



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2019.03.29

(21) Номер заявки  
201400966

(22) Дата подачи заявки  
2013.02.28

(51) Int. Cl. C07K 16/06 (2006.01)  
A61P 25/00 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ДЕМИЕЛИНИЗИРУЮЩЕЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕЙРОПАТИИ, ВЫЗВАННОЙ ТРАВМОЙ

(31) 61/605,117

(32) 2012.02.29

(33) US

(43) 2014.12.30

(86) PCT/US2013/028350

(87) WO 2013/130826 2013.09.06

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
БАКСАЛТА ИНКОРПОРЕЙТИД  
(US); БАКСАЛТА ГМБХ (CH)

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

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

(56) VARGAS MAURICIO E. ET AL.: "Endogenous antibodies promote rapid myelin clearance and effective axon regeneration after nerve injury", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 107, no. 26, June 2010 (2010-06), pages 11993-11998, XP002695282, ISSN: 0027-8424 cited in the application see p. 11994 "Passive transfer of serum, purified IgG, and purified IgM reconstitutes rapid myelin clearance in JHD mice"; see page 11998, "Sciatic nerve crush"

NOTGHI L.M. ET AL.: "P12-12 Neonatal axonal neuropathy: a curious presentation of congenital hypomyelination", CLINICAL NEUROPHYSIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE, IE, vol. 121, 1 October 2010 (2010-10-01), pages S174-S175, XP027454865, ISSN: 1388-2457, DOI: 10.1016/S1388-2457(10)60716-X [retrieved on 2010-10-01] abstract

SEKIGUCHI K. ET AL.: "P12-11 Nerve conduction characteristics of infliximab induced demyelinating neuropathy", CLINICAL NEUROPHYSIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE, IE, vol. 121, 1 October 2010 (2010-10-01), page S174, XP027454864, ISSN: 1388-2457, DOI: 10.1016/S1388-2457(10)60715-8 [retrieved on 2010-10-01] abstract

KRENDEL D.A. ET AL.: "Successful treatment of neuropathies in patients with diabetes mellitus", ARCHIVES OF NEUROLOGY 1995 US, vol. 52, no. 11, 1995, pages 1053-1061, XP008161377, ISSN: 0003-9942 abstract

ZOCHODNE D.W. ET AL.: "Failure of immunotherapy to prevent, arrest or reverse diabetic lumbosacral plexopathy", ACTA NEUROLOGICA SCANDINAVICA 20030401 GB, vol. 107, no. 4, 1 April 2003 (2003-04-01), pages 299-301, XP002695283, ISSN: 0001-6314 the whole document

ODAKA M. ET AL.: "Treatment response to steroid and intravenous immunoglobulin in a patient with chronic sensory demyelinating neuropathy", JOURNAL OF CLINICAL NEUROMUSCULAR DISEASE 200706 US, vol. 8, no. 4, June 2007 (2007-06), pages 207-211, XP002695284, ISSN: 1522-0443 abstract

JOERG-PATRICK STA 1/4 BGEN: "Drug-induced dysimmune demyelinating neuropathies", JOURNAL OF NEUROLOGICAL SCIENCES, ELSEVIER SCIENTIFIC PUBLISHING CO, AMSTERDAM, NL, vol. 307, no. 1, 11 May 2011 (2011-05-11), pages 1-8, XP028234970, ISSN: 0022-510X, DOI: 10.1016/J.JNS.2011.05.010 [retrieved on 2011-05-17] tables 1-3

VERMA A. ET AL.: "High-dose intravenous immunoglobulin therapy in chronic progressive lumbosacral plexopathy", NEUROLOGY, vol. 44, no. 2, 1994, pages 248-250, XP008163795, ISSN: 0028-3878 abstract

COLOVER J.: "Polyneuropathy in type 2 diabetes mellitus", THE LANCET, LANCET LIMITED, LONDON, GB, vol. 358, no. 9298, 15 December 2001 (2001-12-15), page 2086, XP004805732, ISSN: 0140-6736, DOI: 10.1016/S0140-6736(01)07124-0 the whole document

ENGLAND J.D. ET AL.: "Peripheral neuropathy", THE LANCET, LANCET LIMITED, LONDON, GB, vol. 363, no. 9427, 26 June 2004 (2004-06-26), pages 2151-2161, XP004778376, ISSN: 0140-6736, DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16508-2 table 2

