

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040995**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.08.26

(21) Номер заявки
201892521

(22) Дата подачи заявки
2013.02.28

(51) Int. Cl. **C07K 16/06** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01)

(54) РЕМИЕЛИНИЗАЦИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ, СТИМУЛИРОВАННАЯ IGG

(31) **61/605,117**

(32) **2012.02.29**

(33) **US**

(43) **2019.07.31**

(62) **201400966; 2013.02.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)**

(72) Изобретатель:
**Кюри Патрик, Цекова Невена,
Хартунг Ханс-петер (DE), Херманн
Коринна, Райперт Биргит Мария,
Шварц Ханс-петер, Эрлих Хартмут,
Бунк Зебастьян (AT)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **CA-C-2330170**

EP-A1-2484381

FEASBY Tom et al. Guidelines on the Use of Intravenous Immune Globulin for Neurologic Conditions. Transfusion Medicine Reviews, 2007, vol. 21, no. 2, Suppl 1, pp. S57-S107, с. S69, кол. 2, абз. 2, с. S71, кол. 3, абз. 3

WILES C.M. et al. Intravenous immunoglobulin in neurological disease: a specialist review. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2002, 72, pp. 440-448, с. 441, кол. 1, абз. 1

RODRIGUES Maria Carolina O. et al. Peripheral Nerve Repair with Cultured Schwann Cells: Getting Closer to the Clinics. The Scientific World Journal, 2012, Volume 2012, с. 5, кол. 1, абз. 2, с. 5, кол. 2, абз. 2

(57) Настоящее изобретение основано на открытии способности поликлональных IgG стимулировать созревание, дифференциацию шванновских клеток и выработку ими миелина. Представлены способы лечения неидиопатических демиелинизирующих периферических нейропатий у млекопитающих, при этом нейропатия не является иммуно-опосредованной или инфекционно-опосредованной, путем введения поликлональных IgG. Типы демиелинизирующих периферических нейропатий, подлежащие лечению при помощи настоящего изобретения, включают травму периферического нерва и периферическую нейропатию, вызванную воздействием токсинов. В качестве альтернативы композицию поликлональных IgG можно наносить непосредственно на периферическую нервную клетку, чтобы стимулировать созревание, дифференциацию в миелинизирующее состояние, экспрессию миелина или способствовать выживанию клеток.

040995 B1

040995 B1

1. Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка заявляет приоритет на основании предварительной патентной заявки US № 61/605117, поданной 29 февраля 2012, раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

2. Уровень техники

Периферическая нейропатия является проявлением расстройств, которые наносят повреждение периферической нервной системе (ПНС), сети ганглиев и нейронов, передающих сигналы между центральной нервной системой (ЦНС), т.е. головным и спинным мозгом и любой другой частью тела. Нейроны ПНС опираются на шванновские клетки в отношении например, миелинизации, ускоренной нервной проводимости, развития и регенерации нервов, трофической поддержки, выработки внеклеточного матрикса нерва и модуляции нервно-мышечной синаптической активности. Эти шванновские клетки обеспечивают электрическую изоляцию посредством обертыгивания аксонов двигательных и чувствительных нейронов миелиновой оболочкой с высоким содержанием белка и липидов. Учитывая важнейшую роль миелина, не удивительно, что демиелинизация периферических аксонов является отличительной чертой острых и хронических периферических нейропатий, таких как синдром Гийена-Барре (СГБ), хроническая демиелинизирующая полинейропатия (ХВДП) и мультифокальная двигательная нейропатия (МДН), а также других видов патологии периферических нервов, вызванных токсинами, лекарственными средствами или системными заболеваниями, например, сахарным диабетом.

Периферические нейропатии могут искажать передачу сигнала, вызывая симптомы, которые меняются в зависимости от происхождения нейропатии и типа или количества пораженных нервов. Например, симптомы могут зависеть от того, поражает ли расстройство чувствительные нервные волокна, передающие чувствительную информацию от пораженной области к ЦНС, или двигательные нервные волокна, передающие импульсы и координирующие двигательную активность от ЦНС к мышце, или те и другие. Периферические нейропатии могут быть классифицированы как мононейропатии, включающие повреждение одного нерва, или полинейропатии, включающие повреждение множества нервов; острые, при которых симптомы появляются внезапно, быстро прогрессируют и медленно устраняются, или хронические, при которых симптомы начинаются едва уловимо и прогрессируют медленно. На сегодняшний день установлены более 100 разных типов периферической нейропатии. Клинический диагноз периферической нейропатии может быть поставлен на основании анамнеза заболевания субъекта, физического обследования, использования электромиографии (ЭМГ) и исследований проводимости нерва (ИПН), исследований вегетативной нервной системы и биопсии нервов и т.д.

Современные виды лечения периферических нейропатий, там где это возможно, направлены на основное заболевание, и часто применяются в сочетании с симптоматическими видами лечения, такими как противовоспалительные средства, купирование боли, вспомогательные механизмы и/или хирургическое вмешательство и т.д. Организм также обладает собственной регенеративной способностью в ответ на травму или повреждение ПНС. После травмы ПНС происходит валлеровская дегенерация дистальных культей нервов с последующим разрушением миелина шванновских клеток, фагоцитозом внеклеточного миелина, а также вовлечением макрофагов для дальнейшего клиренса миелина. Шванновские клетки могут дополнительно адаптироваться к патологическим ситуациям благодаря их способности к дедифференциации, пролиферации, стимулированию регенерации аксонов и редифференциации, и выработке миелина. См. публикацию Bhatheja et al. (2006) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38(12):1995-9. В ходе восстановления шванновские клетки стимулируют, направляют регенерацию аксонов и целевую реиннервацию, образуя посредством быстрой пролиферации трубку регенерации аксона, известную как пучок Бюнгера, и предоставляя аксону путь для роста вдоль него. См. публикацию Burstyn-Cohen et al. (1998) *J. Neurosci* 18(21): 8875-8885. В то время как обычно можно наблюдать функциональную регенерацию нервов ПНС (в отличие от ЦНС, в которой отсутствует регенеративный механизм для клиренса миелина и регенерации аксонов), она часто является ограниченной или хронически нарушенной. Поэтому необходимы новые подходы стимулирования восстановления ПНС.

Недавние исследования ЦНС представили доказательства прямого влияния IgM на олигодендроциты, миелинизирующие глиальные клетки центральной нервной системы. Например, было обнаружено, что нацеливание олигодендроцит-реактивных антител IgMк на олигодендроциты, стимулирует ремиелинизацию ЦНС (Asakura et al., 1998). Другие исследования показали, что лечение неиммунной, индуцированной токсином, модели демиелинизирующего заболевания объединенными в пул молекулами IgM человека приводит к значительно усиленной дифференциации олигодендроцитов в ЦНС (Bieber et al., 2000; Bieber et al., 2002; Warrington et al., 2007). Открытие Fc рецепторов к IgM на олигодендроцитах, их клетках-предшественниках и миелине в ЦНС предлагает дополнительную информацию возможного взаимодействия лиганд-рецептор (Nakahara et al., 2003).

Знания, полученные из этих исследований олигодендроцитов-IgM, хотя являются значимыми для восстановления ЦНС, не могут использоваться для регенеративной способности ПНС (которая не содержит олигодендроцитов). Как было обнаружено в более релевантных исследованиях, введение человеческого ВВИГ приводит к снижению продолжительности заболевания при ЭАН (аутоиммунном неврите), крысиной модели, имитирующей специфический в отношении ПНС демиелинизирующий синдром Гий-

ена-Барре (СГБ) (Lin et al., 2007). Предположили, что эффекты относились к иммуномодулирующей роли ВВИГ и возможной противовоспалительной и наблюдаемой вторичной способности сокращения потерь аксонов. В отдельном исследовании гуморальной иммунной системы, В-клетки нокаутных по JHD мышцей продемонстрировали значительную задержку притока макрофагов, миелиновый клиренс и регенерацию аксонов после повреждения ПНС. Быстрый клиренс остатков миелина был восстановлен путем пассивной передачи антител от наивных мышечных линий WT или антител к миелину ПНС, тем самым подтверждая роль эндогенных антител в стимулировании поступления макрофагов и фагоцитарной активности (Vargas et al., 2010). Клинические исследования с введением внутривенных иммуноглобулинов (ВВИГ) продемонстрировали положительные эффекты в отношении СГБ, хронической демиелинизирующей полинейропатии (ХВДП) и мультифокальной двигательной нейропатии (МДН), с предположением, что лечение каждой из этих аутоиммунных или иммуно-опосредованных нейропатий и было достигнуто благодаря иммуномодулирующей роли ВВИГ.

Влияние поликлональных IgG на шванновские клетки, если таковое имеется, было до настоящего времени неизвестным. Таким образом, оставался вопрос относительно того, как регенеративная функция шванновских клеток могла бы быть использована в терапевтических целях при демиелинизирующих периферических нейропатиях. Настоящее открытие способности экзогенных поликлональных IgG индуцировать созревание, дифференциацию шванновских клеток и выработку миелина, является важным выяснением механизма, который обеспечивает новые подходы к лечению всех демиелинизирующих периферических нейропатий.

3. Краткое описание изобретения

В одном аспекте настоящего изобретения представлены способы лечения демиелинизирующей периферической нейропатии у млекопитающих, при этом нейропатия не является иммуно-опосредованной или инфекционно-опосредованной, путем введения терапевтически эффективного количества поликлональных IgG млекопитающему, которому установлен диагноз указанной нейропатии. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, демиелинизирующая периферическая нейропатия, подлежащая лечению, не является синдромом Гийена-Барре, хронической демиелинизирующей полинейропатией или мультифокальной двигательной нейропатией. В других вариантах реализации настоящего изобретения демиелинизирующая периферическая нейропатия представляет собой не-идиопатическую нейропатию. Демиелинизирующая периферическая нейропатия, поддающаяся лечению по настоящему изобретению, может быть выбрана из нейропатии, вызванной травмой, нейропатии, вызванной воздействием токсинов, врожденной нейропатии и нейропатии, вызванной метаболическим заболеванием, например диабетической нейропатии.

В другом аспекте настоящего изобретения представлены способы лечения травмы периферических нервов при помощи введения терапевтически эффективного количества поликлональных IgG млекопитающему с травмой периферических нервов.

В еще одном аспекте настоящего изобретения представлены способы лечения периферической нейропатии, вызванной воздействием токсинов, при этом нейропатия не является инфекционно-опосредованной, при помощи введения терапевтически эффективного количества поликлональных IgG млекопитающему, которому установлен диагноз указанной нейропатии.

Для лечения демиелинизирующей периферической нейропатии, описанной в настоящем документе, поликлональные IgG по настоящему изобретению можно вводить местно или системно. Местное введение поликлональных IgG может осуществляться внутримышечно или внутривенно. Системное введение поликлональных IgG может осуществляться интраназально, подкожно, перорально, внутриартериально или внутривенно. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения совместно с поликлональными IgG млекопитающему вводят противовоспалительное средство. Противовоспалительное средство может быть выбрано из адренокортикотропного гормона, кортикостероида, интерферона, глатиромера ацетата или нестероидного противовоспалительного лекарственного средства.

Поликлональные IgG настоящего изобретения можно вводить один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в месяц в дозе от около 0,05 до 5 г на кг массы тела пациента или от около 0,5 до 2 г на килограмм массы тела пациента.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения представлены способы стимулирования миелинизации периферической нервной клетки шванновской клеткой, включающие контактирование шванновской клетки с количеством поликлональных IgG, достаточным для стимулирования миелинизации указанной периферической нервной клетки шванновской клеткой.

В другом аспекте настоящего изобретения представлены способы стимулирования дифференциации незрелой шванновской клетки в миелинизирующее состояние, включающие контактирование шванновской клетки с поликлональными IgG в количестве, достаточном для стимулирования дифференциации шванновской клетки.

В еще другом аспекте представлены способы стимулирования выработки миелина шванновской клеткой, включающие контактирование шванновской клетки с количеством поликлональных IgG, достаточным для активации гена MBP.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения представлены способы культивирования нерв-

ной ткани млекопитающих, содержащей аксоны, посредством контактирования ткани в культуре с эффективным количеством шванновских клеток и эффективным количеством поликлональных IgG, в результате чего контактирование шванновских клеток с поликлональными IgG вызывает активацию гена MBR.

В еще одном аспекте настоящего изобретения представлены способы лечения повреждения периферического нерва у млекопитающего посредством трансплантации нервных клеток в место повреждения периферического нерва и контактирования нервных клеток с композицией, содержащей шванновские клетки и поликлональные IgG.

В способах, описанных в настоящем документе, поликлональные IgG могут быть введены индивидууму, нуждающемуся в таком лечении, через один или больше путей введения, таких как внутримышечный, внутрикожный, подкожный, трансбуккальный, пероральный, интраназальный или внутриартериальный, или внутривенный. Индивидуум может быть человеком или одомашненным животным. В некоторых вариантах реализации поликлональные IgG получают из пула человеческой сыворотки.

В некоторых вариантах реализации млекопитающему, нуждающемуся в такой терапии, вводят поликлональные IgG совместно с противовоспалительным средством.

Противовоспалительное средство может быть выбрано из адренокортикотропного гормона, кортикостероида, интерферона, глатиромера ацетата или нестероидного противовоспалительного лекарственного средства.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предоставлены фармацевтические композиции, содержащие фармацевтически приемлемый носитель и эффективное количество поликлональных IgG для лечения не-идиопатической демиелинизирующей периферической нейропатии.

Краткое описание чертежей

Более конкретные описания настоящего изобретения сделаны со ссылкой на некоторые типичные варианты его реализации, которые проиллюстрированы на прилагаемых фигурах. Эти фигуры составляют часть описания. Следует отметить, однако, что прилагаемые Фигуры иллюстрируют типичные варианты реализации настоящего изобретения, и поэтому не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения.

На фиг. 1 показаны относительные уровни пролиферации незрелых шванновских клеток, которые подвергали воздействию недиализированных (фиг. 1А) и диализированных (фиг. 1В) композиций ВВИГ/буфер через 2 дня, измеренные при помощи анализов с включением BrdU. Эти относительные уровни пролиферации были получены на основании количества клеток, положительных в отношении 5-бром-2'-дезоксисуридина (BrdU), включенного в клеточную ДНК в ходе клеточной пролиферации.

На фиг. 2 показаны относительные уровни пролиферации незрелых шванновских клеток, которые подвергали воздействию недиализированных (фиг. 2А) и диализированных (фиг. 2В) композиций ВВИГ/буфер через 2 дня, измеренные при помощи анализов Ki-67. Эти относительные уровни пролиферации были получены на основании количества клеток, положительных в отношении экспрессии Ki-67 в ходе клеточной пролиферации.

На фиг. 3 показаны уровни экспрессии генов P0 (фиг. 3А) и MBR (фиг. 3В) в незрелых шванновских клетках, которые подвергали воздействию диализированных композиций ВВИГ/буфер во временных точках 1 день и 3 дня.

На фиг. 4 показаны уровни экспрессии генов P0 (фиг. 4А) и MBR (фиг. 4В) в шванновских клетках с супрессией p57kip2, которые подвергали воздействию диализированных композиций ВВИГ/буфер, во временной точке 7 дней (9 дней супрессии).

На фиг. 5 показаны уровни экспрессии Fc рецептора CD64 в шванновских клетках с супрессией p57kip2, по сравнению с контрольными трансфицированными шванновскими клетками (без супрессии p57kip2). Ни одна группа шванновских клеток не подвергалась воздействию композиций ВВИГ/буфер.

На фиг. 6 показаны флуоресцентные изображения шванновских клеток с супрессией p57kip2 (фиг. 6В) и контрольных трансфицированных клеток (фиг. 6А) после стимуляции 20 мг диализированных композиций ВВИГ/буфер. Расположение и протяженность клеточных процессов указаны стрелками, наложенными на флуоресцентные изображения.

На фиг. 7 показана диаграмма длины выроста клеток для шванновских клеток с супрессией p57kip2 и контрольных трансфицированных клеток (фиг. 7А) через 3 дня после стимулирования диализированными композициями ВВИГ/буфер (5 дней супрессии) вместе с соответствующими флуоресцентными изображениями супрессированных p57kip2 шванновских клеток, стимулированных 20 мг ВВИГ (фиг. 7В), шванновских клеток с супрессией p57kip2, стимулированных буфером (фиг. 7С), контрольных трансфицированных клеток, обработанных 20 мг ВВИГ (фиг. 7D) и контрольных трансфицированных клеток, обработанных буфером (фиг. 7E).

На фиг. 8 показана диаграмма длины выроста клеток для шванновских клеток с супрессией p57kip2 и контрольных трансфицированных клеток (фиг. 8А) через 7 дней после стимулирования диализированными композициями ВВИГ/буфер (9 дней супрессии) вместе с соответствующими флуоресцентными изображениями шванновских клеток с супрессией p57kip2, стимулированных 20 мг ВВИГ (фиг. 8В), шванновских клеток с супрессией p57kip2, стимулированных буфером (фиг. 8С), контрольных трансфе-

цированных клеток, обработанных 20 мг ВВИГ (фиг. 8D) и контрольных трансфецированных клеток, обработанных буфером (фиг. 8E).

На фиг. 9 представлена блок-схема процесса создания совместной культуры нейронов ПНС (ганглия заднего корешка крысы, ГЗК) и миелинизирующих шванновских клеток.

4. Подробное описание изобретения

Открытие способности поликлональных IgG стимулировать гомеостаз, созревание, дифференциацию и выработку миелина шванновской клеткой может применяться для лечения демиелинизирующих периферических нейропатий различного происхождения, например нейропатий, вызванных воздействием токсинов, диабетической нейропатии, нейропатии, вызванной травмой, путем стимулирования регенеративной способности природных шванновских клеток. Предусматривается введение поликлональных IgG в качестве дополнения или замены существующих терапевтических схем или симптоматических видов лечения демиелинизирующих периферических нейропатий. Кроме того, настоящее изобретение может быть использовано в лабораторных условиях для осуществления ремиелинизации периферических нервов. На основе выводов, описанных в настоящем документе, поликлональные IgG могут применяться при трансплантации нерва, культивировании клеток, например, для индукции дифференциации шванновских клеток, определении судьбы клеток-предшественников, регуляции или экспрессии белка гена миелина и в качестве предварительного лечения или послеоперационного режима ухода при хирургических способах, угрожающих периферическим нервам или вовлекающих их.

I. Определения

Термин "неидиопатический" относится к расстройству, основная причина которого известна.

