

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045292**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.14

(51) Int. Cl. *A61K 35/16* (2006.01)
A61K 38/38 (2006.01)

(21) Номер заявки
202190719

(22) Дата подачи заявки
2019.10.21

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ПЛАЗМЫ КРОВИ И ФРАКЦИЙ ПЛАЗМЫ КРОВИ ДЛЯ ОБЛЕГЧЕНИЯ БОЛИ, ЗАЖИВЛЕНИЯ РАН И ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ

(31) 62/751,448; 62/842,403

(32) 2018.10.26; 2019.05.02

(33) US

(43) 2021.07.14

(86) PCT/US2019/057235

(87) WO 2020/086469 2020.04.30

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

(56) WO-A1-2007139291
US-A1-20050142208

TANIGUCHI, Y. et al., "Intra-articular platelet-rich plasma (PRP) injections for treating knee pain associated with osteoarthritis of the knee in the Japanese population: a phase I and IIa clinical trial", "Nagoya journal of medical science, February 2018, Vol. 80, No. 1, p. 39-51, abstract; conclusion
US-A1-20180110839
CN-U-201453773

(72) Изобретатель:
Кастро Мариан, Галлагер Изн,
Хейфетс Виктория, Лу Бенсон (US)

(74) Представитель:
Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Лебедев В.В., Костюшенкова М.Ю.,
Гизатуллин Ш.Ф., Парамонова К.В.
(RU)

(57) Описаны способы и композиции для улучшения послеоперационного восстановления. Композиции, используемые в способах, включают в себя плазму крови и фракции плазмы крови, полученные из плазмы крови, с эффективностью в лечении и/или предупреждении состояний, связанных с послеоперационным восстановлением.

B1

045292

045292

B1

I. Ссылка на родственные заявки

В соответствии с 35 U.S.C. § 119 (e) заявка на данное изобретение испрашивает приоритет по дате подачи находящейся на рассмотрении заявки на выдачу патента США № 62/751448, поданной 26 октября 2018 г., и находящейся на рассмотрении заявки на выдачу патента США № 62/842403, поданной 2 мая 2019 г., при этом раскрытия указанных заявок включены в настоящий документ посредством ссылки.

II. Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к предупреждению и лечению заболевания и возрастного заболевания. Настоящее изобретение относится к применению препаратов на основе крови, таких как плазма крови и фракции плазмы крови, для улучшения и ускорения восстановления после хирургического вмешательства, в том числе состояний и показаний, связанных с хирургическим вмешательством. Настоящее изобретение также относится к применению препаратов на основе крови, таких как плазма крови и фракции плазмы крови, для облегчения хронической боли или нейропатии и для лечения показаний, связанных с заживлением ран.

III. Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Нижеследующее предлагается исключительно в качестве справочной информации и не рассматривается в качестве известного уровня техники для настоящего изобретения.

Хирургическое вмешательство зачастую ассоциируется с осложнениями, связанными с болью, сердечно-легочными проблемами, инфекциями, тромбоэмболическими проблемами и послеоперационным заживлением ран. Кроме того, для заживления ран требуется время, независимо от того, возникли ли они в результате самого хирургического вмешательства (например, надрезы) или возникли в результате несчастного случая, воздействия силы или заболевания и впоследствии были обработаны при хирургической процедуре. Такие осложнения часто усугубляются с возрастом. Дополнительные осложнения могут возникнуть из-за реакции на хирургический стресс с последующей нагрузкой на функцию органа, которая часто опосредована вызванными травмой эндокринными метаболическими изменениями и активацией каскадов (цитокинов, комплемента, метаболитов арахидоновой кислоты, оксида азота и свободных радикалов кислорода). (Kehlet H., et al., Br. J. Anaesthesia, 78:606-17 (1997)). Во время реакции на хирургический стресс активируется симпатическая нервная система. (Starkweather A., et al., Topics in Pain Management, 32(8):1-11 (2017)). Увеличивается секреция гормонов гипофиза, что приводит к мобилизации энергии посредством катаболизма. Это, в свою очередь, приводит к задержке соли и воды. Увеличивается секреция адренкортикотропного гормона (АСТН), что приводит к повышению норадреналина и симпатической активности. Это вызывает сердечно-сосудистые реакции, такие как тахикардия и гипертония, и высвобождение глюкагона, что приводит к гипергликемии. Повышение уровня гормона роста и кортизола также приводит к ингибированию дифференцировки моноцитов в макрофаги. Это, в свою очередь, препятствует передаче сигналов Т-клетками/продуцированию гистамина и снижает миграцию иммунных клеток. (Там же).

Современное лечение для послеоперационного восстановления включает в себя уменьшение послеоперационной боли, а также мультимодальные вмешательства. (Там же). Обезболивание важно при многих типах хирургического восстановления и при ожидании острой боли. (Pinto P.R., J. Pain. Res., 10:1087-98 (2017)). Послеоперационная боль в большей степени связана с больными, перенесшими общее хирургическое вмешательство. (Couceiro T.C., Rev. Bras. Anesthesiol., 59(3):314-20 (2009)). Боль также отрицательно сказывается на клиническом исходе, поскольку препятствует заживлению и восстановлению. (Там же). Замена тазобедренного и коленного суставов особенно связана с болью как хронической (например, от остеоартрита), так и острой. (Там же). Поэтому анальгетики обычно используют при послеоперационном восстановлении как во время процедур в стационаре, так и при восстановлении в домашних условиях.

Одним из видов мультимодального вмешательства является ускоренное восстановление после хирургического вмешательства (ERAS). (Starkweather A., supra). ERAS фокусируется на широком спектре хирургических вмешательств, например колоректальной хирургии, ортопедии, гинекологии, урологии, раке головы и шеи, раке мочевого пузыря, заболеваниях печени, ректальных/тазовых заболеваниях, патологиях толстой кишки, дуоденэктомии поджелудочной железы, гастрэктомии, бариатрической и гинекологической онкологической хирургии. (Там же). В качестве мультимодальной стратегии выделяются предоперационные методики (консультирование, нагрузка жидкостью/углеводами, более короткий период голодания), периоперационные методики (анестетики короткого действия, нормотермия, профилактика антибиотиками, профилактика тромбоэмболии, предупреждение перегрузки солью/водой, предупреждение рвоты) и послеоперационные методики (ранняя пероральная диета, упражнения, неопиоидная анальгезия и поддержка после выписки). (Там же).

Однако современные терапевтические средства не смогли устранить послеоперационную заболеваемость и смертность. Мультимодальные методики по самой своей природе требуют больших затрат времени и ресурсов. И еще не существовало ни одной техники или фармацевтического лечения, которые могли бы сравниться с такой мультимодальной терапией. Из-за этих недостатков существует потребность в новых методах лечения для улучшения послеоперационного восстановления.

IV. Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение основано на получении и применении препаратов на основе крови для лечения симптомов и состояний, улучшающих восстановление после хирургического вмешательства, включающих в себя, например, боль и заживление ран. В настоящем изобретении, среди прочего, признается потребность новых терапевтических средств для лечения нежелательных состояний, связанных с послеоперационным восстановлением, и для улучшения такого восстановления. Полученные из крови и плазмы крови настоящие композиции в соответствии с настоящим изобретением относятся к решению проблем, связанных с неудачами и недостатками современных терапевтических средств, путем использования фракций плазмы крови, проявляющих эффективность при лечении нежелательных состояний, связанных с послехирургическим восстановлением, и для улучшения такого восстановления.

Настоящее изобретение также основано на получении и применении препаратов на основе крови для лечения симптомов и состояний, связанных с острой и хронической болью. В настоящем изобретении, среди прочего, признается необходимость в терапевтических средствах для облегчения боли. Хотя существуют терапевтические средства для лечения острой и хронической боли, многие такие терапевтические средства, например, опиоидные анальгетики, вызывают высокий уровень зависимости, злоупотребления и связанных с ними заболеваемости и смертности.

V. Включение посредством ссылки

Все публикации и заявки на выдачу патентов, упоминаемые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы было указано, что каждая отдельная публикация и заявка на выдачу патента включена посредством ссылки.

VI. Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 изображен эксперимент с хроническим констриктивным поражением (CCI). 23-месячным мышам дикого типа осуществляли CCI или имитационное хирургическое вмешательство путем лигирования за 24 ч до осуществления режима импульсного введения дозы 7 суток подряд PPF1, габапентина, рекомбинантного человеческого альбумина (rhAlb) или контроля в виде среды-носителя. Поведение оценивали в течение недель со второй по пятую, а сбор тканей для гистологии проводили в течение пятой недели.

На фиг. 2 представлено изображение расположения CCI, наносимого мышам дикого типа возрастом 22 месяцев. Лигирование проводили на седалищном нерве, как показано на фигуре. Рисунок был взят из работы Suter M.R., et al., *Anesthesiology Res. and Practice*, (2011), которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном своем объеме.

На фиг. 3 представлены данные механического теста на аллодинию фон Фрея у мышей дикого типа, получавших CCI или имитационное хирургическое вмешательство, как описано на фиг. 1. Как применимо для анализа болевого поведения, на задней лапе субъекта, лишенной седалищного нерва, обеспечивали стимуляцию нитями фон Фрея. Давление, при котором мышшь отдергивала заднюю лапу, измеряли и наносили на график на фиг. 3. На фигуре показано, что мышши, получавшие PPF1 после CCI, испытывали значительно меньшую боль (могли выдерживать большее давление), чем мышши, получавшие контроль в виде среды-носителя после CCI. И при имитационных операциях с обработкой средой-носителем также наблюдали значительно меньшую боль, чем при обработке контролем в виде среды-носителя после CCI. Это показывает, что PPF1 положительно влияет на дефицит механической ноцицепции.

На фиг. 4 представлены данные гистологического исследования гиппокампа, проведенного на мышшах дикого типа, описанных на фиг. 1. Нейрогенез измеряли с использованием маркера даблкортина (DCX). У мышшей, получавших CCI, которых обрабатывали с помощью PPF1, нейрогенез в гиппокампе был значительно выше, чем у тех, которые получали среду-носитель. Мыши, получившие имитационную операцию плюс среду-носитель, имели тенденцию к большему нейрогенезу, чем мышши, получавшие CCI и среду-носитель после хирургического вмешательства. Таким образом, PPF1 демонстрировал способность восстанавливать нейрогенез после хронического повреждения нерва.

На фиг. 5 представлены данные гистологического исследования гиппокампа, проведенного на мышшах дикого типа, описанных на фиг. 1. Экспрессию CD68 определяли количественно, и мышши, получавшие CCI плюс среду-носитель, экспрессировали значительно большее количество CD68-положительных клеток в гиппокампе, чем мышши, получавшие CCI плюс PPF1. Подобную степень различия наблюдали между мышшами, получавшими CCI плюс среду-носитель, и мышшами, получавшими имитационное хирургическое вмешательство плюс среду-носитель. Это показывает, что PPF1 может помочь блокировать нейровоспаление, возникающее в результате хронического поражения нервов.

На фиг. 6 представлены данные механического теста на аллодинию фон Фрея у мышшей C57BL/6J возрастом 22 месяца, которые получали CCI или имитационное хирургическое вмешательство и которых тестировали на временной шкале, как показано на фиг. 1. Давление, при котором мышшь отдергивала заднюю лапу, оценивали и представляли на фиг. 6 как недели после CCI или имитационного хирургического вмешательства. На фигуре показано, что мышши, которым вводили PPF1 после хирургического вмешательства CCI, имели значительно повышенную переносимость в отношении механической ноцицепции во все оцениваемые моменты времени, чем мышши, которым вводили среду-носитель после CCI. Напротив, мышши, которым вводили только габапентин, демонстрируют значительное улучшение в отношении

механической ноцицепции через 2 недели после хирургического вмешательства СС1 и подобны мышам, получавшим среду-носитель, во все другие моменты времени. Мыши, подвергшиеся имитационному хирургическому вмешательству, демонстрируют значительно повышенную реакцию на механическую ноцицепцию через 3 и 5 недель после хирургической манипуляции. Вместе эти данные показывают, что PPF1 облегчает периферическую боль на более длительный период времени, чем при стандартном лечении (габапентином).

На фиг. 7 представлены данные теста с горячей пластиной на мышах дикого типа возрастом двадцати двух месяцев, которые получали СС1 или имитационное хирургическое вмешательство и которых тестировали на временной шкале, как описано на фиг. 1. Этот анализ выполняли, как описано в работе Woolfe и Macdonald. (Woolfe G. and Macdonald A.D., J. Pharmacol. Exp. Ther. 80:300-07 (1944), которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном своем объеме). На горячей пластине устанавливали температуру 55°C. Мышей приучали к помещению в прозрачный цилиндр в течение 30 мин. Цилиндр помещали на горячую пластину и запускали таймер. При первом наблюдении за ноцицептивным поведением (например, облизывание задних лап или прыжки) время регистрировали как латентность. На фиг. 7 иллюстрируется ноцицептивная латентность на горячей пластине через 5 недель после СС1 или имитационного хирургического вмешательства. При обработке PPF1 наблюдали значительно меньшую чувствительность к раздражению горячей пластиной по сравнению с мышами, получавшими СС1 плюс контроль в виде среды-носителя, что указывает на защитный эффект PPF1, с учетом того, что стандартные эффекты лечения (габапентином) аналогичны таковым у среды-носителя.

На фиг. 8 представлены данные теста с горячей пластиной на мышах дикого типа, которые получали СС1 или имитационное хирургическое вмешательство и которых протестировали на временной шкале, как показано на фиг. 1. На фиг. 8 иллюстрируется ноцицептивная латентность на горячей пластине через 5 недель после СС1 или имитационного хирургического вмешательства. При обработке с помощью PPF1 и ghALB наблюдали значительно меньшую чувствительность к раздражению горячей пластиной по сравнению с мышами, получавшими СС1 плюс контроль в виде среды-носителя.

На фиг. 9 представлены данные механического теста на аллодинию фон Фрея у мышей C57BL/6J, которые получали СС1 или имитационное хирургическое вмешательство и которых тестировали на временной шкале, как показано на фиг. 1. Мыши, которым вводили PPF1 после хирургического вмешательства СС1, имели значительно повышенную переносимость к механической ноцицепции во все оцениваемые моменты времени, чем мыши, которым вводили среду-носитель после СС1. Напротив, мыши, которым вводили ghALB, демонстрировали ответ на механическую аллодинию, подобный таковому у обрабатываемых средой-носителем мышей во все моменты времени.

На фиг. 10 представлены данные гистологического анализа седалищного нерва (приблизительно на 1000 мкм дистальнее последней лигатуры) на предмет экспрессии основного миелинового белка (МВР) у мышей C57BL/6J, которые получали СС1 или имитационное хирургическое вмешательство, и анализированного после сбора ткани после суток 35, как описано на фиг. 1. На фиг. 10 показано, что у мышей, которым вводили PPF1 после хирургического вмешательства СС1, значительно увеличивалась интенсивность МВР, что свидетельствует об увеличении экспрессии миелина по сравнению с получавшими среду-носитель животными. Мыши с имитацией также экспрессируют повышенный МВР по сравнению с получавшими повреждение СС1 и среду-носитель мышами.

На фиг. 11 представлены данные гистологического анализа седалищного нерва (приблизительно на 1000 мкм дистальнее последней лигатуры) на предмет белка S-100 (экспрессируемого шванновскими клетками) у мышей C57BL/6J, которые получали СС1 или имитационное хирургическое вмешательство, и анализированного после сбора ткани после суток 35, как описано на фиг. 1. На фиг. 11 показано, что у мышей, которым вводили PPF1 после хирургического вмешательства СС1, значительно увеличивалась интенсивность S-100, что свидетельствует об увеличении количества шванновских клеток (которые представляют собой продуцирующие миелин клетки в периферических нервах) по сравнению с получавшими среду-носитель животными. Мыши с имитацией также экспрессируют повышенное количество S-100 по сравнению с получавшими повреждение СС1 и среду-носитель мышами.

На фиг. 12 представлены изображения, выбранные из гистологического анализа седалищного нерва, которые идентифицируют участок, используемый для количественной оценки на фиг. 10 и 11 (приблизительно на 1000 мкм дистальнее последней лигатуры), а также иллюстративные интенсивности белка S-100 (экспрессируемого шванновскими клетками) и основного миелинового белка у мышей C57BL/6J, которые получали хирургическое вмешательство СС1, получали обработку либо средой-носителем, либо PPF1 и использовались для качественного анализа ткани седалищного нерва после суток 35, как показано на фиг. 1.

На фиг. 13 представлены данные гистологического анализа спинного мозга (выполненного на ткани спинного мозга, взятой из поясничного отдела L4-L6) мышей C57BL/6J, которые получали СС1 или имитационное хирургическое вмешательство, и проанализированного после сбора ткани после суток 35, как показано на фиг. 1. На фиг. 13 показано, что у мышей, которым вводили PPF1 после хирургического вмешательства СС1, значительно снизилась интенсивность BDNF в задних рогах спинного мозга, что свидетельствует о сниженной активации микроглии в спинном мозге. Поскольку BDNF представляет

собой провоспалительный цитокин, высвобождаемый активированной микроглией, эти данные свидетельствуют о том, что PPF1 снижает основной регулятор болевых состояний в спинном мозге, нормализуя уровень до уровня у мышей с имитацией (не травмированных CCI).

На фиг. 14 представлены данные гистологического анализа спинного мозга (выполненного на ткани спинного мозга, взятой из поясничного отдела L4-L6) мышей C57BL/6J, которые получали CCI или имитационное хирургическое вмешательство, и проанализированного после сбора ткани после суток 35, как показано на фиг. 1. На фиг. 14 показано, что у мышей, которым вводили PPF1 после хирургического вмешательства CCI, значительно снизилась интенсивность CD68 в задних рогах спинного мозга, что свидетельствует о сниженной активации микроглии в спинном мозге. Поскольку белок CD68 экспрессируется активированной микроглией, это говорит о том, что PPF1 снижает активацию основного типа клеток, ответственных за индукцию болевых состояний в спинном мозге, нормализуя уровень до уровня у мышей с имитацией (не травмированных CCI). Данные, представленные на фиг. 13 и 14, показывают, что PPF1 центрально регулирует состояние боли, возникающее в результате поражения седалищного нерва, и облегчает или предупреждает установление болевых сигналов между периферическими нервами и головным мозгом, также описываемое как центральная сенсibilизация.

На фиг. 15 представлены изображения, выбранные из гистологического анализа спинного мозга, которые идентифицируют участок дорсальных рогов, используемых для количественной оценки на фиг. 14 (выполняемой на ткани спинного мозга, взятой из поясничного отдела L4-L6), и иллюстративные интенсивности белка CD68 (экспрессируемого активированной микроглией) у мышей C57BL/6J, которые получали хирургическое вмешательство CCI и обработку либо средой-носителем, либо PPF1 и использовались для качественного анализа ткани спинного мозга после суток 35, как показано на фиг. 1.

На фиг. 16 представлены изображения, выбранные из гистологического анализа спинного мозга, которые идентифицируют участок дорсальных рогов, используемых для количественной оценки на фиг. 14 (выполняемой на ткани спинного мозга, взятой из поясничного отдела L4-L6), и иллюстративные интенсивности белка BDNF (цитокина, высвобождаемого активированной микроглией) у мышей C57BL/6J, которые получали хирургическое вмешательство CCI и обработку либо средой-носителем, либо PPF1 и использовались для качественного анализа ткани спинного мозга после суток 35, как показано на фиг. 1.

На фиг. 17 показан эксперимент с хроническим констриктивным поражением (CCI). 22-месячным мышам дикого типа осуществляли CCI или имитационное хирургическое вмешательство путем лигирования за 2 недели до введения режима импульсного введения дозы 7 суток подряд PPF1, rhALB или контроля в виде среды-носителя. Поведение оценивали еженедельно в течение недель со второй по седьмую, а сбор тканей для гистологии проводили на протяжении седьмой недели.

