

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045388**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- |   |   |
|---|---|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента<br/><b>2023.11.22</b></p> <p>(21) Номер заявки<br/><b>201790558</b></p> <p>(22) Дата подачи заявки<br/><b>2015.10.15</b></p> | <p>(51) Int. Cl. <b>C07K 16/08</b> (2006.01)<br/><b>C07K 16/12</b> (2006.01)<br/><b>C07K 16/14</b> (2006.01)<br/><b>A01K 67/027</b> (2006.01)<br/><b>C12N 9/02</b> (2006.01)<br/><b>C12N 9/10</b> (2006.01)<br/><b>C12N 9/22</b> (2006.01)<br/><b>C12N 9/40</b> (2006.01)<br/><b>C07K 16/10</b> (2006.01)</p> |
|---|---|

**(54) ПОЛИКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА МЛЕКОПИТАЮЩЕГО, НЕ ЯВЛЯЮЩЕГОСЯ ЧЕЛОВЕКОМ, ЛИШЕННЫЕ АНТИГЕННОЙ ДЕТЕРМИНАНТЫ N-ГЛИКОЛЬНЕЙРАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ И АНТИГЕННОЙ ДЕТЕРМИНАНТЫ  $\alpha$ -1,3-ГАЛАКТОЗЫ**

- |  |   |
|--|---|
| <p>(31) <b>14306633.0</b></p> <p>(32) <b>2014.10.15</b></p> <p>(33) <b>EP</b></p> <p>(43) <b>2017.08.31</b></p> <p>(86) <b>PCT/EP2015/073892</b></p> <p>(87) <b>WO 2016/059161 2016.04.21</b></p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:<br/><b>КСЕНОТЕРА (FR)</b></p> <p>(72) Изобретатель:<br/><b>Дюво Одиль, Сулийу Жан-Поль (FR)</b></p> <p>(74) Представитель:<br/><b>Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н. (RU)</b></p> <p>(56) <b>WO-A1-2014066505</b><br/><b>WO-A2-2013003767</b><br/><b>WO-A2-03097812</b><br/><b>US-A1-2010150942</b><br/><b>US-A1-2012027771</b><br/><b>WO-A1-2010149355</b><br/><b>WO-A1-2007101441</b><br/><b>ANDREW J. LUTZ ET AL.:</b> "Double knockout pigs deficient in N-glycolylneuraminic acid and Galactose [<math>\alpha</math>]-1,3-Galactose reduce the humoral barrier to xenotransplantation", <i>XENOTRANSPLANTATION</i>, vol. 20, no. 1, 5 January 2013 (2013-01-05), pages 27-35, XP055069928, ISSN: 0908-665X, DOI: 10.1111/xen.12019 cited in the application the whole document<br/><b>VERED PADLER-KARAVANI ET AL.:</b> "Potential impact of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid on transplant rejection risk", <i>XENOTRANSPLANTATION</i>, vol. 18, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 1-5, XP055176955, ISSN: 0908-665X, DOI: 10.1111/j.1399-3089.2011.00622.x the whole document<br/><b>RAJU T S ET AL.:</b> "Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics", <i>GLYCOBIOLOGY</i>, OXFORD UNIVERSITY PRESS, US, vol. 10, no. 5, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 477-486, XP002964086, ISSN: 0959-6658, DOI: 10.1093/GLYCOB/10.5.477 the whole document<br/><b>TANGVORANUNTAKUL PAM ET AL.:</b> "Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid", <i>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US</i>, vol. 100, no. 21, 14 October 2003 (2003-10-14), pages 12045-12050, XP002443576, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.2131556100 the whole document<br/><b>WO-A1-2014170867</b></p> | <p>(57) Настоящее изобретение относится к поликлональным антителам по меньшей мере к одному нечеловеческому биологическому патогену или по меньшей мере к одной молекуле, полученной из упомянутого патогена, к организму человека или животного, не являющегося человеком, где указанные поликлональные антитела лишены антигенной детерминанты, выбранной из группы, содержащей (i) N-гликольнейраминовую кислоту (Neu5Gc) и/или (ii) <math>\alpha</math>-1,3-галактозу, и их применению в качестве лекарственного препарата.</p> |
|--|---|

**B1****045388****045388 B1**

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области иммунологии и в частности поликлональным антителам к нечеловеческим биологическим патогенам или молекулам, полученным из указанных патогенов, для человеческого или животного организмов и их применению в медицине.

#### Предшествующий уровень техники

Антитела представляют собой "Y"-образные белковые молекулы, которые в природе продуцируются организмом как часть иммунной защиты. Одна из основных функций антител заключается в связывании с молекулами, которые не распознаются иммунной системой как часть тела. Например, иммунная система создает антитела для связывания с патогенами, например, бактериями и вирусами, для нейтрализации их действия и помощи иммунной системе в уничтожении инфекции.

Большинство терапевтических средств на основе антител являются моноклональными антителами. Моноклональные антитела представляют собой антитела, которые связываются с одним эпитопом. По существу они все представляют собой одно и тоже антитело, а не совокупность различных антител. Моноклональные антитела создают исследователи с применением различных известных способов.

Выбор в пользу поликлональных антител по сравнению с моноклональными антителами для большинства терапевтических средств сегодня имеет смысл, поскольку поликлональные антитела (pAbs) представляют собой антитела, которые секретируются высоко различными линиями В-клеток и плазмочитов внутри тела (в свою очередь моноклональные антитела происходят из единственной клеточной линии). Таким образом, поликлональные гипериммунные антитела представляют собой совокупность высокоразличных иммуноглобулиновых молекул, различных классов и изоформ, которые реагируют со специфичным антигеном, но каждая распознает различный эпитоп. С другой стороны, ассоциации моноклональных антител ограничены несколькими молекулами и не могут имитировать поликлональное многообразие поликлональных антител.

Кроме того, поликлональные антитела действуют через различные механизмы (в частности комплемент и клеточнозависимую цитотоксичность (CDC и ADCC), нейтрализацию, опсонизацию и т.д.), которые могут представлять различные молекулярные мишени классы и изоформы Ig, и которые не могут быть воспроизведены посредством моноклонального антитела, или даже посредством ассоциаций моноклональных антител. В качестве примера поликлональные IgG к Т-клеткам человека взаимодействуют с по меньшей мере 50 кластерами дифференциации (CDs) (Popov et al., Transplantation, 2012).

Таким образом, применение пассивной серотерапии с использованием сыворотки или очищенных поликлональных иммуноглобулинов из животных (кролик, лошадь, коза) явилось первым основным достижением в лечении или предупреждении распространения инфекционных заболеваний, таких как чума или дифтерия.

Однако, несмотря на продемонстрированную эффективность, инъекция человеку иммунных иммуноглобулинов (IgG или IgM, например) из животных может оставаться иммуногенной и ответственной за возникновение заболеваний, связанных с иммунными комплексами (ICD) и тяжелыми нежелательными побочными эффектами, такими как сывороточная болезнь (SSD), включая тяжелые формы (с миокардитами, нефропатиями, например) или другими иммунокомплексными проявлениями, такими как кожная сыпь, лихорадка, головные боли, артрит или псевдоменингеальный синдром и т.д.

ICD человека моделируют у животных (F Dixon J Exp Med 1956). Наиболее известное и хорошо идентифицированное осложнение у людей после инъекции животного IgG представляет собой сывороточную болезнь (SSD), которая наблюдается практически у 100% молодых индивидуумов, имеющих диабет первого типа и принимающих Тимоглобулин, очищенный препарат кроличьего IgG к Т-лимфоцитам, и в отсутствие любых других иммуносупрессивных агентов (SE Giteman et al., The Lancet Diabetes & Endocrinology, 1:306, 2003).

Несмотря на проблемы безопасности пассивная иммунотерапия у большинства людей сталкивается с существовавшим ранее Ig к животному, не являющемуся человеком, который модифицирует биодоступность материала, инъецированного и возможно его раннюю эффективность. Кроме того, известно, что большинство людей уже имеют Ig к животному, не являющемуся человеком, из-за их диеты и кишечного биотопа. Даже в случае эффективного препарата терапевтического Ig животного, не являющегося человеком, и с целью введения людям, тяжелые и многочисленные SSD представляют собой основное препятствие для безопасности и возможной эффективности пассивной иммунотерапии у не иммуносупрессированных реципиентов с тяжелыми инфекционными заболеваниями. Кроме того, проблемы безопасности также могут ограничить широкое применение профилактических мер у возможно зараженных индивидуумов в случае близости пациентов.

Причем присутствие клинических проявлений SSD является клиническим недостатком для корректной оценки результата терапевтической или профилактической процедуры с применением очищенных поликлональных антител. Более того, клинические симптомы SSD включают исключительно головные боли, лихорадку, артрит или псевдоменингеальный синдром, которые все могут препятствовать корректной оценке развития заболевания.

Таким образом, существует необходимость в предложении терапевтических поликлональных антител млекопитающего(-их), не являющегося человеком, способных эффективно предотвращать и/или ле-

чить нарушения вследствие инфекций, вызванных нечеловеческим биологическим патогеном, и имеющие сниженные побочные эффекты, включая терапевтические поликлональные антитела, которые будут существенно менее иммуногены, при сравнении с обычными поликлональными антителами и которые предпочтительно не будут ассоциированы с манифестациями заболеваний, связанных с IC.

#### Краткое описание изобретения

Согласно первому из его аспектов изобретение относится к поликлональному антителу по меньшей мере к одному нечеловеческому биологическому патогену или по меньшей мере одной молекуле, полученной из указанного патогена, для организма человека или животного, не являющегося человеком, предпочтительно для организма человека, где указанное поликлональное антитело лишено первой антигенной детерминанты, выбранной из группы, содержащей (i) N-гликольнейраминовую кислоту (Neu5Gc) и (ii)  $\alpha$ -1,3-галактозу.

Согласно другому его аспекту изобретение относится к композиции, содержащей по меньшей мере поликлональные антитела, такие как указанные выше.

Согласно другому его аспекту изобретение относится к способу получения поликлональных антител или композиции, содержащей поликлональные антитела, такие как вышеуказанные, включающему стадии:

a) обеспечения генетически модифицированного 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  $\alpha$ -(1,3)-галактозилтрансферазу (альфа1,3GT, GGTA1 или GT1);

b) иммунизации указанного генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком по меньшей мере к одному нечеловеческому биологическому патогену(ам), для организма человека или животного, не являющегося человеком, предпочтительно для организма человека, или по меньшей мере к одной молекуле(ам), полученным из указанного патогена(ов); и

c) сбора антител, содержащихся в биологической жидкости указанного генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком стадии b).

Согласно предпочтительному воплощению генетически модифицированное млекопитающее, не являющееся человеком, лишено лишь гена, кодирующего функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты (СМАН).

Согласно другому предпочтительному воплощению генетически модифицированное млекопитающее, не являющееся человеком, лишено двух генов, выбранных из группы, состоящей из (i) гена, кодирующего функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты (СМАН) и (ii) гена, кодирующего функциональную  $\alpha$ -(1,3)-галактозилтрансферазу (альфа1,3GT, GGTA1 или GT1).

Как известно в области техники, антитела к нечеловеческим биологическим патогенам для организма человека или животного, предпочтительно для организма человека, могут быть легко получены посредством иммунизации млекопитающего, не являющегося человеком, которое включает в частности свиней, лошадей или кроликов, за счет введения иммуногенной композиции, содержащей мишенные нечеловеческие биологические патогены или антигены, полученные из них (в частности, молекулы, полученные из указанных патогенов), с или без адьюванта.

Затем поликлональные антитела любого класса или изотипа к любому типу нечеловеческих биологических патогенов, могут быть получены посредством иммунизации млекопитающего, не являющегося человеком, при помощи указанных нечеловеческих биологических патогенов, или альтернативных антигенов, полученных из них (в частности, молекул, полученных из указанных патогенов).

Это включает поликлональные антитела, представляющие терапевтический интерес, антитела к нечеловеческим биологическим патогенам, присутствие которых у человека или животного, не являющегося человеком, особенно человека, нежелательно.

Это включает поликлональные антитела к микроорганизмам, оказывающим вредное воздействие на организм человека или животного, не являющегося человеком, особенно на организм человека.

Поэтому, указанный нечеловеческий биологический патоген для организма человека или животного предпочтительно выбран из группы, состоящей из бактерий, паразитов, грибов, вируса, токсинов, ядов и их комбинаций. Однако, поликлональные антитела, известные в области техники, в частности антитела, получаемые у животных, а именно у млекопитающих, не являющихся человеком, таких как свиньи или кролики, остаются иммуногенными у человека, в частности из-за присутствия эпитопов  $\alpha$ -1,3-галактозы и/или N-гликольнейраминовой кислоты (Neu5Gc) на данных известных поликлональных антителах, эпитопы которых распознаются клетками иммунной системы человека.

Для преодоления недостатков известных поликлональных антител, настоящее изобретение предполагает использование генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком, лишённого первого гена, выбранного из группы, содержащей (i) ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты (СМАН) и (ii) ген, кодирующий функциональную  $\alpha$ -(1,3)-галактозилтрансферазу, для продукции поликлональных антител (или композицию их содержащую) по меньшей мере к одному нечеловеческому биологическому патогену для организма

человека или животного или по меньшей мере к одной молекуле, полученной из указанного патогена.

