

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034057**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.23

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)

(21) Номер заявки
201370127

(22) Дата подачи заявки
2011.11.21

(54) СПОСОБ СОКРАЩЕНИЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ДИАРЕИ, ВЫЗВАННОЙ КИШЕЧНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

(31) **61/416,667**

(32) **2010.11.23**

(33) **US**

(43) **2013.09.30**

(86) **PCT/US2011/061708**

(87) **WO 2012/071346 2012.05.31**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ПАНТЕРИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Старзл Тимоти В. (US)

(74) Представитель:
**Дементьев В.Н., Клюкин В.А.,
Христофоров А.А., Угрюмов В.М.,
Лыу Т.Н., Гизатуллина Е.М.,
Карпенко О.Ю., Строкова О.В.,
Глухарёва А.О. (RU)**

(56) **US-A-4748018**

Playford, et al. Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders. Am J. Clin. Nutr. 2000, 72(1):5-14; pg. 9, col. 1, In 1-2

US-A1-20090142377

US-A1-20090317421

US-A-4341763

Zeitlin, et al. Preventing infectious disease with passive immunization. Microbes and Infection 2000, 2:701-708

Weiner et al. Passive immunity against human pathogens using bovine antibodies. Clin. Exp. Immunol. 1999; 116:193-205

(57) Изобретение предлагает применение композиции, содержащей: а) смесь поликлональных антител IgY, их фрагментов или их смесь, специфичных для антигенов, полученных из энтеропатогенов или желудочно-кишечных патогенов, вызывающих гастроэнтерит, токсинов, связанных с патогеном, или адгезивных элементов, связанных с патогеном, или их комбинации; и б) коровье молозиво, для сокращения продолжительности диареи, вызванной кишечной инфекцией, у человека, не являющегося новорожденным. Изобретение также предлагает способ сокращения продолжительности диареи, вызванной кишечной инфекцией, у человека, не являющегося новорожденным, включающий введение человеку, не являющемуся новорожденным, эффективного количества указанной композиции.

B1**034057****034057****B1**

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка подана 21 ноября 2011 г. как международная заявка РСТ от имени PanTherux, Inc., американской национальной корпорации, указанной в качестве заявителя во всех странах, кроме США, и Timothy W. Starzl, гражданина США, и испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/416 667, поданной 23 ноября 2010 г., которая включена в настоящее описание посредством отсылки в полном объеме.

Область изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает композиции и способы для пассивной иммунизации. В вариантах осуществления описана композиция, содержащая синергическую комбинацию специфических поликлональных антител с матрицей-носителем. Изобретение обеспечивает эффективные и экономичные композиции и способы лечения патогенных инфекций при клинических применениях широкого спектра, недифференцированных или смешанных. В одном варианте осуществления представлены композиции и способы лечения диареи и кишечных инфекций.

Уровень техники

Антитела, иммуноглобулины и другие биологические иммунные факторы (обобщаемые в настоящем описании как антитела) как природные, так и их синтетические аналоги, известны как терапевтические агенты в организме человека и животных. Антитела действуют путем связывания (посредством нековалентных сил) между антигенсвязывающим участком антитела и фрагментом антигена, называемым антигенной детерминантой или эпитопом. Антитела способны проявлять высокую степень специфичности. Например, стимулом для развития области, занимающейся изучением моноклональных антител, в основном послужило получение еще более специфических и точных характеристик связывания. Однако эта высокая специфичность может привести к чрезмерным ограничениям параметров связывания, проявляющимся в том, что функционально идентичные агенты или антигены взаимодействуют с иммунореагентом или иммунотерапевтическим агентом неодинаково. В то же время перекрестная реактивность, рассматриваемая, как правило, как ошибка или неспособность обеспечить специфичность связывания, является реакцией между антигеном и антителом, выработанным против сходного, но другого антигена. Контролируемую перекрестную реактивность можно эффективно использовать для расширения диапазона связывания антитела.

Молозиво естественным образом развилось у млекопитающих в процессе эволюции специально для доставки его компонентов новорожденным в желудочно-кишечный тракт и через него в виде очень концентрированной формы малого объема. Молозиво, как известно, содержит антитела, такие как IgA, IgG и IgM. Другие компоненты молозива включают лактоферрин, лизоцим, лактопероксидазу, комплемент и полипептиды, богатые пролином (ПББ). Также в молозиве содержится ряд цитокинов (небольших пептидных мессенджеров, которые контролируют функционирование иммунной системы), включая интерлейкины, фактор некроза опухоли, хемокины и др. Молозиво также содержит ряд факторов роста, таких как инсулиноподобные факторы роста I и II, трансформирующие факторы роста α , β -1 и β -2, факторы роста фибробластов, эпидермальный фактор роста, гранулоцитарно-макрофагальный стимулирующий фактор роста, тромбоцитарный фактор роста, фактор роста сосудистого эндотелия и колониестимулирующий фактор-I.

Антитела и кофакторы молозива могут обеспечивать пассивный иммунитет их получателю через грудное вскармливание. Обычно антитела и кофакторы поступают новорожденному от матери и обеспечивают первую защиту от патогенных микроорганизмов. Факторы роста также стимулируют развитие и восстановление пищеварительного тракта.

Одним из состояний, которые можно лечить с помощью пассивного иммунитета, является диарея. Диарея возникает, главным образом, в результате поступления патогенов в пищеварительный тракт. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) причиной диареи в 88% случаев во всем мире являются непригодная для питья вода, антисанитарные условия или несоблюдение правил гигиены. Указанные причины приводят к около 1,5 млн смертей в год, большинство из которых - гибель детей (Pruss-Ustun et al., Safer water, better health: costs, benefits and sustainability of interventions to protect and promote world health. World Health Organization, Geneva, 2008. ISBN 978 92 4 1596435).

Особую озабоченность в мировом сообществе вызывают случаи инфекционной диареи в развивающихся странах, которые являются причиной постоянной высокой заболеваемости и смертности, особенно среди детского населения. Например, по данным "Доклада о развитии человека" за 2009 г. Организации Объединенных Наций показатель младенческой смертности в Индии один из самых высоких в мире. Например, всемирная некоммерческая организация "Спасите Детей" ("Save the Children") сообщает, что каждые 15 с в Индии умирает один ребенок, и 90% таких смертей происходят от предотвратимых заболеваний, таких как диарея. Для профилактики диареи ВОЗ рекомендует применять вакцины против ротавируса и против кори, мытье рук с мылом, усовершенствованную систему снабжения питьевой водой и канализации; однако и эти меры не являются эффективными для лечения данного заболевания.

В большинстве стран мира стандартный протокол лечения диареи у детей включает одновременное введение антибиотиков и проведение пероральной регидратации. По многим причинам антибиотики являются лекарством, отпускаемым по рецепту. Антибиотики неэффективны при лечении вирусных ин-

фекций. Например, согласно оценкам, ротавирус является причиной примерно 40% всех случаев госпитализации, связанных с диареей среди детей в возрасте до пяти лет во всем мире (Weekly Epidemiological Record, vol. 83, no. 47, 21 November 2008). Неправильное использование антибиотиков может способствовать появлению резистентных штаммов бактерий. В свою очередь резистентные штаммы бактерий могут стать причиной инфекции. Даже при самых благоприятных обстоятельствах применение соответствующего антибиотика для снижения тяжести симптомов диареи может занять несколько дней.

Другим недостатком антибиотиков является то, что введение антибиотиков может вызывать разрушение как патогенных, так и полезных бактерий, присутствующих в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), что в дальнейшем может привести к высвобождению эндотоксичных липополисахаридов. (Holzheimer, The significance of endotoxin release in experimental and clinical sepsis in surgical patients - evidence for antibiotic-induced endotoxin release? Infection. 1998 Mar-Apr; 26(2):77-84). Эти эндотоксины имеют множество системных побочных действий, включая лихорадку, изменение числа белых кровяных телец в крови, диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови, гипотонию, шок и смерть, нарушение всасывания; в действительности, прямая инъекция довольно небольших доз эндотоксина приводит к смерти у большинства млекопитающих. Todar K. Bacterial Endotoxin. Textbook of Bacteriology. 2008. textbookofbacteriology.net.

По данным ВОЗ, для лечения диареи у детей рекомендуется проведение терапии пероральной регидратацией и цинком при непрерывном кормлении, включая грудное вскармливание. Сироп цинка или обогащенный цинком раствор для пероральной регидратации (РПР, 40 мг/л) обычно используется в дозе от 15 до 30 мг в день. Цинк является недорогим средством, но обладает умеренной эффективностью. Применение сиропа цинка вызывает сокращение продолжительности острой диареи лишь примерно на 25% и на 40% снижение числа случаев неудачных результатов лечения или летальных исходов. (Butta et al. Therapeutic effects of oral zinc in acute and persistent diarrhea in children in developing countries: pooled analysis of randomized controlled trials. The American Journal of Clinical Nutrition. 2000; 72(6):1516-22). В одном исследовании оценивали эффективность и безопасность обогащенных цинком (40 мг/л) РПР среди 1219 детей, страдающих острой диареей. Клинические результаты, полученные для группы, принимавшей обогащенные цинком РПР, были ненамного лучше по сравнению с результатами для контрольной группы, получавшей только стандартные РПР. В этом исследовании в группе, принимавшей цинк-РПР, общее количество случаев стула было ниже по сравнению с общим количеством случаев стула в контрольной группе. Существенного влияния на продолжительность диареи или риск длительной диареи отмечено не было (Bahl R., Bhandari N., Saksena M., et al. Efficacy of zinc-fortified oral rehydration solution in 6- to 35-month-old children with acute diarrhea. J. Pediatr 2002; 141:677-82).

Известно, что антибиотики неэффективны для лечения вирусных инфекций, например ротавирусной инфекции. Другие вмешательства имеют ограниченную эффективность. Кроме того, подходящие средства диагностики для определения причин диареи не всегда доступны и приемлемы.

Очевидно, что появление быстрого, эффективного и экономичного варианта лечения недифференцированной диареи является желательным. Сохраняется потребность в эффективных, экономичных композициях и способах лечения диареи и кишечных инфекций при клинических применениях широкого спектра, недифференцированных или смешанных.

Краткое описание изобретения

В изобретении предложено применение композиции, содержащей: а) смесь поликлональных антител IgY, их фрагментов или их смесь, специфичных для антигенов, полученных из энтеропатогенов или желудочно-кишечных патогенов, вызывающих гастроэнтерит, токсинов, связанных с патогеном, или адгезивных элементов, связанных с патогеном, или их комбинации; и где патогены включают *Escherichia coli*, ротавирус и коронавирусы; и б) коровье молоко для сокращения продолжительности диареи, вызванной кишечной инфекцией, у человека, не являющегося новорожденным. В одном из вариантов кишечная инфекция представляет собой недифференцированную диарею, ротавирусную диарею или брюшной тиф. В одном из вариантов недифференцированная диарея представляет собой недифференцированную диарею у детей. В одном из вариантов смесь IgY дополнительно включает IgY, специфическое для антигенов, полученных из одного или более патогенов, выбранных из группы, состоящей из *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Shigella dysenteriae*, *Plesiomonas shigelloides*, энтеропатогенного *E. coli*, энтеротоксигенного *E. coli*, энтероаггративного *E. coli*, энтероинвазивного *E. coli*, гемолитического *E. coli*, *Clostridium difficile*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio* O139, Non-O1 *Vibrios*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium perfringens*, энтерогепатического *Helicobacter*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Gardnerella* spp., *Mycoplasma* spp., *Streptococcus* spp. группы А, калицивируса, кишечного аденовируса, цитомегаловируса, астровируса, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, вируса опоясывающего герпеса, *Fusarium* spp. и *Acanthamoeba* spp. В одном из вариантов смесь IgY включает совокупность IgY, специфических для антигенов, полученных из *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* K99 pili фактора адгезии, энтеротоксигенного *E. coli* spp., токсина *Clostridium perfringens*, ротавируса и коронавируса. В одном из вариантов токсин, связанный с патогеном, выбран из эндотоксина липополисахарида (LPS) или AB5 экзотоксина. В одном из вариантов адгезивный элемент, связанный с патогеном, включает адгезины K99, K88, 987P или

F41 факторы адгезии или их комбинацию. В одном из вариантов молозиво - это негипериммунное коровье молозиво. В одном из вариантов молозиво - это сухое жирное коровье молозиво. В одном из вариантов смесь IgY находится в твердой форме. В одном из вариантов композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый разбавитель, связующее вещество, наполнитель, смазывающее вещество, подсластитель, ароматизатор, увлажняющий агент или абсорбент. В одном из вариантов смесь IgY содержится в от 1 до 7 г сухого иммунного яйца на дозу. В одном из вариантов композиция содержит от 1 до 7 г сухого коровьего молозива на дозу. В одном из вариантов композиция представляет собой питательную композицию. В изобретении также предложен способ сокращения продолжительности диареи, вызванной кишечной инфекцией, у человека, не являющегося новорожденным, включающий введение человеку, не являющемуся новорожденным, эффективного количества композиции, содержащей: а) смесь поликлональных антител IgY, их фрагментов или их смесь, специфичных для антигенов, полученных из энтеропатогенов или желудочно-кишечных патогенов, вызывающих гастроэнтерит, токсинов, связанных с патогеном, или адгезивных элементов, связанных с патогеном, или их комбинации; и где патогены включают *Escherichia coli*, ротавирус и коронавирусы; и б) коровье молозиво.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана средняя частота стула в течение пятидневного периода для 2 групп, подвергаемых испытаниям в реальных условиях, по сравнению с отрицательным контролем для композиции из примера 1А. В испытании 1 (n=29) и испытании 2 (n=31) композицию из примера 1А вводят один раз в день в течение трех дней с антибиотиком и солями для пероральной регидратации (СПР). В группе отрицательного контроля (n=28) вводят только антибиотик и СПР без композиции согласно настоящему изобретению.

На фиг. 2 показана усредненная консистенция эпизодов стула в день по шкале от 1 до 5 (1 = нормальная и 5 = жидкая) в течение того же пятидневного периода для тех же трех групп, данные для которых показаны на фиг. 1.

На фиг. 3 показана усредненная оценка состояния больного врачом по шкале от 1 до 5 (1 = нормальное и 5 = тяжелое) за тот же пятидневный период для тех же трех групп, данные для которых показаны на фиг. 1.

На фиг. 4 показана средняя частота стула в день в течение пятидневного периода для 3 групп, подвергавшихся исследованиям (испытаниям) в натуральных условиях. Испытания 1 и 2 и отрицательный контроль такие, как показаны на фиг. 1. В испытании 3 (n=140) пациентам вводили композицию из примера 1В с антибиотиком и СПР.

На фиг. 5 показана усредненная консистенция эпизодов стула в день по шкале от 1 до 5 (1 = нормальная и 5 = жидкая) за тот же пятидневный период для тех же четырех групп, данные для которых показаны на фиг. 4.

На фиг. 6 показана усредненная оценка состояния больного врачом по шкале от 1 до 5 (1 = нормальное и 5 = тяжелое) за тот же пятидневный период для тех же четырех групп, данные для которых показаны на фиг. 4.

На фиг. 7 показана средняя частота стула в день в течение пятидневного периода для испытаний 1 и 2, отрицательного контроля, испытание 3 разбито на 6 подгрупп (ES204А): 2 г высушенного распылением яйца с 4 г молозива вводили в течение 3 дней; (ES204В): 2 г высушенного распылением яйца с 4 г молозива вводили в течение 2 дней; (MT204А) 2 г термически высушенного яйца с 4 г молозива в течение 3 дней; (MT304А) 3 г термически высушенного яйца с 4 г молозива вводили в течение 3 дней; (MS204А) 2 г высушенного распылением яйца с 4 г молозива вводили в течение 3 дней; (MS304А) 3 г высушенного распылением яйца с 4 г молозива вводили в течение 3 дней.

На фиг. 8 показана усредненная консистенция эпизодов стула в день по шкале от 1 до 5 (1 = нормальная и 5 = жидкая) за тот же пятидневный период для тех же групп, данные для которых показаны на фиг. 7.

На фиг. 9 показана усредненная оценка состояния больного врачом по шкале от 1 до 5 (1 = нормальное и 5 = тяжелое) за тот же пятидневный период для тех же групп, данные для которых показаны на фиг. 7.

Подробное описание

В изобретении предложены композиции и способы пассивной иммунизации, в которых специфически связывающая молекула, такая как специфический иммуноглобулин, скомбинирована с матрицей-носителем с получением композиции для перорального введения или введения через слизистую оболочку для терапии в отношении микроорганизмов, в том числе лечения или профилактики патогенной инфекции или нежелательного штамма. В вариантах осуществления указанные композиции вводят субъекту, не являющемуся новорожденным.

В одном из вариантов предложена композиция для введения человеку, не являющемуся новорожденным, для терапии в отношении микроорганизмов, при этом указанная композиция содержит по меньшей мере одну специфически связывающую молекулу или ее фрагмент, полученную из адаптивной иммунной системы животного, причем специфически связывающая молекула выбрана из иммуноглобулина, антитела, пептида, вариативного рецептора лимфоцитов, фактора передачи или их смеси, а мат-

рица-носитель содержит два или более компонентов врожденной иммунной системы млекопитающего, не являющегося человеком, при этом указанная матрица может быть выбрана или получена из компонентов молозива, молока, сыворотки, плазмы, слюны, лимфатической жидкости, жидкости слизистой или слезной жидкости; причем указанные матрица и специфически связывающая молекула получены от разных видов.

В предпочтительном варианте матрица-носитель состоит из коровьего молозива.

В другом варианте осуществления матрица содержит компоненты врожденной иммунной системы, которые выбраны из лизоцима, фосфолипазы, дефензинов, опсонинов, компонентов системы комплемента, β -лизина, пептидов, богатых белком (ПББ), (ПББ), лактоферрина, трансферрина, цитокинов, интерлейкинов, хемокинов, интерферонов, ФНО- α , фибронектина, лейкоцитов, белых кровяных телец, фагоцитов, макрофагов, моноцитов, нейтрофилов, полиморфноядерных клеток, дендритных клеток, тучных клеток, эозинофилов, базофилов, натуральных клеток-киллеров (NK), клеток лимфокин-активированных киллеров (ЛАК), дефензинов, эластазы, катепсина G, миелопероксидазы и НАДФН-оксидазы. В различных вариантах осуществления указанная композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель. В других вариантах осуществления композиция включает носитель для пищевых продуктов. В вариантах осуществления композиции могут быть введены посредством пероральной доставки, назально, глазного введения или комбинаций указанных способов.

В других вариантах осуществления композиция не включает экзогенно добавленного полимера, сополимера, липосомы, гидрогеля или фибрина. В других вариантах осуществления композиция не содержит микросфер или микрокапсул. В еще одном варианте осуществления изобретения композиция не включает экзогенно добавленного антигена. В другом варианте осуществления изобретения специфически связывающие молекулы специфически связываются с патогеном; токсином, связанным с патогеном; адгезивным элементом, связанным с патогеном, нежелательными штаммами или их комбинациями. В одном аспекте патоген включает человеческий или ветеринарный, кишечный или желудочно-кишечный, патоген, вызывающий гастроэнтерит. В различных аспектах патоген или нежелательный штамм выбран из группы, состоящей из *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Shigella dysenteriae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Escherichia coli* [включая (EPEC) энтеропатогенного *E. coli*, (ETEC) энтеротоксигенного *E. coli*, (EaggEC) энтероаггративного *E. coli*, (EIEC) энтероинвазивного *E. coli* и (EHEC) геморрагического *E. coli*], *Clostridium difficile*, *Yersinia enterocolitica*, холерный вибрион O1 (*Vibrio cholera* O1), *Vibrio* O139, Non-O1 *Vibrios*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, энтеропатогенного *Helicobacter* (включая *Helicobacter pylori*), золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*), клебсиеллы (*Klebsiella*), ротавируса, коронавируса, норовируса, калицивируса, кишечного аденовируса, цитомегаловируса, астровируса, пневмококка (*S. pneumoniae*), гемофильной палочки (*H. influenzae*), *Neisseria gonorrhoeae*, вируса опоясывающего герпеса, *Fusarium* spp. и *Acanthamoeba* spp.

В конкретном аспекте токсин, связанный с патогеном, включает эндотоксин или экзотоксин.

В другом конкретном аспекте адгезивный элемент, связанный с патогеном, включает адгезины, кадерины, реснички, фимбриллу, вирусную структуру адгезии или их комбинацию.

В различных вариантах осуществления композиция вводится перорально в количестве, эффективном для лечения или профилактики недифференцированной диареи, диареи путешественников, ротавирусной диареи, токсин-опосредованной диареи, холеры, инфекции *C. difficile*, дизентерии, брюшного тифа, пептических язв или регулирования флоры желудочно-кишечного тракта. В другом аспекте эффективное количество композиции передает субъекту пассивный иммунитет.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу получения композиции согласно изобретению посредством следующих этапов: (а) получение от животного по меньшей мере одной специфически связывающей молекулы или ее фрагмента, которая связывается со специфическим антигеном, при этом специфически связывающая молекула выбрана из иммуноглобулина, антитела, пептида, варибельного рецептора лимфоцитов, фактора передачи и их смеси; (б) получение по меньшей мере одной матрицы-носителя, содержащей по меньшей мере два компонента, полученных из животного, не являющегося человеком, выбранного из группы, состоящей из ферментов, лактоферрина, трансферрина, неспецифических иммуноглобулинов, цитокинов, белых кровяных телец, компонентов комплемента, интерферонов и фибронектина; (в) получение твердых форм матрицы-носителя и специфически связывающей молекулы или ее фрагмента; и (г) смешивание твердой формы матрицы-носителя с твердой формой специфически связывающей молекулы или ее фрагмента.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения композиции, передающей иммунитет. Способ включает: (а) получение по меньшей мере одного специфически нацеленного иммунного фактора экзогенного происхождения, (б) получение по меньшей мере одного специфически нацеленного иммунного фактора экзогенного происхождения в форме порошка, (в) получение по меньшей мере одной матрицы-носителя экзогенного происхождения, возможно матрицы-носителя экзогенного происхождения, смешанной со смесью агентов для поддержки и взаимодействия со специфически нацеленным иммунным фактором экзогенного происхождения, (г) получения по меньшей

мере одной матрицы-носителя экзогенного происхождения в форме порошка, и (д) смешивания порошкообразной формы со стадии (б) с порошкообразной формой со стадии (г) с получением композиции, передающей пассивный иммунитет. В одном аспекте композиция, передающая пассивный иммунитет, включает состав с регулируемой дозой. В некоторых аспектах композиция, передающая пассивный иммунитет, включает фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых аспектах композиция, передающая пассивный иммунитет, не содержит полимер, сополимер, липосому, гидрогель или фибрин. В некоторых аспектах композиция, передающая пассивный иммунитет, не содержит микросферы или микрокапсулы. В некоторых аспектах композиция, передающая пассивный иммунитет, не содержит иммуноген или антиген.

