

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Medicinální chemie



Natalie Novotná

Výzkum formulace slepičích protilátek pro terapeutické aplikace
Study of chicken antibody formulations for therapeutic use

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí závěrečné práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis:

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli panu prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení mé bakalářské práce a ochotu, cenné rady, trpělivost a za věnovaný čas. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Vojtěchu Klimšovi za ochotu a přípravu preparátů. Paní laborantce Anně Ammerové jsem vděčná za vstřícnost, užitečné rady a pomoc během provádění experimentální části bakalářské práce.

Abstrakt

Protilátky izolované z vaječných žloutků slepic představují vhodný nástroj použitelný v prevenci proti bakteriálním, virovým či parazitickým onemocněním jak ve veterinární, tak i humánní medicíně. Další použití mají tyto protilátky v terapii např. při léčbě zánětlivých onemocnění střev a žaludečních vředů nebo jako antidota proti bakteriálním či hadím toxinům. Při jejich používání jako léčebně-preventivního přípravku je nutné navrhnout vhodnou formu pro skladování a následnou aplikaci.

V bakalářské práci byly připraveny protilátky z vaječných žloutků imunizovaných a kontrolních slepic a byly porovnávány tři postupy jejich sušení provedené lyofilizací, metodou „spray drying“ a volným sušením při laboratorních podmínkách.

Nejprve byly sledovány některé fyzikálně-chemické vlastnosti vzorků usušených protilátek kontrolních slepic, jako je rozpustnost a hygroskopicitá. Bylo zjištěno, že usušené protilátky nejsou hygroskopické a jsou poměrně dobře rozpustné, nejpomaleji se rozpouštěly protilátky volně sušené ve formě vláken. Z porovnání UV-spekter roztoků připravených z usušených protilátek vyplynulo, že u těchto preparátů nedošlo k denaturaci protilátek na rozdíl od roztoku protilátek ohřátých při 80 °C po dobu 2 minut. Následně byla metodou ELISA ověřena reaktivita usušených specifických protilátek připravených proti BSA. Z výsledku vyplývá, že bez ohledu na způsob sušení byla aktivita protilátek zachována ve všech připravených vzorcích. Nejšetrnějším sušením je vedle lyofilizace sušení protilátek při laboratorní teplotě.

Klíčová slova: ELISA, sušení IgY, denaturace, slepičí protilátky

Abstrakt

Antibodies isolated from egg yolks of hens represent a useful tool for the prevention of bacterial, viral or parasitic diseases in both veterinary and human medicine. Other uses of these antibodies are in therapy, e.g. in the treatment of inflammatory bowel diseases and gastric ulcers or as antidotes against bacterial or snake toxins. When using them as a therapeutic and preventive preparation, it is necessary to design a suitable form for storage and subsequent application.

In the bachelor thesis, antibodies were prepared from egg yolks of immunized and control hens and three methods of their drying carried out by freeze drying, spray drying and free drying under laboratory conditions were compared.

Firstly, some physicochemical properties of the dried antibody samples from control hens were monitored, such as solubility and hygroscopicity. It was found that the dried antibodies were not hygroscopic and were relatively soluble, while the free-dried antibodies in fibre form were the slowest to dissolve. Comparison of the UV spectra of solutions prepared from dried antibodies showed that these preparations did not denature the antibodies, unlike the solution of antibodies heated at 80 °C for 2 minutes. Subsequently, the reactivity of the dried specific antibodies prepared against BSA was verified using the ELISA method. The results indicate that regardless of the drying method, antibody activity was preserved in all prepared samples. The gentlest drying method, besides lyophilization, is drying the antibodies at laboratory temperature.

Key words: ELISA, IgY drying, denaturation, chicken antibodies

Obsah

1	ÚVOD	9
1.1	IMUNITNÍ SYSTÉM	9
1.1.1	<i>Nespecifická imunita</i>	9
1.1.2	<i>Specifická imunita</i>	9
1.2	IMUNIZACE	14
1.2.1	<i>Aktivní imunizace</i>	14
1.2.2	<i>Pasivní imunizace</i>	15
1.3	LÉKOVÉ FORMY	17
1.3.1	<i>Formulace protilátek pro účely aktivní a pasivní imunizace</i>	19
1.3.2	<i>Formulace slepičích protilátek pro perorální podání</i>	20
1.4	LYOFILIZACE	20
1.5	SPRAY DRYING	21
2	CÍL PRÁCE	23
3	MATERIÁL A METODY	24
3.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	24
3.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE	24
3.3	IMUNIZACE SLEPIC	26
3.4	IZOLACE PROTILÁTEK	27
3.4.1	<i>Opakované srážení izolovaných protilátek</i>	27
3.5	STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ	28
3.6	SUŠENÍ PREPARÁTŮ PROTILÁTEK	28
3.6.1	<i>Sušení rozprašováním</i>	28
3.6.2	<i>Sušení při laboratorní teplotě</i>	29
3.6.3	<i>Sušení lyofilizací</i>	29
3.7	SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ DENATURACE PROTILÁTEK	30
3.7.1	<i>Rozpuštění vzorků protilátek</i>	31
3.8	MĚŘENÍ ROZPUSTNOSTI VZORKŮ PROTILÁTEK	31
3.9	MĚŘENÍ POHLCOVÁNÍ VLHKOSTI	32
3.10	ELISA	32
4	VÝSLEDKY	34
4.1	IZOLACE SLEPIČÍCH PROTILÁTEK IGY	34
4.2	REAKTIVITA IZOLOVANÝCH PROTILÁTEK IGY	35
4.3	PŘIPRAVENÉ VZORKY	36
4.4	SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ DENATURACE PROTILÁTEK	38

4.5	MĚŘENÍ ROZPUSTNOSTI VZORKŮ.....	40
4.6	MĚŘENÍ POHLCOVÁNÍ VLHKOSTI.....	41
4.7	REAKTIVITA PŘIPRAVENÝCH VZORKŮ PROTILÁTEK IGY.....	42
5	DISKUSE	44
6	SOUHRN.....	48
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	49

Seznam zkratek

A_{280}	absorbance při vlnové délce 280 nm
A_{275}	absorbance při vlnové délce 275 nm
A_{258}	absorbance při vlnové délce 258 nm
DC	dendritické buňky
NK buňky	„natural killer cells“
APC	antigen prezentující buňky
kDa	kilodalton, jednotka molekulové hmotnosti
Ig	imunoglobulin
PBS	„phosphate buffer saline“, fosfátem pufovaný solný roztok
ELISA	„Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“

1 Úvod

1.1 Imunitní systém

Imunitní systém zajišťuje společně s endokrinním a nervovým systémem řízení organismu a udržování homeostázy neboli stálosti vnitřního prostředí. Jeho hlavní funkce tkví v obraně proti škodlivým vlivům z vnitřního i vnějšího prostředí a v toleranci a rozpoznávání vlastních tkání. Na zajištění imunitních reakcí se podílejí lymfatické orgány a tkáně, různé druhy buněk, molekul a jejich vzájemné interakce. Imunitní systém je rozdělován na dva typy mechanismů, které mezi sebou úzce spolupracují, na specifický neboli adaptivní a na nespecifický neboli vrozený. Oba typy mechanismů zahrnují buněčné a humorální složky.^{1,2}

1.1.1 Nespecifická imunita

Nespecifická neboli vrozená imunita je evolučně starší a je v odlišné míře přítomna u veškerých mnohobuněčných organismů. S mechanismy nespecifické imunity se jedinec již rodí. Imunitní reakce působí velmi rychle, nezávisí na dřívějším setkání s cizorodým agens (antigenem), jelikož se nevytváří tzv. imunologická paměť. Z tohoto důvodu dochází při opakované expozici proti danému patogenu prakticky k identické imunitní odpovědi. Vrozené obranné mechanismy lze rozdělit na biologické (např. nepatogenní mikroorganismy), chemické (enzymy, kyselé pH moči a žaludku, nenasycené mastné kyseliny v kožním mazu, kyselina mléčná v potu) a mechanické (např. bariéra kůže, pohyb řasinek). Nespecifická imunita čelí patogenům pomocí dvou hlavních strategií, první je vznik zánětu, což je důležitý proces ničící mikroby. Za druhé je důležité zamezit replikaci virů a zahubit virem infikované buňky jinými mechanismy, než je zánět. Vrozená imunita je tvořena dvěma složkami, humorální a buněčnou. Humorální složka zahrnuje interferony, lektiny, komplementový systém a další sérové proteiny akutní fáze (C-reaktivní protein). Buněčná složka je zastoupena dendritickými buňkami (DC), makrofágy, NK buňkami (natural killers) či žírnými buňkami.^{1,2}

1.1.2 Specifická imunita

Specifická neboli adaptivní imunita je evolučně mladší, objevuje se až u obratlovců. Imunitní odpověď adaptivní imunity je pomalejší, pro její rozvoj je zapotřebí několik dnů až týdnů, záleží na počtu setkání např. s patogenem. Na rozdíl od vrozené imunity se specifické imunitní

mechanismy spouštějí až po setkání s antigenem a jsou závislé na aktivitě vrozené imunitní reakce.

Důležitou roli hrají dendritické buňky (DC), které jsou přítomny téměř ve všech tkáních a orgánech. DC pohlcují antigeny a vystavují je na svůj povrch v komplexu pomocí MHC proteinů. Pokud DC pohltní potenciálně patogenní molekulové struktury, tak se DC aktivují a ztrácejí schopnost pohlcování částic. Aktivované DC putují do lymfatických uzlin a sekundárních lymfatických orgánů, stávají se tak antigen prezentujícími buňkami (APC). V příslušných lymfatických uzlinách či orgánech APC prezentují získaný antigen specifickým T a B lymfocytům. Pro aktivaci lymfocytů je zapotřebí kromě rozpoznání antigenu prezentovaného APC také další kostimulační signály. Mechanismy adaptivní imunity mají anticipační a klonální charakter. Tudíž je v těle připraven nadbytek individuálně odlišných T a B lymfocytů ještě před stykem s patogenem. Jednotlivé lymfocyty se vzájemně odlišují detaily struktury vazebných míst na povrchových antigenně specifických receptorech.

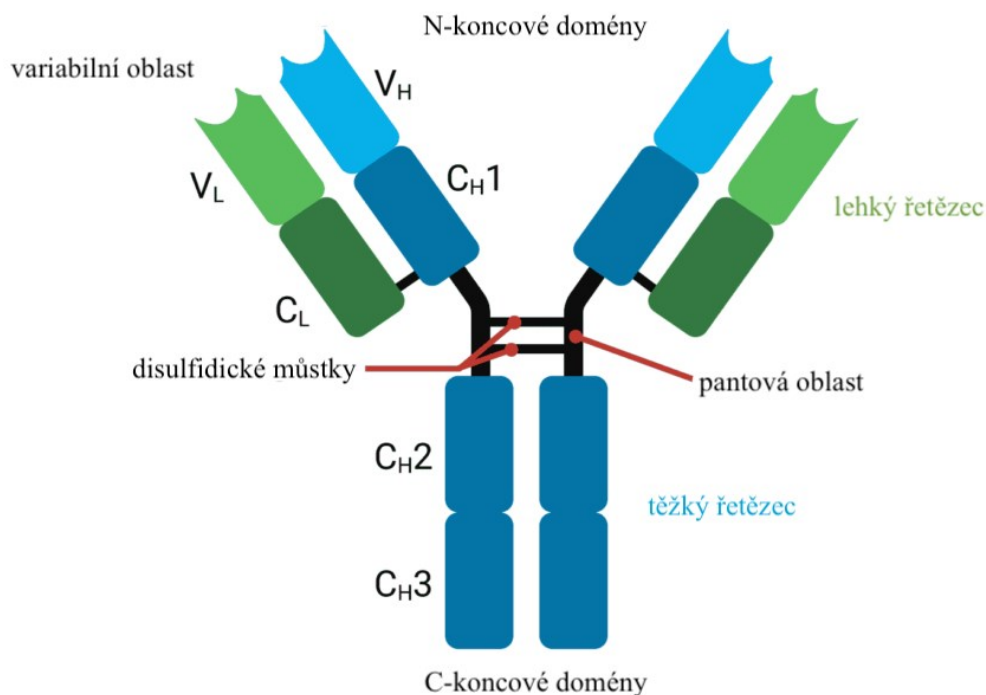
Pro specifickou imunitu je typická tzv. imunitní paměť. Imunitní odpověď po sekundární expozici daného antigenu je pak obvykle výrazně rychlejší a vyvolává vyšší produkci protilátek.

Buněčné mechanismy jsou zastoupeny především T lymfocyty. Humorální mechanismy imunitní odpovědi zprostředkovávají protilátky, které jsou produkovány B lymfocyty a plazmatickými buňkami. Adaptivní imunitu lze získat přirozeně vystavením organismu infekci či uměle pomocí imunizace.¹⁻³

1.1.2.1 Struktura imunoglobulinů

Protilátky neboli imunoglobuliny jsou glykoproteiny, jejichž struktura připomíná písmeno Y. Pro strukturu molekuly imunoglobulinu je charakteristické, že je tvořena ze dvou shodných lehkých (L) a dvou identických těžkých (H) řetězců. Lehké řetězce imunoglobulinů v lidském organismu mohou být tvořeny dvěma typy řetězců λ či κ , které se podstatně liší sekvencí aminokyselin zejména v oblasti konstantní domény. Lidské imunoglobuliny mohou obsahovat pět typů těžkých řetězců – α , γ , δ , ϵ a μ , podle nichž jsou imunoglobuliny děleny do tříd: IgA, IgG, IgD, IgE a IgM. Těžké řetězce jsou vzájemně spojeny kovalentní vazbou realizovanou disulfidickými (cystinovými) můstky. Ke každému z obou těžkých řetězců je kovalentně

připojen jeden lehký řetězec pomocí disulfidického můstku. Těžké řetězce se skládají ze čtyř až pěti strukturně podobných domén (dáno dle imunoglobulinové třídy), přičemž každou doménu tvoří sekvence 110-120 aminokyselin. Jednotlivé domény svojí prostorovou strukturou připomínají soudky, jež jsou vzájemně spojené krátkými úseky polypeptidového řetězce. Lehké řetězce jsou tvořeny pouze dvěma imunoglobulinovými doménami. Molekulová hmotnost těžkých řetězců je přibližně 50-75 kDa v závislosti na třídě řetězce a lehkých řetězců je 25 kDa. Jako variabilní oblast lehkého a těžkého řetězce (V_L a V_H) je nazývána N-koncová část řetězců, která vytváří vazebné místo pro antigen. Strukturní rozdíly variabilní domény udělují imunoglobulinům značnou vazebnou rozmanitost, jež je závislá na klonu B lymfocytu, kterým je imunoglobulin produkován. Ostatní domény jsou označovány jako konstantní (C_L a C_H) dle příslušnosti k lehkému či těžkému řetězci.^{2,4}

