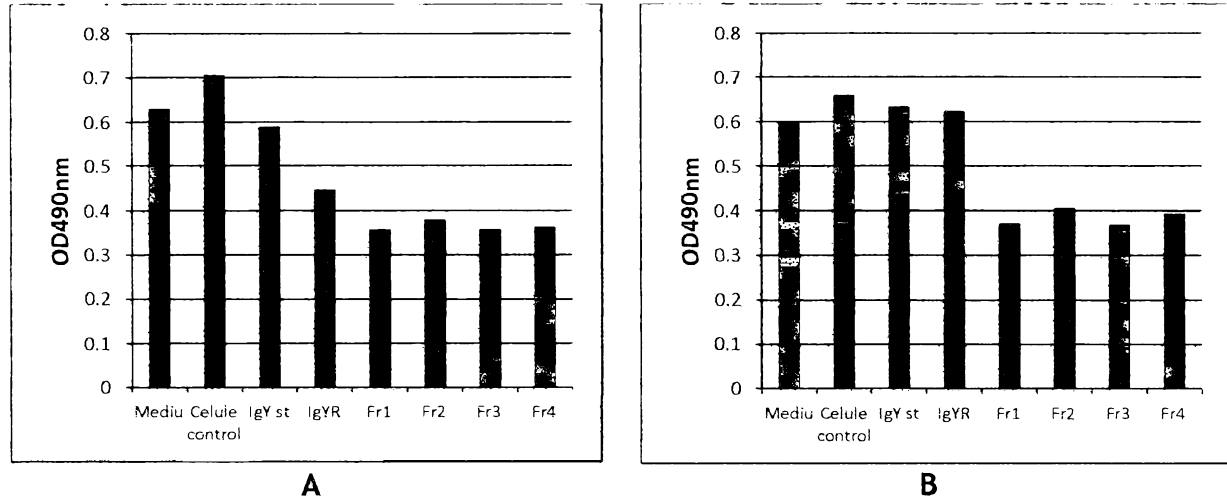


FIGURA 3

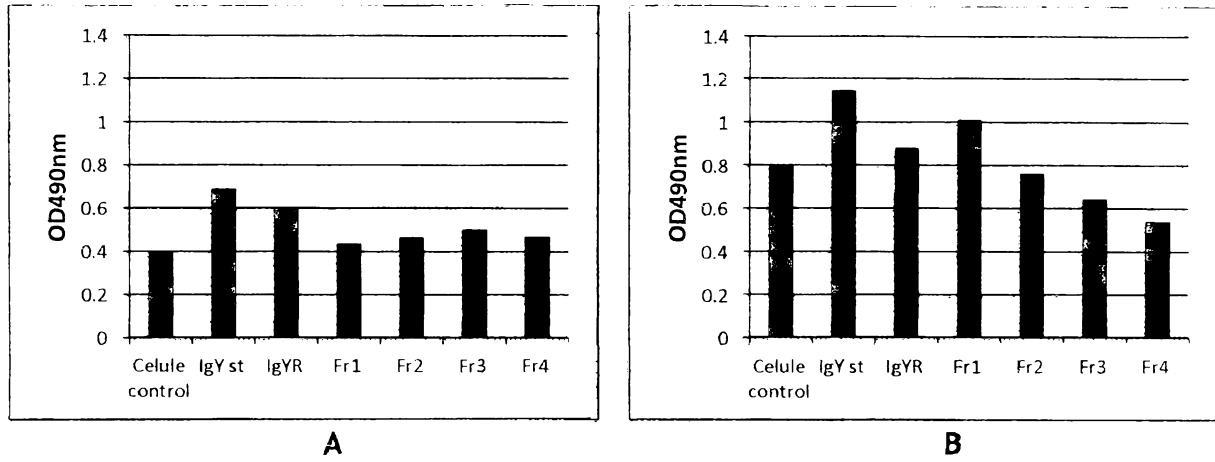
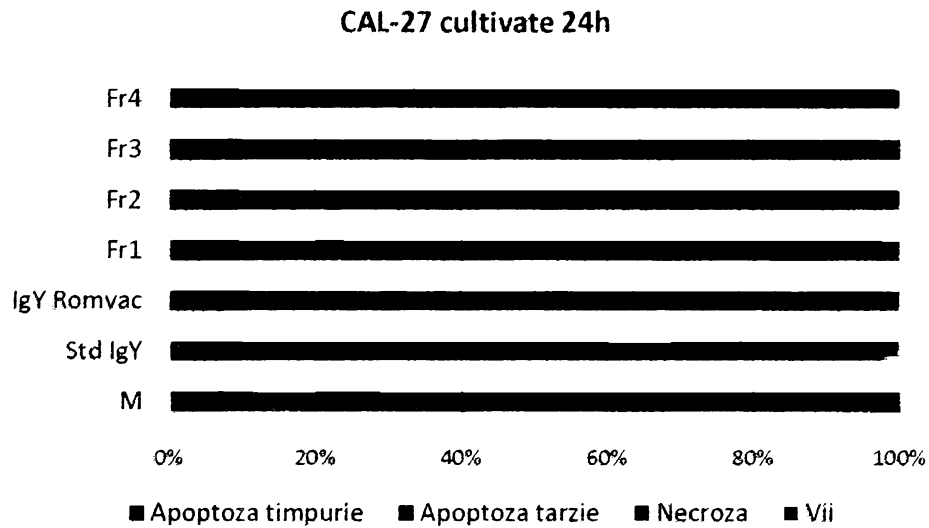
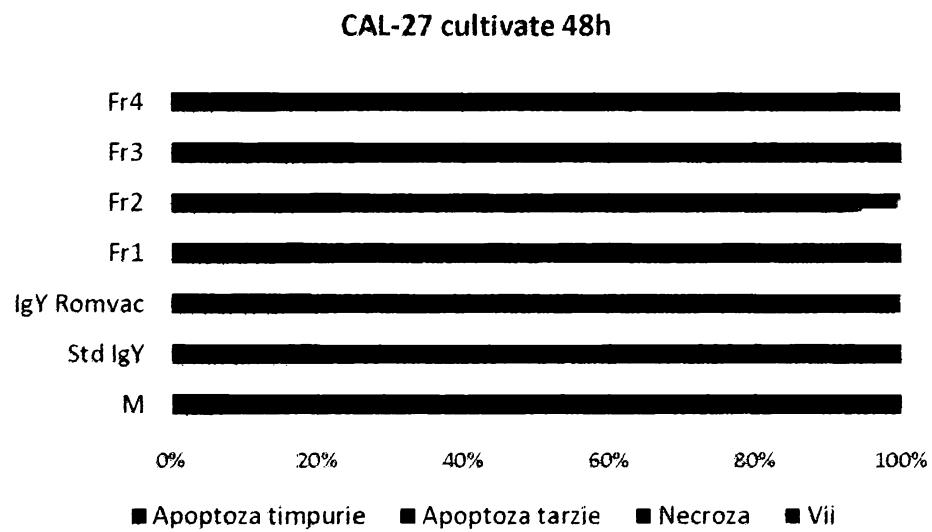
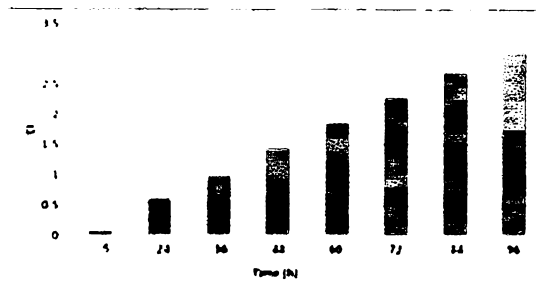