LATOV ET AL.: "Immunological and infectious diseases of the peripheral nerves", 28 May 1998 (1998-05-28), XP002706321, ISBN: 0521462657, page 340, page 340, last paragraph before the new "sequence of events"

VAN SCHAIK I.N. ET AL.: "Immunomodulation and remyelination: two aspects of human polyclonal immunoglobulin treatment in immune mediated neuropathies?", MULTIPLE SCLEROSIS, SAGE PUBLICATIONS, BASINGSTOKE, GB, vol. 3, no. 2, 1 April 1997 (1997-04-01), pages 98-104, XP008161364, ISSN: 1352-4585, DOI: 10.1177/135245859700300208 last par. of the par. "Conclusion"

STANGEL M.: "Transplantation of myelinating cells as regenerative therapy for multiple sclerosis: Experimental basis and present state of clinical studies", NERVENARZT, vol. 73, no. 10, 2002, pages 937-945, XP002706322, ISSN: 0028-2804 par. "Schwann-Zellen" and "Schwann-zellen sind aussichtsreichsten"

WARRINGTON A.E. ET AL.: "HUMAN MONOCLONAL ANTIBODIES REACTIVE TO OLIGODENDROCYTES PROMOTE REMYELINATION IN A MODEL OF MULTIPLE SCLEROSIS", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 97, no. 12, 6 June 2000 (2000-06-06), pages 6820-6825, XP000941806, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.97.12.6820 abstract, table 1 and par. "Human mabs that bind to OLs promote CNS remyelination in TMEV-infected mice

HONMOU O. ET AL.: "RESTORATION OF NORMAL CONDUCTION PROPERTIES IN DEMYELINATED SPINAL CORD AXONS IN THE ADULT RAT BY TRANSPLANTATION OF EXOGENOUS SCHWANN CELLS", JOURNAL OF NEUROSCIENCE, NEW YORK, NY, US, vol. 16, no. 10, 15 May 1996 (1996-05-15), pages 3199-3208,

XP002945997, ISSN: 0270-6474 see in particular the last par of the introduction part; page 3203, RH column, last full par.; par. "discussion", the first 2 par.

KUHLMANN TANJA ET AL.: "Differential regulation of myelin phagocytosis by macrophages/microglia, involvement of target myelin, Fc receptors and activation by intravenous immunoglobulins", JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH, vol. 67, no. 2, 15 January 2002 (2002-01-15), pages 185-190, XP002706323, ISSN: 0360-4012 par. Discussion, LH column, first full par.

ZHANG J. ET AL.: "A model for ex vivo spinal cord segment culture-A tool for analysis of injury repair strategies", JOURNAL OF NEUROSCIENCE METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHER B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 192, no. 1, 30 September 2010 (2010-09-30), pages 49-57, XP027258913, ISSN: 0165-0270 [retrieved on 2010-09-01] abstract

**(57)** Изобретение относится к способу лечения демиелинизирующей периферической нейропатии, вызванной травмой, включающему внутривенное введение поликлональных IgG млекопитающему в дозе от около 0,05 до 5 г на кг массы тела. Изобретение также относится к способу лечения демиелинизирующей периферической нейропатии, вызванной травмой, у млекопитающего, включающий трансплантацию нервных клеток в место повреждения периферического нерва, вызванного травмой; и введение в место повреждения периферического нерва, вызванного травмой, композиции, содержащей шванновские клетки, и внутривенное введение поликлональных IgG в дозе от около 0,05 до 5 г на кг массы тела. Поликлональные IgG, подлежащие введению, получены из пула человеческой сыворотки.

**B1**

**032000**

**032000**

**B1**

### Перекрестные ссылки на родственные заявки

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

### Уровень техники

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

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

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

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

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

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

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

### **Краткое описание изобретения**

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

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

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

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

В способах, описанных в настоящем документе, поликлональные IgG могут быть введены индивидууму, нуждающемуся в таком лечении внутривенно. Индивидуум может быть человеком или одомашненным животным. В некоторых вариантах реализации поликлональные IgG получают из пула человеческой сыворотки.

### **Краткое описание чертежей**

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

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

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

ходе клеточной пролиферации.

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

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

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

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

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

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

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

#### **Подробное описание изобретения**

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

#### **I. Определения.**

Термин "не-идиопатический" относится к расстройству, основная причина которого известна.