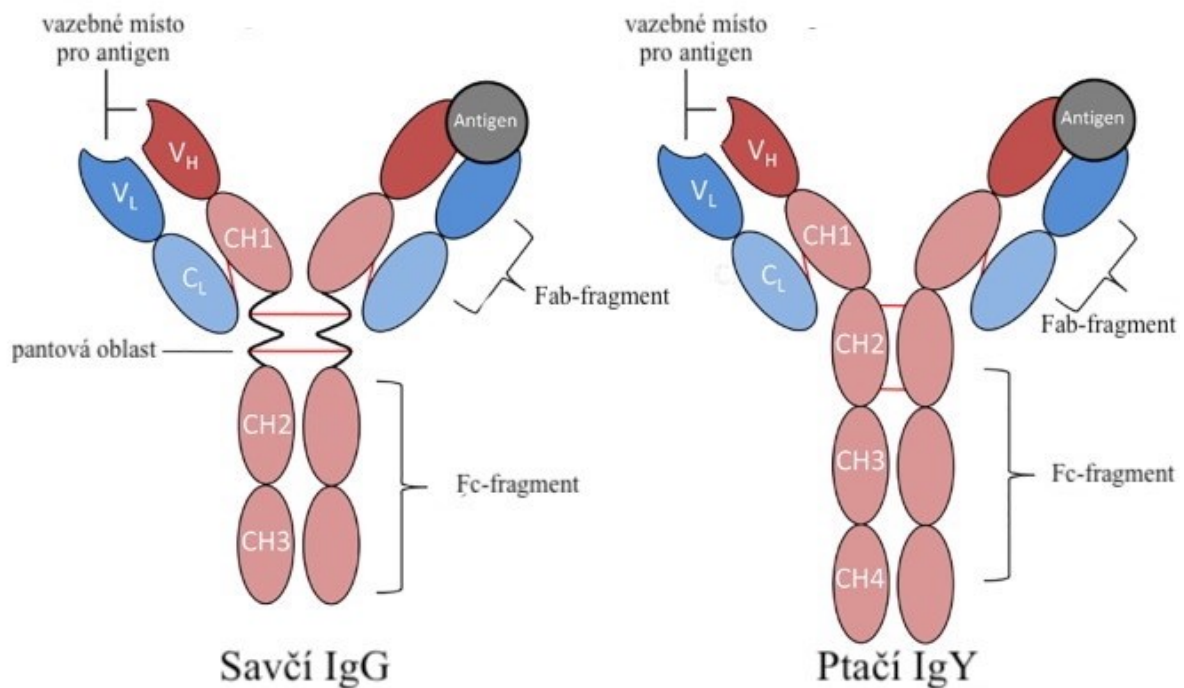


Obrázek 1: Struktura molekuly savčího imunoglobulinu IgG. Molekula se skládá ze dvou lehkých (zelených) a dvou těžkých (modrých) řetězců, jež jsou mezi sebou propojeny pomocí disulfidických můstků. Řetězce obsahují konstantní doménu (C_L - lehký řetězec, C_H - těžký řetězec) a zakončeny jsou variabilní doménou (V_L - lehký řetězec, V_H - těžký řetězec) nesoucí vazebné místo pro antigen. Molekula imunoglobulinu je složena z N-koncových domén odpovídajících Fab-fragmentům a C-koncových domén neboli Fc-fragmentu. Fab-fragменты s Fc-fragmentem jsou propojeny pomocí pantové oblasti. Obrázek byl převzat a upraven.⁵

Molekulu imunoglobulinu lze proteolyticky štěpit na fragmenty označované jako Fc (crystallizable), Fab (antigen binding) či Fv (variable). Fragmenty Fc jsou rozpoznávány Fc receptory fagocytů, nebo na ně mohou být navázány komplementové proteiny C1, jsou tedy zodpovědné za efektorové funkce. Tyto části těžkého řetězce jsou glykosylovány. Fab fragmenty jsou monovalentní, obsahují jen jedno místo pro navázání antigenu. Fv fragment lze odštěpit z Fab fragmentu, je složen pouze z nekovalentně asociovaných N-koncových domén variabilní oblasti lehkého a těžkého řetězce. Pantovou (hinge) oblastí je nazývána část imunoglobulinu, kde jsou těžké řetězce spojeny pomocí disulfidických můstků. Pantová oblast poskytuje Fab fragmentům značnou flexibilitu.²

1.1.2.2 Rozdíly ve struktuře IgY a IgG

U ptáků, plazů a obojživelníků je převládajícím sérovým imunoglobulinem IgY, který je považován za evolučního předchůdce savčích imunoglobulinů IgG a IgE. IgY je sekretován do vaječného žloutku (odtud název IgY – „yolk“). Ptáci v menší míře produkují také imunoglobuliny IgM a IgA, které jsou na rozdíl od IgY koncentrovány ve vaječném bílku. Imunoglobuliny IgY a IgG si jsou velmi podobné vlastnostmi i funkcemi, přestože mezi nimi existují značné strukturní rozdíly. Imunoglobulin IgY obsahuje čtyři konstantní domény těžkého řetězce, IgG obsahuje pouze tři, což souvisí s vyšší molekulovou hmotností IgY. Oproti savčímu imunoglobulinu IgG mají IgY nižší izoelektrický bod a jsou hydrofobnější. Další odlišností je absence pantové oblasti u IgY. Z tohoto důvodu je flexibilita obou ramen Fab fragmentů značně limitovaná. Výhodou méně flexibilního řetězce IgY je vyšší odolnost imunoglobulinu vůči proteolytické degradaci a fragmentaci. Pantová oblast u IgG umožňuje ohyb ramen v rozsahu 60 – 180°, a tím stericky usnadňuje navázání antigenu do vazebných epitopů obou ramen.^{4,6}



Obrázek 2: Porovnání struktury molekul savčího IgG a ptačího IgY imunoglobulinu. Molekuly se skládají ze dvou lehkých (modrých) a dvou těžkých (červených) řetězců, jenž jsou mezi sebou propojeny pomocí disulfidických můstků. Řetězce obsahují konstantní doménu (C_L- lehký řetězec, C_H- těžký řetězec) a jsou zakončeny variabilní doménou (V_L- lehký řetězec, V_H- těžký řetězec) nesoucí vazebné místo pro antigen. Molekula imunoglobulinu je složena z N-koncových domén odpovídajících Fab-fragmentům a C-koncových domén neboli Fc-fragmentu. Fab-fragменты s Fc-fragmentem jsou u savčího imunoglobulinu IgG propojeny pomocí pantové oblasti, u molekuly ptačího imunoglobulinu IgY pantová oblast není vytvořena. Obrázek byl převzat a upraven. ⁷

1.1.2.3 Výhody použití IgY

Protilátky jsou získávány z vaječného žloutku neinvazivní metodou, která nevystavuje zvířata stresu, jak je tomu při imunizaci savců. Také je tato metoda ekonomicky výhodná. Slepice postupně vyprodukuje množství protilátek srovnatelné s většími savci, jako jsou například kozy či ovce. Chov slepic je v porovnání s těmito zvířaty výrazně levnější. Slepice snese za jeden rok v průměru 300 vajec, což odpovídá 20 až 40 g protilátek IgY, z čehož 2 až 10 % obsažených IgY jsou antigenně specifické protilátky na antigen použitý pro imunizaci. Množství vyprodukovaných protilátek je závislé na množství aplikovaného antigenu, na jeho molekulové hmotnosti a imunogenicitě.⁸⁻¹¹ Díky skutečnosti, že vaječný žloutek obsahuje pouze imunoglobulin IgY,¹² lze ho izolovat ze směsi ostatních žloutkových proteinů ekonomicky nenáročnou a snadnou metodou.¹⁰

Molekula IgY vykazuje značnou odolnost vůči teplu a změnám pH. Imunoglobulin Y je aktivní v rozsahu hodnot pH 3,5 – 11. Stabilitu si zachovává až do teploty 70 °C. Pro ochránění molekuly před tepelnou denaturací může být přidána maltosa, sacharosa či glycin.⁸

Žloutkové imunoglobuliny IgY lze dlouhodobě skladovat bez významné ztráty aktivity při 4°C po dobu 5 až 10 let, další variantou je dlouhodobé uchovávání při teplotě -20 °C. Při skladování imunoglobulinů při -70 °C může být aktivita snížena až o 50 %.⁹ V roztoku lze IgY skladovat s přídavkem konzervantu jako např. trimerosalu o koncentraci 0,03 % (w/v), azidu sodného o koncentraci 0,02 % (w/v) nebo gentamicinu o koncentraci 50 µg/ml.¹³

1.2 Imunizace

Imunizace je proces umělého navození imunity proti infekčním nemocem. Existují dva typy imunizace – aktivní a pasivní. Aktivní imunizace stimuluje organismus k produkci protilátek a k zprostředkování dalších imunitních odpovědí podáním vhodného antigenu, vakcíny. Pasivní imunizace poskytuje okamžitou ale krátkodobou imunitu podáváním hotových lidských nebo zvířecích protilátek.¹⁴

1.2.1 Aktivní imunizace

Aktivní imunizace neboli vakcinace vyvolává imunitní reakci vystavením organismu antigenu virového či mikrobiálního původu. Zakladatelem vakcinace byl anglický lékař Edward Jenner, který koncem 18. století využil k prevenci neštovic živý virus kravských neštovic neboli *Vaccinia*. Infekce virem *Vaccinia* vyvolala pouze mírné onemocnění a udělila ochranu i proti příbuznému viru pravých neštovic. Jenner vypožadoval, že dojičky krav, které prodělaly kravské neštovice, se již nenakazily závažnějšími pravými neštovicemi. Na základě tohoto pozorování naočkoval 8letého chlapce hnisem z vřídka kravských neštovic od nakažené dojičky. Následně byl chlapec úmyslně infikován virem pravých neštovic, ale neprojevil se u něho žádné symptomy. Principy očkování a infekčních nemocí byly pevně stanoveny až o sto let později prací Louise Pasteura a Roberta Kocha.¹⁵

Imunitní odpověď navozuje vytvoření specifických plazmatických buněk a paměťových B-lymfocytů, aniž by se nemoc rozvinula. Vyvolaná imunitní reakce zajišťuje jedinci ochranu při příštím setkání se stejným antigenem. Vakcíny mohou být připraveny z mikroorganismů

nebo pouze z jejich antigenních složek. Existují různé typy vakcín jako např. atenuované, které jsou připraveny z živých oslabených mikroorganismů a dále inaktivované, jež obsahují usmrcené mikroorganismy. Dalším typem jsou podjednotkové vakcíny obsahující pouze izolované složky mikroorganismů. Připravit očkovací látku lze také pomocí chemicky modifikovaných, inaktivovaných mikrobiálních toxinů neboli toxoidů. Do očkovacích látek jsou přidávány látky zlepšující imunitní odpověď neboli adjuvancia a látky stabilizující vakcíny tedy stabilizátory a konzervanty. Adjuvancia jsou do očkovacích látek přidávány pro usnadnění pohlcení antigenu APC (antigen prezentujícími buňkami). Nejčastěji používaným adjuvanciem je hydroxid hlinitý.^{2,16}

Poměrně novým typem vakcín jsou mRNA vakcíny. Mediátorová RNA nese informaci pro syntézu proteinu (antigenu) patogenního mikroorganismu či nádorové buňky, proti kterému má být vytvořena imunitní odpověď. Oproti výše jmenovaným typům vakcín mají mRNA vakcíny řadu výhod. Jsou bezpečnější, nehrozí u nich riziko rozvinutí nemoci. Degradace mRNA probíhá přirozenými buněčnými procesy, její poločas lze regulovat různými modifikacemi. Molekula mRNA je upravena tak, aby se co nejvíce podobala mRNA, které se vyskytují přirozeně v cytoplasmě eukaryotických buněk. Vakcíny mohou být podávány opakovaně, jelikož je mRNA minimální genetický vektor, a tudíž nehrozí nechtěná imunitní odpověď. Další výhodou je poměrně rychlá a nenákladná výroba. Tyto vakcíny lze využít k prevenci vzniku infekčních onemocnění i proti některým typům rakoviny.^{17,18}

1.2.2 Pasivní imunizace

Pasivní imunizace probíhá přirozeně již v prenatálním období, kdy dochází k přenosu mateřských protilátek do organismu vyvíjejícího se plodu přes placentu. Další protilátky savčí potomek získává po narození požitím mléka, které je bohaté na imunoglobuliny. Pasivní imunizace je nezbytná pro rozvoj imunitního systému mláďat. Terapeutický způsob pasivní imunizace je založen na přenosu hotových protilátek z jednoho jedince na druhého, čímž lze předcházet nebo léčit některá onemocnění tím, že poskytuje okamžitou, krátkodobou ochranu. Výhodou pasivní imunizace oproti vakcinaci je, že není závislá na imunitním stavu příjemce. K imunizaci lze využít zvířecí i lidské imunoglobuliny. Zvířecí protilátky jsou využívány například proti různým toxinům jako jsou bakteriální toxiny či hadí jed. Při opakovaném podání hrozí vznik sérové nemoci či anafylaktických reakcí. Lidské protilátky bývají využívány pro ochranu jedinců ohrožených závažnými infekcemi, jako je tetanus nebo vztekлина.^{16,19,20}

Po podání komplexního antigenu jsou organismem produkovány polyklonální protilátky, jenž mají různou specifitu, a proto reagují s mnohými epitopy určitého antigenu. Každá specifická protilátka je produkována vlastní linií plazmatických buněk. Naopak monoklonální protilátky jsou produkovány pouze jedním klonem plazmatických buněk, tudíž jsou jednoho izotypu a mají jednu shodnou specifitu. Monoklonální protilátky lze připravit fúzí B-lymfocytu, který produkuje protilátky žádané specifity s vhodnou myelomovou linií. Takto je připravena hybridní immortalizovaná buňka nazývaná hybridom. Jelikož monoklonální protilátky zvířecího původu mohou vyvolat imunitní odpověď, tak lze připravit chimerické či humanizované monoklonální protilátky. Chimerické monoklonální protilátky se skládají z hlodavčích variabilních domén a z lidských konstantních domén. Humanizované monoklonální protilátky mají pouze krátké hlodavčí úseky, zbytek molekuly je nahrazen strukturami z lidského imunoglobulinu. Připravit lze i zcela lidské monoklonální protilátky. Funkce monoklonálních protilátek může být omezena, pokud dojde k malé změně ve struktuře epitopu např. důsledkem glykosylace či genetického polymorfismu.^{2,19,21}

1.2.2.1 Terapeutické využití IgY pro pasivní imunizaci

Použití polyklonální IgY proti infekčním onemocněním minimalizuje riziko mikrobiální rezistence, protože je protilátka namířena proti různým antigenům stejného mikroorganismu, což vyžaduje pro svou syntézu více genů.²²

Imunoglobuliny nejsou syntetickými léčivými, jelikož jsou přirozeně produkovány v organismu zvířat. Slepíčí vejce jsou přirozenou součástí lidské stravy, a proto je IgY lidským organismem dobře snášen a nevyvolává nežádoucí účinky. IgY lze podávat i lidem s alergií na vejce, jelikož purifikovaný IgY neobsahuje vaječný albumin, který je nejčastěji spouštěčem alergické reakce.⁹

