

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 038968

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.11.16

(21) Номер заявки
201591933

(22) Дата подачи заявки
2014.04.17

(51) Int. Cl. C07K 16/18 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИЯ С ПОНИЖЕННОЙ ИММУНОГЕННОСТЬЮ

(31) 13305507.9

(32) 2013.04.18

(33) EP

(43) 2016.02.29

(86) PCT/IB2014/060813

(87) WO 2014/170867 2014.10.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИНСТИТУТ НАСЬОНАЛЬ ДЕ
ЛА САНТ ЭТ ДЕ ЛА РЕШЕРШ
МЕДИКАЛЬ (FR)

(72) Изобретатель:
Сулийу Жан-Поль, Жираль Магали,
Кувра-Девернь Грегуар (FR)

(74) Представитель:
Харин А.В., Буре Н.Н. (RU)

(56) EP-A1-0388151

WO-A2-03097812

ANDREW J. LUTZ ET AL.: "Double knockout pigs deficient in N-glycolylneuraminic acid and Galactose [alpha]-1,3-Galactose reduce the humoral barrier to xenotransplantation", XENOTRANSPLANTATION, vol. 20, no. 1, 5 January 2013 (2013-01-05), pages 27-35, XP055069928, ISSN: 0908-665X, DOI: 10.1111/xen.12019 e.g. abstract; the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей поликлональные антитела к клеткам человека, причем указанные поликлональные антитела лишены первой антигенной детерминанты, выбранной из группы, содержащей (i) N-гликольнейраминовую кислоту (Neu5Gc) и (ii) α -1,3-галактозу, и ее применению в качестве лекарственного средства.

B1

038968

038968

B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области иммунологии, и в частности к антилимфоцитарной сыворотке (АЛС) и антиtimoцитарному глобулину (АТГ) и их применению в медицине для человека.

Предшествующий уровень техники

В области техники известно, что в отторжение аллотрансплантата вовлечены в основном активированные Т-клетки человека, которые при контакте с клеточными антигенами донора трансформируются во вредные лимфоциты-эффекторы, разрушающие пересаженные клетки.

Для достижения успешной трансплантации органа и длительной выживаемости трансплантатов было предложено нейтрализовать вредное воздействие Т-клеток пациентов после трансплантации на трансплантат посредством введения антилимфоцитарной сыворотки (АЛС) и антиtimoцитарного глобулина (АТГ) (Mohty M et al., Best Pract. Res. Clin. Haematol., 2010 Jun; 23 (2):275-82).

Также согласно отдельной терапевтической стратегии снижения вредного эффекта Т-клеток у пациентов после трансплантации достигают за счет применения моноклональных антител к мембранным антигенам. Необходимо упомянуть применение базиликсимаба, являющегося моноклональным антителом к альфа-субъединице (CD25) рецептора интерлейкина 2 (IL-2R), на активированных лимфоцитах. Также может быть упомянуто применение алемтузумаба (продаваемого как Кампат, Мабкампат или Кампат-1Н и в настоящее время в дальнейшем продвигаемый как Лемтрада), представляющего собой моноклональное антитело к поверхностному гликопротеину (CD 52), присутствующему на поверхности зрелых лимфоцитов.

По сравнению, в частности, с базиликсимабом или алемтузумабом, АЛС и АТГ ингибируют множество различных рецепторов, таким образом, вызывая заметное ослабление Т-лимфоцитов (S Louis et al., Transplantation, 2007, vol. 83: 712-721).

Таким образом, в области техники известно, что АЛС и АТГ могут снижать частоту возникновения острого отторжения, могут лечить случаи острого отторжения, а также повышать выживаемость трансплантата (Gaber AO et al., Drugs. 2010 Apr 16; 70 (6): 691-732; Lawen JG et al., Transplantation 2003, 75: 37-43; Lee BM et al., Transplant. Proc. 2006, 38: 2025-2028; Gaber AO et al., Drugs. 2010 Apr 16; 70 (6): 691-732; Mohty M et al., Best Pract. Res. Clin. Haematol., 2010 Jun; 23 (2): 275-82).

Например, в настоящее время АЛС и АТГ являются наиболее популярным индукционным лечением почек.

АЛС и АТГ представляют собой инфузии нечеловеческих поликлональных антител животного происхождения к клеткам человека, в частности Т-клеткам человека. Более конкретно АЛС и АТГ представляют собой сывороточные поликлональные антитела, полученные посредством иммунизации животных, не являющихся человеком, таких как кролики и лошади, при помощи ксеногенных клеток (в частности, лимфоцитов), в частности лимфоцитов человека, тимоцитов человека или иммортализованной клеточной линии человека, в случае получения АЛС и АТГ, предназначенных для применения людьми.

АЛС и АТГ оказывают иммуносупрессорное действие, которое было показано на людях, и, таким образом, их применяют для предотвращения и/или лечения отторжения трансплантата, включая предупреждение и/или лечение острого отторжения при трансплантации органа.

АЛС и АТГ также применяют для предупреждения и/или лечения апластической анемии, а также реакции "трансплантат против хозяина" (ПТХХ) (Norbert Frickhofen et al., N Engl J Med 1991, 324: 1297-1304; Kaya B et al., J. Clin. Pathol. 58(9):994-5; Stein RS et al., Am J Med Sci. 1994 Dec; 308(6):338-43; Bacigalupo A et al., Blood 98(10):2942-7; Bacigalupo A et al., Biology of Blood and Marrow Transplantation 12(5):560-5).

Однако известно, что традиционные АЛС и АТГ ассоциированы с нежелательными побочными эффектами (TU et al., Chin. Med. J., 2012, 125(9): 1664-1666; WANG et al., Chin. Med. J., 2012, 125(6):1135-1140).

В частности, известно, что традиционные АЛС и АТГ ассоциированы с синдромом выброса цитокинов в краткосрочной перспективе и с повышенным риском посттрансплантационного лимфопролиферативного расстройства в долгосрочной перспективе.

Более того, несмотря на то, что в настоящее время их вводят с другими иммуносупрессивными лекарственными средствами, АЛС и АТГ остаются сильно иммуногенными и ответственны за возникновение заболеваний, связанных с иммунными комплексами (ИК), включая серьезные ИК-манифестации, такие как кожная сыпь, лихорадка и т.д.

В этой связи авторы изобретения впервые показали, что возникновение сывороточной болезни является независимой переменной, связанной с поздним отторжением трансплантата. Более того, авторы изобретения впервые наблюдали статистическую значимость ассоциации между сывороточной болезнью и повышением антител к Neu5Gc IgG спустя годы после трансплантации (см. в данном документе после примера 4).

Таким образом, сохраняется необходимость обеспечения композиций, имеющих сниженные побочные эффекты, включая композиции, которые являются улучшенными или альтернативными в отношении традиционных композиций АЛС или АТГ, которые существенно менее иммуногенны по сравнению с традиционными АЛС или АТГ и которые в идеальном случае не задействуют манифестацию ИК-связанных заболеваний.

Краткое описание изобретения

Согласно первому аспекту изобретение относится к композиции, включающей поликлональные антитела к клеткам человека, причем указанные поликлональные антитела лишены первой антигенной детерминанты, выбранной из группы, содержащей (i) N-гликолейраминовую кислоту (Neu5Gc) и (ii) α -1,3-галактозу.

Согласно другому аспекту изобретение относится к способу получения композиции поликлональных антител по изобретению, включающему этапы:

а) обеспечение генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком, утратившего первый ген, выбранный из группы, содержащей (i) ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетил-нейраминовой кислоты (СМАН), и (ii) ген, кодирующий функциональную α -(1,3)-галактозилтрансферазу;

б) иммунизация указанного генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком, к клеткам человека;

с) сбор антител, содержащихся в жидкости организма указанного генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком этапа, с этапа б).

Как известно в области техники, антитела к клеткам человека могут быть легко получены за счет иммунизации млекопитающего, не являющегося человеком, которое включает свиней, лошадей или кроликов, за счет введения иммуногенной композиции, содержащей мишеневые клетки человека.

Это специально проиллюстрировано путем получения композиций, названных "АЛС" и "АТГ", которые получают посредством иммунизации млекопитающих, не являющихся человеком, клетками человека, а именно лимфоцитами человека и тимоцитами человека соответственно.

Затем поликлональные антитела к любому типу клеток человека могут быть получены за счет иммунизации млекопитающего, не являющегося человеком, при помощи указанных клеток человека.

Это включает поликлональные антитела, интересные с точки зрения терапии, антитела к клеткам, присутствие которых в организме человека нежелательно.

Это включает поликлональные антитела к клеткам, оказывающим вредное воздействие на организм человека, таким как лимфоциты, которые являются вредными для тканевого трансплантата или трансплантированного органа или таким как клетки, обладающие нарушенными пролиферативными свойствами, подобные злокачественным клеткам (опухолевым клеткам или раковым клеткам).

Поэтому указанные клетки человека могут быть предпочтительно выбраны из группы, содержащей лимфоциты человека, тимоциты человека и раковые клетки человека, в частности из группы, содержащей лимфоциты человека и тимоциты человека.

Настоящее изобретение также предполагает применение генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком, утратившим первый ген, выбранный из группы, содержащей (i) ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетил-нейраминовой кислоты (СМАН), и (ii) ген, кодирующий функциональную α -(1,3)-галактозилтрансферазу, для получения композиции, содержащей поликлональные антитела к клеткам человека.

Создание такого генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком, является дополнительным преимуществом, в том смысле, что указанное генетически измененное млекопитающее, не являющееся человеком, вырабатывает лишь минимальное количество антител к NeuGc на немодифицированной диете, как показано в примере 3 и на фиг. 5. Таким образом, это освобождает от этапа иммуносорбции сыворотки указанного генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком, перед ее введением пациенту человеку.