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

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

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

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

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

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

Термин "незрелые шванновские клетки", как используется в настоящем документе, относится к определенной стадии линии шванновских клеток. Первый этап в линии шванновских клеток дает предшественника шванновских клеток: пролиферативную клетку, которая становится связанной со многими аксонами и экспрессирует рецептор фактора роста нервов (NGF-R), белок, связанный с ростом 43 (GAP-32), и молекулы клеточной адгезии нервных клеток N-CAM и L1. Последующее "коммитированная" шванновская клетка-предшественник известна как незрелая шванновская клетка; она становится связанной с постепенно уменьшенным количеством аксонов и экспрессирует, в дополнение к ранее отмеченным маркерам, белок S-100 (начиная с этой стадии и далее, все шванновские клетки экспрессируют S-100). Коммитированные шванновские клетки-предшественники развиваются или в немиелинизирующие шванновские клетки, которые остаются связанными с несколькими аксонами и в дополнение к предыдущим маркерам экспрессируют галактоцереброзид (GalC), или в миелинизирующие шванновские клетки. Миелинизирующие шванновские клетки проходят в развитии через пролиферативную "премиелинизирующую" стадию, характеризующуюся временной экспрессией супрессированного цАМФ-индуцируемого фактора транскрипции Рон-домена (SCIP), за которой следует "промиелинизирующая" GalC-положительная стадия, становясь в ходе развития связанными с одним аксоном. Окончательная дифференциация в зрелую миелинизирующую шванновскую клетку включает отрицательное регулирование экспрессии NGF-R, GAP-43, N-CAM и L1, с активацией экспрессии GalC и белков миелина, и *in vivo*, синтез и выработку миелина.

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

знание антигена. Термины переменная легкая цепь ( $V_L$ ) и переменная тяжелая цепь ( $V_H$ ) относятся к этим легким и тяжелым цепям соответственно.

"Иммуноглобулин" или "антитело" представляет собой полипептид, который является иммунологически реактивным с конкретным антигеном. Термин "иммуноглобулин", как он используется в настоящем документе, включает интактные молекулы различных изотипов, а также фрагменты с антиген-связывающей способностью, например  $Fab'$ ,  $F(ab')_2$ ,  $Fab$ ,  $Fv$  и  $rIgG$  (см., например, публикацию Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Kuby J., Immunology, 3-е изд., W.H. Freeman & Co., New York (1998)). Термин также включает рекомбинантные одноцепочечные  $Fv$  фрагменты ( $scFv$ ). Термин также охватывает двухвалентные или биспецифические молекулы, диатела, триатела и тетраатела. Двухвалентные или биспецифические молекулы описаны например, в публикациях Kostelny et al. (1992) J. Immunol. 148:1547, Pack and Pluckthun (1992) Biochemistry 31:1579, Hollinger et al., 1993, выше, Gruber et al. (1994) J. Immunol.:5368, Zhu et al. (1997) Protein Sci 6:781, Hu et al. (1996) Cancer Res. 56:3055, Adams et al. (1993) Cancer Res. 53:4026 и McCartney, et al. (1995) Protein Eng. 8:301.

Термин "поликлональные IgG", как он используется в настоящем документе, относится к гетерогенной коллекции иммуноглобулинов IgG, полученных из множества В-клеток и имеющих различные специфичности и аффинности эпитопов. Способы получения поликлональных антител известны специалистам в данной области техники (например, Harlow & Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual. (Cold Spring Harbor Press)). Поликлональные IgG настоящего изобретения могут быть экстрагированы из плазмы, объединенной от разных индивидуумов млекопитающих, которые прошли предварительный скрининг в отношении патогенных заболеваний. В некоторых вариантах реализации поликлональные IgG по настоящему изобретению являются репрезентативными для более 100 индивидуумов, более 200 индивидуумов, более 300 индивидуумов, более 400 индивидуумов, более 500 индивидуумов, более 600 индивидуумов, более 700 индивидуумов, более 800 индивидуумов, более 900 индивидуумов, более 1000 индивидуумов, более 1100 индивидуумов, более 1200 индивидуумов, более 1300 индивидуумов, более 1400 индивидуумов, более 1500 индивидуумов, более 1600 индивидуумов, более 1700 индивидуумов, более 1800 индивидуумов, более 1900 индивидуумов или более 2000 индивидуумов.