Настоящее изобретение включает по меньшей мере одну из следующих отличительных характеристик: (а) оно позволяет разработать модель матрицы, специфические факторы и активирующие события для конкретных или целевых заболеваний, (б) оно обеспечивает состав с регулируемой дозой из множества смесей и компонентов, которую можно отрегулировать для необходимого эффекта, (в) оно обеспечивает состав с регулируемой дозой, в котором определенные компоненты находятся в избытке по отношению к нормальным физиологическим уровням, которые могут быть достигнуты в природных системах, (г) оно использует сложные взаимодействия, происходящие с участием множества компонентов и по множеству путей, для создания эффекта системы, который имитирует ответ врожденной иммунной системы; (д) оно обеспечивает создание предварительно обработанного или потенцированного пассивного иммунного ответа, который может быть введен в потенцированном состоянии и впоследствии активируется присутствием целевых патогенов, токсинов, болезненным состоянием или синдромом, (е) оно обеспечивает создание составов, которые обладают определенной специфичностью или широким спектром действия с целью соответствия потребностям конкретного целевого болезненного состояния или синдрома, или среды использования, в которой должен применяться указанный продукт, и (ж) обеспечивает создание составов, которые могут быть предназначены для профилактики, а также для терапевтического воздействия.

В другом аспекте путем регулирования количеств специфически связывающих молекул, таких как поликлональные антитела, в композиции может быть получен состав с регулируемой дозой.

В предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере одна специфически связывающая молекула включает иммуноглобулин Y (IgY), полученный из иммунизированных кур. В других конкретных аспектах IgY включает совокупность IgY, характерных по меньшей мере для энтеротоксигенного *E.coli* spp., *E.coli* K99 pili фактора адгезии, *Clostridium perfringens* toxoid, *Salmonella typhimurium*, ротавируса и коронавируса. В другом варианте композиция наносится местно на слизистую мембрану.

В другом варианте патоген включает патоген, вызывающий вагинит. В некоторых аспектах патоген выбран из группы, состоящей из *Gardnerella* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydiae trachomatis*, *Mycoplasma* spp., *Campylobacter jejuni*, *Trichomonas vaginalis*, вируса герпеса 1 типа, вируса герпеса 2 типа, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* и *Candida krusei*.

В другом варианте патоген представляет собой бактерию стрептококка *Streptococcus* группы A.

В другом варианте патоген включает патоген, вызывающий конъюнктивит, выбранный из группы, состоящей из золотистого стафилококка *S.aureus*, пневмококка *S.pneumoniae*, гемофильной инфекции *H.influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, аденовируса, вируса простого герпеса, вируса опоясывающего герпеса, энтеровирусов, *Fusarium* spp, *Candida* spp. и *Acanthamoeba* spp.

В другом варианте осуществления композиции согласно настоящему изобретению полезны в качестве питательных композиций для введения субъекту, нуждающемуся в этом, страдающему от заболевания, которое требует соблюдения специальной диеты, такого как диарея у детей, болезнь Крона и язвенный колит.

Определения

Термины "предупреждение", "предупреждать", "предотвращение", "профилактика", используемые в настоящем описании, относятся к действиям (таким как введение соединения или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению), инициируемым до начала клинического проявления заболевания или состояния для того, чтобы предотвратить или уменьшить такое клиническое проявление заболевания или состояния. Для того чтобы оказывать полезный эффект, такие предупреждение и подавление не обязательно должны быть полными. Термины "лечение", "лечить" и "проведение лечения" в настоящем описании относятся к действиям (например, введение соединения или фармацевтической композиции), инициированным после начала клинического проявления заболевания или состояния для того, чтобы устранить или уменьшить такое клиническое проявление заболевания или состояния. Такое лечение не обязательно должно быть завершенным, чтобы оказывать полезный эффект.

Термин "нуждается в лечении", используемый в настоящем описании, относится к заключению, сделанному лицом, осуществляющим уход, о том, что пациенту требуется или принесет пользу лечение. Такое заключение принимается на основе целого ряда факторов, которые находятся в области компетенции лица, осуществляющего уход, но которая включает знание того, что пациент болен или будет болен в результате состояния, которое поддается лечению способом, соединением или фармацевтической композицией согласно изобретению.

Термин "нуждается в профилактике", используемый в настоящем описании, относится к заключению, сделанному лицом, осуществляющим уход, о том, что пациенту требуется или будет полезна профилактика. Такое заключение принимается на основе целого ряда факторов, которые находятся в области компетенции лица, осуществляющего уход, но которая включает знание того, что пациент будет болен или возможно будет болен в результате состояния, которое поддается профилактике способом, соединением или фармацевтической композицией согласно изобретению.

Термины "индивидуум", "субъект" или "пациент", используемые в настоящем описании, относятся к любому животному, включая птиц или млекопитающих, таких как мыши, норвежские крысы, хлопковые крысы, песчанки, морские свинки, хомяки, другие грызуны, кролики, собаки, кошки, свиньи, крупный рогатый скот, овцы, козы, лошади или приматы и человек. Данный термин может обозначать мужскую особь или женскую особь или обоих, или исключать мужскую особь или женскую особь. В одном аспекте пациент является взрослым человеком. В другом аспекте пациент представляет собой младенца человека до года, не являющегося новорожденным. В другом аспекте пациентом является младенец в возрасте от года до трех лет, ребенок или подросток.

Термин "новорожденный" или только что родившийся относится к младенцу в первые 28 дней после рождения. Термин "не являющийся новорожденным" относится к животному старше 28 дней.

Термин "эффективное количество", используемый в настоящем описании, означает количество агента, либо отдельно, либо как часть фармацевтической композиции, которое способно оказывать какое-либо заметное положительное влияние на любой симптом, аспект, характеристики заболевания или состояния. Такой эффект не обязательно должен быть абсолютным, чтобы быть полезным.

Термин "включая", используемый в настоящем описании, означает "неограниченный в объеме" таким образом, что предполагаются дополнительные элементы как возможное дополнение к перечисленным; этот термин в любом случае может подразумевать "включающий, но не ограниченный".

Термин "иммунизировать", "активно иммунизировать", "проведение активной иммунизации" и "активная иммунизация" означает целенаправленную иммунизацию субъекта, подвергая его воздействию антигена, например, антигена, полученного из микроорганизма, такого как, но не ограничиваясь ими, вирус или бактерия; подобный контакт может быть осуществлен путем воздействия на субъект интактного организма, аттенуированного организма, части организма, одного или нескольких антигенов, присутствующих в указанном организме, или комбинации вышеуказанных.

Термин "пассивно иммунизировать", "проводить пассивную иммунизацию" и "пассивная иммунизация" означает обеспечение субъекта антителом против антигена, например антигена, полученного из микроорганизма, такого как, но не ограничиваясь ими, вирус или бактерия, не вызывая неизбежно возникающий иммунный ответ на данный организм у субъекта. Пассивная иммунизация обеспечивает мгновенную защиту, но в результате нее у субъекта не развиваются клетки памяти.

Термин "пассивный иммунитет", используемый в настоящем описании, относится к искусственно приобретенному иммунитету, который достигается путем передачи антител субъекту. Термины "яйцо" или "яичный продукт", каждый, означает целое яйцо в скорлупе птичьего происхождения (обычное, иммунизированное или другое) или любой продукт или часть, полученные из него.

Термины "иммунное яйцо" или "иммунный яичный продукт", каждый, означает целое яйцо или какой-либо продукт или часть, полученные из него, полученные от животных, несущих яйца, которых поддерживали в иммунизированном состоянии.

Термин "антиген" относится к объекту или его фрагменту, которые могут индуцировать иммунный ответ в организме, в частности, животного. Этот термин включает иммуногены и его области, ответственные за антигенные свойства или антигенные детерминанты.

Термин "поликлональное антитело" относится к антителам, которые представляют собой гетерогенные популяции молекул антител, полученные из сыворотки животных, иммунизированных антигеном или его антигенной функциональной производной. Для получения поликлональных антител различные животные-носители могут быть иммунизированы инъекцией антигена. В зависимости от вида носителя для усиления иммунного ответа могут быть использованы различные адъюванты.

Термин "моноклональное антитело" хорошо известно в данной области и относится к антителу, производимому серийно в лаборатории из одного клона и распознающему только один антиген. Моноклональные антитела, как правило, получают путем слияния обычной короткоживущей продуцирующей антитела В-клетки с быстрорастущей клеткой, такой как раковая клетка (иногда называемой "бессмертной" клеткой). Полученная гибридная клетка, или гибридома, быстро размножается, создавая клон, который производит большие количества антитела. "Моноклональные антитела" являются, по существу, однородными популяциями антител, направленных к конкретному антигену или эпитопу. Они могут быть получены любым способом, который обеспечивает производство молекул антител стабильными клеточными линиями при культивировании.

Моноклональные антитела могут быть получены способами, известными специалистам в данной области. См., например, Kohler, et al., Nature 256:495-497, 1975 и патент US 4376110.

Термин "кристаллический" относится к антителу, такому как моноклональное антитело, которое очищают путем кристаллизации, например путем массовой кристаллизации. Кристаллические антитела

могут быть использованы для того, чтобы генерировать высококонцентрированные формы небольшого объема (Yang, et al., 2003, Crystalline antibodies for subcutaneous delivery. PNAS 100 (12):6934-6939). Термин "недифференцированная диарея" означает, что возбудитель диареи не выявлен.

Термин "фрагмент антитела" включает в себя любой синтетический белок или белок, полученный генной инженерией, который действует как антитело посредством связывания с конкретным антигеном с образованием комплекса. Например, фрагменты антител включают изолированные фрагменты, "Fv" фрагменты, состоящие из переменных областей тяжелой и легкой цепей, молекулы рекомбинантного одноцепочечного полипептида, в котором переменные области легкой и тяжелой цепей соединены пептидным линкером ("scFv белки"), и минимальные рекогниционные единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гиперпеременную область. Фрагменты антител включают часть антитела, такую как F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, sFv и т.п. Независимо от структуры фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, который распознается интактным антителом. Термин "фактор передачи" означает иммунную молекулу массой примерно 5000 Да, состоящую из аминокислот, которые вызывают антигенспецифический клеточно-опосредованный иммунитет, преимущественно гиперчувствительность замедленного типа и производство лимфокинов, а также связывание их с антигенами (Kirkpatrick 1993, Structural nature and functions of transfer factors. Ann. N.Y. Acad. Sci. 685:362-368).

Термин "переменные рецепторы лимфоцитов" означает лимфоцит-производные молекулы, обнаруженные у бесчелюстных позвоночных, таких как минога и миксина. Эти животные обладают множеством переменных рецепторов лимфоцитов, которые производятся только из небольшого числа генов и которые связываются с патогенными антигенами аналогично антителам и с той же степенью специфичности (Alder et al., 2005, Diversity and function of adaptive immune receptors in a jawless vertebrate. Science, 310(5756): 1970-1973).

Термин "клеточный рецептор" относится к лиганд-связывающему фрагменту В-клеточного рецептора; мембраносвязанной молекулы иммуноглобулина одного изотипа (например, IgD, IgM, IgE). Они идентичны своим секретируемым формам за исключением присутствия области целостности мембраны.

Термин "специфическое связывание" в контексте характеристики специфически связывающих молекул, также известных как специфически нацеленных иммунных факторов, такие как антитело, фрагмент антитела, переменный рецептор лимфоцитов или фактор передачи, относится к способности связывается предпочтительно с конкретным антигеном, который присутствует в однородной смеси различных антигенов. В определенных вариантах при осуществлении специфического связывания будет происходить различие желательных и нежелательных антигенов (например, "целевого" и "нецелевого" антигенов) в образце, в некоторых вариантах реализации больше чем от примерно 10 до 100 раз или более (например, более чем примерно 1000 или 10000 раз). В некоторых вариантах осуществления изобретения специфически связывающая молекула может специфически связываться с эпитопом, общим для различных видов или штаммов микроорганизма по сравнению с эпитопами, не являющимися общими. В некоторых вариантах осуществления сродство между антителом и антигеном, когда они специфически связываются в комплекс антитело-антиген, характеризуется K_D (константа диссоциации) менее 10⁻⁶ М, менее 10⁻⁷ М, менее 10⁻⁸ М, менее 10⁻⁹ М, менее 10⁻¹⁰ М, менее 10⁻¹¹ М или менее примерно 10⁻¹² М или менее.

Термин "врожденная иммунная система" или неспецифическая иммунная система относится к клеткам, молекулярным компонентам и механизмам, которые защищают хозяина от инфекции посредством других организмов неспецифическим образом. Клетки и молекулярные компоненты врожденной иммунной системы распознают и реагируют на патогены в общем виде, но в отличие от адаптивной иммунной системы он не придает долгосрочный или защитный иммунитет субъекту. Врожденная иммунная система обеспечивает немедленную защиту от инфекции. Позвоночные обладают вторым уровнем защиты - адаптивной иммунной системой, которая активируется в результате естественного ответа.

Термин "адаптивная иммунная система" относится к узкоспецифическим, системным клеткам и процессам, которые распознают и реагируют на антиген, например устраняют, нейтрализуют или предотвращают рост патогена. Система очень легко адаптируема благодаря соматической гипермутации (процесс ускоренной соматической мутации) и V(D)J рекомбинации (необратимой генетической рекомбинации генных сегментов антигенных рецепторов). Адаптивный иммунитет также относится к приобретенному иммунитету и создает иммунологическую память. Адаптивный иммунный ответ является патоген- и антиген-специфическим, и между воздействием и максимальным ответом существует разрыв по времени. Адаптивный иммунный ответ основан на принципе распознавания клонов таким образом, что после первого воздействия антигена примированные лимфоциты или превращаются в иммунные эффектор-клетки или образуют расширенный пул клеток памяти, которые реагируют на вторичное воздействие того же антигена путем роста усиленного и более быстрого ответа. Термин "животное" относится к определению животного мира. Все местоимения используются в наиболее широких их значениях. Если не указано иное, местоимения женского рода охватывают мужской пол, мужские местоимения охватывают женский, местоимения единственного числа охватывают местоимения множественного числа, и местоимения множественного числа охватывают местоимения единственного числа.

Числовые диапазоны, используемые в настоящем описании, предполагают включение каждого чис-

ла и подмножество чисел, содержащихся в этих диапазонах, вне зависимости раскрыты они конкретно или нет. Кроме того, эти числовые диапазоны должны рассматриваться как основание пункта формулы, относящегося к любому числу или подмножеству чисел в этом диапазоне. Например, раскрытие от 1 до 10 должно рассматриваться как основание для диапазона от 2 до 8, от 3 до 7, от 5 до 6, от 1 до 9, от 3,6 до 4,6, от 3,5 до 9,9 и так далее.

Все патенты, публикации патентов и рецензированные публикации (т.е. "ссылки"), цитируемые в настоящем описании, включены явным образом посредством ссылки в той же мере, как если бы было указано, что каждая отдельная ссылка конкретно и индивидуально включена посредством ссылки. В случае противоречия между настоящим изобретением и указанными ссылками действительным следует считать описание изобретения.

Способы изобретения

Изобретение раскрывает композиции и способы, полезные для терапии в отношении нежелательных штаммов или патогенных микроорганизмов. Один вариант осуществления данного изобретения основан на способе создания состава на основе нацеленных антител, встроенных или включенных в матрицу-носитель, где антитела используют контролирующую форму перекрестной реактивности в отношении множества кластеров родственных целевых антигенов, и где матрица-носитель содержит подложку и кофакторы, которые усиливают действие антител. Польза таких составов "антитело/матрица" может включать предоставление терапевтических вмешательств широкого спектра при условиях, когда класс возбудителя, но не определенный или конкретный возбудитель, известен или предполагается, или в условиях, когда активными являются множество (смесь) возбудителей.

Был разработан новый подход к применению антител подобным образом, использующий преимущество и специфичности, и характеристик перекрестной реактивности антител, а также дополнительно использует компоненты матрицы-носителя для получения многокомпонентного иммунного ответа *in situ*. В этом варианте осуществления антитела предназначены для связывания со всеми из нескольких тесно связанных эпитопов, которые представляют собой структурно родственный кластер антигенов. Эти антигены могут значительно отличаться в остальном и могут происходить из различных источников, организмов или видов.

В одном варианте осуществления изобретение содержит способ специфического связывания молекул (иммунных факторов, например, антител) в матрице-носителе, где специфически связывающие молекулы обладают специфичностью в отношении класса родственных антигенов, и специфически перекрестно-реактивны к различным экземплярам представителей этого класса. Существует степень структурного сходства в родственных кластерах антигенов-мишеней, невзирая на организм или патоген, который является источником антигена. Сходство в структуре может привести к явлению, которое известно как "перекрестная реактивность" (стерическое связывание реакционноспособной молекулы с антигеном отличного от целевого антигена). Перекрестная реактивность часто случайна и в большинстве случаев считается источником ошибок и неспецифичности. Тем не менее, в данном варианте осуществления объем и степень перекрестной реактивности контролируются с помощью различных средств для ограничения и направления ее экспрессии таким образом, чтобы обеспечить желаемые характеристики. В результате такого лечения пациенты приобретают пассивный иммунитет. Характер лечения обеспечивает то, что факторы рисков, связанных с ним, сопоставимы с таковыми от принятия пищи из источника, где антитела были собраны (например, факторы риска будут аналогичны употреблению в пищу яйца и стакана молока). Данное лечение является эффективным и характеризуется меньшей токсичностью, чем существующие в настоящее время альтернативные вмешательства.

Данное изобретение основано на фундаментальном открытии, что использование матрицы-носителя экзогенного происхождения (содержащей компоненты, полученные от животного, отличного от животного, подлежащего лечению) в сочетании со специфически нацеленными иммунными факторами экзогенного происхождения (полученными или соответствующими иммунным факторам, полученными от животного, отличного от животного, подлежащего лечению) может быть использовано для транспортировки и введения эффективного многопараметрического иммунитета субъекту, нуждающемуся в этом.

В одном аспекте изобретение обеспечивает композицию, содержащую: а) количество по меньшей мере одной специфически связывающей молекулы или ее фрагмента, полученной от животного и специфически связывающейся с антигеном, эффективное для человека, не являющегося новорожденным, причем специфически связывающая молекула выбрана из иммуноглобулина, антитела, пептида, варибельного рецептора лимфоцита, факторов передачи и их смеси, и б) матрицу-носитель, содержащую по меньшей мере два компонента, полученные от животного, не являющегося человеком, выбранные из группы, состоящей из ферментов, лактоферрина, трансферрина, неспецифических иммуноглобулинов, цитокинов, белых кровяных телец, компонентов комплемента, интерферонов и фибронектина, при этом по меньшей мере одна специфически связывающая молекула и по меньшей мере два компонента матрицы-носителя получены от разных животных.

В другом аспекте изобретение обеспечивает способ получения композиции, включающий: (а) получение по меньшей мере одной специфически связывающей молекулы или ее фрагмента от животного,

которая связывается со специфическим антигеном, причем специфически связывающая молекула выбрана из иммуноглобулина, антитела, пептида, варибельного рецептора лимфоцитов, фактора передачи и их смеси, (б) получение по меньшей мере одной матрицы-носителя, содержащей по меньшей мере два компонента, полученные из животного, не являющегося человеком, выбранных из группы, состоящей из ферментов, лактоферрина, трансферрина, неспецифических иммуноглобулинов, цитокинов, белых кровяных телец, компонентов комплемента, интерферонов и фибронектина; (в) получение твердых форм матрицы-носителя и специфически связывающей молекулы или ее фрагмента; и (г) смешивание твердой формы матрицы-носителя с твердой формой специфически связывающей молекулы или ее фрагмента.

В еще одном аспекте композиции согласно настоящему изобретению полезны при лечении или профилактике микробных инфекций. В вариантах микробные инфекции включают те, которые вызваны *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Shigella dysenteriae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Escherichia coli*, энтеропатогенным *E. coli*, энтеротоксигенным *E. coli*, энтероаггративным *E. coli*, энтероинвазивным *E. coli*, геморрагическим *E. coli*, *Clostridium difficile*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio* O139, Non-O1 *Vibriosis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium perfringens*, энтерогепатическим *Helicobacter*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, ротавирусом, коронавирусом, норовирусом, калицивирусом, кишечным аденовирусом, цитомегаловирусом и астровирусом. В вариантах осуществления композиции полезны для лечения или профилактики состояний, таких как недифференцированная диарея, диарея путешественников, ротавирусная диарея, токсинопосредованная диарея, холера, инфекция *C. difficile*, дизентерия, брюшной тиф, пептические язвы, вагиниты или регулирование флоры желудочно-кишечного тракта.