Кроме того, обеспечение такого генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком, имеет то преимущество, что указанное генетически модифицированное млекопитающее, не являющееся человеком, развивает лишь минимальное количество антител к NeuGc на немодифицированной диете. Таким образом, это освобождает от стадии иммуносорбции сыворотки указанного генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком, перед ее введением пациенту-человеку.

Применение нокаутного (КО) животного по меньшей мере по одному гену GT1 также имеет преимущество в отношении дальнейшего повышения продукции антител к Gal, которые могут защищать от патогенов (Katorpodis AG et al., J. Clin. Invest., 2002).

Согласно другим аспектам изобретение относится к поликлональному антителу, или композиции, его содержащей, для его применения в качестве лекарственного препарата.

Настоящее изобретение также относится к поликлональному антителу или композиции, описанной выше, для их применения с целью предупреждения и/или лечения тяжелой инфекции, в частности выbranной из группы, включающей инфекции, вызванные ацинетобактериями, актиномикоз, африканскую сонную болезнь (африканский трипаносомоз), СПИД (синдром приобретенного иммунодефицита), амебиаз, анаплазмоз, сибирскую язву, инфекцию, вызванную бактериями *Arcanobacterium haemolyticum*, аргентинскую геморрагическую лихорадку, аскаридоз, аспергиллез, инфекцию, вызванную астровирусом, бабезиоз, инфекцию, вызванную *Bacillus cereus*, бактериальную пневмонию, бактериальный вагиноз (BV), инфекцию, вызванную бактероидами, балантидиоз, байлисаскаридоз, BK-вирусную инфекцию, черную пьедру, инфекцию, вызванную *Blastocystis hominis*, бластомикоз, боливийскую геморрагическую лихорадку, инфекцию, вызванную *Borrelia*, ботулизм (и ботулизм новорожденных), бразильскую геморрагическую лихорадку, бруцеллез, бубонную чуму, инфекцию, вызванную *Burkholderia*, язву Бурули, инфекцию, вызванную калицивирусом (Norovirus и Sapovirus), кампилобактериоз, кандидозы (молочницу; стоматит), болезнь кошачьих царапин, целлюлит, болезнь Чагаса (американский трипаносомоз), шанкроид, ветрянку, чикунгунью, хламидиоз, инфекцию, вызванную *Chlamydophila pneumoniae* (тайваньский острый респираторный агент или TWAR), холеру, хромобластомикоз, клонорхоз, инфекцию, вызванную *Clostridium difficile*, кокцидиомикоз, колорадскую клещевую лихорадку (CTF), простуду (острый вирусный ринофарингит; вирусную инфекцию верхних дыхательных путей), болезнь Крейтцфельда-Якоба (CJD), Крымскую геморрагическую лихорадку (CSHF), криптококкоз, криптоспоридиоз, мигрирующую кожную личинку (CLM), циклоспориоз, цистицеркоз, цитомегаловирусную инфекцию, лихорадку Денге, дизентамебиаз, дифтерию, дифилоботриоз, дракункулез, геморрагическую лихорадку Эбола, эхинококкоз, эрлихиоз, энтеробиоз (оксиуроз), инфекцию, вызванную *Enterococcus*, энтеровирусную инфекцию (в частности энтеровирус 71 типа (EV71) (Huang et al., Curr. Opin. Virol., 2014, 12;5: 98-104)), эпидемический сыпной тиф, инфекционную эритему (пятая болезнь), внезапную экзантему (шестая болезнь), фасциолосидоз, фасциолез, фатальную семейную бессонницу (FFI), филяриоз, пищевое отравление, вызванное *Clostridium perfringens*, инфекцию, вызванную свободной-живущими амебами, инфекцию, вызванную веретенообразными бактериями, газовую гангрену (анаэробная гангрена), геотрихоз, синдром Герстманна - Штраусслера -Шейнкера (GSS), лямблиоз, сап, гнатостомоз, гонорею, паховую гранулему (донованоз), инфекцию, вызванную стрептококком группы А, инфекцию, вызванную стрептококком группы В, инфекцию, вызванную гемофильной палочкой, вирусную пузырчатку рта и конечностей (HFMD), хантавирусный легочный синдром (HPS), вирусную болезнь Хартленда, инфекцию, вызванную *Helicobacter pylori*, гемолитический уремический синдром (HUS), геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (HFRS), гепатит А, гепатит В, гепатит С, гепатит D, гепатит Е, простой герпес, гистоплазмоз, анкилостомоз, бокавирусную инфекцию человека, эрлихиоз человека, вызванный *Ehrlichia ewingii*, гранулоцитарный анаплазмоз человека (HGA), метапневмовирусную инфекцию человека, моноцитарный эрлихиоз человека, папилломовирусную инфекцию человека (HPV), инфекцию человека, вызванную вирусом парагриппа, гименолепидоз, инфекционный мононуклеоз, вызванный вирусом Эпштейн-Барра (Моно), грипп, изоспороз, болезнь Кавасаки, кератит, инфекцию, вызванную *Kingella kingae*, куру, лихорадку Ласса, легионеллез (болезнь легионеров), легионеллез (понтакская лихорадка), лейшманиоз, лепру, лептоспироз, листериоз, болезнь Лайма (лаймборрелиоз), лимфатический филяриатоз (слоновая болезнь), лимфоцитарный хориоменингит, малярию, геморрагическую лихорадку Марбург (МНФ), корь, ближневосточный респираторный синдром (MERS), мелиоидоз (болезнь Уитмора), менингит, менингококковую инфекцию, метагонимоз, микроспориоз, инфекцию, вызванную контактиозным моллюском (MC), оспу обезьян, эпидемический паротит, эндемический блошиный тиф (эндемический тиф), микоплазму пневмонии, мицетому, миаз, неонатальный конъюнктивит (офтальмия новорожденных), (новый) вариант болезни Крейтцфельда-Якоба (vCJD, nvCJD), нокардиоз, онхоцеркоз (речная слепота), параккокцидиоз (южно-американский бластомикоз), парагонимоз, пастереллез, головной педикулез (головные вши), нательный педикулез (нательные вши), лобковый педикулез (площица), воспаление органов таза (PID), коклюш (судорожный кашель), чуму, пневмококковую инфекцию, пневмоцистную пневмонию (PCP), пневмонию, полиомиелит, инфекцию, вызванную *Prevotella*, первичный амебный менингоэнцефалит (РАМ), прогрессирующую мультифокальную лейкоэнцефалопатию, орнитоз, лихорадку Q, бешенство,

респираторную синцитиальную вирусную инфекцию, риноспоридиоз, риновирусную инфекцию, риккетсиозную инфекцию, везикулезный риккетсиоз, лихорадку Рифт-Валли (RVF), пятнистую лихорадку скалистых гор (RMSF), ротавирусную инфекцию, краснуху, сальмонеллез, ТОРС (тяжелый острый респираторный синдром), чесотку, шистосомоз, сепсис, шигеллез (бактериальная дизентерия), опоясывающий лишай (герпес зостер), натуральную оспу (вариола), споротрихоз, стафилококковое пищевое отравление, стафилококковую инфекцию, стронгилоидоз, подострый склерозирующий панэнцефалит, сифилис, тениоз, столбняк (тризм), дерматомироз бороды и усов (обыкновенный сикоз), стригущий лишай (дерматомироз волосистой части головы), дерматомироз гладкой кожи (дерматомироз гладкой кожи головы), паховый дерматомироз (паховая эпидермофития), грибковое поражение кожи кистей (дерматомироз кистей), черный лишай, дермофитию стопы (эпидермофития стопы), дерматофитный онихомироз (онихомироз), разноцветный лишай (отрубевидный лишай), токсокароз (глазной личиночный токсокароз (OLM)), токсокароз (висцеральный токсокароз (VLM)), трахому, токсоплазмоз, трихинеллез, трихомоноз, трихоцефалез (инфекция, вызванная власоглавом), туберкулез, туляремию, инфекцию, вызванную *Ureaplasma urealyticum*, кокцидиоидомикоз, венесуэльский лошадиный энцефалит, венесуэльская геморрагическая лихорадка, вирусную пневмонию, энцефалит Западного Нила, белую пьедру, инфекцию, вызванную *Yersinia pseudotuberculosis*, йерсиниоз, желтую лихорадку, зигомикоз или по меньшей мере одну тяжелую инфекцию(-ии), вызванную по меньшей мере одним устойчивым к антибиотикам патогеном(ми) (D Roux et al., J. Antimicrob. Chemother., 2012; JD Berry et al., New Biotechnology, 2011, 28: 489-501).

Таким образом, нечеловеческий биологический патоген, рассматриваемый в настоящем изобретении выбранный из группы, содержащей бактерии, паразитов, грибы, вирусы, токсины, яды и их комбинации, в частности может представлять собой нечеловеческий биологический патоген, который приводит по меньшей мере к одной тяжелой инфекции (инфекциям), таким как вышеописанные.

Настоящее изобретение дополнительно относится к поликлональным антителам или композициям, таким как описанные выше, для их применения при серопротекции и/или серотерапии.

Кроме того, настоящее изобретение относится к поликлональному антителу или композиции, такой как описанная выше, для их применения с целью снижения и/или супрессии заболеваний, связанных с иммунными комплексами (ICD) и тяжелыми нежелательными побочными эффектами, такими как сыпчатая болезнь (SSD), включая тяжелые формы (например, с миокардитом, нефропатией) или другими иммунокомплексными проявлениями, такими как кожная сыпь, лихорадка, головная боль, артрит или псевдоменингитальный синдром и вызываемыми введением антител, содержащих по меньшей мере одну антигенную детерминанту, выбранную из группы, содержащей (i) N-гликольнейраминовую кислоту (Neu5Gc) или (ii)  $\alpha$ -1,3-галактозу, предпочтительно содержащую по меньшей мере обе антигенные детерминанты (i) N-гликольнейраминовую кислоту (Neu5Gc) и (ii)  $\alpha$ -1,3-галактозу.

#### Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Иммунизация свинок с двойным нокаутом (Double KO) (ELISA IgG свинки). Одной свинке с двойным нокаутом вводили 5 раз по 700 мкг GP EBOLA. Образцы сыворотки, полученные от иммунизированной свинки с двойным нокаутом перед иммунизацией (день 0), в течение иммунизации (день 15, день 30, день 57) или после иммунизации (день 83), анализировали в отношении антител специфичных к GP посредством ELISA. Столбцы представляют среднее значение ОП в каждой временной точке для каждого разведения. Для каждого дня (0, 15, 30, 57 и 83), слева направо (столбики, пронумерованные от 1 до 4): разведения сыворотки 1/500; 1/4500; 1/40500; 1/121500, соответственно. Средняя оптическая плотность (ОП) представлена по оси y.

Фиг. 2. Вариации массы морских свинок в течение эксперимента. Каждое число представляет одну группу морских свинок. Стандартное отклонение представлено для каждой группы, для каждой временной точки: "1" представляет собой Mock-PBS. "2" представляет собой вирус Эбола положительную иммунную группу IgG D0. "3" представляет собой вирус Эбола положительные иммунные IgG D0+D3. "4" представляет собой вирус Эбола положительные неиммунные IgG D0. Масса (g) представлена по оси y. Дни представлены по оси x.

Фиг. 3. Вирусная нагрузка в сыворотке на день 3. Вирусную нагрузку в сыворотке на день 3 оценивали по каждому животному посредством анализа полимеразной цепной реакцией в реальном времени (RTqPCR анализа) при помощи праймеров, нацеленных на L-полимеразу вируса Эбола. Вирусная нагрузка морских свинок, получивших иммунный IgG к вирусу Эбола от двойного нокаута (n=9) при сравнении с морскими свинками, получившими неиммунный IgG (n=5) существенно ниже (Манн-Уитни, p=0,012). Слева направо: вирус Эбола отрицательные иммунные IgG D0, EBOLA вирус Эбола положительные иммунные IgG D0. Вирусную нагрузку (ось y) выражали в виде геном Эбола/мл. Одна морская свинка, получившая иммунный IgG была исключена из анализа как отклонение (значение вирусной нагрузки для данного животного составило 3,5E7 геном/мл). Ни одно животное из контрольной группы Mock PBS не показало какую-либо вирусную нагрузку в сыворотке.

Фиг. 4. кривые выживания Каплана-Мэйера. Кривые выживания Каплана-Мэйера показывают процент выживания морских свинок на каждый день из 12 дней после периода воздействия вирусом Эбола. Выживание морских свинок, получивших иммунные IgG к Эбола из группы свинок двойного нокаута

(n=10) при сравнении с морскими свинками, получившими неиммунный IgG (n=5) было существенно выше (логранговый критерий,  $p=0,0424^*$ ). Ось у представляет процент выживаемости (%). Дни приведены по оси х. Каждая кривая обозначена соответствующим числом: Моск-PBS обозначена "1"; "вирус Эбола положительные иммунные IgG D0+D3" обозначено "2"; "вирус Эбола положительные иммунные IgG D0" обозначено "3"; "вирус Эбола положительные неиммунные IgG D0" обозначено "4".