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

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

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

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

Термин "основной белок миелина" (MBP), как он используется в настоящем документе, относится к

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

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

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

Термины "доза" и "дозировка" используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Доза относится к количеству активного ингредиента, получаемого индивидуумом при каждом введении. Доза будет изменяться в зависимости от ряда факторов, включая частоту введения; размер и переносимость индивидуума; тяжесть состояния; риск побочных эффектов и путь введения. Специалисту в данной области техники будет понятно, что доза может быть изменена в зависимости от вышеуказанных факторов или на основе терапевтического прогресса. Термин "лекарственная форма" относится к конкретной форме фармацевтического препарата и зависит от пути введения. Например, лекарственная форма может быть жидкой, например физиологический раствор для инъекций.

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

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

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

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

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



оба, то диапазоны, исключаящие какой-либо из этих включенных пределов или оба таких предела, также охватываются изобретением.

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

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

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

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

## II. Демиелинизирующие периферические нейропатии.

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

Демиелинизирующие расстройства, подлежащие лечению композицией поликлональных IgG, описанной в настоящем документе, включают, например, периферические нейропатии, которые вызваны травмой.

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

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

В частности, повреждение чувствительного нерва, вызванное демиелинизирующей периферической нейропатией, может вызвать более сложный спектр симптомов, потому что чувствительные нервы имеют более широкий, более узкоспециализированный диапазон функций. Более крупные чувствительные волокна, заключенные в миелин (складки мембраны с высоким содержанием липидов, которые по спирали оборачивают и изолируют многие нервы), регистрируют вибрацию, легкие прикосновения, а также ощущение положения тела. Повреждение крупных чувствительных волокон уменьшает способность чувствовать вибрацию и прикосновения, в результате чего возникает общее чувство онемения, особенно в кистях рук и ступнях. Многие пациенты не могут только на ощупь распознать формы небольших объектов или различать разные формы. Это повреждение чувствительных волокон может способствовать по-

тере рефлексов (также как и повреждение двигательного нерва). Потеря чувства положения тела часто делает индивидуумов неспособными координировать сложные движения, такие как ходьба или застегивание пуговиц, или поддерживать баланс при закрытых глазах. Нейропатическую боль трудно контролировать, и она может серьезно повлиять на эмоциональное благополучие и общее качество жизни.

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

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

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

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

III. Диагностика и наблюдение за демиелинизирующими периферическими нейропатиями.

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

Общее объективное обследование и соответствующие исследования могут выявить наличие системного заболевания, вызывающего поражение нервов. При помощи анализов крови можно обнаружить диабет, дефицит витаминов, нарушение функции печени или почек, другие расстройства обмена веществ и признаки патологической активности иммунной системы. Исследование спинномозговой жидкости, которая окружает головной мозг и спинной мозг, может выявить патологические антитела, связанные с нейропатией. Более специализированные тесты могут выявить другие гематологические или сердечно-сосудистые заболевания, нарушения соединительной ткани или злокачественные заболевания. Исследования мышечной силы, а также признаки судорог или подергиваний мышечных волокон указывают на вовлечение двигательного волокна. Оценка способности пациента регистрировать вибрацию, легкое прикосновение, положение тела, температуру и боль выявляет повреждение чувствительных нервов и может указывать повреждены ли малые или большие волокна чувствительных нервов.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В некоторых вариантах реализации наблюдение за ремиелинизацией у субъекта (например, субъек-

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

#### IV. Приготовление поликлональных IgG.

Препараты иммуноглобулинов в соответствии с настоящим изобретением могут быть получены из любых подходящих исходных материалов. Например, препараты иммуноглобулинов могут быть получены из донорской сыворотки или моноклональных, или рекомбинантных иммуноглобулинов. В типичном примере кровь собрана от здоровых доноров. Как правило, кровь собирают у того же вида животных, что и субъект, которому будут вводить препарат иммуноглобулинов (обычно называемых "гомологичными" иммуноглобулинами). Иммуноглобулины выделяют из крови и очищают с помощью одной или нескольких соответствующих процедур, таких как, например, фракционирование по Кону, ультрацентрифугирование, электрофоретическая подготовка, ионообменная хроматография, аффинная хроматография, иммуноаффинная хроматография, фракционирование полиэтиленгликолем, спиртовое фракционирование, нанофильтрация, ультрафильтрация/диафильтрация и т.п. (см., например, публикации Cohn et al., J. Am. Chem. Soc. 68:459-75 (1946); Oncley et al., J. Am. Chem. Soc. 71:541-50 (1949); Barundern et al., Vox Sang. 7:157-74 (1962); Koblet et al., Vox Sang. 13:93-102 (1967); Teschner et al., Vox Sang (92):42-55 (2007); Hoppe et al., Munch Med Wochenschr (34): 1749-1752 (1967), Falksveden (Swedish Patent № 348942); Tanaka et al., Braz J Med Biol Res (33)37-30 (2000); Lebing et al., Vox Sang (84): 193-201 (2003); патенты US под №№ 5122373 и 5177194; PCT/US 2010/036470 и PCT/US 2011/038247; раскрытия которых включены в настоящий документ в качестве ссылки).