Žloutkový imunoglobulin může na patogen působit aglutinací, opsonizací nebo neutralizací. Aglutinace je reakce, při které protilátky svou vazbou shlukují antigeny, což může vést až k jejich srážení. Protilátky se mohou navázat (opsonizovat) na antigenní částici či mikroorganismus, a tím umožní jejich pohlcení fagocytickými buňkami a aktivaci jejich destrukčních mechanismů. Při neutralizaci se protilátky navážou na kritické epitopy mikroorganismů, toxinů nebo virů, čímž blokují jejich toxické působení. Výhodou IgY je, že

Fc část není schopna aktivovat lidský komplement a ani se neváže na Fc receptor, což nenavozuje rozvoj zánětu.^{2,9}

Vysoké množství kyseliny sialové obsažené v molekule IgY významně prodlužuje poločas jejich rozpadu v porovnání s jinými glykoproteiny, u nichž je obsah kyseliny sialové nižší. Toto zjištění vypovídá o tom, že léčiva založená na IgY by mohla v těle déle cirkulovat, tím by se mohla zvýšit účinnost proti infekcím.⁹ Oproti tomu „clearance“ může být zvýšena vysokým obsahem manosy v glykanech na Fc fragmentu imunoglobulinu, což bylo sledováno při terapeutickém podání IgG v lidském séru.²³

1.3 Lékové formy

Léková forma je společně se způsobem přípravy terapeutického přípravku a způsobem jeho podání důležitým aspektem pro terapeutickou účinnost, která nezávisí pouze na samotné účinné látce. Uvedenými faktory lze ovlivnit nástup a trvání léčebného účinku, biologickou dostupnost a rychlost uvolňování účinné látky z lékové formy do krevního oběhu a dobu, po kterou se koncentrace léčiva v krevním oběhu zachovává v terapeutickém rozmezí. Ideální léková forma léčivého přípravku by měla splňovat následující podmínky:

- snadné podání
- uvolnění největšího možného množství účinné látky či jejího prekurzoru
- rychlost uvolňování v souladu s farmakokinetickými vlastnostmi léčiva, jeho koncentrace v krevním oběhu či cílovém orgánu zachována po požadovanou dobu v terapeutickém rozmezí
- rychlost uvolňování, absorpce a eliminace léčiva co nejméně závislá na fyziologických proměnných
- bez nežádoucích účinků
- lepší stabilita terapeutického přípravku oproti stabilitě účinné látky
- snadná a dobře reprodukovatelná výroba s rovnoměrným složením
- zamezení kontaminace cizorodými látkami a patogenními mikroorganismy

Lékové formy lze rozdělit na dvě základní – kapalné a pevné. Kapalné přípravky lze dělit na roztoky, emulze, suspenze, extrakty, sirupy, spreje a další. Přípravovány jsou rozpouštěním, emulgováním či suspendováním účinné látky ve vodě, minerálních olejích, alkoholu nebo

vodných roztocích s pomocnými látkami jako jsou pufrы, konzervační látky, barviva, povrchově aktivní látky či látky upravující chuť. Rozpustnost některých málo rozpustných léčiv lze zlepšit snížením velikostí částic, tvorbou komplexů, přidáním pomocných rozpouštědel, chemickou modifikací či změnou pH. S kapalnou formulací je spjata i řada nevýhod. Oproti přípravkům v suché formě bývají kapalné přípravky objemnější, vyžadují opatrné zacházení a mají specifické podmínky pro uchovávání. V kapalné formě bývá léčivo náchylnější k růstu mikroorganismů, také snáze podléhá reakcím s pomocnými látkami a degradaci. Problém také může nastat s přesností dávkování. Mezi pevné lékové formy lze řadit tablety, tobolky, pastilky a další. Při přípravě tablet jsou k účinné látce přidávány plniva a pojiva, která vyplňují objem a zajišťují vzájemnou adhezi částic. Naopak pro zajištění rozpadu pevně slisovaných tablet jsou přidávána rozvolňovadla. Složením tobolek lze řídit jejich rozpustnost dle hodnoty pH, a tím ovlivnit ve které části trávicí dutiny dojde k jejímu rozpuštění a absorpci léčiva. Složení tobolky bývá z želatiny a plastifikátoru, její tvrdost lze ovlivnit působením formaldehydu tak, že může odolávat kyselému pH v žaludku. Pevné lékové formy jsou oproti kapalným formulacím stabilnější a obvykle nevyžadují speciální nároky na skladování. Některé léky mohou být hygroskopické, čímž může být ovlivněna jejich stabilita. Obtíže u některých jedinců může činit polykání tablet či jejich chutnost při perorálním podání.^{24,25}

Léčiva mohou být podána lokálně či celkově. Při lokálním podání je nežádoucí průnik léčiva do systémové cirkulace. Obvykle se aplikují na kůži, sliznice či tělních dutin. Naopak při celkové léčbě je žádoucí, aby se do krevního oběhu dostala účinná látka. Celá dávka léčiva do krevního oběhu pronikne při intravaskulárním podání. Pouze část dávky pronikne do krevního oběhu při extravaskulárním podání, protože se léčivo musí rozpustit a v místě absorpce musí překonávat biomembrány. Dále lze lékové formy rozdělit dle cesty podání na enterální, jejichž absorpce probíhá v různých částech trávicí soustavy a parenterální mezi, než se řadí ostatní cesty podání.^{26,27}

Pro získání požadované lékové formy se k účinné látce přidávají různé pomocné látky neboli excipienty, které zlepšují fyzikální a chemické vlastnosti přípravku. Ke každé účinné látce musí být vybrány kompatibilní excipienty tak, aby nepřispívaly k jejímu rozkladu. Naopak by měly zvyšovat stálost přípravku při skladování i při jeho podání. Pomocné látky mohou být dle své funkce v terapeutickém přípravku rozděleny na stabilizující, ovlivňující biologickou dostupnost, konstitutivní a upravující smyslové vjemy. Některé excipienty mohou plnit více funkcí zároveň. V přípravku převažují konstitutivní látky neboli vehikula, které tvoří základ

přípravků a udělují jim jejich charakter. Stabilizující látky mohou mít fyzikální i chemický stabilizující efekt. Povrchově aktivní látky a látky zvyšující viskozitu jsou využívány ke stabilizaci disperzního stavu lékových forem. Před katalytickým rozkladem, oxidací či mikrobiální kontaminací chrání léčivo chemické stabilizátory. Pomocné látky ovlivňující biologickou dostupnost jsou využívány v topických a pevných přípravcích. Jako látky upravující smyslové vjemy lze využít barviva a látky upravující pach a chuť.²⁸

1.3.1 Formulace protilátek pro účely aktivní a pasivní imunizace

Protilátky jsou stabilnější oproti jiným proteinům, přesto se při jejich formulaci pro terapeutické účely musí předejít degradačním procesům, které lze rozdělit na fyzikální, chemické a biologické. Změna fyzikálních vlastností se může projevit agregací a denaturací protilátky. Hlavní chemické degradační dráhy imunoglobulinů jsou deaminace, oxidace, fragmentace, izomerace či zesíťování. K degradačním procesům může dojít nejen při přípravě přípravku, ale i během jeho skladování. Proto je důležité dbát i na vhodné složení materiálů, ve kterých je přípravek uchováván. Náchylnost protilátky k degradačním procesům závisí na její individuální sekvenci, izoelektrickém bodě, obsaženém množství sacharidů či hydrofobnosti.²⁹⁻³¹

Pro snížení náchylnosti protilátky vůči degradaci jsou do přípravků přidávány pomocné látky za účelem stabilizace molekuly imunoglobulinu, a tím i zachování její aktivity.³² Ideálně by měl být přípravek stabilní při přepravě a nenáročně skladovatelný. Typická formulace terapeutického přípravku obsahuje vedle protilátky, pufr, sufraktant a pomocnou látku pro úpravu osmolality či tonicity nebo lyoprotektant v případě lyofilizovaných přípravků. Způsob podání je obvykle subkutánní či intravenózní.^{30,31}

Kapalná dávková forma bývá obvykle výhodnější oproti lyofilizovaným produktům, díky snazšímu podávání a méně nákladné výrobě. Kapalně formy přípravků bývají zpravidla velmi koncentrované, což může způsobovat agregaci protilátek během skladování a vysoká viskozita může komplikovat injekční podání přípravku.³³ Snížení viskozity přípravku může být provedeno přidáním NaCl či úpravou pH, které obvykle bývá slabě kyselé či neutrální. Vyšší koncentrace protilátky zajišťuje stabilitu během zamrazování a rozmrazování roztoku. Často jsou k roztokům také přidávány sacharidy jako je sacharosa či trehalosa, jenž většinou působí pozitivně pro zachování fyzikálních vlastností protilátek a zamezují tak jejich agregaci. Agregaci protilátek může způsobit například třepání.³¹

Lyofilizované pevné formy protilátek jsou obvykle připraveny v případě, kdy protilátky v kapalné formě nejsou dostatečně stabilní. Při výrobě lyofilizované formy se k roztoku protilátky přidává pomocná látka – plnidlo, které zvyšuje objem připraveného produktu. Mezi nejčastěji používaná plnidla se řadí mannitol a glycin, jenž jsou ale špatnými stabilizátory. Bylo dokonce zjištěno, že přidání vyššího množství mannitolu než je 20 mg na 1 mg lidské monoklonální protilátky může urychlit agregaci během lyofilizace.³⁴ Pro zachování stability se opět často využívají neredukující sacharidy. Lyofilizované produkty musí být chráněny před vlhkostí, neboť zvyšuje rychlost degradace během skladování.³¹

Další možností přípravy pevných dávkových forem je sušení protilátek pomocí metody „spray drying“ neboli sušení rozprašováním. Hlavním problémem při této metodě může být vystavení protilátky vysokým teplotám, i když pouze na velmi krátkou dobu. Následkem může dojít k agregaci proteinů. Pro stabilizaci lze přidat pomocné látky trehalosu, laktosu či sorbitol, které agregaci eliminují.^{30,31}

1.3.2 Formulace slepičích protilátek pro perorální podání

Slepičí protilátky mají velký potenciál při navrhování terapeutických a profylaktických přípravků proti gastrointestinálním onemocněním. Ačkoli jsou protilátky IgY poměrně stabilní oproti ostatním proteinům, tak hrozí jejich poškození vlivem nízkého pH žaludečních šťáv a působením trávicích enzymů včetně trypsinu, chymotrypsinu a pepsinu. Poškozené molekuly IgY mohou ztratit svou biologickou aktivitu, ovšem je známa i studie, která ukazuje, že si degradované Fab-fragments mohou zachovat část své neutralizační schopnosti.³⁵ Protilátky lze před nepříznivým prostředím ochránit různými metodami. Některými ze zkoumaných metod je jejich zapouzdření do chitosan-aglinátových kapslí, liposomů či příprava polyakrylamidových hydrogelů, jenž slouží jako nosiče. Chitosan je často využíván jako potahový materiál kapslí, protože snižuje jejich bobtnání, zlepšuje stabilitu.^{36–38}

1.4 Lyofilizace

Lyofilizace je proces sušení materiálů za sníženého tlaku a teploty, při kterém dochází k sublimaci téměř veškerých kapalných složek ze vzorku. Je hojně využívaná pro stabilizaci potravin, biologických materiálů a léčiv jako jsou např. vakcíny, proteiny, bakterie nebo savčí

buňky. Následkem odstranění kapalných složek ze vzorků pomocí sublimace je vytvoření vysoce porézní struktury lyofilizovaných produktů. Vzhledem k odstranění téměř veškerých kapalných složek je vzorek rezistentní proti růstu mikroorganismů či proti chemickému rozkladu. Pokud jsou zvolené optimální podmínky lyofilizace, lyofilizované materiály se nepoškodí a přidáním odpovídajícího množství vhodného rozpouštědla získávají původní morfologii a biologickou aktivitu. Jedním z benefitů lyofilizace je přítomnost vakua, které minimalizuje účinky oxidace materiálů senzitivních na působení vzdušného kyslíku. Další výhodou je nízká teplota během sušení, která přispívá k potlačení termo-degradačních procesů v lyofilizátu.³⁹⁻⁴¹

Lyofilizace probíhá ve třech či čtyřech po sobě jdoucích krocích – úprava vzorku před lyofilizací, zmrazení, primární sušení a sekundární sušení. Před samotným procesem sušení jsou ke vzorkům často přidávány další přídavné látky, které pomáhají zachovávat stabilitu, vzhled či mají další prospěšné vlastnosti. Ve fázi zamrazování se vzorek ochladí pod trojný bod vody, čímž se zajistí, že v následujících krocích bude docházet spíše k sublimaci nežli tání. Tato fáze je v procesu lyofilizace nejkritičtější k poškození vnitřní struktury materiálu, jelikož vznikají krystaly ledu tvořící síť. Během fáze primárního sušení je snížen tlak, do materiálu je dodán dostatek tepla, aby led začal sublimovat. Tato fáze trvá nejdéle. Cílem sekundární fáze sušení je odstranění nezmrzlých molekul vody navázaných v krystalové struktuře. Obvykle se zvýší teplota oproti předchozí fázi a sníží se tlak, aby se podpořila desorpce.⁴²

1.5 Spray drying

Metodou „spray drying“ neboli sprejovým sušením lze připravit suchý prášek z roztoků či suspenzí využitím horkého vzduchu. Tato metoda bývá využívána u tepelně labilních materiálů. Sprejovým sušením je možné ovlivnit velikost a tvar částic či chuť produktu. Velikost částic lze ovlivnit koncentrací roztoku, typem použité sprejové sušárny nebo průměrem rozprašovací trysky.⁴³

Po rozpuštění či resuspendování dané látky je roztok veden do sušárny, kde je za vysoké teploty rozprašován do sušicí komory pomocí speciální trysky. Sušení probíhá v proudu inertního plynu či vzduchu velice rychle, více než 95 % vody se odpaří během několika sekund. Důležité je optimalizovat všechna nastavení sušárny, aby se zabránilo slepení částic a aby se

předešlo navlhnutí konečného produktu, jenž je shromažďován ve sběrné nádobě sušárny. K separování preparátu ochlazením vzduchu je často využíván cyklon.^{44,45}

Mezi klíčové parametry sprejového sušení patří vstupní a výstupní teplota. Vysoká vstupní teplota může poškodit fyzikálně-chemické vlastnosti produktu, zatímco výstupní teplota ovlivňuje konečnou vlhkost prášku a nemůže být přímo řízena. Důležité jsou také vlastnosti roztoku či suspenze, jako je viskozita, povrchové napětí, rychlost nástřiku a průměr trysky.^{44,45}

Připravené produkty mívají dobré smáčecí vlastnosti a rychle se rozpouštějí při kontaktu s kapalinou. Díky tomu jsou ideální pro farmaceutické aplikace, jako je cílený transport léčiv, řízené uvolňování léčiv či jako nosiče léčiv v aerosolových přípravcích.^{44,45}

2 Cíl práce

Hlavním cílem bakalářské práce bylo nalézt vhodnou metodu sušení slepičích protilátek IgY pro případné terapeutické použití. Pro splnění uvedeného cíle bylo potřebné realizovat následující dílčí úlohy:

- z vaječných žloutků imunizovaných slepic izolovat protilátky IgY
- různými metodami vysušit vzorky slepičích protilátek
- studovat vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti připravených vzorků usušených slepičích protilátek
- ověřit reaktivitu slepičích protilátek v připravených vzorcích

3 Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie

- lyofilizovaný řídký bílek (poskytnuto prof. RNDr. Petrem Hodkem, CSc.)