В конкретном варианте осуществления композиции и способы изобретения используются для лечения или профилактики диареи. Существует множество организмов, вызывающих диарею, включая вирусы, бактерии, паразиты и простейшие. Основные возбудители бактериальной инфекции, например, в Индии включают *Escherichia coli* spp., энтеротоксигенный *E. coli*, энтероадгезивный *E. coli*, *Aeromonas* spp., *Campylobacter jejuni*, *Shigella* spp., *Vibrio* spp., *Vibrio cholera* O1, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*), *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* и *Yersinia enterocolitica*. Вторичные причины включают *Clostridium difficile* (токсин А или В). Основной причиной вирусной диареи является ротавирусная инфекция, хотя известно, что диарею вызывают также *Calicivirus*, *Astrovirus*, *Norwalk* вирус и аденовирус. Вторичные причины вирусной диареи включают кишечный аденовирус, вирус простого герпеса и вирусный гепатит (John B. Sullivan and Gary R. Krieger, *Clinical Environmental Health and Toxic Exposures*, 2nd Ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2001, стр. 1040).

Также известны региональные и сезонные различия в распространении. Например, в Праграм, Индия, одно исследование показало, что на ротавирус приходилось в среднем 15-25% случаев диареи у детей. На энтеротоксигенную кишечную палочку *E. coli* приходилось от 10 до 20% от общего числа случаев диареи, при этом энтеропатогенная кишечная палочка вызвала диарею в примерно от 1 до 5% случаев. Инфекция *Campylobacter jejuni* вызвала примерно от 10 до 15%, и на *Shigella* пришлось примерно от 5 до 15% случаев диареи у детей. Холерный вибрион вызвал примерно от 5 до 10% случаев. *Salmonella* (не тифозная) вызвала примерно от 1 до 5% случаев. Протозойные инфекции в основном были вызваны *Cryptosporidium* (5-15%). Возбудитель непатогенной природы был идентифицирован в примерно от 20 до 30% случаев (Flicker, *Children in the Tropics*, Putting an end to diarrheal diseases, 1993-No. 204: 1-66).

Разные регионы внутри Индии приписывают случаи бактериальной диареи у детей различным патогенам с разной степенью распространенности. Например, в 866 образцах с положительным результатом посева, изученных в рамках исследования, проведенного в Ориссе, Индия, обнаружено *E. coli* sp. (75,5%), патогенная *E. coli* (13,2%), *Aeromonas* spp. (2%), *Shigella* spp. (4,5%), *Vibrio cholera* O1 (17,3%), *V. cholera* O139 (1%) и *Salmonella* spp. (0,7%). find-health-articles.com/rec_pub_18806340-incidence. В связи с широким разнообразием этиологии необходим эффективный, широкого спектра действия, экономичный и безопасный способ лечения недифференцированной диареи. Большинство случаев диареи у детей, вероятно, вызваны бактериальной и вирусной инфекциями, но необходима альтернатива антибиотикам и противовирусным средствам.

А. Композиции.

Один аспект данного изобретения относится к композиции, подходящей для лечения, профилактики или регулирования микробной флоры. В вариантах осуществления композиции полезны для лечения патогенных инфекций, в частности желудочно-кишечного тракта.

В вариантах осуществления изобретение обеспечивает композицию, содержащую:

а) количество по меньшей мере одной специфически связывающей молекулы или ее фрагмента, полученной от животного и специфически связывающейся с антигеном, эффективное для субъекта, не являющимся новорожденным, причем специфически связывающая молекула выбрана из иммуноглобулина, антитела, пептида, варибельного рецептора лимфоцитов, фактора передачи и их смеси; и

б) матрицы-носителя, содержащей по меньшей мере два компонента, полученных от животного, не являющегося человеком, выбранных из группы, состоящей из ферментов, лактоферрина, трансферрина, неспецифических иммуноглобулинов, цитокинов, белых кровяных телец, компонентов комплемента, интерферонов и фибронектина, причем по меньшей мере одна специфически связывающая молекула и

по меньшей мере два компонента матрицы-носителя получены от разных животных.

Специфически связывающие молекулы.

Композиции и способы изобретения обеспечивают специфически связывающие молекулы или их фрагменты, полученные от животного, и которые специфически связываются с антигеном. Специфически связывающая молекула включает антитело, фрагмент антитела, пептид, вариабельный рецептор лимфоцитов, фактор передачи и их смесь.

Антитела.

Антитела, иммуноглобулины и другие биологические иммунные факторы (совместно именуемые как антитела) как природные, так и их синтетические аналоги, известны как терапевтические агенты в организме человека и животных. Антитела действуют путем связывания (посредством нековалентных сил) между антигенсвязывающим участком антитела и фрагментом антигена, называемым антигенной детерминантой или эпитопом. Антитела способны проявлять высокую степень специфичности. Например, развитие области моноклональных антител произошло в основном под влиянием производства все более специфических и точных характеристик связывания. Однако эта высокая специфичность может привести к чрезмерным ограничениям параметров связывания, проявляющимся в том, что функционально идентичные агенты или антигены, взаимодействуют с иммунореагентом или иммунотерапевтическим агентом неодинаково. В то же время перекрестная реактивность, рассматриваемая, как правило, как ошибка или сбой, является реакцией между антигеном и антителом, которое было выработано против сходного, но другого антигена. Контролируемая перекрестная реактивность может эффективно использоваться для расширения диапазона связывания антитела.

Один из вариантов осуществления данного изобретения основан на способе создания состава на основе нацеленного антитела, встроенного или включенного в матрицу-носитель, где антитела используют контролируемую форму перекрестной реактивности в отношении множества кластеров родственных целевых антигенов, и где матрица-носитель содержит подложку и кофакторы, которые усиливают действие антител. Польза таких составов "антитело/матрица" может включать обеспечение терапевтических вмешательств широкого спектра при условиях, когда класс возбудителя, но не определенный или конкретный возбудитель, известен или предполагается, или в условиях, когда активными являются множество (смесь) возбудителей. Был разработан новый подход к применению антител подобным образом, использующий преимущества и специфичности, и характеристик перекрестной реактивности антител, а также дополнительно использующий компоненты в матрице-носителе для получения многокомпонентного иммунного ответа *in situ*. В этом варианте осуществления антитела предназначены для связывания со всеми из нескольких близкородственных эпитопов, которые представляют структурно родственный кластер антигенов. Эти антигены могут значительно отличаться в остальном и могут происходить из различных источников, организмов или видов.

Для целей настоящего изобретения антитела могут быть как моноклональными, поликлональными, полученными от любого животного, фрагментами, химерными, гуманизированными или любой другой формы, а антитела могут быть любого изотипа: например IgA, IgD, IgE, IgG и IgM (плацентарные млекопитающие), IgY (куриные) или других, могут быть биспецифическим или бифункциональным или мультиспецифическим или многофункциональным антителом или его фрагментом. В вариантах осуществления специфически связывающая молекула может быть выбрана из одной из трех основных категорий: моноклональных антител млекопитающих, поликлональных антител млекопитающих и поликлональных антител птиц или любых других фрагментов, полученных из них, которые сохраняют способность связываться с патогенным компонентом.

Одним из вариантов осуществления данного изобретения является использование изобретения в производстве широкого спектра терапевтических средств. Один способ получения этого типа реакционноспособного состава включает получение поликлональных антител, полученных от соответствующим образом иммунизированного животного, и затем такие антитела включают в матрицу-носитель. Поликлональные антитела (или антисыворотки) представляют собой антитела, которые получены из различных линий В-клеток. Их обычно получают в совокупности из сыворотки, молока, молозива, яиц или биологических жидкостей иммунизированного животного. Они представляют собой смесь молекул иммуноглобулина, секретируемых против специфического антигена или группы антигенов, распознающих диапазон различных эпитопов. Может существовать множество антител для одного антигена (связывающегося с различными эпитопами) или для одного антитела для связывания с множеством антигенов вследствие перекрестной реактивности. Поликлональные антитела могут быть получены от животных, таких как крупный рогатый скот, овцы, лошади, козы, свиньи, кролики, куры, утки, гуси или индейки, которые были вакцинированы или инокулированы антигенами, полученными из целевых компонентов. Антитела могут быть выделены, например, из ткани, сыворотки, молока или яиц, полученных или извлеченных от привитого животного. Это контрастирует с моноклональными антителами, которые идентичны и моноспецифичны; они вырабатываются одними типом иммунных клеток, которые являются клонами одной клетки-родителя.

Антитела, используемые в данном изобретении, могут быть получены из сыворотки, плазмы, молозива, молока, яиц или других подходящих жидкостей биологического происхождения или из питатель-

ной среды клеток, надосадочной жидкости и т.п. Антитела, используемые в данном изобретении, могут быть обработаны любым подходящим способом для получения состава и применения, включая, но не ограничиваясь, способы разделения, плазмаферез, процессы сушки, лиофилизацию, пастеризацию и способы консервации. Антитела, используемые в данном изобретении, могут быть обработаны, сконцентрированы, разделены или очищены различными способами в зависимости от их окончательного предполагаемого использования. За счет изменения смеси антител в соответствии с различными вариантами осуществления изобретение обеспечивает композиции и способы, подходящие для лечения или профилактики других желудочно-кишечных инфекций, таких как холера, *C.difficile*, дизентерия, *Salmonella typhi* (брюшной тиф) и *H. pylori* (язвенные болезни). В одном варианте антитела предпочтительно вырабатываются у животных посредством, например, нескольких подкожных (sc) инъекций или внутрибрюшных (ip) инъекций соответствующего антигена и необязательно адъюванта. В одном аспекте может быть полезным конъюгирование соответствующего антигена (особенно, когда используются синтетические пептиды) с белком, который является иммуногенным для видов, подлежащих иммунизации. Например, антиген может быть конъюгирован с гемоцианином (KLH), сывороточным альбумином, бычьим тиреоглобулином или ингибитором трипсина соевых бобов при использовании бифункционального или дериватизирующего агента, например сложного эфира малеимидобензоилсульфосукцинимид (конъюгация через остатки цистеина), N-гидроксисукцинимид (через остатки лизина), глutarового альдегида, янтарного ангидрида, SOCl_2 или R, N=C=NR , где являются различными алкильными группами. Животных иммунизируют против антигена, иммуногенных конъюгатов или производных, как описано в настоящем описании. В других вариантах осуществления антитела могут быть синтетическими или полусинтетическими, например, такими, как полученные из библиотеки фагового дисплея или полученные как гуманизированные или химерные антитела.

Птицы (такие как курица-несушка) в значительной мере экономически эффективны как производители антител по сравнению с млекопитающими, традиционно используемыми для такого производства. Птичьи антитела имеют преимущества в биохимическом отношении по сравнению с антителами млекопитающих. Иммунологические различия между млекопитающими и птицами приводят к повышенной чувствительности и снижению фону в иммунологических тестах; а также высокой специфичности и отсутствию дополнительных иммунных эффектов при введении субъектам, являющимся млекопитающими. В отличие от антител млекопитающих птичьи антитела не активируют систему комплемента человека через первичный или классический путь и не будут вступать в реакцию с ревматоидными факторами, человеческими антитышными антителами IgG, белками стафилококка A или G или бактериальными и человеческими Fc рецепторами. Птичьи антитела, однако, могут активировать невоспалительный альтернативный путь. Таким образом, птичьи антитела имеют много преимуществ по сравнению с антителами млекопитающих. В предпочтительном варианте осуществления специфические молекулы являются поликлональными антителами, полученными в куриных яйцах кур, инокулированных одной или смесью патогенных компонентов. Различные препараты специфических антигенов могут быть также использованы для вакцинации. После вакцинации курица несет яйца, содержащие значительные количества специфического иммуноглобулина IgY в желтке, а также небольшие количества иммуноглобулинов IgM и IgA в альбумине. Поэтому яйца являются отличным источником больших количеств экономически производимых, высокоспецифических и стабильных антител. В одном варианте осуществления куры используются для производства птичьего антитела; однако индейки, утки, гуси, страусы и т.д. могут быть использованы в качестве альтернативы. В одном аспекте кур инокулируют любым способом, известным в данной области, который описан в настоящем описании. Например, антиген может быть введен внутримышечно или подкожно. Предпочтительной мышцей у птицы является грудная мышца. Другие способы введения, которые могут быть использованы, включают подкожные инъекции, внутривенные инъекции, внутрибрюшинные инъекции, внутрикожные, ректальные суппозитории, аэрозоли или пероральное введение.

Специфическое иммунное состояние предпочтительно индуцируется и поддерживается у целевого животного путем иммунизации и многократными бустерными введениями соответствующей дозировки с фиксированными интервалами времени. Временные интервалы составляют предпочтительно 1-8 недельные интервалы в течение 1-12 месяцев. Дозировка выбрана между примерно 0,01-5 мг на антиген. В одном аспекте дозировка составляет от 0,01 до 1,0 мг антигена на прививку, предпочтительно 100, 200, 250, 300, 400, 500 или 750 мг антигена на прививку одной курицы. Общее количество вакцинаций может быть выбрано из 1, 2, 3, 4, 5 или 6 в течение 12 месячного периода. Как правило, первая прививка выполняется в день 1, при этом бустерные вакцинации в день 10 и день 20. Цыпленок курицы может быть повторно вакцинирован при необходимости по результатам мониторинга концентрации определенного антитела или его титра в яйцах, например, посредством иммуоферментного анализа (ИФА). Объем обычной дозы для подкожного введения для цыпленка курицы выбран из диапазона от около 0,2 до 1,0 мл, от 0,3 до 0,7 мл или 0,5 мл. Тем не менее, важно, что бустерные введения не приводят к иммунологической толерантности. Такие способы хорошо известны в данной области.

Можно использовать другие процедуры поддержания прививки или комбинация процедур, таких как, например, внутримышечная инъекция для первичной иммунизации и внутривенная инъекция для

бустерных инъекций. Дополнительные процедуры включают в себя одновременное введение микрокапсулированных и жидких иммуногенов или внутримышечную инъекцию для первичной иммунизации и бустерные дозы путем перорального введения или парентерального введения с помощью микрокапсулированных средств. Некоторые комбинации первичной и повторной иммунизации известны специалистам в данной области техники.

Адьюванты, известны также как фармацевтические носители, или их функциональные эквиваленты, могут быть включены в раствор для иммунизации/вакциновой композиции для повышения специфического иммунного ответа у животного. Большое количество адьювантов было описано и использовано для получения антител у лабораторных животных, таких как мыши, крысы, кролики и куры. В таком случае переносимость побочных эффектов достаточно высока, так как основная цель - получение сильного гуморального иммунного ответа.

Адьюванты, относящиеся к настоящему изобретению, могут быть сгруппированы в соответствии с их происхождением, будь-то минеральный, бактериальный, растительный, синтетический или продукт организма хозяина. В первую группу под этой классификацией входят минеральные адьюванты, такие как соединения алюминия. Антигены, осажденные солями алюминия, или антигены, смешанные с или адсорбированные на используемые соединения алюминия, широко используются для усиления иммунных ответов у животных и человека. В одном варианте осуществления адьювант в композиции для иммунизации имеет бактериальное происхождение. Адьюванты бактериального происхождения могут быть очищены и синтезированы (например, мурамилдипептиды, липид А), и медиаторы хозяина клонированы (интерлейкин 1 и 2). Известная химическая очистка некоторых адьювантов активных компонентов бактериального происхождения включают Bordetella pertussis (палочка коклюша), палочка Коха (mycobacterium tuberculosis), липополисахарид, полный адьювант Фрейнда (ПАФ) и неполный адьювант Фрейнда (Difco Laboratories, Детройт, Мичиган) и адьювант Merck 65 (Merck and Company, Inc, Rahway, Нью-Джерси). В конкретном аспекте полный адьювант Фрейнда или неполный адьювант Фрейнда используются в композициях для иммунизации по изобретению. Кроме того, подходящими адьювантами в соответствии с данным изобретением являются, например, TiterMax классический адьювант (SIGMA-ALDRICH), ISCOMS, Quil A, ALUN, см. патенты US58767 и US5,554,372, производные липида А, производные холерного токсина, HSP-производные LPS-производные, синтетические пептидные матрицы, GMPD и другие, а также в сочетании с иммуностимуляторами (патент US 5876735). Палочка коклюша представляет интерес в качестве адьюванта в контексте данного изобретения благодаря своей способности модулировать клеточный иммунитет посредством воздействия на популяции Т-лимфоцитов. Полный адьювант Фрейнда является стандартом в большинстве экспериментальных исследований. Минеральное масло может быть добавлено к композиции для вакцинации в целях защиты антигена от быстрого катаболизма. Многие другие типы веществ могут быть использованы в качестве адьювантов в иммуногенных или композициях для иммунизации в соответствии с данным изобретением. Они включают растительные продукты, такие как сапонин, продукты животного происхождения, такие как хитин и многочисленные синтетические химические вещества.

Куры, иммунизированные внутримышечно, могут производить высокие уровни специфических антител в яйцах к 28 дню после иммунизации и продолжать вырабатывать специфические антитела на протяжении более 200 дней, в результате чего препараты антител становятся доступными в течение короткого периода времени, например менее 4-5 недель. Яйца содержат концентрации IgY антитела от приблизительно 50 до приблизительно 100 мг на яйцо. Более 100 мг очищенного IgY могут быть получены из одного яйца. Процент антиген-специфичных антител в одном яичном желтке может достигать от примерно 2 до 10% (daSilva et al., IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. Veterinary Immunol. Immunopath., 135 (2010): 173-180). Одна курица породы высокой яйценоскости может производить около 20 яиц в месяц.

Вес яйца составляет от примерно 33 до примерно 77 г, при этом около 10,5% целого яйца составляет оболочка. Желток составляет около 31% от веса целого яйца. Из 72 яиц после сушки может быть получено около 1 кг сухого яичного порошка. Исходя из этого расчета одно яйцо может дать около 13,9 г сухого цельного яйца. В другом аспекте одно иммунное яйцо может дать от 10 г до примерно 15 г сухого цельного яйца. В другом аспекте иммунное яйцо согласно изобретению составляют от 40 до 55 мл на яйцо, при этом примерно 1-2 мг/мл от общего IgY приходится на одно яйцо. В другом аспекте иммунные яйца согласно настоящему изобретению содержат от около 0,01 до 0,05 мг/мл конкретного IgY на яйцо. Таким образом, в одном аспекте после обработки одно сухое цельное иммунное яйцо содержит приблизительно от 80 до 110 мг общего IgY и примерно от 6 до 10 мг общего содержания смешанных антиген-специфических IgY, например, из кур, иммунизированных, например, препаратом смешанных антигенов.

Можно определить, является ли вакцина причиной, которая вызвала иммунный ответ у продуцирующих яйца животных, с помощью ряда способов, известных специалистам в области иммунологии. Примеры включают твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), тесты на наличие антител к стимулирующим антигенам и тесты, цель которых оценить способность иммунных клеток хозяина реагировать на антиген. Минимальная доза иммуногена, необходимая для индукции иммунного ответа, зависит от использования процедуры вакцинации, в том числе типа используемых адьювантов и состава иммуно-

гена(ов), а также от типа животного, продуцирующего яйца, которого использовали в качестве хозяина.

В одном варианте куры, подходящие для коммерческого производства яиц, используют для производства поликлональных антител. Любая порода куриных, подходящая для производства яиц, может быть использована. Например, могут быть выбраны следующие породы: Род-Айленд красные, Белые леггорны, Коричневые леггорны, куры Ломан Браун, скрещенные гибридные или другие породы, несущие яйца больших размеров, с высоким объемом яйценоскости и легкости в содержании. В одном аспекте кур, будучи цыплятами, прививают от стандартных заболеваний (например, сальмонеллы, птичьего гриппа или вируса Ньюкасл и т.д.). В одном аспекте куры любого возраста могут быть инокулированы. Кур, возраст которых приближается к яйценесущему, около 15-19 недель, или в любое заданное время до или после этого инокулируют согласно заданному графику определенным количеством и в период, конечным продуктом, который приведет к устойчивому непрерывному потоку производства. Как правило, после соответствующего периода изоляции и акклиматизации - примерно от 2 до 4 недель, каждая группа входит в программу инокуляции с использованием различных антигенов или композиций для иммунизации, содержащих специфические антигены, для которых требуется антитело.

В одном варианте яйца собирали от привитых кур и обрабатывали целиком. Яйца хранятся в охлажденном состоянии, пока не подготовлена достаточная партия. Яйца из партии от заранее определенных групп кур разбивают, содержимое отделяют от скорлупы, смешивают и преимущественно пастеризуют для устранения потенциального загрязнения патогенными микроорганизмами курицы.

В одном аспекте иммунные яичные продукты пастеризуют. Яичные продукты обрабатываются в санитарных условиях. Натуральное яйцо перерабатывается в иммунный яичный продукт на автоматизированном оборудовании, которое отделяет яйца от лотка для яиц, моет и дезинфицирует скорлупу, разбивает яйца. Необязательно, белки отделяются от желтков. Жидкий продукт яйца, при необходимости, фильтруют и, необязательно, смешивают с другими ингредиентами, а затем охлаждают до дополнительной обработки. Полученную жидкость из яичных продуктов затем подвергают летальной обработке, такой как пастеризация или нагревание в высушенной форме. В США согласно Акту проверки яичных продуктов (EPIA) 1970 г. требуется, чтобы все яичные продукты для употребления были пастеризованными. После пастеризации все содержимое яйца сушат с использованием стандартных коммерческих способов, таких как сушка распылением с использованием атмосферного или горячего воздуха, термическая сушка, сублимационная сушка или лиофилизация. В одном аспекте соответствующий метод сушки пастеризованной яичной жидкости сводит к минимуму повреждение антител и молекулярных компонентов в яйце, в результате чего получают продукт, который имеет высокую питательную ценность и способен передавать пассивную защиту.

В одном из аспектов высушенное яйцо испытывают для определения общего титра или уровня антител. Используются стандартные процедуры испытаний, например ИФА, ФИА (флуоресцентный иммуноанализ), РИА (радиоиммуноанализ) и т.п. В другом аспекте партия смешивается с партиями из группы кур других средних уровней производства, результатом чего становится партия, содержащая стандартизированное количество антител. Высушенные яйца, содержащие специфические поликлональные антитела, могут храниться в герметичном контейнере при комнатной температуре до момента создания композиций по изобретению. В вариантах осуществления высушенный материал яйца используется как цельное яйцо и не отделяется. В вариантах осуществления весь высушенный материал яйца содержит по меньшей мере 5 мг на яйцо специфических IgY.