Термин "периферическая нейропатия," как он используется в настоящем документе, относится к расстройству, поражающему периферическую нервную систему, при этом исключает поражение ганглиев и нервов головного мозга и спинного мозга. "Периферическая нейропатия" может проявляться в виде одной или комбинации двигательной, чувствительной, чувствительно-двигательной или вегетативной нервной дисфункции. Разнообразие морфологических проявлений периферических нейропатий может определяться рядом различных причин. Например, периферические нейропатии могут быть генетически приобретенными, могут возникнуть в результате системного заболевания или могут быть вызваны токсическим средством. Примеры включают, но не ограничиваются перечисленным, диабетическую периферическую нейропатию, дистальную чувствительно-двигательную нейропатию или вегетативные нейропатии, такие как снижение моторики желудочно-кишечного тракта или атония мочевого пузыря. Примеры периферических нейропатий, связанных с системным заболеванием, включают нейропатию, связанную с постполиомиелитным синдромом или со СПИД; примеры наследственных периферических нейропатий включают болезнь Шарко-Мари-Тута, абеталипопротеинемия, болезнь Танжера, метахроматическую лейкодистрофию, болезнь Фабри и синдром Дежерина-Сотта; и примеры периферических нейропатий, вызванных токсическим средством включают те, что вызваны лечением химиотерапевтическим средством, таким как винкристин, цисплатин, метотрексат или 3'-азидо-3'-дезокситимидин.

Одной из разновидностей периферической нейропатии является "демиелинизирующая периферическая нейропатия." Как используется в настоящем документе, термин "демиелинизирующая периферическая нейропатия" описывает широкий класс периферических нейропатий, связанных с разрушением или удалением из нервов миелина, богатой липидами оболочки, окружающей и изолирующей нервные волокна. Неограничивающие примеры заболеваний демиелинизирующей периферической нейропатии включают диабетическую периферическую нейропатию, дистальную чувствительно-двигательную нейропатию или вегетативные нейропатии, такие как снижение моторики желудочно-кишечного тракта или атония мочевого пузыря. Дополнительные примеры и описания демиелинизирующей периферической нейропатии можно найти в разделе II подробного описания изобретения.

Термин "иммуно-опосредованное" расстройство, как он используется в настоящем документе, относится к состоянию, которое является результатом патологической активности иммунной системы организма. Подгруппы "иммуно-опосредованных" расстройств включают, без ограничения, аутоиммунное заболевание, при котором иммунная система атакует организм, расстройства иммунных комплексов, расстройства, связанные с отторжением после трансплантации, воспалительные заболевания и аллергии.

Термин "инфекционно-опосредованная" периферическая нейропатия относится к нарушению функции периферической нервной системы, установившейся в результате вирусных, бактериальных или грибковых инфекций.

Термин "периферическая нейропатия, вызванная травмой" или "травматическая периферическая нейропатия" относится к дисфункции периферической нервной системы, вызванной шоком, травмой или "физической травмой" организма. Физическая травма, например, в результате боевых действий, автомобильных аварий, падений и связанной со спортом деятельности, может привести нервы к частичному или полному разрыву, раздавливанию, сдавливанию или растяжению, иногда с такой силой, что они частично или полностью отделяются от ганглиев или спинного мозга, и в результате наступает демиелинизация. Периферические нейропатии, вызванные травмой могут также происходить в результате, например, поражения электрическим током, гипотермии и т.д.

Периферическая нейропатия, вызванная "токсинами" или "химическими средствами" относится к

нарушению функции периферической нервной системы в результате воздействия токсинов (например, химических средств). Токсины, вызывающие периферическую нейропатию, в целом можно разделить на три группы: лекарственные средства и медикаменты; промышленные химические вещества и токсины окружающей среды. Неограничивающие примеры токсинов, которые могут вызвать периферическую нейропатию, описаны ниже в разделе II подробного описания изобретения.

"Противовоспалительное средство", как используется в настоящем документе, включает любое средство, уменьшающее воспаление пораженного кровеносного сосуда и/или окружающих тканей. Неограничивающие примеры противовоспалительных средств представляют собой стероиды (например, глюкокортикоиды и кортикостероиды), иммуно-селективные противовоспалительные производные (ImSAID), охлаждающие средства, травяные добавки (например, дявольский коготь, иссоп, имбирь, куркуму, арнику и кору ивы (содержащую салициловую кислоту) и продукты питания с противовоспалительным действием (например, гранат, зеленый чай, овощи, продукты питания, которые содержат омега-3 жирные кислоты), орехи, семена и натуральное оливковое масло высокого качества). В частности, простагландин 2 (PGE 2) является провоспалительным соединением, а PGE1 и PGE3 являются противовоспалительными соединениями. Соответственно средства, которые снижают уровень PGE2 или повышают уровни PGE1 и PGE3 также могут действовать как противовоспалительные средства. Дополнительные неограничивающие примеры противовоспалительных средств можно найти ниже в разделе VI, "Комбинированная терапия".

Термин "незрелые шванновские клетки", как используется в настоящем документе, относится к определенной стадии линии шванновских клеток. Первый этап в линии шванновских клеток дает предшественника шванновских клеток, пролиферативную клетку, которая становится связанной со многими аксонами и экспрессирует рецептор фактора роста нервов (NGF-R), белок, связанный с ростом 43 (GAP-32) и молекулы клеточной адгезии нервных клеток N-CAM и L1. Последующее "коммитированная" шванновская клетка-предшественник известна как незрелая шванновская клетка; она становится связанной с постепенно уменьшенным количеством аксонов и экспрессирует, в дополнение к ранее отмеченным маркерам, белок S-100 (начиная с этой стадии и далее, все шванновские клетки экспрессируют S-100).

Коммитированные шванновские клетки-предшественники развиваются или в немиелинизирующие шванновские клетки, которые остаются связанными с несколькими аксонами и в дополнение к предыдущим маркерам экспрессируют галактоцереброзид (GalC), или в миелинизирующие шванновские клетки. Миелинизирующие шванновские клетки проходят в развитии через пролиферативную "премиелинизирующую" стадию, характеризующуюся временной экспрессией супрессированного цАМФ-индуцируемого фактора транскрипции Рου-домена (SCIP), за которой следует "промиелинизирующая" GalC-положительная стадия, становясь в ходе развития связанными с одним аксоном. Окончательная дифференциация в зрелую миелинизирующую шванновскую клетку включает отрицательное регулирование экспрессии NGF-R, GAP-43, N-CAM и L1, с активацией экспрессии GalC и белков миелина, и *in vivo*, синтез и выработку миелина.

Термин "IgG", как он используется в настоящем документе, относится к композиции иммуноглобулинов IgG. Класс иммуноглобулинов IgG, как следует из названия, характеризуется наличием у (гамма) тяжелой цепи. Иллюстративная структура полного иммуноглобулина IgG включает тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара имеет одну "легкую" (около 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (около 50-70 кДа). N-конец каждой цепи определяет переменную область из около 100-110 или более аминокислот, которая в первую очередь отвечает за распознавание антигена. Термины переменная легкая цепь (V_L) и переменная тяжелая цепь (V_H) относятся к этим легким и тяжелым цепям соответственно.

"Имуноглобулин" или "антитело" представляет собой полипептид, который является иммунологически реактивными с конкретным антигеном. Термин "имуноглобулин", как он используется в настоящем документе, включает интактные молекулы различных изотипов, а также фрагменты с антиген-связывающей способностью, например, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv и rIgG. См., например, публикацию Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Kubu, J., Immunology, 3-е изд., W.H. Freeman & Co., New York (1998). Термин также включает рекомбинантные одноцепочечные Fv фрагменты (scFv). Термин также охватывает двухвалентные или биспецифические молекулы, диатела, триатела и тетратела. Двухвалентные или биспецифические молекулы описаны например, в публикациях Kostelny et al. (1992) J. Immunol. 148:1547, Pack and Pluckthun (1992) Biochemistry 31:1579, Hollinger et al., 1993, выше, Gruber et al. (1994) J. Immunol. : 5368, Zhu et al. (1997) Protein Sci 6:781, Hu et al. (1996) Cancer Res. 56:3055, Adams et al. (1993) Cancer Res. 53:4026 и McCartney, et al. (1995) Protein Eng. 8:301.

Термин "поликлональные IgG", как он используется в настоящем документе, относится к гетерогенной коллекции иммуноглобулинов IgG, полученных из множества В-клеток и имеющих различные специфичности и аффинности эпитопов. Способы получения поликлональных антител известны специалистам в данной области техники (например, Harlow & Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual. (Cold Spring Harbor Press)). Поликлональные IgG настоящего изобретения могут быть экстрагированы из плазмы, объединенной от разных индивидуумов млекопитающих, которые прошли предварительный скрининг в отношении патогенных заболеваний. В некоторых вариантах реализации поликлональные IgG по

настоящему изобретению являются репрезентативными для более 100 индивидуумов, более 200 индивидуумов, более 300 индивидуумов, более 400 индивидуумов, более 500 индивидуумов, более 600 индивидуумов, более 700 индивидуумов, более 800 индивидуумов, более 900 индивидуумов, более 1000 индивидуумов, более 1100 индивидуумов, более 1200 индивидуумов, более 1300 индивидуумов, более 1400 индивидуумов, более 1500 индивидуумов, более 1600 индивидуумов, более 1700 индивидуумов, более 1800 индивидуумов, более 1900 индивидуумов или более 2000 индивидуумов.

Фраза "специфически (или избирательно) связывается" с антителом или "специфически (или избирательно) иммунореактивен с" в отношении белка или пептида означает реакцию связывания, зависящую от присутствия белка в гетерогенной популяции белков и других биологических веществ. Таким образом, в назначенных условиях иммуноанализа, указанные антитела связываются с последовательностью конкретного белка, по меньшей мере, в два раза сильнее фона и, более типично, больше чем в 10-100 раз сильнее фона. Лиганд (например, антитело), который специфически связывается с белком, обычно имеет константы ассоциации по меньшей мере, составляющие 10^3 M^{-1} или 10^4 M^{-1} , иногда 10^5 M^{-1} или 10^6 M^{-1} , в других случаях 10^6 M^{-1} или 10^7 M^{-1} , предпочтительно, от 10^8 M^{-1} до 10^9 M^{-1} и более предпочтительно, от около 10^{10} M^{-1} до 10^{11} M^{-1} или выше. Для выбора антител, специфически иммунореактивных с конкретным белком, подходят различные способы иммунологического анализа. Например, для выбора моноклональных антител, специфически иммунореактивных с белком, обычно используется твердофазный иммунологический анализ ELISA. См., например, публикацию Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York, а которой дано описание форматов иммунологического анализа и условий, позволяющих определить специфическую иммунореактивность.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используют в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Данные термины применяются к аминокислотным полимерам, в которых один или более аминокислотных остатков являются искусственными химическими миметиками соответствующей природной аминокислоты, а также к природным аминокислотным полимерам и аминокислотным полимерам, не встречающимся в природе.

Термин "аминокислота" относится к встречающимся в природе и синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые действуют аналогично аминокислотам, встречающимся в природе. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодированные генетическим кодом, а также те аминокислоты, которые позже подвергаются модификации, например, гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат и О-фосфосерин. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые имеют такую же основную химическую структуру, что и природная аминокислота, т.е. атом углерода, связанный с атомом водорода, карбоксильную группу, аминогруппу и группу R, например, гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные группы R (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют такую же базовую химическую структуру, как у природной аминокислоты. Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, отличающуюся от общей химической структуры аминокислоты, но действуют аналогично природной аминокислоте.

Аминокислоты могут называться в настоящем документе своими общезвестными трехбуквенными символами, либо однобуквенными символами, рекомендованными Биохимической номенклатурной комиссией IUPAC-IUB. Нуклеотиды, подобным образом, могут называться общепринятыми однобуквенными обозначениями.

Термин "основной белок миелина" (МБР), как он используется в настоящем документе, относится к гену, а также к кодируемому им белку, который является основным белковым компонентом миелина, содержащим около 30% от общего содержания белка миелиновой оболочки. Было продемонстрировано, что МБР является главным аутоантигеном-мишенью при РС, и Т-клетки, реактивные в отношении МБР, играют ключевую роль в его патогенезе (см., например, публикацию Schwartz, R S, "Autoimmunity and Autoimmune Diseases" in Paul, *Fundamental Immunology*, 3-е изд. Raven Press, New York, 1993, стр. 1033 1097; Brown and McFarlin 1981. *Lab Invest* 45, стр. 278 284; Lehmann et al. 1992. *Nature* 358, стр. 155 157; Martin et al. 1992. *Ann Rev Immunol* 10, стр. 153 187; Sprent 1994. *Cell* 76, стр. 315 322; Su and Sriram. 1991. *J of Neuroimmunol* 34, стр. 181 190; и Weimbs and Stoffel. 1992. *Biochemistry* 31, стр. 12289 12296).

Термин "аксон" относится к удлинённому волокну нервной клетки, ответственному за проведение сигналов в организме.

Термины "индивидуум", "субъект" и "пациент", используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относятся млекопитающему, включая, но, не ограничиваясь перечисленным, грызунов, обезьяно-подобных, людей, сельскохозяйственных млекопитающих животных, спортивных млекопитающих животных и домашних млекопитающих. В предпочтительных вариантах реализации индивидуум является человеком.

Термины "доза" и "дозировка" используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Доза относится к количеству активного ингредиента, получаемого индивидуумом при каждом введении. Доза будет изменяться в зависимости от ряда факторов, включая частоту введения; размер и переносимость индивидуума; тяжесть состояния; риск побочных эффектов и путь введения. Специалисту в данной области техники будет понятно, что доза может быть изменена в зависимости от вышеуказанных факторов или на

основе терапевтического прогресса. Термин "лекарственная форма" относится к конкретной форме фармацевтического препарата и зависит от пути введения. Например, лекарственная форма может быть жидкой, например, физиологический раствор для инъекций.

"Терапевтически эффективное" количество или доза, или "достаточное/эффективное" количество или доза представляет собой дозу, которая вызывает те эффекты, для получения которых ее вводят. Точная доза будет зависеть от цели лечения и будет устанавливаться специалистом в данной области техники с использованием известных способов (см., например, публикации Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (том 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); и Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20-е издание, 2003, Genaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

Термин "лечение" или "терапия" обычно означает получение желаемого физиологического эффекта. Этот эффект может быть профилактическим в смысле полного или частичного предупреждения заболевания или состояния или его симптома, и/или он может быть терапевтическим в смысле частичного или полного излечения повреждения, заболевания или состояния и/или облегчения неблагоприятного эффекта, свойственного данному повреждению, заболеванию или состоянию, и включает остановку развития или регрессию заболевания или состояния. Лечение может также включать профилактическое применение для уменьшения последствий травмы, если она произойдет. Например, в одном аспекте настоящее изобретение включает предварительное введение перед оперативным вмешательством с вовлечением периферической нервной системы для уменьшения повреждения. Лечение может также относиться к любой задержке начала, облегчению симптомов, улучшению выживаемости пациентов, увеличению времени или уровня выживаемости и т.д. Эффект лечения можно сравнить с индивидуумом или группой индивидуумов, не получающих лечение.

Термин "контроль", используемый в настоящем документе, относится к эталону, обычно известному эталону, для сравнения с экспериментальной группой. Специалисту в данной области техники будет понятно какой контроль имеет ценность в данной ситуации, и он будет иметь возможность анализировать данные на основе сравнения с контрольными значениями. Контроли также являются ценными для определения значимости данных. Например, если значения для данного параметра изменяются среди контролей в широких пределах, различия в исследуемых образцах не следует рассматривать как значительные.

Прежде чем описывать настоящее изобретение более подробно, необходимо понять, что изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами реализации, поскольку они могут, конечно же, изменяться. Также необходимо понимать, что употребляемая в настоящем описании терминология предназначена только для описания конкретных вариантов реализации изобретения и не предназначена для ограничений, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

В случаях когда представлен диапазон значений, необходимо понимать, что если контекстом явно не обозначено иное, то изобретение охватывает каждое из промежуточных значений с точностью до десятых долей единицы нижнего предела, лежащих между верхним и нижним пределами упомянутого диапазона и любым другим установленным или промежуточным значением в пределах указанного диапазона. Верхние и нижние пределы этих более узких диапазонов могут быть независимо включены в более узкие диапазоны, и также охватываются изобретением, с учетом любого конкретного исключенного предела в установленном диапазоне. Если установленный диапазон включает один из этих пределов или оба, то диапазоны, исключаящие какой-либо из этих включенных пределов или оба таких предела, также охватываются изобретением.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значения, общепринятые для специалиста в области техники, к которой относится изобретение. Несмотря на то, что при практическом использовании или испытании настоящего изобретения могут также использоваться любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, далее будут описаны репрезентативные иллюстративные способы и материалы.

Все публикации и патенты, упомянутые в настоящем описании изобретения, включаются в его объем посредством ссылок, как если бы было конкретно и индивидуально указано на включение каждой отдельной публикации или патента посредством ссылки, с целью раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми упоминаются соответствующие публикации. Цитирование любой публикации приводится для ее раскрытия до даты регистрации настоящего изобретения, и не должно истолковываться как признание того, что настоящее изобретение не имеет право на предвосхищение данной публикации посредством более раннего изобретения. Дополнительно, приведенные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, которые могут нуждаться в независимом подтверждении.

Следует упомянуть, что формы единственного числа, использованные в настоящем документе и в прилагаемой формуле изобретения, включают формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Дополнительно следует отметить, что пункты формулы изобретения могут быть составлены так, чтобы исключить любой обязательный элемент. Таким образом, это утверждение предназначено для обоснования использования таких исключаящих терминов, как "только", "лишь" и т.п. в сочета-

нии с перечислением элементов пункта формулы изобретения или для использования "отрицательного" ограничения.

Специалисту в данной области техники при ознакомлении с настоящим раскрытием будет понятно, что каждый из отдельных вариантов реализации изобретения, описанный и иллюстрированный в данном документе, характеризуется отдельными деталями и признаками, которые могут быть легко отделены от признаков любого из нескольких других вариантов осуществления изобретения или объединены с такими признаками без выхода за пределы объема или сущности настоящего изобретения. Любой из описанных способов может быть осуществлен в описанной последовательности событий или в любой другой логически возможной последовательности.

II. Демиелинизирующие периферические neuropatii

Настоящее изобретение основано на открытии, что поликлональные IgG могут использовать регенеративную способность шванновских клеток посредством стимуляции созревания, дифференциации шванновских клеток и выработки ими миелина. Таким образом, изобретение направлено на комплексный механизм демиелинизирующих периферических neuropatii, чтобы обеспечить широкий спектр лечения этих расстройств. Например, это изобретение направлено на демиелинизирующие периферические neuropatii, вызванные физической травмой, токсическими средствами и диабетом.

Демиелинизирующие расстройства, подлежащие лечению композицией поликлональных IgG, описанной в настоящем документе, включают, например, периферические neuropatii, которые являются генетически приобретенными, возникают в результате системного заболевания или могут быть вызваны воздействием токсина или травмой.

Генетические демиелинизирующие neuropatii (также известные как наследственные neuropatii) являются одним из наиболее распространенных врожденных неврологических заболеваний. Генетические демиелинизирующие neuropatii делятся на четыре основные подкатегории: 1) двигательная и чувствительная neuropatia, 2) чувствительная neuropatia, 3) двигательная neuropatia и 4) чувствительная и вегетативная neuropatia. В частности, демиелинизирующие наследственные neuropatii часто являются прогрессирующими neuropатиями с явно сниженной нервной проводимостью и скоростью, и хронической сегментарной демиелинизацией периферических нервов. Gabreels-Festen et al., "Hereditary demyelinating motor and sensory neuropathy," *Brain Pathol.* 3(2):135-146 (1993). Примеры общих классов генетических демиелинизирующих neuropatii включают, но не ограничиваются перечисленным, диабетическую периферическую neuropатию, дистальную чувствительно-двигательную neuropатию или вегетативные neuropatii, такие как снижение моторики желудочно-кишечного тракта или атония мочевого пузыря. Примеры наследственных периферических neuropatii включают болезнь Шарко-Мари-Тута, абеталипопротеинемию, болезнь Танжера, метахроматическую лейкодистрофию, болезнь Фабри и синдром Дежерина-Сотта.