Согласно другому аспекту, изобретение относится к способу индукции иммуносупрессивного состояния индивидуума, нуждающегося в этом, указанному способу, включающему этап введения указанному индивидууму композиции по изобретению.

Согласно другому аспекту изобретение относится к композиции по изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

Настоящее изобретение также относится к композиции, как описано выше, для ее применения для предупреждения и/или лечения заболевания, выбранного из группы, включающей отторжение трансплантата, апластическую анемию, реакцию "трансплантат против хозяина", тяжелое аутоиммунное заболевание и злокачественные клетки, связанные с заболеванием.

Согласно другим аспектам изобретение относится к композиции, как описано выше, с целью ее применения для предупреждения и/или лечения отторжения трансплантата, в частности отторжения почечного трансплантата.

Настоящее изобретение также относится к композиции, как описано выше, с целью ее применения для предупреждения посттрансплантационных ИК-связанных заболеваний, в частности сывороточной болезни, кожной сыпи или лихорадки.

В некоторых вариантах воплощения композиция, содержащая поликлональные антитела, выбрана из группы, включающей антилимфоцитарную сыворотку (АЛС) и сыворотку с антитимоцитарным глобулином (АТГ).

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 иллюстрирует график получения рассматриваемых данных от пациентов (многоцентровая когорта базы данных DIVAT, Институт трансплантологии Нанта, Нант), имеющих по меньшей мере один почечный трансплантат и индукцию лечения при помощи АЛС или АТГ и в этой связи имеющих развитие заболеваний, связанных с иммунными комплексами (ИК), часть которых представляет сывороточную болезнь и ассоциированные побочные эффекты в отношении длительной выживаемости трансплантатов (ось абсцисс: продолжительность (в месяцах); ось ординат: % выживаемости трансплантата).

Фиг. 2 иллюстрирует график собранных рассматриваемых данных от пациентов (моноцентровая когорта базы данных DIVAT, институт трансплантологии Нанта, Нант), имеющих почечный трансплантат и получающих лечение АЛС или АТГ и в этой связи имеющих развитие заболеваний, связанных с иммунными комплексами (ИК), часть которых представляет сывороточную болезнь и ассоциированные побочные эффекты в отношении длительной выживаемости трансплантата (ось абсцисс: созревание (в месяцах); ось ординат: % выживаемость трансплантата).

Фиг. 3 иллюстрирует график собранных рассматриваемых данных от пациентов (моноцентровая когорта из базы данных DIVAT, институт трансплантологии Нанта, Нант), имеющих пересаженный первый трансплантат почки и/или почки/поджелудочной железы и получающих лечение АЛС или АТГ, и в отношении развитых заболеваний, связанных с иммунными комплексами (ИК), часть которых представляет сывороточную болезнь и ассоциированные побочные эффекты в отношении длительной выживаемости трансплантата (ось абсцисс: созревание (в годах); ось ординат: % выживаемости трансплантата).

Фиг. 4 иллюстрирует график, отражающий количества антител к мононуклеарным клеткам периферической крови человека в сыворотке иммунизированных свиней посредством детекции проточной цитометрией.

Фиг. 5 иллюстрирует график, отражающий данные ИФА для определения IgG к Neu5Gc в сыворотке свиней.

Фиг. 1 и 2 относятся к многоцентровой и моноцентровой когорте базы данных DIVAT соответственно, при этом фиг. 3, которая применена для статистического анализа, относится к более гомогенной моноцентровой когорте (DIVAT, Нант), как показано в данном описании далее в табл. А-С.

Подробное описание изобретения

Определения

Для более полного понимания изобретения, некоторые определения приведены ниже. Такие определения охватывают грамматические эквиваленты.

Термин "антитело" применяют в данном описании в самом широком смысле. "Антитело" относится к любому полипептиду, который, по меньшей мере, содержит (i) Fc-участок и (ii) связывающий полипептидный домен, полученный из варибельного участка иммуноглобулина. Таким образом, антитела включают, но не ограничены, полноразмерные иммуноглобулины, антитела, конъюгаты антител и фрагменты каждого соответственно. Термины "антитело" и "иммуноглобулин" могут быть применены взаимозаменяемо в данном описании.

Термин "антитело" охватывает полипептид, как указано выше, который дополнительно содержит по меньшей мере одну сахарную группу, отличную от антигенной детерминанты, выбранной из группы, включающей (i) N-гликольнойраминовою кислоту (Neu5Gc) и/или (ii) α -1,3-галактозу.

"Поликлональные антитела", как используется в настоящем описании, означает смесь антител, распознающих различные эпитопы данного антигена. Поликлональные антитела охватывают таковые, которые заключены в или альтернативно получены из жидкостей организма, в частности из сыворотки или плазмы из организма млекопитающего.

В случае иммуноглобулинов человека легкие цепи классифицируют как каппа и лямбда легкие цепи. Тяжелые цепи классифицируют как мю, дельта, гамма, альфа или эpsilon и определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно.

"IgG", как используется в настоящем описании, означает полипептид, относящийся к классу антител, которые в основном кодируются геном гамма-иммуноглобулина. У людей IgG имеет подклассы или изотипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. У мыши IgG имеет IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. Полноразмерные IgG состоят из двух идентичных пар двух иммуноглобулиновых цепей, при этом каждая пара имеет одну легкую и одну тяжелую цепь, причем каждая легкая цепь содержит домены иммуноглобулина VL и CL, и каждая тяжелая цепь содержит домены иммуноглобулина VH, C γ 1 (также называемый CH1), C γ 2 (также называемый CH2) и C γ 3 (также называемый CH3).

Как используется в настоящем описании, "антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" (или ADCC) относится к механизму клеточного иммунитета, при этом эффекторная клетка иммунной системы активно лизует мишеневую клетку, которая связывается специфичными антителами. ADCC в основном опосредована NK-клетками, а также другими иммунными клетками, таким как нейтрофилы и эозинофилы. Как правило, ADCC является результатом активации NK-клеток. Активация NK клеток включает связывание других Fc-рецепторов с Fc-участком IgG, связывающегося с антигенами, присутствующими на поверхности мишеневых клеток. Такие взаимодействия индуцируют высвобо-

ждение НК-клетками цитокинов и цитотоксичных гранул. Для оценки способности антитела индуцировать ADCC может быть проведено исследование, как описано в de Romeuf et al. Br J Haematol. 2008 Mar; 140(6):635-43.

Под "антигенной детерминантой" (или эпитопом), как применяется в настоящем описании, в отношении поликлональных антител млекопитающих, не являющихся человеком, как используется в данном документе, понимают структурный компонент антигенной молекулы, которая включает антигенный белок и антигенный углевод, ответственные за их специфическое взаимодействие с молекулами антител, выявляемых таким же или связанным антигеном. Разумеется, термин "антигенная детерминанта", как используется в настоящем описании, в отношении поликлональных антител млекопитающих, не являющихся человеком, также применяют обобщенно в данном документе для антигенной молекулы, содержащей множество эпитопов, которые могут быть распознаны молекулами антител, выявляемых тем же или связанным антигеном. Для иллюстрации антигенная молекула N-гликолейраминово́й кислоты (Neu5Gc) может быть названа в данном описании "антигенной детерминантой", хотя указанная антигенная молекула содержит более чем один эпитоп, распознаваемый антителами, выявляемыми при помощи молекул, содержащих Neu5Gc, или Neu5Gc.

"Тимоциты" представляют собой гематопозитические клетки-предшественники, присутствующие в тимусе. Тимопоез представляет собой процесс в тимусе, посредством которого тимоциты дифференцируются в зрелые Т-лимфоциты.

"Т-клетки" или "Т-лимфоциты" относятся к группе белых кровяных клеток, известных как лимфоциты, и играют центральную роль в клеточном иммунитете. Их можно отличить от других лимфоцитов, таких как В-клетки и клетки нормальные киллеры (НК клетки), за счет присутствия Т-клеточного рецептора (TCR) на поверхности клетки. Их называют Т-клетками, поскольку они зреют в тимусе.

"В-клетки" или "В-лимфоциты" также относятся к группе белых кровяных клеток, известных как лимфоциты, делая их важной частью иммунной системы, в частности ветви гуморального иммунитета адаптивной иммунной системы. В-клетки можно отличить от других лимфоцитов, таких как Т-клетки и клетки натуральные киллеры (НК-клетки), за счет присутствия белка на наружной поверхности В-клеток, известного в качестве В-клеточного рецептора (BCR). Этот специализированный рецепторный белок позволяет В-клеткам связываться с конкретным антигеном. Основными функциями В-клеток является продукция антител к антигенам, выполнение роли антиген-презентирующих клеток (АПК) и развитие в В-клетки памяти после активации в результате взаимодействия с антигеном.

В крови "сыворотка" представляет собой компонент, производное плазмы, при этом клетки (белые кровяные клетки, а также красные кровяные клетки) и факторы свертывания крови удалены. Сыворотка включает все белки, не участвующие в свертывании крови (коагуляции), и все электролиты, антитела, антигены, гормоны и иногда также любые экзогенные вещества (например, лекарственные средства и микроорганизмы).

"Антилимфоцитарная сыворотка" (или АЛС) и "антилимфоцитарный глобулин" (или АТГ) представляют собой, как указано выше, инфузии поликлональных антител, полученных из животных, не являющихся человеком, к лимфоцитам человека и тимоцитам человека соответственно.