Lachner (Česká republika)

- kyselina chlorovodíková, chlorid sodný, hydroxid sodný, uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný, dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného, dihydrát dihydrogenuhličitanu sodného, dihydrogenuhličitan draselný, chlorid hořečnatý

Roth (Německo)

- hovězí sérový albumin

Serva (Německo)

- Tween 20

Sigma (USA)

- konjugát králičí IgG proti slepičím IgY s navázanou alkalickou fosfátasou
- p-nitrofenylfosfát

3.2 Použité přístroje

Analytické váhy:

- OHAUS Discovery (USA)
- 40SM-200A, PESA (Švýcarsko)

Automatické pipety:

- Eppendorf Reference (Německo)
- Eppendorf Reference 2 (Německo)
- Eppendorf Research Plus (Německo)

Centrifugy:

- Eppendorf Centrifuge 5418 (USA)
- HERMLE LaborTechnik Z 206 A (Německo)

Inkubátor:

- Inc. IB-01E, Jeio Tech Co. (USA)

Lyofilizátor:

- Lyovac GT 2E, Finn-Aqua (Finsko)

Magnetické míchačky:

- RH basic 2, IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG (Německo)

Mikrotitrační destička:

- F16 PolySorb Unfra, Nunc – Immuno Modules (Dánsko)

pH metr:

- HI 2211, HANNA Instruments (USA)

Předvážky:

- Kern 440-35A (Německo)
- Kern EMS (Německo)

Spektrofotometry:

- Spektromom 195 D (Maďarsko)
- Sunrise Absorbance Reader, Tecan (Švýcarsko)
- Specord 250 plus, Analytik Jena (Německo)

Třepačka:

- Yellow Line OS 2 basic, IKA (Německo)

Teploměr a vlhkoměr

- Eclipsera (Česká republika)

Vortex:

- Ika genius 3 (Německo)

3.3 Imunizace slepic

Imunizované byly dvě slepice kura domácího označené PT-C a PT-K. Imunitní dávka obsahovala 100 µg BSA. Aplikace byla provedena subkutánně do křidelní blány či křídla tak, aby nedošlo k poškození svalů. Každá slepice byla imunizována třikrát viz Tabulka 1.

Tabulka 1: Přehled imunizací slepic PT-C a PT-K.

Slepice	1. imunizace	2. imunizace	3. imunizace
PT-C	11. 10. 2023	20. 10. 2023	03. 11. 2023
PT-K	19. 12. 2023	26. 12. 2023	02. 01. 2024

Preimunní (nespecifická, kontrolní) frakce byla připravena z vajec nasbíraných před imunizací slepic či v co nejkratším časovém období po podání první dávky. Pro získání specifických protilátek byla zpracována vejce po imunizaci viz Tabulka 2.

Tabulka 2: Přehled sběru vajec od slepic PT-C a PT-K pro jednotlivé frakce.

Frakce	Sběr vajec	Počet vajec
PT-C N	5. 10. - 11. 10. 2023	5
PT-C S	18. 10. - 3. 11. 2023	6
PT-K N	21. 12. - 23. 12. 2023	3
PT-K S1	25. 12. - 29. 12. 2023	4
PT-K S2	2. 1. - 8. 1. 2024	6
PT-K S3	9. 1. - 20. 1. 2024	9

N = kontrolní frakce nespecifických protilátek od slepic PT-C a PT-K, S = frakce specifických protilátek od slepic PT-C a PT-K, čísla udávají pořadí v sekvenci přípravy frakcí.

3.4 Izolace protilátek

Izolace slepičích protilátek IgY byla provedena podle publikovaného protokolu prof. RNDr. Petra Hodka, CSc.¹⁰

Použité roztoky:

- PBS s azidem (z angl. „Phosphate buffered saline“): 0,1 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 0,1% (w/v) NaN₃; pH 7,2

Jednotlivé frakce protilátek byly izolovány ze 3–9 vajec. Žloutky vajec byly separovány od bílků a důkladně opláchnuty pod tekoucí vodou. Následně byl změřen objem žloutků pomocí polyethylenového odměrného válce. Spojené žloutky byly v polyethylenové nádobě 8krát naředěny vodou z vodovodního řadu. Směs byla homogenizována na magnetické míchače a její pH bylo pomocí 0,5M HCl upraveno na hodnotu 5,0. Takto připravená směs byla v nerezové kónické nádobě zamrazena při teplotě -20 °C po dobu 24–72 hodin.

Následně byl zamražený kónus homogenátu v průběhu rozmrazování filtrován přes filtrační papír do skleněné kádinky.

K filtrátu byl za stálého míchání přidán NaCl do výsledné koncentrace 8,76 % (w/v) a po jeho rozpuštění bylo pH roztoku upraveno pomocí 0,5M HCl na hodnotu 4,0. Dále byl roztok půl hodiny míchán na magnetické míchače a následně byl ponechán 2 hodiny stát, aby došlo k precipitaci proteinu IgY. Sraženina byla oddělena centrifugací (20 minut, 5 000 RPM, výkyvný rotor 4 x 250 ml, 4 °C) na centrifuze HERMLE LaborTechnik Z 383 K. Supernatant byl odstraněn a precipitát rozpuštěn v pufru PBS s azidem a pH roztoku bylo upraveno pomocí 1M NaOH na hodnotu v rozmezí 6,5–7,5. Získaný preparát IgY byl uschován při 4 °C.

3.4.1 Opakované srážení izolovaných protilátek

Pro další způsoby zpracování byla z roztoku izolovaných protilátek připravena sraženina následujícím postupem. Roztok izolovaných protilátek o koncentraci 50 mg/ml byl 8krát ředěn vodou z vodovodního řadu, poté byl přidán NaCl do výsledné koncentrace 8,76 % (w/v). Po jeho rozpuštění bylo pH roztoku upraveno pomocí 0,5M HCl na hodnotu 4,0. Roztok byl půl hodiny míchán na magnetické míchače, a následně byl ponechán 2 hodiny stát, aby došlo

k precipitaci proteinů. Poté byl roztok přelit do kyvety, ve které byl umístěn mikrotenový sáček. Sraženina byla oddělena centrifugací (20 minut, 5 000 RPM, výkyvný rotor 4 x 250 ml, 4 °C) na centrifuze HERMLE LaborTechnik Z 383 K. Supernatant byl slit a získaný sediment byl společně s mikrotenovým sáčkem vyjmut z kyvety.

3.5 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace roztoku izolovaných protilátek byla stanovena na základě změřené absorbance roztoku při vlnové délce 280 nm.¹⁰

Roztok protilátek byl nejprve centrifugován na centrifuze Eppendorf Centrifuge 5418 (3 minuty, 13 500 RPM, úhlový rotor 18 x 2 ml), 25 µl supernatantu bylo v křemenné kyvetě s optickou dráhou 1 cm smíšeno s 2,5 ml PBS s azidem. Absorbance byla změřena při 280 nm pomocí spektrofotometru Spektromom 195 D a jako srovnávací vzorek byl použit PBS s azidem. Následně byla koncentrace protilátky v roztoku vypočtena dle uvedeného vztahu:

$$k = A_{280} \cdot n \cdot f$$

k – koncentrace stanovovaného roztoku protilátky v [mg/ml]

A_{280} – absorbance při 280 nm

n – ředění vzorku (101x)

f – empirický faktor = 1,094

3.6 Sušení preparátů protilátek

Jednotlivé vzorky byly připraveny z roztoku či ze sraženiny metodami uvedenými a popsány níže.

3.6.1 Sušení rozprašováním

Pomocí metody „spray drying“ neboli sušení rozprašováním byly Ing. Vojtěchem Klimšou z VŠCHT připraveny vzorky nespecifických protilátek viz Tabulka 3: Podmínky přípravy vzorků nespecifických protilátek pomocí metody "spray drying". Sušení vzorků bylo provedeno na upraveném přístroji Büchi B-290.

Později byly připraveny vzorky z roztoku specifických protilátek odpovídající podmínkám sušení vzorku A1 a A3 (viz Tabulka 3).

Tabulka 3: Podmínky přípravy vzorků nespecifických protilátek pomocí metody "spray drying".

Vzorek	Teplota na trysce [°C]	Typ trysky	Průměr trysky [mm]	Nosný plyn	Rychlost průtoku [l/h]	Koncentrace maltodextrinu [mg/ml]	Koncentrace NaCl [mg/ml]
A1	80	2F	0,7	vzduch	1200	0	0
A2	100	2F	0,7	vzduch	1200	0	0
A3	120	2F	0,7	vzduch	1200	0	0
A4	100	2F	0,7	vzduch	1800	0	0
A5	100	2F	1,4	vzduch	1200	0	0
A6	100	US	-	vzduch	1200	0	0
A7	100	2F	0,7	dusík	1200	0	0
A8	100	2F	0,7	vzduch	1200	50	0
A9	100	2F	0,7	vzduch	1200	100	0
A10	100	2F	0,7	vzduch	1200	0	50
A11	100	2F	0,7	vzduch	1200	0	100

Vzorky byly připraveny na VŠCHT Ing. Vojtěchem Klimšou. 2F označuje normální a US ultrazvukovou trysku.

3.6.2 Sušení při laboratorní teplotě

Injekční stříkačka byla naplněna získaným precipitátem (viz kapitola 3.4.1). Poté byla sraženina aplikována na teflonovou destičku dvěma způsoby. Část sraženiny byla pouze vytlačena, druhá část byla rozetřena do tenké vrstvy. Každý vzorek byl zvážen a hmotnost byla zaznamenána. Vzorky byly přikryty filtračním papírem, aby nedošlo k znečištění. Následující den byla opět stanovena hmotnost vzorku na teflonové destičce. Vzorky byly váženy, dokud nebyla hmotnost konstantní.

3.6.3 Sušení lyofilizací

V neporušené skleněné kulaté 50ml baňce byl zásobní roztok protilátek o koncentraci 50 mg/ml 10x ředěn destilovanou vodou tak, aby byla baňka naplněná maximálně do jedné třetiny. Následně byl roztok zamražen otáčením baňky v lázni připravené ze suchého ledu a ethanolu snižujícím teplotu až na cca -80 °C, tím se na stěnách baňky vytvořila rovnoměrně rozprostřená vrstva zamraženého roztoku. Jedna baňka s takto zamraženým roztokem byla umístěna do

mrazáku při teplotě -20 °C jako kontrola, zda došlo ke snížení aktivity protilátek v tomto kroku zamražení. Druhá baňka se zamraženým vzorkem byla umístěna na lyofilizátor (Lyovac GT 2E, Finn-Aqua), kde byl vzorek ponechán k sušení, dokud nedošlo k vyrovnání teploty baňky s okolím.

Alternativním postupem byly připraveny lyofilizované vzorky „vlákna“. Injekční stříkačka byla naplněna připravenou sraženinou (viz kapitola 3.4.1). Poté byla sraženina pístem vytlačována do kovového cedníčku umístěného v kapalném dusíku. Vzniklá vlákna byla přemístěna do vymražené 50ml kulaté baňky a byla provedena lyofilizace.

3.7 Spektrofotometrické stanovení denaturace protilátek

Tato spektrofotometrická metoda je založena na absorpci UV záření zbytky tryptofanu, fenylalaninu a tyrosinu přítomnými v molekule proteinu. Absorpční maxima tryptofanu, tyrosinu a fenylalaninu leží při 280, 275 a 258 nm. Součet poměrů absorbancí $\frac{A_{258}}{A_{280}} + \frac{A_{257}}{A_{280}} \cdot 46$

Byla proměřena spektra roztoku neovlivněných protilátek, protilátek sušených pomocí metody „spray drying“, lyofilizace a tepelně denaturovaných protilátek. Do skleněných lahviček bylo připraveno po 3,5 ml roztoků o koncentraci 1,5 mg/ml. Roztoky byly připraveny smícháním 105 µl roztoku protilátek o koncentraci 50 mg/ml (viz kapitola 3.7.1) s 3,395 ml PBS s azidem. Roztok tepelně denaturovaných protilátek byl po jeho připravení ohřát ve vodní lázni při 80 °C po dobu 2 minut.

Spektra připravených roztoků byla proměřena pomocí spektrofotometru Specord 250 plus (Analytik Jena) v křemenné kyvetě s optickou dráhou 1 cm v rozmezí vlnových délek 240–310 nm. Do kyvety byly vždy aplikovány 3 ml roztoku. Jako srovnávací vzorek byl použit PBS s azidem. Parametry měření byly zvoleny následovně: Measuring points – 0,2 nm; Speed – 0,2 nm/s; Integration time – 1 s; Slit – 1 nm.

Ze získaných dat byl vypočten součet poměrů absorbancí $\frac{258}{280} + \frac{275}{280}$, pomocí kterého byla posuzována míra denaturace a možná změna aktivity protilátek.

3.7.1 Rozpouštění vzorků protilátek

Vzhledem k další charakterizaci roztoků protilátek (spektrofotometrické měření) jsou vzorky protilátek rozpouštěny tak, aby roztok obsahoval shodné množství azidu jako je obsaženo v zásobním roztoku izolovaných protilátek, ze kterého byly protilátky různými způsoby usušeny. Z tohoto důvodu jsou vzorky získané odpařením vody rozpouštěny nejprve v destilované vodě, dokud nedosáhnou shodné koncentrace se zásobním roztokem izolovaných protilátek a následně je pak koncentrace roztoku upravována pomocí PBS s azidem.

Vzorky bez dalších přidaných látek (A1-A7) viz kapitola 3.6.1 byly připraveny následujícím způsobem. Navážka o hmotnosti přibližně 50 mg vzorku byla rozpuštěna ve skleněné nádobce v 667 μ l destilované vody. Po centrifugaci alikvotu roztoku (100 μ l) na centrifuze Eppendorf Centrifuge 5418 (15 000 RPM, 3 minuty, úhlový rotor 18 x 2 ml) byla proměřena absorbance při 280 nm 101x naředěného supernatantu. Jako srovnávací vzorek byl použit roztok PBS s azidem. Pro výpočet koncentrace proteinů byl použit vzorec viz kapitola 3.5. Podle vypočtené koncentrace byl roztok naředěn destilovanou vodou tak, aby jeho konečná koncentrace byla shodná s koncentrací zásobního roztoku izolovaných protilátek.

Vzorky s přidanými ochrannými látkami byly připravovány obdobně. Odlišovala se pouze hmotnost navážky, která byla korigována podle obsahu aditiv.

3.8 Měření rozpustnosti vzorků protilátek

Do skleněné lahvičky bylo odváženo přibližně 10 mg vzorku a rozpouštěno ve 2,5 ml destilované vody. Lahvičky se vzorky byly umístěny na orbitální třepačku (Yellow Line OS 2 basic, IKA), kde byly míchány 4. stupněm rychlosti. V časech 10, 30, 60 a 110 minut, bylo odebráno 600 μ l roztoku a v 1,5ml mikrozkuhavce centrifugováno pomocí stolní centrifugy Eppendorf Centrifuge 5418 (15 000 RPM, 3 minuty, úhlový rotor 18 x 2 ml). Následovalo proměření absorbance roztoku v 2mm křemenné kyvetě při vlnové délce 280 nm (Spektromom 195 D). Jako srovnávací vzorek byl použit PBS s azidem.