### Подробное описание изобретения

#### 1. Определения.

Для того, чтобы изобретение было полностью понятно, некоторые определения даны ниже. Данные определения охватывают грамматические эквиваленты.

Как употреблено в данном документе, термин "содержащий" охватывает "состоящий из".

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

Термин "антитело" охватывает полипептид, как вышеуказанный, который дополнительно содержит по меньшей мере одну сахарную группу отличную от антигенной детерминанты, выбранной из группы, содержащей (i) N-гликолевойраминную кислоту (Neu5Gc) и/или (ii)  $\alpha$ -1,3-галактозу.

"Поликлональные антитела", как употреблено в данном документе, означают смесь антител, распознающих различные эпитопы данного антигена. Поликлональные антитела охватывают таковые, которые содержатся в или альтернативно которые получены из биологических жидкостей, в частности сыворотки или плазмы из организма млекопитающего, не являющегося человеком.

В пределах обычного смысла настоящего изобретения антитело по изобретению направлено по меньшей мере на один нечеловеческий биологический патоген, или на по меньшей мере одну молекулу, полученную из указанного патогена, для организма человека или животного, не являющегося человеком.

Как употреблено в данном документе, "натуральное" или "эндогенное" антитело относится к антителу, которое не получают из рекомбинантной ДНК.

В случае человеческих иммуноглобулинов легкие цепи подразделяют на каппа и лямбда легкие цепи. Тяжелые цепи подразделяют на мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон, и определяют изотип антитела в виде IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно.

Как употреблено в данном документе "IgG" означает полипептид, относящийся к классу антител, которые в основном кодируются геном иммуноглобулина гамма. У людей IgG содержит подклассы или изотипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. У мышей IgG содержит IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. IgG свиньи имеет 6 различных изотипов. У свиней IgG содержит подклассы или изотипы IgM, IgD, IgG, IgE и IgA антител и большое число подклассов IgG (Butler et al., *Developmental and Comparative Immunology* 30 (2006) 199-221; Butler et al., *Developmental and Comparative Immunology* 33 (2009) 321-333). Полноразмерный IgG состоит из двух идентичных пар двух цепей иммуноглобулинов, каждая из которых имеет одну легкую и одну тяжелую цепь, каждая легкая цепь содержит VL и CL домены иммуноглобулинов и каждая тяжелая цепь содержит домены VH, C $\gamma$ 1 иммуноглобулина (также называемые CH1), C $\gamma$ 2 (также называемые CH2) и C $\gamma$ 3 (также называемые CH3).

Как употреблено в данном документе "комплементзависимая цитотоксичность" (или CDC) относится к результату связывания молекул комплемента или различным путям активации комплемента в отношении комплементсвязывающих классов и изотипов Ig.

Как употреблено в данном документе "антителозависимая клеточноопосредованная токсичность" (или ADCC) относится к механизму клеточно опосредованного иммунитета, вследствие которого эффекторная клетка иммунной системы активно лизирует мишенную клетку, которая связана специфичными антителами. ADCC в основном опосредована NK-клетками, но также другими иммунными клетками, такими как нейтрофилы и эозинофилы. Обычно ADCC развивается в результате активации NK-клеток. Активация NK-клеток включает связывание их Fc-рецепторов с Fc-участком IgG, связанного с антигенами, присутствующими на поверхности мишенных клеток. Такие взаимодействия индуцируют высвобождение NK-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.

ADCC и CDC активности могут быть оценены посредством способов, хорошо известных специалистам в области техники.

"Антигенная детерминанта" (или эпитоп), употребляемая в данном документе к поликлональным антителам млекопитающего, не являющегося человеком, как употреблено в данном документе, означает структурный компонент антигенной молекулы, который включает антигенный белок и антигенный углеводород, ответственный за специфичное взаимодействие с молекулами антитела, выявленное таким же или родственным антигеном. В более широком смысле термин "антигенная детерминанта" при примене-

нии к поликлональным антителам млекопитающего, не являющегося человеком, также применяют обобщенно в данном документе для антигенной молекулы, содержащей множество эпитопов, включая конформационные группы, в которых сахарная группа необходима, но присутствует только часть эпитопа, чувствительная к распознаванию молекулами антитела, выявляемого таким же или родственным антигеном. Для примера, антигенная молекула N-гликольнейраминовой кислоты (Neu5Gc) может быть названа в данном документе "антигенная детерминанта", хотя указанная антигенная молекула может иметь более одного эпитопа, распознаваемого антителами, выявляемыми при помощи молекул, содержащих Neu5Gc или Neu5Gc.

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

"В-клетки" или "В-лимфоциты" также относятся к группе белых кровяных клеток, известных как лимфоциты, делая их жизненно важной частью иммунной системы - а именно гуморальной ветвью иммунитета адаптивной иммунной системы. В-клетки можно отличить от других лимфоцитов, таких как Т-клетки и клетки-натуральные киллеры (NK-клетки), за счет присутствия белка на внешней поверхности В-клеток, известного как В-клеточный рецептор (BCR). Этот специализированный рецепторный белок позволяет В-клеткам связываться со специфичным антигеном. Основные функции В-клеток продуцировать антитела к антигенам, для осуществления роли антиген-презентирующих клеток (АПК) и развитие в В-клетки памяти и плазмочиты после активации посредством антигенного взаимодействия.

В крови "сыворотка" представляет собой компонент, полученный из плазмы, где клетки (белые кровяные клетки, а также красные кровяные клетки) и факторы свертывания крови удалены. Сыворотка включает все белки, не принимающие участие в свертывании крови (коагуляции) и все электролиты, антитела, антигены, гормоны и любые по существу также экзогенные вещества (например, лекарственные средства и микроорганизмы).

Как употреблено в данном документе "обычные поликлональные антитела" означает поликлональные антитела, которые не лишены антигенной детерминанты, выбранной из группы, содержащей (i) N-гликольнейраминовой кислоты (Neu5Gc) и (ii)  $\alpha$ -1,3-галактозы. В данном отношении, в частности могут быть приведены продукты, серийно производимые, под наименованием Тимоглобулин и Веноглобулин.

Термин "патоген" как употреблено в данном документе, охватывает все, что может вызывать заболевание. В данном документе термин применяют для обозначения инфекционного агента, который может быть выбран из группы, содержащей бактерии, паразиты, грибы, вирусы, токсины, яды и их комбинации, и которые вызывают заболевание или инфекцию у их хозяев. В широком смысле термин "патоген" также охватывает антигенные фракции, полученные из такого инфекционного агента (а именно любые молекулы, полученные из указанного патогена), которые включают в частности их антигенные белки или антигенные полисахариды.

Термин "хозяин", как употреблено в данном документе, охватывает организм человека или организм животного, не являющегося человеком. Это является причиной, почему нечеловеческий биологический патоген по настоящему изобретению означает патоген, оказывающий вредное воздействие для организма человека или животного, имеющего хорошее здоровье.

Кроме того, термин "нечеловеческий биологический патоген для организма человека или животного", как употреблено в данном документе, охватывает все патогены нечеловеческой природы, которые в природе не присутствуют или присутствуют, но в неинфекционном количестве в организме человека или животного с хорошим здоровьем.

Данный термин также охватывает сапрофитных организмов, которые могут быть патогенными в случае, когда организм человека или животного, не являющегося человеком, является иммуносупрессивным.

Предпочтительно, нечеловеческий биологический патоген для организма человека или животного является нечеловеческим биологическим экзогенным патогеном для организма человека или животного.

Термин "молекула, полученная из нечеловеческого биологического патогена для организма человека или животного", как употреблено в данном документе, во многом относится к любому антигену, к которому организм человека или животного может генерировать иммунный ответ. Данная "молекула" (или "антиген"), как употреблено в данном документе, во многом относится к молекуле, которая содержит по меньшей мере одну антигенную детерминанту, на которую может быть направлен иммунный ответ. Иммунный ответ может быть клеточноопосредованным или гуморальным или и тем и другим. Молекула, полученная из нечеловеческого биологического патогена может являться по своей природе белком, углеводородом, липидом или нуклеиновой кислотой или комбинацией этих молекул. Молекула, полученная из нечеловеческого биологического патогена также может включать молекулы, такие как полимеры и т.п.

Термин "нуклеиновая кислота", как употреблено в данном документе, охватывает рибонуклеиновую кислоту (РНК) и дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), которые включают нуклеиновые кисло-

ты, выбранные из группы, содержащей или состоящей из: одноцепочечного дезоксирибонуклеотида(ов) (оцДНК); двуцепочечного дезоксирибонуклеотида(ов) (дцДНК); одноцепочечного рибонуклеотида(ов) (оцРНК); двуцепочечного рибонуклеотида(ов) (дцРНК); одноцепочечного олигодезоксирибонуклеотида(ов) (оцОДНК); двуцепочечного олигодезоксирибонуклеотида(ов) (дцОДНК); одноцепочечного олигорибонуклеотида(ов) (ОЦОРНК); двуцепочечного олигорибонуклеотида(ов) (дцОРНК); дуплексов РНК-ДНК.

В неограничивающей манере указанные нуклеиновые кислоты могут быть в виде информационной РНК (иРНК), транспортной РНК, рибосомальной РНК, короткой интерферирующей РНК (миРНК), короткой шпилечной РНК (кшРНК), микро-РНК (мкРНК), рибозимов, кДНК, рекомбинантных полинуклеотидов, разветвленных полинуклеотидов, плазмид, векторов, изолированной ДНК любой последовательности, нуклеокислотных проб и праймеров.

## 2. Композиция по изобретению.

В целях преодоления недостатков обычных поликлональных антител к нежелательным патогенам или молекулам, полученным из указанных патогенов, авторы изобретения предложили поликлональные антитела и содержащие их композиции, имеющие пониженные иммуногенные свойства у человеческих индивидуумов и таким образом пониженную способность индуцировать тяжелые нежелательные побочные эффекты, в частности иммуногенный комплекс (IC).

Кроме того поликлональные антитела по настоящему изобретению особо интересны тем, что они имеют повышенную "комплементзависимую цитотоксичность" (или CDC) и "антителозависимую клеточноопосредованную токсичность" (или ADCC).

Данное изобретение в первую очередь относится к поликлональному антителу по меньшей мере к одному нечеловеческому биологическому патогену или по меньшей мере к одной молекуле, полученной из указанного патогена для организма человека или животного, не являющегося человеком, где указанное поликлональное антитело лишено первой антигенной детерминанты, выбранной из группы, содержащей (i) N-гликольнейраминовою кислоту (Neu5Gc) и (ii)  $\alpha$ -1,3-галактозу.

Согласно конкретному воплощению поликлональное антитело по настоящему изобретению может быть дополнительно лишено второй антигенной детерминанты, отличной от первой антигенной детерминанты и где указанная вторая антигенная детерминанта выбрана из группы, содержащей (i) N-гликольнейраминовою кислоту (Neu5Gc) и (ii)  $\alpha$ -1,3-галактозу.

Изобретение относится в частности к "нечеловеческим" поликлональным антителам, таким как таковые, продуцируемые генетически модифицированным млекопитающим, не являющимся человеком, как описано в данном документе.

В частности изобретение относится к поликлональным антителам млекопитающего, не являющегося человеком по меньшей мере к одному нечеловеческому биологическому патогену(ам) или по меньшей мере к одной молекуле(ам), полученным из указанного патогена(ам), в отношении организма человека или животного, не являющегося человеком, где указанное поликлональное антитело лишено:

первой антигенной детерминанты, выбранной из группы, состоящей из (i) N-гликольнейраминовой кислоты (Neu5Gc) и (ii)  $\alpha$ -1,3-галактозы; и

второй антигенной детерминанты, отличной от первой антигенной детерминанты и выбранной из группы, состоящей из (i) N-гликольнейраминовой кислоты (Neu5Gc) и (ii)  $\alpha$ -1,3-галактозы.

Также настоящее изобретение относится к композиции, содержащей по меньшей мере поликлональные антитела по настоящему изобретению.

Считается, что поликлональные антитела по изобретению или содержащая их композиция обладают пониженными иммуногенными свойствами у человека при сравнении с поликлональными антителами и содержащими их композициями, которые применяют в настоящее время в области техники.

В области техники известно, что Neu5Gc является иммуногенной у людей (Noguchi A. et al., J. Biochem. Tokyo (1995), 117(1): 59-62; Scobie L et al., J. Immunol., 2012). Кроме того, известно, что пациенты, развивающие тяжелый иммунный комплекс (IC) в результате введения антител, повышающих животные иммуноглобулины, антител в основном к эпитопу Neu5Gc (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 в области техники, что фермент  $\alpha$ -1,3-галактозилтрансфераза ( $\alpha$ 1,3GT or GGTA1) синтезирует эпипоты  $\alpha$ -1,3-галактозы ( $\alpha$ 1,3Gal) (Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R), которые являются основными ксеноантигенами, вызывающими сверхострое отторжение при ксенотрансплантации свинья-человек.