Системные демиелинизирующие периферические neuropatii возникают как побочные эффекты системного заболевания. Неограничивающие примеры периферических neuropatii, связанных с системным заболеванием, включают neuropатию, связанную с постполиомиелитным синдромом или со СПИД. Кроме того, следующие неограничивающие системные заболевания могут иметь симптомы периферической neuropatii: рак, недостаточность питания, алкоголизм, сахарный диабет, СПИД, болезнь Лайма, ревматоидный артрит, хроническая почечная недостаточность, аутоиммунные заболевания, гипотиреоз и вирусные инфекции (например, гепатит).

Вызванные токсинами демиелинизирующие периферические neuropatii возникают в результате воздействия нейротоксических средств, таких как фармацевтические средства, биологические вещества и воздействие химических веществ. Примеры токсинов, которые вызывают периферические neuropatii, включают, но не ограничиваются перечисленным, химиотерапевтические средства (например, винкристин, паклитаксел, цисплатин, метотрексат или 3'-азидо-3'-дезокситимидин), свинец, ртуть, таллий, органические растворители, пестициды, сероуглерод, мышьяк, акриламид, токсин дифтерии, алкоголь, лекарственные средства против ВИЧ (например, диданозин и залцитабин), противотуберкулезные лекарственные средства (например, изониазид и этамбутол), противомикробные лекарственные средства (например, дапсон, метронидазол, хлорохин и хлорамфеникол), психотропные препараты (например, литий), облучение и такие лекарственные средства как амиодарон, ауротиоглюкоза, фенитоин, талидомид, колхицин, циметидин, дисульфирам, гидралазин и высокие уровни витамина B6. Дополнительные токсические средства, которые могут вызвать периферическую neuropатию перечислены ниже.

Вызванные травмой демиелинизирующие периферические neuropatii, как описано выше, возникают в результате шока, травмы или физической травмы организма.

Соответственно причины периферической neuropatii колеблются в широких пределах, например от осложнений сахарного диабета; травмы; токсинов, включая, без ограничений, лекарственные средства и медикаменты, промышленные химические вещества и токсины окружающей среды; аутоиммунного ответа; дефицитов питательных веществ и до сосудистых и метаболических расстройств. Например, демиелинизирующие периферические neuropatii могут возникнуть в результате остеохондротической миеломы, периферической neuropatii, связанной с моноклональным белком, наследственных двигательной и чувствительной периферических neuropatii типов 1 и 3 и наследственной восприимчивости к

компрессионным параличам.

Аналогичным образом симптомы демиелинизирующей периферической нейропатии также различаются, например, в зависимости от типа пораженных нервов. Например, пациент-человек, имеющий демиелинизирующее расстройство, может иметь один или более симптомов демиелинизирующего расстройства, таких как, но, не ограничиваясь перечисленным, нарушение зрения, онемение, слабость в конечностях, тремор или мышечная спастичность, тепловая непереносимость, нарушение речи, недержание, головокружение или нарушения проприоцепции (например, баланса, координации, чувства положения конечностей). Человек (например, пациент-человек) с семейным анамнезом демиелинизирующего расстройства (например, с генетической предрасположенности к демиелинизирующему расстройству), или проявляющий умеренные или нерегулярные симптомы демиелинизирующего расстройства, описанного выше, может для целей настоящего способа рассматриваться как имеющий риск развития демиелинизирующего расстройства.

В частности, повреждение чувствительного нерва, вызванное демиелинизирующей периферической нейропатией может вызвать более сложный спектр симптомов, потому что чувствительные нервы имеют более широкий, более узкоспециализированный диапазон функций. Более крупные чувствительные волокна, заключенные в миелин (складки мембраны с высоким содержанием липидов, которые по спирали оборачивают и изолируют многие нервы), регистрируют вибрацию, легкие прикосновения, а также ощущение положения тела. Повреждение крупных чувствительных волокон уменьшает способность чувствовать вибрацию и прикосновения, в результате чего возникает общее чувство онемения, особенно в кистях рук и ступнях. Многие пациенты не могут только на ощупь распознать формы небольших объектов или различать разные формы. Это повреждение чувствительных волокон может способствовать потере рефлексов (также как и повреждение двигательного нерва). Потеря чувства положения тела часто делает индивидуумов неспособными координировать сложные движения, такие как ходьба или застегивание пуговиц, или поддерживать баланс при закрытых глазах. Нейропатическую боль трудно контролировать, и она может серьезно повлиять на эмоциональное благополучие и общее качество жизни.

Более мелкие чувствительные волокна без миелиновых оболочек передают болевые и температурные ощущения. Повреждение этих волокон может влиять на способность чувствовать боль или изменения температуры. Индивидуумы могут не чувствовать, что они получили травму через порез, или что рана инфицирована. Другие могут не ощущать боль, которая предупреждает о надвигающемся сердечном приступе или других острых состояниях. (Потеря чувства боли является особенно серьезной проблемой для индивидуумов с сахарным диабетом, поскольку приводит к высокому уровню ампутаций нижних конечностей среди этой популяции.) Болевые рецепторы в коже также могут стать чрезмерно чувствительными, так что ощущается сильная боль (аллодиния) от раздражителей, которые обычно являются безболезненными.

Симптомы повреждения вегетативных нервов разнообразны и зависят от того, какие органы или железы поражены. Нарушение функции вегетативных нервов может представлять угрозу для жизни и может потребовать экстренной медицинской помощи в случаях, когда нарушается дыхание или когда начинается сердечная аритмия. Общие симптомы повреждения вегетативных нервов включают невозможность нормального потоотделения, что может привести к тепловой непереносимости; потерю контроля мочевого пузыря, что может вызвать инфицирование или недержание мочи; и неспособность контролировать мышцы, расширяющие или сокращающие кровеносные сосуды для поддержания безопасных уровней кровяного давления. Потеря контроля над кровяным давлением может вызвать головокружение, предобморочное состояние или даже обморок при резком переходе индивидуума из сидячего положения в стоячее (состояние, известное как постуральная или ортостатическая гипотензия).

Вегетативную нейропатию часто сопровождают желудочно-кишечные симптомы. Частые нарушения функции нервов, контролирующих сокращения мышц кишечника, приводят к диарее, запору или недержанию. При поражении определенных вегетативных нервов индивидуумы могут также испытывать трудности при приеме пищи или глотании.

Композицию поликлональных IgG по настоящему изобретению можно также применять для лечения демиелинизирующей периферической нейропатии, которая развилась как осложнение сахарного диабета, т.е. I типа, II типа. Периферическая нейропатия является одним из основных осложнений сахарного диабета. Снижение скорости нервной проводимости и повышенная устойчивость к нарушению проводимости, вызванные ишемией, являются одними из самых ранних изменений, обнаруженных у пациентов с диабетом и в животных моделях заболевания. Ультраструктурные исследования продемонстрировали изменения как в аксонах, так и в шванновских клетках (ШК) (например, уменьшение толщины аксонов и сегментарная демиелинизация), а также в микроциркуляторной части сосудистого русла, все из которых, по всей видимости, развиваются независимо. Некоторые исследования привели к выводу, что прогрессирующая потеря волокон периферических нервов, наблюдаемая при диабетической нейропатии у человека, может быть обусловлена, по меньшей мере частично, замедленной дегенерацией нервов и нарушенной регенерацией нервов. Метаболические и микрососудистые нарушения, а также дефицит нейротрофинов рассматривались как ответственные за патогенез диабетической нейропатии. Сосудистые изменения при диабете в основном состоят из ишемии и эндоневральной гипоксии. Механизмы,

лежащие в основе этой сосудистой патологии, включают дегенеративные изменения в симпатических нервных окончаниях сосудов, несущих кровь к периферическим нервам, с последующим нарушением нервной регуляции тока крови нервов и снижением выработки в нервах простаглицина и оксида азота.

Двумя различными клиническими проявлениями диабетической нейропатии являются те, что представлены у пациентов, страдающих от болезненной симметричной полинейропатии, и у пациентов со ступнями с отсутствием чувствительности и боли. Безболезненная нейропатия является распространенным расстройством и, согласно ряду исследований, скорее всего отражает степень дегенерации нервов. Болевой синдром, с другой стороны, связан с меньшей морфологической патологией. В то время как было высказано предположение, что болевой синдром может в отличие от дегенерации отражать регенерацию нервов, несколько сообщений позволили предположить, что при диабете регенерация нервов нарушается. Анализ нескольких функциональных показателей периферических чувствительных нервов грызунов с диабетом также позволяет предположить снижение, а не увеличение функции. Например, экспериментальный диабет вызывает несколько ноцицептивных ответов, включая раннюю тепловую гипералгезию, которая со временем превращается в гипоалгезию, механическую гипералгезию, тепловую и тактильную аллодинию, повышенную активность С волокон и пониженную чувствительность к опиоидам. В этом контексте механическая гипералгезия может быть результатом повышенного жжения после длительной сверхпороговой механической стимуляции С волокон.

В то время как виды терапии с применением антиоксидантов, сосудорасширяющих средств и нейротрофических средств могут обратить вспять некоторые функциональные и метаболические патологические изменения нервов при диабете, они приводят лишь к частичному улучшению патологического восприятия и боли, позволяя предположить участие других путей. Настоящее изобретение может стимулировать заживляющую способность шванновских клеток для лечения диабетической нейропатии.

Композицию поликлональных IgG по настоящему изобретению можно также применять для лечения демиелинизирующей периферической нейропатии, которая развилась в результате травмы. Вызванная травмой нейропатия относится к повреждению нервной системы в результате внешней физической травмы. Повреждение или неожиданная травма, например, в результате боевых действий, автомобильных аварий, падений и связанной со спортом деятельности, может привести нервы к частичному или полному разрыву, раздавливанию, сдавливанию или растяжению, иногда с такой силой, что они частично или полностью отделяются от спинного мозга, и в результате наступает демиелинизация. Менее существенные травмы также могут привести к серьезному повреждению нервов.

Композицию поликлональных IgG по настоящему изобретению можно также применять для лечения периферической нейропатии, которая развилась в результате воздействия токсического средства. Токсины, вызывающие периферическую нейропатию, в целом можно разделить на три группы: лекарственные средства и медикаменты; промышленные химические вещества и токсины окружающей среды. Как используется в настоящем документе, термин "токсическое средство" определяется как любое вещество, которое, посредством своего химического действия ухудшает нормальную функцию одного или более компонентов периферической нервной системы. Это определение включает средства, которые переносятся по воздуху, попадают внутрь в качестве примеси с пищей или лекарственными средствами, или принимаются сознательно как часть терапевтической схемы.

Список токсических веществ, которые могут вызывать периферическую нейропатию, включает, но не ограничивается перечисленным, 3'-азидо-3'-дезокситимидин, ацетазоламид, акриламид, адриамицин, алкоголь, хлористый аллил, алмитрин, амитриптилин, амиодарон, амфотерицин, мышьяк, ауриотиоглюкозу, карбаматы, сероуглерод, окись углерода, карбоплатин, хлорамфеникол, хлорохин, холестирамин, циметидин, цисплатин, цис-платину, клиохинол, колестипол, колхицин, колистин, циклосерин, цитарабин, дапсон, дихлорфеноксиуксусную кислоту, диданозин; дидеоксицитидин, дидезоксиинозин, дидезокситимидин, диметиламинопропионитрил, дисульфирам, доцетаксел, доксорубин, этамбутол, этионамид, этиленоксид, FK-506 (такролимус), глутетимид, золото, гексауглероды, гексан, гормональные контрацептивы, гексаметилолмеламин, гидралазин, гидроксихлорохин, имипрамин, индометацин, неорганический свинец, неорганическую ртуть, изониазид, литий, метилртуть, метформин, метотрексат, метилбромид, метилгидразин, метронидазол, мизонидазол, метил-N-бутилкетон, нитрофурантоин, азотистый иприт, оксид азота, фосфорорганические соединения, осполот паклитаксел, пенициллин, пергексиллин, пергексилина малеат, фенитоин, платину, полихлорированные бифенилы, примидон, прокаинамид, прокарибазин, пиридоксин, симвастанин, цианат натрия, стрептомицин, сульфонамиды, сурамин, тамоксифен, талидомид, таллий, толуол, триамтерен, триметилолово, триортокрезилфосфат, L-триптофан, вакор, алкалоиды барвинка, винкристин, виндезин, мегадозы витамина А, мегадозы витамина D, зальцитамин, зимелдин; промышленные вещества, особенно растворители; тяжелые металлы; и "нюхательный клей" или другие токсичные соединения.

Композицию поликлональных IgG по настоящему изобретению можно также применять для лечения демиелинизирующей периферической нейропатии, которая развилась в результате введения хемотоксинов для терапии рака. Среди хемотоксинов, которые известны тем, что вызывают периферическую нейропатию, находятся винкристин, винбластин, цисплатин, паклитаксел, прокарибазин, дидезоксиинозин, цитарабин, альфа-интерферон и 5-фторурацил (см. публикацию Macdonald, Neurologic Clinics 9: 955-

967 (1991)).

III. Диагностика и наблюдение за демиелинизирующими периферическими нейропатиями

Диагностику демиелинизирующей периферической нейропатии может проводить врач или клиницист, используя один или более способов, известных в данной области техники. Обычно требуется неврологическое обследование, которое включает сбор анамнеза заболевания пациента (в том числе симптомы, испытываемые пациентом, условия труда, социальные привычки, воздействия любых токсинов, алкоголизм в анамнезе, риск заражения ВИЧ или другой инфекционной болезнью и семейный анамнез неврологического заболевания), выполнение исследований, которые могут выявить причину нейропатического расстройства, и проведение исследований для определения объема, местоположения и типа повреждения нерва.

Общее объективное обследование и соответствующие исследования могут выявить наличие системного заболевания, вызывающего поражение нервов. При помощи анализов крови можно обнаружить диабет, дефицит витаминов, нарушение функции печени или почек, другие расстройства обмена веществ и признаки патологической активности иммунной системы. Исследование спинномозговой жидкости, которая окружает головной мозг и спинной мозг, может выявить патологические антитела, связанные с нейропатией. Более специализированные тесты могут выявить другие гематологические или сердечно-сосудистые заболевания, нарушения соединительной ткани или злокачественные заболевания.

Исследования мышечной силы, а также признаки судорог или подергиваний мышечных волокон указывают на вовлечение двигательного волокна. Оценка способности пациента регистрировать вибрацию, легкое прикосновение, положение тела, температуру и боль выявляет повреждение чувствительных нервов и может указывать повреждены ли малые или большие волокна чувствительных нервов.

На основании результатов неврологического обследования, объективного обследования, анамнеза пациента, и любого предыдущего скрининга или исследования, для помощи в определении характера и степени нейропатии может быть назначено дополнительное исследование. Иллюстративные технологии для оказания помощи в диагностике периферических нейропатий включают: компьютерную томографию, магнитно-резонансную томографию, электромиографию, определение скорости нервной проводимости, биопсию нерва или биопсию кожи. Аппараты, используемые в диагностике периферических нейропатий, включают, без ограничения, приведенные в патенте US № 7854703.

Компьютерная томография или КТ-скан представляет собой неинвазивный, безболезненный процесс, который используют для получения быстрых, четких двумерных изображений органов, костей и тканей. Рентгеновские лучи проходят через тело под разными углами и обнаруживаются с помощью компьютеризированного сканера. Данные обрабатываются и отображаются в виде изображений поперечного сечения или "срезов" внутренней структуры тела или органа. При помощи неврологических КТ-сканов можно обнаружить костные и сосудистые нарушения, некоторые опухоли и кисты головного мозга, грыжи межпозвоночных дисков, энцефалит, стеноз спинномозгового канала (сужение спинномозгового канала) и другие расстройства.

Магнитно-резонансная томография (МРТ) позволяет исследовать качество и размер мышц, обнаружить любую жировую замену мышечной ткани и определить, имеет ли нервное волокно повреждение в результате длительного сдавливания. Оборудование МРТ создает вокруг тела сильное магнитное поле. Затем через тело пропускают радиоволны, чтобы вызвать резонансный сигнал, который может быть обнаружен в теле под различными углами. Компьютер перерабатывает этот резонанс либо в трехмерное изображение или в двумерный "срез" сканируемой области.

Электромиография (ЭМГ) включает введение тонкой иглы в мышцу для сравнения величины присутствующей электрической активности в мышце в состоянии покоя и во время сокращения. ЭМГ исследования могут помочь различить мышечные и нервные расстройства.

Определение скорости нервной проводимости (СНП) может точно измерить степень повреждения больших нервных волокон и выявить, вызваны ли симптомы дегенерацией миелиновой оболочки или аксона. В ходе этого исследования зонд посредством электричества стимулирует нервное волокно, которое отвечает путем создания своего собственного электрического импульса. Электрод, который помещают дальше по ходу нерва, измеряет скорость передачи импульсов по аксону. Медленные скорости передачи и блокирование импульса, как правило, указывают на повреждение миелиновой оболочки, в то время как уменьшение силы импульсов является признаком дегенерации аксонов.

Биопсия нервов включает извлечение и исследование образца нервной ткани, чаще всего из голени. Несмотря на то, что это исследование может дать ценную информацию о степени повреждения нерва, оно является инвазивной процедурой, которую трудно выполнять, и которая сама по себе может вызвать побочные эффекты в виде нейропатии.

Биопсия кожи представляет собой анализ, во время которого врачи извлекают тонкий образец кожи и исследуют окончания нервных волокон. В отличие от СНП, он может выявить повреждения, присутствующие в меньших волокнах; в отличие от обычной биопсии нерва, биопсия кожи является менее инвазивной, имеет меньше побочных эффектов, и ее легче выполнять.

Способы наблюдения индивидуума в отношении демиелинизации или ремиелинизации известны в данной области техники. Наблюдение субъекта (например, пациента-человека) в отношении ремиелини-

зации, как определено в настоящем документе, означает оценку у субъекта изменения, например, улучшения одного или более параметров, которые свидетельствуют о ремиелинизации, например, можно наблюдать за улучшением одного или более симптомов демиелинизирующего расстройства. Такие симптомы включают любой из симптомов демиелинизирующего расстройства, описанного в настоящем документе. За ремиелинизацией также можно наблюдать с помощью способов, которые включают прямое определение состояния миелина у субъекта, например, можно измерить массу белого вещества с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) или измерить толщину миелиновых волокон посредством сканирования с помощью магнитно-резонансной спектроскопии (МРС) головного мозга.