3.9 Měření pohlcování vlhkosti

Do 1,5 ml mikrozkušavek bylo odváženo přesně asi 10 mg vzorku. Otevřené mikrozkušavky byly přikryté filtračním papírem, aby nedošlo k znečištění vzorků prachem. Pomocí digitálního teploměru a vlhkoměru Eclipsera bylo zjištěno, že se vlhkost vzduchu v laboratoři pohybovala mezi 34-36 % v rozmezí teplot 19-20 °C. Po uplynutí dvou dnů byly mikrozkušavky se vzorky opět zvaženy a jejich hmotnosti byly porovnány s původní navázkou.

3.10 ELISA

ELISA (z angl. „Enzyme-linked Immunosorbent Assay”) je imunochemická metoda, která využívá enzym jako indikační molekulu pro kvantitativní stanovení komplexu antigen-protilátka. Tato metoda je založena na specifické interakci mezi protilátkou a antigenem zakotveném na dně mikrotitrační destičky. Po vytvoření komplexu primární protilátky s antigenem následuje interakce protilátky (s kovalentně navázaným enzymem) s primární protilátkou. Přítomný enzym (např. alkalická fosfatasa) reaguje s chromogenním substrátem, čímž vznikne barevný produkt.

Tato metoda byla využita pro porovnávání aktivity slepičích protilátek po různých druzích sušení. Jako antigen byl použit hovězí sérový albumin.

Použité roztoky:

- vazný (imobilizační) pufr: 13 mM Na₂CO₃; 25 mM NaHCO₃; pH 9,6
- PBS-ELISA + Tween: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; 0,1 % (v/v) Tween 20; pH 7,2
- blokovací roztok: 2 % roztok „řidkého bílku“ (w/v) v PBS-ELISA + Tween
- PBS-ELISA: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; pH 7,2
- vyvolávací roztok: 30 mM NaHCO₃; 20 mM Na₂CO₃; 1 mM MgCl₂; 0,1 % (w/v) p-nitrofenolfosfát

Rozpuštěním 10 mg antigenu v 1 ml PBS ELISA vznikl roztok o koncentraci 10 mg/ml. Přenesením 40 µl připraveného roztoku do 10 ml vazného pufru byl připraven roztok o koncentraci 4 µg/ml. Poté bylo do jamek mikrotitrační destičky PolySorp naneseno po 100 µl

tohoto roztoku antigenu. Mikrotitrační destička byla ve vlhké komoře inkubována přibližně 16 hodin při teplotě 4 °C.

Následně byl roztok z jamek odstraněn vyklepáním, jamky třikrát promyty 220 µl promývacího roztoku PBS ELISA + Tween, a poté byly jamky blokovány 150 µl blokovacího roztoku. Mikrotitrační destička byla ve vlhké komoře inkubována při 37 °C po dobu 1 hodiny.

Po inkubaci byl z jamek opět odstraněn roztok a jamky byly třikrát promyty 220 µl pufru PBS ELISA + Tween. Dále bylo do jamek nanášeno po 100 µl specifické (proti BSA) a kontrolní (preimunní) protilátky o koncentracích 90, 30, 10 a 3,3 µg/ml. Vše bylo aplikováno v duplikátech (paralelně) či kvartetech. Ředění specifických protilátek bylo provedeno pomocí PBS ELISA. Následovala inkubace mikrotitrační destičky ve vlhké komoře při 37 °C po dobu 2 hodin.

Jamky byly opět třikrát promyty 220 µl promývacího roztoku PBS ELISA + Tween. Do každé jamky bylo aplikováno po 100 µl sekundární králičí protilátky IgG proti slepičím IgY značené alkalickou fosfatase (Sigma) v pufru PBS ELISA ředěné v poměru 1:1430. Mikrotitrační destička byla inkubována ve vlhké komoře při 37 °C po dobu 1 hodiny.

Po odstranění protilátek a promytí jamek třikrát 220 µl pufru PBS ELISA + Tween bylo do každé jamky nanášeno po 100 µl vyvolávacího roztoku. Mikrotitrační destička s roztokem byla ponechána stát při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Poté bylo do jamek přidáno 100 µl 3M NaOH, čímž byla reakce zastavena. Nakonec byla proměřena absorbance vzniklého barevného produktu při vlnové délce 405 nm pomocí přístroje Sunrise Absorbance Reader.

4 Výsledky

4.1 Izolace slepičích protilátek IgY

Nejprve byly ze 49 vajec izolovány nespecifické protilátky IgY, ze kterých bylo připraveno 11 vzorků pomocí metody „spray drying“, další vzorky byly připraveny lyofilizací a volným sušením protilátek za laboratorní teploty či v termostatu. U vzorků byly sledovány jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. Poté byly izolovány jednotlivé frakce specifických protilátek IgY proti BSA.

Slepice označené PT-C a PT-K byly imunizovány třemi dávkami BSA. Vejce nasbíraná před imunizací od slepice PT-C obsahující pouze nespecifické protilátky z pohledu použitého antigenu byla použita k přípravě kontrolní frakce obsahující nespecifické protilátky. Jelikož u slepice PT-K nebyla k dispozici vejce z období před imunizací, tak byla kontrolní frakce připravena z prvních tří vajec snesených po první imunizační dávce BSA. Po imunizaci slepic byly z nasbíraných snůšek vajec připravené frakce specifických protilátek viz Tabulka 2. Koncentrace protilátek IgY v jednotlivých frakcích byla stanovena spektrofotometricky na základě proměření absorbance při 280 nm viz Tabulka 4.

Tabulka 4: Připravené frakce izolovaných protilátek IgY.

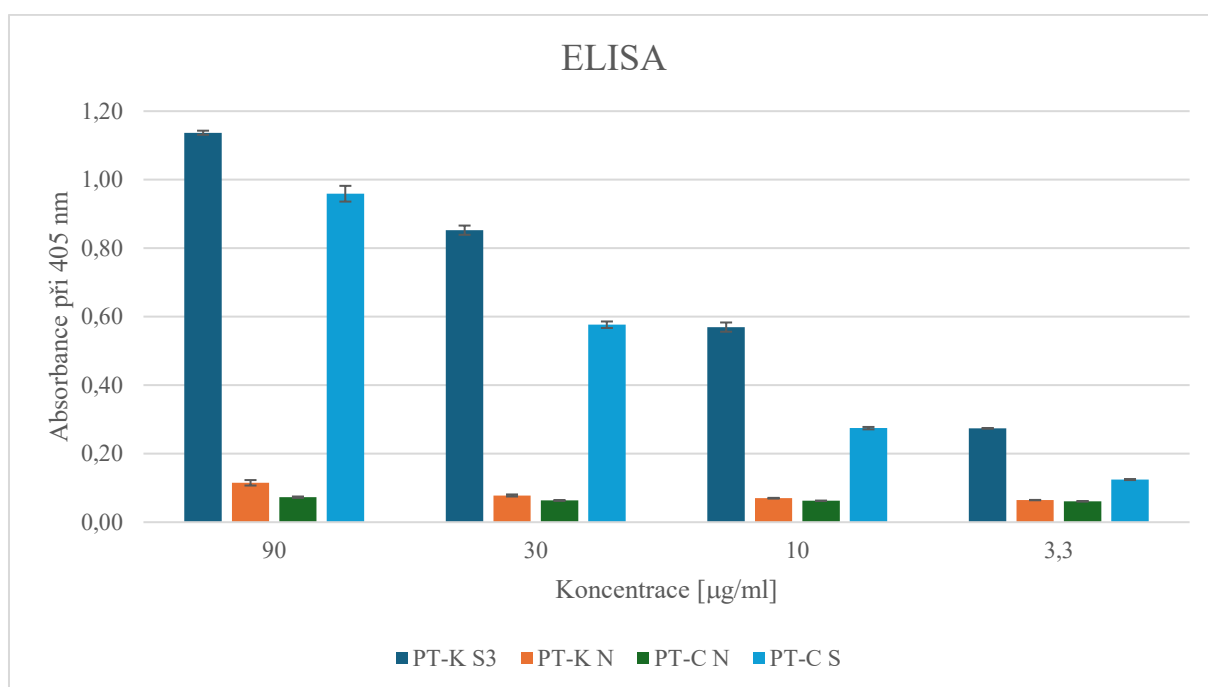
Frakce	Absorbance A_{280}	Koncentrace proteinu [mg/ml]	Objem žloutku [ml]	Množství IgY [mg]	Výtěžek IgY [mg/ml]
PT-C N	0,468	51,7	92	612	51,7
PT-C S	0,540	59,7	112	687	59,7
PT-K N	0,460	50,8	64	295	59
PT-K S1	0,510	56,3	88	424	53
PT-K S2	0,508	56,1	134	693	49,5
PT-K S3	0,485	53,6	204	1218	58

N = kontrolní frakce nespecifických protilátek od slepic PT-C a PT-K, S = frakce specifických protilátek od slepic PT-C a PT-K, čísla udávají pořadí v sekvenci přípravy frakcí.

4.2 Reaktivita izolovaných protilátek IgY

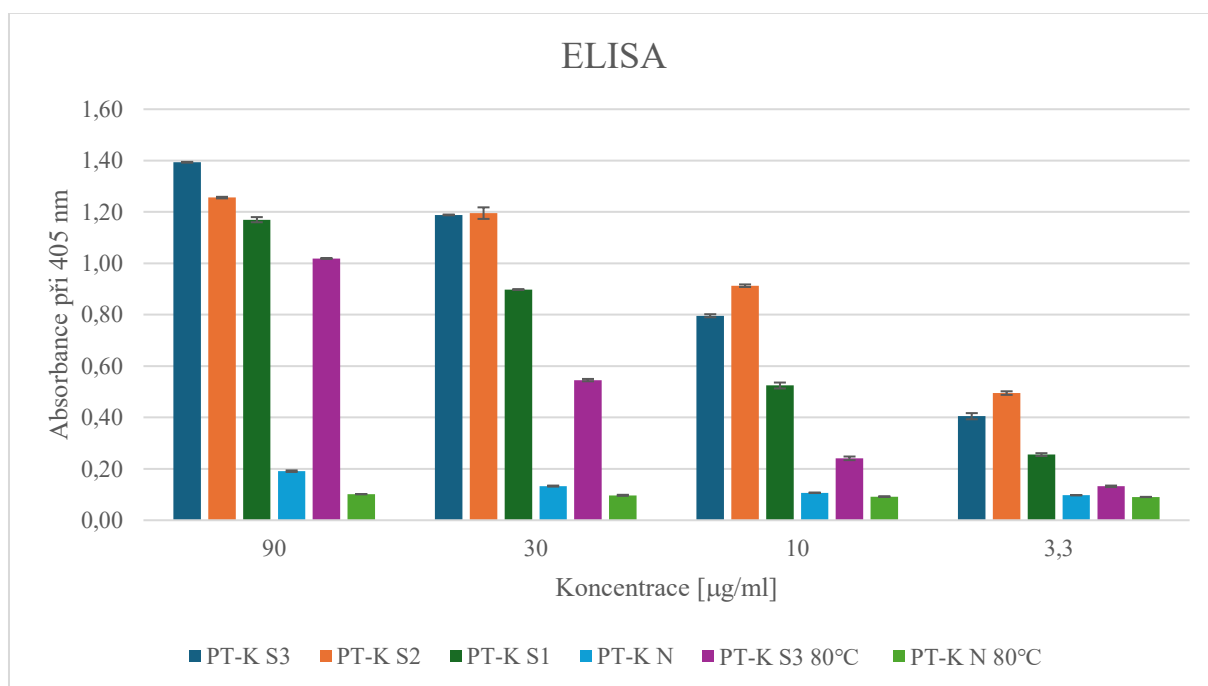
Pomocí imunochemické metody ELISA byla stanovena reaktivita izolovaných slepičích protilátek IgY vůči antigenu – hovězímu sérovému albuminu. Pro vyhodnocení aktivity protilátek byla změřena absorbance aplikovaných vzorků na mikrotitrační destičce při 405 nm pomocí spektrofotometru Tecan Sunrise.

Nejprve byla ověřena aktivita specifických protilátek frakcí PT-C S a PT-K S3 a preimunních protilátek frakcí PT-C N a PT-K N viz Obrázek 3. Stanovení bylo provedeno s roztoky protilátek o koncentracích 90, 30, 10 a 3,3 $\mu\text{g/ml}$.



Obrázek 3: Reaktivita protilátek slepic PT-K a PT-C proti antigenu BSA. Frakce označené N obsahují nespecifické (preimunní) protilátky, frakce s označením S obsahují specifické protilátky. Pro stanovení byly použity roztoky protilátek o koncentracích 90, 30, 10 a 3,3 $\mu\text{g/ml}$. BSA byl aplikován na mikrotitrační destičku o koncentraci 4 $\mu\text{g/ml}$. V grafu jsou vyneseny průměrné hodnoty naměřené absorbance při 405 nm vzorků protilátek. Variační rozpětí hodnot je znázorněno pomocí chybových úseček.

Dále byla stanovena aktivita protilátek od slepice PT-K viz Obrázek 4, které byly izolované z vajec snesených před podáním 3. vakcíny (PT-K S1) či v těsné blízkosti po jejím podání (PT-K S2) viz Tabulka 2. Reaktivita byla také sledována u protilátek ohřátých na 80 °C po dobu 2 minut (PT-K S3 80 °C a PT-K N 80 °C). Stanovení bylo provedeno s roztoky protilátek o koncentracích 90, 30, 10 a 3,3 µg/ml.



Obrázek 4: Reaktivita protilátek slepice PT-K proti antigenu BSA. Frakce označené N obsahují nespecifické (preimunní) protilátky, frakce s označením S obsahují specifické protilátky. Vzorky označené PT-K S3 80 °C a PT-K N 80 °C byly ohřáté při 80 °C po dobu 2 minut. Pro stanovení byly použity roztoky protilátek o koncentracích 90, 30, 10 a 3,3 µg/ml. BSA byl aplikován na mikrotitrační destičku o koncentraci 4 µg/ml. V grafu jsou vyneseny průměrné hodnoty naměřené absorbance při 405 nm vzorků protilátek. Variační rozpětí hodnot je znázorněno pomocí chybových úseček.

4.3 Připravené vzorky

Z připravených směsných frakcí nespecifických protilátek byly různými způsoby usušeny vzorky protilátek viz Tabulka 5.

Tabulka 5: Tabulka vysvětlující zkratky připravených vzorků nespecifických protilátek.

Označení vzorku	Proces sušení IgY
A1-A11	Sprejové sušení
K	Kontrolní frakce bez úprav
V1	Volně sušený vzorek "vlákna" za laboratorní teploty
V2	Volně sušený vzorek v jednotné vrstvě za laboratorní teploty
V3	Volně sušený vzorek "vlákna" termostatu při 37 °C
V4	Volně sušený vzorek v jednotné vrstvě v termostatu při 37 °C
L1	Lyofilizovaný vzorek
L2	Lyofilizovaný vzorek "vlákna" zamražení v kapalném dusíku
L3	Lyofilizovaný vzorek "vlákna" bez zamražení v kapalném dusíku

Pro získání dostatečného objemu izolovaných protilátek pro další zpracování byla připravena směsná frakce izolovaných protilátek. Frakce všech specifických protilátek a část frakce nespecifických protilátek PT-C byly spojeny do jedné směsné frakce, jejíž koncentrace byla upravena pomocí PBS s azidem na 50 mg/ml. Takto připravená směsná frakce byla využita k různým postupům při sušení protilátek viz Tabulka 6. Směsná frakce byla obdobně připravena i z frakcí nespecifických protilátek PT-C N a PT-K N.