Следовательно, поликлональные антитела и механически содержащие их композиции, лишённые антигенных детерминант (i) N-гликольнейраминовой кислоты (Neu5Gc) и/или (ii)  $\alpha$ -1,3-галактозы, поскольку данные поликлональные антитела являются менее иммуногенными, чем обычные поликлональные антитела, обладают пониженной иммуногенностью. Затем считают, что такие поликлональные антитела по изобретению и содержащие их композиции обладают пониженными свойствами в увеличении различных вредных эффектов, которые возникают после введения продуктов обычных поликлональных

антител, которые включают заболевания, связанные с иммунными комплексами (ICD) и тяжелые нежелательные побочные эффекты, такие как сывороточная болезнь (SSD), включая тяжелые формы (например, с миокардитом, нефропатией) или другие иммунокомплексные проявления, такие как кожная сыпь, лихорадка, головная боль, артрит или псевдоменингеальный синдром и т.д.

Таким образом, считают, что поликлональные антитела по изобретению и содержащие их композиции снижают риск возникновения обычных побочных эффектов, вызываемых поликлональными антителами, а также их тяжести, если они все-таки возникают, как показано в данном документе.

Причем, считают, что поликлональные антитела по изобретению и содержащие их композиции проявляют повышенную "комплемент зависимую цитотоксичность" (или CDC) и "антителозависимую клеточноопосредованную токсичность" (или ADCC).

Согласно знаниям авторов изобретения в области техники неизвестны поликлональные антитела, лишенные антигенной детерминанты, выбранной из группы, содержащей (i) Neu5Gc и/или (ii)  $\alpha$ -1,3-галактозу для применения, раскрытого в настоящем описании.

В этом отношении поликлональные антитела по изобретению и содержащие их композиции являются особо выигрышными тем, что они точно позволяют преодолеть или понизить вышеуказанные нежелательные эффекты, вызываемые обычными поликлональными антителами, по этой причине они сохраняют свои иммуномодулирующие свойства и в тоже время являются менее токсичными на системном уровне организма человека или животного, предпочтительно организма человека.

Другими словами поликлональные антитела по изобретению и содержащие их композиции являются существенно менее иммуногенными и таким образом предполагается существенное снижение возникновения нежелательных побочных эффектов, в частности заболеваний, связанных с иммунными комплексами (IC), наблюдаемых при применении обычных поликлональных антител. Данный положительный эффект из-за более низкой иммуногенности поликлональных антител по изобретению особенно уместен в случае, когда поликлональные антитела вводят нормальным индивидуумам, а именно индивидуумам с достаточным иммунным ответом, как в случае профилактического медицинского показания, такого как профилактическое лечение (предупреждение) инфицированного пациента.

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

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

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

Поэтому согласно воплощению, где поликлональные антитела по настоящему изобретению лишены по меньшей мере антигенной детерминанты N-гликольнейраминовой кислоты (Neu5Gc), указанные поликлональные антитела обладают дополнительными преимуществами, поскольку они проявляют, за счет обеспечения более физиологического доступа к Fc гамма-рецептору, повышенное сродство к Fc $\gamma$ R.

Поэтому поликлональные антитела согласно данному воплощению проявляют повышенную "комплементзависимую цитотоксичность" (или CDC) и "антителозависимую клеточно опосредованную токсичность" (или ADCC) в отношении рассматриваемого нечеловеческого биологического патогена.

Кроме того, из-за отсутствия в поликлональных антителах по настоящему изобретению антигенной детерминанты, выбранной из группы, содержащей (i) N-гликольнейраминовую кислоту (Neu5Gc) и/или (ii)  $\alpha$ -1,3-галактозу, указанные поликлональные антитела при введении в организм человека не повышают иммунный ответ, включая продукцию антител к Neu5Gc или к GAL, антител, которые способствуют возникновению нежелательных эффектов, особенно возникновению заболеваний, связанных с иммунными комплексами (ICD) и тяжелых нежелательных побочных эффектов, таких как сывороточная болезнь (SSD), включая тяжелые формы (например, с миокардитом, нефропатией) или другие иммунокомплексные проявления, такие как кожная сыпь, лихорадка, головная боль, артрит или псевдоменингеальный синдромы т.д.

Способ, предназначенный для идентификации или характеристики поликлональных антител по настоящему изобретению находится в пределах общего знания специалистов в области техники.

Способ, который может быть применен специалистами в области техники для идентификации или характеристики поликлональных антител по изобретению включает твердофазный иммуносорбентный анализ (ELISA), где антитела к Neu5Gc и/или антитела к Gal применяют в качестве детектирующих молекул. Также могут быть указаны лектины, которые специфичны для Neu5Gc или 1-3 Gal (такие как, например, IB4 для 1,3 GAL). Данные лектины хорошо известны специалистам в области техники.

В качестве антител к Neu5Gc для оценки отсутствия антигенной детерминанты Neu5Gc может быть процитировано применение IgY цыпленка к Neu5Gc или лектины и Gc-Free Basic Kit, серийно производимые компанией Sialix, Inc.

В качестве антител к Gal для демонстрации отсутствия антигенной детерминанты  $\alpha$ -1,3-галактозы, может быть рассмотрен протокол, раскрытый в Jianq-Qiang Wang et al. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121:

8181) или таковой серийно производимый под наименованием WH0051083M1 Sigma компанией Sigma-Aldrich.

Согласно способу ELISA, где специфичные антитела к Neu5Gc и/или антитела к Gal или лектины иммобилизованы в лунках микропланшета, единственные антитела, которые содержат антигенную детерминанту, выбранную из группы, содержащей (i) N-гликольнейраминовую кислоту (Neu5Gc) и/или (ii)  $\alpha$ -1,3-галактозу формируют комплекс с указанными антителами к Neu5Gc и/или к Gal и таким образом остаются связанными с лунками. В случае такого применения способа ELISA поликлональные антитела по изобретению являются таковыми, лишенными одной или более антигенных детерминант, выбранных из группы, содержащей (i) N-гликольнейраминовую кислоту (Neu5Gc) и/или (ii)  $\alpha$ -1,3-галактозу и следовательно таковые, которые не формируют комплексы с (i) антителами к Neu5Gc, (ii) антителами к Gal или (iii) как с антителами к Neu5Gc, так и с антителами к Gal.

Альтернативно, поликлональные антитела по изобретению подлежащие исследованию могут быть первично связаны, после чего могут быть применены планшет и идентифицирующие реагенты. В качестве идентифицирующих реагентов могут быть процитированы лектины, специфичные к Neu5Gc или 1,3 Gal или антитела к Neu5Gc и/или антитела к Gal.

Настоящее изобретение также относится к способу продукции поликлональных антител или композиции по настоящему изобретению и таким, как определенным выше, содержащему стадии:

а) обеспечения генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком, лишённого первого гена, выбранного из группы, содержащей (i) ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат N-ацетилнейраминовой кислоты (СМАН) и (ii) ген, кодирующий функциональную  $\alpha$ -(1,3)-галактозилтрансферазу;

б) иммунизации указанного генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком, по меньшей мере к одному нечеловеческому биологическому патогену(ам) для организма человека или животного, не являющегося человеком, или по меньшей мере к одной молекуле(ам), полученной из указанного патогена(ов); и

с) сбора антител, содержащихся в биологической жидкости указанного генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком, стадии б).

Предпочтительно стадию б) проводят посредством применения по меньшей мере одной молекулы, полученной из по меньшей мере одного специфичного нечеловеческого биологического патогена для организма человека или животного, не являющегося человеком.

В некоторых воплощениях композиция по изобретению может быть получена посредством смешивания поликлональных антител, собранных на стадии с) способа, описанного выше, с одним или более адьювантами и/или одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, такими как физиологически приемлемый носитель, эксципиенты или стабилизаторы.

В некоторых воплощениях поликлональные антитела очищают перед применением в композиции по изобретению.

В некоторых воплощениях композиция поликлональных антител по изобретению имеет жидкую форму.

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

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

Композиция по изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере один адьювант, один фармацевтически приемлемый эксципиент или их смесь.

Как употреблено в данном документе термин "адьювант" относится в его обычном значении к любому веществу, которое усиливает иммунный ответ к антигену, с которым он смешан. Адьюванты, полезные в настоящем изобретении, включают но не ограничены, адьювант Фрейнда, минеральные гели, такие как гидроксид алюминия, и поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, плурониловые полиолы, полианионы, пептиды, масляные эмульсии, гемоцианин моллюска *Megathura crenulata* и динитрофенол, VCG (бацилла Кальмета-Герена) и *Corynebacterium parvum*.

Любой адьювант, известный в области техники, может быть применен в композиции по настоящему изобретению, включая адьюванты, основанные на масле, такие как полный адьювант Фрейнда и неполный адьювант Фрейнда, адьюванты на основе миколата (например, трегалоза демиколат), бактериальный липополисахарид (ЛПС), пептидогликаны (т.е. муреины, мукопептиды, или гликопротеины, такие как N-Ораса, мурамидипептид [MDP], или аналоги MDP), протеогликианы (например, экстрагированные из *Klebsiella pneumoniae*), стрептококковые препараты (например, ОК432), Biostim.TM. (например, 01 K2), "Iscoms" из EP 109 942, EP 180 564 и EP 231 039, гидроксид алюминия, сапонин, ДЭАЭ-декстран, нейтральные масла (такие как миглиол), растительные масла (такие как арахисовое масло), липосомы, плуроновый (рекомбинантный тромбомодулин), полиол, адьювантная система Ribi (см. например, GB-A-2 189 141), или интерлейкины, в частности таковые, которые стимулируют клеточно-

опосредованный иммунитет. Альтернативный адъювант, состоящий из экстрактов *Amucolata*, бактериальный род порядка *Actinomycetales*, описан в патенте США No. 4877612. Кроме того, патентованные адъювантные смеси коммерчески доступны. Применяемый адъювант зависит отчасти от организма-реципиента. Количество вводимого адъюванта зависит от типа и размера животного. Оптимальные дозы могут быть быстро определены посредством обычных способов.

Приемлемые адъюванты включают но не ограничены поверхностно-активные вещества, например, гексадециламин, октадециламин, лизолецитин, диметилдиокадециламмоний бромид, N,N-диокадецил-N'-N-бис(2-гидроксиэтил-пропан диамин), метоксигексадецил-глицерол и плурононовые полиолы; полианионы, например, пиран, декстран сульфат, поли IC, полиакриловую кислоту, карбопол; пептиды, например, мурамил дипептид, монофосфориллипид (MPL), диметилглицин, тафтсин, масляные эмульсии, алюм и их смеси. Другие потенциальные адъюванты включают субъединицы В-пептида *E. coli* термолabile токсина или холерного токсина. Mc Ghee, J. R. et al., "On vaccine development" *Sem. Hematol*, 30:3-15 (1993).

Адъювантные свойства сапонина давно известны, как обладающего способностью повышать титры антител к иммуногенам. Как употреблено в данном документе, термин "сапонин" относится к группе поверхностно-активных гликозидов растительного происхождения, состоящих из гидрофильного участка (обычно нескольких сахарных цепей) в ассоциации с гидрофобным участком или стероидной или три-терпеноидной структурой. Хотя сапонин доступен из ряда различных источников, сапонины с полезной адъювантной активностью получают из южноамериканского дерева *Quillaja saponaria* (Molina). Сапонин из данного источника применяют для выделения "гомогенной фракции", обозначаемой "Quil A" (Dalsgaard, K., (1974), *Arch. Gesamte Virusforsch.* 44:243).

В конкретных воплощениях композиции по изобретению указанная композиция может дополнительно содержать в качестве фармацевтических эксципиентов, один или более заряженный неорганический носитель. Примеры приемлемых заряженных неорганических носителей включают, но не ограничены, сапонин, комплексы сапонина, любой один или более компонент иммуностимулирующего комплекса сапонина, холестерол и липид, известный как ISCOMATRIX.TM. (например, сапониновый компонент и/или фосфолипидный компонент), липосомы или эмульсии масло в воде. (Композиция и препарат ISCOMATRIX.TM. описана подробно в PCT/SE86/00480, номера австралийских патентов 558258 и 632067 и EP 0 180 564, раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки).

Дополнительные адъюванты могут быть таковыми, которые описаны в книге Vogel et al. (Vogel F. R., Powell M. F. and Alving C. R., "A compendium of vaccine adjuvants and excipients"; 2<sup>nd</sup> Edition; Vogel F. R. and Powell MF, 1995, "A summary compendium of vaccine adjuvants and excipients. In: Powell MF, Newman MJ eds. "Vaccine design: the subunit and adjuvant approach". New York: Plenum publishing, 1995: 141-228).

Фармацевтически приемлемые эксципиенты, которые могут быть применены, в частности описаны в руководстве по фармацевтическим эксципиентам Американской Фармацевтической Ассоциации (Pharmaceutical Press; 6th revised edition, 2009).

С целью лечения пациента, нуждающегося в этом, как указано выше, может быть введена терапевтически эффективная доза поликлональных антител по изобретению или содержащей их композиции.

В данном документе "терапевтически эффективная доза" означает дозу, которая оказывает воздействие, для которого ее вводят. Точная доза зависит в частности от цели лечения, природы заболевания/инфекции, степени тяжести заболевания/инфекции и устанавливается специалистами в области техники при помощи известных способов.

Дозировки могут варьировать от 0,001 до 100 мг или более 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. Дозировка и частота введения могут быть адаптированы в зависимости от природы заболевания/инфекции, степени тяжести заболевания/инфекции, ответа хозяина, а также частоты введения вследствие лучшей толерантности. Дозировка и схема могут отличаться для применения с целью лечения и профилактики.