В некоторых вариантах реализации оценку осуществляют в течение, по меньшей мере, 1 ч, например, по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 24 или 48 ч или, по меньшей мере, 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней или 20 дней или более, или, по меньшей мере, 1 недели, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель или более или их любой комбинации после введения, предпочтительно первого введения поликлональных IgG. Субъект может быть оценен во время одного или более из следующих периодов: до начала лечения; во время лечения или после введения одного или более элементов лечения. Оценивание может включать оценку необходимости дополнительного лечения, например, оценку необходимости изменения дозировки, частоты приема или продолжительности лечения. Оно также может включать оценку необходимости добавления или прекращения выбранного терапевтического воздействия, например, добавления или прекращения любого из способов лечения демиелинизирующих расстройств, описанных в настоящем документе. Например, продолжительное введение поликлональных IgG в случае необходимости может выполняться с одним или более дополнительными терапевтическими средствами. В предпочтительном варианте реализации, если получают предварительно выбранные результаты оценки, то предпринимают дополнительный шаг, например, субъекту вводят другой вид лечения или выполняют другое оценивание или исследование. Уровень ремиелинизации может использоваться для принятия решения относительно помощи пациенту, например, выбора или изменения курса лечения, или принятия решения о возмещении лечения третьей стороной.

В некоторых вариантах реализации наблюдение за ремиелинизацией у субъекта (например, субъекта-человека) может также включать наблюдение за уменьшением размера или количества воспалительных поражений (т.е. уплотнений) с использованием, например сканов магнитно-резонансной томографии (МРТ), сканов позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), диффузионно-взвешенной визуализации (ДВ-В или ДВ-МРТ), диффузионно-тензорной визуализации, миелографии, способов переноса намагниченности. В некоторых вариантах реализации наблюдение за ремиелинизацией у субъекта может включать выявление, например, (i) патологических белков, таких как крошечные фрагменты миелина, (ii) повышенных уровней или специфических типов лимфоцитов и/или (iii) патологических уровней молекул иммуноглобулина (IgG). В других вариантах реализации наблюдение за ремиелинизацией у субъекта может включать в себя оценку нейropsychологических изменений у субъекта (например, состояния различных способностей, таких как память, арифметические вычисления, внимание, суждение и аргументация). В некоторых вариантах реализации наблюдение за ремиелинизацией у субъекта (например, субъекта-человека) может включать исследование мочи пациента в отношении снижения уровней материала, подобного основному белку миелина (МВР-подобного материала), уровень этого вещества становится повышенным, когда происходит повреждение аксонов во время прогрессирования заболевания. В некоторых вариантах реализации, в которых демиелинизирующее расстройство поражает глаза или зрение субъекта, наблюдение за ремиелинизацией у субъекта может включать исследование на улучшение в отношении, например дальтонизма.

В настоящем документе представлены способы оценивания субъекта для определения, например, отвечает ли субъект или не отвечает на лечение демиелинизирующего расстройства, например, на терапию, увеличивающую ремиелинизацию у субъекта, такую как введение поликлональных IgG. Способ включает предоставление контрольного значения (например, значения перед введением) уровня или состояния миелина у субъекта и, необязательно, введение субъекту лекарственного средства, которое увеличивает ремиелинизацию (например, поликлональных IgG). В вариантах реализации, в которых вводят лекарственное средство, способ также включает предоставление значения уровня или состояния миелина у субъекта после введения (например, уровня или состояния миелина после введения ремиелинизирующей терапии), и сравнение значения после введения с контрольным значением, тем самым выполняя оценивание субъекта, например, определение того, отвечает или не отвечает субъект на терапию. Значение после введения (т.е. значение, соответствующее состоянию или уровню миелина у субъекта после ремиелинизирующей терапии) может быть определено, например, с помощью любого из способов оценки, описанных в настоящем документе. Контрольное значение (т.е. состояние или уровень миелина у субъекта перед лечением путем ремиелинизирующей терапии) также может быть определено, например, с помощью любого из способов оценки, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации определение того, что субъект отвечает, означает, что меньшая продолжительность лечения может/необходима/будет/в настоящее время применяется у данного субъек-

та (например, короче продолжительности лечения, рекомендованной субъекту, который не отвечает на терапию, или короче той продолжительности, которая в настоящее время используется с существующими видами терапии демиелинизирующих расстройств, и необязательно это показание заносят в протокол.

В некоторых вариантах реализации определение того, что субъект отвечает, означает, что меньшая продолжительность лечения противопоказана данному субъекту (например, продолжительность короче той, которая в настоящее время используется с существующими видами лечения демиелинизирующих расстройств, например, любым из видов лечения демиелинизирующих расстройств, описанных в настоящем документе), и, необязательно, это показание заносят в протокол.

В некоторых вариантах реализации предоставление сравнения значения после введения с контрольным значением включает: предоставление определения уровня миелина у субъекта после введения в первой временной точке (например, при этом первая временная точка представляет собой 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более дней (например, 3, 4, 5, 6, 8 или более недель (например, 3, 4, 6, 12 или более месяцев))) после начала назначения ремиелинизирующей терапии (например, поликлональных IgG); предоставление определения контрольного значения состояния или уровня миелина у субъекта во второй временной точке, которая предшествует первой временной точке (например, когда вторая временная точка предшествует или находится в пределах около 1, 2, 3, 4 или 5 дней начала назначения ремиелинизирующей терапии (например, поликлональных IgG); и предоставление сравнения уровня миелина у субъекта после введения с контрольным значением, при этом повышение уровней миелина у субъекта (например, уровни отличаются не более чем на около 60%, около 50%, около 40%, около 30%, около 20%, около 10%, около 5%, около 2%, или около 1%) что касается уровня после введения в сравнении с контрольным значением указывает на то, что субъект отвечает на лечение.

В некоторых вариантах реализации определение того, отвечает ли пациент на терапию, производится путем оценки у субъекта изменения, улучшения одного или более параметров, которые свидетельствуют о ремиелинизации, например, можно наблюдать за улучшением одного или более симптомов демиелинизирующего расстройства. Такие симптомы включают любой из симптомов демиелинизирующего расстройства, описанного в настоящем документе. Ремиелинизацию также можно наблюдать с помощью способов, которые включают прямое определение состояния миелина у субъекта, например, можно измерить массу белого вещества с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ), измерить толщину миелиновых волокон посредством сканирования с помощью магнитно-резонансной спектроскопии (МРС) головного мозга или любых других прямых измерений, описанных в настоящем документе.

В другом варианте реализации определение того, отвечает ли субъект на терапию можно также оценить с помощью любого другого способа оценки или устройства для выявления, описанного здесь, включая, но не ограничиваясь этим, наблюдение за пациентом в отношении уменьшения размера или количества воспалительных поражений (т.е. уплотнений); наблюдение за эндоневральной жидкостью пациента в отношении уменьшения наличия или количества, например, (i) повышенных уровней или специфических типов лимфоцитов и/или (ii) патологических уровней молекул иммуноглобулина (IgG); наблюдение за позитивными нейropsychологическими изменениями у пациента (например, состоянием различных способностей, таких как память, арифметические вычисления, внимание, суждение и аргументация); и/или наблюдение за мочой пациента в отношении уменьшения уровней материала, подобного основному белку миелина (МВР-подобного материала).

В некоторых вариантах реализации, по меньшей мере, 5% (например, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%) улучшения одного или более симптомов демиелинизирующего расстройства или других вышеописанных признаков после ремиелинизирующей терапии (например, терапии, которая стимулирует ремиелинизацию у субъекта, например, такой терапии, как поликлональные IgG) является достаточным для классификации пациента, как отвечающего на терапию.

IV. Приготовление поликлональных IgG

Препараты иммуноглобулинов в соответствии с настоящим изобретением могут быть получены из любых подходящих исходных материалов. Например, препараты иммуноглобулинов могут быть получены из донорской сыворотки, или моноклональных, или рекомбинантных иммуноглобулинов. В типичном примере кровь собрана от здоровых доноров. Как правило, кровь собирают у того же вида животных, что и субъект, которому будут вводить препарат иммуноглобулинов (обычно называемых "гомологичными" иммуноглобулинами). Иммуноглобулины выделяют из крови и очищают с помощью одной или нескольких соответствующих процедур, таких как, например, фракционирование по Кону, ультрацентрифугирование, электрофоретическая подготовка, ионообменная хроматография, аффинная хроматография, иммуноаффинная хроматография, фракционирование полиэтиленгликолем, спиртовое фракционирование, нанофильтрация, ультрафильтрация/диафильтрация и т.п. (См., например, публикации Cohn et al., J. Am. Chem. Soc. 68:459-75 (1946); Oncley et al., J. Am. Chem. Soc. 71:541-50 (1949); Barundern et al., Vox Sang. 7:157-74 (1962); Koblet et al., Vox Sang. 13:93-102 (1967); Teschner et al. Vox Sang (92):42-55 (2007); Hoppe et al. Munch Med Wochenschr (34): 1749-1752 (1967), Falksveden (Swedish Patent № 348942); Tanaka et al., Braz J Med Biol Res (33)37-30 (2000); Lebing et al., Vox Sang (84):193-201 (2003); патенты US под номера-

ми 5122373 и 5177194; PCT/US 2010/036470; и PCT/US 2011/038247; раскрытия которых включены в настоящий документ в качестве ссылки).

Для того чтобы инактивировать различные вирусные примеси, которые могут присутствовать в получаемых из плазмы продуктах, очищенный фильтрат PpTG может быть подвергнут обработке растворителем-детергентом (P/D). Способы обработки детергентом получаемых из плазмы фракций хорошо известны в данной области техники (для обзора см., Pelletier JP et al., Best Pract Res Clin Haematol. 2006;19(1):205-42). Обычно в сочетании со способами, представленными в настоящем документе, может быть использована любая стандартная P/D обработка.

Для дополнительной очистки и концентрации IgG может быть использована катионообменная и/или анионообменная хроматография. Способы очистки и концентрации IgG с помощью ионообменной хроматографии хорошо известны в данной области техники. Например, в патенте US № 5886154 описан способ, в котором осадок фракции II+III экстрагируют при низком уровне pH (в диапазоне от около 3,8 до 4,5) с последующим осаждением IgG с помощью каприловой кислоты, и в конце с осуществлением двух этапов анионообменной хроматографии. В патенте US № 6069236 описана схема хроматографической очистки IgG, которая вообще не основана на спиртовом осаждении. В PCT публикации № WO 2005/073252 описан способ очистки IgG, включающий экстрагирование осадка фракции II+III, обработку каприловой кислотой, обработку ПЭГ и единственный этап анионообменной хроматографии. В патенте US № 7186410 описан способ очистки IgG, включающий экстрагирование осадка фракции I+II+III или фракции II с последующим единственным этапом анионообменной хроматографии, который выполняется при щелочном уровне pH. В патенте US № 7553938 описан способ, включающий экстрагирование осадка фракции I+II+III или фракции II+III, обработку каприлатом и один или два этапа анионообменной хроматографии. В патенте US № 6093324 описан способ очистки, включающий использование макропористой анионообменной смолы, функционирующей при уровне pH в диапазоне от около 6,0 до около 6,6. В патенте US № 6835379 описан способ очистки, основанный на катионообменной хроматографии при отсутствии спиртового фракционирования. Раскрытия приведенных выше публикаций включены в настоящий документ в качестве ссылки во всей своей полноте для любых целей.

В целях снижения вирусной нагрузки композиции IgG, представленной в настоящем документе, композиция, может подвергаться нанофильтрации с помощью подходящего устройства для нанофильтрации. В некоторых вариантах реализации устройство для нанофильтрации будет иметь средний размер пор в диапазоне от около 15 нм до около 200 нм. Примеры нанофильтров, подходящих для этой цели включают, без ограничения, DVD, DV 50, DV 20 (Pall), Viresolve NFP, Viresolve NFR (Millipore), Planova 15N, 20N, 35N и 75N (Planova). В конкретном варианте реализации нанофильтр может иметь средний размер пор в диапазоне от около 15 нм до около 72 нм, или в диапазоне от около 19 нм до около 35 нм, или составляющий около 15 нм, 19 нм, 35 нм или 72 нм. В предпочтительном варианте реализации нанофильтр будет иметь средний размер пор около 35 нм, как, например в фильтре Asahi PLANOVA 35N или аналогичном. В конкретном варианте реализации композицию IgG, извлеченную на этапе анионного обмена, подвергают нанофильтрации с использованием нанофильтра, имеющего размер пор в диапазоне от 30 нм до 40 нм, предпочтительно 35 ± 2 нм. В другом предпочтительном варианте реализации нанофильтр будет иметь средний размер пор около 19 или 20 нм, как, например, в фильтре Asahi PLANOVA 20N (19 ± 2 нм) или аналогичном.

В конкретном варианте реализации композицию IgG, извлеченную на этапе анионного обмена, подвергают нанофильтрации с использованием нанофильтра, имеющего размер пор в диапазоне от 15 нм до 25 нм, предпочтительно 19 ± 2 нм.

В некоторых вариантах реализации иммуноглобулин получают из продуктов, содержащих гамма-глобулин, полученных при помощи способов спиртового фракционирования и/или ионообменной и аффинной хроматографии, хорошо известных специалистам в данной области техники. Обычно используется очищенная фракция II по Кону. Исходная паста фракции II по Кону, как правило, содержит около 95 процентов IgG и состоит из четырех подтипов IgG. Различные подтипы присутствуют во фракции II приблизительно в той же пропорции, в которой они находятся в пуле человеческой плазмы, из которой они получены. Фракцию II дополнительно очищают до введения в состав продукта, подлежащего введению. Например, пасту фракции II можно растворить в холодном очищенном водно-спиртовом растворе и удалить примеси с помощью осаждения и фильтрации. Для удаления спирта, после окончательной фильтрации суспензию иммуноглобулинов можно подвергнуть диализу или диафильтрации (например, с помощью мембран для ультрафильтрации, имеющих предел номинальной молекулярной массы меньше или равный 100000 дальтон). Раствор можно концентрировать или разбавлять до получения желаемой концентрации белка и можно дополнительно очищать с помощью способов, хорошо известных специалистам в данной области техники.

Для обогащения конкретного изотипа или подтипа иммуноглобулина могут быть использованы подготовительные этапы. Например, для того, чтобы обогатить смесь иммуноглобулинами IgG, или определенными подтипами IgG, может быть использована хроматография на сефарозе с белком А, белком G или белком Н. (См. в общих чертах публикации Harlow and Lane, Using Antibodies, Cold Spring Harbor

Laboratory Press (1999); Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); патент US № 5180810).

Могут быть использованы также коммерческие источники поликлональных иммуноглобулинов. Такие источники включают, но не ограничиваются перечисленным: Kiovig® 10% ВВИГ (Baxter Healthcare); Gammagard Liquid® 10% ВВИГ (Baxter Healthcare); Gammagard S/D® (Baxter Healthcare); Gammagard S/D® с менее чем 1 мг/мл IgA в 5% растворе (Baxter Healthcare); Gamunex®-C, 10% (Grifols USA); Flebogamma®, 5% и 10% ДИФ (Grifols USA); Privigen® 10% раствор (CSL Behring); Carimune® NF или Sandoglobulin® (CSL Behring); и Hizentra® 20% Liquid (CSL Behring); Octagam®, 5% и 10% ВВИГ (Octapharma AG); Gammanorm® 16,5% ПККИГ (Octapharma AG). Коммерческие источники препаратов иммуноглобулинов для использования в способах настоящего изобретения не являются крайне необходимыми.

Альтернативный подход состоит в использовании фрагментов антител с антиген-связывающей способностью, например, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv и rIgG. См., например, публикацию Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Kubu, J., *Immunology*, 3-е изд., W.H. Freeman & Co., New York (1998). Композиция поликлональных IgG по настоящему изобретению может включать фрагменты одного изотипа иммуноглобулинов, т.е. IgG, или может содержать смесь фрагментов иммуноглобулинов различных изотипов (например, IgA, IgD, IgE, IgG и/или IgM). Препарат Fc также может содержать преимущественно (по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% или, по меньшей мере, 99%) фрагменты изотипа иммуноглобулина IgG, и может содержать незначительные количества других подтипов. Например, препарат Fc может содержать по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% фрагментов IgG. Кроме того, препарат поликлональных IgG может содержать один подтип IgG или смесь двух или более подтипов IgG. Подходящие подтипы IgG включают IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В конкретном варианте реализации препарат поликлональных IgG содержит фрагменты IgG1.

В любое подходящее время в ходе приготовления иммуноглобулины могут расщепляться для получения фрагментов Fab, F(ab') и/или F(ab')₂, если это применимо. Подходящим для расщепления ферментом является, например, папаин, пепсин или плазмин. (См., например, публикации Harlow and Lane, *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999); Plan and Makula, *Vox Sanguinis* 28:157-75 (1975).) После расщепления, части Fc могут быть отделены от фрагментов Fab, F(ab') и/или F(ab')₂ при помощи, например, аффинной хроматографии, ионообменной хроматографии, гель-фильтрации и т.п. В конкретном примере для отделения фрагмента Fc от фрагментов Fab иммуноглобулины расщепляли с помощью папаина. Затем смесь расщепления подвергают катионообменной хроматографии для отделения фрагментов Fc от фрагментов Fab.

Фрагменты иммуноглобулинов могут быть также получены из гибридом или другой культуральной системы, экспрессирующей моноклональное антитело. (См., например, публикации Kohler and Milstein, *Nature* 256:495-97 (1975); Hagiwara and Yuasa, *Hum. Antibodies Hybridomas* 4:15-19 (1993); Kozbor et al., *Immunology Today* 4:72 (1983); Cole et al., in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., стр. 77-96 (1985).) Человеческие моноклональные антитела могут быть получены, например, из человеческого гибридом (см., например, публикацию Cote et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-30 (1983)) или путем трансформации В-клеток человека вирусом EBV *in vitro* (см., например, Cole et al., выше). Моноклональные антитела, полученные из гибридом, могут быть очищены, а фрагменты Fc отделены от фрагментов Fab, F(ab') и/или F(ab')₂ так, как описано в настоящем документе, или, как известно специалисту в данной области техники.

Фрагменты IgG могут быть также получены рекомбинантным способом, например, из систем культур эукариотических клеток. Например, одноцепочечные Fv-фрагменты (scFv) могут быть получены рекомбинантным способом путем трансфекции клеток яичника китайского хомячка (CHO) вектором, содержащим последовательность ДНК, кодирующую Fv-фрагменты.

Способы создания таких рекомбинантных клеток млекопитающих описаны, например, в публикациях Sambrook and Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3-е изд. (Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York) 2001) и Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 4-е изд. (John Wiley & Sons, Inc. (New York) 1999) и известны специалистам в данной области техники. Рекомбинантные фрагменты иммуноглобулина также могут быть получены в других клеточных линиях млекопитающих, таких как клетки почек детеныша хомяка (ВНК). Способы культивирования рекомбинантных клеток для получения рекомбинантных белков также известны в данной области техники.

Множество других систем экспрессии может быть использовано для экспрессии рекомбинантных фрагментов иммуноглобулинов IgG. Они включают, но не ограничиваются перечисленным, системы клеток насекомых и микроорганизмов, таких как дрожжи или бактерии, которые были трансфицированы или трансформированы посредством кассеты экспрессии, кодирующей заданный фрагмент IgG. В некоторых вариантах реализации микроорганизм может быть необязательно сконструирован для воспроизведения модели гликозилирования фрагментов IgG млекопитающих или человека.