В другом варианте осуществления IgY изолирован. Первым шагом к выделению IgY является отделение водорастворимых белков от липопротеинов. Водорастворимые белки представляют 42,4% от общего белка в яичном желтке (Osuga et al., "Egg Proteins: In Food Proteins, J.R. Whitaker and S.R. Tanenbaum (1977)).

Многие методы были использованы для выделения и очистки иммуноглобулинов из яичного желтка (Martin et al., Can J. Biochem. Physiol 35:241 (1957); Martin et al., Can J. Biochem. Physiol. 36:153 (1958); Jensenius et al., J. Immunol. Methods 46:63 (1981); Bade et al., J. Immunol. Methods 72:421 (1984); Poison et al., Immunol. Invest. 14:323 (1985); Hassl et al., J. Immunol. Methods 110:225 (1988)). Hatts et al. (Agric. Biol. Chem. 54:2531 (1990)), основанные на использовании пищевые природные смолы (например, каррагинана), чтобы удалить липопротеин желтка в виде осадка и перевести IgY в водорастворимую фракцию из яичного желтка. Способы получения антител из куриного желтка хорошо известны в данной области. Некоторые методы могут быть использованы для извлечения IgY из яичного желтка, и коммерческие наборы для извлечения доступны (van Regenmortel, M.H.V (1993). Eggs as protein and antibody factories. In Proceedings of the European Symposium on the Quality of Poultry Meat, pp. 257-263. Tours, France: INRA).

В другом варианте осуществления стерические специфически связывающие молекулы могут представлять собой моноклональные антитела, специфические к патогенному компоненту.

Моноклональные антитела могут быть получены с использованием гибридного метода, впервые описанного Kohler et al., Nature.256: 495 (1975), или могут быть получены методами рекомбинантных ДНК (US 4816567). В гибридном способе мышь или другое подходящее животное-хозяин, такое как хомья, иммунизирует, как описано выше, чтобы извлечь лимфоциты, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с белком, используемым для им-

мунизации. Альтернативно, лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. После иммунизации лимфоциты отделяют и затем проводят слияние с линией клеток миеломы с использованием подходящего агента для слияния, такого как полиэтиленгликоль, с получением гибридной клетки (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Культуральную среду, в которой выращивают клетки гибридомы, исследуют на продуцирование моноклональных антител, направленных против антигена. Предпочтительно специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридомы, определяют иммунопреципитацией или с помощью анализа связывания *in vitro*, такого как радиоиммуноанализ (РИА) или иммуноферментный анализ (ИФА). Аффинность связывания моноклонального антитела может, например, быть определена с помощью анализа Скэтчарда, описанного Munson et al., *Anal. Biochem.* 107:220 (1980).

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, соответствующим образом отделяют от культурной среды, асцитной жидкости или сыворотки обычными способами очистки антител, таких как, например, аффинная хроматография (например, используя белок А или белок G-сефароза) или ионообменная хроматография, хроматография на гидроксилапатите, гель-электрофорез, диализ и т.д. ДНК, кодирующую моноклональные антитела, легко выделяют и секвенируют с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышиных антител). Клетки гибридомы служат в качестве предпочтительного источника такой ДНК. После выделения ДНК может быть помещена в экспрессирующие векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, обезьяньи COS-клетки, клетки яичника китайского хомяка (CHO) или клетки миеломы, которые иначе не продуцируют белок антитела, для получения синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках хозяина. Обзорные статьи по рекомбинантной экспрессии в бактериях ДНК, кодирующей антитело, включают Skerra et al., *Curr. Opin. in Immunol.*, 5:256-262 (1993) и Plijeckthun, *Immunol. Revs.* 130:151-188 (1992). В другом варианте моноклональные антитела или фрагменты антител могут быть выделены из фаговых библиотек антител, полученных с использованием методов, описанных McCafferty et al., *Nature*. 348:552-554 (1990). Clackson et al. *Nature*. 352:624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) описывают выделение мышиных и человеческих антител соответственно, с использованием фаговых библиотек. В последующих публикациях описано продуцирование антител человека высокой аффинности (нМ диапазон) путем перестановки цепей (Marks et al., *Bio/Technology*. 10:779-783 (1992)), а также комбинаторной инфекции и *in vivo* рекомбинации в качестве стратегии конструирования очень больших фаговых библиотек (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.* 21 :2265-2266 (1993)). Таким образом, эти методы являются приемлемой альтернативой традиционным методам гибридом моноклональных антител для выделения моноклональных антител.

ДНК, которая кодирует антитело, может быть модифицирована для получения химерных или гибридных полипептидов, например, путем замещения последовательностей константного домена (C_H и C_L) тяжелой цепи и легкой цепи человека на гомологичные мышиные последовательности (патент США № 4816567; и Morrison et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), или путем слияния кодирующей последовательности иммуноглобулина со всей или частью кодирующей последовательности для неиммуноглобулинового полипептида (гетерологичного полипептида). Неиммуноглобулиновые полипептидные последовательности могут заменить константные домены антитела, или их могут заменить переменные домены одного антигенсвязывающего участка антитела для создания химерного бивалентного антитела, включающего один антигенсвязывающий участок, обладающий специфичностью к антигену, и другой антигенсвязывающий участок, обладающий специфичностью по отношению к другому антигену.

Антигены для иммунизации по подготовке специфически связывающего белка

Антигены, отобранные для иммунизации, могут быть бактериальными, вирусными, протозойными, грибковыми, паразитарными, клеточными или любыми другими веществами, на которое будет реагировать иммунная система животного. В одном аспекте иммуногенность антигенов усиливается использованием адъюванта. В одном аспекте животных прививают патогенными компонентами, антигенами или иммуногенами, содержащимися в композиции для вакцинации. В одном аспекте патогенные компоненты или специфические антигены могут быть получены или добыты из коммерческих источников, таких как Американская коллекция типовых культур (ATCC). В другом аспекте патогенные компоненты могут быть выделены из штамма дикого типа. В другом аспекте патогенные компоненты или нежелательные штаммы присутствуют в виде препарата смеси антигенов. Любые антигены или комбинация антигенов, полученных из различных нежелательных штаммов или патогенных компонентов, могут быть использованы в композиции для иммунизации. В одном аспекте инокулянт, антиген или иммуноген выбран из общего или сохраненного компонента или области кластера нацеленного антигена, игнорируя переменные или отличительные компоненты или области отдельных членов кластера родственных антигенов. Способ включает подготовку соответствующего иммуногена с характеристиками, которые вызывают образование антител, которые являются перекрестно-реактивными в отношении к желаемым экземплярам этого эпитопа, но которые не реагируют на другие эпитопы, а прививка или воздействие продуцирующих клеток или организма по отношению к этому иммуногену так, чтобы вызвать образование анти-

тел, которые встроены в подходящую матрицу-носитель для введения. Составы этого типа могут быть разработаны, при этом они используют добавки антител, полученных согласно данному способу, и обеспечить широкий охват более одного кластера целевых антигенов. Например, в случае, когда две группы неродственных антигенов связаны с заболеванием или состоянием, и необходимо создание единого состава для лечения этого заболевания или состояния, добавка двух антител, иммуноглобулинов или биологических иммунных факторов может быть получена с использованием этого метода, который одновременно обеспечивает две широких области реактивности. Один пример этого варианта осуществления подходит для производства антител антитоксина, которые специфически реагируют на кластеры структурно родственных токсинов.

В одном варианте осуществления этот подход используется, чтобы сделать широко реакционноспособное антитело по отношению к липополисахариду (LPS) (эндотоксин) из любой грамотрицательной бактерии (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* и других энтеробактерий, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Helicobacter*, *Stenotrophomonas* и др.) или, например, широко реактивное антитело к AB5 токсинам (в том числе энтеротоксин *Campylobacter*, холерный токсин, термолabile энтеротоксины (LT и LT-II) (*E.coli*), токсин коклюша, токсин шига (*Shigella*), шигоподобный токсин (или веротоксин)). В предпочтительном аспекте это антитоксिनные антитела, приведенные в качестве примеров, оказывают эффект вне зависимости от вида, являющегося источником токсина. В другом аспекте получаемые антитела являются нейтрализующими антителами, способными нейтрализовать или инактивировать биологическую активность целевых токсинов. Такое нейтрализующее антитело широкого спектра действия может быть использовано для вмешательства в патологических случаях (например, определенных типов диареи), где токсин, вызываемый симптомами, был одним из нацеленного кластера (в этих примерах, AB5 или LPS), без необходимости знания того, какой организм был возбудителем. Кроме того, если была подготовлена добавка, содержащая как анти AB5 антитела, так и анти LPS антитела в клинически эффективных количествах, состав может быть использован для вмешательства в случае, когда активный токсин был AB5 или LPS или оба.

Этот метод может быть распространен на любое количество (в этом примере) кластеров токсинов, а также широкого спектра действия нейтрализующие антитела к медиаторам других токсинподобных реакций (например, вирусное токсинподобное явление), чтобы создать широко применимые терапии (в этом примере) диареи, когда симптомами и патологией можно управлять без знания инфекционных причин, или когда есть несколько инфекционных причин. В одном аспекте изобретение раскрывает композицию, включающую синергическую комбинацию антитоксिनных антител в сочетании с матрицей-носителем.

В некоторых вариантах осуществления способы и композиции согласно изобретению используются в отношении различных патогенов или агентов, включая, без ограничений, холерный токсин (*Vibrio cholera*), *E.coli* (в том числе энтеротоксигенные (ETEC)), *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium difficile*, паразитов (например, *Giardia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidiosis*, *Cyclospora*) и вирусы диареи (например, ротавирус).

После попадания в желудочно-кишечный тракт многие патогенные микроорганизмы, включая, но не ограничиваясь бактериями, такими как *E.coli*, связываются (прилипают) к эпителиальной ткани, ткани слизистой оболочки или другим тканям и становятся встроенными в ткани желудочно-кишечного тракта, такие как стенка кишечника. После прилипания к ткани в желудочно-кишечном тракте патогены реплицируются, что приводит к увеличению концентрации токсинов, либо непосредственно за счет их производства, либо косвенно за счет возрастания лизиса патогенных клеток посредством действия иммунной системы. Ингибирование способности патогенов связываться с тканями желудочно-кишечного тракта способствует более эффективной мобилизации патогенов, расщеплению и выделению до того, как смогут образоваться колонии достаточного размера, чтобы вызывать поражения и другие симптомы. За счет блокирования класса рецепторов и лигандов на патогене, который будет использоваться, чтобы присоединиться к желудочно-кишечному тракту, включая, но не ограничиваясь адгезинами, кадгеринами, ресничками, фимбриллами и/или вирусными структурами адгезии, адгезия к ткани желудочно-кишечного тракта может быть предотвращена или сведена к минимуму, в конечном счете, в результате чего существенно снизятся патологии от патогенов, которые используют такой способ действия. В различных вариантах осуществления патоген выбран из одного или комбинации человеческих или ветеринарных, кишечных или желудочно-кишечных патогенов, вызывающих гастроэнтерит. В различных аспектах патоген выбран из группы, состоящей из *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Shigella dysenteriae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Escherichia coli* [включая (EPEC) энтеропатогенный *E.coli*, (ETEC) энтеротоксигенный *E.coli*, (EAggEC) энтероагрегативный *E.coli*, (EIEC) энтероинвазивный *E.coli* и (EHEC) гемолитический *E.coli*], *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio* O139, Non-O1 *Vibriosis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, печеночный *Helicobacter* (включая *Helicobacter Pylori*), золотистый стафилококк, клебсиеллу, ротавирус, коронавирусы, норовирус, калицивирусы, кишечные аденовирусы, цитомегаловирус и астровирус. В другом аспекте патогенсвязанный токсин включает эндотоксин или экзотоксин. В другом аспекте адгезивный элемент, связанный с патогеном, включает адгезины, кадгерины, реснички, фим-

брилли, вирусную структуру адгезии или их комбинации.

В различных специфических аспектах патогенные компоненты, иммуногены или антигены могут быть получены, например, из ротавируса, коронавируса, *Clostridium Perfringens* типа C; кишечной палочки *Escherichia coli* (клеточной); энтеротоксигенных штаммов, и энтеротоксинов, кишечной палочки *E.coli*; любых бактерий, имеющих K99, K88, 987P, или F41 антиген пили-фактор адгезии; эндотоксина (или LPS), вызванного кишечной палочкой и *Salmonella Typhimurium* (грамотрицательные бактерии, в общем случае). В конкретном аспекте куры инокулированы антигенами или токсинами, полученными из одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми или нескольких патогенных микроорганизмов.

В одном из аспектов иммунный ответ является более сильным, когда расстояние между источником антигена и иммунной системой вакцинированных животных увеличивается.

В конкретном варианте осуществления первую группу кур инокулируют первым препаратом смеси антигенов. В одном аспекте вторую группу кур инокулируют вторым препаратом смешанных антигенов, содержащим другой набор антигенов, в отличие от первого. В другом аспекте третью группу кур инокулируют третьим препаратом смешанных антигенов. Ещё в одном аспекте четвертую группу кур инокулируют четвертым препаратом смешанных антигенов. Хотя это и не подразумевает ограничение области изобретения, считается, что выгодно иммунизировать различные группы различными антигенами во избежание перегрузки антигенами.

Собирают яйца от каждой группы, возможно титруют, определяя специфические или общий IgY, возможно выделяют и/или очищают и обрабатывают отдельно для получения сухого порошка. В другом аспекте сухой яичный порошок из первой и второй; первой, второй и третьей или первой, второй, третьей и четвертой групп смешивают или пакут с матрицей-носителем для получения композиции данного изобретения. В одном аспекте первый антигенный препарат включает бычий ротавирус (серотипы G6 и G10), бычий коронавирус, энтеротоксигенные штаммы кишечной палочки, имеющей пили-фактор адгезии K99 и *Clostridium perfringens* типа C. В препарат смешанных антигенов необязательно может быть добавлен адъювант, чтобы повысить иммунный ответ.

В другом аспекте второй препарат антигенов включает в себя β -токсин, продуцируемый *Clostridium perfringens* типа C и энтеротоксигенные штаммы кишечной палочки, которые производят термолабильный токсин или имеют факторы адгезии K99, K88, 987P или F41.

В одном аспекте третий препарат антигенов состоит из *E.coli* и *Salmonella typhimurium*. JVAC снижает частоту и тяжесть эндотоксемии, вызванные *E.coli* и *Salmonella Typhimurium*. Заболевания, обычно связанные с их эндотоксинами, представляют собой колиформный мастит и другие грамотрицательные заболевания, связанные с эндотоксемией.

В другом аспекте антигены получены любыми способами, известными в данной области. Например, клетки от источника дикого типа, например животного, страдающего от *E.coli* диареи. Изолированные клетки можно культивировать, например, в триптиказосоевом бульоне (ТСБ) при 37°C в течение ночи и концентрировать центрифугированием. Полученный осадок повторно суспендируют с 0,4% формальдегидом в PBS-буфере и инкубируют при 37°C для инактивации. Формальдегид может быть удален центрифугированием. Осадок может быть повторно суспендирован в PBS-буфере и использован в качестве антигена. В одном аспекте антигены эмульгируют в равном объеме полного адъюванта перед инокуляцией.

В другом варианте осуществления антигены выбирают из патогенных микроорганизмов, вызывающих конъюнктивит. Известные возбудители описаны в патенте US 2008/0031903, Gambotto et al., который включен в данное описание посредством ссылки.

Эпидемический кератоконъюнктивит (ЭКК) является изнуряющим инфекционным заболеванием глаз, которое наблюдается во всем мире. Заболевание обусловлено, в основном, аденовирусами, особенно серотипа 8, 19 и 37. Серотипы типа 3, 4 и 11 были также вовлечены в некоторые ЭКК эпидемии. Болезнь затрагивает все возрастные группы, очень заразна и быстро распространяется в школах, бассейнах, детских отделениях и лагерях. Лечение в настоящее время симптоматическое, поскольку эффективного лечения не существует. Разработка эффективных противовирусных агентов местного применения является актуальным для лечения заболевания и предупреждения эпидемии.

Конъюнктивиты также могут быть вызваны рядом дополнительных бактериальных, вирусных, грибковых и простейших агентов, включая, но не ограничиваясь следующими: золотистый стафилококк, стрептококк пневмонии, гемофильная палочка, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, аденовирус, вирус простого герпеса, вирус опоясывающего герпеса, энтеровирусы, фуариозы, виды *Candida* и виды *Acanthamoeba*. Некоторые вирусные инфекции, такие как аденовирусные инфекции, можно лечить с помощью противовирусных лекарственных средств, например цидофовира. Как правило, лекарственные средства имеют побочные эффекты, такие как глазные и почечные побочные эффекты, связанные с цидофовиром. Другие организационные вопросы связаны с лекарственными препаратами, включая стабильность, себестоимость продукции и т.д. Таким образом, недорогие, легкодоступные, хорошо воспринимаемые организмом и стабильные лекарственные средства для лечения глазных инфекций являются актуальными.

В одном аспекте изобретение раскрывает композицию для лечения конъюнктивита и покраснения

глаз, содержащую поликлональные антитела к этим патогенам, которые объединены в матрице-носителе, как описано ниже. Антитела получают согласно данному описанию.

В другом варианте осуществления антигены выбирают из патогенных организмов, вызывающих вагинит. Инфекция может быть бактериальной, грибковой (дрожжи) или паразитарной. Бактериальный вагинит может быть вызван, например, *Gardnerella* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydiae* trachomatis, *Mycoplasma* spp., *Campylobacter jejuni*. Паразитарный вагинит может быть вызван, например, влагалищной трихомонадой. Вирусный вагинит может быть вызван, например, вирусом герпеса типа 1 или типа 2. Кандидозный вагинит вызывается дрожжеподобными грибами *Candida*. Описано более 170 видов дрожжеподобных грибов. *C. albicans* является наиболее частым возбудителем кандидозного вагинита у 85-90% женщин. *C. glabrata* (5-10%), *C. tropicalis* (3-5%), *C. parapsilosis* (3-5%) и *C. krusei* (1-3%) также являются клинически значимыми среди других видов *Candida*. Любой из этих патогенов может быть выбран в качестве источника антигена для получения поликлональных антител, как описано здесь. Кандидозный вульвовагинит зачастую является следствием ряда предрасполагающих факторов, таких как длительное и неконтрольное использование антибиотиков, кортикостероидов, цитостатиков, оральных контрацептивов, лучевой терапии, тяжелые инфекционные заболевания, эндокринные расстройства, иммунодефицитное состояние и т.д. Назначение антибиотиков широкого спектра действия подавляет не только патогенные бактерии, но и сапрофита слизистой влагалища: лактобациллы и бифидобактерии. В результате pH влагалища повышается (в сторону щелочного диапазона) и происходит нарушение процессов самоочищения. Кроме того, *Candida* может использовать некоторые антибиотики в качестве питательных субстратов. Таким образом, в женских половых органах возникают благоприятные условия для активного разрастания *Candida*. В одном аспекте изобретение раскрывает композицию для лечения вагинита, содержащую поликлональные антитела к одному или более из описанных патогенов, которые объединены в матрице-носителе, как описано ниже. В конкретном аспекте композиция согласно изобретению, содержащая смесь специфических поликлональных антител в матрице-носителе, обеспечивает способ лечения широкого спектра действия бактериальных, вирусных, грибковых и паразитарных вагинитов. В другом аспекте композиции согласно изобретению могут быть использованы для лечения недифференцированного вагинита у субъекта, нуждающегося в этом. Другие специфически связывающие молекулы.

Композиции и способы согласно изобретению включают другие специфически связывающие молекулы, в том числе факторы передачи, вариабельные рецепторы лимфоцитов и клеточные рецепторы. Фактор передачи представляет собой иммунную молекулу массой примерно 5000 Да, состоящую из аминокислот, которые вызывают антиген-специфический клеточный иммунитет, в первую очередь, гиперчувствительность замедленного типа и производство лимфокинов, а также связывание с самими антигенами (Kirkpatrick 1993, Structural nature and functions of transfer factors. Ann. N.Y Acad. Sci. 685:362-368). Вариабельные рецепторы лимфоцитов - молекулы, полученные из лимфоцитов, обнаруженные в бесчелюстных позвоночных, таких как миноги и миксины. Эти животные обладают большим массивом вариабельных рецепторов лимфоцитов, которые производятся только из небольшого числа генов и которые связываются с патогенными антигенами аналогично антителам и с той же степенью специфичности (Alder et al., 2005, Diversity and function of adaptive immune receptors in a jawless vertebrate. Science, 310 (5756):1970-1973).

Матрица-носитель.

Изобретение раскрывает композиции для лечения или профилактики патогенных инфекций у субъекта. Композиции содержат специфически связывающие молекулы, такие как поликлональные антитела, в комбинации с матрицей-носителем. Хотя это и не подразумевает ограничение области изобретения, матрица-носитель служит для выполнения двойной цели. Во-первых, для защиты антитела в их предполагаемой функциональной среде, например, при пероральном введении, и внутри желудочно-кишечного тракта субъекта, не являющегося новорожденным; и, во-вторых, дать возможность компонентам, например компонентам врожденной иммунной системы, синергически реагировать с антителами при лечении инфекции.

Термин "матрица-носитель" или поддерживающая/реакционноспособная матрица относится к любому субстрату, соединению, составу или дополнительной добавке (природной или синтетической), содержащий элементы, кофакторы или другие компоненты в соответствующих соотношениях и концентрациях, чтобы обеспечить элементы, необходимые для распространения, промотирования, поддержки или повышения иммунного ответа типа *in situ*, каскада или реакции. Эти элементы могут по-разному промотировать реакции расщепления и созревания, образование агрегатов и комплексов, функций элиминации и адсорбции; поставлять основные элементы, биологические вещества или соединения, а также обеспечить функции защиты для активных элементов или компонентов. Матрица-носитель может содержать или не содержать эндогенные антитела (иммунные факторы), которые могут или не могут быть специфическими для нацеленных антигенов.