Также любое введение может сопровождаться какой-либо обычной процедурой для предупреждения и/или предотвращения анафилактической реакции.

Кроме того, введение поликлональных антител по изобретению или содержащей их композиции может быть выполнено посредством большого периферического доступа или если возможно посредством центрального катетера.

Как известно в области техники может быть необходима поправка в отношении деградации белка, системной против локальной доставки, а также возраста, массы тела, общего здоровья, пола, диеты, времени введения, возможной аллергии, лекарственного взаимодействия и тяжести состояния, и ее легко определить посредством обычного исследования специалистам в области техники.

Введение композиции по изобретению может быть выполнено различными путями, включая, но не ограничено, орально, подкожно, внутривенно, парентерально, интраназально, интраорбитально, интраокулярно, ректально, вагинально, чрескожно, местно (например, гели), интраперитонеально, внутримышечно, внутривлагалищно или интратекально.

Введение композиции по изобретению может быть выполнено согласно методу Безредки.

Композиция по изобретению может быть введена совместно с другими терапевтическими веществами, т.е. терапевтические вещества, описанные в данном документе, могут быть введены совместно с другими способами лечения или терапевтическими веществами, включая например, малые молекулы, другие биологические препараты, радиационную терапию, хирургию и т.д.

В наиболее предпочтительном воплощении композиция по изобретению присутствует в форме, приемлемой для внутривенного введения.

Согласно конкретному воплощению композиция по изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере одно противовоспалительное средство, такое как глюкокортикоиды.

3. Способ получения поликлональных антител (и содержащей их композиции) по изобретению

Как указано выше, способ получения поликлональных антител или содержащей их композиции по настоящему изобретению, определенных выше, содержит стадии:

а) обеспечения генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком, лишеного первого гена, выбранного из группы, содержащей (i) ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты (СМАН) и (ii) ген, кодирующий функциональную  $\alpha$ -(1,3)-галактозилтрансферазу;

б) иммунизации указанного генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком, по меньшей мере к одному нечеловеческому биологическому патогену(-нам) для организма человека или животного, не являющегося человеком, или по меньшей мере к одной молекуле(ам), полученной из указанного патогена(ов); и

с) сбора антител, содержащихся в биологической жидкости указанного генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком стадии б).

Согласно конкретному воплощению генетически модифицированное млекопитающее, не являющееся человеком, может дополнительно быть лишено второго гена, отличного от первого гена, причем указанный второй ген, выбран из группы, содержащей (i) ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты (СМАН) и (ii) ген, кодирующий функциональную  $\alpha$ -(1,3)-галактозилтрансферазу.

Таким образом, изобретение в частности относится к способу получения поликлональных антител или содержащей их композиции по настоящему изобретению, определенным выше, содержащему стадии:

а) обеспечение генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком, лишеного

первого гена, выбранного из группы, состоящей из (i) гена, кодирующего функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты (СМАН) и (ii) гена, кодирующего функциональную  $\alpha$ -(1,3)-галактозилтрансферазу; и

второго гена, отличного от первого гена, причем указанный второй ген, выбран из группы, состоящей из (i) гена, кодирующего функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты (СМАН) и (ii) гена, кодирующего функциональную  $\alpha$ -(1,3)-галактозилтрансферазу;

б) иммунизация указанного генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком по меньшей мере к одному нечеловеческому биологическому патогену(ам) для организма человека или животного, не являющегося человеком, или по меньшей мере к одной молекуле(ам), полученным из указанного патогена(ов); и

с) сбор антител, содержащихся в биологической жидкости указанного генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком стадии б).

Предпочтительно способ по изобретению может дополнительно содержать стадию d) очистки указанных поликлональных антител или определенного класса или определенного изотипа указанных поликлональных антител, из указанной биологической жидкости.

Поликлональное антитело по изобретению, в случае получения от генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком, как описано в данном документе, также может быть рассмотрено в качестве "поликлонального антитела млекопитающего, не являющегося человеком".

Соответственно, поликлональное антитело по настоящему изобретению в случае получения от генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком, как описано в данном документе, может представлять собой натуральное/эндогенное нечеловеческое поликлональное антитело.

Альтернативно, поликлональное антитело (т.е. IgG), в случае получения от генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком (т.е. коровы), как описано в данном документе и дополнительно экспрессирующее экзогенные иммуноглобулиновые гены (т.е. иммуноглобулиновые гены человека), может представлять собой ненатуральные нечеловеческие поликлональные антитела.

3.1. Стадия а) обеспечения генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком

Для получения поликлональных антител по изобретению, выполняют первую стадию а) состоящую из обеспечения генетически модифицированного трансгенного млекопитающего, не являющегося чело-

веком, лишённого гена, выбранного из группы, содержащей (i) ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминановой кислоты (СМАН) и/или (ii) ген, кодирующий функциональную  $\alpha$ -(1,3)-галактозилтрансферазу.

Предпочтительно указанное генетически модифицированное млекопитающее, не являющееся человеком, представляет собой трансгенное млекопитающее, не являющееся человеком, нокаутное по СМАН и/или GGTA1 (или СМАН и/или GGTA1 КО млекопитающее, не являющееся человеком), которое включает трансгенное млекопитающее, не являющееся человеком, с двойным нокаутом по СМАН и GGTA1.

Как употреблено в данном документе "нокаутное (КО) трансгенное млекопитающее, не являющееся человеком" представляет собой трансгенное млекопитающее, не являющееся человеком, в котором функция одной или более аллелей рассматриваемого гена изменена, например, посредством гомологичной рекомбинации или другой инсерции или делеции.

В конкретных воплощениях данный ген нарушен. "Нарушенный ген" означает, что часть генетического кода изменена, в результате чего оказывается влияние на транскрипцию и/или трансляцию данного сегмента генетического кода, например, делая данный сегмент кода нечитаемым посредством способов нокаута или посредством инсерции дополнительного гена для желаемого белка или инсерции регуляторной последовательности, которая модулирует транскрипцию существующей последовательности.

В некоторых воплощениях изобретения все клетки трансгенного млекопитающего, не являющегося человеком, содержат нарушенный ген.

В некоторых воплощениях нокаутное трансгенное млекопитающее, не являющееся человеком, представляет собой трансгенное млекопитающее, не являющееся человеком, в котором одна или более аллели рассматриваемого гена нефункциональны.

В некоторых воплощениях обе аллели рассматриваемого гена нефункциональны. Такие воплощения включают таковые обычно рассматриваемые модификации, как "нокауты гена", "нокины гена" 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 для продукции композиции по настоящему изобретению.

Способ получения генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком, лишённого гена, выбранного из группы, содержащей (i) ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминановой кислоты и/или (ii) ген, кодирующий функциональную  $\alpha$ -(1,3)-галактозилтрансферазу, находится в пределах обычного знания специалистов в области техники.

Генетически модифицированное млекопитающее, не являющееся человеком, лишённое гена, кодирующего функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминановой кислоты, называют СМАН КО млекопитающее, не являющееся человеком.

Генетически модифицированное млекопитающее, не являющееся человеком, лишённое гена, кодирующего функциональную  $\alpha$ -(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 в частности раскрывает способ получения животных продуктов, лишённых N-гликонейраминановой кислоты (Neu5Gc) для применения на людях, включающий стадии: получения генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком, лишённого гена функциональной гидролазы цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминановой кислоты (СМАН); и экстракции по меньшей мере одного животного продукта из генетически модифицированного животного, не являющегося человеком.

Способ получения GAL нокаутного трансгенного млекопитающего, не являющегося человеком, лежит в пределах обычного знания специалистов 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 млекопитающего, не являющегося человеком, в частности описан в US 7,547,816.

Согласно конкретному воплощению способ получения поликлональных антител по настоящему изобретению и содержащей их композиции, а именно указанных поликлональных антител к нечеловеческому биологическому патогену, или по меньшей мере к одной молекуле, полученной из указанного патогена, для организма человека или животного, не являющегося человеком, где указанные поликлональные антитела лишены антигенной детерминанты, выбранной из группы содержащей (i) N-гликолейраминановую кислоту (Neu5Gc) и (ii)  $\alpha$ -1,3-галактозу, включает обеспечение генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком, лишённого гена, выбранного из группы, содержащей (i) ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминановой кислоты (СМАН) и (ii) ген, кодирующий функциональную  $\alpha$ -(1,3)-галактозилтрансферазу.

Другими словами, указанное определенное генетически модифицированное млекопитающее, не являющееся человеком, является трансгенным млекопитающим, не являющимся человеком, с двойным

нокаутом по СМАН и GAL (KO).

Протокол получения данного специфического трансгенного млекопитающего, не являющегося человеком, с двойным нокаутом по СМАН и GAL, описан в Lutz AL et al. (Xenotransplantation, 2013; 20 (1): 27-35) или в Conchon S. et al. (ксенотрансплантация; специальный выпуск Международной Ассоциации Ксенотрансплантации IXA 2013, 2013, Vol. 20, Issue 5).

В качестве генетически модифицированного трансгенного млекопитающего, не являющегося человеком, которое может быть использовано в настоящем изобретении, в частности могут быть указаны Ovidae, Bovidae, Suidae, Leporidae и Equidae.

Предпочтительно генетически модифицированное трансгенное млекопитающее, не являющееся человеком, может представлять собой мышь, крысу, морскую свинку, кролика, козу, овцу, ламу, свинью, предпочтительно свинью.

Более того, свиньи предпочтительны для получения поликлональных антител по настоящему изобретению, поскольку они особо интересны с промышленной точки зрения.

Более того, свиньи имеют несколько преимуществ, в частности по сравнению с кроликами, а именно тем, что объем иммунной сыворотки и таким образом интересующих поликлональных антител, которые могут быть собраны пропорционально массовому отношению животного (в 30 раз лучше).

При этом свиней не нужно подвергать эвтаназии во время сбора сыворотки и таким образом, легальные процедуры по сбору сыворотки существенно облегчены.

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

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

3.2. Стадия b) иммунизации генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком, к нечеловеческому биологическому патогену для организма человека или животного, не являющегося человеком

Как только получают генетически модифицированное трансгенное млекопитающее, не являющееся человеком, лишенное гена, выбранного из группы, содержащей (i) ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты (СМАН) и/или (ii) ген, кодирующий функциональную  $\alpha$ -(1,3)-галактозилтрансферазу, затем вводят раствор, содержащий в частности по меньшей мере один нечеловеческий биологический патоген (патогены) или по меньшей мере одну молекулу (молекулы), полученную из указанного патогена(ов), защиту организма человека или животного, не являющегося человеком, к которым изучают.

Предпочтительно нечеловеческий биологический патоген (патогены) стадии b) может быть выбран из бактерий, паразитов, грибов, вируса, токсинов, ядов и их комбинаций, или по меньшей мере одной молекулы(-л), полученной из указанного патогена(ов), и в частности из таковых, вызывающих по меньшей мере одну из специфических тяжелых инфекций, описанных в данном документе.

Например, способ получения раствора, содержащего в частности нечеловеческий биологический патоген, или по меньшей мере одну молекулу (молекулы), полученную из указанного патогена, в отношении специфического связанного заболевания/инфекции лежит в пределах обычного знания специалистов в области техники.

Предпочтительно патогенность рассматриваемого нечеловеческого биологического патогена ослаблена.

Например, в воплощении, где нечеловеческий биологический патоген представляет собой вирус, предпочтительно вышеописанному генетически модифицированному трансгенному млекопитающему, не являющемуся человеком, вводят ослабленный (или убитый) вирус или только экстракт данного вируса.

Способ получения ослабленного патогена, в частности ослабленного вируса, лежит в пределах обычного знания специалистов в области техники.

Другими словами способы получения молекулы, полученной из конкретного нечеловеческого биологического патогена в отношении организма человека или животного, не являющегося человеком, лежат в пределах обычного знания специалистов в области техники.

В этом отношении, можно указать на применение супернатантов вирусных культур, рекомбинантных вирусов, лизатов клеток, трансфецированных или трансдуцированных вирусом или его компонентами. Кроме того, в случае токсина, он может быть инактивирован химически или при помощи нагревания (данный обезвреженный токсин часто называют "токсоид").

Протокол получения хорошего уровня иммунизации трансгенного млекопитающего, не являющегося человеком, в отношении Т-клеток, но также применимый посредством аналогии в отношении специфического нечеловеческого биологического патогена для организма человека или животного, не являющегося человеком, или молекулы, полученной из указанного патогена, в частности описан в EP 0335804.

Такой протокол в частности может заключаться в иммунизации животных, таких как кролики, лошади или свиньи, предпочтительно свиньи, при повторном введении, согласно известным способам, по меньшей мере одного специфического нечеловеческого биологического патогена(ов), предпочтительно единственного специфического нечеловеческого биологического патогена, или по меньшей мере одной молекуле(ам), полученной из указанного патогена(ов), в отношении организма человека или животного, не являющегося человеком, и предпочтительно в отношении организма человека.

Например, некоторые введения выполняют внутривенно или подкожно. Предпочтительно первое введение является подкожным с или без адьюванта, и другое введение является внутривенным,  $10^6$ - $10^9$  клеток каждый раз, введения проводят по меньшей мере раз в неделю. Спустя около двух недель после иммунизации сыворотку собирают от иммунизированных животных и изолируют согласно известным способам.