В некоторых вариантах реализации могут быть использованы дополнительные подготовительные

этапы для того, чтобы сделать препарат иммуноглобулина безопасными для использования в способах согласно настоящему изобретению. Такие этапы могут включать, например, обработку растворителем/детергентом, пастеризацию и стерилизацию. Могут использоваться дополнительные подготовительные этапы для обеспечения безопасности препарата поликлональных IgG. Такие подготовительные этапы могут включать, например, ферментативный гидролиз, химическую модификацию с помощью восстановления и алкилирования, сульфирование, обработку В-пропиолактоном, обработку при низком уровне pH и т.п. Описания подходящих способов также могут быть найдены, например, в патентах US под номерами 4608254; 4687664; 4640834; 4814277; 5864016; 5639730 и 5770199; публикациях Romer et al., *Vox Sang.* 42:62-73 (1982); Romer et al., *Vox Sang.* 42:74-80 (1990); и Rutter, J. *Neurosurg. Psychiat.* 57 (доп.):2-5 (1994) (раскрытия которых включены в настоящий документ в качестве ссылки).

V. Фармацевтические композиции и дозировки

Индивидуум, для которого введение поликлональных IgG, как изложено в настоящем документе, является эффективной схемой терапии демиелинизирующей периферической нейропатии, предпочтительно представляющей собой человека, но может быть любым млекопитающим. Таким образом, как может легко понять специалист в данной области техники, способы и фармацевтические композиции по настоящему изобретению особенно пригодны для введения любому млекопитающему, включая домашних животных, таких как представители семейства кошачьих или псовых, но никоим образом не ограничиваясь ими, сельскохозяйственных животных, таких как представители крупного рогатого скота, лошадей, коз, овец и свиней, но, не ограничиваясь ими, диких животных (в дикой природе или в зоологическом саду, лабораторных животных, таких как мыши, крысы, кролики, козы, овцы, свиньи, собаки, кошки и т.д., т.е. для ветеринарного применения).

Необходимо понимать, что фармацевтическую композицию, содержащую поликлональные IgG в соответствии с настоящим изобретением можно вводить различными способами, известными в данной области техники. Путь и/или способ введения изменяется в зависимости от желаемых результатов, но обычно будет внутривенным, внутримышечным, интраназальным, внутривнутрибрюшинным, внутриартериальным или подкожным.

Фармацевтическая композиция может включать приемлемый носитель, подходящий для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии).

Поликлональные IgG настоящего изобретения могут быть использованы для местного или системного введения для профилактического и/или терапевтического лечения. Типичные способы введения включают, без ограничения, трансдермальное, подкожное, внутриартериальное, внутривенное, интраназальное, внутримышечное, ректальное, трансбуккальное и пероральное введение. Фармацевтические композиции можно вводить в различных стандартных лекарственных формах в зависимости от способа введения. Например, стандартные лекарственные формы включают порошки, таблетки, пилюли, капсулы, суппозитории, ампулы и леденцы. Необходимо только, чтобы активный ингредиент составлял эффективное количество, т.е. чтобы подходящая эффективная доза соответствовала используемой лекарственной форме, применяемой в однократной или многократных стандартных дозах. Точные индивидуальные дозировки, а также суточные дозы, конечно, будут определяться в соответствии со стандартными медицинскими принципами по указанию врача или ветеринара. Фармацевтические композиции поликлональных иммуноглобулинов IgG по настоящему изобретению, при пероральном введении, предпочтительно защищены от переваривания. Это обычно выполняется либо образованием комплексов этих антител с композицией для придания устойчивости к кислотному и ферментативному гидролизу, или упаковкой этих антител в подходящем устойчивом носителе, таком как везикула, в частности, липосома (см. Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat et al., в публикации *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (ред.), Liss, New York, стр. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, там же, стр. 317-327; см. в целом там же). Средства защиты белков от переваривания хорошо известны в данной области техники.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению особенно пригодны для парентерального введения, например, внутривенного введения или введения в полость тела или просвет органа. Композиции для введения обычно включают в себя композицию поликлональных IgG с фармацевтически приемлемым носителем, предпочтительно водным носителем. Могут быть использованы различные водные носители, например, буферный солевой раствор и т.п.

Разбавители, которые могут быть использованы в фармацевтических композициях (например, гранулированных), содержащих активное соединение, подходящих для введения в состав таблеток, драже, капсул и таблеток включают следующие: (а) наполнители и вещества, увеличивающие объем, например крахмал, сахара, маннитол и кремниевая кислота; (б) связывающие вещества, например карбоксиметилцеллюлоза и другие производные целлюлозы, альгинаты, желатин и поливинилпирролидон; (в) увлажняющие средства, например глицерин; (г) вещества, способствующие дезинтеграции лекарственного средства, например агар-агар, карбонат кальция и бикарбонат натрия; (д) средства, тормозящие растворение, например парафин; (е) ускорители всасывания, например четвертичные соединения аммония; (ж) поверхностно-активные вещества, например цетиловый спирт, глицеринмоностеарат; (з) носители, спо-

собствующие адсорбции, например каолин и бентонит; (и) смазочные вещества, например тальк, стеарат кальция и магния и твердые полиэтиленгликоли. Разбавители для использования в фармацевтических композициях, подходящих для введения в состав суппозиторий, могут, например, представлять собой обычные водорастворимые разбавители, такие как полиэтиленгликоли и жиры (например, масло какао и высокие сложные эфиры (например, C₁₄-спирт с C₁₆-жирной кислотой)) или смеси этих разбавителей.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения являются стерильными и свободными от нежелательных веществ. Растворы и суспензии для парентерального введения, например, вода или арахисовое масло, содержащиеся в ампулах, должны быть стерильными и, при необходимости, изотоничными в отношении крови. Эти композиции могут быть простерилизованы с помощью обычных, хорошо известных способов стерилизации. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, которые требуются для создания близких к физиологическим условий, такие как средства для регулирования уровня pH, буферные средства, средства, регулирующие тоничность и т.п., например ацетат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, лактат натрия и т.п. Концентрация поликлональных IgG в этих препаратах может изменяться в широких пределах, и будет выбрана в первую очередь на основе объемов жидкости, показателей вязкости, массы тела пациента и т.п. в соответствии с конкретным выбранным способом введения и потребностями пациента.

Соответствующую текучесть композиции можно поддерживать, например, посредством использования покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и посредством использования поверхностно-активных веществ. В некоторых случаях в композицию предпочтительно включать изотонические средства, например сахара, такие как сахароза, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит и хлорид натрия. Могут быть также использованы стабилизаторы, такие как никотинамид, L-пролин, L-глицин или L-изолейцин. Длительная абсорбция инъекционной композиции может быть обеспечена включением в композицию средства, которое задерживает абсорбцию, например, моностеарата алюминия или желатина.

Фармацевтические композиции, являющиеся суспензиями, могут содержать обычные разбавители, такие как жидкие разбавители, например воду, этиловый спирт, пропиленгликоль, поверхностно-активные вещества (например, этоксилированный изостеариловый спирт, полиоксиэтиленсорбиты и сложные эфиры сорбитана), микрокристаллическую целлюлозу, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант или их смеси.

Фармацевтические композиции могут также содержать красители и консерванты, а также добавки в виде отдушек и ароматизаторов (например, масло мяты перечной и масло эвкалипта) и подсластители (например, сахарин и аспартам).

Фармацевтические композиции обычно содержат от 0,5 до 90% активного ингредиента по массе от общей композиции.

В дополнение к моноклональным антителам, фармацевтические композиции и лекарственные средства могут также содержать другие фармацевтически активные соединения, например, стероиды, противовоспалительные средства или подобные.

Любой разбавитель в лекарственных средствах по настоящему изобретению может представлять собой любой из упомянутых выше в отношении фармацевтических композиций. Такие лекарственные средства в качестве единственного разбавителя могут включать растворители с молекулярной массой менее чем 200.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть получены в соответствии со способами, хорошо известными и обычно используемыми на практике в данной области техники. См., например, публикацию Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20^e изд., 2000; и Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Фармацевтические композиции предпочтительно изготавливают в условиях, соответствующих стандартам GMP. Как правило, в фармацевтических композициях настоящего изобретения используют терапевтически эффективную дозу или эффективную дозу препарата иммуноглобулина. Фармацевтическая композиция может быть введена в состав лекарственных форм обычными способами, известными специалистам в данной области техники. Схемы дозирования корректируются для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, может быть введена одна болюсная доза, может быть введено несколько отдельных доз в течение периода времени, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена, как показано остротой терапевтической ситуации. Преимущественным может быть приготовление парентеральных композиций в стандартной лекарственной форме для простоты введения и единства дозирования. Термин "стандартная лекарственная форма", как он используется в настоящем документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве стандартных доз для субъектов, подлежащих лечению, при этом каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное таким образом, чтобы создавать желательный терапевтический эффект в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем.

Фактические уровни доз могут изменяться таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа у конкретного пациента, при этом не являясь токсичным для пациента. Врач может начинать с доз фармацевтической

композиции на меньших уровнях, чем требуется для достижения желаемого терапевтического эффекта, а затем постепенно увеличивать дозу до тех пор, пока не будет достигнут желаемый эффект. В общем, эффективные дозы изменяются в зависимости от многих различных факторов, в том числе от конкретного заболевания или состояния, подлежащего лечению, его тяжести, физиологического состояния пациента, введения других лекарственных средств, и от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим.

Композицию поликлональных IgG можно вводить в разнообразных случаях. Интервалы между введением однократных доз могут быть ежедневными, еженедельными, раз в две недели, каждые 3 недели, каждые 4 недели, ежемесячно или ежегодно. Интервалы также могут быть непостоянными, по показаниям в соответствии с измерением терапевтического прогресса у пациента. Дозировка и частота введения могут изменяться в зависимости от периода полувыведения антител у пациента.

В качестве альтернативы поликлональные IgG могут быть доставлены в системе с контролируемым высвобождением. Например, поликлональные иммуноглобулины можно вводить с помощью внутривенной инфузии, имплантируемого осмотического насоса, трансдермального пластыря, липосом или других способов введения. В одном варианте реализации может быть использован насос (см. Langer, выше; Sef-ton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)). В другом варианте реализации могут быть использованы полимерные материалы (см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (ред.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (ред.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983); см. также Levy et al., Science 228:190 (1985); During et al., Ann. Neurol. 25:351 (1989); Howard et al., J. Neurosurg. 71:105 (1989)). В еще одном варианте реализации система с контролируемым высвобождением может быть помещена в непосредственной близости от терапевтической мишени, т.е. от места повреждения в периферической нервной системе, нуждаясь только в части системной дозы (см., например, Goodson, в Medical Applications of Controlled Release, выше, том 2, стр. 115-138 (1984)). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре автора Langer (Science 249:1527-1533 (1990)).

В случае препарата поликлональных иммуноглобулинов IgG, обычно используется внутривенный иммуноглобулин (ВВИГ). Композиции ВВИГ предназначены для введения путем инъекции. Поскольку в препаратах поликлональных IgG достигается исключительно высокая концентрация иммуноглобулинов (например, в некоторых вариантах реализации 10% мас./об., в других вариантах реализации 15% мас./об., еще в других вариантах реализации 20% мас./об., и в других вариантах реализации вплоть до 25% мас./об.), что значительно снижает объем терапевтически эффективной дозы, композиция по настоящему изобретению является особенно полезной для подкожного и/или внутримышечного введения пациенту, а также для внутривенного введения.

Термин "эффективное количество" относится к количеству препарата поликлональных IgG, которое приводит к улучшению или коррекции медицинского состояния, подлежащего лечению, у субъекта (например, для лечения травмы периферических нервов, для лечения вызванной воздействием токсинов периферической нейропатии и т.д.). Эффективное количество для введения субъекту может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе тела, тяжести заболевания, пути введения (например, внутривенный в сравнении с подкожным) и ответе на терапию.

Схема дозирования может изменяться в зависимости от периода полувыведения из циркуляции и используемой композиции. Композиции вводят совместимым с лекарственной формой способом в терапевтически эффективном количестве. Точные количества активного ингредиента, необходимые для введения, зависят от решения лечащего врача и являются индивидуальными для каждого пациента.

Подходящую дозу поликлональных IgG можно вводить пациенту еженедельно, один раз в две недели, каждые 3 недели, каждые 4 недели или ежемесячно, при этом доза находится в диапазоне от около 0,050 до 5 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,095 до 4,7 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,140 до 4,4 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,185 до 4,1 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,230 до 3,8 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,275 до 3,5 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,320 до 3,2 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,365 до 2,9 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,410 до 2,6 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,455 до 2,3 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,500 до 2,0 г/килограмм массы тела пациента.

В альтернативных вариантах реализации композицию поликлональных IgG настоящего изобретения вводят субъекту еженедельно, один раз в две недели, каждые 3 недели, каждые 4 недели или ежемесячно в дозе от около 0,05 до 4,9 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 4,8 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 4,7 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 4,6 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 4,5 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 4,4 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 4,3 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 4,2 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 4,1 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 4,0 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 3,9 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 3,8 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 3,7 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 3,6 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 3,5 г/килограмм

массы тела пациента, от около 0,05 до 3,4 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 3,3 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 3,2 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 3,1 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 3,0 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 2,9 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 2,8 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 2,7 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 2,6 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 2,5 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 2,4 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 2,3 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 2,2 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 2,1 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 2,0 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 1,9 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 1,8 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 1,7 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 1,6 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 1,5 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 1,4 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 1,3 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 1,2 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 1,1 г/килограмм массы тела пациента, от около 0,05 до 1,0 г/килограмм массы тела пациента. Врачи, обладающие знаниями относительно заболеваний, подлежащих лечению препаратами IgG, могут определить соответствующую дозу для пациента в соответствии с критериями, известными в данной области техники.

В других вариантах реализации продукт ВВИГ можно каждый раз вводить субъекту в диапазоне дозы от около 0,2 г/килограмм массы тела пациента до около 4 г/килограмм массы тела пациента, и частота введения может составлять от двух раз в неделю, одного раза в неделю, двух раз в месяц, одного раза в месяц или одного раза в два месяца. Один типичный диапазон доз ВВИГ находится в диапазоне от около 0,1 до около 1 или от около 0,2 до от около 0,8 г/кг массы тела пациента, при этом введение обычно осуществляют с частотой два раза в месяц или один раз в месяц. Например, некоторым пациентам ВВИГ вводят в дозе 0,2, 0,4, 0,6 или 0,8 г/кг массы тела пациента в соответствии со схемой два раза в месяц. В других случаях ВВИГ вводят в дозе 0,2, 0,4, 0,6 или 0,8 г/кг массы тела пациента в соответствии со схемой один раз в месяц.

Продолжительность лечения демиелинизирующей периферической нейропатии ВВИГ может варьироваться: она может быть короткой и составлять 3 или 6 месяцев, или может продолжаться до 18 месяцев, 2 лет, 5 лет или 10 лет. В некоторых случаях лечение ВВИГ может продолжаться весь остаток естественной жизни пациента. Эффективность лечения ВВИГ может оцениваться в течение всего курса введения по истечении определенного периода времени, например, каждые 3 месяца или каждые 6 месяцев для 18-месячного плана лечения. В других случаях эффективность может быть оценена каждые 9 или 12 месяцев для более длительного курса лечения. Схема введения (доза и частота) может быть скорректирована соответствующим образом для любого последующего введения.

Для внутривенного введения, поликлональные IgG вводят с типичной начальной скоростью инфузии, составляющей 0,5 мл/кг/час (0,8 мг/кг/мин) в течение 30 мин, тогда как типичная поддерживающая скорость инфузии при хорошей переносимости может представлять увеличение скорости каждые 30 мин вплоть до 5 мл/кг/ч (8 мг/кг/мин). Продолжительность проведения инфузии могут меняться в зависимости от дозы, скорости инфузии и переносимости.

Для подкожного введения индивидуумам с массой тела пациента 40 кг и более типичная начальная скорость инфузии составляет 30 мл/локализация при 20 мл/ч/локализация, тогда как типичная поддерживающая скорость инфузии составляет 30 мл/локализация при 20-30 мл/ч/локализация. Для подкожного введения индивидуумам с массой тела пациента менее 40 кг, типичная начальная скорость инфузии составляет 20-30 мл/локализация при 15 мл/ч/локализация, тогда как типичная поддерживающая скорость инфузии составляет 20 мл/локализация при 15-20 мл/ч/локализация. Продолжительности проведения инфузии могут меняться в зависимости от дозы, скорости инфузии и переносимости.

В соответствии с настоящим изобретением продолжительность, необходимая для завершения курса лечения, может быть определена лечащим врачом и может быть от короткой, составляющей один день до более чем одного месяца. В некоторых вариантах реализации курс лечения может составлять от 1 до 6 месяцев.

Способы приготовления композиций для парентерального введения известны или очевидны специалистам в данной области техники и описаны более подробно в таких публикациях, как Remington's Pharmaceutical Science, 15-е изд., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980).

VI. Комбинированная терапия

В некоторых вариантах реализации поликлональные IgG могут быть введены субъекту в виде комбинированной терапии с другим лечением, например, другим лечением демиелинизирующего расстройства (например, любого из демиелинизирующих расстройств, описанных в настоящем документе. Например, комбинированная терапия может включать введение субъекту (например, пациенту-человеку) одного или более дополнительных средств, обеспечивающих терапевтический эффект субъекту, имеющему демиелинизирующее расстройство или риск его развития. В некоторых вариантах реализации поликлональные IgG и одно или больше дополнительных средств вводят одновременно. В других вариантах реализации поликлональные IgG вводят первыми по времени, а одно или больше дополнительных средств вводят вторыми по времени. В некоторых вариантах реализации, одно или больше дополнитель-

ных средств вводят первыми по времени, а поликлональные IgG вводят вторыми по времени. Поликлональные IgG могут заменить или дополнить предшествующую или проводимую в настоящее время терапию. Например, при лечении поликлональными IgG, введение одного или больше дополнительных средств может прекращаться или уменьшаться, например, введение может осуществляться на более низких уровнях. В других вариантах реализации введение предыдущей терапии поддерживается. В некоторых вариантах реализации предыдущая терапия будет поддерживаться до тех пор, пока уровень поликлональных IgG не достигнет уровня, достаточного для обеспечения терапевтического эффекта. Два вида терапии могут быть введены в комбинации.

В некоторых вариантах реализации индивидууму, получающему первый вид терапии демиелинизирующего расстройства, например, интерферон бета 1a (авонекс), интерферон бета 1b (ребиф), глатирамера ацетат (копаксон), митоксантрон (новантрон), азатиоприн (имуран), циклофосфамид (цитоксан или неозар), циклоспорин (сандиммун), метотрексат, кладрибин (лейстатин), метилпреднизолон (депо-медрол или солу-медрол), преднизолон (дельтазон), преднизолон (дельта-кортеф), дексаметазон (медрол или декадрон), адренокортикотропный гормон (АКТГ), или кортикотропин (актар), также можно вводить поликлональные IgG. В некоторых вариантах реализации при введении человеку поликлональных IgG, первую терапию прекращают. В других вариантах реализации человека наблюдают в отношении первого предварительно выбранного результата, например, улучшения одного или больше из симптомов демиелинизирующего расстройства (например, повышение ремиелинизации), например, любого из симптомов демиелинизирующих расстройств, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации, когда наблюдается первый предварительно выбранный результат, лечение поликлональными IgG уменьшают или прекращают. В некоторых вариантах реализации после прекращения лечения поликлональными IgG, человека затем наблюдают в отношении второго предварительно выбранного результата, например, ухудшения симптома демиелинизирующего расстройства. Когда наблюдается второй предварительно выбранный результат, введение поликлональных IgG к человеку возобновляют или увеличивают, или введение первого вида терапии восстанавливают, или человеку вводят как поликлональные IgG, или повышенное количество поликлональных IgG, так и первую терапевтическую схему.