В одном варианте осуществления матрицей-носителем выбрана матрица из или полученная из сыроворотки, плазмы, молозива, молока, слюны, лимфатической жидкости, жидкости слизистой или слезной жидкости, полученные из млекопитающего, не являющегося человеком.

Примером матрицы-носителя природного происхождения является молозиво. Молозиво развилось естественным путем у млекопитающих специально для доставки его компонентов новорожденным и через желудочно-кишечный тракт в очень концентрированной форме малых объемов. Молозиво или "первое молоко" вырабатывается сразу после родов у млекопитающих. Антитела и кофакторы передаются новорожденному от матери и обеспечивают первую защиту от болезнетворных микроорганизмов. Факторы роста также стимулируют развитие и восстановление кишечника.

Молозиво содержит множество иммуноспособствующих факторов. Среди них интерфероны, иммуноглобулины (в том числе IgG и секреторный IgA), полиморфноядерные лейкоциты, макрофаги и лимфоциты. Молозиво также содержит полипептид, богатый пролином или ПБП, Т-клеточный активатор. Молозиво, как известно, имеет высокое содержание иммуноглобулина по сравнению с молоком. Молозиво, как известно, содержит антитела, такие как IgA, IgG и IgM у млекопитающих. IgA поступает в организм через эпителий кишечника, проходит через кровь и выделяется на слизистых поверхностях другого типа 1. Замечено, что в коровьем молозиве содержится в пределах от 6 до 20% иммуноглобулинов; в первую очередь IgG₁ и IgG₂. В одном аспекте цельное коровье молозиво используется в качестве матрицы-носителя. Молозиво помогает регулировать кишечную среду и делает ее враждебной для чужеродных патогенов. Молозиво содержит лактоферрин, железосвязывающий белок, который предотвращает получение бактериями и вирусами железа, необходимого для репликации. Молозиво также избирательно удобряет определенные пробиотические виды, которые, в свою очередь, помогают защититься от инфекции. Это единственный природный источник двух основных факторов роста, трансформирующего фактора роста (TGF) α и β , а также источник инсулиноподобного фактора роста 1 и 2. Эти факторы способствуют восстановлению и развитию тканей. Молозиво также является источником фактора роста гепатоцитов, который стимулирует рост и распространение клеток стенок кишечника. Молозиво естественным образом предназначено в качестве матрицы-носителя в желудочно-кишечном тракте. Синтетические версии матрицы-носителя также включены в данное описание. Матрицы-носители, которые состоят из природных и синтетических компонентов, также включены в данное изобретение. Молозиво очень богато белками, витамином А и хлоридом натрия, но содержит меньшее количество углеводов, липидов и калия, чем обычное молоко. Наиболее близкими биологически активными компонентами в молозиве являются факторы роста и антимикробные факторы. Антитела в молозиве обеспечивают пассивный иммунитет, тогда как факторы роста стимулируют развитие в кишечнике. Они передаются новорожденному и обеспечивают первую защиту от патогенов. Пассивный иммунитет от матери передается новорожденному.

Новорожденные имеют очень маленькие пищеварительные системы, а молозиво поставляет питательные вещества в очень концентрированной форме малых объемов. Желудочно-кишечный тракт новорожденного особенно восприимчив к пассивной передаче иммунитета из молозива. При рождении желудочный диапазон pH изменяется от 6-8 из-за остаточной амниотической жидкости в желудке. Желудочный pH затем падает до pH от 1,5 до 3 за 24-48 ч. Таким образом, условия в ЖКТ новорожденного способствуют пассивной иммунизации. Кроме того, время опорожнения желудка у новорожденных и недоношенных детей продолжительно, значения времени для взрослого достигаются в возрасте 6-8 месяцев. Антитела и кофакторы в молозиве могут при определенных обстоятельствах (например, грудного вскармливания) обеспечивать пассивный иммунитет их получателю, что особенно актуально для новорожденных. Желудочно-кишечный тракт младенцев, не являющихся новорожденными, детей, подростков и здоровых взрослых является более агрессивной средой по отношению к пероральному введению иммуноглобулинов.

Другие иммунные компоненты молозива включают основные компоненты врожденной иммунной системы, такие как, лактоферрин, трансферрин, лизоцим, лактопероксидаза, комплемент и пролином богатый полипептид (ПБП). Количество цитокинов (небольшие мессенджерные пептиды, которые контролируют функционирование иммунной системы) также находятся в молозиве, включая интерлейкины, фактор некроза опухоли, хемокины и др. Молозиво также содержит ряд факторов роста, таких как инсулиноподобные факторы роста I и II, трансформирующие факторы роста α , β -1 и β -2, фактора роста фибробластов, эпидермальный фактор роста, гранулоцитарно-макрофагальный стимулирующий фактор роста, тромбоцитарный фактор роста, фактор роста сосудистого эндотелия и колониестимулирующий фактор-1.

В одном из аспектов матрица-носитель состоит из двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более, шести или более или семи или более неиммуноглобулиновых компонентов молозива. В другом аспекте матрица-носитель содержит молозиво, которое было обработано, чтобы удалить большинство иммуноглобулинов. В вариантах осуществления матрица-носитель содержит по меньшей мере два компонента, полученных из животного, не являющегося человеком, выбранного из группы, состоящей из ферментов, лактоферрина, трансферрина, неспецифических иммуноглобулинов, компонентов системы комплемента, цитокинов, белых кровяных телец, компонентов комплемента, интерферонов и фибронектина, причем по меньшей мере одна специфически связывающая молекула и по меньшей мере два компонента матрицы-носителя получены из различных животных.

В другом аспекте матрица состоит из двух или более агентов, выбранных из лизоцима, фосфолипа-

зы, дефензинов, опсонинов, пролином богатых полипептидов (ПБП), β -лизина, лактоферрина, трансферрина, цитокинов, интерлейкинов, хемокинов, интерферонов, TNF- α , фибронектина; полипептидов, богатых пролином; инсулиноподобного фактора роста типа 1, инсулиноподобного фактора роста типа 2, тромбоцитарного фактора роста, эпидермального фактора роста, фактора роста фибробластов, трансформирующего фактора роста α , трансформирующего фактора роста β , фактора роста нервов, лептина, лейкоцитов, белых кровяных телец, фагоцитов, макрофагов, моноцитов, нейтрофилов, полиморфноядерных клеток и дендритных клеток, тучных клеток, эозинофилов, базофилов, клеток-натуральных киллеров (NK), клеток-лимфокинактивированных киллеров (ЛИАК), катионных белков, включая дефензины, протеолитических ферментов, в том числе эластазы, катепсина G, миелопероксидазы, компонентов НАДФН-оксидазы или их комбинаций. В другом аспекте матрица содержит смесь агентов от врожденной иммунной системы. В предпочтительном варианте матрица-носитель состоит из негипериммунного коровьего молозива.

Коровье молозиво производится коровами для их новорожденных телят. Во многих стадах молочных коров кормление телят коровой не разрешается; вместо этого их кормят молозивом, а позже молоком из бутылки, затем из ведра. Молозиво собирается и обрабатывается для коммерческого использования. Различные композиции, содержащие молозиво, и способы получения молозива были раскрыты в патентах США 5846569, 6410058, 6475511 и 6521277, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Сухое коровье молозиво является коммерчески доступным. В одном конкретном аспекте матрица-носитель является коммерческим сухим коровьим молозивом.

Животноводы/заводчики обычно собирают молозиво от своих животных.

Молозиво, произведенное из собственных источников, считается качественнее молозива из других источников, так как оно производится животными, которые уже подвергались (и таким образом у них вырабатываются антитела к) патогенам, встречающимся на территории их содержания. Как правило, молозиво животных, подвергнутых соответствующим патогенам, будет иметь более высокие иммунологические характеристики.

Коровье молозиво и его компоненты являются безопасными для потребления человеком, за исключением непереносимости или аллергии на лактозу или другие компоненты. Коровье молозиво коров, которые паслись на пастбище, содержит иммуноглобулины, специфические к многим патогенам человека, в том числе *Escherichia coli*, *Cryptosporidium parvum*, *Shigella flexneri*, *Salmonella*, *Staphylococcus* и ротавирусу, в зависимости от их природного воздействия на эти патогены. До появления антибиотиков молозиво было основным источником иммуноглобулинов, которые использовались для борьбы с инфекциями.

Гипериммунное молозиво представляет собой попытку повысить эффективность природного коровьего молозива путем иммунизации коров конкретным патогеном. Этот подход является перспективным, поскольку получают антитела к конкретным патогенам или антигенам, используемым в исходной задаче. Тем не менее, вариabельный ответ на антигены, биологическая вариabельность и низкий выход при производстве молозива ограничили его клиническое и коммерческое использование. В одном аспекте изобретение обеспечивает композицию, содержащую молозиво, которое не является гипериммунным молозивом или которое не содержит измеряемое или значительное количество антител, специфичных к патогенным компонентам или компонентам целевого антигена. В другом аспекте изобретение обеспечивает композицию, в которой матрица-носитель содержит различные компоненты врожденной иммунной системы без значительного количества специфических или неспецифических антител.

В одном варианте осуществления молозиво может быть обработано, чтобы удалить большую часть иммуноглобулина, например, путем абсорбирования антител на аффинной смоле (например, сефарозе Protein G или Protein A; или агарозе Protein A или Protein G) объемным способом или на колонке, оставляя элюат для дальнейшей обработки. Иммуноглобулин также может быть удален с помощью гель-фильтрационной хроматографии на Sephadex G-200 или DEAE Sephadex A-25 для ионообменной хроматографии. (Lloyd and Soulsby, Immunology, The role of IgA immunoglobulin in the passive transfer of protection to *Taenia taeniaeformis* in the mouse. 34, 939-945). Эти процессы можно осуществлять на колонке или объемном формате с помощью различных методов и способов, известных в данной области.

В одном конкретном варианте осуществления матрица-носитель включает молозиво. В одном аспекте коммерческое молозиво используют в качестве поддерживающей/реакционноспособной матрицы. В предпочтительном аспекте коммерческое коровье молозиво - это агломерированное и растворимое, пастеризованное, полножирное, цельное молозиво в форме порошка, полученное только из первого доения. В другом аспекте молозиво обрабатывается при низких давлениях и низких температурах и подвергается распылительной сушке с использованием непрямого пара для сохранения максимальной биологической активности. В другом аспекте коммерческое молозиво происходит из источников, не содержащих антибиотиков. В другом аспекте молозиво подвергается микробиологическому анализу, в результате чего определяют, что оно не содержит или уровень содержания разных патогенов оказывается ниже допустимых значений. В различных других аспектах молозиво тестируют на другие загрязняющие вещества, такие как нитраты, афлатоксин, нитрофуран, диоксины, меламина и тяжелые металлы; их содержание должно

быть отрицательным или ниже указанных уровней. В одном варианте осуществления композиция изобретения может быть составлена из молозива нескольких гипериммунизированных источников, предназначенных для различных кластеров или классов антигена, причем молозиво смешивают, чтобы обеспечить широкий спектр действия антител препарата. В другом варианте осуществления матрица-носитель состоит из восстановленной или искусственной секреции слизистой оболочки, такой как слезная жидкость, назальная или бронхиальная слизистая, слизистая шейки матки, семенная жидкость, пот, плазма крови или слюна. Биологические жидкости, как известно, содержат несколько компонентов в различных количествах (Schenkels et al., *Biochemical composition of human saliva in relation to other fluids*, *Crit Rev. Oral Biol. Med.*, 1995, 6 (2): 161-175). Слюна содержит муцины, соли различных кислот, лизоцим (бактерицидный агент), ферменты амилазу и мальтазу, секреторные IgA, цистатины, IgG, экстра-околоушной гликопротеин (EP-GP), липокалин, histatins, лизоцим, калликреин, лактоферрин, лактопероксидаза гаптокоррин, β -microseminoprotein, IgM, альбумин и Zn- α -2-гликопротеин. В одном аспекте матрица-носитель содержит два или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более или семь или более компонентов жидкостей организма.

Слезная жидкость имеет многие из тех же компонентов, что и слюна, и имеет особенно высокую концентрацию секреторного IgA, VEGh, лизоцима и лактоферрина. В одном аспекте искусственная слезная жидкость содержит соли, такие как хлорид натрия и т.п., в качестве основного ингредиента, или глазные капли, содержащие гидроксиэтилцеллюлозу, хондроитин сульфат или гиалуроновую кислоту или ксантановую камедь (патент US 7875271, который включен здесь в качестве ссылки), как известно в данной области и закреплена двумя или более, тремя или более, четырьмя или более, пятью или более компонентами жидкости, как описано и использовано в качестве матрицы-носителя для очищения поликлональных антител, как описано здесь. В одном аспекте композиция может быть использована для лечения микробной инфекции глаз, таких как конъюнктивит.

Слизистая шейки матки содержит муцин, α -амилазу, лизоцим, лактопероксидазу, альбумин и β -microseminoprotein. Матрица образована сочетанием двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более этих компонентов в качестве матрицы-носителя в композиции со стерически специфически связывающей молекулой, такой как антибактериальное или противогрибковое поликлональное анти-тело, полученной способами данного изобретения.

В одном аспекте изобретение предлагает композицию, содержащую смолу, способную фиксировать воду или набухающую в воде, содержащую карбоксиметилкрахмал в сочетании с целлюлозой в качестве проникающего агента, который, когда контактирует с водой, почти мгновенно приобретает форму геля и тем самым становится легко применимым для вагинального применения. Таблетки, содержащие анти-тело/матричный состав, согласно данному изобретению могут содержать, например, карбоксиметилкрахмал и целлюлозы, как описано в патенте US 4808415, который включен здесь в качестве ссылки. В конкретном аспекте антибактериальные и противогрибковые поликлональные антитела объединены в матрицу и сформулированы, чтобы обеспечить лечение вагиноза широкого спектра действия. В одном аспекте композиция используется для лечения вагинальной бактериальной инфекции, такой как инфекции трихомонады или грибковый вагинит, инфекция *Candida*. Слизистые секреции слюны присутствуют в полости рта и являются производством слюнных желез. Слюна выполняет защитные функции, такие как смазывание тканей, увлажнение и реминерализация зубов. Слюна также выполняет функции защиты хозяина с иммунологической активностью, антибактериальной, антивирусной и антигрибковой активностью. Слюна также помогает пищеварительной деятельности с помощью пищеварительных ферментов, образования болюсов и вкуса.

Слюна содержит различные белки, такие как histatins и кислотные пролин богатые белки, которые являются уникальными для слюны. Слюна также содержит белки, присутствующие в других жидкостях организма, таких как лизоцимы, муцины, статерины и иммуноглобулины. Слюна содержит белки, такие как альбумин и Zn- α -2-гликопротеин, которые вырабатываются в плазме крови. Существует известная терапевтическая ценность бычьей слюны (Varshney et al., 1997, *Therapeutic value of bovine saliva in wound healing: a histomorphological study.*, *Indian J. Biol.* 1997 май, 35 (5) :535-7). В одном аспекте компоненты слюны могут быть полезны, например, в зубной пасте или жидкости для полоскания рта или других препаратах для перорального введения через слизистые оболочки.

Бронхиальная слизистая содержит муцин, α -амилазы, основные пролинбогатые полипептиды (ПБП), цистатины, статерин, EP-GP, лизоцим, β -microseminoprotein и альбумин. В одном аспекте изобретение предлагает композицию, содержащую стерическую специфически связывающую молекулу и матрицу-носитель, содержащие два или более, три или более, четыре или более компонента слюны или бронхиальной секреции. В одном аспекте композиция с матрицей-носителем должна быть упакована в сухом формате с стерической специфически связывающей молекулой, такой как антистрептококк группы А поликлональные антитела, полученные в соответствии с изобретением. В одном аспекте сухую композицию восстанавливают, например, в физиологическом растворе и вводят в горло спреем для лечения горла. Другие матрицы-носители могут быть получены, чтобы функционировать в другой среде использования, например для аэрозольного (ингаляционного), глазного, местного или других препаратов.

В конкретном варианте осуществления специфически связывающая молекула и матрица-носитель получены от различных видов. В дополнительном аспекте и специфически связывающая молекула, и матрица-носитель являются производными от нечеловеческого вида. В другом аспекте специфически связывающая молекула получена от неотносящихся к млекопитающим животным. В другом аспекте матрица-носитель является производным от млекопитающего, не являющегося человеком.

Составы и композиции.

В одном варианте антитела получают из плазмы, сыворотки или крови, молозива, яиц или другого компонента инокулированного животного или искусственной системы производства (например, клеточной культуры), затем очищают или обрабатывают и добавляют к матрице-носителю, такой как молозиво. Композиции позволяют использовать в качестве среды для доставки, например для перорального введения состава антител. Этот подход может обеспечить эффективный способ надежного масштабирования производства антител для состава таким образом, чтобы контролировать титр, постоянство и непрерывную доступность для коммерческих нужд. В одном из вариантов антитела получают из яиц привитых животных и могут быть очищены, или обработаны, или сохранены в яичном материале и добавлены в коровье молозиво. Существует явная потребность в недорогих и эффективных способах лечения многих желудочно-кишечных патогенов, и перорально вводимые антитела являются кандидатами на эту роль. Кроме продемонстрированной эффективности, перорально вводимые антитела, как правило, неиммунногенны. Считают, что обычно они хорошо переносятся, и побочных эффектов от их применения отмечено не было, и, как правило, не вызывает реакций, отличных от приема внутрь соответствующего пищевого продукта. Примечательно, что несколько продуктов, содержащих перорально вводимые антитела, получили сертификат GRAS (в целом, признаны безопасными) от FDA (Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов в США).

Один вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой терапевтические или профилактические антитоксинные составы широкого спектра, состоящие из смеси нейтрализующих антител широкого спектра, внедренных в матрицу-носитель, полученных в соответствии с этим способом, с целью обеспечить эффективное введение, направленное против широкого спектра неизвестных или недиагностированных состояний, приводящих к опосредованной токсинами диарее.

Один вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой терапевтический или профилактический антипатогенный состав широкого спектра, внедренный в матрицу-носитель, содержащую добавку антител широкого спектра против патогенов, при этом антитела получены в соответствии с этим методом. Один вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой терапевтический или профилактический антиадгезивный состав широкого спектра, внедренный в матрицу-носитель, содержащую добавку антиадгезивных антител широкого спектра, полученные в соответствии с этим методом.

Один вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой терапевтический или профилактический состав широкого спектра, внедренный в матрицу-носитель, содержащую добавку антитоксинных, антипатогенных и антиадгезивных антител широкого спектра, полученных в соответствии с этим методом.

Одним из важных ограничений использования продуктов на основе натуральных пищевых продуктов является то, что препараты ограничены результатами, предусмотренными естественными процессами. Настоящее изобретение позволяет селективное добавление уровней специфических антител и общих иммунных факторов (состав), значительно превышающих физиологические уровни, которые обычно могут быть достигнуты в природе. Настоящее изобретение также обеспечивает примешивание различных факторов таким образом, чтобы создать большую специфичность к целевым заболеваниям, патогенам или веществам.

В одном варианте осуществления состав, содержащий специфически связывающую молекулу, представляет собой сухой твердый (яичный порошок) состав. Порошкообразный состав запечатан в герметичные пакеты, при необходимости, покрытый слоем инертного газа. Состав можно хранить в течение длительного периода времени при комнатной температуре, в охлажденном состоянии или при температурах заморозки. В других вариантах осуществления высушенную композицию изготавливают в виде капсул или таблеток для перорального введения. В другом варианте осуществления состав прессуется в жевательные таблетки.

В другом варианте осуществления данное изобретение относится к фармацевтически приемлемым разбавителями для формулирования композиции, причем указанные фармацевтически приемлемые разбавители выбраны из группы, включающей лактозу, маннит, сорбит, микрокристаллическую целлюлозу, сахарозу, цитрат натрия, фосфат дикальция или любой другой ингредиент аналогичной природы по отдельности или в подходящей их комбинации; связующее, выбранное из группы, состоящей из трагакантовой камеди, аравийской камеди, метилцеллюлозы, желатина, поливинилпирролидона, крахмала или любого другого ингредиента аналогичной природы по отдельности или в подходящей их комбинации; наполнители, выбранные из группы, включающей агар-агар, карбонат кальция, карбонат натрия, силикаты, альгиновую кислоту, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, тапиоки, примогель или любой другой ингредиент, аналогичный по отдельности или в соответствующей комбинации; смазочные мате-

риалы выбраны из группы, включающей стеарат магния, стеарат кальция, тальк, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия или любой другой ингредиент подобного рода отдельно; глиденты выбраны из группы, включающей коллоидный диоксид кремния или любой другой ингредиент подобного рода, по отдельности или в соответствующей их комбинации; подслащивающий агент, выбранный из группы, включающей сахарозу, сахарин или любой другой аналогичный ингредиент или их подходящая комбинация; вкусовые вещества, выбраны из группы, включающей мяту перечную, метилсалицилат, апельсиновый ароматизатор, ванильный ароматизатор или любой другой фармацевтически приемлемый вкус отдельно или в соответствующей их комбинации; смачивающие агенты выбраны из группы, состоящей из ацетилового спирта, моностеарата глицерина или любого другого фармацевтически приемлемого смачивающего агента отдельно или в подходящем их сочетании; абсорбенты выбраны из группы, состоящей из каолина, бентонита, глины или любого другого фармацевтически приемлемого абсорбента отдельно или в соответствующей комбинации; ингибиторы, выбраны из группы, состоящей из воска, парафина или любых других фармацевтически приемлемых ингибиторов отдельно или в подходящей комбинации.