На фиг. 18 представлены данные механического теста на аллодинию фон Фрея у мышей C57BL/6J, которые получали CCI или имитационное хирургическое вмешательство и которых протестировали по временной шкале, описанной на фиг. 17. На фиг. 18 показано, что мыши, которым вводили PPF1 через две недели после хирургического вмешательства CCI, имели значительно повышенную переносимость механической ноцицепции, начинающуюся в пределах одной недели после прекращения лечения с помощью PPF1, которая сохранялась на протяжении всего исследования. Результаты на фиг. 18 предполагают, что обработка с помощью PPF1 инициирует процессы, которые снижают чувствительность к механической аллодинии в продольном направлении, поскольку улучшение переносимости проявляется не раньше, чем через неделю после лечения (в отличие от терапевтических средств, которые приносят облегчение исключительно во время лечения, таких как опиоидные анальгетики) и сохраняется не менее 28 суток. Напротив, мыши, которым вводили rhALB, демонстрировали ответ на механическую аллодинию, сходный с таковым у получавших среду-носитель мышей во все моменты времени.

На фиг. 19 представлены данные теста с горячей пластиной на мышцах дикого типа, которые получали CCI или имитационное хирургическое вмешательство и которых протестировали по временной шкале, описанной на фиг. 17. На фиг. 19 показана ноцицептивная латентность при тесте с горячей пластиной через 5 недель после CCI или имитационного хирургического вмешательства. Мыши, получавшие обработку с помощью PPF1, значительно менее чувствительны к раздражению горячей платиной по сравнению с мышами, получавшими CCI плюс контроль в виде среды-носителя.

На фиг. 20 представлены данные теста с горячей пластиной на мышцах дикого типа, которые получали CCI или имитационное хирургическое вмешательство и которых протестировали по временной шкале, описанной на фиг. 17. На фиг. 20 показана ноцицептивная латентность при тесте с горячей пластиной через 7 недель после CCI или имитационного хирургического вмешательства. Мыши, получавшие обработку с помощью PPF1, значительно менее чувствительны к раздражению горячей платиной по сравнению с мышами, получавшими CCI плюс контроль в виде среды-носителя.

На фиг. 21A и 21B представлено гистологическое сравнение между диабетическими ранами (диабетическая модель мыши B6.BKS(D)-Lep^{db}/J), которые не обрабатывали (фиг. 21A) или обрабатывали с помощью PPF1 (фиг. 21B). Черные столбики показывают толщину раневого ложа (эпидермальный слой плюс слой грануляции). Стрелки показывают границы раны. Толщина раневого ложа повышалась у обработанных с помощью PPF1 мышей, как определяли по толщине раневого ложа. Следовательно, PPF1

демонстрирует улучшенное заживление ран.

На фиг. 22А и 22В представлено гистологическое сравнение между диабетическими ранами (диабетическая модель мыши B6.BKS(D)-Lep^{db}/J), которые не обрабатывали (фиг. 22А) или обрабатывали с помощью PPF1 (фиг. 22В). Черные столбики показывают слой грануляции. Синие столбики показывают эпидермальный слой. Обработанная с помощью PPF1 рана демонстрировала более толстый эпидермальный слой, чем необработанная рана, однако слой грануляции характеризовался еще большей тенденцией к различию между обработанными с помощью PPF1 и необработанными ранами (т.е. слой грануляции был толще в обработанных с помощью PPF1 ранах, чем в необработанных ранах).

На фиг. 23 показана общая схема эксперимента по заживлению диабетической раны, использованного на фиг. 24-28. Капли крови указывают на то, когда кровь собирали для измерения содержания глюкозы натошак. В сутки 2 наносили кожную рану, а в сутки 1-7 выполняли внутривенное (iv) введение дозы. Гистологию (показанную под микроскопом) проводили после умерщвления.

На фиг. 24 показан процент раны, все еще открытой в некоторые моменты времени после нанесения раны, в первом исследовании (исследование 1). Мышей обрабатывали либо PPF1 (150 мкл) в течение 7 суток, либо контролем в виде солевого раствора. Через 10 суток размеры открытых ран у животных, получавших обработку с помощью PPF1, были значительно уменьшены по сравнению с таковыми у обрабатываемых контролем в виде солевого раствора (**p<0,006 по непарному Т-критерию).

На фиг. 25 показан процент раны, все еще открытой в некоторые моменты времени после нанесения раны, во втором исследовании (исследование 2). Мышей обрабатывали либо PPF1 (150 мкл) в течение 7 суток, либо контролем в виде солевого раствора. Через 8 суток размеры открытых ран у животных, получавших обработку с помощью PPF1, были значительно уменьшены по сравнению с таковыми у обрабатываемых контролем в виде солевого раствора (**p<0,0018 по непарному Т-критерию).

На фиг. 26 показан процент раны, все еще открытой через 11 суток после нанесения раны, с объединением данных исследований 1 и 2. Получавшие обработку с помощью PPF1 животные демонстрировали статистически значимое снижение процента раны, оставшейся открытой через 11 суток (**p<0,006 по непарному Т-критерию). Различие между получавшими обработку с помощью PPF1 и получавшими обработку средой-носителем животными в сутки 10 было одинаково значимым (** p<0,006 по непарному Т-критерию).

На фиг. 27 представлены результаты исследования с использованием вводимых местным путем PPF1 или среды-носителя в раны мышей B6 ob/ob (мышей B6.Cg-Lepob/J). На фиг. 27 показана парадигма исследования ежедневных введений 30 мкл местного PPF1 или контроля в виде среды-носителя, вводимых в раны. Нанесение раны выполняли, как описано на фиг. 10.

На фиг. 28 представлены результаты исследования местного введения с указанием процента площади первоначальной раны, оставшейся после 10 суток обработки. На фиг. 15 показано, что PPF1 значительно уменьшил процент открытой раны, оставшейся через 10 суток, по сравнению с контролем в виде среды-носителя.

VII. Подробное раскрытие настоящего изобретения

А. Введение.

Настоящее изобретение относится к идентификации и открытию способов и композиций для лечения нежелательных состояний, связанных с послеоперационным восстановлением, и для улучшения такого восстановления.

Фраза "улучшение такого восстановления" означает, что послеоперационное восстановление субъекта может быть ускорено, т.е. субъект может стать подвижным или может быть выписан из стационара за меньшее время, чем это потребовалось бы без вмешательства согласно вариантам осуществления настоящего изобретения.

Фраза "нежелательные состояния" означает состояние или симптом, такие как, например, без ограничения, боль, сердечно-легочные проблемы, инфекции, тромбоземболические проблемы, воспаление и замедленное заживление ран. В настоящем документе описаны способы и композиции для лечения субъектов, страдающих нежелательными состояниями, связанными с послеоперационным восстановлением, и для улучшения такого восстановления, которые являются аспектами настоящего изобретения. В настоящем документе также описаны режимы введения дозы, которые вызывают улучшение у субъектов, страдающих от нежелательных состояний, связанных с послеоперационным восстановлением, и для улучшения такого восстановления. Описанные в настоящем документе способы и композиции применимы для предупреждения осложнений послеоперационного восстановления, облегчения симптомов и предупреждения осложнений послеоперационного восстановления и ускорения послеоперационного восстановления. Способы и композиции в соответствии с настоящим изобретением можно использовать или вводить перед операцией (перед хирургическим вмешательством), в ходе операции (во время хирургического вмешательства) или в послеоперационном периоде (после хирургического вмешательства).

Другой аспект настоящего изобретения относится к лечению хронической боли/нейропатии в целом, а не исключительно, хронической боли/нейропатии, связанной с послеоперационным восстановлением. Способы и композиции в соответствии с настоящим изобретением, описываемые в настоящем документе, могут быть использованы для лечения хронической боли и нейропатии.

Фраза "лечение хронической боли и нейропатии" означает, что степень хронической боли, испытываемой субъектом, которому вводят композиции в соответствии с настоящим изобретением, уменьшается, по оценке субъективными или объективными средствами, незначительно, умеренно или значительно. Такие средства могут включать в себя тесты, проводимые самостоятельно или медицинским специалистом, такие как, например, без ограничения, рентген, MRI, CT сканирования, оценивание больного или описание боли, диапазон движения, рефлексы, сила мышц, чувствительность (например, сколько времени требуется субъекту, чтобы отдернуть конечность, подвергающуюся давлению или другому раздражителю), анализы крови на маркеры воспаления, электромиография (EMG) и скорость нервной проводимости.

Осуществление настоящего изобретения включает в себя применение фракций плазмы крови в качестве лечения, например, одной или нескольких фракций или одного или нескольких эффлюентов, полученных в процессах фракционирования крови, например, подобных процессу фракционирования по Кону, описанному ниже. Вариант осуществления настоящего изобретения включает в себя применение фракции плазмы крови (раствора, состоящего из нормального человеческого альбумина, альфа- и бета-глобулинов, гамма-глобулина и других белков либо по отдельности, либо в виде комплексов, в дальнейшем именуемого "фракцией плазмы крови"). Другой вариант осуществления настоящего изобретения включает в себя применение белковой фракции плазмы крови (PPF) в качестве лечения. Другой вариант осуществления настоящего изобретения включает в себя применение фракции раствора человеческого альбумина (HAS) в качестве лечения. Еще один вариант осуществления включает в себя применение эффлюентов из процессов фракционирования крови, таких как эффлюент I или эффлюент II/III, описываемые ниже. Дополнительный вариант осуществления включает в себя фракцию плазмы крови, из которой удалены практически все факторы свертывания для сохранения эффективности при одновременном снижении риска тромбозов (например, см. заявки на выдачу патентов США № 62/236710 и 63/376529, которые включены в настоящий документ посредством ссылки в полном своем объеме).

Перед рассмотрением подробного описания настоящего изобретения следует учесть, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными способом или композицией, поскольку они, конечно, могут варьировать. Также следует учитывать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена исключительно для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

Обсуждаемые в настоящем документе публикации предназначены исключительно для их раскрытия до даты подачи заявки на данное изобретение. Ничто в данном документе не должно быть истолковано как признание того, что настоящее изобретение не имеет права датировать такую публикацию более ранней датой в силу предшествующего изобретения. Кроме того, указанные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, что может потребовать независимого подтверждения.

Если представляется диапазон значений, подразумевается, что также конкретно раскрывается каждое промежуточное значение, вплоть до десятой единицы нижнего предела, если контекст явно не диктует иное, между верхним и нижним пределами этого диапазона. Каждый меньший диапазон между любым заявленным значением или промежуточным значением в указанном диапазоне и любым другим заявленным или промежуточным значением в этом указанном диапазоне охватывается настоящим изобретением. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут независимо включаться или исключаться из диапазона, и каждый диапазон, в котором один, ни один, или оба предела включены в меньшие диапазоны, также охватывается настоящим изобретением с учетом любого специально исключенного ограничения в заявленном диапазоне. Если указанный диапазон включает в себя один или оба предела, то диапазоны, исключающие один или оба из этих включенных пределов, также включены в настоящее изобретение.

Следует отметить, что формула изобретения может быть составлена так, чтобы исключить любой необязательный элемент. По существу, это утверждение предназначено для использования в качестве предшествующей основы для применения такой исключительной терминологии, как "исключительно", "только" и т.п., в связи с перечислением элементов формулы изобретения или использованием "отрицательного" ограничения.

Как будет очевидно специалистам в данной области после прочтения настоящего раскрытия, каждый из отдельных вариантов осуществления, описанных и проиллюстрированных в настоящем документе, имеет дискретные компоненты и признаки, которые могут быть легко отделены или объединены с признаками любого из нескольких других вариантов осуществления без отклонения от объема или сути настоящего изобретения. Любой изложенный способ может быть выполнен в порядке перечисления событий или в любом другом порядке, который логически возможен.

В. Определения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описываемым в настоящем документе, могут быть использованы на практике или при тестировании настоящего изобре-

тения, описываются некоторые потенциальные и предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми цитируются публикации. Следует учитывать, что настоящее раскрытие заменяет собой любое раскрытие включенной публикации в той степени, в которой существует противоречие.

Следует отметить, что используемые в настоящем документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают в себя ссылки во множественном числе, если контекст явно не диктует иное. Таким образом, например, ссылка на "клетку" включает в себя множество таких клеток, а ссылка на "пептид" включает в себя ссылку на один или несколько пептидов и их эквивалентов, например полипептидов, известных специалистам в данной области, и т.д.

В описываемых способах в соответствии с настоящим изобретением термины "хозяин", "субъект", "индивидуум" и "больной" используются взаимозаменяемо и относятся к любому млекопитающему, нуждающемуся в таком лечении согласно раскрываемым способам. Такие млекопитающие включают в себя, например, людей, овец, коров, лошадей, свиней, собак, кошачьих, отличных от человека приматов, мышей и крыс. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является отличное от человека млекопитающее. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой сельскохозяйственное животное. Согласно другим вариантам осуществления субъект представляет собой домашнее животное. Согласно определенным вариантам осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых случаях субъект представляет собой человека. Другие субъекты могут включать в себя домашних животных (например, собак и кошек), домашний скот (например, коров, свиней, коз, лошадей и т. п.), грызунов (например, мышей, морских свинок и крыс, например, как в животных моделях заболевания), а также отличных от человека приматов (например, шимпанзе и обезьян). Таким образом, субъекты в соответствии с настоящим изобретением включают в себя, без ограничения, млекопитающих, например людей и других приматов, таких как шимпанзе и другие виды человекообразных обезьян и остальных обезьян, и т.п., при этом согласно некоторым вариантам осуществления субъектом являются люди. Термин "субъект" также включает в себя человека или организм любых возраста, массы или других физических характеристик, при этом субъект может быть взрослым, ребенком, младенцем или новорожденным.

Под термином "молодой человек" или "молодой индивидуум" подразумевается индивидуум, имеющий хронологический возраст 40 лет или моложе, например 35 лет или моложе, в том числе 30 лет или моложе, например 25 лет или моложе или 22 года и моложе. В некоторых случаях индивидуумом, который служит источником препарата на основе крови, содержащего плазму крови молодого человека, является человек в возрасте 10 лет или моложе, например 5 лет или моложе, в том числе 1 год или моложе. В некоторых случаях субъектом является новорожденный, а источником препарата на основе плазмы крови является пуповина, при этом препарат на основе плазмы крови берется из пуповины новорожденного. Таким образом, термин "молодой человек" или "молодой индивидуум" может относиться к субъекту в возрасте от 0 до 40 лет, например 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 лет. В других случаях термин "молодой человек" или "молодой индивидуум" может относиться к биологическому (в противоположность хронологическому) возрасту, например к индивидууму, у которого не обнаружено содержание воспалительных цитокинов в плазме крови, наблюдаемое у сравнительно пожилых индивидуумов. И наоборот, термин "молодой человек" или "молодой индивидуум" может относиться к биологическому (в противоположность хронологическому) возрасту, например к индивидууму, у которого наблюдается более высокое содержание противовоспалительных цитокинов в плазме крови по сравнению с содержанием у сравнительно пожилых индивидуумов. Например, без ограничения, воспалительный цитокин представляет собой эотаксин, и разница кратности между молодым субъектом или молодым индивидуумом и более пожилыми индивидуумами составляет по меньшей мере 1,5 раза. Подобным образом, разница кратности между пожилыми и более молодыми индивидуумами в отношении других воспалительных цитокинов может быть использована для соотнесения к биологическому возрасту. (См. заявку на патент США № 13/575437, которая включена в настоящий документ посредством ссылки). Обычно индивидуум здоров, например, у индивидуума нет гематологических злокачественных новообразований или аутоиммунного заболевания на момент сбора.

Используемый в настоящем документе термин "лечение" относится к любому из (i) предупреждения заболевания или нарушения или (ii) снижения или устранения симптомов заболевания или нарушения. Лечение можно проводить профилактически (до начала заболевания) или терапевтически (после начала заболевания). Эффект может быть профилактическим с точки зрения полного или частичного предупреждения заболевания или его симптома и/или может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения от заболевания и/или неблагоприятного эффекта, связанного с лечением. Таким образом, используемый в настоящем документе термин "лечение" охватывает любое лечебное состояние, связанное с послеоперационным восстановлением у млекопитающего, и включает в себя (a) предупреждение возникновения состояния у субъекта; (b) подавление состояния, т.е. прекращение его возникновения; или (c) облегчение состояния, т.е. обеспечение регрессии состояния. Лечение может приводить к множеству различных физических проявлений, например к модуляции экспрессии генов,

омоложению ткани или органов, уменьшению воспаления и т.д. Терапевтическое средство можно вводить до, во время или после проявления состояния. Рассматриваемую терапию можно проводить во время симптоматической стадии состояния, а в некоторых случаях после симптоматической стадии состояния.

Препараты на основе крови, содержащие компоненты плазмы крови.

При практическом применении рассматриваемых способов препарат на основе крови, содержащий компоненты плазмы крови, вводят нуждающемуся в этом индивидууму, например индивиду, страдающему послеоперационным состоянием. По существу, способы согласно вариантам осуществления настоящего изобретения предусматривают введение препарата на основе крови, содержащего компоненты плазмы крови, от индивидуума ("индивидуума-донора" или "донора") индивидууму, страдающему послеоперационным состоянием ("индивидууму-реципиенту" или "реципиенту"). Под термином "препарат на основе крови, содержащий компоненты плазмы крови" подразумевается любой продукт, полученный из крови, которая содержит плазму (например, цельная кровь, плазма крови или ее фракции). Термин "плазма крови" используется в его общепринятом смысле и относится к жидкому компоненту крови соломленного/бледно-желтого цвета, состоящему из приблизительно 92% воды, 7% белков, таких как альбумин, гамма-глобулин, антигемофильный фактор и другие факторы свертывания крови, и 1% минеральных солей, сахаров, жиров, гормонов и витаминов. Неограничивающие примеры препаратов на основе крови, содержащих плазму крови, подходящих для использования в рассматриваемых способах, включают в себя цельную кровь, обработанную антикоагулянтном (например, EDTA, цитратом, оксала-том, гепарином и т.д.), препараты на основе крови, полученные путем фильтрации цельной крови для удаления белых кровяных клеток ("лейкоредукция"), препараты на основе крови, состоящие из полученной плазмаферезом или полученной аферезом плазмы крови, свежемороженой плазмы крови, препараты на основе крови, состоящие в основном из очищенной плазмы крови, и препараты на основе крови, состоящие в основном из фракций плазмы крови. В некоторых случаях используемый препарат на основе крови не является препаратом на основе плазмы цельной крови, что означает, что продукт не является цельной кровью, так что в нем отсутствует один или несколько компонентов, обнаруживаемых в цельной крови, таких как эритроциты, лейкоциты и т.д., по меньшей мере в той степени, в которой эти компоненты присутствуют в цельной крови. В некоторых случаях препарат на основе плазмы крови является практически, если не полностью, бесклеточным, при этом в таких случаях содержание клеток может составлять 5% по объему или меньше, например, 1% или меньше, в том числе 0,5% или меньше, при этом в некоторых случаях бесклеточный фракции плазмы крови представляют собой такие композиции, в которых полностью отсутствуют клетки, т.е. они не содержат клеток.

Сбор препаратов на основе крови, содержащих компоненты плазмы крови.

Варианты осуществления способов, описываемых в настоящем документе, предусматривают введение препаратов на основе крови, содержащих компоненты плазмы крови, которые могут быть получены от доноров, в том числе людей-добровольцев. Термин "полученный от человека" может относиться к таким препаратам. Способы сбора препаратов на основе крови, содержащих плазму крови, от доноров хорошо известны в уровне техники. (См., например, работу AABB TECHNICAL MANUAL, (Mark A. Fung, et al., eds., 18th ed. 2014), включенную в настоящий документ посредством ссылки).

Согласно одному варианту осуществления донорство осуществляют путем венопункции. Согласно другому варианту осуществления венопункция представляет собой только однократную венопункцию. Согласно другому варианту осуществления объемное замещение физиологического раствора не используют. Согласно предпочтительному варианту осуществления используют процесс плазмафереза получения препаратов на основе крови, содержащих плазму крови. Плазмаферез может предусматривать удаление установленного по массе объема плазмы крови с возвратом клеточных компонентов донору. Согласно предпочтительному варианту осуществления цитрат натрия используют во время плазмафереза для предупреждения свертывания клеток. Объем плазмы крови, взятой у донора, предпочтительно составляет от 690 до 880 мл после введения цитрата и предпочтительно согласуется с массой донора.