Генетически модифицированное трансгенное млекопитающее, не являющееся человеком, продуцирует антитела к специфическому нечеловеческому биологическому патогену, или молекуле(ам), полученным из указанного патогена, указанные специфические антитела лишены антигенной детерминанты Neu5Gc и/или  $\alpha$ -1,3-Gal согласно природе рассматриваемого генетически модифицированного трансгенного млекопитающего, не являющегося человеком.

3.3. Стадия с) сбора антител, содержащихся в биологической жидкости генетически модифицированного трансгенного млекопитающего, не являющегося человеком стадии b).

Затем часть крови указанного генетически модифицированного трансгенного млекопитающего, не являющегося человеком, удаляют, интересующие антитела собирают.

Согласно конкретному воплощению указанная биологическая жидкость может быть выбрана из группы, содержащей плазму крови и сыворотку крови.

Протокол получения крови и в частности плазмы крови или сыворотки крови, лежит в пределах обычного знания специалистов в области техники.

3.4. Дополнительная стадия d) очистки антител от биологической жидкости стадии с).

Согласно предпочтительному воплощению и как указано выше, способ по изобретению может дополнительно содержать стадию d) очистки антител от указанной биологической жидкости.

Указанная стадия d) очистки является преимущественной, так как в частности позволяет преодолеть возможные нежелательные побочные эффекты, ассоциированные с присутствием внутри биологической жидкости различных клеточных примесей, которые могут вызывать, у иммунизированного млекопитающего, не являющегося человеком, образование соответствующих контаминирующих антител.

Указанная стадия d) очистки также является преимущественной, так как позволяет получать композицию, обладающую желаемой степенью чистоты.

Указанная стадия d) очистки лежит в пределах обычного знания специалистов в области техники. Вся возможная адаптация любого обычного протокола очистки также лежит в пределах обычного знания специалистов в области техники.

В качестве соответствующего способа получения поликлональных антител по настоящему изобретению может быть в частности указан способ фракционированного осаждения при помощи этанола, при помощи сульфата аммония, при помощи риванола, при помощи полиэтиленгликоля или каприловой кислоты, способ пропускания через ионообменные колонки; другие способы могут включать колонки для аффинной хроматографии на основе белка А или G. Полученные антитела, затем могут быть подвергнуты обычным обработкам для их внутривенного введения, например, ферментативному расщеплению плазмином, папаином или пепсином.

В этом отношении в частности может быть указан протокол, реализуемый в примере 3 EP 0335804, который предусматривает ионообменную хроматографию на целлюлозе DEAE.

Согласно другим воплощениям поликлональные антитела по настоящему изобретению, а также композиция по настоящему изобретению, могут состоять из поликлональных антител и композиции, где антитела, полученные на стадии с) способа, описанного выше, отделяют от других клеточных компонентов, нежели антитела, включая в частности нейтрофилы, моноциты, красные кровяные клетки и тромбоциты.

Согласно этим другим воплощениям поликлональные антитела по изобретению а также композиция по изобретению могут состоять из очищенных поликлональных антител, которые изначально присутствуют в сыворотке, указанных очищенных поликлональных антител практически свободных от белковых компонентов сыворотки или даже поликлональных антител, которые по существу свободны от любого вещества, которое изначально содержится в сыворотке, используемой в качестве исходного продукта.

В качестве соответствующего способа очистки данных интересующих поликлональных антител могут быть указаны способы очистки антител при помощи аффинной подложки, на которой присоединен антиген, на белке G или на белке A, например, таковые производимые серийно компаниями ProteoGenix, Cell Biolabs, Inc. or CliniSciences or still disclosed in EP 1601697, JP 7155194 or US 6,870,034.

Также может быть указана иммунноаффинная очистка поликлональных антител, специфических для по меньшей мере одного конкретного патогена или для по меньшей мере одного его компонента.

Очистка также может относиться к конкретному изотипу поликлональных антител по настоящему изобретению.

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

Альтернативно применению поликлональных антител, полученных из генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком, как описано выше, настоящее изобретение также

охватывает поликлональные антитела, полученные после иммунизации дикого млекопитающего, не являющегося человеком, по меньшей мере к одному нечеловеческому биологическому патогену(ам) или по меньшей мере одной молекуле(ам) или по меньшей мере одной молекуле(ам), полученным из указанного патогена(ов).

Термин "дикое млекопитающее, не являющееся человеком" употреблен в данном документе в противовес генетически модифицированному млекопитающему, не являющемуся человеком. Другими словами "дикое млекопитающее, не являющееся человеком" означает млекопитающее, не являющееся человеком, которое не лишено по меньшей мере ни одного гена, выбранного из группы, содержащей (i) ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты (СМАН) и/или (ii) ген, кодирующий функциональную  $\alpha$ -(1,3)-галактозилтрансферазу.

В данном отношении и в соответствии с целью настоящего изобретения поликлональные антитела, полученные из такого дикого млекопитающего, не являющегося человеком, должны быть затем десалированы посредством соответствующей биохимической (в частности ферментативной) обработки (обработок).

Другими словами поликлональные антитела по настоящему изобретению могут быть получены (1) из генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком, такого как описанное выше, или (2) в результате биохимической (в частности ферментативной) обработки (обработок) поликлональных антител, полученных из дикого млекопитающего, не являющегося человеком, которое иммунизируют по меньшей мере к одному нечеловеческому биологическому патогену(ам) в отношении организма человека или животного, не являющегося человеком, или по меньшей мере к одной молекуле(ам), полученной из указанного патогена(ов).

#### 4. Медицинские применения по изобретению.

Как указано выше, настоящее изобретение согласно одному из его аспектов относится к применению генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком, лишеного первого гена, выбранного из группы, содержащей (i) ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты (СМАН) и (ii) ген, кодирующий функциональную  $\alpha$ -(1,3)-галактозилтрансферазу, для продукции композиции, содержащей поликлональные антитела по меньшей мере к одному нечеловеческому биологическому патогену или по меньшей мере к одной молекуле, полученной из указанного патогена, для организма человека или животного, не являющегося человеком, предпочтительно для организма человека.

Согласно конкретному воплощению данное генетически модифицированное млекопитающее, не являющееся человеком, дополнительно может быть лишено второго гена отличного от первого гена, причем указанный второй ген, выбран из группы, содержащей (i) ген, кодирующий функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты (СМАН) и (ii) ген, кодирующий функциональную  $\alpha$ -(1,3)-галактозилтрансферазу.

В частности, изобретение относится к применению генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком, лишеного:

первого гена, выбранного из группы, состоящей из (i) гена, кодирующего функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты (СМАН) и (ii) гена, кодирующего функциональную  $\alpha$ -(1,3)-галактозилтрансферазу; и

второго гена, отличного от первого гена, причем указанный второй ген выбран из группы, состоящей из (i) гена, кодирующего функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты (СМАН) и (ii) гена, кодирующего функциональную  $\alpha$ -(1,3)-галактозилтрансферазу;

для продукции поликлональных антител или содержащих их композиций по изобретению, как определено выше.

В частности отсутствие антител к Neu5Gc в образце может быть оценено согласно способу дозирования, описанному в Padler-Karavani V et al. (PLoS One. 2013; 8 (3): e58443).

Согласно другому конкретному воплощению композиция по настоящему изобретению может представлять собой сыворотку по меньшей мере к одному нечеловеческому биологическому патогену или по меньшей мере к одной молекуле, полученной из указанного патогена, для организма человека или животного, не являющегося человеком, предпочтительно организма человека.

Данное изобретение также относится к поликлональному антителу или содержащей его композиции, как описано в данном описании, с целью его применения в качестве лекарственного препарата.

Соответственно и принимая во внимание вышесказанное, следует понимать, что изобретение также относится к поликлональному антителу или содержащей его композиции по изобретению с целью их применения для получения лекарственного препарата.

Настоящее изобретение относится к поликлональному антителу или содержащей его композиции, как описано в настоящем описании, с целью их применения для профилактики и/или лечения тяжелой инфекции.

Ниже приведен список не всех тяжелых инфекций, в частности инфекции, вызванные ацинетобак-

терами, актиномикоз, африканскую сонную болезнь (африканский трипаносомоз), СПИД (синдром приобретенного иммунодефицита), амебиаз, анаплазмоз, сибирскую язву, инфекцию, вызванную бактериями *Arcanobacterium haemolyticum*, аргентинскую геморрагическую лихорадку, аскаридоз, аспергиллез, инфекцию, вызванную астровирусом, бабезиоз, инфекцию, вызванную *Bacillus cereus*, бактериальную пневмонию, бактериальный вагиноз (BV), инфекцию, вызванную бактероидами, балантидиоз, байлиссакаридоз, ВК-вирусную инфекцию, черную пьедру, инфекцию, вызванную *Blastocystis hominis*, бластомикоз, боливийскую геморрагическую лихорадку, инфекцию, вызванную *Borrelia*, ботулизм (и ботулизм новорожденных), бразильскую геморрагическую лихорадку, бруцеллез, бубонную чуму, инфекцию, вызванную *Burkholderia*, язву Бурули, инфекцию, вызванную калицивирусом (Norovirus и Sapovirus), кампилобактериоз, кандидозы (молочницу; стоматит), болезнь кошачьих царапин, целлюлит, болезнь Чагаса (американский трипаносомоз), шанкроид, ветрянку, чикунгунью, хламидиоз, инфекцию, вызванную *Chlamydomphila pneumoniae* (тайваньский острый респираторный агент или TWAR), холеру, хромобластомикоз, клонорхоз, инфекцию, вызванную *Clostridium difficile*, кокцидиоидомикоз, колорадскую клещевую лихорадку (CTF), простуду (острый вирусный ринофарингит; вирусную инфекцию верхних дыхательных путей), болезнь Кретцфельда-Якоба (CJD), Крымскую геморрагическую лихорадку (CSHF), криптококкоз, криптоспориоз, мигрирующую кожную личинку (CLM), циклоспориоз, цистицеркоз, цитомегаловирусную инфекцию, лихорадку Денге, дизентамебиаз, дифтерию, дифилоботриоз, дракункулез, геморрагическую лихорадку Эбола, эхинококкоз, эрлихиоз, энтеробиоз (оксиуроз), инфекцию, вызванную *Enterococcus*, энтеровирусную инфекцию (в частности энтеровирус 71 типа (EV71)), эпидемический сыпной тиф, инфекционную эритему (пятая болезнь), внезапную экзантему (шестая болезнь), фасциолопсидоз, фасциоз, фатальную семейную бессонницу (FFI), филяриоз, пищевое отравление, вызванное *Clostridium perfringens*, инфекцию, вызванную свободно-живущими амебами, инфекцию, вызванную веретенообразными бактериями, газовую гангрену (анаэробная гангрена), геотрихоз, синдром Герстманна - Штраусслера - Шейнкера (GSS), лямблиоз, сап, гнатостомоз, гонорею, паховую гранулему (донованоз), инфекцию, вызванную стрептококком группы А, инфекцию, вызванную стрептококком группы В, инфекцию, вызванную гемофильной палочкой, вирусную пузырчатку рта и конечностей (HFMD), хантавирусный легочный синдром (HPS), вирусную болезнь Хартленда, инфекцию, вызванную *Helicobacter pylori*, гемолитический уремический синдром (HUS), геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (HFRS), гепатит А, гепатит В, гепатит С, гепатит D, гепатит Е, простой герпес, гистоплазмоз, анкилостомоз, бокавирусную инфекцию человека, эрлихиоз человека, вызванный *Ehrlichia ewingii*, гранулоцитарный анаплазмоз человека (HGA), метапневмовирусную инфекцию человека, моноцитарный эрлихиоз человека, папилломовирусную инфекцию человека (HPV), инфекцию человека, вызванную вирусом парагриппа, гиленолепидоз, инфекционный мононуклеоз, вызванный вирусом Эпштейн-Барра (Моно), грипп, изоспороз, болезнь Кавасаки, кератит, инфекцию, вызванную *Kingella kingae*, куру, лихорадку Ласса, легионеллез (болезнь легионеров), легионеллез (понтякская лихорадка), лейшманиоз, лепру, лептоспироз, листериоз, болезнь Лайма (лаймоборрелиоз), лимфатический филяриоз (слоновая болезнь), лимфоцитарный хориоменингит, малярию, геморрагическую лихорадку Марбург (MHF), корь, ближневосточный респираторный синдром (MERS), мелиоидоз (болезнь Уитмора), менингит, менингококковую инфекцию, метагонимоз, микроспориоз, инфуцию, вызванную контактиозным моллюском (MC), оспу обезьян, эпидемический паротит, эндемический блошиный тиф (эндемический тиф), микоплазму пневмонии, мицетому, миаз, неонатальный конъюнктивит (офтальмия новорожденных), (новый) вариант болезни Крейтцфельда-Якоба (vCJD, nvCJD), нокардиоз, онхоцеркоз (речная слепота), паракокцидиоидоз (южно-американский бластомикоз), парагонимоз, пастереллез, головной педикулез (головные вши), нательный педикулез (нательные вши), лобковый педикулез (площица), воспаление органов таза (PID), коклюш (судорожный кашель), чуму, пневмококковую инфекцию, пневмоцистную пневмонию (PCP), пневмонию, полиомиелит, инфекцию, вызванную *Prevotella*, первичный амёбный менингоэнцефалит (PAM), прогрессирующую мультифокальную лейкоэнцефалопатию, орнитоз, лихорадку Q, бешенство, респираторную синцитиальную вирусную инфекцию, риноспориоз, риновирусную инфекцию, риккетсиозную инфекцию, везикулезный риккетсиоз, лихорадку Рифт-Валли (RVF), пятнистую лихорадку скалистых гор (RMSF), ротавирусную инфекцию, краснуху, сальмонеллез, ТОРС (тяжелый острый респираторный синдром), чесотку, шистосомоз, сепсис, шигеллез (бактериальная дизентерия), опоясывающий лишай (герпес зостер), натуральную оспу (вариола), споротрихоз, стафилококковое пищевое отравление, стафилококковую инфекцию, стронгилоидоз, подострый склерозирующий панэнцефалит, сифилис, тениоз, столбняк (тризм), дерматомироз бороды и усов (обыкновенный сикоз), стригущий лишай (дерматомироз волосистой части головы), дерматомироз гладкой кожи (дерматомироз гладкой кожи головы), паховый дерматомироз (паховая эпидермофития), грибковое поражение кожи кистей (дерматомироз кистей), черный лишай, дермофитию стопы (эпидермофития стопы), дерматофитный онихомироз (онихомироз), разноцветный лишай (отрубевидный лишай), токсокароз (глазной личиночный токсокароз (OLM)), токсокароз (висцеральный токсокароз (VLM)), трахому, токсоплазмоз, трихинеллез, трихомоноз, трихоцефалез (инфекция, вызванная власоглавом), туберкулез, туляремию, инфекцию, вызванную *Ureaplasma urealyticum*, кокцидиоидомикоз, венесуэльский лошадиный энцефалит, венесуэльская геморрагическая лихорадка, вирусную пневмонию, энцефалит Западного Нила, белую