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

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

В целях снижения вирусной нагрузки композиции IgG, представленной в настоящем документе, композиция может подвергаться нанофильтрации с помощью подходящего устройства для нанофильтрации. В некоторых вариантах реализации устройство для нанофильтрации будет иметь средний размер пор в диапазоне от около 15 до около 200 нм. Примеры нанофильтров, подходящих для этой цели, вклю-

чают, без ограничения, DVD, DV 50, DV 20 (Pall), Viresolve NFP, Viresolve NFR (Millipore), Planova 15N, 20N, 35N и 75N (Planova). В конкретном варианте реализации наночастица может иметь средний размер пор в диапазоне от около 15 до около 72 нм, или в диапазоне от около 19 до около 35 нм, или составляющий около 15, 19, 35 или 72 нм. В предпочтительном варианте реализации наночастица будет иметь средний размер пор около 35 нм, как, например в фильтре Asahi PLANOVA 35N или аналогичном. В конкретном варианте реализации композицию IgG, извлеченную на этапе анионного обмена, подвергают наночастищению с использованием наночастицы, имеющего размер пор в диапазоне от 30 до 40 нм, предпочтительно 35±2 нм. В другом предпочтительном варианте реализации наночастица будет иметь средний размер пор около 19 или 20 нм, как, например, в фильтре Asahi PLANOVA 20N (19±2 нм) или аналогичном. В конкретном варианте реализации композицию IgG, извлеченную на этапе анионного обмена, подвергают наночастищению с использованием наночастицы, имеющего размер пор в диапазоне от 15 до 25 нм, предпочтительно 19±2 нм.

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

Для обогащения конкретного изотипа или подтипа иммуноглобулина могут быть использованы подготовительные этапы. Например, для того чтобы обогатить смесь иммуноглобулинами IgG или определенными подтипами IgG, может быть использована хроматография на сефарозе с белком А, белком G или белком H (см. в общих чертах публикации Harlow and Lane, *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999); Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); патент US № 5180810). Могут быть использованы также коммерческие источники поликлональных иммуноглобулинов. Такие источники включают, но не ограничиваются перечисленным: Kiovig® 10% ВВИГ (Baxter Healthcare); Gammagard Liquid® 10% ВВИГ (Baxter Healthcare); Gammagard S/D® (Baxter Healthcare); Gammagard S/D® с менее чем 1 мг/мл IgA в 5% растворе (Baxter Healthcare); Gamunex®-C, 10% (Grifols USA); Flebogamma®, 5 и 10% ДИФ (Grifols USA); Privigen® 10% раствор (CSL Behring); Carimune® NF или Sandoglobulin® (CSL Behring) и Hizentra® 20% Liquid (CSL Behring); Octagam®, 5 и 10% ВВИГ (Octapharma AG); Gammanorm® 16,5% ПКВИГ (Octapharma AG). Коммерческие источники препаратов иммуноглобулинов для использования в способах настоящего изобретения не являются крайне необходимыми.

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

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

ментов Fc от фрагментов Fab.

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

Фрагменты IgG могут быть также получены рекомбинантным способом, например из систем культур эукариотических клеток. Например, одноцепочечные Fv-фрагменты (scFv) могут быть получены рекомбинантным способом путем трансфекции клеток яичника китайского хомячка (CHO) вектором, содержащим последовательность ДНК, кодирующую Fv-фрагменты. Способы создания таких рекомбинантных клеток млекопитающих описаны, например, в публикациях Sambrook and Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3-е изд. (Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York) 2001) и Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 4-е изд. (John Wiley & Sons, Inc. (New York) 1999) и известны специалистам в данной области техники. Рекомбинантные фрагменты иммуноглобулина также могут быть получены в других клеточных линиях млекопитающих, таких как клетки почек детеныша хомяка (BHK). Способы культивирования рекомбинантных клеток для получения рекомбинантных белков также известны в данной области техники.