Как используется в настоящем описании, "традиционная сыворотка", и в частности "традиционная антилимфоцитарная сыворотка (АЛС)" и "традиционная сыворотка с антилимфоцитарным глобулином (АТГ)" (или "известная сыворотка, известный АТГ или известная АЛС"), обозначает сыворотку, в которой содержащиеся в ней поликлональные антитела не лишены антигенных детерминант, выбранных из группы, включающей (i) N-гликолейраминово́ую кислоту (Neu5Gc) и/или (ii) α -1,3-галактозу. В этом отношении, в частности, могут быть указаны продукты, коммерчески доступные под наименованием Тимоглобулин от компании Genzyme или наименованием Атгам от компании Pfizer.

Термины "злокачественные клетки", "раковые клетки" и "опухолевые клетки" могут использоваться взаимозаменяемо в данном описании. Как используется в настоящем описании, "опухолевые клетки" относится к клеткам, которые гиперпролиферируют автономно *in vivo*. Примеры опухолевых клеток включают клетки, включенные в (1) саркомы, такие как остеосаркому и саркому мягких тканей, (2) карциномы, такие как карцинома груди, карцинома легких, карцинома мочевого пузыря, карцинома щитовидной железы, карцинома простаты, карцинома толстой кишки, колоректальная карцинома, карцинома поджелудочной железы, карцинома желудка, карцинома печени, карцинома матки, карцинома шейки матки и карцинома яичника, (3) лимфомы, такие как лимфома Ходжкина и неходжкинская лимфома, (4) нейробластомы, (5) меланомы, (6) миеломы, (7) опухоли Вильмса, (8) лейкемии, такие как острая миелоцитарная лейкемия (ОМЛ), хроническая миелоцитарная лейкемия (ХМЛ), острая лимфоцитарная лейкемия (ОЛЛ) и хроническая лимфоцитарная лейкемия (ХЛЛ), (9) глиомы и (10) ретинобластомы.

Как используется в настоящем описании, термин "рак" означает неконтролируемый аномальный рост клеток и включает внутри объема изобретения все известные заболевания, вызванные неконтролируемым и аномальным ростом клеток. Неограничивающие примеры распространенного рака включают рак мочевого пузыря, рак груди, рак яичников и рак желудка, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак головы и шеи, рак легких, меланому, множественную миелому, лейкемию (например, миелоидную, лимфоцитарную, миелоцитарную и лимфобластную лейкемию), неходжкинскую лимфому,

рак простаты, ректальный рак, злокачественные меланомы, и в частности рак поджелудочной железы.

Как используется в настоящем описании, термин "аутоиммунное заболевание" означает заболевание, развившееся в результате иммунного ответа против собственных тканей или компонентов тканей, включая как гуморальный иммунный ответ, так и клеточно-опосредованные ответы.

Термин "аутоиммунное заболевание", как используется в настоящем описании, охватывает орган-специфичные аутоиммунные заболевания, при которых аутоиммунный ответ направлен против одной ткани, такие как сахарный диабет I типа (Т1 Д), болезнь Крона, язвенный колит, миастения Грависа, витилиго, болезнь Грейвса, тиреоидит Хашимото, болезнь Аддисона, аутоиммунный гастрит и аутоиммунный гепатит. Термин "аутоиммунное заболевание" также охватывает неспецифичные для органов аутоиммунные заболевания, при которых аутоиммунный ответ направлен против компонента, присутствующего в нескольких или многих органах всего тела. Такие аутоиммунные заболевания включают, например, ревматоидную болезнь, системную красную волчанку, прогрессирующий системный склероз и варианты, полиомиозит и дерматомиозит. Дополнительное аутоиммунное заболевание включает пернициозную анемию, включая некоторые из аутоиммунного гастрита, первичного билиарного цирроза печени, аутоиммунной тромбоцитопении, синдрома Шегрена, множественного склероза и псориаза. Специалисты в области техники понимают, что при желании способы по изобретению могут быть применены к данным или иным аутоиммунным заболеваниям. Неограничивающие примеры некоторых аутоиммунных заболеваний также включают тромбоцитопению, такую как идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП), дробьевидный ретинохориоидит, синдром Гийена-Барре (СГБ), мультифокальную моторную нейропатию или болезнь Кавасаки (или слизисто-кожный лимфонулярный синдром), аутоиммунный тиреоидит или анкилозирующий спондилит.

Композиция по изобретению

Согласно изобретению обнаружено, что в популяции пациентов после трансплантации, получавших лечение АЛС или АТГ, время выживаемости трансплантата у этих пациентов в основном зависело от возникновения ИК-связанных заболеваний, таких как сывороточная болезнь при образовании иммунных комплексов (ИК). В частности, авторы изобретения обнаружили, что пациенты после лечения АЛС или АТГ, имеющие ИК-связанное заболевание, и в частности сывороточную болезнь, имеют намного более сниженное время выживаемости трансплантата и неудовлетворительный отдаленный результат, причем последний можно сравнить с таковым, наблюдаемым при отторжении трансплантата, вызванным несовместимостью по пяти *versus* одного HLA-антигена.

С целью преодоления недостатков традиционных АЛС или АТГ авторы изобретения разработали композиции, содержащие поликлональные антитела, имеющие сниженные иммуногенные свойства у индивидуумов человека и, таким образом, обладающие пониженной способностью индуцировать иммуногенные комплексы (ИК) у человека и, следовательно, пониженной способностью к индукции ИК-связанных заболеваний, таких как сывороточная болезнь.

Данное изобретение в первую очередь относится к композиции, содержащей поликлональные антитела к клеткам человека, причем указанные поликлональные антитела лишены первой антигенной детерминанты, выбранной из группы, содержащей (i) N-гликольнейраминную кислоту (Neu5Gc) и (ii) α -1,3-галактозу.

Согласно конкретному варианту воплощения композиция по изобретению может быть дополнительно лишена второй антигенной детерминанты, которая отличается от первой антигенной детерминанты, и при этом указанная вторая антигенная детерминанта выбрана из группы, содержащей (i) N-гликольнейраминную кислоту (Neu5Gc) и (ii) α -1,3-галактозу.

Полагают, что поликлональные антитела, содержащиеся в композиции поликлональных антител по изобретению, обладают сниженными иммуногенными свойствами у человека по сравнению с композициями поликлональных антител, которые в настоящее время применяют в области в виде АЛС и АТГ.

В области техники известно, что Neu5Gc является иммуногенным для людей (Noguchi A. et al., J. Biochem. Tokyo (1995), 117(1):59-62). Более того, известно, что у пациентов, у которых развивается тяжелый иммунный комплекс (ИК) вслед за инфузией животных иммуноглобулинов, нарастают антитела, в основном развивающиеся против Neu5Gc эпитопа (Merrick JM et al., Int. Allergy Appl. Immunol., 1978, Vol. 57: 477-480; Aggarwal S. et al., Nat Biotechnol. 2008;26:1227-1233; Arnold JN et al., Annu Rev Immunol. 2007;25:21-50; Durocher Y et al., Curr Opin Biotechnol. 2009;20:700-707; Higgins E et al., Glycoconj. J. 2009).

Также известно, что фермент α 1,3-галактозилтрансфераза (α 1,3GT или GGTA1) синтезирует эпитопы α 1,3-галактозы (α 1,3Gal) (Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc-R), которые являются основными ксеноантигенами, вызывающими гиперострое отторжение при ксенотрансплантации от свиньи к человеку.

Следовательно, композиция, содержащая поликлональные антитела, лишенные антигенных детерминант к (i) N-гликольнейраминной кислоте (Neu5Gc) и/или (ii) α -1,3-галактозе, поскольку данные поликлональные антитела являются менее иммуногенными, чем поликлональные антитела, которые содержатся в традиционных АЛС и АТГ, обладает пониженной иммуногенностью. Также полагают, что такая композиция, содержащая поликлональные антитела по изобретению, обладает пониженными свойствами в отношении увеличения побочных эффектов, индуцирующихся после введения традиционных АЛС или

АТГ продуктов, которые включают индукцию серьезных ИК-заболеваний, включая сывороточную болезнь, синдром высвобождения цитокинов и посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство.

Таким образом, полагают, что композиция, содержащая поликлональные антитела по изобретению, снижает риск возникновения побочных эффектов, индуцированных после традиционных АЛС или традиционных АТГ, причем каждый из этих побочных эффектов вносит вклад в снижение долгосрочной выживаемости трансплантата у человека, как показано в данном описании.

Согласно знаниям авторов изобретения, АЛС или АТГ, лишенные антигенной детерминанты, выбранной из группы, содержащей (i) Neu5Gc и/или (ii) α -1,3-галактозу, не известны в области техники, в частности для применения, раскрытого в настоящем описании.

В этой связи композиция по изобретению обладает особыми преимуществами в том, что она определенно позволяет преодолеть вышеупомянутые нежелательные эффекты, вызванные традиционными АЛС и АТГ, поскольку она сохраняет свои иммуномодулирующие свойства в отношении Т-клеток человека и/или В-клеток человека, при меньшей токсичности на системном уровне организма человека.

Другими словами, композиция по изобретению является существенно менее иммуногенной, и, таким образом, ожидают, что частота возникновения заболеваний, связанных с иммунными комплексами (ИК), и в частности с сывороточной болезнью, наблюдаемыми при традиционных АЛС или АТГ, будет существенно снижена.

Дополнительным преимуществом композиции по изобретению является то, что она позволяет существенно повысить долгосрочную выживаемость трансплантата.

Кроме того, в области техники известно, что N-гликозилирование антител играет критичную роль в модулировании их эффекторных свойств, в частности их про- или противовоспалительных свойств.

Таким образом, обнаружено, что сиалирование представляет собой добавление N-ацетилнейраминовой кислоты, также называемой Neu5Ac, NANA, N-ацетилсиаловой или сиаловой кислоты, на остатках галактозы N-гликанов кристаллизуемого фрагмента (Fc) антител.