С. Фракции плазмы крови.

Во время Второй мировой войны возникла потребность в стабильном плазмозаменителе, который можно было бы использовать на поле боя, когда солдаты теряли большое количество крови. В результате были разработаны способы приготовления высушенной замораживанием плазмы крови. Однако использование высушенной замораживанием плазмы крови было затруднено в боевых условиях, поскольку для восстановления требовалась стерильная вода. В качестве альтернативы доктор E.J. Cohn предположил, что можно использовать альбумин, и приготовил готовый к применению стабильный раствор, который можно было немедленно ввести для лечения шока. (См. Johan, Current Approaches to the Preparation of Plasma Fractions in (Biotechnology of Blood) 165 (Jack Goldstein ed., 1st ed., 1991). В процедуре очистки фракций плазмы крови доктор Кон использовал холодный этанол из-за его денатурирующего эффекта, а также изменения pH и температуры для достижения разделения.

Вариант осуществления способов, описываемых в настоящем документе, предусматривает введение фракций плазмы крови субъекту. Фракционирование представляет собой процесс, с помощью которого некоторые подгруппы белков отделяют от плазмы крови. Технология фракционирования известна в

уровне техники и предусматривает стадии, разработанные Cohn et al. в 1940-х гг.. (E. Cohn, Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. 68 J. Am. Chem. Soc. 459 (1946), включенная в настоящий документ посредством ссылки). Этот процесс предусматривает несколько стадий, при этом каждая стадия предусматривает определенные концентрации этанола, а также сдвиги pH, температуры и осмоляльности, которые приводят к селективному осаждению белка. Осадки также отделяют центрифугированием или осаждением. Первоначальный "процесс фракционирования по Кону" включал в себя разделение белков посредством осаждения на пять фракций, обозначенных фракцией I, фракцией II + III, фракцией IV-1, фракцией IV-4 и фракцией V. Первоначально определенным конечным продуктом этого процесса был альбумин (фракция V). Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения каждая фракция (или эффлюент с предыдущей стадии разделения) содержит или потенциально содержит терапевтически применимые белковые фракции. (См. работы Thierry Burnouf, *Modern Plasma Fractionation*, 21(2) *Transfusion Medicine Reviews*, 101 (2007); Adil Denizli, *Plasma fractionation: conventional and chromatographic methods for albumin purification*, 4 J. Biol. & Chem. 315 (2011); и T. Brodniewicz-Proba, *Human Plasma Fractionation and the Impact of New Technologies on the Use and Quality of Plasma-derived Products*, 5 *Blood Reviews* 245 (1991), а также патенты США № 3869431, 5110907, 5219995, 7531513 и 8772461, которые включены в настоящий документ посредством ссылки). Может быть выполнена регулировка вышеуказанных экспериментальных параметров для получения конкретных белковых фракций.

В последнее время фракционирование стало еще более сложным и, как таковое, включает в себя дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения. Это недавнее повышение сложности произошло за счет внедрения хроматографии, обеспечивающей выделение новых белков из существующих фракций, таких как криопреципитат, криосупернатантная плазма крови и фракции Кона; увеличения выделения IgG за счет интеграции хроматографии и процесса фракционирования этанолом, а также уменьшения/инактивации/удаления вирусов. (Там же). Для захвата белков при физиологическом значении pH и ионной силе может быть использована анионообменная хроматография. Это сохраняет функциональную активность белков и/или белковых фракций. Гепарин и моноклональные антитела также используются в аффинной хроматографии. Кроме того, используют фракционирование с использованием гель-фильтрации, фракционирование с помощью соли и фракционирование с помощью полиэтиленгликоля. (Hosseini M. *Iran J. Biotech.*, 14(4):213-20 (2016), включенная в настоящий документ посредством ссылки). Рядовому специалисту в данной области будет понятно, что параметры и методики, описанные выше, могут быть скорректированы для получения конкретных желаемых фракций плазмы крови, содержащих белок.

Фракционирование плазмы крови также может быть осуществлено на основе сульфата аммония. (См., например, работу Odunuga O.O., *Biochem Compounds*, 1:3 (2013); Wingfield P.T., *Curr Protoc. Protein Sci.*, Appx. 3 (2001), включенную в настоящий документ посредством ссылки). В дополнение к получению определенных фракций крови, фракционирование на основе сульфата аммония использовали для уменьшения большого количества белков из плазмы крови. (Saha S., et al., *J. Proteomics Bioinform*, 5(8) (2012), включенная в настоящий документ посредством ссылки).

Извлеченный криопреципитат замораживают при -30°C или ниже и хранят. Плазму крови с низким содержанием криопреципитата ("криосупернатантную") немедленно обрабатывают для захвата (например, с помощью первичной хроматографии) лабильных факторов свертывания, таких как комплекс фактора IX и его компоненты, а также ингибиторов протеазы, таких как антитромбин и ингибитор С1-эстеразы. Последовательное центрифугирование и выделение осадка может быть применено на последующих стадиях. Такие методики известны рядовому специалисту в данной области и описаны, например, в патентах США № 4624780, 5219995, 5288853, а также в заявках на выдачу патентов США № 20140343255 и 20150343025, раскрытия которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном своем объеме.

Согласно варианту осуществления настоящего изобретения фракция плазмы крови может включать в себя фракцию плазмы крови, содержащую существенную концентрацию альбумина. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения фракция плазмы крови может включать в себя фракцию плазмы крови, содержащую существенную концентрацию IgG или внутривенного иммуноглобулина (IGIV) (например, Gamunex-C®). Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения фракция плазмы крови может включать в себя фракцию плазмы крови IGIV, такую как Gamunex-C®, которая была в значительной степени истощена по иммунному глобулину (IgG) способами, хорошо известными рядовому специалисту в данной области, такими как, например, опосредованное белком А истощение. (См. Keshishian, H., et al., *Multiplexed, Quantitative Workflow for Sensitive Biomarker Discovery in Plasma Yields Novel Candidates for Early Myocardial Injury*, *Molecular & Cellular Proteomics*, 14 at 2375-93 (2015)). Согласно дополнительному варианту осуществления фракция плазмы крови может представлять собой фракцию, в которой практически все факторы свертывания удалены для сохранения эффективности фракции с пониженным риском тромбозов. Например, фракция плазмы крови может

представлять собой фракцию плазмы крови, описанную в патенте Соединенных Штатов Америки № 62/376529, поданном 18 августа 2016 г., раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки в полном своем объеме.

D. Препараты на основе альбумина.

Рядовым специалистам в данной области известны две общие категории препаратов на основе альбумина плазмы крови ("APP"): белковая фракция плазмы крови ("PPF") и раствор человеческого альбумина ("HAS"). PPF получается в процессе с более высоким выходом, чем HAS, но имеет более низкую минимальную чистоту альбумина, чем HAS (>83% для PPF и >95% для HAS). (Production of human albumin solution: a continually developing colloid, P. Matejtschuk et al., British J. of Anaesthesia, 85(6):887-95, at 888 (2000)). В некоторых случаях чистота альбумина PPF составляет от 83 до 95% или в качестве альтернативы от 83 до 96%. Чистоту альбумина можно определить с помощью электрофореза или других количественных анализов, таких как, например, масс-спектрометрия. Кроме того, отмечали, что PPF имеет недостаток, заключающийся в присутствии белковых "контаминантов", таких как РКА. (Там же). Как следствие, препараты PPF потеряли популярность как препараты на основе альбумина плазмы крови и даже были исключены из фармакопей некоторых стран. (Там же). Вопреки этим опасениям, в соответствии с настоящим изобретением эти "контаминанты" успешно используются. Помимо α -, β - и γ -глобулинов, а также вышеупомянутых РКА, в способах в соответствии с настоящим изобретением используют дополнительные белки или другие факторы в составе "контаминантов", которые способствуют таким процессам, как нейрогенез, выживание нейронных клеток, улучшение когнитивных функций или двигательной функции и снижение нейровоспаления.

Специалистам в данной области будет понятно, что существует или существовало несколько коммерческих источников PPF ("коммерческих препаратов PPF"). К ним относятся PPF Plasma-Plex™ (Armor Pharmaceutical Co., Tarrytown, NY), PPF Plasmanate™ (Grifols, Clayton, NC), PPF Plasmatein™ (Альфа Therapeutics, Los Angeles, CA) и Protenate™ (Baxter Labs, Inc. Deerfield, IL).

Специалистам в данной области также будет понятно, что существует или существовало несколько коммерческих источников HAS ("коммерческих препаратов HAS"). К ним относятся Albuminar™ (CSL Behring), AlbuRx™ (CSL Behring), Albutein™ (Grifols, Clayton, NC), Buminat™ (Baxatla, Inc., Bannockburn, IL), Flexbumin™ (Baxalta, Inc., Bannockburn, IL) и Plasbumin™ (Grifols, Clayton, NC).

1. Белковая фракция плазмы крови (человека) (PPF).

Согласно Управлению по контролю качества продуктов питания и лекарственных средств ("FDA") термин "белковая фракция плазмы крови (человека)" или PPF представляет собой собственное название препарата, определяемого как "стерильный раствор белка, состоящего из альбумина и глобулина, полученного из плазмы крови человека" (Code of Federal Regulations "CFR" 21 CFR 640.90, который включен в настоящий документ посредством ссылки). Исходный материал PPF представляет собой плазму крови, извлеченную из цельной крови, полученной в соответствии с требованиями 21 CFR 640.1-640.5 (включенными в настоящий документ посредством ссылки), или исходную плазму крови, полученную в соответствии с требованиями 21 CFR 640.60-640.76 (включенными в настоящий документ посредством ссылки).

PPF тестируют на предмет соответствия следующим стандартам согласно 21 CFR 640.92 (включенным в настоящий документ посредством ссылки):

(a) конечный препарат должен представлять собой $5,0 \pm 0,30\%$ раствор белка; а также

(b) общий белок в конечном препарате должен состоять по меньшей мере на 83% из альбумина и не более чем на 17% из глобулинов. Не более 1% от общего белка должен составлять гамма-глобулин. Белковый состав определяют способом, одобренным для каждого производителя директором Центра по оценке и изучению биологических препаратов при Управлении по контролю качества продуктов питания и лекарственных средств.

Используемый в настоящем документе термин "белковая фракция плазмы крови" или "PPF" относится к стерильному раствору белка, состоящего из альбумина и глобулина, полученного из плазмы крови человека, с содержанием альбумина по меньшей мере 83%, не более чем 17% глобулинов (включая α 1-, α 2-, β - и γ -глобулины) и других белков плазмы крови, а также не более чем 1% гамма-глобулина, как определено с помощью электрофореза. (Hink, J.H., Jr., et al., Preparation and Properties of a Heat-Treated Human Plasma Protein Fraction, VOX SANGUINIS, 2(174) (1957)). PPF также может относиться к твердой форме, которая при суспендировании в растворителе имеет подобный состав. Общая фракция глобулина может быть определена путем вычитания альбумина из общего белка. (Busher, J., Serum Albumin and Globulin, CLINICAL METHODS: THE HISTORY, PHYSICAL, AND LABORATORY EXAMINATIONS, Chapter 10, Walker HK, Hall WD, Hurst JD, eds. (1990)).

2. Альбумин (человека) (HAS).

Согласно FDA термин "альбумин (человека)" (также называемый в настоящем документе "HAS") представляет собой собственное название препарата, определяемого как "стерильный раствор альбумина, полученного из плазмы крови человека". (Code of Federal Regulations "CFR" 21 CFR 640.80, который включен в настоящий документ посредством ссылки). Исходный материал для альбумина (человека)

представляет собой плазму крови, извлеченную из цельной крови, полученной в соответствии с требованиями 21 CFR 640,1-640,5 (включенными в настоящий документ посредством ссылки), или исходную плазму крови, полученную в соответствии с требованиями 21 CFR 640.60-640.76 (включенными в настоящий документ посредством ссылки). Другие требования к альбумину (человека) перечислены в 21 CFR 640.80-640.84 (включенном в настоящий документ посредством ссылки).

Альбумин (человека) тестируют на соответствие следующим стандартам согласно 21 CFR 640.82:

(а) концентрация белка: конечный препарат должен соответствовать одной из следующих концентраций: $4,0 \pm 0,25$ -, $5,0 \pm 0,30$ -, $20,0 \pm 1,2$ - и $25,0 \pm 1,5$ %-ный раствор белка;

(б) состав белка: по меньшей мере 96% общего белка в конечном препарате должен составлять альбумин, как определяется способом, одобренным для каждого производителя директором Центра по оценке и изучению биологических препаратов при Управлении по контролю качества продуктов питания и лекарственных средств.

Используемый в настоящем документе термин "альбумин (человека)" или "HAS" относится к стерильному раствору белка, состоящего из альбумина и глобулина, полученного из плазмы крови человека, с содержанием альбумина по меньшей мере 95%, не более чем 5% глобулинов (включая $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β - и γ -глобулины) и других белков плазмы крови. HAS также может относиться к твердой форме, которая при суспендировании в растворителе имеет подобный состав. Общая фракция глобулина может быть определена путем вычитания альбумина из общего белка.

Как будет понятно рядовому специалисту в данной области, фракции PPF и HAS также могут быть высушены замораживанием или представлять собой другую твердую форму. Такие препараты с соответствующими добавками могут быть использованы, например, для изготовления таблеток, порошков, гранул или капсул. Твердая форма может быть составлена в препараты для инъекций путем их растворения, суспендирования или эмульгирования в водном или неводном растворителе, таком как растительные или другие аналогичные масла, синтетические глицериды алифатических кислот, сложные эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоль, и, если желательно, с традиционными добавками, такими как солюбилизаторы, изотонические средства, суспендирующие средства, эмульгирующие средства, стабилизаторы и консерванты.

Е. Фракции с пониженным содержанием фактора свертывания.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения применяют фракцию плазмы крови, из которой удалены практически все факторы свертывания для сохранения эффективности фракции с пониженным риском тромбозов. Для удобства препарат на основе крови может быть получен от молодого донора или пула молодых доноров и может быть лишен IgM с получением препарата на основе крови молодого индивидуума, совместимого с ABO. В настоящее время переливаемая плазма крови соответствует группе крови ABO, поскольку наличие встречающихся в природе антител против антигенов А и В может привести к трансфузионным реакциям. IgM, по-видимому, отвечает за трансфузионные реакции, когда больные получают плазму крови, не подобранную по ABO. Удаление IgM из препаратов на основе крови или фракций помогает исключить трансфузионные реакции у субъектов, которым вводят препараты на основе крови и фракции плазмы крови в соответствии с настоящим изобретением.

Следовательно, согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего нежелательным состоянием, связанным с послеоперационным восстановлением. Способ предусматривает введение субъекту препарата на основе крови или фракции крови, полученного из цельной крови от индивидуумов или пула индивидуумов, при этом препарат на основе крови или фракции крови практически не содержит (а) по меньшей мере один фактор свертывания и/или (б) IgM. Согласно определенным вариантам осуществления индивидуум(ы), от которого(которых) получен препарат на основе крови или фракции крови, представляет(представляют) собой молодого(ых) индивидуума(ов). Согласно определенным вариантам осуществления препарат на основе крови практически не содержит по меньшей мере один фактор свертывания и IgM. Согласно некоторым вариантам осуществления препарат на основе крови практически не содержит фибриноген (фактор I). Согласно дополнительным вариантам осуществления в препарате на основе крови практически отсутствуют эритроциты и/или лейкоциты. Согласно следующим вариантам осуществления препарат на основе крови является практически бесклеточным. Согласно другим вариантам осуществления препарат на основе крови получают из плазмы крови. Такие варианты осуществления настоящего изобретения дополнительно подтверждаются заявкой на выдачу патента США № 62/376529, поданной 18 августа 2016 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном своем объеме.

Ф. Лечение обогащенными белком белковыми препаратами на основе плазмы крови.

Согласно дополнительным вариантам осуществления настоящего изобретения применяют фракции плазмы крови с пониженной концентрацией альбумина по сравнению с PPF, но с повышенными количествами глобулинов и других белков плазмы крови (которые иногда называли "контаминантами"). В вариантах осуществления, касающихся PPF, HAS, эффлюента I и эффлюента II/III, практически отсутствуют факторы свертывания крови. Такие фракции плазмы крови далее в настоящем документе называют "обогащенными белком белковыми препаратами на основе плазмы крови". Например, согласно варианту

осуществления настоящего изобретения могут применять обогащенный белком белковый препарат на основе плазмы крови, состоящий из 82% альбумина и 18% α -, β - и γ -глобулинов, и также других белков плазмы крови. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения могут применять обогащенный белком белковый препарат на основе плазмы крови, состоящий из 81% альбумина и 19% α -, β - и γ -глобулинов и/или других белков плазмы крови. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения могут применять обогащенный белком белковый препарат на основе плазмы крови, состоящий из 80% альбумина и 20% α -, β - и γ -глобулинов и/или других белков плазмы крови. Согласно дополнительным вариантам осуществления настоящего изобретения могут применять обогащенные белком белковые препараты на основе плазмы крови, состоящие из 70-79% альбумина и соответствующих 21-30% α -, β - и γ -глобулинов и других белков плазмы крови. Согласно дополнительным вариантам осуществления настоящего изобретения могут применять обогащенные белком белковые препараты на основе плазмы крови, состоящие из 60-69% альбумина и соответствующих 31-40% α -, β - и γ -глобулинов и других белков плазмы крови. Согласно дополнительным вариантам осуществления настоящего изобретения могут применять обогащенные белком белковые препараты на основе плазмы крови, состоящие из 50-59% альбумина и соответствующих 41-50% α -, β - и γ -глобулинов и других белков плазмы крови. Согласно дополнительным вариантам осуществления настоящего изобретения могут применять обогащенные белком белковые препараты на основе плазмы крови, состоящие из 40-49% альбумина и соответствующих 51-60% α -, β - и γ -глобулинов и других белков плазмы крови. Согласно дополнительным вариантам осуществления настоящего изобретения могут применять обогащенные белком белковые препараты на основе плазмы крови, состоящие из 30-39% альбумина и соответствующих 61-70% α -, β - и γ -глобулинов и других белков плазмы крови. Согласно дополнительным вариантам осуществления настоящего изобретения могут применять обогащенные белком белковые препараты на основе плазмы крови, состоящие из 20-29% альбумина и соответствующих 71-80% α -, β - и γ -глобулинов и других белков плазмы крови. Согласно дополнительным вариантам осуществления настоящего изобретения могут применять обогащенные белком белковые препараты на основе плазмы крови, состоящие из 10-19% альбумина и соответствующих 81-90% α -, β - и γ -глобулинов и других белков плазмы крови. Согласно дополнительным вариантам осуществления настоящего изобретения могут применять обогащенные белком белковые препараты на основе плазмы крови, состоящие из 1-9% альбумина и соответствующих 91-99% α -, β - и γ -глобулинов и других белков плазмы крови. Согласно следующему варианту осуществления настоящего изобретения могут применять обогащенные белком белковые препараты на основе плазмы крови, состоящие из 0% альбумина и 100% α -, β - и γ -глобулинов и других белков плазмы крови.

Согласно описанным выше вариантам осуществления настоящего изобретения концентрации общего гамма-глобулина также могут составлять 1-5%.

Конкретные концентрации белков во фракции плазмы крови могут быть определены с использованием методик, хорошо известных рядовому специалисту в соответствующей области. Например, без ограничения, такие методики включают в себя электрофорез, масс-спектрометрию, анализ ELISA и анализ вестерн-блоттинга.