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

В некоторых вариантах реализации могут быть использованы дополнительные подготовительные этапы для того, чтобы сделать препарат иммуноглобулина безопасными для использования в способах согласно настоящему изобретению. Такие этапы могут включать, например, обработку растворителем/детергентом, пастеризацию и стерилизацию. Могут использоваться дополнительные подготовительные этапы для обеспечения безопасности препарата поликлональных IgG. Такие подготовительные этапы могут включать, например, ферментативный гидролиз, химическую модификацию с помощью восстановления и алкилирования, сульфирование, обработку В-пропиолактоном, обработку при низком уровне pH и т.п. Описания подходящих способов также могут быть найдены, например, в патентах US № 4608254; 4687664; 4814277; 5864016; 5639730 и 5770199; публикациях Romer et al., *Vox Sang.* 42:62-73 (1982); Romer et al., *Vox Sang.* 42:74-80 (1990) и Rutter, J. *Neurosurg. Psychiat.* 57 (доп.):2-5 (1994) (раскрытия которых включены в настоящий документ в качестве ссылки).

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

Поликлональные IgG настоящего изобретения могут быть использованы для системного введения для терапевтического лечения. Способы введения включают внутривенное введение. Точные индивидуальные дозировки, а также суточные дозы, конечно, будут определяться в соответствии со стандартными медицинскими принципами по указанию врача или ветеринара. Фактические уровни доз могут изменяться таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа у конкретного пациента, при этом не является токсичным для пациента. Врач может начинать с доз на меньших уровнях, чем требуется для достижения желаемого терапевтического эффекта, а затем постепенно увеличивать дозу до тех пор, пока не будет достигнут желаемый эффект. В общем, эффективные дозы изменяются в зависимости от многих различных факторов, в том числе от конкретного заболевания или состояния, подлежащего лечению, его тяжести, физиологического состояния пациента, введения других лекарственных средств, и от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим.

Интервалы между введением однократных доз могут быть ежедневными, еженедельными, раз в две

недели, каждые 3 недели, каждые 4 недели, ежемесячно или ежегодно. Интервалы также могут быть непостоянными, по показаниям в соответствии с измерением терапевтического прогресса у пациента. Дозировка и частота введения могут изменяться в зависимости от периода полувыведения антител у пациента.

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

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

Схема дозирования может изменяться в зависимости от периода полувыведения из циркуляции. Точные количества активного ингредиента, необходимые для введения, зависят от решения лечащего врача и являются индивидуальными для каждого пациента.

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

В альтернативных вариантах реализации композицию поликлональных IgG настоящего изобретения вводят субъекту еженедельно, один раз в две недели, каждые 3 недели, каждые 4 недели или ежемесячно в дозе от около 0,05 до 4,9 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 4,8 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 4,7 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 4,6 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 4,5 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 4,4 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 4,3 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 4,2 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 4,1 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 4,0 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 3,9 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 3,8 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 3,7 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 3,6 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 3,5 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 3,4 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 3,3 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 3,2 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 3,1 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 3,0 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 2,9 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 2,8 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 2,7 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 2,6 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 2,5 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 2,4 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 2,3 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 2,2 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 2,1 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 2,0 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 1,9 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 1,8 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 1,7 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 1,6 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 1,5 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 1,4 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 1,3 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 1,2 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 1,1 г/кг массы тела пациента, от около 0,05 до 1,0 г/кг массы тела пациента. Врачи, обладающие знаниями относительно заболеваний, подлежащих лечению препаратами IgG, могут определить соответствующую дозу для пациента в соответствии с критериями, известными в данной области техники.

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

Продолжительность лечения демиелинизирующей периферической нейропатии ВВИГ может варьироваться: она может быть короткой и составлять 3 или 6 месяцев или может продолжаться до 18 месяцев, 2, 5 или 10 лет. В некоторых случаях лечение ВВИГ может продолжаться весь остаток естественной



жизни пациента. Эффективность лечения ВВИГ может оцениваться в течение всего курса введения по истечении определенного периода времени, например каждые 3 месяца или каждые 6 месяцев для 18-месячного плана лечения. В других случаях эффективность может быть оценена каждые 9 или 12 месяцев для более длительного курса лечения. Схема введения (доза и частота) может быть скорректирована соответствующим образом для любого последующего введения.