FIGURA 4

**A****B****FIGURA 5**



A

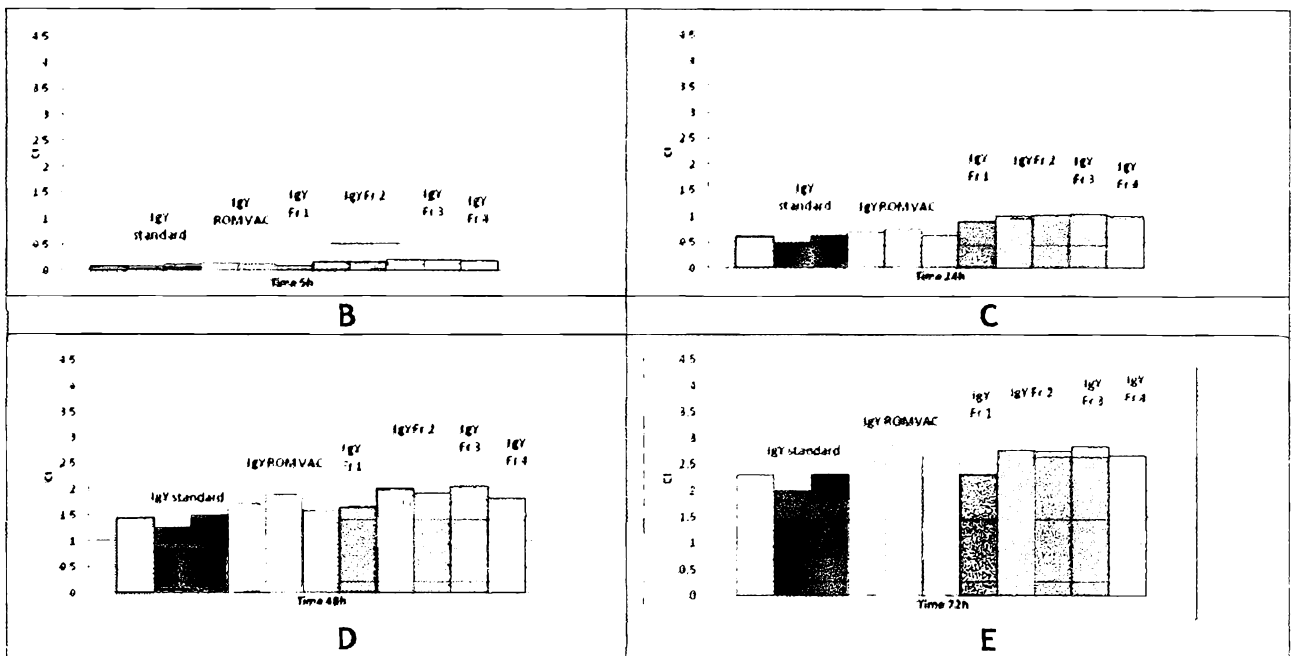


FIGURA 6