Г. Получение фракций плазмы крови

Способы получения PPF и других фракций плазмы крови хорошо известны рядовым специалистам в данной области. Вариант осуществления изобретения позволяет собирать кровь, используемую для получения белковой фракции плазмы крови человека, в колбы с цитратом или антикоагулянтным раствором цитрата декстрозы (или другим антикоагулянтом) для ингибирования коагуляции с дальнейшим разделением фракций I, II + III, IV и PPF согласно способу, описанному у Hink et al. (См. работу Hink, J.H., Jr., et al., Preparation and Properties of a Heat-Treated Human Plasma Protein Fraction, VOX SANGUINIS, 2(174) (1957), включенную в настоящий документ посредством ссылки). Согласно этому способу смесь может быть собрана до 2-8°C. Затем плазму крови можно отделять центрифугированием при 7°C, удалять и хранить при -20°C. Затем плазму можно размораживать при 37°C и фракционировать, предпочтительно в течение 8 ч после удаления из хранилища при -20°C.

Плазма крови может быть выделена из фракции I с использованием 8% этанола при pH 7,2 и температуре от -2 до -2,5°C с концентрацией белка от 5,1 до 5,6%. Может быть добавлен холодный 53,3%-ный этанол (176 мл/л плазмы крови) с ацетатным буфером (200 мл 4 М ацетата натрия, 230 мл ледяной уксусной кислоты с доведением до 1 л с помощью H₂O) струями при скорости, например, 450 мл/мин при понижении температуры плазмы крови до -2°C. Фракция I может быть отделена и удалена из эффлюента (эффлюента I) посредством ультрацентрифугирования. Фибриноген может быть получен из фракции I согласно способам, хорошо известным рядовым специалистам в данной области.

Фракция II + III может быть выделена из эффлюента I посредством доведения эффлюента до 21% этанола при pH 6,8, при температуре -6°C, с концентрацией белка 4,3%. Холодный 95%-ный этанол (176 мл/л эффлюента I) с 10 М уксусной кислотой, используемой для доведения pH, может быть добавлен струями при скорости, например, 500 мл/мин, при снижении температуры эффлюента I до -6°C. Полученный в результате осадок (фракция II + III) может быть удален центрифугированием при -6°C. Гам-

ма-глобулин может быть получен из фракции II + III с использованием способов, хорошо известных рядовым специалистам в данной области.

Фракция IV-1 может быть выделена из эффлюента II + III ("эффлюента II/III") посредством доведения эффлюента до 19% этанола при pH 5,2, при температуре -6°C и концентрации белка 3%. H_2O и 10 М уксусная кислота, используемая для доведения pH, могут быть добавлены струями при поддержании эффлюента II/III при -6°C в течение 6 ч. Осажденная фракция VI-1 может быть осаждена при -6°C в течение 6 ч, а затем выделена из эффлюента центрифугированием при той же температуре. Стабильная белковая фракция плазмы крови может быть извлечена из эффлюента IV-1 посредством доведения концентрации этанола до 30% при pH 4,65, температуре -7°C и концентрации белка 2,5%. Это может быть выполнено путем доведения pH эффлюента IV-1 с помощью холодной смеси кислоты и спирта (двух частей 2 М уксусной кислоты и одной части 95%-ного этанола). При поддержании температуры -7°C на каждый литр доведенного эффлюента IV-1 добавляют 170 мл холодного этанола (95%). Выпавшим в осадок белкам можно дать отстояться в течение 36 ч, а затем удалить их центрифугированием при -7°C .

Восстановленные белки (стабильная белковая фракция плазмы крови) могут быть высушены (например, путем сушки замораживанием) для удаления спирта и H_2O . Полученный в результате высушенный порошок можно растворить в стерильной дистиллированной воде, например, с использованием 15 л воды/kg порошка, с доведением pH раствора до 7,0 с помощью 1 М NaOH. Конечная концентрация белка 5% может быть достигнута путем добавления стерильной дистиллированной воды, содержащей ацетилтриптофанат натрия, каприлат натрия и NaCl, с доведением конечной концентрации до 0,004 М ацетилтриптофаната, 0,004 М каприлата и 0,112 М натрия. Наконец, раствор можно профильтровать при 10°C для получения прозрачного раствора, а затем подвергнуть термообработке для инактивации патогенов при 60°C в течение по меньшей мере 10 ч.

Рядовому специалисту в данной области будет понятно, что каждые из различных фракций и эффлюентов, описанных выше, можно использовать со способами в соответствии с настоящим изобретением для лечения состояний, связанных с послеоперационным восстановлением. Например, но не в качестве ограничения, эффлюенты I или эффлюент II/III могут использоваться для лечения состояний, связанных с послеоперационным восстановлением, или для ускорения послеоперационного восстановления и являются вариантами осуществления изобретения.

Предыдущие способы получения фракций плазмы крови и белковой фракции плазмы крови (PPF) являются исключительно иллюстративными и включают в себя просто варианты осуществления настоящего изобретения. Рядовому специалисту в данной области будет понятно, что эти способы могут варьировать. Например, pH, температура и концентрация этанола, среди прочего, могут быть отрегулированы для получения разных вариаций фракций плазмы крови и белковой фракции плазмы крови согласно разным вариантам осуществления и способам в соответствии с настоящим изобретением. В другом примере дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к применению нанофильтрации для удаления/инактивации патогенов из фракций плазмы крови и белковой фракции плазмы крови.

Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к способам и композиции с использованием и/или с содержанием дополнительных фракций плазмы крови. Например, настоящее изобретение, среди прочего, предполагает, что конкретные концентрации альбумина не являются критическими для лечения состояний, связанных с послеоперационным восстановлением, или для ускорения послеоперационного восстановления. Следовательно, фракции с пониженной концентрацией альбумина, такие как фракции, содержащие менее 83% альбумина, рассматриваются в настоящем изобретении.

Н. Лечение.

Аспекты способов в соответствии с настоящим изобретением, описываемые в настоящем документе, включают в себя лечение субъекта препаратом на основе крови, содержащим плазму крови, такую как фракция плазмы крови, например, как описывается выше. Вариант осуществления включает в себя лечение субъекта-человека препаратом на основе крови, содержащим плазму крови. Специалисту в данной области будет понятно, что способы лечения субъектов препаратами на основе крови, содержащими плазму крови, известны в уровне техники. Например, без ограничения, один вариант осуществления способов в соответствии с настоящим изобретением, описываемых в настоящем документе, предусматривает введение свежемороженой плазмы крови субъекту для лечения состояний, связанных с послеоперационным восстановлением. Согласно одному варианту осуществления препарат на основе крови, содержащий плазму крови, вводят немедленно, например, в пределах приблизительно 12-48 ч после сбора у донора, индивидууму, страдающему состоянием, связанным с послеоперационным восстановлением. В таких случаях препарат можно хранить в холодильнике, например, при $0-10^{\circ}\text{C}$. Согласно другому варианту осуществления свежемороженой плазмы крови представляет собой плазму крови, которую хранили замороженной (криоконсервированной) при -18°C или ниже. Перед введением свежемороженную плазму крови размораживают и после размораживания вводят субъекту через 60-75 мин после начала процесса размораживания. Каждый субъект предпочтительно получает одну единицу свежемороженой плазмы крови (200-250 мл), при этом свежемороженную плазму крови предпочтительно по-

лучают от доноров предварительно определенного возрастного диапазона. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения свежемороженая плазма крови предоставляется молодыми индивидуумами (получается от таковых). Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения свежемороженая плазма крови предоставляется донорами того же пола (получается от таковых). Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения свежемороженая плазма крови предоставляется донорами возрастного диапазона от 18 до 22 лет (получается от таковых).

Согласно варианту осуществления настоящего изобретения композиции в соответствии с настоящим изобретением (например, препарат на основе крови, содержащий плазму крови, такой как фракция плазмы крови) вводят внутривенно. Композиции в соответствии с настоящим изобретением также могут быть доставлены внутривенно. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения композиции в соответствии с настоящим изобретением могут быть доставлены перорально, подкожно или местным путем. Местные составы для лечения ран и обеспечения заживления ран известны в уровне техники в виде гелей, кремов, мазей, марли, пластырей и т.п., и композиции в соответствии с настоящим изобретением могут быть составлены как таковые. (См., например, Kahn A.W., et al., *Pharmacogn Mag*, 9 (Suppl 1):S6-S10 (2013), заявку на выдачу патента США № 5641483, заявку на выдачу патента США № 4885163, заявку на выдачу патента США № 8313764, которые включены в настоящий документ посредством ссылки в полном своем объеме).

Согласно варианту осуществления настоящего изобретения препараты на основе крови, содержащие плазму крови, подвергают скринингу после сбора у донора на предмет группы крови. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения препараты на основе крови, содержащие плазму крови, подвергают скринингу на предмет возбудителя инфекционного заболевания, такого как HIV I и II, HBV, HCV, HTLV I и II, антитела против Hbс, в соответствии с требованиями 21 CFR 640.33 и рекомендациями, содержащимися в руководящих документах FDA.

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения субъекта лечат фракцией плазмы крови. Согласно варианту осуществления настоящего изобретения фракция плазмы крови представляет собой PPF или HAS. Согласно следующему варианту осуществления настоящего изобретения фракция плазмы крови представляет собой фракцию коммерческих препаратов PPF или коммерческих препаратов HAS. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения фракция плазмы крови представляет собой PPF или HAS, полученную от пула индивидуумов определенного возрастного диапазона, таких как молодые индивидуумы, или представляет собой модифицированную фракцию PPF или HAS, которая была подвергнута дополнительному фракционированию или обработке (например, PPF или HAS с одним или несколькими частично или практически удаленными специфическими белками). Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения фракция плазмы крови представляет собой фракцию плазмы крови IGIV, которая была практически истощена по иммунному глобулину (IgG). Фракция крови, которая "практически истощена" по специфическим белкам или в которой были "практически удалены" специфические белки, такие как IgG, относится к фракции крови, содержащей менее чем приблизительно 50% количества, которое наблюдается в эталонном препарате или плазме цельной крови, например, менее чем 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,1%, невыявляемые содержания, или любое целое число между этими значениями, как измеряют с использованием стандартных анализов, хорошо известных в уровне техники.

I. Введение.

Аспекты способов в соответствии с настоящим изобретением, описываемых в настоящем документе, включают в себя лечение субъекта препаратом на основе крови, содержащим плазму крови, таким как плазма крови или фракция плазмы крови, например, как описывается выше. Вариант осуществления включает в себя лечение субъекта-человека препаратом на основе крови, содержащим плазму крови. Специалисту в данной области будет понятно, что способы лечения субъектов препаратами на основе крови, содержащими плазму крови, известны в уровне техники. Например, без ограничения, один вариант осуществления способов в соответствии с настоящим изобретением, описываемых в настоящем документе, предусматривает введение свежемороженой плазмы крови субъекту для лечения состояний, связанных с послеоперационным восстановлением. Согласно одному варианту осуществления препарат на основе крови, содержащий плазму крови, вводят немедленно, например, в пределах приблизительно 12-48 ч после сбора у донора, индивидууму, страдающему нежелательным состоянием, связанным с послеоперационным восстановлением. В таких случаях, препарат можно хранить в холодильнике, например, при 0-10°C. Согласно другому варианту осуществления свежемороженая плазма крови представляет собой плазму крови, которую хранили замороженной (криоконсервированной) при -18°C или ниже. Перед введением свежемороженую плазму крови размораживают и после размораживания вводят субъекту через 60-75 мин после начала процесса размораживания. Каждый субъект предпочтительно получает одну единицу свежемороженой плазмы крови (200-250 мл), при этом свежемороженую плазму крови предпочтительно получают от доноров предварительно определенного возрастного диапазона. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения свежемороженая плазма крови предоставляется молодыми индивидуумами (получается от таковых). Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения свежемороженая плазма крови предоставляется донорами

того же пола (получается от таковых). Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения свежемороженая плазма крови предоставляется донорами возрастного диапазона от 18 до 22 лет (получается от таковых).

Согласно варианту осуществления настоящего изобретения препараты на основе крови, содержащие плазму крови, подвергаются скринингу после сбора у донора на предмет группы крови. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения препараты на основе крови, содержащие плазму крови, подвергаются скринингу на предмет возбудителя инфекционного заболевания, такого как HIV I и II, HBV, HCV, HTLV I и II, антитела против HBc, в соответствии с требованиями 21 CFR 640.33 и рекомендациями, содержащимися в руководящих документах FDA.

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения субъекта лечат фракцией плазмы крови. Согласно варианту осуществления настоящего изобретения фракция плазмы крови представляет собой PPF или HAS. Согласно следующему варианту осуществления настоящего изобретения фракция плазмы крови представляет собой фракцию коммерческих препаратов PPF или коммерческих препаратов HAS. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения фракция плазмы крови представляет собой PPF или HAS, полученную от пула индивидуумов определенного возрастного диапазона, таких как молодые индивидуумы, или представляет собой модифицированную фракцию PPF или HAS, которая была подвергнута дополнительному фракционированию или обработке (например, PPF или HAS с одним или несколькими частично или практически удаленными специфическими белками). Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения фракция плазмы крови представляет собой фракцию плазмы крови IGIV, которая была практически истощена по иммуноглобулину (IgG). Фракция крови, которая "практически истощена" по специфическим белкам или в которой были "практически удалены" специфические белки, такие как IgG, относится к фракции крови, содержащей менее чем приблизительно 50% количества, которое наблюдается в эталонном препарате или плазме цельной крови, например, менее чем 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,1%, невыявляемые содержания, или любое целое число между этими значениями, как измеряют с использованием стандартных анализов, хорошо известных в уровне техники.

Вариант осуществления настоящего изобретения включает в себя лечение субъекта, страдающего состоянием, связанным с послеоперационным восстановлением, путем введения субъекту эффективного количества плазмы крови или фракции плазмы крови. Другой вариант осуществления настоящего изобретения предусматривает введение эффективного количества плазмы крови или фракции плазмы крови, а затем мониторинг субъекта на предмет улучшения функции, заживления ран, присутствия маркеров, снижение боли или уменьшение воспаления. Другой вариант осуществления настоящего изобретения включает в себя лечение субъекта, страдающего состоянием, связанным с послеоперационным восстановлением, путем введения субъекту эффективного количества плазмы крови или фракции плазмы крови, при этом плазму крови или фракцию плазмы крови вводят путем, обеспечивающим в результате улучшенную функцию заживления ран, заживление ран, присутствие маркеров, снижение боли или уменьшение воспаления после достижения среднего или медианного периода полужизни белков плазмы крови или белков фракции плазмы крови относительно самой последней введенной дозы (что называется в настоящем документе "импульсным введением дозы" или "импульсным дозированием") (см. патент США № 10357513 и заявки на выдачу патентов США № 15/961618 и 62/701411, которые включены в настоящий документ посредством ссылки в полном своем объеме). Другой вариант осуществления настоящего изобретения предусматривает введение плазмы крови или фракции плазмы крови согласно режиму введения дозы по меньшей мере двое суток подряд и мониторинг субъекта на предмет улучшенной функции или содержания маркера HSC по меньшей мере через 3 суток после даты последнего введения. Следующий вариант осуществления настоящего изобретения предусматривает введение плазмы крови или фракции плазмы крови согласно режиму введения дозы по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 суток подряд и мониторинг субъекта на предмет улучшенной функции заживления ран, заживление ран, присутствие маркеров, снижение боли или уменьшение воспаления по меньшей мере через 3 суток после даты последнего введения. Еще один вариант осуществления настоящего изобретения предусматривает введение плазмы крови или фракции плазмы крови согласно режиму введения дозы по меньшей мере 2 суток подряд и после даты последнего введения, мониторинг на предмет улучшенной функции заживления ран, заживление ран, присутствие маркеров, снижение боли или уменьшение воспаления после достижения среднего периода полужизни белков в плазме крови или фракции плазмы крови. Другой вариант осуществления настоящего изобретения предусматривает введение плазмы крови или фракции плазмы крови согласно режиму введения дозы от 2 до 14 непоследовательных суток, при этом каждый промежуток между дозами может составлять от 0 до 3 суток.

В некоторых случаях импульсное введение дозы в соответствии с настоящим изобретением предусматривает введение первого набора доз, например, как описывается выше, с последующим периодом без введения дозы, например, "периодом без введения дозы", за которым в свою очередь следует введение другой дозы или набора доз. Продолжительность такого периода "без введения дозы" может варьировать, но согласно определенным вариантам осуществления составляет 7 суток или больше, например 10 суток или больше, в том числе 14 суток или больше, при этом в некоторых случаях период без введе-

ния дозы варьирует от 15 до 365 суток, например от 30 до 90 суток и в том числе от 30 до 60 суток. Таким образом, варианты осуществления способов включают в себя нехроническое (т.е. непостоянное) введение дозы, например, нехроническое введение препарата на основе плазмы крови. Согласно определенным вариантам осуществления паттерн импульсного введения дозы с последующим периодом без введения дозы повторяют несколько раз, при необходимости, при этом в некоторых случаях такой паттерн продолжается на протяжении 1 года или больше, например 2 лет или больше, вплоть до на протяжении жизни субъекта. Другой вариант осуществления настоящего изобретения предусматривает введение плазмы крови или фракции плазмы крови согласно режиму введения дозы 5 суток подряд с периодом без введения дозы 2-3 суток, с последующим введением на протяжении 2-14 суток подряд.

Биохимически термин "эффективное количество" или "эффективная доза" активного средства означает количество активного средства, которое будет ингибировать, антагонизировать, снижать, уменьшать или подавлять на приблизительно 20% или больше, например, на 30% или больше, на 40% или больше, или на 50% или больше, в некоторых случаях на 60% или больше, на 70% или больше, на 80% или больше или на 90% или больше, в некоторых случаях на приблизительно 100%, т.е. до незначительных уровней, а в некоторых случаях будет обращать нежелательные состояния, связанные с послеоперационным восстановлением.

J. Белковая фракция плазмы крови.

При осуществлении способов в соответствии с настоящим изобретением субъекту вводят фракцию плазмы крови. Согласно варианту осуществления фракция плазмы крови представляет собой белковую фракцию плазмы крови (PPF). Согласно дополнительным вариантам осуществления PPF выбрана из коммерческих препаратов PPF.

Согласно другому варианту осуществления PPF состоит из 88% нормального альбумина человека, 12% альфа- и бета-глобулинов и не более чем 1% гамма-глобулина, как определяют с помощью электрофореза. Следующие варианты осуществления данного варианта осуществления, используемые в осуществлении на практике способов в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя, например, вариант осуществления в виде 5% раствора PPF, забуференного карбонатом натрия и стабилизированного 0,004 М каприлатом натрия и 0,004 М ацетилтриптофаном. Дополнительные составы, в том числе те, в которых изменены процент PPF (например, от приблизительно 1 до приблизительно 10%, от приблизительно 10 до приблизительно 20%, от приблизительно 20 до 25%, от приблизительно 25 до 30%) в растворе, а также концентрации растворителя и стабилизаторов, могут быть использованы в осуществлении на практике способов в соответствии с настоящим изобретением.

K. Фракции плазмы крови донора определенного возраста.

Дополнительные варианты осуществления в соответствии с настоящим изобретением предусматривают введение белковой фракции плазмы крови, полученной из плазмы крови индивидуумов определенных возрастных категорий. Вариант осуществления предусматривает введение PPF или HAS, которые были получены из плазмы крови молодых индивидуумов. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения молодые индивидуумы относятся к одному определенному возрасту или определенной возрастной категории. Согласно еще одному варианту осуществления средний возраст доноров меньше, чем у субъекта, или меньше, чем средний возраст субъектов, подлежащих лечению.

Определенные варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают объединение крови или плазмы крови индивидуумов определенных возрастных категорий и фракционирование плазмы крови, как описывается выше, для получения препарата на основе белковой фракции плазмы крови, такого как PPF или HAS. Согласно альтернативному варианту осуществления настоящего изобретения белковую фракцию плазмы крови или специфическую белковую фракцию плазмы крови получают от определенных индивидуумов, соответствующих определенной возрастной категории.