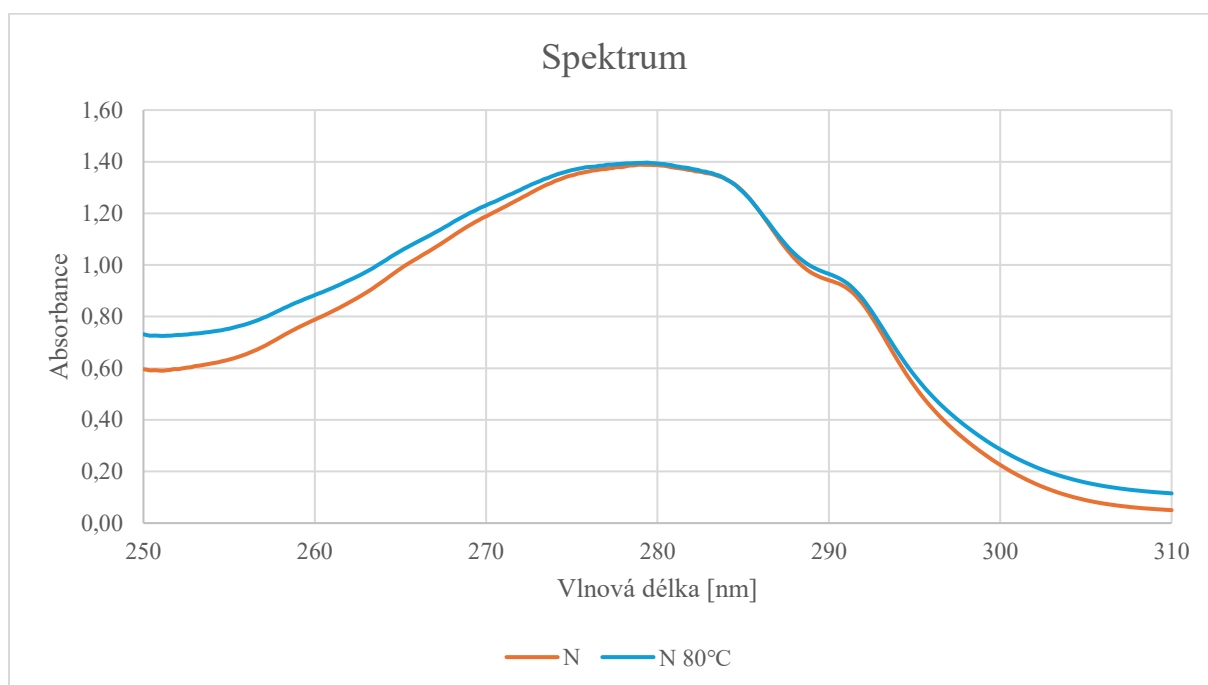
Tabulka 6: Tabulka vysvětlující zkratky připravených vzorků specifických protilátek.

Označení vzorku	Proces sušení IgY
A0	Směsná frakce specifických protilátek z VŠCHT bez úprav
A1	Vzorek připravený metodou "spray drying" s teplotou na vstupní trysce 80 °C
A3	Vzorek připravený metodou "spray drying" s teplotou na vstupní trysce 120 °C
V0	Opakované srážení – aplikováno z injekční stříkačky
V2	Volně sušený vzorek v jednotné vrstvě za laboratorní teploty
V5	Volně sušený vzorek na sítu při laboratorní teplotě
L0	Zamražená směs v kapalném dusíku
L1	Lyofilizovaný vzorek
L2	Lyofilizovaný vzorek "vlákna" zamražení v kapalném dusíku
L3	Lyofilizovaný vzorek "vlákna" bez zamražení v kapalném dusíku
S 80 °C	Směsná frakce specifických protilátek ohřátých při 80 °C po dobu 2 minut
N 80 °C	Směsná frakce nespecifických protilátek ohřátých při 80 °C po dobu 2 minut
S	Směsná frakce specifických protilátek bez úprav
N	Směsná frakce nespecifických protilátek bez úprav

4.4 Spektrofotometrické stanovení denaturace protilátek

Denaturace izolovaných protilátek byla sledována pomocí spektrofotometrické metody, která je založená na měření změn absorbance v UV oblasti. Důraz je kladen na absorpční maxima tryptofanu, tyrosinu a fenylalaninu, která leží při 280, 275 a 258 nm. Míra denaturace proteinu je určena podle součtu poměrů absorbancí $\frac{A_{258}}{A_{280}} + \frac{A_{257}}{A_{280}}$.⁴⁶

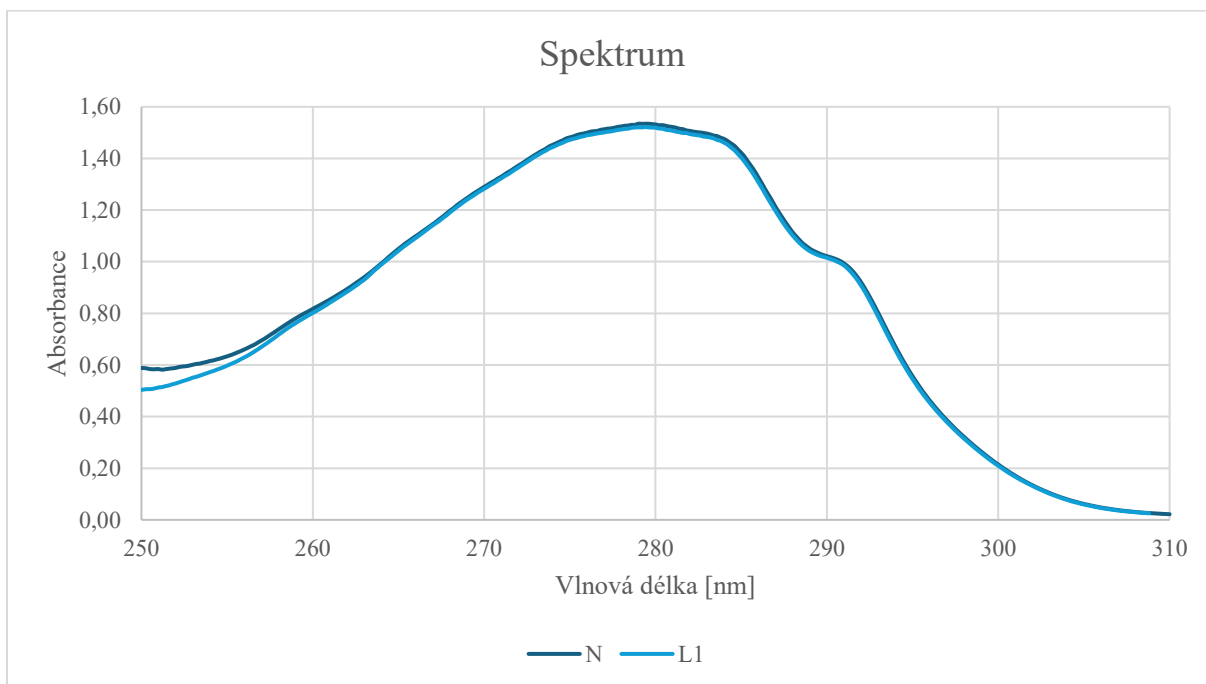
K proměření spekter byly použity roztoky nespecifických protilátek o koncentraci 1,5 mg/ml viz Obrázek 5. Pro stanovení hodnoty součtu poměrů absorbancí nativní formy protilátek byl využit roztok nespecifických protilátek a pro získání denaturované formy protilátek byl roztok ohřát při 80 °C po dobu 2 minut.



Obrázek 5: Vliv zahřátí na spektra roztoků nespecifických protilátek. Roztok obsahující nativní formy protilátek (1,5 mg/ml) nese označení N a roztok obsahující nespecifické protilátky (1,5 mg/ml) ohřátý na 80 °C po dobu 2 minut je označen N 80 °C.

Vypočítaný součet poměrů absorbancí neovlivněného roztoku nespecifických protilátek (N) o koncentraci 1,5 mg/ml byl 3,065. Součet poměrů absorbancí roztoku nespecifických protilátek ovlivněného vysokou teplotou (N 80 °C) byl spočten na hodnotu 2,706.

Dále byla proměřena spektra vzorků specifických protilátek sušených technikou „spray drying“ za šetrných (A1) a kritických podmínek (A3). Pro získání spekter byly proměřeny roztoky rozpuštěných vzorků protilátek o koncentraci 1,5 mg/ml. Přestože byly vzorky protilátek usušeny různými způsoby, tak spektra byla téměř totožná. Z tohoto důvodu byly do grafu vyneseny pouze spektra nativní formy protilátek a vzorku usušeného pomocí lyofilizace viz Obrázek 6. Součty poměrů absorbancí všech vzorků jsou uvedeny v Tabulka 7.



Obrázek 6: Vliv lyofilizace na spektra roztoků nespecifických protilátek. Roztok obsahující nativní formy protilátek nese označení N a roztok vzorku usušeného pomocí lyofilizace je označen L1.

Tabulka 7: Vliv způsobu sušení na součty poměrů absorbancí pro roztoky nespecifických protilátek.

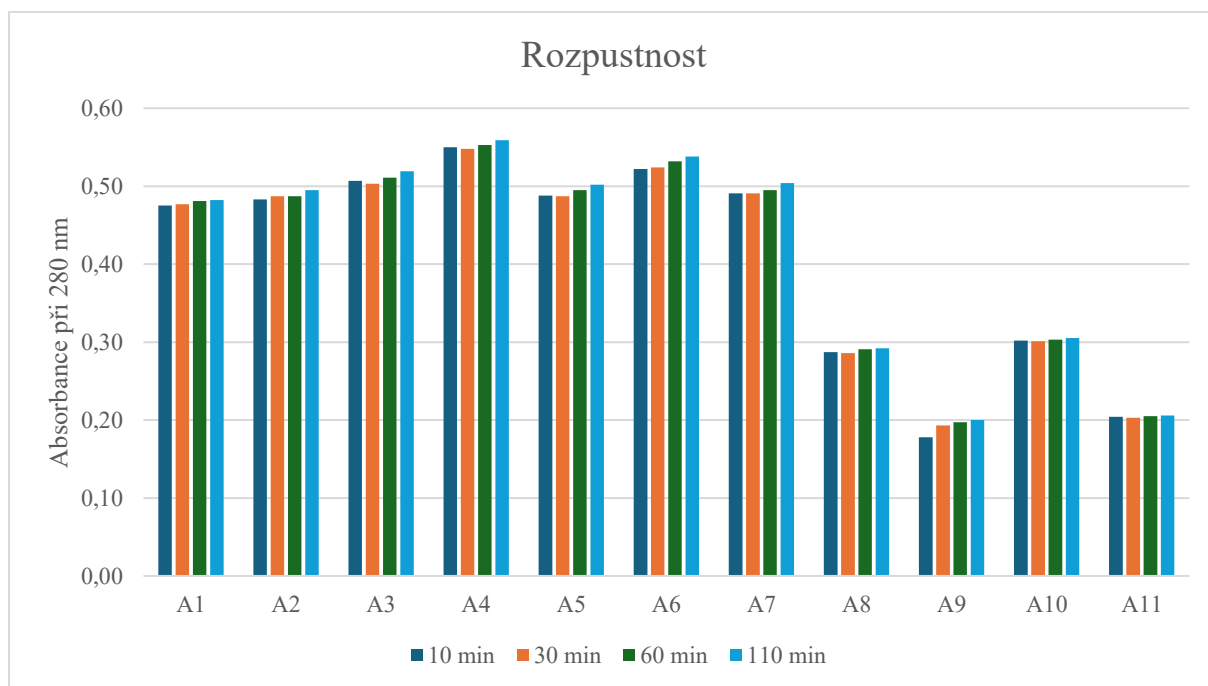
Vzorek	Součet poměrů absorbance
N	3,110
A1	3,006
A3	3,008
V1	3,079
V2	3,098
V3	3,098
V4	3,084
L1	3,150
L2	3,013
L3	2,964

Součty poměrů absorbančí $\frac{A_{258}}{A_{280}} + \frac{A_{257}}{A_{280}}$ pro roztoky nesespecifických protilátek o koncentraci 1,5 mg/ml. Označení vzorků viz Tabulka 5.

4.5 Měření rozpustnosti vzorků

Rozpustnost vzorků byla měřena spektrofotometricky na základě absorbance při 280 nm. Měření absorbance vzorků bylo provedeno pomocí přístroje Spektromom 195 D v křemenné kyvetě s optickou dráhou o délce 2 mm.

U vzorků usušených metodou „spray drying“, byla sledována rozpustnost po daných intervalech v průběhu třepání po dobu 110 min. Data jsou na Obrázek 7 vynesena jako závislost absorbance při 280 nm. Vzorky A1-7 byly připraveny pouze z roztoku izolovaných nesespecifických protilátek bez dalších přidaných látek. Vzorky A8-11 obsahují kromě nesespecifických protilátek další přidané látky (viz Tabulka 3).



Obrázek 7: Rozpustnost vzorků usušených nesespecifických protilátek metodou „spray drying“. Rozpustnost vyjádřená jako absorbance při 280 nm byla sledována po 10, 30, 60 a 110 minutách. Vzorky byly připraveny přidáním 2,5 ml destilované vody k 10 mg sušeného vzorku.

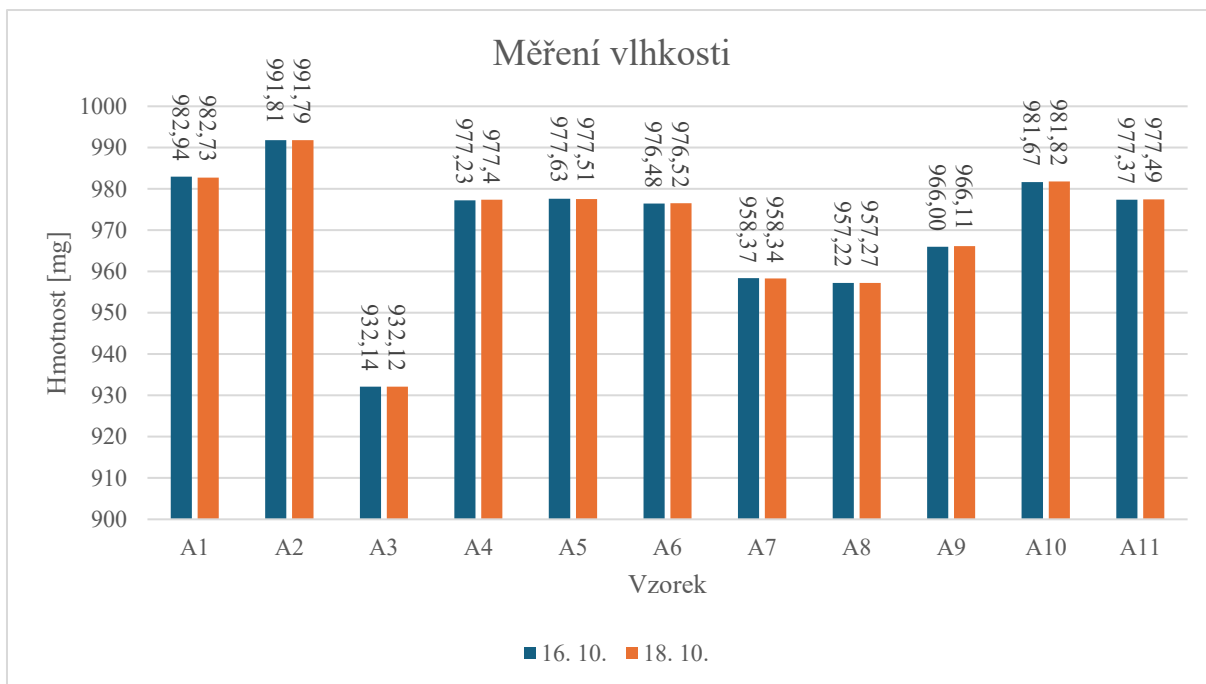
Rozpustnost vzorků usušených nespecifických protilátek dalšími technikami byla pozorována v intervalech 10, 30, 60 a 110 minut viz Obrázek 8.