В другом аспекте суточная доза для человека, не являющегося новорожденным, стандартизирована любым методом количественного определения специфических антител. В одном аспекте доза композиции стандартизирована путем использования ИФА для оценки концентрации специфических антител против антигена антитела в составе. В одном аспекте одна доза композиции для перорального введения, эффективной для лечения патогенной инфекции, содержит антигенспецифически связывающую молекулу в количестве от 0,0001 до 20 мг; от 0,001 до 15 мг; от 0,01 до 10 мг; от 0,05 до 5 мг; от 0,1 до 1 мг смешанной антигенспецифически связывающей молекулы.

Термин "твердая форма" относится к высушенной форме специфически связывающей молекулы или высушенной форме матрицы-носителя или твердой лекарственной форме, содержащей как высушенную специфически связывающую молекулу, так и матрицу-носитель в виде порошка, спрессованной таблетки, таблетки или капсулы. В одном аспекте твердая дозированная форма предназначена для перорального введения. В одном аспекте порошок представляет собой состав для суспензии. В одном аспекте порошкообразное высушенное иммунное яйцо и порошкообразное высушенное молоко упакованы в герметичный пакет. Непосредственно перед пероральным введением содержимое пакета суспендируют или растворяют примерным количеством жидкости и вводят перорально. В одном аспекте композиция также может вводиться в жидкой форме.

В одном из аспектов одна доза содержит 1, 2, 3, 4, 5, 5, 6 или 7 г сухого иммунного яйца и 1, 2, 3, 4, 5, 5, 6 или 7 г сухого коровьего молока. В одном аспекте одна доза высушенной лекарственной формы содержит 3 г высушенного иммунного яйца и 4 г высушенного коровьего молока. В одном аспекте одну дозу высушенной лекарственной формы содержит 2 г высушенного иммунного яйца и 4 г высушенного коровьего молока. В одном аспекте одна доза высушенной лекарственной формы содержит 4 г высушенного иммунного яйца и 4 г высушенного коровьего молока. В другом аспекте дозу содержимого одного пакета растворяют в примерно 2 мл воды и вводят перорально.

Составы для перорального применения могут быть также получены в виде пастилок, жевательных таблеток или в виде твердых желатиновых капсул, где активный ингредиент смешан с инертным твердым разбавителем (например, картофельным крахмалом, лактозой, микрокристаллической целлюлозой, карбонатом кальция, фосфатом кальция или каолином), или в виде мягких желатиновых капсул, где активный ингредиент смешан с водой или маслянистой средой, например арахисовым маслом, жидким парафином или оливковым маслом. Порошки и гранулы могут быть получены с использованием ингредиентов, указанных выше для таблеток и капсул обычным способом, с использованием, например, миксера, аппарата с псевдоожиженным слоем или оборудованием для распылительной сушки.

В различных вариантах осуществления составы согласно изобретению обладают различными преимуществами по сравнению с предшествующим уровнем в данной области. В одном аспекте композиции изобретения, содержащие антиген-специфический IgY и матрицу-носитель с коровьим молоком, имеют преимущество в том, что они готовы в малый период времени - в пределах от 6 недель, после того как необходимые антигены определены. Это обеспечивает легкую воспроизводимость и стандартизацию протоколов куриной вакцинации. В одном конкретном аспекте различные группы кур были вакцинированы одним смешанным антигенным препаратом каждая, а затем их объединили широким спектром действия композицией для лечения патогенной инфекции. В одном конкретном аспекте три группы кур были вакцинированы отдельно смешанными антигенными препаратами, а затем их объединили для получения широкого спектра действия композиции для лечения недифференцированной диареи. Этот метод имеет преимущество в том, что смесь антигенспецифических антител в композиции может быть адаптирована для конкретной вспышки, региона или сезона, если это необходимо. Наконец, в вариантах осуществления изобретения специфически связывающие молекулы не должны быть отделены от цельного сухого яйца для быстрого приготовления и длительного хранения.

В другом аспекте композиции по изобретению являются эффективными для перорального применения в лечении патогенных инфекций у новорожденных. Желудочно-кишечный тракт детеныша очень кислотный и менее абсорбируемый, чем у новорожденного, как описано здесь. В примерах изобретения композиции были эффективны при лечении недифференцированной диареи у детенышей от 6 ме-

сяцев до 5 лет. В другом аспекте композиции по изобретению являются эффективными при лечении или профилактики диареи путешественников у взрослых. Матрица-носитель является защитной и реакционноспособной матрицей для комбинации с антигенспецифически связывающими молекулами. В другом аспекте композиции изобретения приведены в порошкообразной твердой форме для приготовления суспензии непосредственно перед введением. В одном аспекте суспензированная или восстановленная лекарственная форма имеет преимущество в том, что очень приемлема для младенцев и детей, даже если они страдают от симптомов патогенной инфекции. Данное преимущество в том, что полная доза легко вакцинируется и попадает в организм субъекта, страдающего от патогенной инфекции.

В другом аспекте композиции согласно изобретению могут быть использованы для введения широкого спектра пассивного иммунитета, либо лечения, либо профилактики патогенных инфекций. В одном аспекте низкий уровень иммунизации кур может быть достаточным для получения композиции с эффективным количеством антиантигенспецифически связывающей молекулы и привести к эффективному составу, широкого спектра при введении с матрицей-носителем.

Лечение или профилактика патогенных инфекций.

Композиции согласно данному изобретению включают специфически связывающий белок, внедренный в матрицу-носитель. Эти композиции могут быть введены любым способом, подходящим к их конкретным иммуногенным или биологическим или иммунологическим реактивным характеристикам, в том числе пероральным, внутривенным, трансбуккальным, назальным, через слизистую оболочку, кожу или другими методами, на основе соответствующей матрицы-носителя. Конкретный вариант осуществления включает пероральное введение композиции согласно изобретения.

В различных вариантах осуществления изобретения композицию вводят в качестве профилактической или терапевтической композиции. В различных аспектах композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель. В различных аспектах композиция не содержит полимер, сополимер, липосомы, гидрогель или фибрин. В различных аспектах композиция не содержит микросферы или микрокапсулы. В различных аспектах композиция не включает иммуноген или антиген. Композиция по изобретению может быть введена с помощью перорального, назального, глазного введения, через слизистую оболочку или их комбинации.

Один вариант осуществления данного изобретения использует пероральное введение. Было продемонстрировано на примере систем человека и животного, что пероральное введение антител, иммуноглобулинов и других биологических иммунных факторов может оказать заметное воздействие на курс, тяжесть и длительность заболевания, связанные с или под влиянием желудочно-кишечного тракта. Прямая широкого спектра антител внедрена в пределы матрицы-носителя, такого как, например, молозиво для перорального введения. Молозиво служит для обеспечения синергической защиты и является эффективным атрибутом по отношению к составу, содержащему антитело. Любая комбинация антител может быть использована в носителе, включая, но не ограничиваясь, комбинацию антипатогенных, антитоксичных и антиадгезивных антител.

В одном аспекте композиции согласно изобретению используют для лечения пациентов, страдающих от различных патогенных инфекций. Композиции и составы для перорального введения можно вводить один раз, два, три или четыре раза в день в течение двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, 8, 9, 10, 11 или 12 последовательных дней для лечения патогенной инфекции. В одном аспекте композицию вводят дважды в день в течение пяти дней для лечения патогенной инфекции. В другом конкретном аспекте композицию вводят один раз в день в течение трех последовательных дней для эффективного лечения недифференцированной диареи у новорожденных детей, или для лечения диареи путешественников у новорожденных детей или взрослых. В другом аспекте композиция может вводиться регулярно для профилактики патогенной инфекции. В случае композиции для лечения патогенной инфекции слизистой путем местного нанесения на слизистую оболочку композиция может быть нанесена от двух до шести раз в день в течение периода от 3 до 12 дней.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предлагает композицию, эффективную для лечения недифференцированной диареи у детеныша человека. Композиция использует эффективные стратегии поликлональных антител (куриные прививки, с антителами, полученными из яиц), чтобы создать высокую специфичность антител, нацеленных на несколько причин патологической диареи. В конкретном варианте осуществления композиция включает специфичные поликлональные антитела в матрице-носителе, которая является коммерческим коровьим молозивом.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предлагает экономичную композицию для эффективного лечения недифференцированной диареи у детей. Композиция включает смесь поликлональных антител, в первую очередь IgY, специфическую *E.coli*, *Salmonella* spp., ротавирус, грамотрицательные бактерии, токсины, продуцируемые патогенами, и адгезины, которые обеспечивают патогену крепление и колонизацию в желудочно-кишечном тракте.

В конкретном аспекте композиция содержит эквивалентное весовое количество высушенного иммунного яичного продукта из каждой из трех групп, инокулированных различными антигенами или препаратами смеси различных антигенов, упакованное совместно с определенным весовым количеством коммерческого высушенного гипериммунного коровьего молозива. В одном варианте от 0,5 до 3 г, от 0,7

до 2,0 г, 1,0 г, 1,3 г или 1,5 г сухого продукта из иммунного яйца из каждой группы добавляют в упаковку с разовой дозой. Предпочтительно либо 1,0 или 1,3 г каждого иммунного яичного продукта добавляют в упаковку с разовой дозой. В другом аспекте от 1 до 5 г, от 2 до 4 г, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 или 5 г высушенного молозива добавляют в ту же упаковку.

Перед применением содержимое пакета или саше смешивают с примерно 2 унциями очищенной воды или другими жидкостями для перорального введения. Весь восстановленный состав вводят перорально субъекту. Композицию можно вводить один-четыре раза в день в течение от двух до десяти дней. В конкретном варианте осуществления композицию вводят один раз в день в течение 3 последовательных дней. Изобретение обеспечивает способ лечения недифференцированной диареи у детей посредством введения композиции по изобретению один раз в день в течение двух, трех или четырех дней.

В одном из аспектов композицию по изобретению вводят в качестве дополнительной терапии к лечению антибиотиками. В этом аспекте композиция может быть введена один раз в день в течение первых трех дней лечения. В другом аспекте композицию по изобретению вводят с раствором для пероральной регидратации (РПС). В другом аспекте, композицию по изобретению вводят совместно с составом цинка для перорального введения. В другом аспекте композицию по изобретению вводят в качестве дополнения к лечению антибиотиками, чтобы предотвратить чрезмерный рост конкретного патогенного организма, который устойчив к антибиотикам. Как подробно описано в примерах, композиция и способ эффективны для быстрого устранения симптомов недифференцированной диареи у детей, в результате чего значительно снижается объем стула, частота стула и продолжительность диареи, а также значительно улучшается общее состояние согласно наблюдению врача.

В одном альтернативном варианте композиции по изобретению используются для лечения диареи путешественников. Наступление ДП обычно происходит в течение первой недели путешествия, но может произойти в любое время в течение путешествия и даже после возвращения домой. Наиболее важным фактором, определяющим риск, является пункт назначения путешественника. Направлениями, характеризующимися высокими рисками, являются развивающиеся страны Латинской Америки, Африки, Ближнего Востока и Азии. Группой высокого риска являются молодые люди, люди с ослабленным иммунитетом, лица с воспалительными заболеваниями кишечника или диабетом, и лица, принимающие H-2 блокаторы или антациды. Большинство случаев ДП начинаются внезапно. Болезнь обычно приводит к увеличению частоты, объема и веса стула. Также часто изменяется консистенция стула. Как правило, путешественник производит 4-5 жидких или водянистых испражнений каждый день. Другими симптомами, обычно связанными с заболеванием, являются тошнота, рвота, диарея, спазмы в животе, вздутие живота, лихорадка, urgency и недомогание. Инфекционные агенты являются основной причиной ДП. Бактериальные энтеропатогены вызывают около 80% случаев ДП. Наиболее распространенным возбудителем, выделенным в странах, в которых проводили обследование, является энтеротоксигенная кишечная палочка (ЕТЕС). ЕТЕС вызывает водянистую диарею, сопровождающуюся судорогами и понижением температуры, но без лихорадки. Кроме того, ЕТЕС и другие бактериальные патогены, различные вирусные и паразитарные кишечные патогены также являются потенциальными возбудителями. В одном аспекте композицию изобретения вводят пациенту один раз в день в течение трех последовательных дней в качестве альтернативы или дополнения к антибиотикам для лечения диареи путешественников. Ограниченные данные полевых исследований наблюдают улучшение симптомов диареи в течение 24 или 48 ч после первой дозы. Кроме того, две дозы в день композиции изобретения вводят в 1-й день, после однократной дозы в дни 2 и 3. В одном аспекте композицию изобретения вводят по альтернативному ежедневному или еженедельному графику либо по графику уменьшения дозировки для профилактики диареи путешественников.

В другом альтернативном варианте осуществления композиции по изобретению используются как "пребиотик" для регулирования желудочно-кишечной флоры субъекта, например, до введения пробиотика. Используемые здесь термин "пребиотик" относится к композиции, которая позволяет специфические изменения, как в композиции, так в активности кишечной микрофлоры, что воздействует на улучшение состояния здоровья субъекта. В одном варианте осуществления, композиция является полезной для регулирования кишечной микрофлоры таким образом, чтобы уменьшить или устранить один или более нежелательных штаммов бактерий. В одном аспекте антиантгенная иммуноглобулиновая композиция создана для регулирования кишечной микрофлоры таким образом, чтобы уменьшить или устранить один или более нежелательных штаммов бактерий. В другом аспекте, композицию используют в качестве дополнения к традиционным пребиотикам. В еще одном аспекте композиция изобретения дополнительно содержит растворимое волокно. В другом аспекте композиция используется только для регулирования флоры.

В другом аспекте изобретение предлагает способ регулирования флоры желудочно-кишечного тракта у субъекта, включающий стадии введения композиции изобретения, чтобы уменьшить или устранить один или более нежелательных штаммов бактерий, с последующим введением пробиотика для введения одного или более желательных штаммов бактерий. В другом аспекте композицию изобретения вводят в качестве дополнения к лечению антибиотиками, чтобы предотвратить чрезмерный рост конкретного патогенного организма, который устойчив к антибиотикам.

Пример 1. Композиции для лечения диареи.

Диарея является симптомом широкого спектра причин, включая бактериальные, вирусные, протозойные и паразитарные инфекции. Бактериальной диареей индуцированы несколько организмов, в том числе различные формы *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae* и *parahemolyticus*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia* и др. Вирусная диарея у детей часто является причиной ротавируса, но также может быть вызвана несколькими другими вирусами.

Известны несколько возбудителей диареи в организме. Эти возбудители могут быть объединены в общие кластеры, которые продуцируют структурно-родственные токсины, к которым может быть получена серия нейтрализующих антител широкого спектра, которая при добавлении в состав с клинически эффективными титрами может быть использована в качестве терапевтического воздействия широкого спектра действия, не зависящего от организма, по отношению к токсинопосредованной диарее. Иначе говоря, антитела, специфичные к возбудителям диареи генерируются с помощью прививки кур с антигеном. Имунные яйца собирают и цельное яйцо пастеризуют и сушат распылением с получением порошкообразной формы. Коммерческое коровье молоко смешивают в порошкообразную форму. Два порошка добавляют последовательно к одной дозе пакета, герметизируют и распространяют в сухеном виде для перорального применения. Перед введением порошкового перорального препарата его смешивают с небольшим количеством воды.

Это лечение, нацеленное на создание пассивного иммунитета у пациентов, как показано в данных примерах. Характер лечения делает сопутствующие факторы риска сравнимыми с пищей из источника, где были собраны антитела (например, аналогичным фактору риска будет съесть яйцо и выпить стакан молока). Это эффективное лечение с меньшей токсичностью, чем имеющиеся в настоящее время альтернативные медикаменты.

Пример 1А. Куры были индивидуально инокулированы очищенными антигенами, полученными из 5 штаммов *E.coli*: четырех штаммов ATCC, содержащие *E.coli* адгезины антигенов F41, 97P, F19 и K99 пилей, и одного дикого типа штамма *E.coli*, полученного из молока. Каждую курицу инокулировали только одним антигеном. Куры были привиты один раз в неделю в течение трех недель. Адьювант Фрейнда был использован для первой иммунизации, а затем неполный адьювант Фрейнда для второй и третьей прививки. Два укола в левую и правую грудь были использованы для прививки. Яйца были размещены по отдельности; яйца были собраны, флэш-пастеризованы и высушены распылением. Каждый из пяти препаратов антител смешивали в равных частях. В виде сухого яичного порошка антиантитела кишечной палочки препарат хранят в замороженном виде в течение 2 лет.

Вторая группа кур инокулирована смешанным антигенным препаратом, содержащим ротавирус, коронавирус и антигены кишечной палочки. Протоколы прививки, сбора и переработки яиц были соблюдены, как указано выше. В виде сухого яичного порошка антитела против диареи хранят в замороженном виде в течение 1,5 лет. Для характеристики препаратов антител был использован ИФА.

Один грамм каждого из высушенных антител препарата против кишечной палочки и высушенные антитела антидиарейного препарата были смешаны с 3 или 4 г коммерчески высушенного жирного коровьего молока в одном пакете дозы.

Пример 1Б. Три группы кур были индивидуально инокулированы, каждая разными смешанными антигенными препаратами: первый антигенный препарат содержит ротавирус (серотипы G6 и G10), коронавирус, энтеротоксигенную кишечную палочку, разбавленную K99 пили фактором адгезии, и кластридия перфрингенс типа C, анатоксин с адьювантной, второй препарат, содержащий энтеротоксигенные штаммы кишечной палочки, имеющий K99, K88, 987P или F41 факторов адгезии; и третий смешанный антигенный препарат, содержащий различные кишечные палочки, эндотоксин; с адьювантом. Каждая из трех групп получила только по одному смешанному антигенному препарату. Яйца были собраны, очищены, разбиты, пастеризованы и высушены распылением или тепловой сушкой, чтобы создать три сухих иммунных яичных продукта. Сухой яичный продукт, в случае необходимости, дополнительно оценивался ИФА для удельной активности IgY. Одинаковое количество каждого из трех высушенных иммунных яичных продукта смешивали с 3 или 4 г высушенного молока в одной дозе пакета. Либо 2 г, 3 г или 4 г общего веса сухого иммунного яичного продукта было использовано в одной дозе пакета, как описано ниже. В одном аспекте коммерчески высушенное молоко не проявляло удельную активность по отношению к антигенам вакцин.

Пример 1В. Иммунизация кур посредством IgY производства.

Следующий протокол иммунизации был адаптирован из протокола Gallus Immunotech, Inc. и может быть использован для генерации IgY поликлональных антител. Несколько яиц необязательно должны быть собраны перед иммунизацией, чтобы служить в качестве базового контроля. Если смешанный антигенный препарат используется для крупного рогатого скота или свиней, то он разбавляется в пропорции 1:02, 1:04, 1:08 или 1:16 перед введением. В день 0 курам вводят среднее количество между 0,02 и 0,5 мг антигена с полным адьювантом Фрейнда. Инъекции могут быть либо подкожными, либо внутримышечными, в ткани молочной железы курицы в нескольких местах. Общий объем антиген/адьювант смеси может быть примерно 1 мл адьюванта от половины до двух третей от объема. Иммунизации повторяются обычно в дни 14, 21 и 28 с использованием неполного адьюванта Фрейнда, около половины от началь-

го количества антигена. Как правило, специфическое антитело в яйцах может быть обнаружено примерно на 30-й день. При длительном производстве антител куриные инъекции повышаются каждые несколько месяцев. Яйца могут храниться в холодильных установках до обработки и/или очистки IgY. В одном аспекте яйца могут находиться в холодном хранении на срок до одного месяца, или до двух месяцев до обработки или очистки. В другом аспекте IgY могут быть получены аналогичным образом из утиных, гусиных, страусиных, перепелиных или индюшиных яиц с использованием соответствующих количеств антигена.

Пример 2. Введение антител для лечения *Clostridium difficile*.

В одном варианте осуществления способы и композиции изобретения, которые используются для лечения *Clostridium difficile* (*C. difficile*), бактерии, которые естественным образом присутствуют у большинства людей. Количество бактерий *C. difficile* находится под контролем со стороны другой естественной флоры кишечника. Пациенты часто провоцируют инфекции *C. difficile*, когда вводят антибиотики в течение другого заболевания, тем самым разрушают естественную флору кишечника, что позволяет бактериям *C. difficile* размножаться бесконтрольно. В то время как многие штаммы *C. difficile* можно лечить с помощью антибиотиков, растет все большее число штаммов *C. difficile*, которое устойчиво к лечению антибиотиками. Это приводит к длительному и трудному восстановлению для пациентов, и даже может стать опасным для жизни в определенных обстоятельствах. Процесс нейтрализации популяций *C. difficile* с помощью антитела, которое создает пассивный иммунитет, способен контролировать количество бактерий *C. difficile* для их естественного баланса, флора кишечника должна быть восстановлена.

Как и в борьбе с диареей, составы, вызванные ротавирусной и грамотрицательной бактерией, антитело, внедренное в матрицу-носитель, создано специально для привязки к *C. difficile* или его токсинам и является эффективным терапевтическим подходом. Эта композиция может быть использована для лечения или текущей инфекции или для предотвращения такой инфекции. Таким образом, лечение можно вводить отдельно или одновременно с антибиотиком. Эта процедура приносит не только пользу пациентам, перенесшим *C. difficile*, также ее можно вводить пациентам с высоким риском развития *C. difficile* в профилактических целях.

Антитела, которые нейтрализуют *C. difficile*, вводятся в матрицу-носитель (смесь белков и ферментов, которые предназначены для "активирования" антител в кишечнике, а также обеспечения вторичного иммунитета, защиты или питания). В одном варианте антитела вводят путем инъекции или прививки животного с антигеном или комбинацией антигенов, которые могут или не могут содержаться в виде антигенного смешанного препарата (возможно в сочетании с адъювантом, чтобы вызвать сильный иммунный ответ).