В одном варианте реализации человек, получающий первый вид терапии демиелинизирующего расстройства, которого затем лечат поликлональными IgG, продолжает получать первую терапию в том же или в уменьшенном количестве. В другом варианте реализации лечение первым видом терапии прекращается по времени с лечением поликлональными IgG, но лечение первым видом терапии впоследствии прекращают.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективное количество поликлональных IgG вводят совместно с противовоспалительным средством. Противовоспалительные средства представляют собой хорошо известный класс фармацевтических средств, которые уменьшают воспаление, воздействуя на механизмы организма (Stedman's Medical Dictionary 26 изд., Williams and Wilkins, (1995); Physicians Desk Reference 51 изд., Medical Economics, (1997)).

Противовоспалительные средства, пригодные для применения со способами настоящего изобретения, включают нестероидные противовоспалительные средства (НПВС). НПВС обычно подавляют способность организма синтезировать простагландины. Простагландины представляют собой семейство гормоноподобных химических веществ, некоторые из которых вырабатываются в ответ на повреждение клеток. Конкретные НПВС, одобренные для введения человеку, включают напроксен натрия, диклофенак, сулиндак, оксaproзин, дифлунизал, аспирин, пироксикам, индометацин, этодолак, ибупрофен, фенпрофен, кетопрофен, мефенамовую кислоту, набуметон, толметин натрия и кеторолак трометамин.

Другие противовоспалительные средства, пригодные для применения со способами настоящего изобретения, включают салицилаты, такие как, например, салициловая кислота, ацетилсалициловая кислота, салицилат холина, салицилат магния, салицилат натрия, олсалазин и салсалат.

Другие противовоспалительные средства, пригодные для применения со способами настоящего изобретения, включают ингибиторы циклооксигеназы (ЦОГ). ЦОГ катализирует превращение арахидоната в простагландин H₂ (PGH₂); ингибитор ЦОГ ингибирует эту реакцию. ЦОГ также известна как простагландин H-синтаза, или PGH-синтаза. У нескольких видов были выделены два гена ЦОГ: ЦОГ-1 и ЦОГ-2. В большинстве тканей имеется жесткая регуляция ЦОГ-2 и, как правило, она индуцируется только при патологических состояниях, таких как воспаление, ревматический и остеоартрит, заболевание почек и остеопороз. Считается, что ЦОГ-1 экспрессируется в основном для поддержания функции тромбоцитов и почек и гомеостаза между ними. Типичные ингибиторы ЦОГ, пригодные для применения со способами настоящего изобретения, включают этодолак, целебрекс, мелоксикам, пироксикам, нимесулид, набуметон и рофекоксиб.

Предпочтительные противовоспалительные средства, которые могут быть включены в полимерную матрицу для введения в способах настоящего изобретения включают: изониксин, амтолметин гуацил, проглуметацин, пикетопрофен, дифенамизол, эпризол, апазон, фепразон, моразон, фенилбутозон, пипебузон, пропиофеназон, рамифеназон, тиазолинобутозон, аспирин, бенорилат, ацетилсалицилат кальция, этерсалат, имидазолсалицилат, лизинацетилсалицилат, морфолина салицилат, 1-нафтилсалицилат, фе-

ниацетилсалицилат, ампроксикам, дроксикам, S-аденозилметионин, амиксетин, бензидамин, буколом, дифенпирамид, эморфазон, гвайазулен, набуметон, нимесулид, проквазон, супероксиддисмутаза и тенидап.

Противовоспалительные средства, которые могут быть добавлены к полимеру для введения в способ настоящего изобретения, включают: этофенамат, тальнифлумат, терофенамат, ацетатацин, алклофенак, буфксамак, цинметацин, клопирак, фелбинак, фенклозная кислота, фентиазак, ибуфенак, индометацин, изофезолак, изоксепак, лоназолак, метиазиновая кислота, мофезолак, оксаметацин, пиразолак, сулиндак, тиарамида, толметин, тропезин, зомепирак, бумадизон, бутибуфен, фенбуфен и ксенбуцин, клиданак, кеторолак, тиноридин, беноксапрофен, бермопрофен, буюклоксая кислота, фенопрофен, флуноксапрофен, флурбипрофен, ибупрофен, ибупроксам, индопрофен, кетопрофен, локсопрофен, напроксен, оксапрозин, пирпрофен, пранопрофен, продзиновая кислота, супрофен, тиетрофеновая кислота, залтопрофен, бензиперилон, мофебутазон, оксифенбутазон, суксифузон, ацетаминосалол, парсалмид, фенилсалицилат, салацетамид, салицилсерная кислота, изоксикан, пироксикам и теноксикам, эпсилон-ацетамидокапроновая кислота, бендазак, альфа-бисаболл, паранилин, перизоксаль и зилеутон.

Противовоспалительные средства, которые могут быть включены в остов полимера для введения в способ настоящего изобретения включают: энфенамовую кислоту, ацеклофенак, глюкометацин, алминопрофен, кайпрофен, ксинопрофен, салсалат, 3-амино-4-гидроксимасляную кислоту, дитазол, фепадаинол и оксацепрол.

Противовоспалительные средства, обладающие подходящей орто функциональностью для включения в остов полимера формулы (I), как описано в настоящем документе, включают флуфенамовую кислоту, меклофенамовую кислоту, мефенамовую кислоту, нифлумовую кислоту, толфенамовую кислоту, амфенак, бромфенак, диклофенак натрия, этодолак, бромосалигенин, дифлунизал, фендозал, гентизовую кислоту, гликоля салицилат, салициловую кислоту, мезаламин, олсалазин, салициламид О-уксусной кислоты, сульфасалазин.

Следует понимать, что для любого противовоспалительного средства, которое упоминается в настоящем документе под коммерческим наименованием, может быть использовано или коммерческое наименование продукта или активный ингредиент, обладающий противовоспалительной активностью продукта. Кроме того, предпочтительные средства, идентифицированные в настоящем документе для включения в остов полимера, могут также предпочтительно быть добавлены к полимеру или могут быть включены в полимерную матрицу. Предпочтительные средства, которые могут быть добавлены к полимеру, предпочтительно могут также быть включены в полимерную матрицу.

5. Примеры

Для иллюстрации настоящего изобретения ниже приведены примеры. Эти примеры не предназначены для ограничения настоящего изобретения любым конкретным применением или теорией действия.

Пример 1. Исследование влияния ВВИТ на шванновские клетки.

Прямое влияние поликлональных иммуноглобулинов, полученных из сыворотки человека на гомеостаз, дифференциацию и созревание шванновских клеток, продемонстрированное с помощью различных молекулярных и клеточных переменных, исследовали с помощью трех моделей: 1) модель культивирования первичных шванновских клеток крысы; 2) модель шванновских клеток с супрессией p57kip2; 3) совместное культивирование нейронов ПНС и миелинизирующих шванновских клеток.

1.1. Подготовка модели 1 шванновских клеток крысы. В этой модели культивировали наивные первичные шванновские клетки (ШК), выделенные из седалищных нервов новорожденных крыс. На этой стадии ШК являются незрелыми, и процессы дифференциации еще не инициированы. В культуре, не происходит их прогресса по программе дифференциации, и они остаются пролиферативными, но незрелыми, скорее всего, в связи с наличием внутренних ингибиторов дифференциации (Heinen et al., 2008a).

1.2. Подготовка модели 2 шванновских клеток с супрессией p57kip2. Авторы настоящего изобретения идентифицировали ген p57kip2 в качестве нового внутреннего ингибитора дифференциации, созревания и миелинизации миелинизирующих глиальных клеток. Было продемонстрировано, что длительная супрессия гена p57kip2, зависящая от мшРНК, выключает первичную дифференциацию ШК от аксонального контакта. Это было показано посредством выхода клеточного цикла, измененной морфологии ШК, а также индуцированной экспрессии миелина (Küry et al., 2002; Heinen et al., 2008a; Heinen et al., 2008b). В этой второй модели, ШК с супрессией p57kip2, использовали для сравнения с контрольными трансфицированными клетками, т.е. недифференцирующимися клетками. Эта культуральная система обеспечивает уникальную возможность наблюдать количественным образом дифференциацию и созревание ШК *in vitro* в отсутствие аксонов.

1.3. Подготовка модели 3 совместной культуры нейронов ПНС и миелинизирующих шванновских клеток. В этой модели были созданы совместные культуры миелинизирующих нейронов/ШК. Культуры были приготовлены из ганглиев заднего корешка эмбрионов крыс линии Вистар или мышей линии C57/BL6, содержащих как незрелые чувствительные нейроны, так и предшественников шванновских клеток ПНС. Это совместное культивирование имитирует ситуацию *in vivo*, и предоставляет возможность изучения процесса окончательного обертывания/миелинизации и возможности влияния на это сложное взаимодействие введением иммуноглобулинов. Оптимизацию условий и подготовки совместной культуры выполняли в соответствии с установленными протоколами, используемыми в лаборатории

изобретателей или протоколом, опубликованным Päiväläinen et al., (2008) с некоторыми изменениями. Стимуляцию ВВИГ проводили параллельно для инициации процесса миелинизации с помощью диализированных препаратов ВВИГ/буфера. Диализ ВВИГ/буфера проводили против среды клеточной культуры без добавок. Все эксперименты проводили с одной концентрацией ВВИГ: 20 мг/мл. Продолжительность стимуляции определяли с помощью анализа кинетики миелинизации (образование междуузлия) через 3 и 6 дней после добавления диализированного ВВИГ/буфера.

1.4. Морфология клеток. Морфологию клеток исследовали в модели 1 (крысиные ШК в культуре) и модели 2 (ШК с супрессией p57kip2) в течение периода до 9 дней со стимуляцией 10 мг/мл и 20 мг/мл ВВИГ для модели 1 (для наблюдения дозовой зависимости) и в течение периода до 7 дней стимуляции (9 дней трансфекции) для модели 2. Эксперименты проводили как с недиализированными, так и с диализированными препаратами ВВИГ и буфера. Диализ ВВИГ и буфера проводили против среды клеточной культуры без добавок. Все эксперименты модели 2 проводили с одной концентрацией диализированного ВВИГ (20 мг/мл). В модели 2 кинетики роста и дифференциации клеток также определяли путем измерения длины выступа клеток через 3 и 7 дней стимуляции диализованным ВВИГ.

1.5. Смерть/пролиферация клеток. Смерть/пролиферацию клеток исследовали в модели 1 после 2 дней стимуляции недиализированными и диализированными препаратами ВВИГ/буфера. Диализ ВВИГ/буфера проводили против среды клеточной культуры без добавок. Все эксперименты проводили с одной концентрацией ВВИГ (20 мг/мл). Для измерения клеточной пролиферации использовали два анализа: иммуноцитохимическое окрашивание против Ki-67 антигена и иммуноцитохимическое окрашивание против BrdU. Антиген Ki-67 представляет собой ядерный белок, который служит в качестве клеточного маркера пролиферации. BrdU (бромдезоксисуридин) представляет собой нуклеотидный аналог тимидина, используемый для маркировки пролиферирующих клеток. Иммуноцитохимическое окрашивание против каспазы-3 использовали в качестве маркера апоптоза. Каспаза-3 представляет собой протеазу, которая активируется в апоптотных клетках и, следовательно, используется в качестве маркера клеточной смерти. Клетки фиксировали после двух различных продолжительностей BrdU- импульса, 8 ч и 24 ч.

1.6. Экспрессия генов. Экспрессию генов анализировали в модели 1 (крысиные ШК в культуре - раздел 1.1) и модели 2 (ШК с супрессией p57kip2 - раздел 1.2) подвергнутых стимуляции вплоть до 9 дней для модели 1 и стимуляции до 7 дней (9 дней трансфекции) для модели 2 с применением как недиализированных и диализированных препаратов ВВИГ/буфера. Диализированные препараты SYNAGIS использовали в качестве контроля IgG на наивных ШК (модель 1). Диализ ВВИГ/буфера/SYNAGIS проводили против среды клеточной культуры без добавок. Все эксперименты проводили с одной концентрацией ВВИГ: 20 мг/мл. Транскрипцию генов миелина (P0, MBP) и Fc рецепторов (CD64, CD32 и CD16) измеряли с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени.

Пример 2. Реакции шванновских клеток на инкубирование с ВВИГ.

2.1. Морфология. Было зарегистрировано, что обработка ВВИГ влияет на морфологию шванновских клеток. Как представляется, ШК, которые культивировали в присутствии 10 мг/мл ВВИГ, и в большей степени, в присутствии 20 мг/мл ВВИГ, имеют большие сомы и ядра. В настоящее время неясно, является ли это прямым влиянием на форму ШК и цитоскелет или адгезионные свойства в результате различных плотностей клеток, или отражает дискретные изменения клеточной поверхности, возможно, связанные с сайтом(ами) связывания ВВИГ на поверхности клетки.

Значительно ускоренный рост клеточных выступов измеряли при стимуляции ВВИГ, используя модель 2 (супрессия p57kip2). Этот эффект наблюдался только на ранних стадиях процесса дифференциации, указывая на влияние ВВИГ на кинетики дифференциации шванновских клеток. Для объяснения: рост клеточных выступов является параметром созревания, который, как было установлено, является зависимым от уровней супрессированного p57kip2. С другой стороны, как показали окрашивания конъюгированным с меткой TRITC фаллоидином, после стимуляции ВВИГ не наблюдалось влияние на структуру и сборку волокон актина.

2.2. Смерть/пролиферация клеток (модель 1). После стимуляции недиализированными препаратами ВВИГ (20 мг/мл), скорость пролиферации наивных ШК была значительно снижена, как показали анализы с использованием маркеров пролиферации BrdU и Ki-67. См. фиг. 1-2. Зависимое от ВВИГ влияние на скорость пролиферации было снижено с диализом ВВИГ, но после этого оставалось статистически значимым. В настоящее время нет доказательств индукции апоптоза после обработки ВВИГ на основе отрицательного окрашивания для каспазы-3.

2.3. Экспрессия генов. Стимуляция не трансфецированных ШК (модель 1) недиализированными и диализированными препаратами ВВИГ/буфер привела к небольшой положительной регуляции P₀ и сильной положительной регуляции MBP генов в течение первых 3 дней обработки, но не после длительной инкубации. Стимуляция клеток с супрессией p57kip2 (модель 2) недиализированными и диализированными препаратами ВВИГ/буфер также привела к аналогичным результатам в отношении экспрессии генов миелина. Экспрессия и положительная регуляция обоих генов миелина были значительно сильнее в клетках с супрессией p57kip2, по сравнению с контрольными трансфецированными клетками. Наблюдения за генной регуляцией Fc рецепторов показали, что шванновские клетки экспрессируют CD64 и CD32, и что продолжительная супрессия p57kip2 приводит к значительной положительной регуляции

этих генов. В незрелых ШК существовал определяемый уровень экспрессии Fc рецептора CD64. В дифференцирующихся шванновских клетках (при супрессии внутреннего ингибитора p57kip2) уровни CD64 значительно повышались со стимуляцией ВВИГ.

Важно отметить, что контроли моноклонального IgG1 (синагис, авастин и герцептин) не продемонстрировали существенного влияния на экспрессию генов миелина. Стимуляция клеток с супрессией p57kip2 (модель 2) недиализированными и диализированными препаратами ВВИГ/буфер индуцировала экспрессию генов миелина в такой же степени. Снова, экспрессия МВР сильно индуцировалась при стимуляции ВВИГ, тогда как экспрессия РО индуцировалась обработкой умеренно. Обратите внимание, что индукцию гена миелина можно было наблюдать в течение семидневного периода стимуляции, и поэтому она не ограничивается ранними этапами. Кроме того, было обнаружено, что экспрессия гена p57kip2 кодирует внутренний ингибитор дифференциации шванновских клеток, и была значительно снижена в контрольных трансфецированных (не-дифференцирующихся) клетках.

Наблюдения за генной регуляцией всех известных Fc γ рецепторов показали, что шванновские клетки экспрессируют Fc рецептор CD64. В дифференцирующихся шванновских клетках (модель 2), уровни CD64 были значительно увеличены по сравнению с контрольными трансфецированными (не-дифференцирующимися) клетками. Не наблюдалось регуляции экспрессии CD64 рецепторов в ответ на стимуляцию ВВИГ. Следует отметить, что во всех выполненных экспериментах по экспрессии генов, наблюдались влияния недиализованного буферного контроля. Этот эффект был, однако, уменьшен после диализа. Поэтому дополнительные анализы экспрессии генов выполняли только с диализованными препаратами ВВИГ.

2.4. Краткое изложение данных. В первые 18 месяцев исследования, было обнаружено, что первичные ШК реагируют на инкубацию с ВВИГ изменением морфологии клеток, что сопровождается ускоренным ростом клеточных выступов на ранних стадиях процесса дифференциации. Было также обнаружено, что инкубация с ВВИГ приводит к снижению пролиферации шванновских клеток, не влияя на выживаемость клеток. Более того, экспрессию двух основных генов миелина, P₀ и МВР индуцировали в незрелых, а также в дифференцирующихся ШК после стимуляции ВВИГ. Данные демонстрируют, что первичные шванновские клетки крысы экспрессировали Fc рецептор CD64 и что в дифференцирующихся шванновских клетках (при супрессии внутреннего ингибитора p57kip2) уровни CD64 значительно повышались при воздействии ВВИГ. Данные также предоставляет убедительные свидетельства положительной регуляции Fc рецепторов (в частности CD64) в дифференцирующихся ШК. Кроме того, было продемонстрировано специфическое связывание человеческих ВВИГ на поверхности шванновских клеток.

Эти данные подтверждают гипотезу о том, что ШК могут демонстрировать иммунную компетентность. Пониженная скорость пролиферации без признаков апоптоза, а также индукция генов миелина в сочетании с ускоренным ростом клеточных выступов, позволяет предположить стимулирование процесса дифференциации в незрелых ШК посредством ВВИГ. Это были первые результаты *in vitro*, демонстрирующие, что шванновские клетки способны не только реагировать на иммуноглобулины, но и специфически связываться с ними, и что стимуляция ВВИГ может стимулировать созревание предшественников шванновских клеток.

Пример 3. Экспрессия генов.

Для дополнительного исследования ВВИГ-зависимых эффектов на экспрессию генов дифференцирующихся (клетки с супрессией p57kip2, модель 2) и не-дифференцирующихся (контрольные супрессированные клетки, модель 2) шванновских клеток авторы настоящего изобретения собрали 16 образцов РНК из 4 независимых экспериментов для анализа GeneChip Array (выполняется согласно Miltenyi Biotec, Германия). Проверку образца проводили путем определения уровней экспрессии генов МВР, P₀, p57kip2 и CD64.