Obrázek 8: Rozpustnost vzorků usušených nespecifických protilátek různými metodami. Rozpustnost jako absorbance při 280 nm byla sledována po 10, 30, 60 a 110 minutách. Vzorky byly připraveny přidáním 2,5 ml destilované vody k 10 mg sušeného vzorku.

4.6 Měření pohlcování vlhkosti

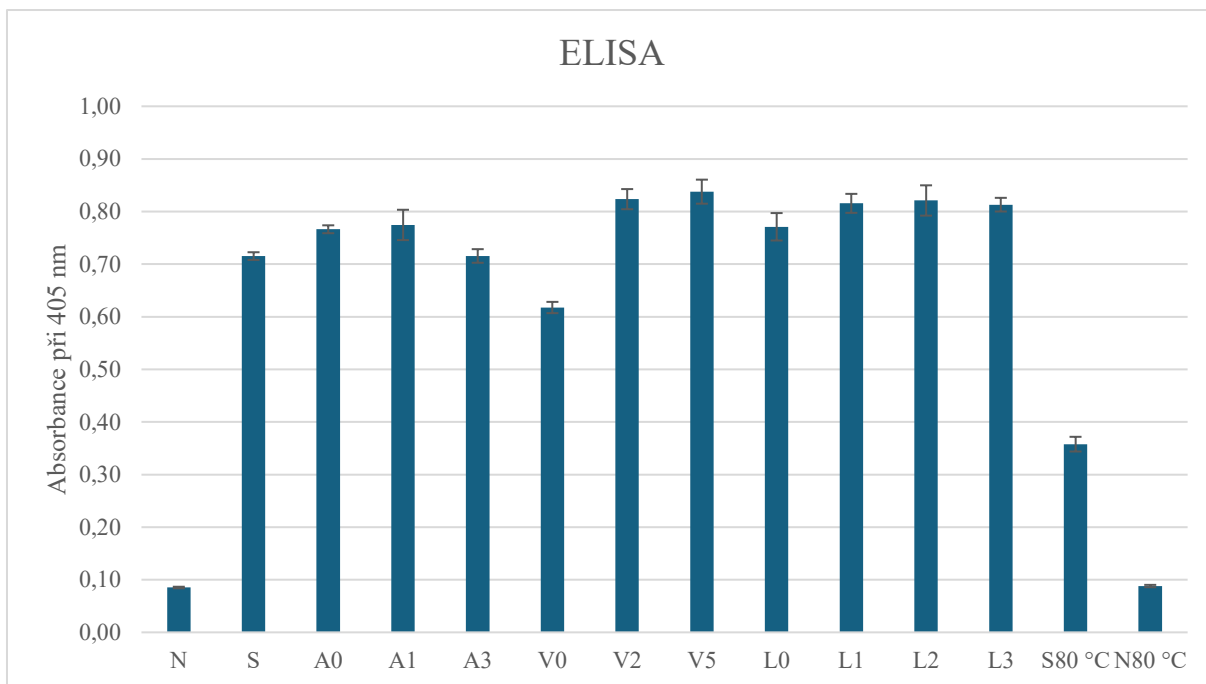
Pohlcování vzdušné vlhkosti bylo pozorováno u vzorků usušených metodou „spray drying“ na základě změny hmotnosti vzorků, které byly ponechány stát po dobu 2 dnů v laboratoři. Z Obrázek 9 je zřejmé, že za běžných podmínek tyto vzorky nejsou hygroskopické.



Obrázek 9: Hmotnosti vzorků usušených metodou „spray drying“ skladovaných na vzduchu. Interval mezi vážením vzorků byl 2 dny, vlhkost vzduchu se pohybovala mezi 34-36 % v rozmezí teplot 19-20 °C.

4.7 Reaktivita připravených vzorků protilátek IgY

Ovlivnění reaktivity protilátek ve vzorcích, které byly sušeny různými způsoby, bylo pozorováno pomocí metody ELISA viz Obrázek 10. Ovlivnění aktivity bylo sledováno i ve vzorcích jednotlivých kroků sušení (V0, L0). Pro porovnání denaturace protilátek byla proměřena reaktivita ohřáté protilátky při 80 °C po dobu 2 minut. Stanovení bylo provedeno s roztoky protilátek o koncentraci 10 µg/ml.



Obrázek 10: Reaktivita protilátek v roztocích připravených rozpuštěním usušených protilátek směsné frakce vůči antigenu BSA. Frakce označená S je směsnou frakcí nespecifických protilátek, zbytek vzorků byl připraven ze směsné frakce specifických protilátek. Označení vzorků viz Tabulka 6. Vzorky označené S 80 °C a N 80 °C byly ohřáté při 80 °C po dobu 2 minut. Pro stanovení byly použity roztoky protilátek o koncentraci 10 µg/ml. BSA byl aplikován na mikrotitrační destičku o koncentraci 4 µg/ml. V grafu jsou vyneseny průměrné hodnoty naměřené absorbance při 405 nm vzorků protilátek. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku hodnot. Každý vzorek byl proveden v kvadruplikátech.

5 Diskuse

Izolované slepičí polyklonální protilátky IgY z vaječných žloutků se jeví jako vhodná volba pro účely pasivní imunizace proti řadě virových, bakteriálních i parazitických onemocnění. Při jejich získávání je minimalizováno vystavení zvířat stresu. Také vyprodukované množství specifických protilátek na antigen použitý pro imunizaci je výrazně větší oproti savcům odpovídající velikosti. Jak vysoká produkce, tak ekonomická nenáročnost předurčují využití žloutkových protilátek pro pasivní imunizaci ve veterinární i humánní medicíně.^{47,48}

Pro zachování dlouhodobé stability a biologické aktivity protilátek je výhodná příprava protilátkových léčiv v suché práškové formě. Ge a spol. ve své publikaci uvádí, že lyofilizovaný prášek ze žloutku obsahující protilátky lze bez přidání konzervačních látek uchovávat bez bakteriální kontaminace až po dobu 1 roku.⁴⁹ Roztoky izolovaných protilátek vykazují mírnou tendenci k autoagregaci, jsou náchylné ke kontaminaci růstem bakterií, proto se k roztoku obvykle přidávají inhibitory růstu bakterií (např. azid sodný, thimerosal či gentamicin). Takto připravené roztoky lze skladovat měsíce až roky při teplotě 4 °C.¹³ Některé tyto inhibitory nejsou ovšem biokompatibilní a je třeba je před aplikací z roztoků odstranit. Další výhodou přípravy protilátkových terapeutických přípravků v suché práškové formě je snadné a neinvazivní podání např. v tobolkách, pomocí kterých lze ovlivnit jejich distribuci v trávicím traktu při perorálním podání.

Nejprve byly zjišťovány fyzikálně-chemické vlastnosti usušených vzorků nespecifických protilátek připravených metodou „spray drying“. Usušené vzorky A1-A5 a A7 měly podobný vzhled jako sypký prášek tvořený z malých hrudek. Vzorek A6 byl přilnavý prášek, tvořen z kumulujících se krystalků. Obdobný charakter měly vzorky s přidanými látkami A8-A11, prášek se skládal z větších hrudek, které agregují. Bylo zjištěno, že za normálních podmínek vzorky bez aditiv nejsou významně hygroskopické a že vzorky s přidaným maltodextrinem a NaCl mají určitou tendenci pohlcovat vzdušnou vlhkost. Dále byla sledována rozpustnost vzorků v destilované vodě na základě měření absorbance při 280 nm v daných časových intervalech. Vzorky byly dobře rozpustné, již po 10 minutách byly zcela rozpuštěné vzorky s přidaným NaCl. Vzorky obsahující maltodextrin se rozpustily do 60 minut po přidání destilované vody. Zbylé vzorky bez dalších přídavných látek se rozpustily do 110 minut. Pomalejší rozpouštění může být pro některé aplikace právě výhodné. Před měřením absorbance byly vzorky centrifugovány, aby naměřená data nebyla ovlivněna nerozpuštěnými částicemi

v roztoku, které by mohly způsobit zákal. Byla sledována velikost vzniklých pelet, které nejspíše obsahovaly především denaturované protilátky, jež vznikly během procesu sušení. Po 10 minutách byly pelety ve vzorcích s přidanými látkami pouze nepatrné. Ve vzorcích A1, A2 a A5-A7 měly vzniklé pelety průměr do 2 mm, pelety vzniklé ve vzorcích A3 a A4 byly menší s průměrem do 1 mm. S přibývajícím dobou rozpouštění se pelety ve vzorcích zmenšovaly. Zjištěná data potvrzují naše očekávání a korelují s již známými vlastnostmi maltodextrinu a NaCl, protože to jsou hygroskopické a dobře rozpustné látky.⁵⁰

Dále byly studovány fyzikálně-chemické vlastnosti vzorků bez aditiv připravených odlišnými metodami sušení, než je metoda „spray drying“. Nejlépe rozpustné byly lyofilizované vzorky připravené lyofilizací roztoku protilátek. Ty se zcela rozpustily již během 10 minut a vzniklý roztok byl téměř čirý. Po jejich centrifugaci vznikly pelety o průměru cca 1 mm, jež mohly být tvořeny především agregovanými či denaturovanými molekulami protilátek. U volně sušených vzorků sraženiny IgY byla rozpustnost závislá na způsobu nanesení sraženiny během sušení. Lépe rozpustné byly vzorky, které v průběhu sušení byly rovnoměrně rozprostřené v jedné tenké vrstvě. Volně sušené vzorky ve formě vláken vytvořily nejprve nabobtnalé útvary, které se začaly rozpouštět až po uplynutí 10 minut, vzniklé roztoky byly zakalené. Centrifugací roztoků vznikly pelety s průměrem cca 2 mm. Vzorky volně sušené sraženiny při laboratorní teplotě či v termostatu měly shodné vlastnosti, proto byly dále připravovány pouze vzorky volně sušené při laboratorní teplotě.

Dle publikace Biter a spol. lze z UV-spekter vypočítat součet poměrů absorbancí při určitých vlnových délkách a zjistit tak míru denaturace proteinů.⁴⁶ Pro vyhodnocení možné denaturace protilátek v průběhu sušení bylo nutné získat spektra roztoků protilátek jak v nativní formě, tak prokazatelně poškozených. V publikacích se uvádí, že protilátky podléhají denuraci například změnou pH či vystavením protilátek teplotě vyšší než 70 °C.³¹ Pro experiment byla zvolena tepelná denaturace protilátek. Ze spektra roztoků neovlivněných protilátek (N) a roztoku izolovaných protilátek vystavených teplotě 80 °C po dobu 2 minut (N 80 °C) (viz Obrázek 5) je patrné, že jsou spektra odlišná. Spektrum vzorku N 80 °C je oproti spektru vzorku N více zploštělé, rozdíl součtů poměrů absorbancí je 0,359. Dalo se tedy předpokládat, že protilátky ve vzorku N 80 °C podlehly denuraci. Domněnka byla potvrzena pomocí metody ELISA, kterou byla ověřena reaktivita neovlivněného vzorku specifických protilátek (PT-K S3) a vzorku specifických protilátek vystavených teplotě 80 °C po dobu

2 minut (PT-K S3 80 °C). Metoda prokázala snížení reaktivity protilátek vzorku PT-K S3 80 °C oproti vzorku PT-K S3 průměrně o 54,5 % (viz Obrázek 4).

Změřená spektra jednotlivých roztoků vzorků nespecifických protilátek připravených volným sušením (V1-4), lyofilizací (L1-3) a metodou „spray drying“ (A1 a A3) byla téměř shodná s roztokem neovlivněných protilátek (N) (viz Obrázek 6). Ze vzorků sušených metodou „spray drying“ byly pro měření vybrány pouze dva vzorky, A1 a A3. Vzorek A1 byl vybrán, protože byl sušen za nejšetrnějších podmínek oproti zbylým vzorkům a během sušení byl vystaven nejvýše teplotě 80°C. Naopak vzorek A3 byl vystaven nejkritičtějším podmínkám ze všech vzorků, během sušení byla na trysce rozprašovače teplota až 120 °C. Z naměřených spekter byly vypočítané součty poměrů absorbancí pro jednotlivé vzorky, které se též příliš nelišily (Tabulka 7). Zjištěné výsledky byly porovnány se vzorkem obsahujícím denaturované formy protilátek (N 80 °C). Rozdíl hodnot vypočítaných součtů poměrů absorbancí připravených vzorků se vzorkem obsahujícím denaturované formy protilátek nabývá průměrné hodnoty 0,35. Výsledky z vyhodnocení UV-spekter dokazují, že procesem sušení nedošlo k denuraci proteinů v připravených vzorcích. Na základě těchto výsledků byly Ing. Klimšou připraveny vzorky usušených specifických protilátek (proti BSA) za stejných podmínek jako vzorek A1 a A3.

Pro zjištění vlivu „namáhání“ během procesu sušení na imunoreaktivitu protilátek, bylo třeba pracovat se specifickými protilátkami. Specifické protilátky jsou potřebné k provedení imunochemické metody ELISA, jež je založena na specifické interakci mezi antigenem a protilátkou. Za tímto účelem byly izolovány specifické protilátky ze žloutků vajec od slepic PT-C a PT-K, které byly imunizovány BSA. Nejprve byla zjišťována jejich reaktivita pomocí metody ELISA v jednotlivých frakcích (viz Obrázek 3 a Obrázek 4). Dle očekávání bylo potvrzeno, že reaktivita se zvyšovala s rostoucím počtem imunizací slepic, tudíž nejvyšší reaktivitu vykazovala frakce PT-K S3. Následně byly jednotlivé izolované frakce specifických protilátek spojeny do jedné směsné frakce, aby bylo získáno dostatek materiálu pro jednotlivé protokoly sušení protilátek.