В одном аспекте антиген, полученные из антигена или токсина *C. difficile*. В другом аспекте, комбинация антигенов содержит один или несколько антигенов или токсинов, полученных из *C. difficile*, а также один или несколько дополнительных вирусных антигенов. В другом аспекте комбинация антигенов содержит один или более антигенов или токсинов, полученных из *C. difficile*, и один или более дополнительных бактериальных антигенов или токсинов. В другом аспекте комбинация антигенов содержит один или несколько антигенов, полученных из *C. difficile*, а также один или несколько дополнительных протозойных антигенов. В другом аспекте комбинация антигенов содержит один или несколько антигенов, полученных из *C. difficile*, а также один или несколько дополнительных грибковых антигенов.

Затем антитела, полученные из животных продуктов, таких как молоко, яйца, или молозиво из животного, или полученные непосредственно от животного продукта, например сыворотки, плазмы. В конкретном аспекте кур инокулируют антигеном, комбинацией антигенов или вакциной, а антитела получают из целых яиц или яичного желтка или из цельных или очищенных яиц или яичного желтка привитых кур. В другом аспекте антитела - это поликлональные антитела.

Эта композиция предназначена для лечения инфекции *C. difficile* или может быть профилактическим средством против инфекции *C. difficile*. Например, вещество состоит из антител, конкретно нацеленных на *C. difficile*, внедренное в матрицу-носитель (например, молозиво). После сбора антитела могут быть превращены в порошок. Матрица-носитель также может иметь форму порошка. Два порошка затем тщательно смешивают или добавляют отдельно в одну дозу пакета или флакона и распространяют в сухой форме. В предпочтительном способе введения вещество можно вводить перорально, через рот. Для потребления порошкообразные вещества будут смешаны с небольшим количеством жидкости, такой как вода, молоко, сок или раствор электролита, непосредственно перед употреблением, и будут приняты в соответствии с указаниями врача. Также предполагаются другие способы введения.

На сегодняшний день лечение инфекции *C. difficile* фокусируется на антибиотикотерапии. Тем не менее, существуют случаи, когда сильные антибиотики были причиной инфекции, а также случаи, когда была разработана устойчивость к антибиотикам, известны несколько альтернативных методов лечения в настоящее время. Данный вариант осуществления изобретения направлен на нейтрализацию *C. difficile*, используя естественные иммунные механизмы, а не токсичные антибиотики. Преимущество состоит в том, что это позволяет рост естественной флоры кишечника при одновременном снижении уровня популяции *C. difficile*.

Комбинация антител, введенная в матрицу-носитель для повышения эффективности антител, в на-

стоящее время не используется при лечении болезней, вызванных *C. difficile*. Методы изобретения создают пассивный иммунитет у пациентов. Характер лечения делает сопутствующие факторы риска сравнимыми с пищей из источника, где были собраны антитела (например, аналогичным фактору риска будет съесть яйцо и выпить стакан молока). Это эффективное лечение с меньшей токсичностью, чем имеющиеся в настоящее время альтернативные медикаменты.

В одном аспекте выбранные антитела получают, очищают и отделяют и получают в порошкообразной форме. В другом аспекте выбранные антитела не очищены или отделены, но обработаны как удельный продукт. Например, содержимое цельного яйца, полученного из привитых кур, обрабатывают, например пастеризуют, и получают в порошкообразной форме, без дополнительных стадий очистки. Активированную ферментную/белковую смесь (например, включая молозиво) также получают в форме порошка. Два порошка тщательно смешивают и распространяют в сухом виде для перорального применения. Перед введением порошкового перорального препарата его смешивают с небольшим количеством воды.

Это лечение пассивного иммунитета у пациентов. Характер лечения делает сопутствующие факторы риска сравнимыми с пищей из источника, где были собраны антитела (например, аналогичным фактору риска будет съесть яйцо и выпить стакан молока). Это эффективное лечение с меньшей токсичностью, чем имеющиеся в настоящее время альтернативные медикаменты.

Пример 3. Введение антител для лечения *Helicobacter avlori*.

Helicobacter pylori (*H. pylori*) представляет собой грамотрицательные бактерии, которые могут обитать в области желудка. Считается, что *H. pylori* связано двенадцатиперстной кишкой и язвой желудка и, возможно, рака желудка. *H. pylori* может избежать кислотной среды желудка с помощью закапывания в слизистом слое эпителиальной клеточной поверхности, который имеет более нейтральную pH среду. *H. pylori* может производить адгезины для связывания с мембранными связывающими липидами и углеводами эпителиальных клеток. Колонизация *H. pylori* внутри области желудка может быть результатом при хроническом гастрите, длительном воспалении желудка. *H. pylori* инфекции являются основной причиной язвенной болезни. Выбранные антитела против *Helicobacter pylori* получены и подготовлены в форме порошка. Активированную ферментную/белковую смесь (например, включая молозиво) также получают в форме порошка. Два порошка тщательно смешивают и распространяют в сухом виде для перорального применения. Перед введением порошкового перорального препарата его смешивают с небольшим количеством воды. Методы изобретения создают пассивный иммунитет у пациентов. Характер лечения делает сопутствующие факторы риска сравнимыми с пищей из источника, где были собраны антитела (например, аналогичным фактору риска будет съесть яйцо и выпить стакан молока). Это эффективное лечение с меньшей токсичностью, чем имеющиеся в настоящее время альтернативные медикаменты.

Пример 4. Клинические исследования эффективности недифференцированной диареи.

Эффективное лечение диареи широкого спектра действия является серьезной проблемой в связи с широким спектром возбудителей, ограниченной доступностью диагностического тестирования для определения режимов и методов. Текущие стандартные вмешательства в случаях тяжелой диареи включают вездесущее введение антибиотиков и солей для пероральной регидратации (СПР). Однако такой подход показал ограниченную эффективность и способствовал развитию устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий.

Пример 4А. Полевые исследования (испытания) 1 и 2.

Клинические исследования проводились для оценки переносимости и эффективности препарата примера 1А для лечения или ускорения окончания недифференцированной диареи. Первым примером для сравнительного исследования послужил случай в общей сложности 63 педиатрических пациентов с диареей у детей обоих полов от шести месяцев до пяти лет. В ходе исследования сравнивались клинические исходы тест-группы, "испытание 1", которая получила пероральные введения примера 1А, введения антибиотиков и СПР; тест-группы Б, получавшей только антибиотики и СПР. Вторая тест-группа АА, "испытание 2", поступила в количестве 33 пациентов для последующих исследований по проверке композиции примера 1А при различных сезонных условиях.

Все участвующие педиатрические пациенты представляли случай "серьезной" или "тяжелой" профильной диареи (уровень 4 или 5) по 5-балльной шкале (см. табл. 1) по оценке лечащего врача. Диагностическая дифференциация не была сделана для определения возбудителя или этиологии диареи у детей. Пациенты с повышенным водянистым стулом или кровавым стулом были исключены. Кроме того, пациенты, у которых была аллергия на молоко, курицу или яичные продукты, также были исключены.

Таблица 1

5-Бальная шкала		
	Уровень 1	Уровень 5
Частота стула	1-2 в день	10 или более в день
Консистенция стула	1 = норма	5 = абсолютно жидкий
Состояние по оценке врача	1 = норма	5 = тяжелое (как правило, стационар)

Зарегистрированные дети (n=63) были разделены на две группы, экспериментальное исследование 1, "группа А" (34 зарегистрированных; 29 из которых прошли испытание), отрицательный контроль "группа В" (29 зарегистрированных; 28 из которых прошли испытание) и исследование 2 "группа АА" (31 зарегистрированный). Вторая контрольная группа "группа ВВ" получавшая антибиотики и СПР, была использована в качестве отрицательного контроля одновременно с группой АА, однако результаты исключены.

Каждый тест группы получала 2 г комбинированного яичного порошка и 4 г молотого, смешанных в воде, перорально один раз в день в течение трех дней подряд. Каждая группа наблюдалась и данные собирались в течение пяти дней. Группа А получала композицию из примера 1 в дополнение к стандартному набору антибиотиков и растворов пероральной регидратации (РПР) согласно назначению лечащего педиатра. Группа В лечилась стандартным режимом антибиотиков и РПР. Шестимесячный промежуток времени между исследованием 1 и исследованием 2 был разрешен в целях тестирования сезонности. Оба испытания были проведены в одном исследовательском центре. В каждой группе антибиотики и РПР были назначены индивидуально в каждом конкретном случае лечащим педиатром (табл. 2).

Таблица 2

Исследуемые группы с номерами завершенных дел				
Группа	Терапевтические введения	Завершенны е	Период лечения	Наблюдение
А	Композиция из Примера 1 + Антибиотик + РПР	29	Композиция из Примера 1: 1-4 дня Антибиотик + РПР: 1-6 дней	5 дней
АА	Композиция из Примера 1 + Антибиотик + РПР	31	Композиция из Примера 1: 1-3 дня Антибиотик + РПР: 1-6 дней	5 дней
В	Антибиотик+РПР	28	Антибиотик + РПР: 1-5 дней	5 дней

Состав из примера 1А упакован в дозу 5 г порошка одного пакетика. Композицию вводят перорально, одним пакетом, повторно суспендируют в приблизительно 2 унциях питьевой воды. Пациенты должны принимать введения в одинаковых условиях, с повторным суспендированием, придерживаясь этого протокола во всех случаях.

Параметры будут сохранены в этом примере индивидуально для каждого пациента, включая частоту стула, консистенцию стула и оценку состояния врачом. Частота стула является основным больничным показателем желудочно-кишечных испражнений за 24-часовой период. Консистенция стула указывается по 1-5 шкале, где 1 - норма и 5 - абсолютно жидкая. Оценка общего состояния врачом указывается по 1-5 шкале, где 1 соответствует нормальному параметру здорового ребенка и 5 указывает на тяжелобольного ребенка.

Врачам, участвующим в испытаниях, было предложено определить прогрессию пациента, исходя из тех параметров, которые были описаны в течение шести дней.

Показатели были объединены в единую базовую прогрессию пациента для каждого параметра. Пациенты были оценены с точки зрения улучшения состояния по сравнению с ожидаемыми результатами на основе опыта врача, а также в соответствии совпадающих отрицательных контролей.

Анализ данных проводился в MS Excel и Matlab. Статистическая значимость была вычислена с помощью хи-квадрат с р-значением <0,05 считается значимым. Результаты показаны на фиг. 1-3.

Заметное улучшение у пациентов, получающих композиции из примера 1А, наблюдалось в течение 24 ч после первоначального введения дозы. В течение 48 ч после введения первой дозы пациентам их состояние, как правило, стабилизировалось до нормального уровня или почти нормального уровня.

Как показано на фиг. 1, среднее количество желудочно-кишечных испражнений в 24-часовой период уменьшилось с 9 до 2 в группе А (испытание 1) после первоначальной дозы композиции из примера 1.

Группа АА (испытание 2) показала аналогичное уменьшение с 10 до 3. В противоположность этому среднее число эпизодов в группе В (отрицательный контроль) снизилось с 11 до 10 за тот же период времени. Среднее число эпизодов в группах А и АА (испытания 1 и 2) остается постоянным и составляет прогрессию с 2 до 3 дня, а группа В в конечном счете постепенно уменьшила показатели до 6 эпизодов за 24 ч на 5 день. В группе в течение 24 ч после введения композиции из примера 1 уровень частоты стула приближается к нормальным уровням, $2,32 \pm 2,48$, более 86% сокращения продолжительности желудочно-кишечных симптомов по сравнению с контрольной группой ($P < 0,001$). В течение 48 ч частота стула улучшилась до $2,14 \pm 2,19$. В группе АА частотные показатели соответствуют аналогичным показателям стабилизации и повышаются до $2,56 \pm 0,68$ в течение 24 ч и $2,00 \pm 0,45$ в течение 48 ч, заметное улучшение по сравнению с контролем ($p < 0,001$).

Как показано на фиг. 2, консистенция стула была жидкой у всех пациентов. Консистенции стула группы А и группы АА были улучшены почти до нормальных уровней в течение 24 ч после первой дозы композиции из примера 1. В контрольной группе В консистенция улучшилась, но была все еще жидкой в течение 24 ч с симптомами, не в полной их мере, за весь период наблюдений. У группы А наблюдалась нормальная консистенция стула в течение 48 ч и до конца исследования, тогда как у группы В на 3-й день улучшилось до средней жидкости. Группа В в конечном счете достигла почти нормального уровня консистенции стула на 6 день, в то время как консистенция стула группы А осталась нормальной в течение 3-6 дней.

Удивительно, но в течение 24 ч после введения композиции из примера 1А, консистенции стула вернулись к умеренным уровням, $2,05 \pm 1,02$ для группы А и $1,96 \pm 0,61$ для группы АА, более 86% сокращение продолжительности желудочно-кишечных симптомов по сравнению с контрольной группой ($P < 0,001$). В течение 48 ч консистенции стула группы А упала ниже нормальных уровней $1,41 \pm 0,9$, а уровни группы АА составили $1,17 \pm 0,37$.

Как показано на фиг. 3, все пациенты, включенные в исследование, были оценены врачами, как тяжелобольные, вплоть до серьезных обезвоживаний, рвоты и низкой чувствительности. Состояние пациентов в группе А и группе АА значительно улучшилось в течение ночи ($P < 0,001$), после первой дозы композиции из примера 1, в среднем оценка общего состояния составила приблизительно два. Через 24 ч пациенты группы В оставались тяжелобольными. Состояние больных группы А и группы АА в течение 48 ч улучшилось до нормы и продолжает улучшаться на третий день, тогда как состояние больных группы В улучшилось, но остается очень тяжелым. На протяжении 4-6 дней пациенты в группе А полностью восстанавливаются, а состояние всех пациентов в группе В улучшилось линейным образом, однако они по-прежнему умеренно больны в конце исследования.

Общая оценка врача показывает, что состояние приближается к здоровому уровню в течение одного дня, у группы А снижается от начального значения $4,46 \pm 0,5$ до $11,9 \pm 0,9$ уровня, который считается в пределах нормы для данной популяции. Группа АА показывает аналогичные результаты, опустившись с начальным уровнем $4,3 \pm 0,46$ до $2,03 \pm 0,49$. Коллективные показатели составляют 86% сокращение продолжительности заболевания по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$). В течение 48 ч, по оценке врача, состояние улучшено до $1,26 \pm 0,83$ в группе А и $1,4 \pm 0,49$ для группы АА.

Чтобы убедиться в нормальном распределении в исследованиях в отношении ожидаемого распространения ротавируса, испытание было выполнено в рамках группы А (испытание 1), независимо от первичной оценки исследования. Образцы стула были взяты у 26 из 29 пациентов в экспериментальной группе А и у 24 из 31 пациентов из группы АА, были протестированы в независимой лаборатории с использованием хорошо известного коммерческого анализа агглютинации (Slidex Rota-kit, BioMerieux, Франция). Семь из 26 пациентов, отобранных в группе, показали положительный результат теста на ротавирус (27% испытуемых популяции). Эта педиатрическая распространенность ротавирусной инфекции соответствует ожидаемым результатам в течение сезона и степени тяжести диареи у подопытных больных. Четыре из 24 дали положительный результат в группе АА (17% испытуемых популяции). Распространенность ротавируса в группе АА была несколько ниже, чем ожидалось. Таким образом, композиция из примера 1А считается эффективной для лечения недифференцированной диареи, в том числе вызванной ротавирусной инфекцией.

В целях дальнейшего определения сходства реакции на композицию из примера 1 между ротавирусной положительной группой (RV) и неротавирусной положительной группой (Non-RV) был использован коэффициент корреляции Пирсона (представленный как "R"), сила, которая представлена в диапазоне от -1 до 1. При расчете R использовали среднее значение Non-RV и RV группу для каждой временной точки, при расчете R-значения от среднего значения каждой группы на 6 дней.

Значение R и RV групп совместно с Non-RV группой для оценки состояния врачом составило 0,99029, показав очень сильную линейную зависимость и ковариацию между этими двумя группами. Поведение Non-RV и RV пациентов прогнозируют друг друга и проявили очень похожую реакцию на лечение в течение шести суток лечения и периода наблюдения. Эти результаты подтверждают эффективность композиции из примера 1 в случае ротавирусной опосредованной диареи (табл. 3).

Таблица 3

Средние значения RV/Non-RV		
день	RV	Non-RV
1	4.71	4.38
2	1.71	1.95
3	1.33	1.24
4	1.28	1
5	1.14	1
6	1	1

Из 96 пациентов, участвующих в исследовании, 88 прошли полный шестидневный период исследования. Четыре пациента были выведены из группы А, а два из группы АА врачом, когда было установлено, что их энтерит был сопутствующими с или результатом, другие условия; как показано в табл. 4. Один пациент из группы А был потерян в процессе исследования, когда его опекун решил, что состояние пациента достаточно хорошо, чтобы уйти после второй дозы композиции из примера 1. И один пациент был исключен из группы В в связи с ошибкой делопроизводства (табл. 4).

Таблица 4

Пациенты, выведенные из исследования			
Пациент #	Группа	Причина	Кем выведен
А 12	Экспериментальная (А)	Корь	Лечащим врачом
А 19	Экспериментальная (А)	Менингит	1
А26	Экспериментальная (А)	Хорошее состояние пациента	Опекуном
А28	Экспериментальная (А)	Корь	Лечащим врачом
А33	Экспериментальная (А)	Менингит	Лечащим врачом
В08	Контрольная (В)	Ошибка делопроизводства	Лечащим врачом

Эти результаты показывают, что композиция из примера 1 может обеспечить безопасное и эффективное лечение для недифференцированной диареи у детей. Уменьшение продолжительности и тяжести диареи может предотвратить значительное количество заболеваемости и смертности, связанных с диареей у детей, а также может помочь предотвратить диарею, связанную с сопутствующими заболеваниями из развивающихся стран у педиатрических больных.

После одного дня лечения композицией из примера 1, педиатры сообщают о значительном улучшении общего благосостояния у 100% пациентов, завершивших исследование. Удивительно, но значительное снижение, как продолжительности, так и тяжести заболевания обеспечено 86%-м снижением продолжительности эпизода диареи после двух дней лечения композицией из примера 1. Тестирование независимого ротавируса подтвердило эффективность композиции из примера 1А в этих случаях. Состав из примера 1А показал, что является весьма эффективным в лечении недифференцированной диареи, что значительно сокращает продолжительность и тяжесть заболевания по сравнению с обычной терапией. Состав из примера 1А хорошо переносится без неблагоприятных побочных эффектов. Результаты этого исследования представляют собой важный и надежный метод в лечении диареи у детей в сложных полевых условиях. Эти результаты дают возможность дополнительного исследования механизмов и биохимии, которым композиция по изобретению защищает пациентов от самых тяжелых симптомов недифференцированной диареи.

Пример 4В. Полевые исследования (испытания) 3.

В третьем испытании было проведено исследование 140 пациентов и 30 отрицательных контрольных пациентов, зарегистрированных в испытании 3. Суточная доза композиции содержала, либо 2 г равных частей сухого цельного яйца от каждой из трех групп, каждая отдельно инокулирована одной вакциной коммерческой диареи или вакциной мастита; и 4 г сухого коровьего молозива (ES204A; MS204A); либо 3 г равных частей сухого цельного яйца от каждой из трех групп, каждая отдельно инокулирована одной вакциной коммерческой диареи или вакциной мастита; и 4 г сухого коровьего молозива (MS304A). Кроме того, яйцо было обработано, либо путем распылительной сушки (S), либо термической сушки (T).

группы были размещены в двух разных географических точках на территории Соединенных Штатов (М) или (Е). Испытание 3 проводили, как описано выше; пациентов лечили композицией один раз в день в течение трех дней. Средние результаты для испытания 3 по сравнению с испытаниями 1 и 2 показаны на фиг. 4-9. Композиция испытания 3 с 15 пациентами включала 2 г сушеных яйца и 4 г молозива один раз в день в течение двух дней и замечены значительные улучшения в дни один и два в каждом измеряемом параметре. Эта группа продемонстрировала незначительный эффект со средним рецидивом симптомов, по оценке врача состояние улучшилось на 4 день, консистенция стула на 3 и 4 дни (ES204B). Однако эти показатели были все еще значительно выше по сравнению с отрицательной контрольной группой.

Эти результаты показывают, что твердый препарат для суспензии, содержащей специфически связывающие молекулы, которые являются антигенспецифическими антителами IgY в целом сухом яйце и матрице-носителе, которая является неиммунным высушенным коровьим молозивом, является экономичным и эффективным. Матрица согласно изобретению, сухое коровье молозиво является легко коммерчески доступным и может обеспечить более высокие уровни различных компонентов матрицы, чем молоко. Это отличие, например, описано Ларсоном в соавт., US 2010/0233162. Ларсон предлагает способ местной вакцинации изолированных куриных желтков иммунных глобулинов (IgY) в человеческое грудное молоко для лечения и профилактики грибковых инфекций. По крайней мере, использование человеческого грудного молока делает композицию Ларссона менее экономичной и трудной для быстрого производства и хранения. Кроме того, после трех дней лечения композиции по настоящему изобретению должны значительно сократить продолжительность недифференцированной диареи у детенышей и детей, где условия желудочно-кишечного тракта жестче, чем у новорожденных. Это также в отличие от Ларссон в соавт. US 2006/0134101, который предлагает способ использования птичьих антител для профилактики и лечения кишечных инфекций у новорожденных. Это тоже отличие, Саркер в соавт., 2001, которые сообщили о клиническом испытании гипериммунизированного куриного желтка иммуноглобулина, на детенышах с ротавирусной диареей, которая не показала разницы в продолжительности диареи (Sarker et al., 2001, Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr* 32: 19-25). Кроме того, в композиции по данному изобретению используют сухое цельное яйцо с содержанием антиген-специфических IgY с защитной и реакционноспособной матрицей-носителем, такой как коровье молозиво к (1) защите антител при пероральном введении и (2) для дальнейшей активизации пассивного иммунитета, как описано выше. Это в отличие от Ли в соавт., патент US 2003/0185856, который предлагает способ производства яйца, содержащего антипатогенные бактерии специфических IgY и композиции в виде йогурта или мороженого, содержащих IgY. Однако защитные и реакционноспособные матрицы-носители не описаны. Йогурт и мороженое, как правило, не имеют достаточно высокой концентрации компонентов матрицы, присутствующий в матрице, полученной из молозива.