Был проведен статистический и функциональный анализ. Гены, в которых была идентифицирована значительная положительная или отрицательная регуляция при обработке ВВИГ, приведены в табл. 1 и 2. Будущими целями является дополнительная идентификация генов, а также проверка полученных результатов.

Таблица 1. Сравнение недифференцирующихся шванновских клеток +/- ВВИГ

Гены с положительной регуляцией после обработки (название геной последовательности)	Гены с отрицательной регуляцией после обработки (название геной последовательности)
Tyrp1	RGD1562551
Tyrp1	Ctnna2
Col24a1	Olr832
Fat3	Phgr1
Tmem72	RGD1566220
Tesc	Nedd9
I118	Slc12a3
Mt1a	Arhgef9
Slc40a1	Gckr
Asgr1	TC636329
LOC678704	A_64_P023581
TC609365	Ptprr
Bcl6b	Olr749
A_64_P063062	Neb1
Npas2	RGD1562545
Gpx2	Hes5
Matn1	Mpz12
A_64_P022503	Ezr
Fbxo32	Cryab
Pls1	Fcgr2b
A_64_P094596	
A_64_P025678	
Olig1	
Sox2	
Plp1	

Таблица 2. Сравнение дифференцирующихся шванновских клеток +/- ВВИГ

Гены с положительной регуляцией после обработки (название геновой последовательности)	Гены с отрицательной регуляцией после обработки (название геновой последовательности)
ENSRNOT00000064975	XM_346212
Zfp334	XR_009266
Mmp25	LOC688695
A_64_P117674	Ak311
A_64_P151655	A_64_P163956
A_44_P386999	
Olig1	
Sox10	
Hes5	

Для того чтобы подтвердить наблюдаемую индукцию экспрессии генов миелина (в частности, P₀ и МВР) на уровне белка, авторы настоящего исследования провели вестерн-блот анализ клеток с супрессией p57kip2 в сравнении с контрольными супрессированными клетками (модель 2) после обработки диализованным ВВИГ/буфером. Авторы смогли продемонстрировать, что уровни белка P₀ и в меньшей степени МВР в дифференцирующихся шванновских клетках после обработки ВВИГ были увеличены.

Пример 4. Связанные с иммунной системой белки.

Было важно подтвердить прямое связывание иммуноглобулина с поверхностью шванновских клеток. Применение антител к Fab-специфическим F(ab)₂ человека и антител к Fcγ-специфическим F(ab)₂ человека показало, что иммуноглобулины человека в ВВИГ специфически связываются с поверхностью шванновских клеток. Живые шванновские клетки в культуре стимулировали посредством ВВИГ, промывали, фиксировали, а затем отдельно окрашивали против фрагментов Fab человека, фрагментов Fcγ человека или против обоих эпитопов в комбинации двойного окрашивания. Специфическое связывание с поверхностью может быть локализовано в перинуклеарной области клеток. Эти исследования связывания проводились с наивными шванновскими клетками (модель 1) с применением ВВИГ и контролей IgG1 (авастин и герцептин), а также с дифференцирующимися шванновскими клетками (модель 2) с применением ВВИГ. Для решения вопроса о том, экспрессируется ли на поверхности шванновских клеток также белок рецептора CD64, были начаты эксперименты окрашивания двумя антителами к CD64.

Для определения того, экспрессируется ли на поверхности шванновских клеток также белок рецептора CD64, были выполнены эксперименты окрашивания двумя антителами к CD64. Оказалось, что одно антитело к CD64 специфически связывается с рецептором CD64 крысы на шванновских клетках, и диффузное окрашивание рецептора распределялось по клеточной поверхности не-дифференцирующихся клеток. Для сравнения, окрашивание рецептора на дифференцирующихся клетках концентрировалось в клеточной коме выше перинуклеарной области. Обнаруженные CD64 сигналы не совпадают с сигналами связывания ВВИГ (сравнение иммунологических окрашиваний).

Пример 5. Образование междуузлия.

С целью повышения эффективности и воспроизводимости модели миелинизации *in vitro* (модель 3), установили и выполнили ряд шагов по улучшению экспериментов с использованием культур ГЗК, полученных из мышинных эмбрионов линии C57/BL6. С этой целью, протокол в соответствии Pääväläinen et al. (2008) был модифицирован, и теперь может быть использован для изучения влияния применения ВВИГ на взаимодействия аксон/шванновская клетка. Стимуляцию ВВИГ (20 мг/мл) проводили параллельно для инициации процесса миелинизации с использованием диализованных препаратов ВВИГ/буфера.

После определения оптимальной временной точки для анализа через 7 дней после начала миелинизации, было проведено статистически значимое количество экспериментов стимуляции ВВИГ (n=9). Для того чтобы оценить способность обработки иммуноглобулинами модулировать образование миелиновых оболочек (образование междуузлий), количество междуузлий (нормализованное до целого числа ядер в совместной культуре) с обработкой ВВИГ сравнивали с количеством междуузлий в контрольной совместной культуре. Хотя можно было наблюдать тенденцию к незначительному увеличению плотностей междуузлий, после обработки не обнаруживали статистически значимые различия в формировании миелинового сегмента.

Пример 6. Концепция восстановления нервов *in vivo*.

6.1. Краткое описание.

Для того чтобы перевести выводы из экспериментов *in vitro*, основанные на культуре первичных шванновских клеток крысы в концепцию *in vivo*, вызывали хронические повреждения периферических нервов у взрослых крыс, получавших ВВИГ или контрольный буфер во время так называемого "периода регенерации нерва". Перерезали седалищный нерв и с помощью наложения швов повторно лигировали концы нерва, регенерацию нерва предотвращали в течение трех месяцев. После этого периода дегенерации, нервы лигировали, чтобы обеспечить наличие регенерации и вводили иммуноглобулин или буфер (и.п. инъекции). Нервам предоставляли возможность регенерации в течение еще трех месяцев, до тех пор, пока животных не умерщвляли.

Описанный выше хирургический подход к шванновским клеткам был использован, чтобы определить, может ли стимуляция иммуноглобулинами восстанавливать активность поврежденных периферических нервов. В течение периода трех месяцев регенерации (и лечения ВВИГ/буфером) у живых крыс проводили ряд функциональных исследований. После этого животных умерщвляли, а седалищные нервы иссекали, фиксировали и заливали для будущих морфологических и иммуногистохимических анализов с целью описания реакций шванновских клеток/миелина и аксонов. Из функционального анализа были получены предварительные результаты. Эти предварительные результаты показывают, что существуют различия между двумя группами (лечение животных ВВИГ в сравнении с буфером). В частности, животные, которых лечили ВВИГ, продемонстрировали более длинные и более широкие области следа (контактные зоны между лапой и полом) по сравнению с животными, которых лечили буфером. Указанные области следа также постепенно увеличивались в течение периода лечения, и это сопровождалось повышенным давлением приземления (соответствующим силе, которая используется лапой, чтобы сделать шаг или давлению, которое лапа оказывает на поверхность). В общем, эти первые предварительные данные дают возможность предположить, что животные, которых лечат ВВИГ, испытывают ускоренную нормализацию свойств ходьбы и повышенную силу при использовании ног.

6.2. Способы.

Исследовали зависимые от ВВИГ эффекты на выживаемость шванновских клеток. В частности, для изучения пролиферации, а также ремиелинизации и регенерации аксонов в денервированных сегментах нервов *in vivo* использовали ранее установленную модель длительной денервации периферических нервов (Fu and Gordon; J Neurosci 1995). Характеристики этой *in vivo* модели аналогичны тем состояниям нервов, которые наблюдаются при многих видах патологии нервов у человека. Эта *in vivo* модель также обеспечивает преимущество фокусировки на регенеративных событиях только процессов дегенерации (т.е. иммунные реакции временно исключены).

Для этого седалищные нервы 24 взрослых крыс Льюиса перерезали, и предотвращали регенерацию нерва с помощью лигирования концов нервов посредством наложения швов. Этот этап приводил в результате к длительному повреждению и денервации нервных сегментов. Регенерацию предотвращали в течение периода трех месяцев после перерезания нерва. В течение этого периода у указанных животных не проводили функциональных исследований.

Через три месяца дегенерации все 24 крысы были подвергнуты отсроченному лигированию седалищного нерва (анастомоз) таким образом, что проксимальные нервные сегменты пришивали к дистальным нервным сегментам, тем самым предоставляя возможность регенерации нерва. Следует отметить, что на этом продолжительном этапе общая способность к регенерации была значительно снижена по сравнению с острыми повреждениями нервов. В течение этого первого трехмесячного периода процесс дегенерации аксонов и миелина был завершен.

В первой серии экспериментов (исследование 1) у здоровых крыс (с непораженными нервами) с помощью анализов ELISA изучали образование антител к лекарственным средствам (АЛС) и уровни IgG в плазме человека после применения ВВИГ. В качестве получения вторичных данных в исследовании 2 наблюдали за АЛС к ВВИГ у животных с повреждениями и у пролеченных (см. ниже).

Во второй серии экспериментов (исследование 2) крыс Льюиса с длительными повреждениями периферических нервов пролечивали ВВИГ в дозе 1 г/кг массы тела (лечение в высоких дозах) после лигирования нерва (период регенерации 3 месяца). Применение ВВИГ выполняли с помощью и.п. инъекций один раз в неделю в течение первого месяца, а затем один раз в две недели в течение оставшихся двух месяцев этапа регенерации. Контрольные крысы с поражениями нервов получали инъекции композиции ВВИГ-буфер. Контрольные группы животных, которым вводили буфер и лечили ВВИГ, состояли из 12 взрослых самок крыс в каждой. В период лечения ВВИГ отбирали образцы крови из хвостовой вены с целью наблюдения за АЛС и для определения периода полураспада человеческого IgG (см. исследование 1). Образцы плазмы крови отбирали каждые две недели до начала лечения.

6.2. Результаты.

Для того чтобы исследовать степень восстановления функции целевых органов после лигирования концов нервов был проведен еженедельный набор функциональных тестов.

Чувствительную функцию оценивали с помощью теста реакции отдергивания пальцев 4 и 5 после применения болевых стимулов (тест щипка пинцетом). Мышечную силу и регенерацию мышечных во-

локон проанализировали с помощью теста с разведением лап. Эти два функциональных теста, а также наблюдение за массой животных (параметр здоровья и благополучия) выполняли еженедельно. Животных дополнительно подвергали еженедельному наблюдению следов и дорожек ходьбы (т.е., "анализу дефиле"), чтобы оценить функциональное восстановление седалищных нервов.

В конце этого исследования были оставлены 21 животное: 10 животных, получавших контрольные инъекции буфера и 11 животных, получавших ВВИГ. Всех крыс умерщвляли и отбирали для дальнейшего анализа регенерирующие сегменты периферических нервов, а также контралатеральные контрольные здоровые нервы. Для этой цели животные были разделены на три группы:

Группа I состояла из 4 животных, получавших буфер и 4 животных, пролеченных ВВИГ. Сегменты седалищного нерва (здоровые и рассеченные) от этих животных подвергали анализу с помощью электронной микроскопии (ЭМ). Для определения эффективности ремиелинизации помимо определения плотности аксонов (измеряя таким образом эффективность регенерации) она также включает вычисление g-отношения (диаметр аксона, разделенный на диаметр аксона и его миелиновой оболочки). Этот анализ в настоящее время продолжается. Были определены данные функциональной оценки этих животных (данные поведения при "дефиле", тесте-щипке и разведении ног), и предварительные результаты описаны ниже.

Группа II состояла из 3 животных, получавших буфер и 4 животных, пролеченных ВВИГ. Сегменты седалищного нерва (здоровые и рассеченные) от этих животных используют для иммуногистохимического окрашивания (ИГХ) против аксональных, миелиновых и глиальных маркеров, чтобы определить степень клеточной редифференциации и регенерации. Нервы в настоящее время обрабатываются и это исследование также продолжается. Были определены данные функциональной оценки этих животных (данные поведения при "дефиле", тесте-щипке и разведении ног), и имеющиеся предварительные результаты описаны ниже.

Группа III состояла из 3 животных, получавших буфер и 3 животных, пролеченных ВВИГ. Сегменты перерезанного седалищного нерва этих животных не продемонстрировали анатомических признаков регенерации, так как анастомоз не произошел. Данные функциональной оценки этих животных не будут включены в общий анализ.

Предварительная оценка данных походки показывает, что существуют различия между двумя группами (лечение животных ВВИГ в сравнении с буфером). Животные, которых лечили ВВИГ, продемонстрировали более длинные и более широкие области следа (контактные зоны между лапой и полом) по сравнению с животными, которых лечили буфером. Указанные области следа также постепенно увеличивались в течение периода лечения, и это сопровождалось повышенным давлением приземления (соответствующим силе, которая используется лапой, чтобы сделать шаг или давлению, которое лапа оказывает на поверхность). В общем, эти данные дают возможность предположить, что животные, которых лечили ВВИГ, испытывали ускоренную нормализацию свойств ходьбы и повышенную силу при использовании ног.

Пример 7. Дополнительные исследования с целью определения основных механизмов действия ВВИГ.

Чтобы лучше понять основные механизмы действия ВВИГ и механизмы, с помощью которых ВВИГ стимулирует созревание клеток, выполняют детальные молекулярные/клеточные исследования на стимулированных шванновских клетках.

Как отмечалось выше (см. раздел 5.1), был выполнен и проанализирован анализ GeneChip на недифференцирующихся и дифференцирующихся шванновских клетках, подвергавшихся лечению ВВИГ. На основании недавно открытых генов с положительной регуляцией и с отрицательной регуляцией (табл. 1 и 2), дальнейшие эксперименты проверки на отдельных генах проводят с использованием количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени. При необходимости и если это применимо, выполняют дополнительные проверки с использованием антител (вестерн-блот, иммунологические окрашивания, а также ELISA). Это особенно интересно для генов, связанных с иммунной компетенцией. Следует отметить, что этот анализ экспрессии выполняют не только для того, чтобы понять, какие клеточные процессы являются наиболее чувствительными к ВВИГ, он, скорее всего, также служит для того, чтобы определить дополнительные гены-маркеры, которые могут быть использованы для наблюдения и количественной оценки ВВИГ-зависимых реакций.

После создания подходящего *in vitro* анализа миелинизации (модель 3), выполняют статистически значимое количество экспериментов стимуляции ВВИГ. Оценивают активные временные окна и степень, до которой лечение иммуноглобулинами может модулировать образование миелиновых оболочек (образование междоузлий).

Использование конъюгированного с СуЗ антитела против человеческого антитела Fab продемонстрировало специфическое связывание ВВИГ с поверхностью шванновских клеток. Остается показать, происходит ли это за счет взаимодействия с Fc рецептором CD64 или же специфические эпитопы шванновских клеток распознаются благодаря Fab-опосредованному связыванию. Для этой цели шванновские клетки (модель 1) либо контактируют с фракциями Fc и F(ab)₂ переваренного папаина ВВИГ, или связанные ВВИГ на шванновских клетках подвергают перевариванию папаином *in situ*. Кроме того, приме-

нение FITC-конъюгированного антитела против человеческого Fc в комбинации с Су3 конъюгированным антителом против человеческого Fab, как ожидается, приведет к папаин-чувствительным окрашиваниям. Два антитела к CD64 применяют к не-дифференцирующимся и дифференцирующимся (модель 2) шванновским клеткам для того, чтобы определить, экспрессируется ли CD64 на поверхности шванновских клеток также как рецепторный белок. В случае, если связывание ВВИГ действительно опосредуется через этот Fc рецептор, ожидается, что CD64 сигналы совпадают с ВВИГ связыванием (иммунологические окрашивание). В дополнение, с этой целью исследуют может ли увеличение уровней белка CD64 наблюдаться как следствие процесса дифференциации (вестерн-блот).

Для предоставления функционального доказательства участия Fc-рецептора, применяют фармакологические ингибиторы, такие как 3-(1-метил-1H-индол-3-ил-метил)-2-оксо-2,3-дигидро-1H-индол-5 сульфонамид или LY294002 интерферирующие с селезеночной тирозинкиназой (Suk) и фосфатидилинозит-3-киназу (PI3K), соответственно, перед ВВИГ стимуляцией наивных шванновских клеток (модель 1). Это показывает, участвуют ли эти компоненты Fc-зависимого сигналинга в стимуляции МВР (или соответствующих генов-маркеров, определенных в 1). Кроме того, переваренные ВВИГ используются для стимулирования культивированных шванновских клеток (модели 1) для того, чтобы определить, несут ли ответственность фракции Fc или/i Fab за регуляцию ВВИГ специфических генов (МВР и других маркерных генов, определенных в ходе анализа экспрессии генов). Наконец, мшРНК-опосредованная супрессии экспрессии CD64 в шванновских клетках (модель 1) может быть использована, чтобы подтвердить, что связывание ВВИГ является зависимым от CD64, а также отвечает за ИГВВ-зависимую стимуляцию экспрессии МВР (или других маркерных генов, определенных в ходе анализа экспрессии генов).

Стандартные условия культивирования шванновских клеток (поддержка и дифференциация) отличаются высокими концентрациями эмбриональной телячьей сыворотки (до 10% от объема). Поэтому возможно, что иммуноглобулины, присутствующие в сыворотке, уменьшают ВВИГ-зависимые реакции шванновских клеток. Чтобы проверить это, сывороточную концентрацию снижают до нижнего предела, необходимого для того, чтобы обеспечить клеточное выживание и дифференциацию шванновских клеток, стимулированных ВВИГ, и измеряют уровни экспрессии МВР (модели 1 и 2), а также морфологические параметры (модель 2).

Недавние исследования авторов настоящего изобретения показали, что дифференциация шванновских клеток в решающей степени зависит от метилтрансферазы гистонов, усилителя zeste гомолога 2 (EZH2; Heinen et al., в пересмотре). После супрессии активности EZH2, культивируемые шванновские клетки демонстрируют реакции дедифференциации, подобные тем, которые наблюдается при патологии нервов. В рамках будущих исследований, такие дедифференцирующиеся шванновские клетки будут стимулировать ВВИГ, чтобы определить экспрессию маркера шванновских клеток и генов миелина. Последние из которых, как было продемонстрировано, отрицательно регулируются ниже контрольных уровней. Будет интересно увидеть, способно ли лечение иммуноглобулинами не только стимулировать реакции дифференциации/созревания (как это видно в модели 2; т.е. при супрессии ингибиторного гена p57kip2), но также влиять на процессы дедифференциации (например, нормализацию уровней экспрессии генов миелина).

Несмотря на то, что данное изобретение описано выше более подробно посредством иллюстраций и примеров для ясности понимания, обычному специалисту в данной области техники в свете описания настоящего изобретения должно быть ясно, что в данное изобретение могут быть внесены определенные изменения и модификации без выхода за пределы сущности и объема прилагаемой формулы изобретения.

Ссылки на публикации.

Arnson, Y., Shoenfeld, Y., Amital, H. (2009). Intravenous immunoglobulin therapy for autoimmune diseases. *Autoimmunity* 42(6), 553-60.