L. Показания.

Рассматриваемые способы и препараты на основе крови, содержащие плазму крови и фракции, находят применение в лечении нежелательных состояний, связанных с послеоперационным восстановлением, и даже в ускорении послеоперационного восстановления. Такие состояния и показания включают в себя, например, без ограничения, боль и заживление ран. Рассматриваемые способы и композиции в соответствии с настоящим изобретением также находят применение в лечении острой и хронической боли при заболеваниях или состояниях, не обязательно связанных с послеоперационным восстановлением. Рассматриваемые способы и композиции также находят применение в лечении для заживления ран, что необязательно связано с послеоперационным восстановлением. Рассматриваемые способы и композиции также находят применение в обеспечении или стимулировании ремиелинизации и в лечении заболеваний, связанных с миелинизацией, таких как рассеянный склероз.

Рассматриваемые способы и препараты на основе крови, содержащие плазму крови и фракции, также находят применение в лечении показаний, связанных с нервной системой. Такие состояния, например, без ограничения, включают в себя состояния центральной нервной системы, такие как центральная нейропатическая боль, поражение спинного мозга, миелопатия и центральная нейропатическая боль, связанная с послеоперационным восстановлением.

Ежегодно возникают 17 тыс. новых случаев поражения спинного мозга с распространенностью

приблизительно 300000, из которых 40-75% субъектов с поражением спинного мозга страдают центральной нейропатической болью. (Jadad A. et al., AHRQ Evidence Report Summaries, Agency for Healthcare Research and Quality; (1998-2005); <https://www.nscisc.uab.edu/Public/Facts%202016.pdf>; и <https://www.nscisc.uab.edu/PublicDocuments/factfiguresdocs/Facts%202012%20Feb%20Final.pdf>). Одна треть больных испытывает сильную боль, и только у 1/3 при лечении боль уменьшается на 50% или больше. (Charbonneau R., CMAJ, 189(2):E48-E49 (2017); и Hadjipavlou G., et al., BJA Education, 16(8):264-68 (2016)). Миелопатия имеет частоту возникновения 605 случаев на 1000000 с вариантами хирургического вмешательства, но без фармакологических методов лечения, что указывает на неудовлетворенную потребность в этой области. (Nouri A., et al., Spine, 40(12):E675-93 (2015); The Lancet Neurology, editorial 18(7):P615 (2019)).

Эти состояния также включают в себя, например, без ограничения, связанные со сплетением/нервным корешком состояния, такие как плексопатия, шейная радикулопатия и пояснично-крестцовый радикулит (люмбальная радикулопатия). Заболеваемость плексопатией составляет 2-3 случая на 100000 населения. Имеющиеся варианты лечения ее включают в себя контроль невропатической боли с помощью противосудорожных средств и антидепрессантов, что указывает на неудовлетворенную потребность. Заболеваемость шейной радикулопатией составляет 100 случаев на 100000 мужчин и 60 случаев на 100000 женщин. (McCartney S., et al., Br. J. Gen. Pract, 68(666):44-46 (2018)). Пояснично-крестцовый радикулит характеризуется ежегодной заболеваемостью 1-5%, и, хотя многие случаи разрешаются спонтанно, пояснично-крестцовый радикулит становится менее чувствительным к лечению с увеличением продолжительности эпизодов. Варианты методов лечения включают в себя хирургические процедуры, стандартные обезболивающие медикаменты и стероиды, что указывает на необходимость новых терапевтических средств. (Lewis R., et al., Health Technology Assessment - The Clinical Effectiveness and Cost-Effectiveness of Management Strategies for Sciatica: Systematic Review and Economic Model, No. 15.39 NHR Journals Library (2011)).

Дополнительные показания включают в себя нарушения периферической нервной системы. Они включают в себя, например, без ограничения, периферическую нейропатию, связанную с послеоперационным восстановлением периферическую нейропатию, синдром запястного канала, вызванную химиотерапией периферическую нейропатию, компрессию и травму, диабетическую нейропатию, периферическую нейропатию, связанную с опоясывающим лишаем (постгерпетическую невралгию), комплексный региональный болевой синдром и невралгию тройничного нерва. Периферическая нейропатия представляет собой нарушение периферических нервов, которым страдают по меньшей мере 20 миллионов человек в США. Почти 60% субъектов с сахарным диабетом страдают диабетической нейропатией, типом периферической нейропатии. (<http://www.healthcommunities.com/neuropathy/overview-of-neuropathy.shtml>) Синдром запястного канала поражает 3-6% взрослых, и лечение включает в себя шины, стероиды и хирургическое вмешательство. (LeBlanc K.E., et al., Am. Fam. Physician, 83(8):952-58 (2011)). Вызванная химиотерапией периферическая нейропатия встречается у 40-60% больных как во время прохождения химиотерапии, так и в течение 3 месяцев после нее, при этом сообщается, что в год химиотерапии получали 650000 больных. Периферическая нейропатия приводит к снижению дозы химиотерапии или даже к ее прекращению, что влияет на качество жизни, при этом не было показано, что медикаменты или добавки предотвращают заболевание. (JAMA Oncology, 5(5):750, (2019)). Периферическая нейропатия, связанная с компрессией и травмой, встречается у 2-3% больных с травмой, при этом в Соединенных Штатах Америки происходят 3 миллиона случаев травмы. Хотя хирургическое вмешательство часто бывает эффективным, существует потребность в новых фармакологических средствах. (American Association for the Surgery of Trauma - Trauma Facts, доступно на <http://www.aast.org/trauma-facts>; and Novak CB, Medscape - Peripheral Nerve Injuries, (Oct 5, 2018), доступно на <https://emedicine.medscape.com/article/1270360-overview>).

Следующие связанные с периферической нервной системой показания, для лечения которых рассматриваемые способы и препараты на основе крови, содержащие плазму крови и фракции, также находят применение, включают в себя диабетическую нейропатию. В Соединенных Штатах Америки группа больных сахарным диабетом составляет приблизительно 30 миллионов, и 8-26% из этих больных, страдают нейропатией. (Risson V., et al., Incidence and prevalence of painful diabetic neuropathy and postherpetic neuralgia in major 5 European countries, the United States and Japan, Value in Health, (20):A339-A811, PSY18 (2017), доступно на [https://www.valueinhealthjournal.com/article/S1098-3015, \(17\)31179-8/pdf](https://www.valueinhealthjournal.com/article/S1098-3015, (17)31179-8/pdf)).

Одобренные FDA варианты для диабетической нейропатической боли включают в себя прегабалин, дулоксетин, флуоксетин и тапентадол, на каждый из которых многие больные не отвечают, и ни один из них напрямую не устраняет повреждение нервов.

Периферическую нейропатию, связанную с опоясывающим лишаем (постгерпетическую невралгию), также можно лечить способами и препаратами в соответствии с настоящим изобретением. 20% больных опоясывающим лишаем страдают постгерпетической невралгией, а в Соединенных Штатах Америки ежегодно регистрируется 1 миллион случаев. (См. <https://emedicine.medscape.com/article/1143066-overview#a6>, <https://www.cdc.gov/shingles/hcp/clinical-overview.html>). Габапентин и прегабалин являются одобренными методами лечения этого состояния, но

боль часто не поддается лечению. (Sacks G.M., Am. J. Manag Care 19 (1 Suppl): S207-13 (2013)).

Дополнительные периферические невропатические показания, такие как комплексный региональный болевой синдром и невралгия тройничного нерва, можно лечить с помощью способов и композиций в соответствии с настоящим изобретением. Заболеваемость составляет от 5,5 до 26 случаев на 100000 населения. Это связано с сильной болью и инвалидностью, и реакция на лечение варьирует, что указывает на высокую неудовлетворенную потребность. (Complex Region Pain Syndrome Fact Sheet, National Institutes of Health - National Institute of Neurological Disorders and Stroke, доступно на <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/Patient-Caregiver-Education/Fact-Sheets/Complex-Regional-Pain-Syndrome-Fact-Sheet>). Невралгия тройничного нерва встречается у 4,2-28,9 на 100000 населения. Она оказывает значительное влияние на качество жизни, и со временем больной может стать невосприимчивым к лечению, что требует от больных пробовать множество различных методов лечения. (Wu N., et al., J. Pain, 18 (Suppl 4): S69, (2017)). Единственным одобренным лечением является карбамазепин. Следовательно, существует неудовлетворенная потребность в лечении боли, испытываемой этими больными.

Дополнительные показания, которые можно лечить способами и композициями в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя следующие примеры: центральная постинсультная боль, центральная боль при рассеянном склерозе, посттравматические головные боли, синдром Дежерина-Русси, неврит зрительного нерва, митохондриальные нейропатии зрительного нерва, ишемическая нейропатия зрительного нерва, нейромиеелит зрительного нерва, наследственные нейропатии зрительного нерва, алкогольная нейропатия, синдром Гийена-Барре, хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (CIDP), мультифокальная двигательная нейропатия (MNN), паранеопластическая автономная нейропатия, периферическая нейропатия, связанная с саркаидозом; периферическая нейропатия, связанная с ревматоидным артритом, периферическая нейропатия, связанная с системной красной волчанкой, периферическая нейропатия, связанная с синдромом Шегрена, периферическая нейропатия, связанная с целиакией, паралич Белла, периферическая нейропатия, связанная с болезнью Лайма, периферическая нейропатия, связанная с проказой, периферическая нейропатия, связанная с гепатитом В, периферическая нейропатия, связанная с гепатитом С, периферическая нейропатия, связанная с HIV/AIDS, периферическая нейропатия, связанная с амилоидозом, периферическая нейропатия, связанная с антителом против MAG, периферическая нейропатия, связанная с криоглобулинемией, периферическая нейропатия, связанная с POEMS, вызванная токсином периферическая нейропатия, периферическая нейропатия, связанная с заболеванием почек, периферическая нейропатия, связанная с васкулитом, периферическая нейропатия, связанная с дефицитом витаминов и питательных веществ, болезнь Шарко-Мари-Тута (СМТ), идиопатическая периферическая нейропатия, фибромиалгия и паранеопластическая периферическая нейропатия.

Раны могут быть, например, без ограничения, ссадинами, отрывами, разрезами, разрывами и проколами. К таким показаниям могут относиться как хронические раны, так и острые раны. Например, без ограничения, показания для ран включают в себя хронические раны, такие как диабетическая язва, пролежневая язва, венозная язва, артериальная язва, а также острые раны, такие как хирургические раны, травматические раны и ожоги. Но любой тип хронической или острой раны можно лечить рассматриваемыми способами и композициями в соответствии с настоящим изобретением.

Диабетические язвы поражают более 2,2 миллиона человек в Соединенных Штатах Америки, с глобальной заболеваемостью 6,4%. (Chun D., et al., J. Clin. Med., 8:748 (2019)). Несмотря на несколько вариантов лечения, таких как хирургическая обработка раны и медицинские повязки, многие больные получают инфекцию и в конечном итоге нуждаются в ампутации, что подчеркивает потребность в новых лекарственных средствах, в частности, фармакологических лекарственных средствах.

Пролежневые раны наблюдаются с общей частотой 1,8% больных, поступающих в больницу, при этом общее число случаев ежегодно исчисляется сотнями тысяч. (Bauer K., et al., Ostomy Wound Manage, 62(11):30-38 (2016)). Как и при диабетических язвах, существуют варианты лечения, такие как хирургическая обработка раны и медицинская повязка, но у многих больных возникает инфекция, и язвы могут привести к смерти.

Венозные язвы возникают в основном на ногах, они ложатся тяжелым бременем на пожилых людей и встречаются у приблизительно 1% населения во всем мире. (Nelzen O., Phlebology, 15(4), (2008)). Венозные язвы трудно заживают и имеют значительную тенденцию к рецидиву, чем другие хронические язвы. Как и в случае диабетических и пролежневых язв, существуют варианты лечения, такие как хирургическая обработка раны и медицинская повязка, но их рецидив подчеркивает потребность в новых методах лечения, особенно в методах лечения на основе фармакологических лекарственных средств. Артериальные язвы возникают с частотой, составляющей приблизительно четверть от частоты венозных язв. (Gabriel A., Vascular Ulcers, (2018), доступно на <https://emedicine.medscape.com/article/1298345-overview#a6>). Варианты лечения также включают в себя хирургическую обработку раны и медицинские повязки, но одобренные фармакологические средства отсутствуют.

Хирургические раны возникают приблизительно у 1,3 миллиона больных в год. (См. MediWound - Innovating Solutions for Wound & Burn Care (2019) at 19, доступно на <http://ir.mediwound.com/static->

files/cd547017-dled-460e-8cb2-0550b1e18a29). Хирургические раны представляют собой разрезы или иссечения на коже, которые обычно делаются скальпелем во время хирургического вмешательства, но также могут быть результатом установки дренажа во время хирургического вмешательства. Заживление хирургических ран является важнейшим исходом хирургического вмешательства. Послеоперационное разрушение раны или расслоение слоев раны с разрывом фасции может стать серьезным осложнением. (См. Hospital Harm Improvement Resource - Wound Disruption (2016), доступно на <https://www.patientsafetyinstitute.ca/en/toolsResources/Hospital-Harm-Measure/Documents/Resource-Library/HHIR%20Wound%20Disruption.pdf>). Кроме того, у пожилых больных заживление хирургических ран занимает значительно больше времени, чем у более молодых индивидуумов. (Gerstein A.D., *Dermatol. Clin.*, 11(4):749-57 (1993).

Травматические раны представляют собой в первую очередь порезы, разрывы, прокол или ссадины с повреждением кожи и подлежащих тканей. Травматические раны обычно подразделяют на три группы: острые раны; резаные раны и проникающие раны. Острые раны представляют собой раны, при которых кожа разорвана или разодрана, рана имеет неровный вид и обычно содержит инородные тела, такие как стекло, металл, гравий, песок или грязь. Резаные раны представляют собой раны, при которых острый предмет проникает в кожу и подкожные ткани. Проникающие раны - самые глубокие из трех типов и самые тяжелые. Типичными примерами являются колотые раны и огнестрельные раны. (См. *Traumatic Wounds* доступно на <https://www.woundcarecenters.org/article/wound-types/traumatic-wounds>; и Leaper D.J., *BMJ*, 332(7540):532-35 (2006)). Хотя существует несколько вариантов физического лечения (например, наложение швов), сохраняется потребность в фармакологических вмешательствах.

По оценкам Всемирной организации здравоохранения ежегодно в результате ожогов умирает 180000 человек, а ожоговые поражения без смертельного исхода являются ведущей причиной заболеваемости, в том числе длительной госпитализации, (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns>). Типичное лечение включает в себя хирургическое вмешательство и перевязки. Фармакологическое лечение направлено на обезболивание, контроль инфекций, седативный эффект, восполнение объема циркулирующей крови, антикоагуляцию и питание. (Green A., et al., *Clinical Pharmacist*, 2:249-54 (2010)). Способы и композиции в соответствии с настоящим изобретением могут удовлетворять неудовлетворенную потребность в фармакологическом вмешательстве, которое способствует заживлению повреждений кожи и подлежащих тканей.

Рассматриваемые способы и препараты на основе крови, содержащие плазму крови и фракции, могут быть использованы для лечения состояний и показаний, связанных с послеоперационным восстановлением, в различные моменты времени. Например, без ограничения, введение субъекту может быть выполнено до операции, во время операции (во время процедуры) или после операции.

Один вариант осуществления настоящего изобретения заключается в том, что рассматриваемые способы и препараты на основе крови, содержащие плазму крови и фракции, могут быть использованы для лечения боли. Такая боль, например, без ограничения, может включать в себя острую или хроническую боль. Другой вариант осуществления настоящего изобретения заключается в том, что рассматриваемые способы и препараты на основе крови, содержащие плазму крови и фракции, могут быть использованы для лечения центральной боли или центральной нейропатии. Центральная боль включает в себя неврологические состояния, вызванные повреждением или дисфункцией центральной нервной системы (ЦНС), в том числе головного мозга, ствола головного мозга и спинного мозга. Это может влиять на большую часть организма или ограничиться определенными областями. Боль может быть постоянной или прерывистой. Боль может быть средней или сильной по интенсивности. На такую боль также могут влиять прикосновение, движение, эмоции и изменения температуры. Боль также может возникнуть сразу после причинного инцидента или может длиться месяцами или годами. (См. *Central Pain Information Page - National Institute of Neurological Disorders and Stroke*, *Central Pain Syndrome Information Page*, доступно на <https://www.ninds.nih.gov/disorders/all-disorders/central-pain-syndrome-information-page>; и Colloca L., et al., *Nat. Rev. Dis. Primers*, 3:17002 (2017)). Следующие варианты осуществления настоящего изобретения включают в себя применение рассматриваемых способов и препаратов на основе крови, содержащих плазму крови и фракции, для лечения поражения спинного мозга (SCI), миелопатии, плексопатии, шейной радикулопатии, пояснично-крестцового радикулита (поясничной радикулопатии), центральной постинсультной боли, центральной боли при рассеянном склерозе, посттравматических головных болей, синдрома Дежерина-Русси, неврита зрительного нерва, митохондриальных нейропатий зрительного нерва, ишемической нейропатии зрительного нерва, нейромиелимита зрительного нерва и наследственных нейропатий зрительного нерва.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения заключается в том, что рассматриваемые способы и препараты на основе крови, содержащие плазму крови и фракции, также могут быть использованы для лечения периферической боли или периферической нейропатии. Периферическая нейропатия может относиться к некоторым состояниям, включающим в себя поражение периферической нервной системы. Идентифицированы более чем 100 периферических нейропатий, и они зависят от пораженно-го(пораженных) типа(ов) нерва(ов), в том числе двигательных нервов, чувствительных нервов и вегетативных нервов. (См. *Central Page Information Page - National Institute of Neurological Disorders and Stroke*,

Peripheral Neuropathy Fact Sheet, доступно на <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/Patient-Caregiver-Education/Fact-Sheets/Peripheral-Neuropathy-Fact-Sheet>; и Colloca L., et al., Nat. Rev. Dis. Primers, 3:17002 (2017)). Следующие варианты осуществления настоящего изобретения включают в себя применение рассматриваемых способов и препаратов на основе крови, содержащих плазму крови и фракции, для лечения синдрома запястного канала, вызванной химиотерапией периферической нейропатии, компрессии и травмы, диабетической нейропатии, периферической нейропатии, связанной с опоясывающим лишаем (постгерпетической невралгии), комплексного регионального болевого синдрома, невралгии тройничного нерва, алкогольной нейропатии, синдрома Гийена-Барре, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIDP), мультифокальной двигательной нейропатии (MNN), паранеопластической автономной нейропатии, периферической нейропатии, связанной с саркаидозом, периферической нейропатии, связанной с ревматоидным артритом, периферической нейропатии, связанной с системной красной волчанкой, периферической нейропатии, связанной с синдромом Шегрена, периферической нейропатии, связанной с целиакией, паралича Белла, периферической нейропатии, связанной с болезнью Лайма, периферической нейропатии, связанной с проказой, периферической нейропатии, связанной с гепатитом В, периферической нейропатии, связанной с гепатитом С, периферической нейропатии, связанной с HIV/AIDS, периферической нейропатии, связанной с амилоидозом, периферической нейропатии, связанной с антителом против MAG, периферической нейропатии, связанной с криоглобулинемией, периферической нейропатии, связанной с ROEMS, вызванной токсином периферической нейропатии, периферической нейропатии, связанной с заболеванием почек, периферической нейропатии, связанной с васкулитом, периферической нейропатии, связанной с дефицитом витаминов и питательных веществ, болезни Шарко-Мари-Тута (СМТ), идиопатической периферической нейропатии, фибромиалгии и паранеопластической периферической нейропатии.

Один вариант осуществления настоящего изобретения заключается в том, что рассматриваемые способы и препараты на основе крови, содержащие плазму крови и фракции, могут быть использованы для лечения ран путем обеспечения заживления ран. Следующие варианты осуществления настоящего изобретения включают в себя применение рассматриваемых способов и препаратов на основе крови, содержащих плазму крови и фракции, для лечения хронических или острых ран. Дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения включают в себя лечение диабетических язв, пролежневых язв, венозных язв, артериальных язв, хирургических ран, травматических ран и ожогов.

М. Реагенты, устройства и наборы.