Сиалирование придает антителам особо интересные противовоспалительные свойства (Dimitrov et al.; *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2007.22: 1301 и WO 2007/117505).

Поэтому согласно варианту воплощения, в котором поликлональные антитела по настоящему изобретению лишены, по меньшей мере, антигенной детерминанты N-гликольнейраминовой кислоты (Neu5Gc), преимуществом указанных антител, кроме того, является то, что они проявляют, за счет лучшего физиологического доступа к Fc-гамма рецептору, повышенную аффинность к Fc γ R и, таким образом, повышенную ADCC (антителозависимую клеточную цитотоксичность) в отношении Т-лимфоцитов.

Кроме того, из-за отсутствия в поликлональных антителах по настоящему изобретению антигенной детерминанты, выбранной из группы, состоящей из (i) N-гликольнейраминовой кислоты (Neu5Gc) и/или (ii) α -1,3-галактозы, указанные поликлональные антитела при введении в организм человека не повышают иммунный ответ, увеличивая продукцию анти-Neu5Gc или анти-GAL антител, которые необходимы для возникновения иммунных комплексов (ИК) и ИК-связанных заболеваний, таких как сывороточная болезнь.

Способ идентификации и характеристики поликлональных антител по настоящему изобретению находится в пределах общих знаний специалистов в области техники.

Способ, который может быть применен специалистами в области техники для идентификации или характеристики поликлональных антител по изобретению, включает твердофазный иммуноферментный анализ (тИФА), причем антитела к Neu5Gc и/или антитела к Gal применяют в качестве детектирующих молекул.

В качестве антител к Neu5Gc для оценки утраты антигенной детерминанты Neu5Gc может быть упомянут Gc-Free Basic Kit, коммерчески доступный от компании Sialix, Inc.

В качестве антител к Gal для демонстрации утраты антигенной детерминанты α -1,3-галактозы может быть рассмотрен протокол, раскрытый в Jianq-Qiang Wang et al. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121: 8181) или таковые, распространяемые под торговым наименованием WH0051083M1 Sigma компанией Sigma-Aldrich.

Согласно способу тИФА, в котором конкретные антитела к Neu5Gc и/или антитела к Gal могут быть иммобилизованы в лунках микропланшета, антитела, содержащие антигенную детерминанту, выбранную из группы, содержащей (i) N-гликольнейраминовую кислоту (Neu5Gc) и/или (ii) α -1,3-галактозу, образуют комплекс с указанными антителами к Neu5Gc и/или антителами к Gal и, таким образом, остаются связанными с лунками. При применении такого способа тИФА поликлональные антитела по изобретению представляют собой антитела, лишенные одной или более антигенных детерминант, выбранных из группы, содержащей (i) N-гликольнейраминовую кислоту (Neu5Gc) и/или (ii) α -1,3-галактозу, и, следовательно, антитела, которые не образуют комплексы с (i) антителами к Neu5Gc, (ii) антителами к Gal или (iii) как антителами к Neu5Gc, так и с антителами к Gal.

Также данное изобретение относится к способу получения композиции, содержащей поликлональные антитела по изобретению, включающему этапы:

а) обеспечение генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком, утративше-

го первый ген, выбранный из группы, содержащей (i) ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты (СМАН), и (ii) ген, кодирующий функциональную α -(1,3)-галактозилтрансферазу;

b) иммунизация указанного генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком, к клеткам человека;

c) сбор антител, содержащихся в жидкости организма указанного генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком, с этапа b) и, таким образом, получение композиции, содержащей поликлональные антитела.

В некоторых вариантах воплощения композицию по изобретению можно получить при помощи смешивания поликлональных антител, собранных на этапе c) способа, описанного выше, с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, такими как физиологически приемлемый носитель, разбавители или стабилизаторы.

В некоторых вариантах воплощения поликлональные антитела очищают до их применения в композиции по изобретению.

В некоторых вариантах воплощения композиция поликлональных антител по изобретению имеет жидкую форму.

В некоторых вариантах воплощения композиция поликлональных антител по изобретению имеет твердую форму, которая включает лиофилизированную форму.

Композиция по изобретению может быть получена стандартными способами, описанными в Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Lippincott Williams & Wilkins; Twenty first Edition, 2005).

Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, которые могут применяться, представляют собой, в частности, описанные в Handbook of Pharmaceuticals Excipients, American Pharmaceutical Association (Pharmaceutical Press; 6th revised edition, 2009).

С целью лечения пациента, нуждающегося в этом, такому как вышеуказанный, ему может быть введена терапевтически эффективная доза композиции по изобретению.

В данном документе "терапевтически эффективная доза" означает дозу, оказывающую эффекты, для которых ее вводят. Точная доза будет зависеть от цели лечения и будет очевидна специалистам в области техники, применяющим известные способы. Дозы могут варьировать от 0,001 до 100 мг поликлональных антител по изобретению на кг массы тела (мг/кг) или выше, например 0,1, 1,0, 10 или 50 мг/кг массы тела, предпочтительно 1-10 мг/кг. Доза и частота введения могут быть модифицированы в зависимости от ответа хозяина, а также частоты введения, исходя из лучшей толерантности.

Как известно в области техники, может быть необходима корректировка вследствие деградации белка, системной versus локализованной доставки, а также возраста, массы тела, общего состояния, пола, диеты, времени введения, лекарственного взаимодействия и тяжести состояния, и ее легко определить при помощи рутинных экспериментов специалистам в области техники.

Введение композиции по изобретению может быть выполнено различными путями, включая, но не ограничиваясь, перорально, подкожно, внутривенно, парентерально, интраназально, интраортикально, интраокулярно, ректально, вагинально, трансдермально, местно (например, гели), интраперитонеально, внутримышечно, внутривенно или интратекально.

Композиция по изобретению может быть введена параллельно с другими терапевтическими агентами, т.е. терапевтические агенты, описанные в данном документе, могут быть введены параллельно с другими курсами терапии или терапевтическими агентами, включая, например, малые молекулы, радиационную терапию, хирургию и т.д.

В наиболее предпочтительном варианте воплощения композиция по изобретению имеет форму, приемлемую для введения внутривенным путем.

Согласно конкретному варианту воплощения, композиция по изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере одно иммуносупрессивное лекарственное средство, такое как глюкокортикоиды, цитостатики (Азатиоприн, Метотрексат), антитела, лекарственные средства, действующие на иммунофилины (Циклоспорин, Такролимус, Рапамицин).

Способ получения композиции по изобретению

Как упомянуто выше, способ получения композиции по изобретению включает этапы:

a) обеспечение генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком, утратившего первый ген, выбранный из группы, содержащей (i) ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетил нейраминовой кислоты (СМАН), и (ii) ген, кодирующий функциональную α -(1,3)-галактозилтрансферазу;

b) иммунизация указанного генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком, к клеткам человека;

c) сбор антител, содержащихся в жидкости организма указанного генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком, с этапа b).

Согласно конкретному варианту воплощения генетически измененное млекопитающее, не являющееся человеком, может дополнительно утратить второй ген, отличный от первого гена, причем указан-

ный второй ген выбирают из группы, содержащей (i) ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты (СМАН), и (ii) ген, кодирующий α -(1,3)-галактозилтрансферазу.

Предпочтительно способ по изобретению может дополнительно включать этап d) очистки указанных поликлональных антител из указанной жидкости организма.

Этап а) обеспечения генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком

Для получения композиции по изобретению проводят первый этап а), заключающийся в обеспечении генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком, утратившего ген, выбранный из группы, содержащей (i) ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты (СМАН), и/или (ii) ген, кодирующий функциональную α -(1,3)-галактозилтрансферазу.

Предпочтительно указанное генетически измененное млекопитающее, не являющееся человеком, представляет собой СМАН и/или GGTA1 нокаутное трансгенное млекопитающее, не являющееся человеком (или СМАН и/или GGTA1 КО млекопитающее, не являющееся человеком), которое включает двойное СМАН и GGTA1 нокаутное трансгенное млекопитающее, не являющееся человеком.

Как используется в настоящем описании, "нокаутное трансгенное млекопитающее, не являющееся человеком" означает трансгенное млекопитающее, не являющееся человеком, у которого изменена функция одной или более аллелей рассматриваемого гена, например, за счет гомологичной рекомбинации или иной инсерции или делеции.

В конкретном варианте воплощения данный ген разрушен. "Разрушенный ген" означает, что часть генетического кода изменена таким образом, что изменена транскрипция и/или трансляция этого участка генетического кода, например, делая этот участок генетического кода нечитаемым за счет методик нокаутирования или посредством инсерции дополнительного гена для желаемого белка или инсерции регуляторной последовательности, которая модулирует транскрипцию существующей последовательности.

В некоторых вариантах воплощения изобретения все клетки трансгенного млекопитающего, не являющегося человеком, включают разрушенный ген.

В конкретных вариантах воплощения нокаутное трансгенное млекопитающее, не являющееся человеком, представляет собой трансгенное млекопитающее, не являющееся человеком, в котором одна или более аллелей рассматриваемого гена приведены в нефункциональное состояние.

В некоторых вариантах воплощения обе аллели рассматриваемого гена оказываются нефункциональными. Такие варианты воплощения включают таковые, обычно рассматриваемые в качестве "генных нокаутов", "нокаутных инсерций в ген" и любую другую модификацию одной или более нативной аллели нативного рассматриваемого гена, которая делает такой ген нефункциональным. Такое трансгенное млекопитающее, не являющееся человеком, полезно в качестве источника получения композиции по настоящему изобретению.