педру, инфекцию, вызванную *Yersinia pseudotuberculosis*, йерсиниоз, желтую лихорадку, зигомикоз или по меньшей мере одну тяжелую инфекцию(-ии), вызванная по меньшей мере одним устойчивым к антибиотикам патогеном(ми).

Соответственно настоящее изобретение относится к поликлональному антителу или содержащей его композиции, как описано в настоящем описании, с целью их применения для профилактики и/или лечения геморрагической лихорадки Эбола.

Настоящее изобретение также относится к поликлональному антителу или содержащей его композиции как описано в настоящем описании, с целью их применения при серопротекции и/или серотерапии.

Термин "серопротекция", как употреблено в данном документе относится к инъекции иммунной сыворотки, полученной из иммунизированного животного, предпочтительно иммунизированного млекопитающего, не являющегося человеком, с целью профилактики по меньшей мере одного инфекционного заболевания (заболеваний) у человека или животного организма, не являющегося человеком, указанного инфекционного заболевания (заболеваний), вызванного по меньшей мере одним нечеловеческим биологическим патогеном.

Термин "серотерапия" как употреблено в данном документе относится к инъекции иммунной сыворотки, полученной из иммунизированного животного, предпочтительно иммунизированного млекопитающего, не являющегося человеком, с целью лечения по меньшей мере одного инфекционного заболевания (заболеваний) человека или организма животного, не являющегося человеком, указанного инфекционного заболевания (заболеваний), вызванного по меньшей мере одним нечеловеческим биологическим патогеном.

Соответственно, настоящее изобретение относится к поликлональному антителу или содержащей его композиции, как описано в настоящем описании, с целью его применения для профилактики и/или лечения тяжелой инфекции, вызванной патогеном, выбранным из группы, состоящей из токсинов, ядов и их комбинаций.

Указанные токсины и яды могут быть выбраны из группы, состоящей из: ботулинового токсина, тетанотоксина, шига-токсина, дифтерийного токсина, коклюшного токсина, нейротоксинов, миотоксинов, гемотоксинов, цитотоксинов, токсинов растительного происхождения, микотоксинов, таксола, цитохалазина В, грамицидина D, бромистого этидия, эметина, митомицина, этопозида, тенопозида, винкристина, винбластина, колхицина, доксорубина, даунорубина, дигидроксиантрациндина, митоксантрона, митрамицина, актиномицина D, 1-дигидротестостерона, глюкокортикоидов, прокаина, тетракаина, лидокаина, пропранола и пурамицина, ридина, СС-1065, токсинов, полученных из ядовитых животных и животных ядов; и их аналогов или гомологов.

Примеры животных ядов включают яд змеи, яд паука, яд пчелы, яд рыбы, яд медузы, яд скорпиона, яд улитки; включая яд гадюки, яд кобры, яд гремучей змеи, яд очковой кобры; и их аналоги или гомологи.

Настоящее изобретение относится к поликлональному антителу или содержащей его композиции, как описано в настоящем описании, с целью его применения для снижения и/или супрессии заболеваний, связанных с иммунными комплексами (ICD) и тяжелых побочных эффектов, таких как сывороточная болезнь (SSD), включая тяжелые формы (например, с миокардитом, нефропатией) или других иммунно-комплексных проявлений, таких как кожная сыпь, лихорадка, головная боль, артрит или псевдоменингитальный синдром, и вызываемых в результате введения антител, содержащих по меньшей мере одну антигенную детерминанту, выбранную из группы, содержащей (i) N-гликольнойраминовою кислоту (Neu5Gc) или (ii)  $\alpha$ -1,3-галактозу, предпочтительно содержащей по меньшей мере обе антигенные детерминанты (i) N-гликольнойраминовою кислоту (Neu5Gc) и (ii)  $\alpha$ -1,3-галактозу.

### Примеры

Во всех дальнейших примерах, все использованные свиньи были на немодифицированной диете.

Пример 1. Протокол получения поликлональных антител к вирусу геморрагической лихорадки Эбола из свиней с двойным GAL/СМАН КО.

Предварительно, использованная свинья с двойным GAL/СМАН КО раскрыта 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).

1) Протокол иммунизации свиней с двойным нокаутом по GAL/СМАН к вирусу геморрагической лихорадки Эбола.

Иммунизацию свиней с двойным нокаутом по GAL/СМАН КО, описанную 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), проводят посредством введения растворимых форм гликопротеинов вируса Эбола (GP), высвобожденных в культуральную среду из клеток, экспрессирующих данные белки (как раскрыто в Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses, Nature Medicine, 2005, Jones, SM et al., или Foreign glycoproteins expressed from recombinant vesicular stomatitis viruses are incorporated efficiently into virus particles, PNAS, 1996, Schnell MJ et al or A Marzi, PLoS ONE, 7:e36192).

Соответственно иммунизация может быть проведена посредством введения 700 мкг гликопротеи-

нов вируса Эбола.

В данном примере вирусный антигенный препарат наиболее предпочтительно не содержит Neu5Gc. Вирусный антигенный препарат (также называемый поликлональной гипериммунной сывороткой) удовлетворяет всем правовым рекомендациям, при уровне антигенного препарата животного с двойным нокаутом (СМАН и GT1), используемым для иммунизации и хорошей практикой реализации всех стадий, указанных в данном документе ниже:

а) выполнение первой подкожной инъекции раствора, содержащего вышеуказанные растворимые формы гликопротеинов вируса Эбола с гидроксидом алюминия в качестве адъюванта с последующими двумя или более внутривенными инъекциями (т.е. на день 14 и 21);

б) необязательно, введение внутривенно 10 доз BCG, или любого типа адъюванта, при  $10^7$ - $10^8$  возб/10 доз на день 5;

с) сбор сыворотки на день 35 или позже посредством кровопускания, сбор приблизительно 100 мл свиной сыворотки.

Исследования (Elisa при помощи GP Эбола для покрытия Elisa-планшетов и реакцию нейтрализации инфекционности вируса везикулярного стоматита, трансфецированного GP Эбола для клеток Vero) проводят на сыворотке с обнаруживаемыми титрами 1/10000 и 1/100 соответственно.

Соответственно иммунизацию можно проводить посредством выполнения первой подкожной инъекции раствора, содержащего вышеуказанные растворимые формы гликопротеинов вируса Эбола с гидроксидом алюминия в качестве адъюванта с последующими четырьмя внутривенными инъекциями на день 14 и 29, 44, и 78.

Соответственно сыворотка может быть собрана на день 40 после дозы, посредством кровопускания.

2) Протокол получения поликлональных антител (IgG) к введенному вирусу геморрагической лихорадки Эбола из свиней с двойным нокаутом по GAL/СМАН

В данном документе предложен протокол получения поликлональных антител А (т.е. IgG, IgM, и т.д.), содержащий следующие стадии:

а) проведение хроматографии на целлюлозе Whatman DEAE вышеуказанной свиной сыворотки и затем проведение стадии элюции при помощи динатрийфосфатного буфера 1,5 г/л, pH 8;

б) очистка полученного гамма-глобулинового раствора посредством двойного осаждения при помощи сульфата натрия при 180 г/л, затем 170 г/л, pH 7.

Повторное растворение осадка в растворе 0,3 М глицина, pH 7 для получения объема эквивалентного начальному объему.

Альтернативно, вышеуказанная стадия очистки может быть проведена при помощи белка А, с предшествующей фазой осаждения при помощи каприловой кислоты. За стадией очистки может следовать ионообменная колонка. Данный альтернативный способ очистки дает хороший выход поликлонального IgG 51% с чистотой 95%.

с) Гемадсорбция раствора дважды на эритроцитах (объем осадка для каждой гемадсорбции по существу эквивалентен объему неочищенной сыворотки) для снижения количества гемагглютининов. Снова осаждение раствора при помощи сульфата натрия для удаления гемоглобина. Растворение осадка в 0,3 М глицериновом буфере, диафильтрация против конечного раствора глицина 10 г/л, NaCl 2 г/л, маннитола 10 г/л. Добавление белков к 5 г/л и затем лиофилизация.

Измерение титров Elisa двойных нокаутных свиней к GP Эбола и нейтрализация антител к вирусу Эбола (как указано ранее) и предотвращение смерти морских свинок, инфицированных 1,000 LD<sub>50</sub> морских свинок, адаптированных рекомбинантным EBOV. Фиг. 1B.

Самки морских свинок (Хартли), приблизительно по 200 г (Charles River), разделяют на 4 группы. Следует отметить, продукт для инъекции предварительно протестировали на двух группах по 5 мышей, которым вводили IP: одна группа 200 мкг × 4 дня и вторая 2 мг × 4 дня, без видимой токсичности.

Каждая группа содержит пять морских свинок, как описано ниже.

Группы	Протокол
Mock-PBS (n=5)	Отсутствие инфекции вирусом Эбола Инъекция PBS на D0 в одну ногу Инъекция PBS на D3 в другую ногу
Вирус Эбола-неиммунные IgG D0 (n=5)	Инъекция вируса Эбола на D0 (1000 TCID50) Инъекция неиммунизированных свинок с двойным нокаутом на D0 в две ноги (65 мг всего)
Вирус Эбола-иммунные IgG D0 (n=5)	Инъекция вируса Эбола на D0 (1000 TCID50) IgG к вирусу Эбола иммунизированных свинок в двойным нокаутом. Инъекция GP на день D0 в одну ногу (68 мг)
Вирус Эбола-иммунные IgG D0 + D3 (n=5)	Инъекция вируса Эбола на D0 (1000 TCID50) IgG к вирусу Эбола иммунизированных свинок с двойным нокаутом. Инъекция GP на D0 в одну ногу (68 мг)
	IgG к вирусу Эбола иммунизированных свинок с двойным нокаутом. Инъекция GP на D3 в другую ногу (34 мг)

Клинические признаки инфекции и массу тела отслеживали в течение двух недель после испытания. Образец крови собирали на день 3 (1 мл при возможности) для измерения вирусной нагрузки и концентрации свиного IgG. За испытуемыми наблюдали в течение 15 дней после инфекции. В конце эксперимента или в день смерти животного (при возможности), анализировали образцы крови и органов (селезенка, печень и т.д.).

Комментарии.

Результаты свидетельствуют (см. фиг. 3) о том, что животные, относящиеся к группе вирус Эбола-иммунный IgG D0 (см. выше) проявляют статистически значимо более низкую репликацию вируса на день 3 (вирусную нагрузку), при сравнении с животными, относящимися к группе Mock или неиммунных IgG.

Результаты также свидетельствуют (см. фиг. 4) о том, что животные, относящиеся к вирус Эбола-иммунной группе выживают дольше, чем животные, относящиеся к группе вирус Эбола-неиммунный IgG D0.

Полученные поликлональные антитела к рассматриваемому нечеловеческому биологическому патогену (т.е. вирусу геморрагической лихорадки Эбола) из свиней с двойным нокаутом по GAL/СМАН особо интересны тем, что они значительно менее иммуногенны у людей и более цитотоксичны (в частности в терминах CDC) по сравнению с обычными поликлональными антителами к такому же рассматриваемому нечеловеческому биологическому патогену.