В отличие от иммунорегуляторного ответа последствия введения композиции в целом можно наблюдать в течение 6-12 ч от момента первого введения. Композиции по настоящему изобретению эффективны, не опираясь на иммунный ответ субъекта.

Пример 5. Клиническое исследование - неожиданная эффективность при брюшном тифе.

Данные по эффективности заявленной композиции были предоставлены посредством незапланированной и неожиданной демонстрации клинической эффективности, вызванной неизвестным до инокуляции.

Во время одного полевого исследования в Индии небольшое число детей было выбрано для лечения, которые имели клинический диагноз "брюшной тиф". Брюшной тиф является инфекцией, чаще всего вызванной типом бактерий под названием *Salmonella typhi* (*S. typhi*). Классические симптомы этой болезни - диарея, вызванная системной фазой инфекции. Бактерии, в первую очередь, попадают в кишечник, а затем в кровоток, где они могут мигрировать в лимфатические узлы, желчный пузырь, печень, селезенку и другие части тела. Эти пациенты имели классические симптомы тяжелого заболевания, в том числе высокую температуру, общее недомогание и боли в животе, а также немаловажно, классическую сыпь "роза пятна", которые представляют собой небольшие красные пятна на животе и груди.

Как это типично для практики в этой среде, никакие диагностические испытания на пациентах не проводят, кроме всеобщего физического обследования. Хотя эти пациенты не вписываются в критерии отбора для полевых исследований, им была введена композиция примера 1B, по просьбе лечащего врача, по семейным обстоятельствам. Стандартный протокол прививки для кур из трех коммерчески доступных вакцин не содержал в себе антигены сальмонеллы, так что ожидался лишь ограниченный клинический ответ. Умеренное улучшение за счет нейтрализации эндотоксинов было предсказано и связано с некоторым облегчением основных симптомов диареи, но не повлияло на ход самой болезни.

Удивительно, но все пациенты с брюшным тифом получили композиции примера 1B и показали значительное улучшение симптомов диареи в течение от 24 до 48 ч. Это улучшение казалось невозможным из-за нейтрализации эндотоксинов в одиночку. Еще более удивителен, тем не менее, факт, что системные симптомы брюшного тифа во всех случаях также исчезли в течение следующих 24 ч, что дает период времени для нормального или почти нормального состояния от 48 до 72 ч. Симптомы лихорадки брюшного тифа с лечением обычно уменьшаются от 2 до 4 недель. Ни у одного из пациентов не наблю-

далось отклонение или рецидив заболевания в течение испытательного срока полевых исследований (5 дней). Хорошо известно, что симптомы могут возвращаться быстро, если инфекция не полностью извлечена лечением. Лечение с помощью композиции из примера 1В один раз в день в течение трех последовательных было достаточным, чтобы вызвать (в сочетании со стандартной мед. помощью) значительное снижение симптомов болезни системно, в очень короткий период времени. Сроки ответа не могут быть объяснены естественным эффектом или "стандартом медицинской помощи" в одиночку.

В попытке обнаружить источник этой неожиданной эффективности за всю историю производственного процесса многое было тщательно рассмотрено. Было обнаружено, что в рамках обычного, но дискреционного, протокола прививки для коммерческих кур-несушек, мы использовали инокулирование вакциной с сальмонеллой. Хотя привитыми птицами были куры, композиция оказалась высокоэффективной против сальмонеллы брюшного тифа. Сальмонелла не была одной из антигенов прививки протокола, используемого в препаратах для кур в примере 1. Неожиданная реакция этих пациентов с брюшной лихорадкой на композицию изобретения стала очень удивительным фактом для лечащих врачей во время полевых испытаний.

Пример 6. Количественный ИФА для специфических IgY и общих IgY яичного порошка.

Активности антител общего IgY и специфических антиантисывороточных IgY можно определить, используя иммуноферментный анализ (ИФА) с помощью модификации метода Liou et al., 2011, J. Anim. Vet. Adv., 10(18):2349-2356, как описано ниже. Микротитрационные планшеты покрывали 100 мкл смешанного антигенного препарата (10 мкг на лунку) или покрывали 100 мкл кроличьего антикуриного антитела IgY (10 мкг/мл, Sigma-Aldrich) для контрольных лунок. Планшеты инкубировали в течение ночи при 4°C. После промывки PBS-Твин 20 буфер планшеты блокировали 2% BSA и инкубировали в течение ночи при 4°C. Затем лунки промывали PBS-Твин 20 буфер и один раз PBS. Затем разбавленный высушенный яичный порошок (10 мг/мл) серийно разводили 1% BSA и добавляли к образцу лунок при 100 мкл на лунку. Лунки для стандартной кривой заполнены 100 мкл серийных разведений стандартной IgY, например, в диапазонах концентраций, например 0.015-1 мкг/мл, и инкубировали в течение ночи при 4°C. После промывки PBS-Твин 20 буфер 100 мкл конъюгированный со щелочной фосфатазой козий антикуриный IgY добавляли в лунки и инкубировали 2 ч при 37°C. После промывки PBS-Твин 20 буфер, 100 мкл динатриевой п-нитрофенилфосфата, в качестве субстрата добавляли в каждую лунку и давали реагировать в течение 10 мин при 37°C. Оптическую плотность измеряли при 405 нм с использованием планшетридера. Поглощение стандартных кривых обеспечивает относительное измерение специфических антиантисывороточных IgY концентраций.

Для измерения общего IgY каждую лунку планшета для микротитрования покрывают кроличьим антителом против куриного IgY (10 мкг/мл). После инкубации и промывки, как описано выше, в 100 мкл добавляют разбавленный высушенный яичный порошок и анализ проводят, как описано выше.

Хотя настоящее изобретение было описано со ссылкой на приведенные выше примеры, следует понимать, что модификации и изменения охватываются в пределах сущности и объема изобретения. Соответственно, изобретение ограничено только нижеследующей формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение композиции, содержащей:

а) смесь поликлональных антител IgY, их фрагментов или их смесь, специфичных для антигенов, полученных из энтеропатогенов или желудочно-кишечных патогенов, вызывающих гастроэнтерит, токсинов, связанных с патогеном, или адгезивных элементов, связанных с патогеном, или их комбинации; и где патогены включают *Escherichia coli*, ротавирус и коронавирусы; и

б) коровье молоко;

для сокращения продолжительности диареи, вызванной кишечной инфекцией, у человека, не являющегося новорожденным.

2. Применение по п.1, отличающееся тем, что кишечная инфекция представляет собой недифференцированную диарею, ротавирусную диарею или брюшной тиф.

3. Применение по п.2, отличающееся тем, что недифференцированная диарея представляет собой недифференцированную диарею у детей.

4. Применение по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что смесь IgY дополнительно включает IgY, специфические для антигенов, полученных из одного или более патогенов, выбранных из группы, состоящей из *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Shigella dysenteriae*, *Plesiomonas shigelloides*, энтеропатогенного *E. coli*, энтеротоксигенного *E. coli*, энтероаггративного *E. coli*, энтероинвазивного *E. coli*, гемолитического *E. coli*, *Clostridium difficile*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio* O139, Non-O1 *Vibriosis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium perfringens*, энтерогепатического *Helicobacter*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Gardnerella* spp., *Mycoplasma* spp., *Streptococcus* spp. группы A, калицивируса, кишечного аденовируса, цитомегаловируса, астровируса, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, вируса опоясывающего герпеса, *Fusarium* spp. и *Acanthamoeba* spp.

5. Применение по п.4, отличающееся тем, что смесь IgY включает совокупность IgY, специфических для антигенов, полученных из *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* K99 pili фактора адгезии, энтеротоксигенного *E. coli* spp., токсоида *Clostridium perfringens*, ротавируса и коронавируса.

6. Применение по п.4 или 5, отличающееся тем, что токсин, связанный с патогеном, выбран из эндотоксина липополисахарида (LPS) или AB5 экзотоксина.

7. Применение по любому из пп.1-6, отличающееся тем, что адгезивный элемент, связанный с патогеном, включает адгезины K99, K88, 987P или F41 факторы адгезии, или их комбинацию.

8. Применение по любому из пп.1-7, где молозиво - это негипериммунное коровье молозиво.

9. Применение по любому из пп.1-8, где молозиво - это сухое жирное коровье молозиво.

10. Применение по любому из пп.1-9, отличающееся тем, что смесь IgY находится в твердой форме.

11. Применение по любому из пп.1-10, отличающееся тем, что коровье молозиво находится в твердой форме.

12. Применение по любому из пп.1-11, отличающееся тем, что композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый разбавитель, связующее вещество, наполнитель, смазывающее вещество, подсластитель, ароматизатор, увлажняющий агент или абсорбент.

13. Применение по любому из пп.1-12, отличающееся тем, что смесь IgY содержится в от 1 до 7 г сухого иммунного яйца на дозу.

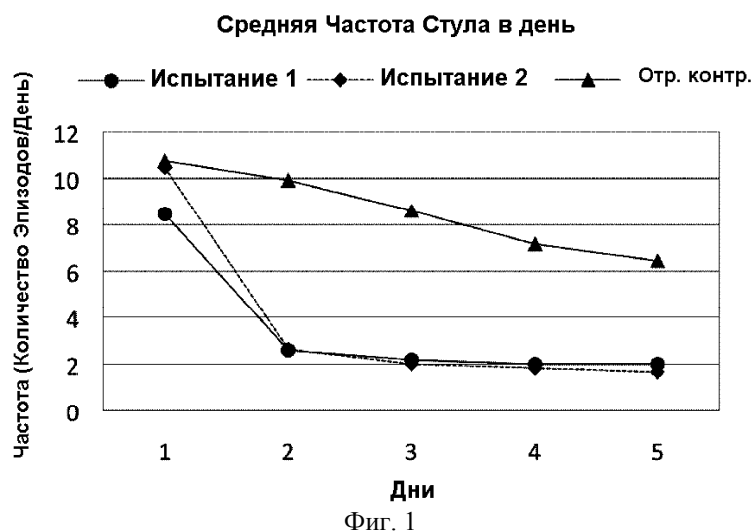
14. Применение по любому из пп.1-13, отличающееся тем, что композиция содержит от 1 до 7 г сухого коровьего молозива на дозу.

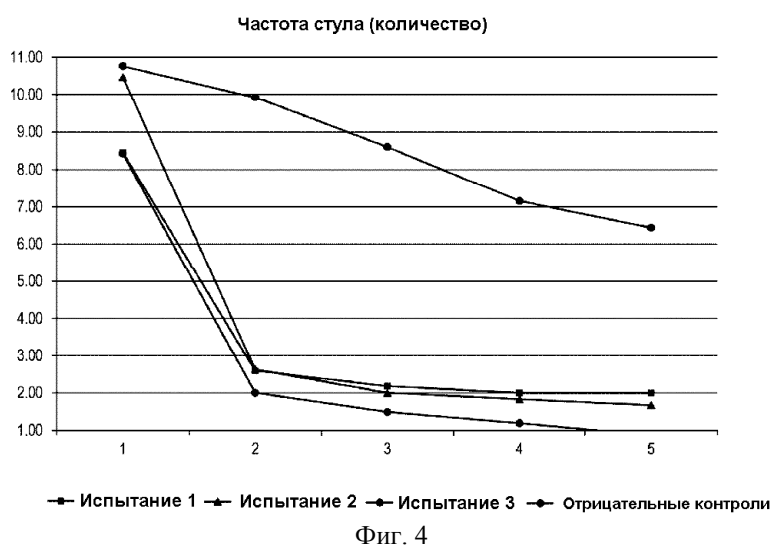
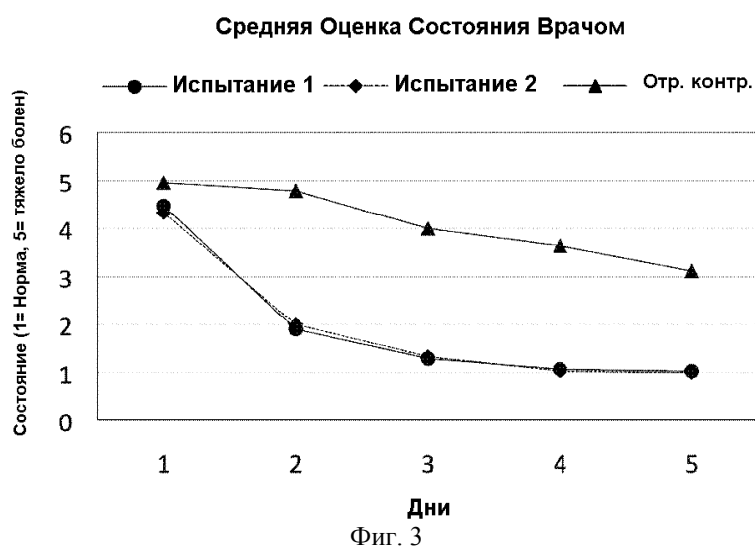
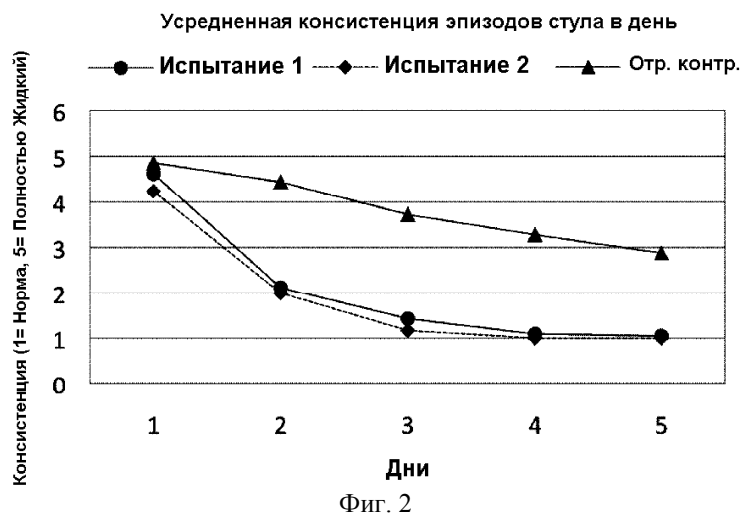
15. Применение по любому из пп.1-14, где композиция представляет собой питательную композицию.

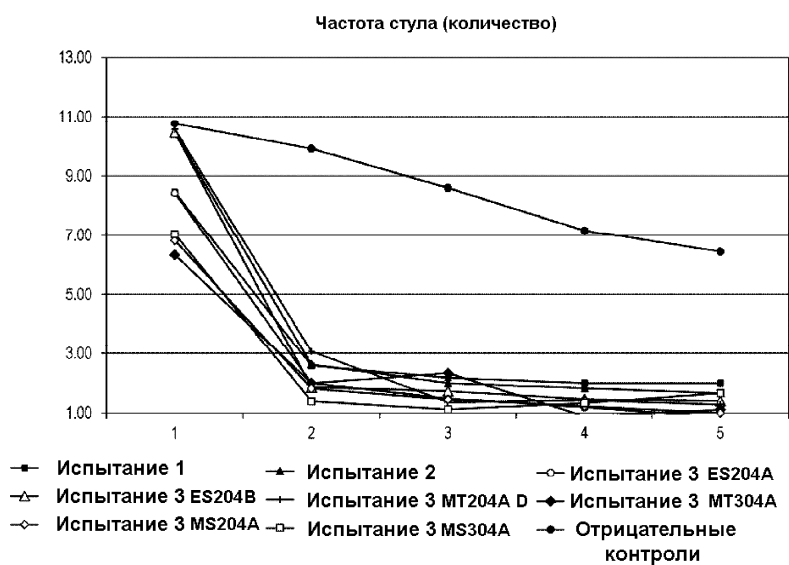
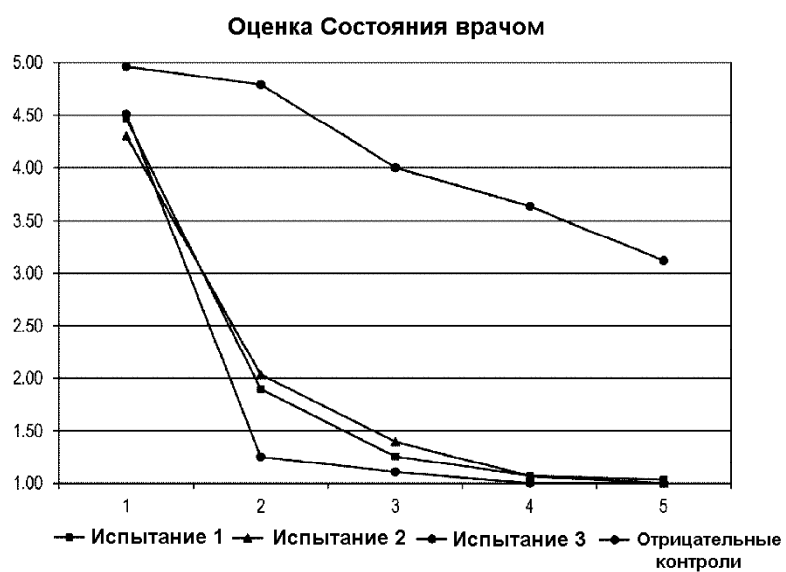
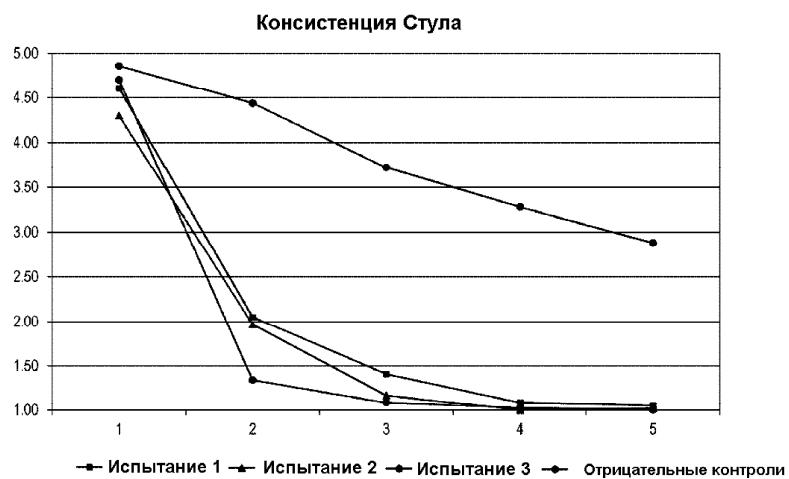
16. Способ сокращения продолжительности диареи, вызванной кишечной инфекцией, у человека, не являющегося новорожденным, включающий введение человеку, не являющемуся новорожденным, эффективного количества композиции, содержащей:

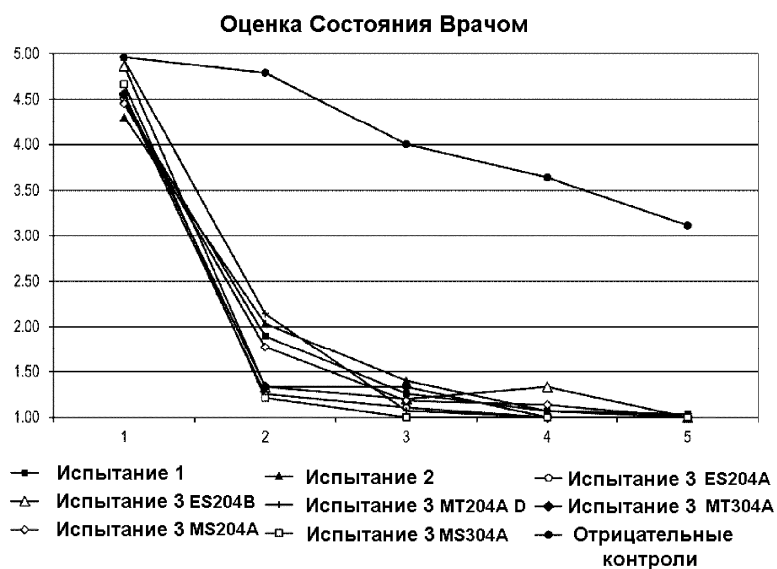
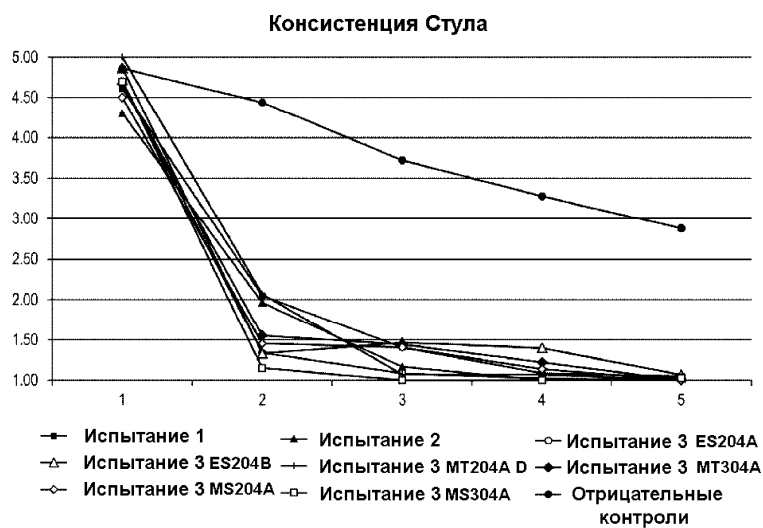
а) смесь поликлональных антител IgY, их фрагментов или их смесь, специфичных для антигенов, полученных из энтеропатогенов или желудочно-кишечных патогенов, вызывающих гастроэнтерит, токсинов, связанных с патогеном, или адгезивных элементов, связанных с патогеном, или их комбинации; и где патогены включают *Escherichia coli*, ротавирус и коронавирус; и

б) коровье молозиво.









Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2