Способ получения генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком, утратившего ген, выбранный из группы, содержащей (i) ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты и/или (ii) ген, кодирующий функциональную α -(1,3)-галактозилтрансферазу, находится в пределах общих знаний специалиста в области техники.

Генетически измененное млекопитающее, не являющееся человеком, утратившее ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты, называют СМАН КО млекопитающим, не являющимся человеком.

Генетически измененное млекопитающее, не являющееся человеком, утратившее ген, кодирующий функциональную α -(1,3)-галактозилтрансферазу, называют GAL КО млекопитающим, не являющимся человеком.

Способ получения СМАН нокаутного трансгенного млекопитающего, не являющегося человеком, в частности, описан в WO 2006/133356, который более подробно раскрывает способ получения животных продуктов, лишенных N-гликольнойраминовой кислоты (Neu5Gc), для применения человеком, включающий этапы: получения генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком, утратившего ген функциональной гидролазы цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты (СМАН); и выделения по меньшей мере одного животного продукта из генетически измененного животного, не являющегося человеком.

Способ получения GAL нокаутного трансгенного млекопитающего находится в пределах обычных знаний специалиста в области техники (Cooper DK et al., Genetically engineered pigs, Lancet 1993, 342: 682; Lai L et al., Science 2002, 295:1089; Sachs DH et al., Current Opinion in Organ Transplantation, 2009, 14:148-153).

Способ получения GAL нокаутного трансгенного животного, не являющегося человеком, в частности, описан в US 7547816.

Согласно конкретному варианту воплощения изобретения для получения указанной композиции по настоящему изобретению, содержащей поликлональные антитела к лимфоцитам человека и тимоцитам

человека, причем указанные поликлональные антитела лишены антигенной детерминанты, выбранной из группы, содержащей (i) N-гликольнейраминную кислоту (Neu5Gc) и (ii) α -1,3-галактозу, включает получение генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком, утратившего ген, выбранный из группы, содержащей (i) ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминной кислоты (СМАН), и (ii) ген, кодирующий функциональную α -(1,3)-галактозилтрансферазу.

Другими словами, указанное специфичное генетически измененное млекопитающее, не являющееся человеком, представляет собой двойное СМАН- и GAL-нокаутное трансгенное млекопитающее, не являющееся человеком.

Протокол получения данного специфичного двойного СМАН- и GAL-нокаутного трансгенного млекопитающего, не являющегося человеком, описан в Lutz AL et al. (Xenotransplantation, 2013; 20(1):27-35) или в Conchon S. et al. (Xenotransplantation; special issue International Xenotransplantation Association IXA 2013, 2013, Vol. 20, Issue 5).

В качестве генетически измененного трансгенного млекопитающего, которое можно использовать в настоящем изобретении, в частности, могут быть упомянуты Ovidae, Bovidae, Suidae, Leporidae и Equidae.

Предпочтительно генетически измененное трансгенное млекопитающее, не являющееся человеком, может представлять собой свинью. Более того, свиньи предпочтительны для получения композиции по настоящему изобретению, и в частности АЛС или АТГ, по той причине, что они особенно интересны с точки зрения производства.

Более того, свиньи обладают рядом преимуществ, в частности, по сравнению с кроликами в отношении объема иммунной сыворотки и, таким образом, интересующих поликлональных антител, которые могут быть собраны пропорционально отношению массы животного (в 30 раз лучше).

Кроме того, свиней не надо подвергать эвтаназии во время сбора сыворотки, и, таким образом, юридические процедуры, позволяющие собирать сыворотку, существенно облегчены.

Более того, может быть собрано 10% объема крови животного в месяц.

По всем этим причинам получение композиции по настоящему изобретению из генетически измененной трансгенной свиньи является особенно экономичным.

Этап b) иммунизации генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком, к клеткам человека

Как только получают генетически измененное трансгенное млекопитающее, не являющееся человеком, утратившее ген, выбранный из группы, содержащей (i) ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминной кислоты (СМАН), и/или (ii) ген, кодирующий функциональную α -(1,3)-галактозилтрансферазу, ему вводят раствор, содержащий исключительно клетки человека.

Предпочтительно клетки человека на этапе b) могут быть выбраны из группы, содержащей лимфоциты человека, тимоциты человека и раковые клетки человека, и в частности, лимфоциты человека и тимоциты человека.

Например, способ получения раствора, содержащего только Т-клетки человека, находится в пределах общего знания специалистов в области техники (EP 1778836; EP 0335804).

Согласно конкретному варианту воплощения указанные клетки человека представляют собой клоны Т-клеток человека, такие как описанные в EP 0335804.

Данный вариант воплощения обладает преимуществом, поскольку позволяет преодолеть возможные нежелательные побочные эффекты, связанные с присутствием вместе с клетками человека, особенно Т-лимфоцитами, различных примесей клеточной природы, включая нейтрофилы, моноциты, красные кровяные клетки и тромбоциты, которые могут участвовать посредством иммунизированного млекопитающего, не являющегося человеком, в образовании соответствующих контаминирующих антител.

Протокол достижения хорошего уровня иммунизации трансгенного млекопитающего, не являющегося человеком, к Т-клеткам, в частности, описан в EP 0335804.

Такой протокол, в частности, может включать иммунизацию животных, таких как кроликов, лошадей или свиней, предпочтительно свиней, с повторным введением, согласно известным способам, Т-клеток человека.

Например, выполняют несколько введений, внутривенно или подкожно, с адъювантом или без, от 10^6 до 10^9 клеток каждый раз, с разделением, по меньшей мере, в неделю. Приблизительно спустя неделю после последней иммунизации собирают сыворотку от иммунизированных животных и выделяют согласно известным способам.

Генетически измененное трансгенное млекопитающее, не являющееся человеком, будет продуцировать антитела к этим Т-клеткам человека, причем указанные специфичные антитела будут лишены антигенной детерминанты Neu5Gc и/или α -1,3-Gal согласно природе рассматриваемого генетически измененного трансгенного млекопитающего, не являющегося человеком.

Этап с), сбор антител, содержащихся в жидкости организма генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком, с этапа b)

Далее часть жидкости крови указанного генетически измененного трансгенного млекопитающего, не являющегося человеком, удаляют и собирают интересующие антитела.

Согласно конкретному варианту воплощения указанную жидкость организма можно выбрать из группы, содержащей плазму крови и сыворотку крови.

Протокол получения жидкости крови, и в частности плазмы крови или сыворотки крови, находится в пределах знаний специалиста в области техники.

Дополнительный этап d) очистки антител из жидкости организма с этапа с)

Согласно предпочтительному варианту воплощения, и как указано выше, способ согласно изобретению может дополнительно включать этап d) очистки антител от указанной жидкости организма.

Указанный этап d) очистки обладает преимуществом в том, что он, в частности, позволяет преодолеть возможные нежелательные побочные эффекты, связанные с присутствием внутри жидкости организма различных примесей клеточной природы, которые могут вызывать, за счет иммунизированного млекопитающего, не являющегося человеком, образование соответствующих контаминирующих антител.

Указанный этап d) очистки также обладает преимуществом в том, что делает возможным получение композиции, обладающей желаемой степенью чистоты.

Указанный этап d) очистки находится в пределах общих знаний специалиста в области техники. Все возможные изменения любого обычного протокола очистки также находятся в объеме общих знаний специалиста в области техники. В этом отношении согласно первому варианту композиции по изобретению может представлять собой антилимфоцитарную сыворотку (АЛС), сыворотку с антиtimoцитарным глобулином (АТГ) или сыворотку с противораковыми клетками по существу, предпочтительно композиция по изобретению может представлять собой антилимфоцитарную сыворотку (АЛС) или сыворотку с антиtimoцитарным глобулином (АТГ) по существу.

В качестве подходящего способа получения указанной АЛС или АТГ, в частности, может быть упомянут способ фракционированного осаждения при помощи этанола, сульфата аммония, риванола или полиэтиленгликоля, способа пропускания через ионообменные колонки. Затем полученные антитела могут быть подвергнуты обычным методам обработки для их внутривенного введения, например, посредством энзиматического расщепления плазмином, папаином или пепсином.

В этом отношении, в частности, может быть упомянут протокол, реализуемый в примере 3 согласно EP 0335804, в котором применена ионообменная хроматография на целлюлозе DEAE.

Согласно другим вариантам воплощения композиция по изобретению может состоять из композиции, причем антитела, полученные на этапе с) описанного выше способа, отделяют от других клеточных компонентов, иных, чем антитела, включая, в частности, нейтрофилы, моноциты, красные кровяные клетки и тромбоциты.

Согласно этим другим вариантам воплощения композиция по изобретению может состоять из композиции, содержащей очищенные поликлональные антитела, которые изначально присутствуют в сыворотке, причем указанные очищенные поликлональные антитела по существу не содержат белковых компонентов сыворотки или даже поликлональных антител, которые по существу свободны от любого вещества, изначально содержащегося в сыворотке, применяемой в качестве исходного продукта.

В качестве указанного способа очистки данных интересующих поликлональных антител могут быть упомянуты данные способы очистки антител на аффинной подложке, к которой прикреплен антиген, на белке G или на белке A, например таковые, продаваемые компаниями ProteoGenix, Cell Biolabs, Inc. или CliniSciences или также описанные в EP 1601697, JP 7155194 или US 6870034.

Также может быть указана аффинная подложка для селективной фиксации интересующих антител из жидкости крови, содержащая твердый материал подложки, имеющий иммобилизованный аптамер, специфично связывающий указанные интересующие антитела из жидкости крови. Такой способ, в частности, раскрыт в WO 2010/094901.