Данные поликлональные антитела, таким образом, делают возможным эффективное лечение или предупреждение заболевания/инфекции, вызванного вирусом геморрагической лихорадки Эбола и параллельно снижение нежелательных побочных эффектов, таких как заболевания, связанные с иммунными комплексами (IC) и/или сывороточная болезнь, которые могут развиваться у пациентов после инъекции обычных поликлональных антител. При этом отмечено, что поликлональные антитела проявляют очень значимую и интересную активность в отношении вируса геморрагической лихорадки Эбола из-за повышенной ADCC и CDC.

Все данные преимущества неизбежно улучшают хорошее самочувствие пациента, также в том случае, когда расстройство/инфекция, подлежащая лечению, уже дает тяжелые симптомы.

Пример 2. Измерение антител к Neu5Gc (или к IgGs Neu5Gc) у свиней с двойным нокаутом по GAL/СМАН.

Антитела к Neu5Gc в сыворотке иммунизированных свиней примера 1 (отобранные на день 35 протокола иммунизации) количественно определяли при помощи ELISA, адаптированного из Scobie et al., J. Immunol., 2013, модифицированного для улучшения специфичности. Кратко, планшеты покрывали сывороткой мышей дикого типа (содержащей Neu5Gc) в течение ночи при 4°C, затем блокировали при помощи PBS 1% овалбумина, 0,05% Tween в течение 2 часов при комнатной температуре. В течение данного времени образцы предварительно инкубировали в течение 2 часов на льду с сывороткой мыши, нокаутной по СМАН (не экспрессирующей Neu5Gc), и с или без 5 мМ синтетической Neu5Gc (для конкурентной адсорбции антител к Neu5Gc). Затем образцы добавляли в ELISA-планшет, выдерживали в течение 2 часов при комнатной температуре. Вторичное козьё антитело к IgG (Fc), меченное пероксидазой хрена (AbD Serotec, ссылка: AAI41P) применяли для детекции антител к Neu5Gc и планшеты визуализи-

ровали при помощи субстрата ТМБ (Sigma-Aldrich). Оптическую плотность считывали при помощи планшетного ридера MRX (Dynatech Laboratories). Результаты представляли в виде различий между оптической плотностью лунок, ингибированных или неингибированных посредством синтетического Neu5Gc.

Результаты.

Таким образом, свиньи с двойным нокаутом давали только минимальное количество антител к Neu5Gc, что свидетельствует об отсутствии необходимости иммунной сывороточной адсорбции.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Поликлональное антитело млекопитающего, не являющегося человеком, по меньшей мере к одному нечеловеческому биологическому патогену(ам) или по меньшей мере к одной молекуле(ам), полученной из указанного патогена(ов), для организма человека или животного, не являющегося человеком, где указанное поликлональное антитело лишено:

антигенной детерминанты N-гликольнойраминово́й кислоты (Neu5Gc) и

антигенной детерминанты  $\alpha$ -1,3-галактозы, где указанный нечеловеческий биологический патоген для организма человека или животного выбран из группы, состоящей из бактерий и вируса.

2. Композиция для профилактики и/или лечения тяжелой инфекции, содержащая, по меньшей мере, поликлональные антитела, как определено в п.1, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

3. Композиция по п.2, дополнительно содержащая по меньшей мере один адъювант.

4. Способ получения поликлональных антител, как определено в п.1, включающий стадии:

а) обеспечение генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком, лишеного

(i) гена, кодирующего функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминово́й кислоты (СМАН), и

(ii) гена, кодирующего функциональную  $\alpha$ -(1,3)-галактозилтрансферазу;

б) иммунизация указанного генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком, по меньшей мере к одному нечеловеческому биологическому патогену(ам) для организма человека или животного, не являющегося человеком, или по меньшей мере к одной молекуле(ам), полученной из указанного патогена(ов), где указанный нечеловеческий биологический патоген для организма человека или животного, не являющегося человеком, является бактериями или вирусом, и

с) сбор антител, содержащихся в биологической жидкости указанного генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком, со стадии б).

5. Способ по п.4, где биологическая жидкость выбрана из группы, состоящей из плазмы крови и сыворотки крови.

6. Способ по п.4 или 5, где указанное млекопитающее, не являющееся человеком, представляет собой мышь, крысу, морскую свинку, кролика, козу, овцу, ламу, свинью, и предпочтительно свинью.

7. Применение генетически модифицированного млекопитающего, не являющегося человеком, лишеного

(i) гена, кодирующего функциональную гидролазу цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминово́й кислоты (СМАН), и

(ii) гена, кодирующего функциональную  $\alpha$ -(1,3)-галактозилтрансферазу;

для получения поликлональных антител, как определено в п.1.

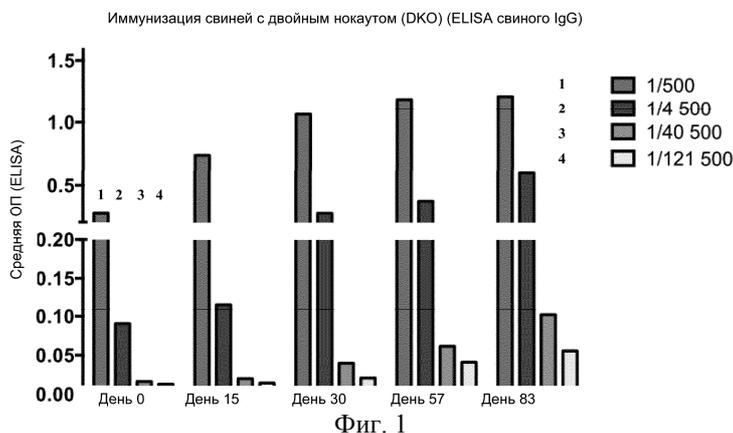
8. Применение поликлонального антитела, как определено в п.1, или композиции, как определено в п.2 или 3, для профилактики и/или лечения тяжелой инфекции.

9. Применение по п.8, где тяжелая инфекция представляет собой тяжелую бактериальную или тяжелую вирусную инфекцию.

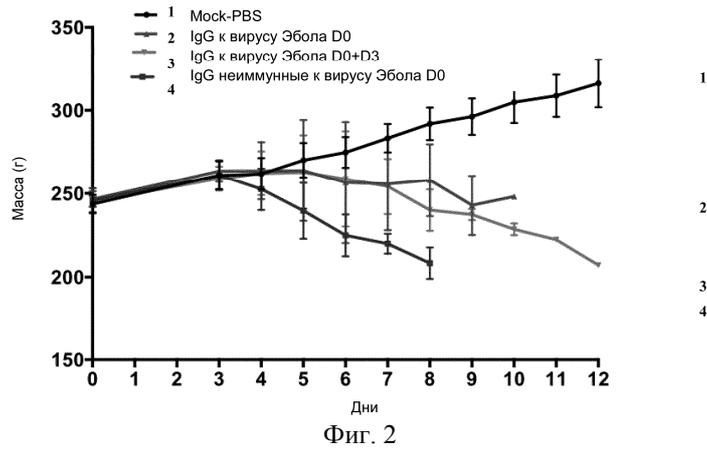
10. Применение по п.8, где тяжелая инфекция выбрана из группы, включающей инфекции, вызванные ацинетобактериями, СПИД (синдром приобретенного иммунодефицита), анаплазмоз, сибирскую язву, инфекцию, вызванную бактериями *Agarobacterium haemolyticum*, аргентинскую геморрагическую лихорадку, инфекцию, вызванную астровирусом, инфекцию, вызванную *Vacillus cecaeus*, бактериальную пневмонию, бактериальный вагиноз (BV), инфекцию, вызванную бактероидами, ВК-вирусную инфекцию, боливийскую геморрагическую лихорадку, инфекцию, вызванную *Borrelia*, ботулизм (и ботулизм новорожденных), бразильскую геморрагическую лихорадку, бруцеллез, бубонную чуму, инфекцию, вызванную *Burkholderia*, язву Бурули, инфекцию, вызванную калицивирусом (Norovirus и Sapovirus), кампилобактериоз, болезнь кошачьих царапин, целлюлит, шанкроид, ветрянку, чикунгунью, хламидиоз, инфекцию, вызванную *Chlamydia pneumoniae* (тайваньский острый респираторный агент или TWAR), холеру, инфекцию, вызванную *Clostridium difficile*, колорадскую клещевую лихорадку (CTF), простуду (острый вирусный ринофарингит; вирусную инфекцию верхних дыхательных путей), Крымскую геморрагическую лихорадку (СCHF), цитомегаловирусную инфекцию, лихорадку Денге, дифтерию, геморрагическую лихорадку Эбола, эрлихиоз, инфекцию, вызванную *Ehrlichia*, энтеровирусную инфекцию (в

частности энтеровирус 71 типа (EV71)), эпидемический сыпной тиф, инфекционную эритему (пятая болезнь), внезапную экзантему (шестая болезнь), пищевое отравление, вызванное *Clostridium perfringens*, инфекцию, вызванную веретенообразными бактериями, газовую гангрену (анаэробная гангрена), сепсис, гонорею, паховую гранулему (донованоз), инфекцию, вызванную стрептококком группы А, инфекцию, вызванную стрептококком группы В, инфекцию, вызванную гемофильной палочкой, вирусную пузырчатку рта и конечностей (HFMD), хантавирусный легочный синдром (HPS), вирусную болезнь Хартленда, инфекцию, вызванную *Helicobacter pylori*, гемолитический уремический синдром (HUS), геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (HFRS), гепатит А, гепатит В, гепатит С, гепатит D, гепатит Е, простой герпес, бокавирусную инфекцию человека, эрлихиоз человека, вызванный *Ehrlichia ewingii*, гранулоцитарный анаплазмоз человека (HGA), метапневмовирусную инфекцию человека, моноцитарный эрлихиоз человека, папилломовирусную инфекцию человека (HPV), инфекцию человека, вызванную вирусом парагриппа, инфекционный мононуклеоз, вызванный вирусом Эпштейн-Барра (Моно), грипп, болезнь Кавасаки, кератит, инфекцию, вызванную *Kingella kingae*, лихорадку Ласса, легионеллез (болезнь легионеров), легионеллез (понтакская лихорадка), лепру, лептоспироз, листериоз, болезнь Лайма (лаймборрелиоз), лимфоцитарный хориоменингит, геморрагическую лихорадку Марбург (MHF), корь, ближневосточный респираторный синдром (MERS), мелиоидоз (болезнь Уитмора), менингит, менингококковую инфекцию, оспу обезьян, эпидемический паротит, эндемический блошиный тиф (эндемический тиф), микоплазму пневмонии, мицетому, неонатальный конъюнктивит (офтальмия новорожденных), нокардиоз, пастереллез, воспаление органов таза (PID), коклюш (судорожный кашель), чуму, пневмококковую инфекцию, пневмонию, инфекцию, вызванную *Prevotella*, прогрессирующую мультифокальную лейкоэнцефалопатию, орнитоз, лихорадку Q, бешенство, респираторную синцитиальную вирусную инфекцию, риноспориоз, риновирусную инфекцию, риккетсиозную инфекцию, везикулезный риккетсиоз, лихорадку Рифт-Валли (RVF), пятнистую лихорадку скалистых гор (RMSF), ротавирусную инфекцию, краснуху, сальмонеллез, ТОРС (тяжелый острый респираторный синдром), сепсис, шигеллез (бактериальная дизентерия), опоясывающий лишай (герпес зостер), натуральную оспу (вариола), стафилококковое пищевое отравление, стафилококковую инфекцию, подострый склерозирующий панэнцефалит, сифилис, столбняк (тризм), трахому, туберкулез, туляремию, инфекцию, вызванную *Ureaplasma urealyticum*, венесуэльский лошадиный энцефалит, венесуэльскую геморрагическую лихорадку, вирусную пневмонию, энцефалит Западного Нила, инфекцию, вызванную *Yersinia pseudotuberculosis*, йерсениоз и желтую лихорадку или по меньшей мере одну тяжелую инфекцию (инфекции), вызванную по меньшей мере одним устойчивым к антибиотикам патогеном(ми).

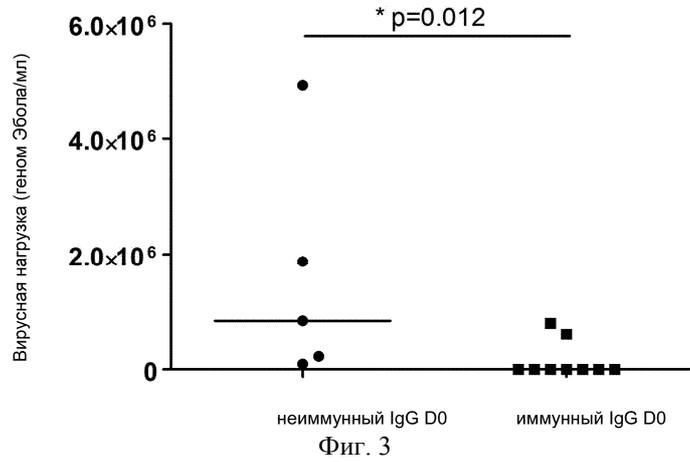
11. Применение по п.8 для профилактики и/или лечения геморрагической лихорадки Эбола или ТОРС.



Масса морских свинок



Вирусная нагрузка в сыворотке на день 3



Кривые выживания Каплан-Мейера