Также представлены реагенты, устройства и их наборы для осуществления на практике одного или нескольких из описанных выше способов. Рассматриваемые реагенты, устройства и их наборы могут сильно варьировать.

Представляющие интерес реагенты и устройства включают в себя те, которые упомянуты выше в отношении способов получения препарата на основе крови, содержащего плазму крови, для переливания нуждающемуся в этом субъекту, например антикоагулянты, криоконсерванты, буферы, изотонические растворы и т.д.

Наборы также могут содержать пакеты для сбора крови, трубки, иглы, центрифужные пробирки и т.п. Согласно следующим вариантам осуществления наборы, описываемые в настоящем документе, включают в себя два или более контейнера для препарата на основе плазмы крови, такого как белковая фракция плазмы крови, например три или более, четыре или более, пять или более, в том числе шесть или более контейнеров для препарата на основе плазмы крови. В некоторых случаях число отдельных контейнеров для препарата на основе плазмы крови в наборе может составлять 9 или более, 12 или более, 15 или более, 18 или более, 21 или более, 24 или более, 30 или более, в том числе 36 или более, например, 48 или более. Каждый контейнер может иметь связанную с ним идентифицирующую информацию, которая включает в себя различные данные о содержащемся в нем препарате на основе плазмы крови, при этом идентифицирующая информация может включать в себя одно или более из возраста донора препарата на основе плазмы крови, подробности обработки, касающиеся препарата на основе плазмы крови, например, был ли препарат на основе плазмы крови обработан с удалением белков с молекулярной массой, превышающей среднюю (таких как описанные выше), подробности о группе и т.д. В некоторых случаях каждый контейнер в наборе включает в себя идентифицирующую информацию о содержащейся в нем плазме крови, и идентифицирующая информация включает в себя информацию о возрасте донора препарата на основе плазмы крови, например, идентифицирующая информация обеспечивает подтверждение данных о возрасте донора препарата на основе плазмы крови (при этом такая идентифицирующая информация может представлять собой возраст донора на момент сбора). В некоторых случаях каждый контейнер набора содержит препарат на основе плазмы крови от донора практически одного и того же возраста, т.е. все контейнеры включают в себя препарат от доноров, которые практически одного и того же, если не одного и того же, возраста. Под практически одним и тем же возрастом подразумевают, что каждый из различных доноров, от которых получают препараты на основе плазмы крови в наборах, отличается в некоторых случаях на 5 лет или меньше, например, на 4 года или меньше, например, на 3 года или меньше, в том числе на 2 года или меньше, например, на 1 год или меньше, например, на 9 месяцев или меньше, на 6 месяцев или меньше, на 3 месяца или меньше, в том числе на 1 месяц или

меньше. Идентифицирующая информация может находиться на любом удобном компоненте контейнера, таком как этикетка, чип RFID и т.д. Идентифицирующая информация может быть читаемой человеком, машиночитаемой и т.д., при необходимости. Контейнеры могут иметь любую удобную конфигурацию. При том, что объем контейнеров может варьировать, в некоторых случаях объемы варьируют от 10 до 5000 мл, например, от 25 до 2500 мл, например, от 50 до 1000 мл, в том числе от 100 до 500 мл. Контейнеры могут быть жесткими или гнущимися и могут быть изготовлены из любого удобного материала, например, полимерных материалов, включая пластмассы медицинского качества. В некоторых случаях контейнеры имеют конфигурацию пакета или мешка. Помимо контейнеров, такие наборы могут дополнительно включать в себя устройства для введения, например, описываемые выше. Компоненты таких наборов могут быть обеспечены в любой подходящей упаковке, например в коробке или аналогичной конструкции, сконфигурированной для размещения контейнеров и других компонентов набора.

Помимо описываемых выше компонентов рассматриваемые наборы будут дополнительно включать в себя инструкции по осуществлению на практике рассматриваемых способов. Эти инструкции могут находиться в рассматриваемых наборах в различных формах, одна или несколько из которых могут присутствовать в наборе. Одной из форм, в которой могут быть представлены эти инструкции, является напечатанная информация на подходящем носителе или подложке, например лист или листы бумаги, на которых напечатана информация, в упаковке набора, во вкладыше к упаковке и т.д. Другим средством может быть машиночитаемый носитель, например дискета, компакт-диск, переносной флэш-накопитель и т.д., на котором была записана информация. Еще одним средством, которое может присутствовать, является адрес веб-сайта, который можно использовать через Интернет для доступа к информации на удаленном сайте. В наборах могут находиться любые удобные средства.

N. Экспериментальные примеры.

1. Модели боли.

а) Боль. Обработка перед поражением.

(1) Изменение нейропатического поражения нерва.

Модель хронической боли с использованием хронического констриктивного повреждения (CCI) использовали для определения уровней боли, испытываемой 22-месячными мышами C57BL/6J, обрабатываемыми:

(1) PPF1 после CCI;

(2) средой-носителем после CCI или

(3) средой-носителем после имитационного хирургического вмешательства.

С использованием такой модели нервную систему доводили до постоянного состояния высокой реактивности, что снижало болевой порог еще долгое время после того, как произошло первоначальное поражение. (См., например, работы Safakhah, H.A. et al., *Journal of Pain*, 10:1457-66, и Suter M.R., et al., *Anesthesiology Res and Practice* (2011), которые включены в настоящий документ посредством ссылки в полном своем объеме).

PPF1 представляет собой PPF приблизительно с 88% нормального альбумина человека (по отношению к общему белку), 12% альфа- и бета-глобулинов и не более 1% гамма-глобулина, как определяли с помощью электрофореза. Если не указано иное, PPF1 вводили в приведенных в настоящем документе примерах *in vivo* с использованием 5% раствора (масса/объем, 50 г/л). PPF2 также представляет собой PPF, но отличается от PPF1. PPF2 соответствует тем же характеристикам содержания и концентрации белка, что и PPF1.

На фиг. 1 изображен эксперимент с CCI на временной шкале. 23-месячным мышам дикого типа осуществляли CCI или имитационное хирургическое вмешательство путем лигирования за 24 ч до осуществления режима импульсного введения дозы 7 суток подряд по 150 мкл/сутки (внутривенно в хвостовую вену) либо PPF1, либо контроля в виде среды-носителя. Поведение оценивали в течение четвертой недели, а сбор ткани для гистологии производили на пятой неделе.

На фиг. 2 представлено изображение расположения CCI, наносимого мышам дикого типа возрастом двадцати трех месяцев. Лигирование проводили на седалищном нерве, как показано на фиг. Рисунок был взят из работы Suter M.R., et al., *Anesthesiology Res and Practice*, (2011), которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном своем объеме.

На фиг. 3 представлены данные механического теста на аллодинию фон Фрея у мышей дикого типа через 4 недели после CCI или имитационного хирургического вмешательства, как подробно показано на фиг. 1. Для определения переносимости животным механического давления заднюю лапу, иннервируемую рассматриваемым седалищным нервом, раздражали нитями фон Фрея различной толщины. Давление, при котором мышь отдергивала свою заднюю лапу, измеряли и наносили на график на фиг. 3. На фигуре показано, что мыши, получавшие PPF1 после CCI, испытывали значительно меньшую боль (могли выдерживать большее давление), чем мыши, получавшие контроль в виде среды-носителя после CCI. При имитационном хирургическом вмешательстве животные также демонстрировали значительно меньшую боль, чем обрабатываемые контролем в виде среды-носителя после CCI. Первичный вывод заключается в том, что PPF1 оказывает положительный эффект на дефициты механической ноцицепции, индуцированные с помощью CCI. *** $P < 0,001$ при CCI с обработкой PPF1 по сравнению с CCI с обработ-

кой средой-носителем, * $P < 0,05$ при имитации со средой-носителем по сравнению с ССИ со средой-носителем; однофакторный ANOVA с апостериорным анализом Тьюки.

На фиг. 4 представлены данные гистологического исследования гиппокампа, проведенного на мышях дикого типа, описанных на фиг. 1. Нейрогенез измеряли с использованием маркера даблкортина (DCX). У мышей, получавших хирургическое вмешательство ССИ и которых обрабатывали с помощью PPF1, нейрогенез в зубчатой фасции гиппокампа был значительно выше, чем у тех, которые получали среду-носитель. Мыши, получившие имитационную операцию, имели тенденцию к большему нейрогенезу, чем мыши, получавшие хирургическое вмешательство ССИ, при этом обе группы получали обработку средой-носителем после хирургического вмешательства. Таким образом, PPF1 демонстрировал способность восстанавливать нейрогенез после хронического повреждения нерва. * $P < 0,05$ при ССИ с обработкой PPF1 по сравнению с ССИ с обработкой средой-носителем; по непарному Т-критерию.

На фиг. 5 представлены данные гистологического исследования гиппокампа, проведенного на мышях дикого типа, описанных на фиг. 1. Количественно определяли Маркер воспаления, измеряемый по экспрессии CD68. Полученные авторами настоящего изобретения данные показывают, что мыши, получавшие хирургическое вмешательство ССИ и обработку средой-носителем, экспрессировали значительно большее количество CD68-положительных клеток в гиппокампе, чем мыши, обрабатываемые с помощью PPF1 после хирургического вмешательства ССИ. Обрабатываемые с помощью PPF1 животные имели уровни воспаления, подобные таковым у получавшей имитационное хирургическое вмешательство группы. Это показывает, что PPF1 может помочь блокировать нейровоспаление, возникающее в результате хронического поражения нервов. * $P < 0,05$ при ССИ с обработкой PPF1 по сравнению с ССИ с обработкой средой-носителем, при имитации со средой-носителем по сравнению с ССИ со средой-носителем; однофакторный ANOVA с апостериорным анализом Тьюки.

На фиг. 6 представлены данные механического теста на аллодинию фон Фрея у мышей C57BL/6J, которые получали ССИ или имитационное хирургическое вмешательство и которых тестировали на временной шкале, как показано на фиг. 1. Мышам возрастом 22 месяца осуществляли режим импульсного введения дозы 7 суток подряд по 150 мкл/сутки (внутривенно в хвостовую вену) либо PPF1, либо контроля в виде среды-носителя. Другая группа получала габапентин при 75 мг/кг (внутрибрюшинное введение) ежесуточно в течение 7 суток подряд. Все виды обработки начинали через 24 ч после ССИ или имитационного хирургического вмешательства. Для определения переносимости животным механического давления заднюю лапу, иннервируемую рассматриваемым седалищным нервом, раздражали нитями фон Фрея различной толщины. Давление, при котором мышь отдергивала свою заднюю лапу, оценивали и представляли на фиг. 6 как недели после ССИ или имитационного хирургического вмешательства. На фигуре показано, что мыши, получавшие PPF1 после ССИ, характеризовались значительно большей переносимостью механической ноцицепции по всем оцениваемым временным шкалам, чем обрабатываемые средой-носителем после ССИ. Напротив, мыши, которым вводили только габапентин, демонстрировали значительное улучшение в отношении механической ноцицепции через 2 недели после хирургического вмешательства ССИ и были подобны мышам, получавшим среду-носитель, во все другие моменты времени. Мыши, подвергшиеся имитационному хирургическому вмешательству, демонстрировали значительно повышенную реакцию на механическую ноцицепцию через 3 и 5 недель после хирургической манипуляции. Вместе эти данные показывают, что PPF1 облегчает периферическую боль на более длительный период времени, чем при стандартном лечении (габапентином). ***, **** $P < 0,001$, $P < 0,0001$ при PPF1 по сравнению с контролем в виде среды-носителя; ANOVA с апостериорным анализом Тьюки. * $P < 0,05$ при габапентине по сравнению с контролем в виде среды-носителя; ANOVA с апостериорным анализом Тьюки. *, ** $P < 0,05$, $P < 0,01$ при имитации по сравнению с контролем в виде среды-носителя; ANOVA с апостериорным анализом Тьюки.

На фиг. 7 представлены данные теста с горячей пластиной на мышях дикого типа, обрабатываемых, как описано на фиг. 1 и как описано в работе Woolfe и Macdonald. (Woolfe G. and Macdonald A.D., J. Pharmacol. Exp. Ther. 80:300-07 (1944), которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном своем объеме). На горячей пластине устанавливали температуру 55°C. Мышей приучали к помещению в прозрачный цилиндр в течение 30 мин. Цилиндр помещали на горячую пластину и запускали таймер. При первом наблюдении за ноцицептивным поведением (например, облизывание задних лап или прыжки) время регистрировали как латентность. Если не наблюдали ноцицептивное поведение, животное извлекали в предварительно определенное время окончания, например 30 с, для предотвращения повреждения тканей. Мышей тестировали только через 2 и 5 недель после хирургического вмешательства ССИ, поскольку было показано, что повторное испытание изменяет чувствительность. На фиг. 7 иллюстрируется ноцицептивная латентность на горячей пластине через 5 недель после ССИ или имитационного хирургического вмешательства. При обработке PPF1 наблюдали значительно меньшую чувствительность к раздражению горячей пластиной по сравнению с мышами, получавшими ССИ плюс контроль в виде среды-носителя, что указывает на защитный эффект PPF1. ** $P < 0,01$ при имитации по сравнению с хирургическим вмешательством ССИ, **** $P < 0,0001$ при PPF1 по сравнению с обработанными средой-носителем мышами с хирургическим вмешательством ССИ. ANOVA с апостериорным анализом Тьюки.

(2) Предупреждение неprovоспаления в спинном мозге.

Отдельное исследование, подобное предыдущему исследованию (выше), выполняли на 22-месячных мышах C57BL/6J. Когорты мышей обрабатывали следующим образом: (1) PPF (PPF2) после СС1; (2) среда-носитель после СС1; (3) рекомбинантный альбумин человека (rhAlb) после СС1 или (4) среда-носитель после имитационного хирургического вмешательства. Мышам осуществляли режим импульсного введения дозы 7 суток подряд по 150 мкл/сутки (внутривенно в хвостовую вену) PPF2, рекомбинантного альбумина человека или контроля в виде среды-носителя. Все виды обработки начинали через 24 ч после СС1 или имитационного хирургического вмешательства.

На фиг. 8 представлены данные теста с горячей пластиной (как описывается выше) через 35 суток после СС1 при обработке по временной шкале на фиг. 1. Обработанные с помощью PPF2 мыши были значительно менее чувствительны к раздражению горячей пластиной по сравнению с мышами, получавшими СС1 плюс контроль в виде среды-носителя. Мыши, обрабатываемые рекомбинантным альбумином человека, также были значительно менее чувствительны по сравнению с мышами, получавшими СС1 плюс контроль в виде среды-носителя, но не до такой степени, как мыши, обрабатываемые с помощью PPF2. * $P < 0,05$ при rhAlb по сравнению с обрабатываемыми средой-носителя мышам с СС1, *** $P < 0,001$ при PPF2 по сравнению с обрабатываемыми средой-носителем мыши с хирургическим вмешательством СС1. ANOVA с апостериорным анализом Тьюки.

На фиг. 9 представлены данные механического теста на аллодинию фон Фрея у тех же мышей с другими временными интервалами как до СС1 (исходный уровень), так и после СС1. Давление, при котором мышь отдергивала заднюю лапу, оценивали и представляли на фиг. 9 как недели после СС1 или имитационного хирургического вмешательства. На фигуре показано, что мыши, которым вводили PPF1 после хирургического вмешательства СС1, имели значительно повышенную переносимость в отношении механической ноцицепции во все оцениваемые моменты времени, чем мыши, которым вводили среду-носитель или рекомбинантный альбумин человека (rhAlb) после СС1. Это говорит о том, что PPF (PPF2) облегчает боль на более длительный период времени, чем контроль в виде среды-носителя или альбумин, при этом альбумин является основным белковым компонентом PPF. Таким образом, эти эффекты, по-видимому, опосредуются не альбумином, а другими белками, присутствующими в PPF. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ по сравнению с контролем в виде среды-носителя; ANOVA с апостериорным анализом Тьюки.

На фиг. 10 представлено относительное содержание основного миелинового белка (MBP, выявляемого с помощью Abscam, антитела против антигена кролика ab40390) в дистальном седалищном нерве через пять недель после последней дозы PPF (PPF1) в другом подобном эксперименте, проводимом на 22-месячных мышах, как описывается выше. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ по сравнению с контролем в виде среды-носителя; ANOVA с апостериорным анализом Тьюки.

На фиг. 11 представлено относительное содержание у этих мышей маркера S-100 шванновских клеток. В обоих случаях PPF у мышей с СС1 повышал относительное содержание этих маркеров по сравнению с обрабатываемыми контролем в виде среды-носителя мышами с СС1. Вместе эти данные показывают, что PPF обеспечивает механизмы репарации седалищного нерва посредством усиления экспрессии миелинового белка и S-100. Также показали, что PPF индуцирует механизмы репарации миелинизации. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с контролем в виде среды-носителя; ANOVA с апостериорным анализом Тьюки.

На фиг. 12 показано характеристическое представление с помощью флуоресцентной микроскопии данных, представленных на фиг. 10 и 11.

На фиг. 13 и 14 показано выявление BDNF и CD68 соответственно в задних рогах спинного мозга у обрабатываемых мышей через 24 ч после поражения СС1. Происходящий из головного мозга нейротрофический фактор (BDNF, выявляемый с помощью Abscam, антитела против антигена кролика ab108319) секретируется активированной микроглией и, как было показано, усиливает спинальную ноцицепцию (выявление болезненных раздражителей) посредством синаптической фасилитации и вовлечения механизмов, подобных центральной сенсibilизации. Вызванная периферическим поражением нейропатическая боль часто сопровождается повышенной экспрессией BDNF в спинном мозге (Garraway S.M., et al., Neural. Plast. Article ID 9857201 (2016)). Также определяли содержание CD68 (выявляемое с помощью антитела Biorad MCA1957 GA против антигена кролика). CD68 является маркером активированной микроглии. На фиг. 13 и 14 показано, что лечение с помощью PPF через 24 ч после поражения СС1 приводило к значительному снижению маркеров BDNF и CD68 в задних рогах спинного мозга, что указывает на предотвращение активации микроглии и блокирование пагубных последующих событий, связанных с развитием нейропатической боли. ** $p < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с контролем в виде среды-носителя; ANOVA с апостериорным анализом Тьюки.

На фиг. 15 и 16 представлены полученные с помощью флуоресцентной микроскопии изображения данных, представленных на фиг. 13 и 14 соответственно. Прямоугольником выделены дорсальные рога спинного мозга, который проанализировали в поясничных сегментах L4-L6. Изображения в правой части фигур представляют собой изображения прямоугольных областей в левой части каждой фигуры с более высоким фокусным расстоянием.

b) Боль. Обработка через 14 суток после поражения.

На фиг. 17 показан протокол, используемый на 22-месячных мышах C57BL/6J. Исходные пороговые значения отдергивания лапы в тесте фон Фрея для измерения механической аллодинии получали за 3-4 суток до ССИ или имитационных процедур. Когорты мышей обрабатывали следующим образом: (1) PPF (PPF1) через 14 суток после ССИ; (2) среда-носитель через 14 суток после ССИ; (3) рекомбинантный альбумин человека (rhAlb) через 14 суток после ССИ или (4) среда-носитель через 14 суток после имитационного хирургического вмешательства. Мышам осуществляли режим импульсного введения дозы 7 суток подряд по 150 мкл/сутки (внутривенно в хвостовую вену) PPF1, рекомбинантного альбумина человека или контроля в виде среды-носителя. Все виды обработки начинали через 14 суток после ССИ или имитационного хирургического вмешательства.

На фиг. 18 представлены пороговые значения отдергивания лапы по фон Фрею на исходном уровне, через 14, 21, 28, 35, 42 и 49 суток после ССИ. В сутки 14 наблюдали значительный дефицит во всех группах, кроме группы с имитацией, что указывает на центральную сенсibilизацию во всех группах с ССИ после 2 недель поражения. Это не изменялось до 7 суток после прекращения обработки с помощью PPF (сутки 28), что указывает на то, что в этой модели простая аналгезия не происходит с PPF. Вместо этого при обработке с помощью PPF имеет место механистический эффект, который не наблюдается со средой-носителем или рекомбинантным альбумином человека (rh альбумином). Это показывает, что боль, полностью установившаяся перед обработкой с помощью PPF (что обязательно вовлекает центральный компонент), значительно облегчается с помощью PPF по сравнению с контролем в виде среды-носителя. $**P<0,01$; $***P<0,001$; $****P<0,0001$ по сравнению с контролем в виде среды-носителя; ANOVA с апостериорным анализом Тьюки.