Медицинское применение по изобретению

Как указано выше, настоящее изобретение согласно одному из его аспектов относится к применению генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком, утратившего первый ген, выбранный из группы, содержащей (i) ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетил нейраминавой кислоты (СМАН), и (ii) ген, кодирующий функциональную α -(1,3)-галактозилтрансферазу, для получения композиции, содержащей поликлональные антитела к клеткам человека.

Согласно конкретному варианту воплощения данное генетически измененное млекопитающее, не являющееся человеком, дополнительно может быть утратившим второй ген, отличный от первого гена, причем указанный второй ген выбран из группы, содержащей (i) ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминавой кислоты (СМАН), и (ii) ген, кодирующий функциональную α -(1,3)-галактозилтрансферазу.

В частности, отсутствие антител к Neu5Gc в образце может быть определено согласно способу до-

зирования, описанному в Padler-Karavani V et al. (PLoS One. 2013; 8 (3): e58443).

Предпочтительно клетки человека могут быть выбраны из группы, включающей лимфоциты человека, тимоциты человека и раковые клетки человека, и в частности могут быть выбраны из группы, включающей лимфоциты человека и тимоциты человека.

Согласно другому предпочтительному варианту воплощения композиция по настоящему изобретению может представлять собой сыворотку к клеткам человека, причем указанную композицию предпочтительно выбирают из группы, включающей антилимфоцитарную сыворотку (АЛС), сыворотку с анти-timoцитарным глобулином (АТГ) и сыворотку к противораковым клеткам, при этом указанную композицию более предпочтительно выбирают из группы, включающей антилимфоцитарную сыворотку (АЛС) и сыворотку с антиtimoцитарным глобулином (АТГ).

Данное изобретение также относится к композиции, содержащей поликлональные антитела, как раскрыто в настоящем описании, для ее применения в качестве лекарственного средства.

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей поликлональные антитела, как раскрыто в настоящем описании, для ее применения для предупреждения и/или лечения заболевания, выбранного из группы, включающей отторжение трансплантата, апластическую анемию, реакцию "трансплантат против хозяина", тяжелое аутоиммунное заболевание и заболевание, связанное со злокачественными клетками (или заболевание, связанное с раковыми клетками).

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей поликлональные антитела, как раскрыто в настоящем описании, для ее применения для предупреждения и/или лечения отторжения трансплантата, и в частности отторжения почечного трансплантата.

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей поликлональные антитела, как раскрыто в настоящем описании, для ее применения для предупреждения заболеваний, связанных с посттрансплантационными иммунными комплексами (ИК), в частности сывороточной болезни, кожной сыпи или лихорадки, в сравнении с традиционной сывороткой к лимфоцитам человека или тимоцитам человека.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к способу индукции иммуносупрессивного состояния у индивидуума, нуждающегося в этом, причем указанный способ включает этап введения указанному индивидууму композиции по настоящему изобретению.

Согласно конкретному варианту воплощения указанный индивидуум может страдать апластической анемией.

Согласно другому конкретному варианту воплощения, указанный индивидуум может представлять собой реципиента аллогенного или ксеногенного трансплантата органа.

Согласно другому конкретному варианту воплощения композиция, содержащая поликлональные антитела, как раскрыто в настоящем описании, может быть введена индивидууму, нуждающемуся в этом, в сочетании по меньшей мере с одним иммуносупрессивным лекарственным средством.

В качестве такого иммуносупрессивного лекарственного средства может быть, в частности, упомянут глюкокортикоид, цитостаз (метотрексат, азатиоприн и меркаптопурин), лекарственные средства, действующие на иммунофиллины (циклоспорин, такролимус и сиролимус), финголимод, микофеноловая кислота, ФНО- α (фактор некроза опухолей альфа), связывающие белки (инфликсимаб (ремикейд), этанерцепт (энбрел) или адалимумаб (хумира)).

В качестве иллюстрации этого конкретного варианта воплощения может быть процитирован Marsh J et al. (Blood. 1999 Apr 1; 93 (7): 2191-5) or Delmonico FL et al. (Ann Surg. 1987 Nov; 206 (5): 649-54).

Настоящее изобретение в дальнейшем проиллюстрировано без ограничения посредством нижеприведенных примеров.

Примеры

В данном документе во всех последующих примерах все используемые свиньи получали немодифицированную диету.

Пример 1. Протокол получения АЛС и АТГ из двойной GAL/СМАН КО свиньи.

Предварительно используемая двойная свинья GAL/СМАН КО раскрыта в Lutz AL et al. (Xenotransplantation, 2013; 20 (1): 27-35) или раскрыта в Conchon S. et al. (Xenotransplantation; special issue International Xenotransplantation Association IXA 2013, 2013, Vol. 20, Issue 5).

Иммортализованная клеточная линия Т-лимфоцитов, используемая в данном исследовании, представляла собой линию Jurkat, доступную в Американской коллекции типовых культур под номером CRL2899 (которая также может быть названа "Т-клетки" в примере в данном описании).

1) Протокол иммунизации двойной GAL/СМАН КО свиньи к Т-лимфоцитам человека.

Иммунизация двойной GAL/СМАН КО свиньи описана в Lutz AL et al. (Xenotransplantation, 2013; 20(1):27-35) или в Conchon S. et al. (Xenotransplantation; special issue International Xenotransplantation Association IXA 2013, 2013, Vol. 20, Issue 5) при помощи введения $3 \cdot 10^8$ Т-клеток.

Выполняли три внутривенных инъекций на день 0, 14 и 21.

Возможно, введение внутривенно 10 доз BCG или любого типа адьюванта при 10^7 - 10^8 возбудителя/10 доз на день 5.

Сбор сыворотки проводили на день 28 посредством кровопускания. Сбор составлял приблизительно

но 100 мл сыворотки свиньи.

2) Протокол получения АЛС из двойной GAL/СМАН КО свиньи.

Вышеуказанную сыворотку свиньи подвергали хроматографии на целлюлозе Whatman DEAE и затем выполняли этап элюирования при помощи динатрийфосфатного буфера 1,5 г/л, pH 8.

Проводили очистку полученного раствора гамма-глобулина посредством двойного осаждения сульфатом натрия при 180 г/л, затем 170 г/л, pH 7. Осадок повторно растворяли в растворе 0,3 М глицина, pH 7, до получения объема, эквивалентного начальному объему.

Альтернативно вышеуказанный этап очистки может быть проведен при помощи белка А и ионообменной хроматографии на колонке.

Проводили гемасорбцию раствора дважды на ступках красных кровяных клеток человека (объем ступок для каждой адсорбции по сути эквивалентен объему неочищенной сыворотки) для снижения показателя гемагглютинина. Проводили повторное осаждение раствора сульфатом натрия для удаления гемоглобина. Осадок растворяли в 0,3 М глициновом буфере, диафильтровали против конечного раствора глицина 10 г/л, NaCl 2 г/л, маннитола 10 г/л. Добавляли белки до 5 г/л и затем лиофилизировали.

Комментарии: полученная АЛС от двойной GAL/СМАН КО свиньи особо интересна тем, что она существенно менее иммуногенна по сравнению с традиционной АЛС.

Таким образом, данная АЛС делает возможным снижение заболеваний, связанных с иммунным комплексом (ИК), которые могут развиваться у пациентов после трансплантации аллотрансплантата или ксенотрансплантата. К тому же, данная АЛС также позволяет снизить сывороточную болезнь, которая может развиваться в дальнейшем.

Все данные преимущества безусловно улучшают долговременную выживаемость трансплантата.

Пример 2. Иммунная реакция двойных GAL/СМАН КО свиней на Т-клетки человека (или ЛПК (лимфоциты периферической крови) человека).

Иммунизацию двойных нокаутных свиней согласно примеру 1 (в котором рассмотрен BCG или любой другой тип адъюванта) и свиней дикого типа выполняли посредством трех последовательных инъекций 30×10^6 клеток Jurkat в фосфатно-солевом буфере: первую подкожную инъекцию проводили на день 0 с последующими двумя внутривенными инъекциями на день 14 и 28. Клетки Jurkat культивировали в среде, не содержащей Neu5Gc и соединений. Кровь брали на день 35, и сыворотку применяли для дальнейших экспериментов или очистки IgGs.

Метод детекции специфичных антител человека к ЛПК в упомянутой сыворотке адаптировали на основе протокола, описанного в Poirier N et al., Journal of Surgical Research, 2007. Кратко, $2,5 \times 10^5$ мононуклеарных клеток периферической крови человека инкубировали с различными разведениями сыворотки иммунизированных свиней (от 1:5 до 1:5000) или без сыворотки в качестве отрицательного контроля, в течение 30 мин при 4°C. После промывки в буфере FACS (ФСБ, 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), 0,1% азида) клетки инкубировали с FITC-мечеными козьими антителами к IgG свиньи (AbD Serotec, reference: AAI41F) при разведении 1:30, в течение 30 мин, при 4°C. Клетки промывали три раза до ресуспендирования в буфере FACS и немедленно анализировали на BD FACSCanto™ II.

Результаты показаны в виде средней интенсивности флуоресценции в одном и том же эксперименте для сыворотки, взятой на день 35 протокола иммунизации.

Результаты.

Результаты показаны на фиг. 4. Более сильная интенсивность наблюдается в случае сыворотки двойных GAL/СМАН КО свиней. Таким образом, упомянутые двойные КО свиньи дают сильный ответ на ЛПК человека (= лимфоциты периферической крови) вследствие иммунизации клетками Jurkat.

Пример 3. Измерение антител к Neu5Gc (или IgGs к Neu5Gc) у двойных GAL/СМАН КО свиней.