Reaktivita připravených vzorků specifických protilátek byla ověřena a porovnána pomocí metody ELISA. Bylo předpokládáno, že nejvyšší reaktivita bude zjištěna u vzorků neovlivněných protilátek A0 a S. Experiment byl opakován a přinesl shodné výsledky, ze kterých vyplývá, že reaktivitu neovlivněných protilátek (A0 a S) převyšují téměř všechny

ostatní vzorky (viz Obrázek 10). Zdánlivě zvýšená reaktivita připravených vzorků mohla být způsobena selektivním zakoncentrováním protilátek. V roztocích izolovaných protilátek byly pravděpodobně rozpuštěné i další proteiny, které zvýšily hodnoty naměřené absorbance, a tím i vypočítanou koncentraci proteinů v roztocích (viz kapitola 3.5), podle níž jsou vzorky ředěny na ELISA. Po namáhání proteinů během procesu sušení a jejich opětovném pokusu o rozpuštění byly rozpuštěné pouze protilátky a případné balastní proteiny byly po centrifugaci součástí vzniklých pelet společně s denaturovanými protilátkami. Z tohoto důvodu byla zvýšená reaktivita, jelikož tento roztok obsahoval při stejné koncentraci proteinů více protilátek oproti zásobnímu roztoku protilátek s rozpuštěnými balastními proteiny.

Dle zjištěných výsledků je nejsnazším a ekonomicky nejvýhodnějším způsob přípravy vzorků volné sušení za laboratorní teploty (vzorky V1 a V2). Nevýhodou této metody byla horší rozpustnost vzorků v porovnání se vzorky připravenými lyofilizací či sprejovým sušením. Na druhou stranu pomalejší rozpouštění může být pro některé aplikace žádoucí.

6 Souhrn

V bakalářské práci byly různými metodami připraveny vzorky sušených slepičích protilátek, které byly následně charakterizovány.

- Z vaječných žloutků kontrolních a imunizovaných slepic hovězím sérovým albuminem byla provedena izolace protilátek jak nespecifických, tak specifických protilátek rozpoznávající použitý antigen.
- Lyofilizací, sprejovým sušením a volným sušením byly připraveny vzorky usušených nespecifických slepičích protilátek a byla sledována jejich rozpustnost a hygroskopicita. Bylo zjištěno, že vzorky jsou dobře rozpustné a nejsou hygroskopické.
- Byla proměřena UV-spektra roztoků z připravených vzorků usušených protilátek, ze kterých vyplývá, že nedošlo k denaturaci protilátek na rozdíl od roztoku protilátek vystaveného teplotě 80 °C po dobu 2 minut.
- Metodou ELISA byla ověřena reaktivita usušených protilátek proti hovězímu sérovému albuminu, která u všech vzorků bez ohledu na způsob sušení nebyla významně změněna.

7 Seznam použité literatury

- (1) Chottová Dvořáková, M.; Mistrová, E. *Fyziologie Krve a Základy Imunity*, 1. vyd.; Karolinum Press: Praha, **2018**, 93–103.
- (2) Hořejší, V.; Bartůňková, J.; Brdička, T.; Špišek, R. *Základy Imunologie*, 5. vyd.; TRITON, **2013**.
- (3) Quinn, A.; Raja-Gabaglia, C.; Schneider, S. C.; Braciak, T.; Sercarz, E. E. Immune Response. In *Encyclopedia of Immunology*; Elsevier, **1998**; 1226–1229. <https://doi.org/10.1006/rwei.1999.0318>.
- (4) Štern, P. Struktura Protilátek a Jejich Aktivita. *Klinická biochemie a metabolismus* **2016**, 4–9.
- (5) Gorshtein, G. *Structure and Function of Antibodies*. <https://www.rapidnovor.com/structure-and-function-of-antibodies/>. (navštíveno 30. 5. 2024)
- (6) Dávalos-Pantoja, L.; Ortega-Vinuesa, J. L.; Bastos-González, D.; Hidalgo-Álvarez, R. A Comparative Study between the Adsorption of IgY and IgG on Latex Particles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2000**, *11* (6), 657–673. <https://doi.org/10.1163/156856200743931>.
- (7) Lee, W.; Syed Atif, A.; Tan, S. C.; Leow, C. H. Insights into the Chicken IgY with Emphasis on the Generation and Applications of Chicken Recombinant Monoclonal Antibodies. *Journal of Immunological Methods* **2017**, *447*, 71–85. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.05.001>.
- (8) Pereira, E. P. V.; Van Tilburg, M. F.; Florean, E. O. P. T.; Guedes, M. I. F. Egg Yolk Antibodies (IgY) and Their Applications in Human and Veterinary Health: A Review. *International Immunopharmacology* **2019**, *73*, 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.015>.
- (9) Abbas, A. T.; El-Kafrawy, S. A.; Sohrab, S. S.; Azhar, E. I. A. IgY Antibodies for the Immunoprophylaxis and Therapy of Respiratory Infections. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* **2019**, *15* (1), 264–275. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1514224>.
- (10) Hodek, P.; Trefil, P.; Simunek, J.; Hudecek, J.; Stiborova, M. Optimized Protocol of Chicken Antibody (IgY) Purification Providing Electrophoretically Homogenous Preparations. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2013**, *8*, 113–124.
- (11) Pauly, D.; Chacana, P. A.; Calzado, E. G.; Brembs, B.; Schade, R. IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation. *JoVE* **2011**, No. 51, 3084. <https://doi.org/10.3791/3084>.

- (12) Gassmann, M.; Thömmes, P.; Weiser, T.; Hübscher, U. Efficient Production of Chicken Egg Yolk Antibodies against a Conserved Mammalian Protein. *FASEB* **1990**, *4* (8), 2528–2532. <https://doi.org/10.1096/fasebj.4.8.1970792>.
- (13) Schade, R.; Calzado, E. G.; Sarmiento, R.; Chacana, P. A.; Porankiewicz-Asplund, J.; Terzolo, H. R. Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY-Technology): A Review of Progress in Production and Use in Research and Human and Veterinary Medicine. *Altern Lab Anim* **2005**, *33* (2), 129–154. <https://doi.org/10.1177/026119290503300208>.
- (14) Strikas, R. A.; Mawle, A. C.; Pickering, L. K.; Orenstein, W. A. Active Immunization. In *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*; Elsevier, **2018**; 43-71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00006-2>.
- (15) Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S.; Baker, D. L. *Cellular and Molecular Immunology*, 10 ed.; Elsevier: Philadelphia, Pennsylvania, 2022.
- (16) Baxter, D. Active and Passive Immunity, Vaccine Types, Excipients and Licensing. *Occupational Medicine* **2007**, *57* (8), 552–556. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqm110>.
- (17) Pardi, N.; Hogan, M. J.; Porter, F. W.; Weissman, D. mRNA Vaccines — a New Era in Vaccinology. *Nat Rev Drug Discov* **2018**, *17* (4), 261–279. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>.
- (18) Karikó, K.; Muramatsu, H.; Welsh, F. A.; Ludwig, J.; Kato, H.; Akira, S.; Weissman, D. Incorporation of Pseudouridine Into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector With Increased Translational Capacity and Biological Stability. *Molecular Therapy* **2008**, *16* (11), 1833–1840. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.200>.
- (19) Marcotte, H.; Hammarström, L. Passive Immunization. In *Mucosal Immunology*; Elsevier, **2015**; 1403–1434. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00071-9>.
- (20) Long, S. S., Prober, C. G., Fischer, M. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*, 5 ed.; Elsevier: Philadelphia, PA, **2018**.
- (21) Lipman, N. S.; Jackson, L. R.; Trudel, L. J.; Weis-Garcia, F. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal* **2005**, *46* (3), 258–268. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.258>.
- (22) Rahman, S.; Van Nguyen, S.; Icatlo Jr., F. C.; Umeda, K.; Kodama, Y. Oral Passive IgY-Based Immunotherapeutics: A Novel Solution for Prevention and Treatment of Alimentary Tract Diseases. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* **2013**, *9* (5), 1039–1048. <https://doi.org/10.4161/hv.23383>.
- (23) Goetze, A. M.; Liu, Y. D.; Zhang, Z.; Shah, B.; Lee, E.; Bondarenko, P. V.; Flynn, G. C. High-Mannose Glycans on the Fc Region of Therapeutic IgG Antibodies Increase Serum

- Clearance in Humans. *Glycobiology* **2011**, *21* (7), 949–959. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwr027>.
- (24) Moreira, M.; Sarraguça, M. How Can Oral Paediatric Formulations Be Improved? A Challenge for the XXI Century. *International Journal of Pharmaceutics* **2020**, *590*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119905>.
- (25) Podání Léčiv a Lékové Formy. <https://is.muni.cz/el/1431/jaro2012/C8790/um/31610507/Farm06.pdf>. (navštíveno 12. 7. 2024)
- (26) Martínková, J. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů, 2.*, zcela přepracované a doplněné vydání.; Grada Publishing: Praha, **2018**.
- (27) Švihovec, J., Bultas, J., Anzenbacher, P., Chládek, J., Příborský, J., Slíva, J., Votava, M. *Farmakologie*, 1. vyd.; Grada Publishing: Praha, **2018**.
- (28) Aulton, M. E., Taylor, K. M. G. The Design and Manufacture of Medicines. In *Aulton's Pharmaceutics*: 5 ed.; Elsevier: Edinburgh, **2018**.
- (29) Bogard, W. C.; Dean, R. T.; Deo, Y.; Fuchs, R.; Mattis, J. A.; McLean, A. A.; Berger, H. J. Practical Considerations in the Production, Purification, and Formulation of Monoclonal Antibodies for Immunoscintigraphy and Immunotherapy. *Seminars in Nuclear Medicine* **1989**, *19* (3), 202–220. [https://doi.org/10.1016/S0001-2998\(89\)80014-5](https://doi.org/10.1016/S0001-2998(89)80014-5).
- (30) Strickley, R. G.; Lambert, W. J. A Review of Formulations of Commercially Available Antibodies. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2021**, *110* (7). <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.03.017>.
- (31) Wang, W.; Singh, S.; Zeng, D. L.; King, K.; Nema, S. Antibody Structure, Instability, and Formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2007**, *96* (1), 1–26. <https://doi.org/10.1002/jps.20727>.
- (32) Hermeling, S.; Crommelin, D. J. A.; Schellekens, H.; Jiskoot, W. Structure-Immunogenicity Relationships of Therapeutic Proteins. *Pharm Res* **2004**, *21* (6), 897–903. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000029275.41323.a6>.
- (33) Shire, S. J.; Shahrokh, Z.; Liu, J. Challenges in the Development of High Protein Concentration Formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2004**, *93* (6), 1390–1402. <https://doi.org/10.1002/jps.20079>.
- (34) Hagiwara, H.; Yuasa, H.; Yamamoto, Y. *Stabilized Human Monoclonal Antibody Preparation* **1997**, 6165467.
- (35) Akita, E. M.; Nakai, S. Production and Purification of Fab' Fragments from Chicken Egg Yolk Immunoglobulin Y (IgY). *Journal of Immunological Methods* **1993**, *162* (2), 155–164. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90380-P](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90380-P).

- (36) Li, X.-Y.; Jin, L.-J.; Lu, Y.-N.; Zhen, Y.-H.; Li, S.-Y.; Wang, L.-H.; Xu, Y.-P. Chitosan–Alginate Microcapsules for Oral Delivery of Egg Yolk Immunoglobulin (IgY): Effects of Chitosan Concentration. *Appl Biochem Biotechnol* **2009**, *159* (3), 778–787. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8628-6>.
- (37) Paul, N. C.; Al-Adwani, S.; Crespo, R.; Shah, D. H. Evaluation of Passive Immunotherapeutic Efficacy of Hyperimmunized Egg Yolk Powder against Intestinal Colonization of *Campylobacter Jejuni* in Chickens. *Poultry Science* **2014**, *93* (11), 2779–2787. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-04234>.
- (38) Zhang, X.-Y.; Vieira-Pires, R. S.; Morgan, P. M.; Schade, R. Correction to: IgY-Technology: Production and Application of Egg Yolk Antibodies. In *IgY-Technology: Production and Application of Egg Yolk Antibodies*; Springer International Publishing: Cham, **2021**. https://doi.org/10.1007/978-3-030-72688-1_19.
- (39) Ratti, C. *Advances in Food Dehydration*, CRC Press, **2008**. <https://doi.org/10.1201/9781420052534>.
- (40) Nowak, D.; Jakubczyk, E. The Freeze-Drying of Foods—The Characteristic of the Process Course and the Effect of Its Parameters on the Physical Properties of Food Materials. *Foods* **2020**, *9* (10), 1488. <https://doi.org/10.3390/foods9101488>.
- (41) Franks, F.; Auffret, T. *Freeze-Drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals*; The Royal Society of Chemistry, 2007. <https://doi.org/10.1039/9781847557704>.
- (42) Rey, L. *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*; CRC Press, **2010**. <https://doi.org/10.3109/9781439825761>.
- (43) Subirade, M.; Chen, L. Food-Protein-Derived Materials and Their Use as Carriers and Delivery Systems for Active Food Components. In *Delivery and Controlled Release of Bioactives in Foods and Nutraceuticals*; Elsevier, **2008**; 251–278. <https://doi.org/10.1533/9781845694210.2.251>.
- (44) Okáčová, L.; Vetchý, D.; Franc, A.; Rabišková, M.; Kratochvíl, B. Zvýšení Biodostupnosti Těžce Rozpustných Léčivých Látek Jejich Modifikací. *Chemické listy* **2010**, No. 104, 21–26.
- (45) Patel, R. P. Spray Drying Technology: An Overview. *IJST* **2009**, *2* (10), 44–47. <https://doi.org/10.17485/ijst/2009/v2i10.3>.
- (46) Biter, A. B.; Pollet, J.; Chen, W.-H.; Strych, U.; Hotez, P. J.; Bottazzi, M. E. A Method to Probe Protein Structure from UV Absorbance Spectra. *Analytical Biochemistry* **2019**, 587. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113450>.
- (47) Mine, Y.; Kovacs-Nolan, J. Chicken Egg Yolk Antibodies as Therapeutics in Enteric

Infectious Disease: A Review. *Journal of Medicinal Food* **2002**, *5* (3), 159–169. <https://doi.org/10.1089/10966200260398198>.

(48) Thirumalai, D.; Visaga Ambi, S.; Vieira-Pires, R. S.; Xiaoying, Z.; Sekaran, S.; Krishnan, U. Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) as Diagnostics and Therapeutics in Parasitic Infections – A Review. *International Journal of Biological Macromolecules* **2019**, *136*, 755–763. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.118>.

(49) Ge, S.; Yang, Y.; Chelliappan, B.; Michael, A.; Zhong, F.; Zhang, X. Evaluation of Different IgY Preparation Methods and Storage Stability as Potential Animal Feed Supplement. *PJZ* **2020**, *52* (6). <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/20190612010610>.

(50) Wang, S.-T.; Lu, Y.-Y.; Tsai, M.-L. Formulation and Evaluation of Chitosan/NaCl/Maltodextrin Microparticles as a Saltiness Enhancer: Study on the Optimization of Excipients for the Spray-Drying Process. *Polymers* **2021**, *13* (24), 4302. <https://doi.org/10.3390/polym13244302>.