Asakura, K., Miller, D.J., Pease, L.R. and Rodriguez, M. (1998). Targeting of IgMkappa antibodies to oligodendrocytes promotes CNS remyelination. *J. Neurosci.* 18, 7700-7708.

Bhatheja, K. and Field, J. (2006). Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38(12):1995-9.

Bieber, A., Asakura, K., Warrington, A., Kaveri, S.V., and Rodriguez, M. (2000). Antibody-mediated remyelination: relevance to multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 6 Suppl 2, S1-S5.

Bieber, A.J., Warrington, A., Asakura, K., Ciric, B., Kaveri, S.V., Pease, L.R., and Rodriguez, M. (2002). Human antibodies accelerate the rate of remyelination following lysolecithin-induced demyelination in mice. *Glia* 37, 241-249.

Burstyn-Cohen, T., Frumkin, A., Xu, Y. T., Scherer, S. S., and Klar, A. (1998). Accumulation of F-spondin in injured peripheral nerve promotes the outgrowth of sensory axons. *J. Neurosci.*, 18(21), 8875-8885.

Fu, S.Y. and Gordon, T. (1995a). Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: Prolonged axotomy. *J. Neurosci.*, 15(5), 3876-3885.

Fu, S.Y. and Gordon, T. (1995b). Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: Prolonged denervation. *J. Neurosci.*, 15(5), 3886-3895.

Heinen, A., Kremer, D., Hartung, H.P., and Küry P. (2008a). p57(kip2)'s role beyond Schwann cell cycle control. *Cell Cycle* 7, 2781-2786.

Heinen, A., Kremer, D., Göttle, P., Kruse, F., Hasse, B., Lehmann, H., Hartung, H.P., and Küry, P. (2008b). The cyclin-dependent kinase inhibitor p57kip2 is a negative regulator of Schwann cell differentiation and in vitro myelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 8748-8753.

Küry, P., Greiner-Petter, R., Cornely, C., Jürgens, T. and Müller, H.W. (2002). Mammalian Achaete Scute Homolog 2 Is Expressed in the Adult Sciatic Nerve and Regulates the Expression of Krox24, Mob-1, CXCR4, and p57kip2 in Schwann Cells. *J. Neurosci.* 22, 7586-7595.

Lin, H.H., Spies, J.M., Lu, J.L. and Pollard, J.D. (2007), Effective treatment of experimental autoimmune neuritis with human immunoglobulin. *J. Neurol Sci.*;256:61-7.

Nakahara, J., Seiwa, C., Shibuya, A., Aiso, S. and Asou, H. (2003). Expression of Fc receptor for immunoglobulin M in oligodendrocytes and myelin of mouse central nervous system. *Neurosci. Lett.* 337, 73-76.

Negi, V. S., Elluru, S., Siberil, S. Graff-Dubois, S., Mouthon, L., Kazatchkine, M.D., Lacroix-Desmazes, S., Bayry, J. and Kaveri, S.V. (2007). Intravenous immunoglobulin: an update on the clinical use and mechanisms of action. *J. Clin. Immunol.* 27:233.

Päiväläinen, S., Nissinen, M., Honkanen, H., Lahti, O., Kangas, S.M., Peltonen, J., Peltonen, S. and Heapea, A.M. (2008). Myelination in mouse dorsal root ganglion/Schwann cell cocultures. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 568-578

Handbook of Development Neurotoxicology eds. Slikker et al. (1998), Academic Press, San Diego.

Vargas, M.E., Watanabe, J., Singh, S.J., Robinson, W.H. and Barres, B.A. (2010). Endogenous antibodies promote rapid myelin clearance and effective axon regeneration after nerve injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107 (26), 11993-11998.

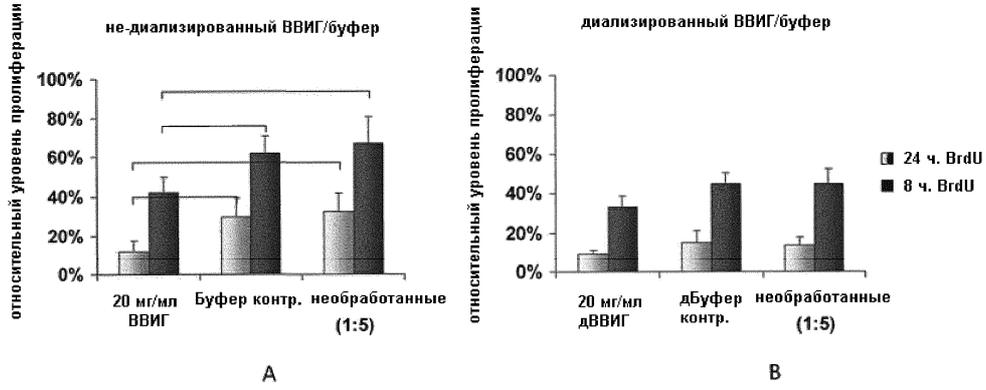
Warrington, A.E., Bieber, A.J., Ciric, B., Pease, L.R., Van, K., V, and Rodriguez, M. (2007). A recombinant human IgM promotes myelin repair after a single, very low dose. *J. Neurosci. Res.* 85, 967-976.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

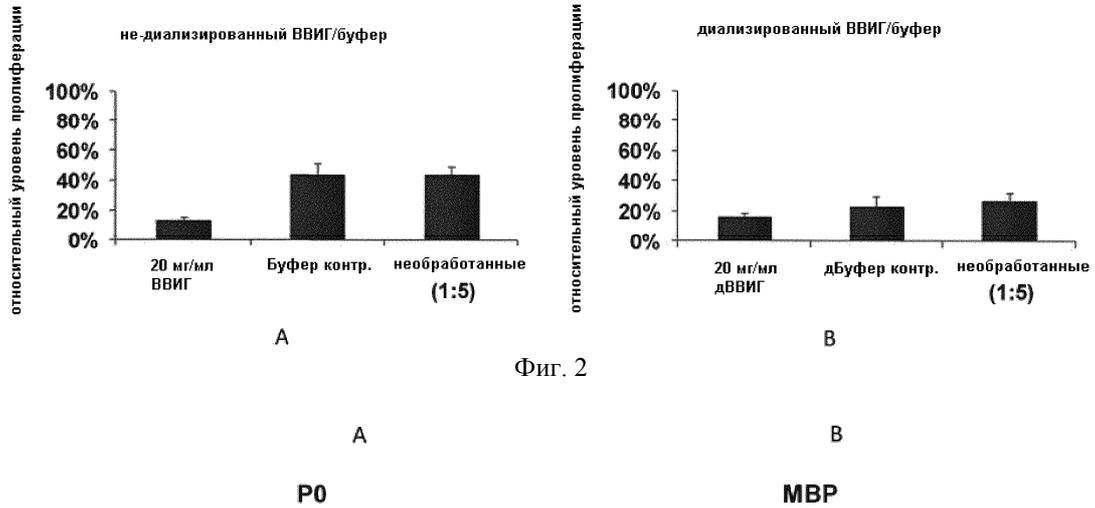
1. Способ лечения демиелинизирующей периферической нейропатии, вызванной воздействием токсинов, включающий внутривенное введение поликлонального IgG млекопитающему в дозе от 0,05 до 5 г на кг массы тела, где указанное поликлональное IgG получено из пула человеческой плазмы.
2. Способ по п.1, где млекопитающее представляет собой человека.
3. Способ по п.1 или 2, где совместно с поликлональным IgG млекопитающему вводят противовоспалительное средство.
4. Способ по п.3, где противовоспалительное средство представляет собой аденокортикотропный гормон, кортикостероид, интерферон, глатирамера ацетат или нестероидное противовоспалительное лекарственное средство.
5. Способ по любому из пп.1-4, где указанное поликлональное IgG вводят еженедельно.
6. Способ по любому из пп.1-4, где указанное поликлональное IgG вводят раз в две недели.
7. Способ по любому из пп.1-4, где указанное поликлональное IgG вводят один раз в месяц.
8. Способ по п.1, где указанное поликлональное IgG вводят млекопитающему в дозе от около 0,5 до 2 г на кг массы тела.
9. Способ лечения демиелинизирующей периферической нейропатии, вызванной воздействием токсинов, у млекопитающего, включающий трансплантацию нервных клеток в место повреждения периферического нерва, вызванного воздействием токсинов;
введение в место повреждения периферического нерва, вызванного воздействием токсинов, компо-

зиции, содержащей шванновские клетки, и внутривенное введение поликлонального IgG в дозе от около 0,05 до 5 г на кг массы тела, где указанное поликлональное IgG получено из пула человеческой плазмы.

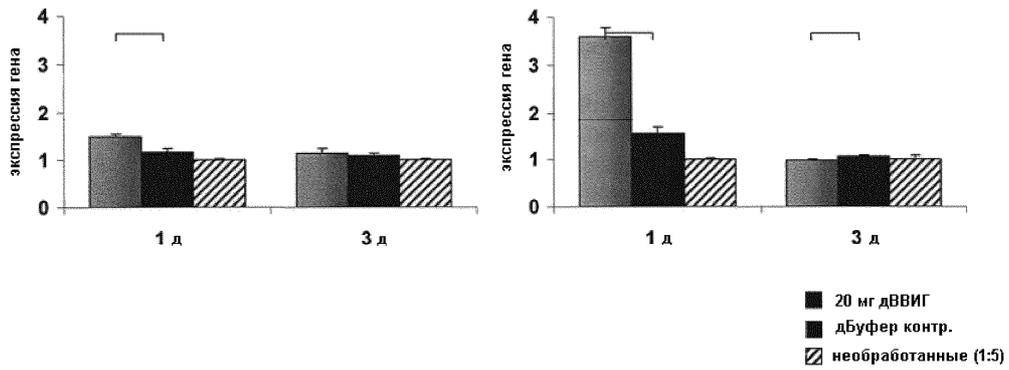
10. Способ по п.9, где молокопитающее представляет собой человека.



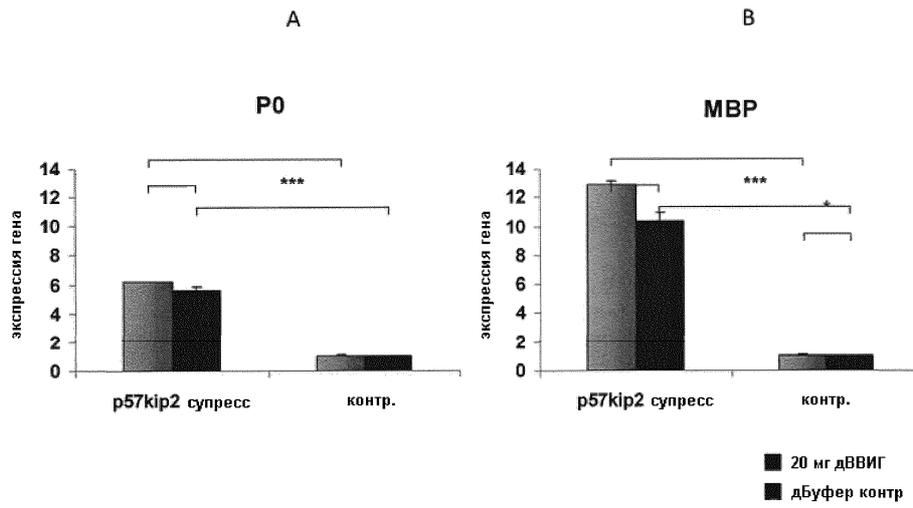
Фиг. 1



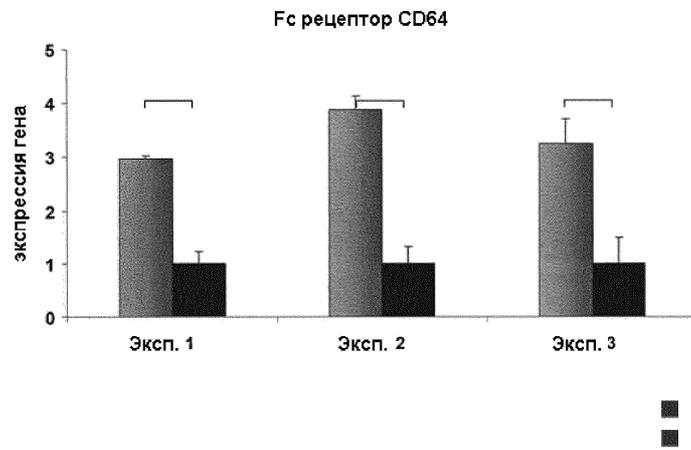
Фиг. 2



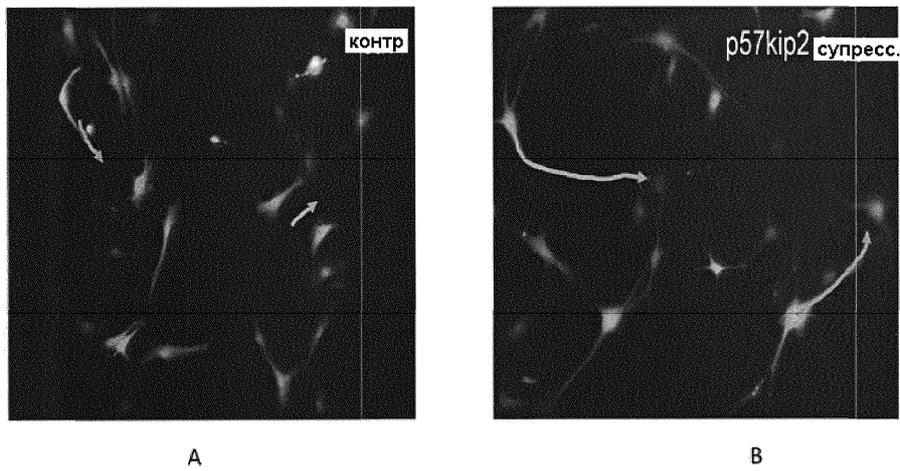
Фиг. 3



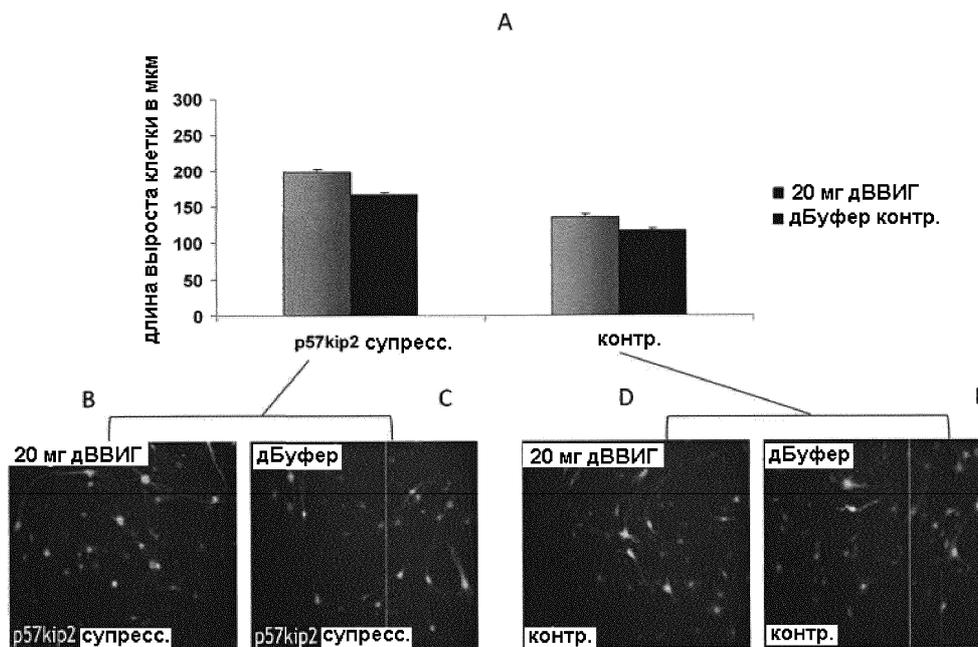
Фиг. 4



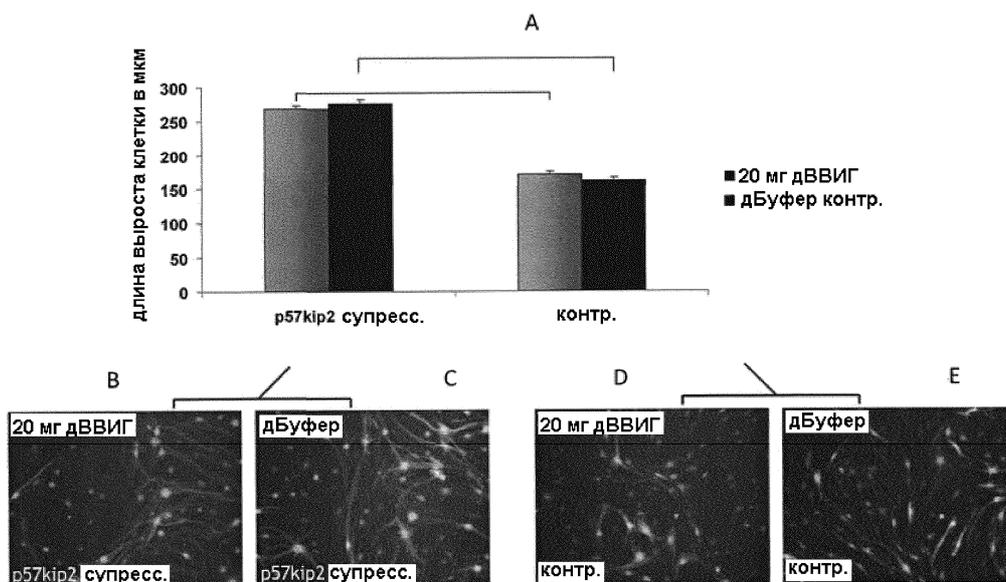
Фиг. 5



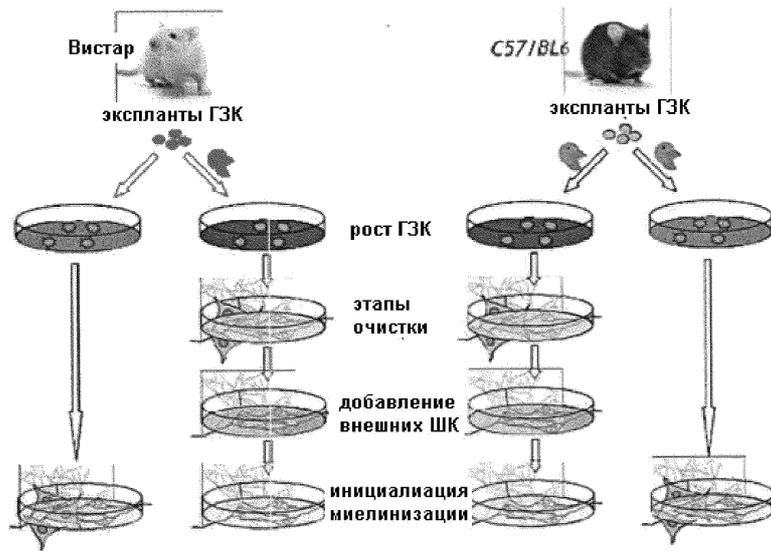
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9