Антитела к Neu5Gc в сыворотке иммунизированных свиней согласно примеру 2 (взятой на день 35 протокола иммунизации) количественно оценивали при помощи тИФА, адаптированного исходя из Scobie et al., J Immunol., 2013, модифицированного для улучшения специфичности. Вкратце, планшеты покрывали сывороткой мышей дикого типа (содержащей Neu5Gc) в течение ночи при 4°C, затем блокировали при помощи ФСБ 1% овальбумина, 0,05% Твин в течение 2 ч при комнатной температуре. В течение данного времени образцы предварительно инкубировали в течение 2 ч на льду при помощи сыворотки от СМАН-КО мыши (отсутствие экспрессии Neu5Gc) и с или без 5 мМ синтетической Neu5Gc (для сравнительной адсорбции антител к Neu5Gc). Затем образцы добавляли к тИФА планшету в течение 2 ч при комнатной температуре. Вторичные козы антитела к IgG (Fc) свиньи, меченные пероксидазой хрена (AbD Serotec, reference: AAI41P), применяли для детекции антител к Neu5Gc, и детекцию проводили при помощи субстрата TMB (Sigma-Aldrich). Оптическую плотность считывали на планшетном ридере MRX (Dynatech Laboratories). Результаты представляли в качестве разницы между оптической плотностью лунок, ингибированных или неингибированных синтетическим Neu5Gc.

Результаты.

Результаты показаны на фиг. 5. Таким образом, двойные GAL/СМАН КО свиньи продуцируют минимальное количество антител к Neu5Gc, которое показывает, что нет необходимости в адсорбции иммунной сыворотки.

Пример 4. Связь между диагностикой сывороточной болезни и выживаемостью почечного трансплантата.

Данное исследование оценивает долю собранных данных от пациентов (моноцентрическая когорта базы данных DIVAT, Nantes Transplantation Institute, Nantes), имеющих первый трансплантат почки или почки/поджелудочной железы и получающих лечение АЛС или АТГ, и в этом отношении имеющих развившиеся заболевания, связанные с иммунным комплексом (ИК), проявляющиеся в сывороточной болезни и связанных побочных эффектах в отношении долгосрочной выживаемости трансплантата.

Указанное исследование проиллюстрировано при помощи фиг. 3 и при помощи трех последующих табл. А-С.

Табл. А отражает характеристики пациентов, входящих в рассматриваемые когорты. Табл. В и С отражают анализы выживаемости посредством одновариантной и многовариантной моделей Кокса соответственно.

Таблица А

Параметры	Пропущенные значения	общее	Группа с сывороточной болезнью	Группа без сывороточной болезни	р-значение
	Число (%)	(N=889) Число (%)	(N=86) Число (%)	(N=803) Число (%)	
Реципиент					
Мужчина	0 (0,0)	554 (62,3)	55 (64,0)	499 (62,1)	0,8318
Возраст ≥ 55 лет	0 (0,0)	254 (28,6)	9 (10,5)	245 (30,5)	0,0002*
Возраст ≥ 40 лет	0 (0,0)	545 (61,3)	42 (48,8)	503 (62,6)	0,0173*
Индекс массы тела	54 (6,1)				0,5115
худой		72 (8,6)	10 (11,8)	62 (8,3)	
нормальный		724 (86,7)	72 (84,7)	652 (86,9)	
тучный		39 (4,7)	3 (3,5)	36 (4,8)	
Реккурентное исходное заболевание	85 (9,6)	301 (37,4)	26 (32,1)	275 (38,0)	0,3545
Превентивный диализ	35 (3,9)	86 (10,1)	13 (15,1)	73 (9,5)	0,1468
PRA** к классу I	65 (7,3)	235 (28,5)	23 (26,7)	212 (28,7)	0,7956
PRA** к классу II	391 (44,0)	195 (39,2)	30 (41,1)	165 (38,8)	0,8121
Анамнез диабета	0 (0,0)	103 (11,6)	9 (10,5)	94 (11,7)	0,8693
Анамнез повышенного кровяного давления	0 (0,0)	613 (69,0)	62 (72,1)	551 (68,6)	0,5896
Сердечно-сосудистый Анамнез	0 (0,0)	127 (14,3)	7 (8,1)	120 (14,9)	0,1207
Трансплантат					
Трансплантат почка-поджелудочная железа	0 (0,0)	96 (10,8)	12 (14,0)	84 (10,5)	0,4185
Срок трансплантата	0 (0,0)				0,0473*
1985-1989		351 (39,5)	43 (50,0)	308 (38,4)	
1990-1999		538 (60,5)	43 (50,0)	495 (61,6)	
Отсроченная функция трансплантата (ОФТ)	21 (2,4)	363 (41,8)	36 (42,91)	327 (41,7)	0,9312
Холодовая ишемия ≥ 36 ч	12 (1,3)	413 (47,1)	44 (51,8)	369 (46,6)	0,4273
Трупный донор	0 (0,0)	863 (97,1)	83 (96,5)	780 (97,1)	0,7326

Число несовместимости HLA	2 (0,2)	431 (48,6)	35 (40,7)	396 (49,4)	0,1534
Донор					
Мужчина	1 (0,1)	639 (71,9)	67 (77,9)	572 (71,2)	0,2371
Возраст ≥ 55 лет	0 (0,0)	90 (10,1)	4 (4,7)	86 (10,7)	0,1136
Возраст ≥ 40 лет	0 (0,0)	325 (36,6)	21 (24,4)	304 (37,9)	0,0192*
Креатинин ≥ 133 мкмоль/л	338 (38,0)	98 (17,8)	7 (15,2)	91 (18,0)	0,7837
Сосудистая причина смерти	35 (3,9)	266 (31,1)	19 (7,1)	247 (18,0)	0,0982
Лечение					
Кортикоиды	0 (0,0)	760 (85,5)	79 (91,9)	681 (84,8)	0,1087

** PRA - панель реактивных антител

Таблица В

Параметр	Соотношение вреда (СВ)	95 % CI	p
Реципиент			
пол (мужчины/женщины)	1,38	[1,12; 1,69]	0,0021*
возраст (≥ 55 / < 55)	0,94	[0,75; 1,18]	0,6062
Индекс массы тела			0,7158
Худой/нормальный	0,98	[0,69; 1,39]	0,8940
Тучный/нормальный	1,21	[0,75; 1,95]	0,4270
Реккурентное исходное заболевание (да / нет)	1,19	[0,96; 1,48]	0,1103*
Превентивный диализ (да/нет)	0,81	[0,58; 1,13]	0,2222
PRA** класса I (да/нет)	1,34	[1,08; 1,66]	0,0082*
PRA** класса II (да/нет)	1,33	[1,04; 1,70]	0,0229*
Анамнез диабета (да/нет)	0,82	[0,59; 1,14]	0,2278
Анамнез повышенного кровяного давления (да/нет)	1,16	[0,93; 1,45]	0,1784*
Сердечнососудистый анамнез (да/нет)	0,96	[0,72; 1,26]	0,7487
Сывороточная болезнь (да/нет)			0,0233*
До 10 лет	0,89	[0,59; 1,35]	0,5910
После 10 лет	1,85	[1,18; 2,91]	0,0072*
Возникновение отторжения (да/нет)	2,62	[2,14; 3,21]	< 0,0001*
Трансплантат			
Тип трансплантата (почка-поджелудочная железа/только почка)	0,80	[0,56; 1,12]	0,1900*
Срок трансплантата (≥ 1990 / < 1990)	0,82	[0,67; 1,00]	0,0462*
Отсроченная функция трансплантата (ОФТ) (да/нет)	1,33	[1,09; 1,62]	0,0055*

Холодовая ишемия (≥ 36 ч / < 36 ч)	1,16	[0,95; 1,41]	0,1356*
Взаимоотношение донор-реципиент (трупный донор/живой донор)	1,04	[0,62; 1,75]	0,8705
Число несовместимости HLA (≥ 4 / < 4)	0,83	[0,68; 1,01]	0,0623*
Донор			
Пол (мужчины/женщины)	0,93	[0,75; 1,15]	0,5063
Возраст (10 лет)	1,16	[1,09; 1,25]	$< 0,0001^*$
креатинин (≥ 133 мкмоль/л / < 133 мкмоль/л)	1,18	[0,84; 1,66]	0,3392
Причина смерти (сосудистая/другая)	1,25	[1,01; 1,55]	0,0380*
Лечение			
Кортикоиды (да/нет)	0,34	[0,27; 0,44]	$< 0,0001^*$

* одновариантный анализ. Значимые параметры ($p < 0.20$)

** PRA - панель реактивных антител

Таблица С

Параметр	Отношение рисков (HR)	95 % CI	p
Пол реципиента (мужчины/женщины)	1,39	[1,12; 1,73]	0,0027*
Возраст реципиента (≥ 55 / < 55)	1,03	[0,805; 1,31]	0,8427
PRA** класса I (да/нет)	1,51	[1,20; 1,89]	0,0004*
Сывороточная болезнь (да/нет)			0,0233*
До 10 лет	0,90	[0,59; 1,39]	0,6430
После 10 лет	1,72	[1,08; 2,72]	0,0218*
Возникновение острого отторжения (да/нет)	2,86	[2,29; 3,57]	$< 0,0001^*$
Срок трансплантата (≥ 1990 / < 1990)	1,06	[0,84; 1,33]	0,6278*
Холодовая ишемия (≥ 36 ч / < 36 ч)	1,25	[1,02; 1,54]	0,0322*
Число несовместимости HLA (≥ 4 / < 4)	0,82	[0,67; 1,01]	0,0587*
Возраст (10 лет)	1,26	[1,17; 1,36]	$< 0,0001^*$
Кортикоиды (да/нет)	0,26	[0,20; 0,35]	$< 0,0001^*$

* Многовариантный анализ. Значимые параметры ($p < 0.05$)

** PRA: панель реактивных антител

Комментарии.