На фиг. 19 и 20 представлены значения латентности в тесте с горячей пластиной через 35 суток после ССИ (фиг. 19) и 49 суток после ССИ (фиг. 20). Оба набора результатов показывают, что у обрабатываемых с помощью PPF мышей наблюдали длительное снижение болевой чувствительности к горячей пластине. Это также подтверждает наблюдение, что PPF действует посредством механистического эффекта, а не просто оказывает обезболивающий эффект. $**P<0,01$; ANOVA с апостериорным анализом Тьюки.

2. Модель для заживления ран.

Использовали мышиную модель сахарного диабета (B6.BKS(D)-Lep^{db}/J) для оценивания эффективности PPF1 в заживлении ран. Шестинедельным самцам мышей B6.BKS(D)-Lep^{db}/J обривали спину в сутки -1. Мышам наносили рану в сутки 0 в двух местах на спине. Мыши получали ежедневную обработку (IV) средой-носителем (150 мкл) или PPF1 (150 мкл) с суток 0 (сразу же после нанесения раны) до 6 включительно.

Нанесение раны на коже выполняли следующим образом: животных депилировали за сутки до нанесения раны на коже, используя крем для депиляции, а затем осторожно промывали их кожу теплой водой. Животных анестезировали ингаляционным изофлураном, участок операции обривали и обрабатывали антисептическими препаратами повидон-йодом ("бетадином") или хлоргексидином (или аналогичной хирургической дезинфекцией) и 70% этанолом. Мышей помещали на грелку с горячей водой (или аналогичный хирургический продукт). Перманентным маркером на коже спины отмечали два участка нанесения раны кружочками диаметром 5 мм. Кожу на спине поднимали чистыми щипцами и разрезали тонкими хирургическими ножницами по отмеченным кружочкам. Силиконовую шину диаметром 15 мм с разрезом в середине диаметром 6 мм накладывали вокруг раны с помощью Vetbond и нейлоновой шовной нити. После нанесения раны на коже мышей взвешивали (исходная масса тела) и помещали в чистую домашнюю клетку с грелкой под ней и размягченной пищей. Мыши оставались на грелке и находились под наблюдением, пока не становились бодрыми, alertными и активными.

В послеоперационном периоде заживление ран оценивали ежедневно до снятия швов. Бупренорфин вводили внутрибрюшинно сразу же после хирургического вмешательства и каждые ~12 ч, всего три инъекции. Мелоксикам вводили внутрибрюшинно до хирургического вмешательства и через 24 ч после хирургического вмешательства.

Размягченный корм и гель Clear H₂O Recovery помещали на дно клетки после хирургического вмешательства. Массу тела мыши измеряли ежедневно после хирургического вмешательства. Если мышь теряла более 1 г массы тела после хирургического вмешательства, ей вводили 500 мкл/сутки физиологического раствора.

У мышей ежедневно оценивали степень закрытия раны путем измерения размера раны с помощью штангенциркуля. Мышей умерщвляли в сутки 10 и 14. Мышей подвергали глубокой анестезии с помощью авертина (250 мг/кг, внутрибрюшинно), а затем подвергали пункции сердца и собирали образцы крови с помощью предварительно заполненных шприцев с EDTA. Затем кровь/EDTA вводили в микроцентрифужную пробирку. Пробирки держали на льду и как можно быстрее отделяли плазму крови центрифугированием при 1000 g (+4°C) в течение 15 мин. Плазму крови от каждой мыши отбирали аликвотами по 100 мкл на флакон, остаток помещали во второй флакон и хранили при -80°C.

У каждой мыши собирали кожу, фиксировали 4% параформальдегидом с последующими двумя промывками в PBS, а затем заливали парафином. Ткани разделяли или лизировали и анализировали на

предмет маркеров воспаления стандартными гистологическими и биохимическими способами, включающими в себя qRT-PCR, вестерн-блоттинг, ELISA и иммуногистохимию.

На фиг. 21 представлено гистологическое сравнение между диабетической раной (диабетическая модель мыши B6.BKS(D)-Lep^{db}/J), которую не обрабатывали (фиг. 21A) или обрабатывали с помощью PPF1 (фиг. 21B). Черные столбики показывают толщину раневого ложа (эпидермальный слой плюс слой грануляции). Стрелки показывают границы раны. Толщина раневого ложа повышалась у обработанных с помощью PPF1 мышей, как определяли по толщине раневого ложа. Следовательно, PPF1 демонстрирует улучшенное заживление ран.

На фиг. 22 представлено гистологическое сравнение между диабетической раной (диабетическая модель мыши B6.BKS(D)-Lep^{db}/J), которую не обрабатывали (фиг. 22A) или обрабатывали с помощью PPF1 (фиг. 22B). Черные столбики показывают слой грануляции. Синие столбики показывают эпидермальный слой. Обработанная с помощью PPF1 рана демонстрировала более толстый эпидермальный слой, чем необработанная рана, однако слой грануляции демонстрировал еще большую тенденцию к различию между обработанными с помощью PPF1 и необработанными ранами (т.е. слой грануляции был толще в обработанных с помощью PPF1 ранах, чем в необработанных ранах).

На фиг. 23-26 представлены результаты оценивания на диабетической модели мыши B6 ob/ob (мышь B6.Cg-Lepob/J) эффективности PPF1 по сравнению со средой-носителем в отношении заживления диабетических ран. Использовали девятидневных самцов мышей B6 OB/OB. За сутки до нанесения раны мышью взвешивали и не кормили в течение 5 ч для определения содержания глюкозы натощак в крови из хвостовой вены. Мышей равномерно делили на две разные группы обработки по массе и содержанию глюкозы. Для нанесения раны мышью обривали, наносили крем для удаления волос (Nair™), наносили раны на двух участках на спине (иссечение диаметром 5 мм), затем наносили силиконовое кольцо, пропитанное 70% спиртом (с внешней окружностью 12 мм и внутренней окружностью 6 мм). Кольцо прикрепляли к открытой ране с помощью Vectabond™. На каждое кольцо накладывали по четыре шва, чтобы силиконовое кольцо оставалось прикрепленным к ране на протяжении всего эксперимента. Наносили 30 мкл PPF1 и контроля непосредственно на верхнюю часть раны и обе раны закрывали кусочком Tegaderm™. Проводили ежесуточную обработку путем инъекции PPF1 и контроля внутрь Tegaderm™, покрывающего раны. Чтобы визуализировать раны, Tegaderm™, который покрывал рану, отрезали и рану снова закрывали свежим кусочком Tegaderm™. При умерщвлении кольца удаляли, а раны вырезали со спины для гистологии.

Заживление ран ежесуточно оценивали путем определения степени закрытия раны. Размер раны измеряли с помощью камеры и точной масштабной линейки. Окончательный сбор ткани выполняли в сутки 10 и 14. Ткани разделяли или лизировали и анализировали на предмет маркеров воспаления стандартными гистологическими и биохимическими способами, включающими в себя иммуногистохимию, qRT-PCR, H&E и другие специальные окрашивания.

На фиг. 23 показана общая схема эксперимента. Капли крови указывают на то, когда кровь собирали для измерения содержания глюкозы натощак. В сутки 2 наносили кожную рану, а в сутки 1-7 выполняли внутривенное (iv) введение дозы.

На фиг. 24 показан процент раны, все еще открытой в некоторые моменты времени после нанесения ранены, в первом исследовании (исследование 1). Мышей обрабатывали либо PPF1 (150 мкл) в течение 7 суток, либо контролем в виде солевого раствора. Через 10 суток размеры открытых ран у животных, получавших обработку с помощью PPF1, были значительно уменьшены по сравнению с таковыми у обрабатываемых контролем в виде солевого раствора (**p<0,006 по непарному Т-критерию).

На фиг. 25 показан процент раны, все еще открытой в некоторые моменты времени после нанесения раны, во втором исследовании (исследование 2). Мышей обрабатывали либо PPF1 (150 мкл) в течение 7 суток, либо контролем в виде солевого раствора. Через 8 суток размеры открытых ран у животных, получавших обработку с помощью PPF1, были значительно уменьшены по сравнению с таковыми у обрабатываемых контролем в виде солевого раствора (**p<0,0018 по непарному Т-критерию).

На фиг. 26 показан процент раны, все еще открытой через 11 суток после нанесения раны, с объединением данных исследований 1 и 2. Получавшие обработку с помощью PPF1 животные демонстрировали статистически значимое снижение процента раны, оставшейся открытой через 11 суток (**p<0,006 по непарному Т-критерию). Различие между получавшими обработку с помощью PPF1 и получавшими обработку средой-носителем животными в сутки 10 было одинаково значимым (** p<0,006 по непарному Т-критерию).

На фиг. 27 и 28 представлены результаты исследования с использованием вводимых местным путем PPF1 или среды-носителя в раны мышью B6 ob/ob (мышью B6.Cg-Lepob/J).

На фиг. 27 показана парадигма исследования ежесуточных введений 30 мкл местного PPF1 или контроля в виде среды-носителя, вводимых в раны. Нанесение раны выполняли, как описано на фиг. 23.

На фиг. 28 представлены результаты исследования местного введения с указанием процента площади первоначальной раны, оставшейся после 10 суток обработки. На фиг. 28 показано, что PPF1 значительно уменьшил процент открытой раны, оставшейся через 10 суток, по сравнению с контролем в виде

среды-носителя.

По меньшей мере в некоторых из ранее описанных вариантов осуществления один или несколько элементов, используемых в одном варианте осуществления, могут взаимозаменяемо использоваться в другом варианте осуществления, если такая замена технически не осуществима. Специалистам в данной области будет понятно, что различные другие упущения, дополнения и модификации могут быть сделаны в способах и структурах, описанных выше, без отклонения от объема заявленного изобретения. Предполагается, что все такие модификации и изменения входят в объем изобретения, определяемый прилагаемой формулой изобретения.

Специалистам в данной области будет понятно, что в целом термины, используемые в настоящем документе и особенно в прилагаемой формуле изобретения (например, в главной части прилагаемой формулы изобретения), обычно подразумеваются как "открытые" термины (например, термин "включающий в себя" следует интерпретировать как "включающий в себя без ограничения", термин "имеющий" следует интерпретировать как "имеющий по меньшей мере", термин "включает в себя" следует интерпретировать как "включает в себя без ограничения" и т.д.). Кроме того, специалистам в данной области будет понятно, что если имеется в виду конкретное число заявляемых признаков, то такое намерение будет четко изложено в формуле изобретения, и в отсутствие таких признаков такое намерение отсутствует. Например, для облегчения понимания следующие прилагаемые пункты формулы изобретения могут содержать использование вводных фраз "по меньшей мере один" и "один или несколько" для введения формулировок формулы изобретения. Однако использование таких фраз не должно толковаться как означающее, что введение заявляемого признака в единственном числе ограничивает любой конкретный пункт формулы изобретения, содержащий такой введенный заявляемый признак, вариантами осуществления, содержащими только один такой признак, даже если тот же пункт формулы изобретения включает в себя вводные фразы "один или несколько" или "по меньшей мере один" и использование единственного числа (например, признак в единственном числе следует интерпретировать как "по меньшей мере один" или "один или несколько"); то же самое верно и в отношении использования множественного числа для введения заявляемых признаков. Кроме того, даже если точно указано конкретное количество введенных заявляемых признаков, специалистам в данной области будет понятно, что такое упоминание должно интерпретироваться как означающее по меньшей мере упомянутое количество (например, простое упоминание "двух признаков" без других модификаторов означает по меньшей мере два признака или два или более признаков). Кроме того, в тех случаях, когда используют предположение, аналогичное "по меньшей мере одному из А, В и С и т.д.", такая конструкция предусматривает тот смысл, что специалист в данной области вкладывает в предположение (например, "система, имеющая по меньшей мере один из А, В и С", будет включать в себя, без ограничения, системы, которые имеют А отдельно, В отдельно, С отдельно, А и В вместе, А и С вместе, В и С вместе и/или А, В и С вместе и т.д.). В тех случаях, когда используют предположение, аналогичное "по меньшей мере одному из А, В или С, и т.д.", в целом, такая конструкция предусматривает тот смысл, что специалист в данной области вкладывает в предположение (например, "система, имеющая по меньшей мере один из А, В и С", будет включать в себя, без ограничения, системы, которые имеют А отдельно, В отдельно, С отдельно, А и В вместе, А и С вместе, В и С вместе и/или А, В и С вместе и т.д.). Кроме того, специалистам в данной области будет понятно, что фактически любые разделительные слово и/или фразу, представляющие два или более альтернативных термина, будь то в описании, формуле изобретения или графических материалах, следует понимать как возможности включения одного из терминов, любого из терминов или обоих терминов. Например, фразу "А или В" следует понимать как включение возможностей "А" или "В" или "А и В".

Кроме того, если признаки или аспекты настоящего раскрытия описаны в терминах групп Маркуша, специалистам в данной области будет понятно, что настоящее раскрытие также таким образом описано в терминах любого отдельного члена или подгруппы членов группы Маркуша.

Как будет понятно специалисту в данной области, для любых и всех целей, например, с точки зрения предоставления письменного описания, все диапазоны, раскрываемые в настоящем документе, также охватывают любые и все возможные поддиапазоны и комбинации поддиапазонов. Любой указанный диапазон можно легко понять как достаточно описывающий и позволяющий разбить один и тот же диапазон по меньшей мере на равные половины, трети, четверти, пятые части, десятые части и т.д. В качестве неограничивающего примера каждый обсуждаемый в настоящем документе диапазон можно легко разбить на нижнюю треть, среднюю треть и верхнюю треть и т.д. Как также будет понятно специалисту в данной области, все выражения, такие как "до", "по меньшей мере", "больше чем", "меньше чем" и подобные, включают в себя указанное число и относятся к диапазонам, которые далее могут быть разбиты на поддиапазоны, как описано выше. Наконец, как будет понятно специалисту в данной области, диапазон включает в себя каждый отдельный член. Таким образом, например, группа, имеющая 1-3 элемента, относится к группам, имеющим 1, 2 или 3 элемента. Подобным образом, группа, имеющая 1-5 элементов, относится к группам, имеющим 1, 2, 3, 4 или 5 элементов и т.д.

Хотя вышеизложенное изобретение было описано довольно подробно с помощью иллюстраций и примеров в целях ясности понимания, для специалистов в данной области в свете идей настоящего изо-

бретения понятно, что могут быть внесены определенные изменения и модификации без отклонения от сути и объема прилагаемой формулы изобретения.

Соответственно, вышеизложенное описание просто иллюстрирует принципы настоящего изобретения. Следует учитывать, что специалисты в данной области могут разрабатывать различные устройства, которые, хотя и не описаны или не показаны в настоящем документе явно, предусматривают принципы настоящего изобретения и охватываются его сутью и объемом. Кроме того, все примеры и условные формулировки, приведенные в настоящем документе, в основном предназначены для помощи читателю в понимании принципов настоящего изобретения и концепций, внесенных авторами настоящего изобретения в развитие данной области, и не должны рассматриваться как ограничивающие такие конкретно перечисленные примеры и условия. Более того, все утверждения в настоящем документе, излагающие принципы, аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения, а также его конкретные примеры, предназначены охватывать как структурные, так и функциональные его эквиваленты. Кроме того, предполагается, что такие эквиваленты включают в себя как известные в настоящее время эквиваленты, так и эквиваленты, которые будут разработаны в будущем, то есть любые разработанные элементы, которые выполняют ту же функцию, независимо от структуры. Более того, ничто из раскрытого в настоящем документе не предназначено для публичного ознакомления, независимо от того, указано ли такое раскрытие явно в формуле изобретения.

Поэтому объем настоящего изобретения не предназначен для ограничения иллюстративными вариантами осуществления, показанными и описанными в настоящем документе. Скорее, объем и суть настоящего изобретения определяются прилагаемой формулой изобретения. Согласно 35 U.S.C. §112 (f) или 35 U.S.C. §112 (6) прямо определено, что в формуле изобретения ограничительная часть пункта формулы используется только тогда, когда точная фраза "предназначен для" или точная фраза "стадия для" указана в начале такой ограничительной части пункта формулы; если такая точная фраза не используется в ограничительной части пункта формулы, то 35 U.S.C. § 112 (f) или 35 U.S.C. §112 (6) не применяется.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ улучшения или ускорения послеоперационного восстановления у субъекта, при этом способ предусматривает введение белковой фракции плазмы крови (PPF) субъекту в количестве, эффективном для улучшения или ускорения послеоперационного восстановления, при котором PPF содержит от 83 до 95% альбумина по отношению к общему содержанию белка.

2. Способ по п.1, при котором PPF представляет собой коммерчески доступную PPF.

3. Способ по п.1 или 2, при котором введение выполняют по меньшей мере 3 дня подряд.

4. Способ лечения субъекта с диагнозом боли, при этом способ предусматривает введение эффективного количества белковой фракции плазмы крови (PPF) субъекту, при котором PPF содержит от 83 до 95% альбумина по отношению к общему содержанию белка.

5. Способ по п.4, при котором боль представляет собой хроническую боль.

6. Способ по п.4, при котором боль представляет собой периферическую боль.

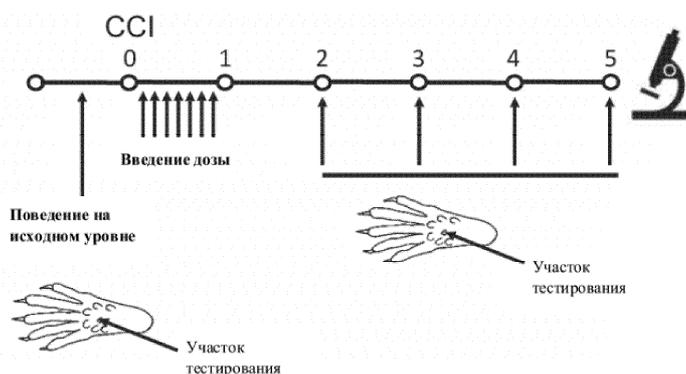
7. Способ по п.4, при котором боль представляет собой центральную боль.

8. Способ по любому из пп.4-7, при котором PPF представляет собой коммерчески доступную PPF.

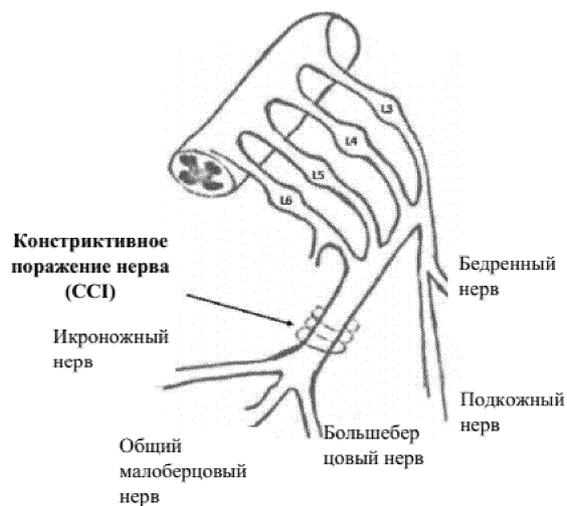
9. Способ по любому из пп.4-8, при котором введение выполняют по меньшей мере 3 дня подряд.

10. Способ по любому из пп.1-3, при котором введение осуществляют в течение от 3 до 14 дней подряд.