Относительно этих клинических данных (см. фиг. 3) авторы изобретения показали, что возникновение сывороточной болезни представляет собой независимую переменную, связанную с поздней утратой трансплантата.

Более того, авторы изобретения показали, что относительный риск ("СВ" для "соотношения вреда") указанной сывороточной болезни оценивается числом 2 после острого отторжения и более высок, чем для всех тестируемых параметров.

И, наконец, авторы изобретения наблюдали статистически значимую взаимосвязь между сывороточной болезнью и повышением целых IgG антител к Neu5Gc спустя годы после трансплантации.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция антилимфоцитарной сыворотки (АЛС) к лимфоцитам человека для предупреждения или лечения отторжения трансплантата, реакции "трансплантат против хозяина" или посттрансплантационных заболеваний, связанных с иммунным комплексом (ИК), у пациента-человека, где композиция АЛС содержит поликлональные антитела к лимфоцитам человека, причем поликлональные антитела ли-

шены антигенных детерминант - N-гликольнойраминовой кислоты (Neu5Gc) и α -1,3-галактозы - и содержат по меньшей мере одну сахарную группу, отличную от N-гликольнойраминовой кислоты (Neu5Gc) и α -1,3-галактозы.

2. Композиция сыворотки с антитимоцитарным глобулином (АТГ) к тимоцитам человека для предотвращения или лечения отторжения трансплантата, реакции "трансплантат против хозяина" или посттрансплантационных заболеваний, связанных с иммунным комплексом (ИК), у пациента-человека, где композиция АТГ содержит поликлональные антитела к тимоцитам человека, причем поликлональные антитела лишены антигенных детерминант - N-гликольнойраминовой кислоты (Neu5Gc) и α -1,3-галактозы - и содержат по меньшей мере одну сахарную группу, отличную от N-гликольнойраминовой кислоты (Neu5Gc) и α -1,3-галактозы.

3. Способ получения поликлональных антител композиции по п.1 или 2, включающий этапы:

а) обеспечение генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком, утратившего ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты (СМАН), и ген, кодирующий функциональную α -(1,3)-галактозилтрансферазу;

б) иммунизация указанного генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком, к лимфоцитам человека или тимоцитам человека путем инъектирования млекопитающему, не являющемуся человеком, раствора, содержащего лимфоциты человека или тимоциты человека; и

с) сбор антител, содержащихся в жидкости организма указанного генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком, с этапа б) с получением таким образом композиции, содержащей поликлональные антитела.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что указанная жидкость организма выбрана из группы, содержащей плазму крови и сыворотку крови.

5. Способ по п.3 или 4, отличающийся тем, что указанное млекопитающее, не являющееся человеком, представляет собой свинью.

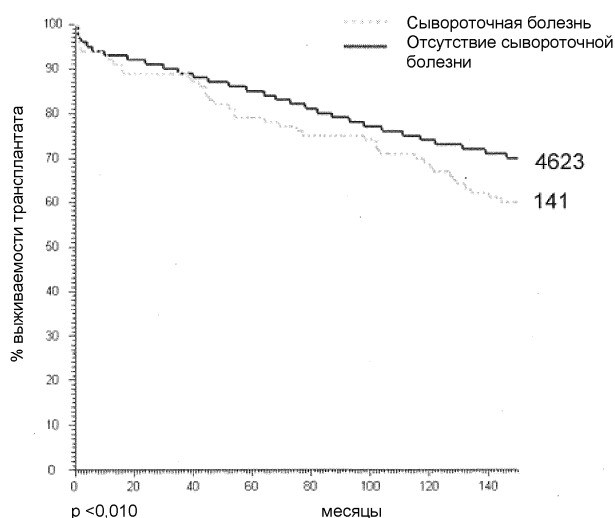
6. Применение генетически измененного млекопитающего, не являющегося человеком, утратившего ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты (СМАН), и ген, кодирующий функциональную α -(1,3)-галактозилтрансферазу, для получения антилимфоцитарной сыворотки (АЛС), как определено в п.1, или сыворотки с антитимоцитарным глобулином (АТГ), как определено в п.2.

7. Применение композиции по п.1 или 2 (i) для предупреждения или лечения заболевания, выбранного из группы, содержащей отторжение трансплантата и реакцию "трансплантат против хозяина", или (ii) для предупреждения посттрансплантационных заболеваний, связанных с иммунным комплексом (ИК).

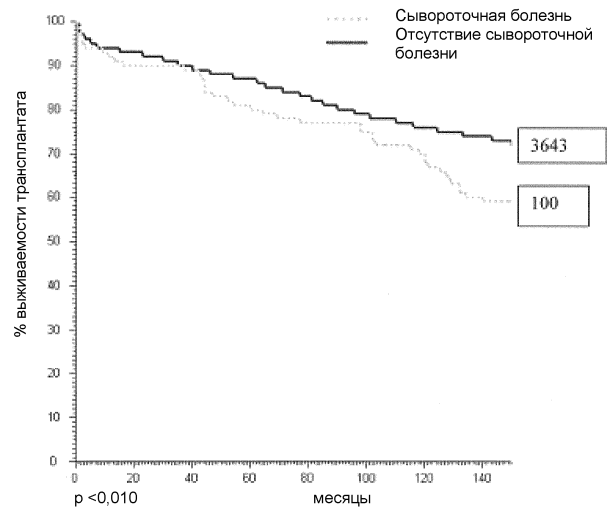
8. Применение по п.7, где посттрансплантационное заболевание, связанное с иммунным комплексом (ИК), представляет собой сывороточную болезнь, кожную сыпь или лихорадку.

9. Способ предупреждения или лечения отторжения трансплантата, реакции "трансплантат против хозяина" и посттрансплантационных заболеваний, связанных с иммунным комплексом (ИК), у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту композиции по п.1 или 2.

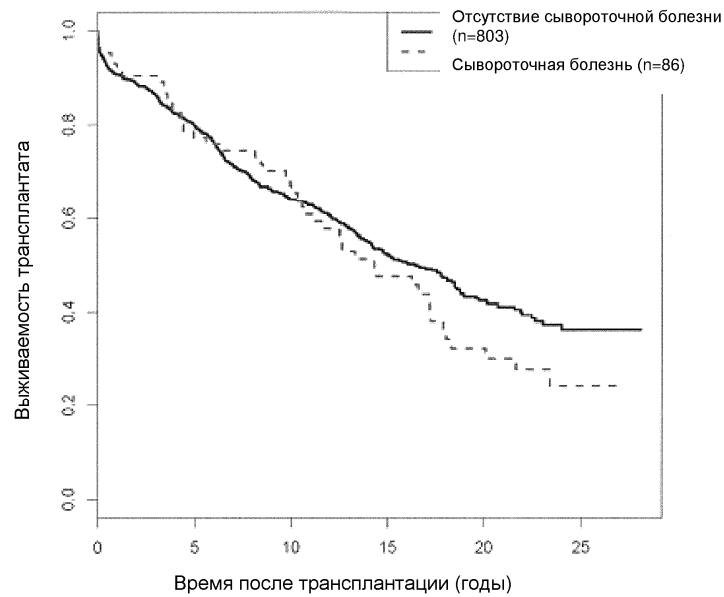
10. Способ по п.9, где посттрансплантационное ИК-связанное заболевание выбрано из группы, состоящей из сывороточной болезни, кожной сыпи и лихорадки.



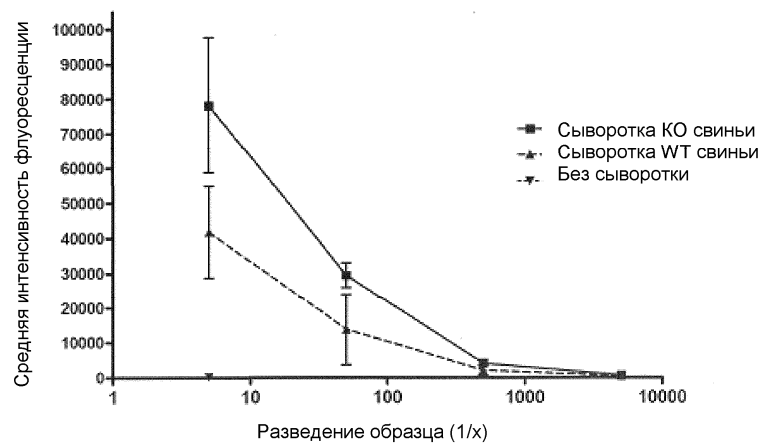
Фиг. 1



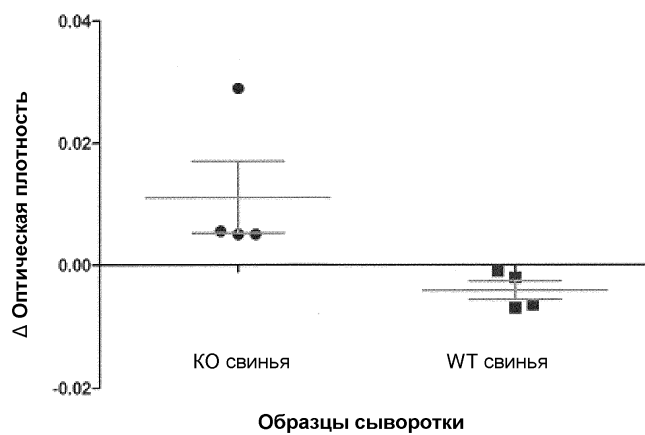
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