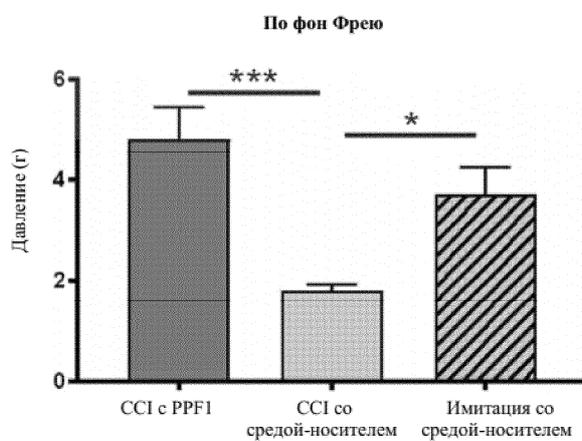
11. Способ по любому из пп.4-8, при котором введение осуществляют в течение от 3 до 14 дней подряд.



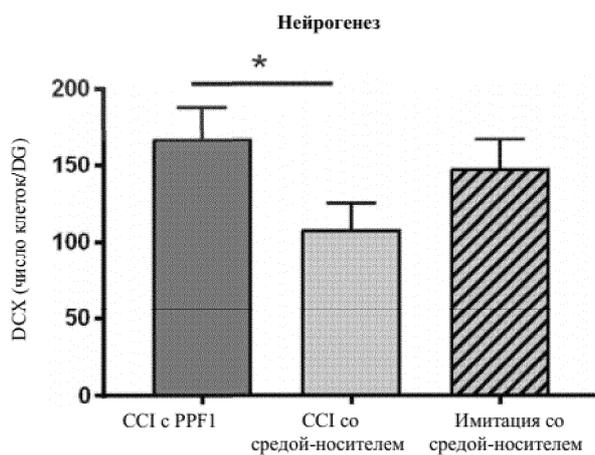
Фиг. 1



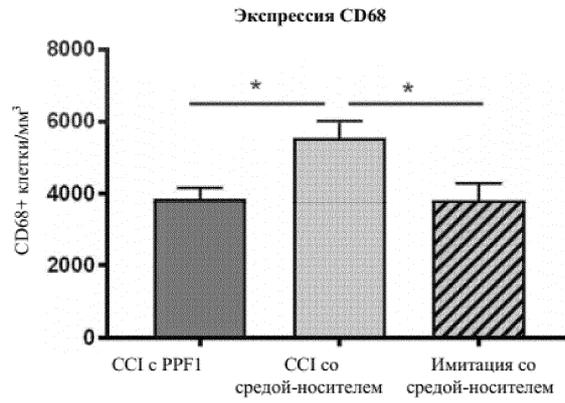
Фиг. 2



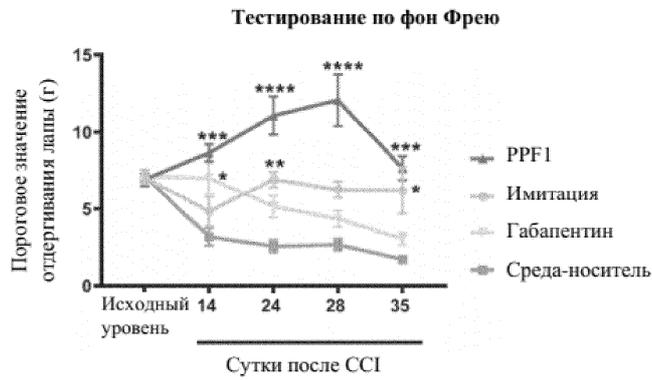
Фиг. 3



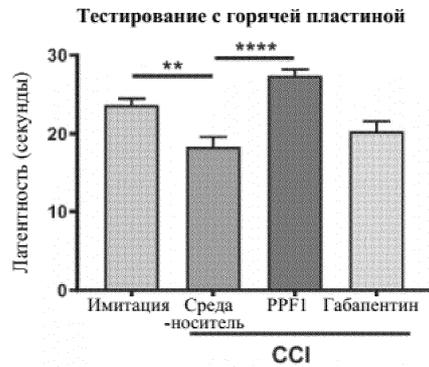
Фиг. 4



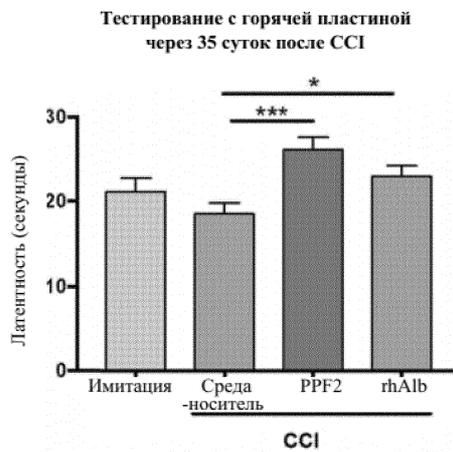
Фиг. 5



Фиг. 6

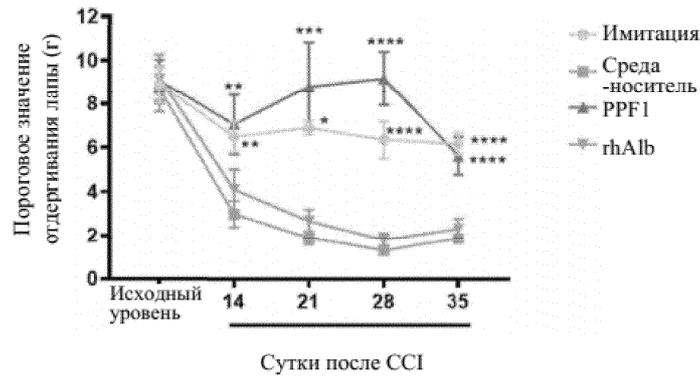


Фиг. 7



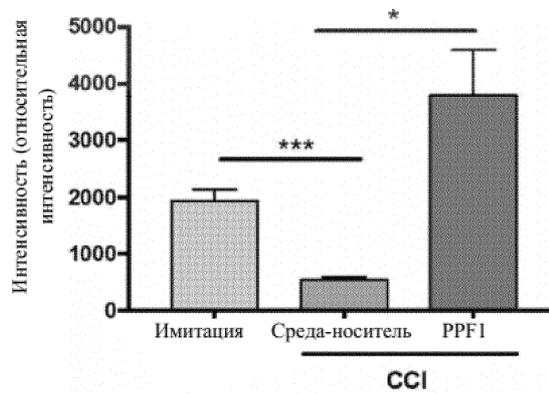
Фиг. 8

Механический тест на аллодинию (по фон Фрею)



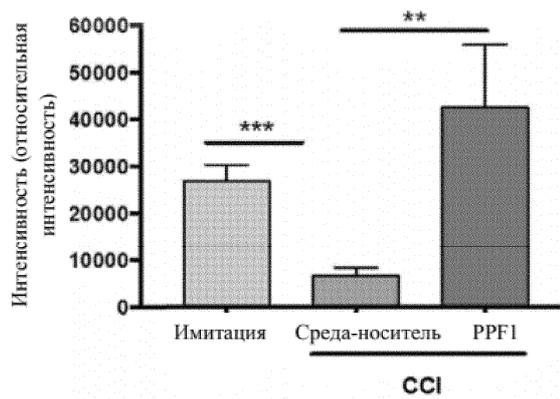
Фиг. 9

Основной миелиновый белок в дистальном седалищном нерве

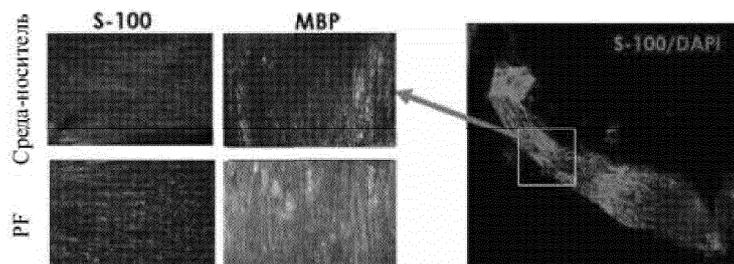


Фиг. 10

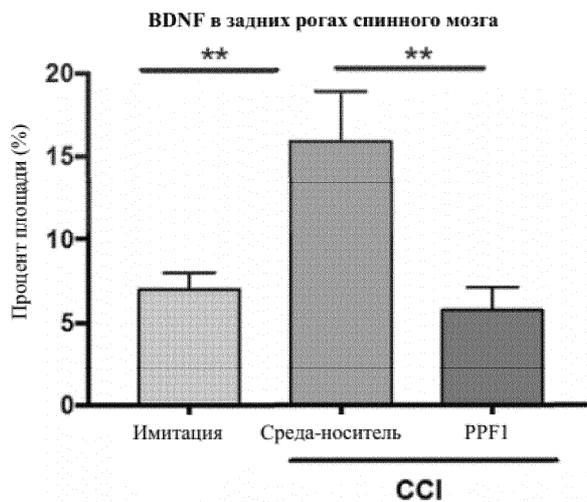
S-100 шванновских клеток в дистальном седалищном нерве



Фиг. 11

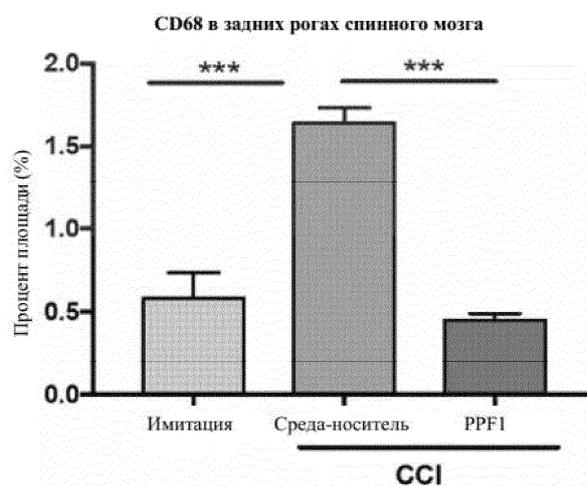


Фиг. 12



Обработка через 24 часа после поражения CCI

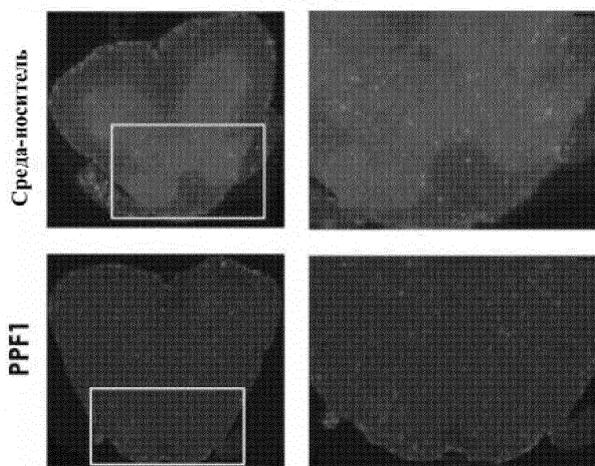
Фиг. 13



Обработка через 24 часа после поражения CCI

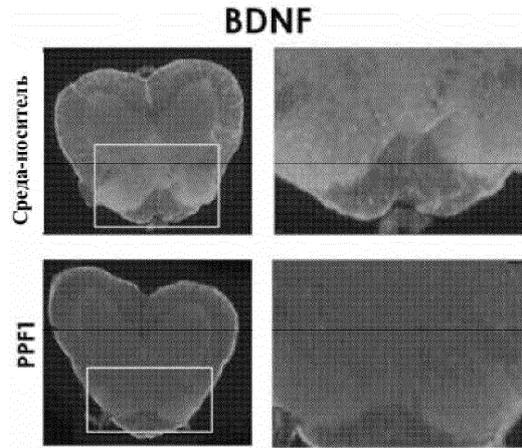
Фиг. 14

CD68



Участок анализа L4-L6

Фиг. 15

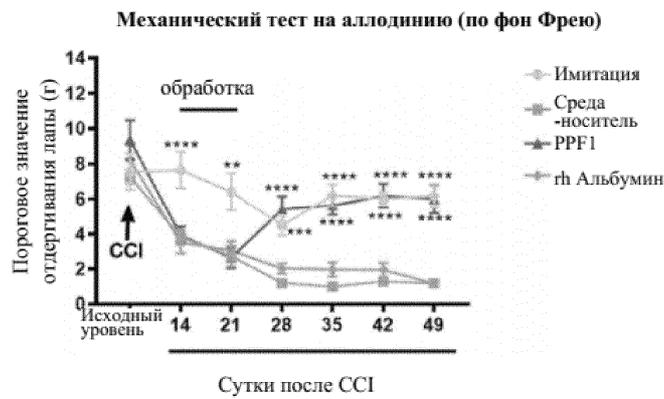


Участок анализа L4-L6

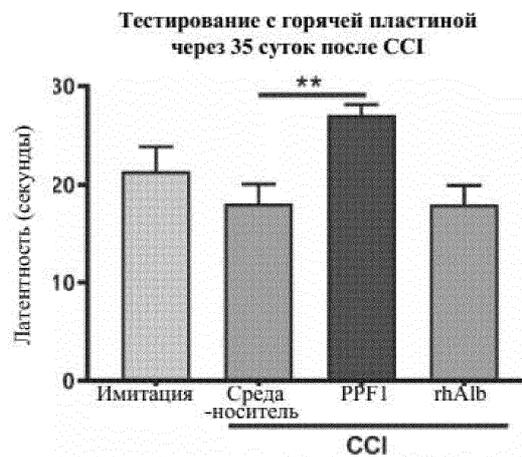
Фиг. 16



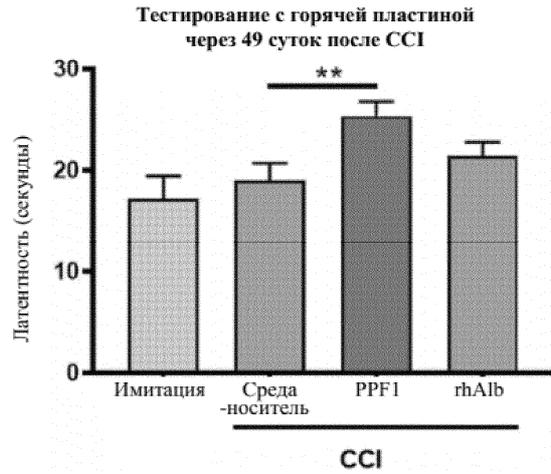
Фиг. 17



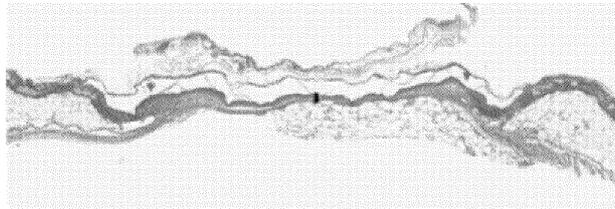
Фиг. 18



Фиг. 19

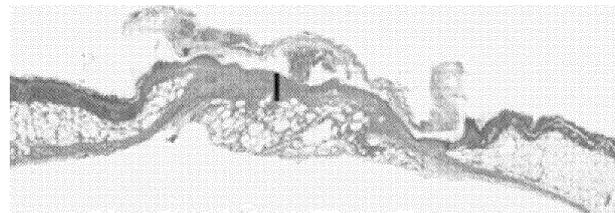


Фиг. 20



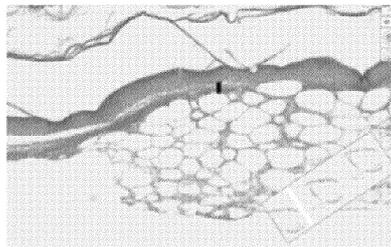
Диабетическая рана без обработки

Фиг. 21А



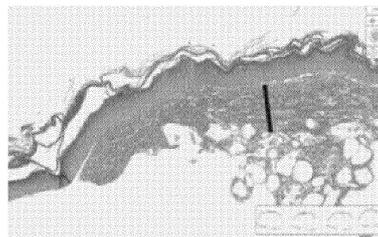
Диабетическая рана, обработанная PPF1

Фиг. 21В



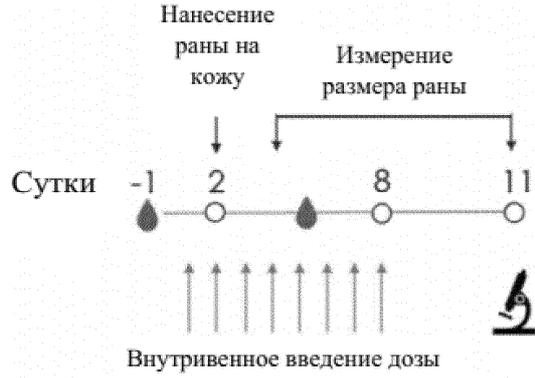
Диабетическая рана без обработки

Фиг. 22А

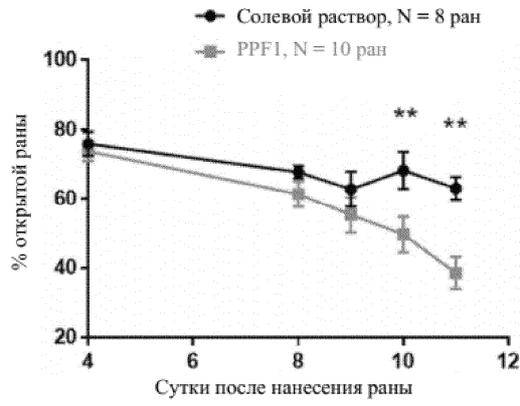


Диабетическая рана, обработанная PPF1

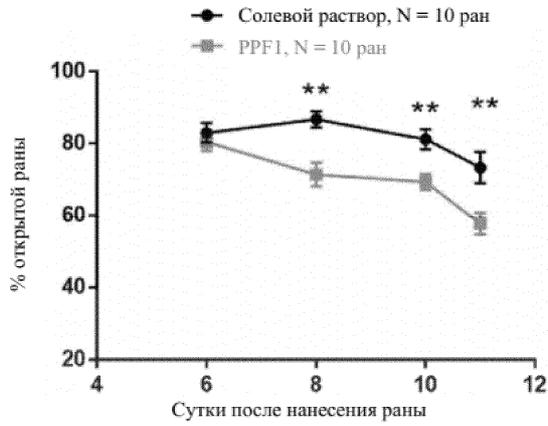
Фиг. 22В



Фиг. 23

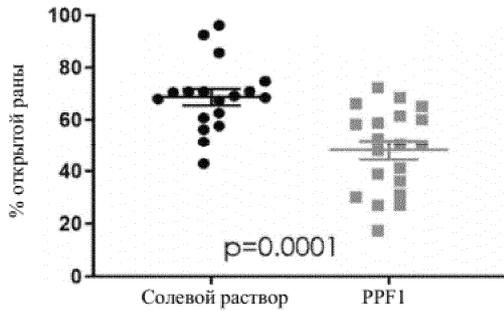


Фиг. 24

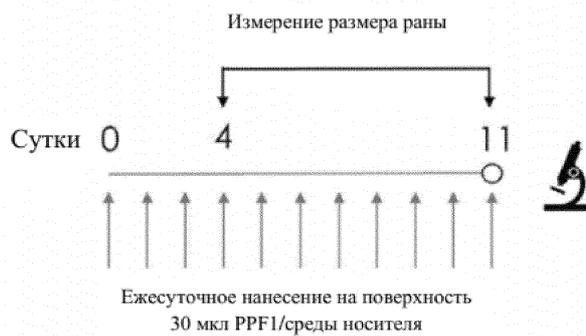


Фиг. 25

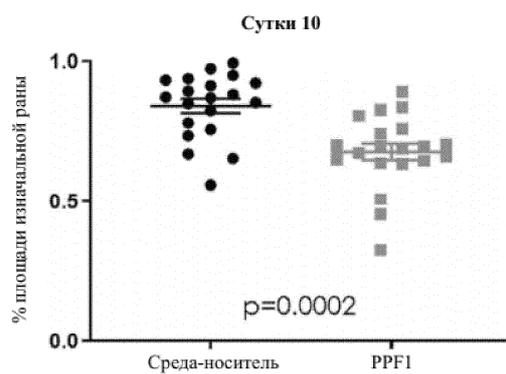
Объединенные данные исследований 1 + 2 через 11 суток



Фиг. 26



Фиг. 27



Фиг. 28