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

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

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

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

#### VI. Комбинированная терапия.

В некоторых вариантах реализации поликлональные IgG могут быть введены субъекту в виде комбинированной терапии с другим лечением, например другим лечением демиелинизирующего расстройства. Например, комбинированная терапия может включать введение субъекту (например, пациенту-человеку) одного или более дополнительных средств, обеспечивающих терапевтический эффект субъекту, имеющему демиелинизирующее расстройство или риск его развития. В некоторых вариантах реализации поликлональные IgG и одно или больше дополнительных средств вводят одновременно. В других вариантах реализации поликлональные IgG вводят первыми по времени, а одно или больше дополнительных средств вводят вторыми по времени. В некоторых вариантах реализации одно или больше дополнительных средств вводят первыми по времени, а поликлональные IgG вводят вторыми по времени. Поликлональные IgG могут заменить или дополнить предшествующую или проводимую в настоящее время терапию. Например, при лечении поликлональными IgG введение одного или больше дополнительных средств может прекращаться или уменьшаться, например введение может осуществляться на более низких уровнях. В других вариантах реализации введение предыдущей терапии поддерживается. В некоторых вариантах реализации предыдущая терапия будет поддерживаться до тех пор, пока уровень поликлональных IgG не достигнет уровня, достаточного для обеспечения терапевтического эффекта. Два вида терапии могут быть введены в комбинации.

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

В одном варианте реализации человек, получающий первый вид терапии демиелинизирующего расстройства, которого затем лечат поликлональными IgG, продолжает получать первую терапию в том же или в уменьшенном количестве. В другом варианте реализации лечение первым видом терапии пере-



крывается по времени с лечением поликлональными IgG, но лечение первым видом терапии впоследствии прекращают.

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

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

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

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

Предпочтительные противовоспалительные средства, которые могут быть включены в полимерную матрицу для введения в способах настоящего изобретения, включают изониксин, амтолметин гуацил, проглуметацин, пикетопрофен, дифенамизол, эпризол, апазон, фепразон, моразон, фенилбутазон, пипебузон, пропифеназон, рамифеназон, тиазолинобутазон, аспирин, бенорилат, ацетилсалицилат кальция, этерсалат, имидазолсалицилат, лизинацетилсалицилат, морфолина салицилат, 1-нафтилсалицилат, фенилацетилсалицилат, ампиноксикам, дроксикам, S-аденозилметионин, амиксетин, бензидамин, буколом, дифенпирамид, эморфазон, гвайазулен, набуметон, нимесулид, проквазон, супероксиддисмутаза и тенидап.

Противовоспалительные средства, которые могут быть добавлены к полимеру для введения в способах настоящего изобретения, включают этофенамат, тальнифлумат, терофенамат, ацететацин, алклофенак, буфексамак, цинметацин, клопирак, фелбинак, фенклозовую кислоту, фентиазак, ибуфенак, индометацин, изофезолак, изоксепак, лоназолак, метиазиновую кислоту, мофезолак, оксаметацин, пипразолак, сулиндак, тиарамид, толметин, тропезин, зомепирак, бумадизон, бутибуфен, фенбуфен и ксенбуцин, клиданак, кеторолак, тиноридин, беноксaproфен, бермопрофен буклоксовую кислоту, фенпрофен, флуноксaproфен, флурбипрофен, ибупрофен, ибупроксам, индопрофен, кетопрофен, локсaproфен, напроксен, оксaproзин, пирпрофен, пранопрофен, продзиновую кислоту, супрофен, тиапрофеновую кислоту, залтопрофен, бензиперилон, мофебутазон, оксифенбутазон, суксibuзон, ацетаминосалол, парсалмид, фенилсалицилат, салацетамид, салицилсерную кислоту, изоксикан, пироксикам и теноксикам, эпсилон-ацетамидокапроновую кислоту, бендазак, альфа-бисаболл, паранилин, перизоксаль и зилеутон.

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

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

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

включены в полимерную матрицу. Предпочтительные средства, которые могут быть добавлены к полимеру, предпочтительно могут также быть включены в полимерную матрицу.

### Примеры

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

Пример 1. Исследование влияния ВВИГ на шванновские клетки.

Прямое влияние поликлональных иммуноглобулинов, полученных из сыворотки человека на гомеостаз, дифференциацию и созревание шванновских клеток, продемонстрированное с помощью различных молекулярных и клеточных переменных, исследовали с помощью трех моделей:

- 1) модель культивирования первичных шванновских клеток крысы;
- 2) модель шванновских клеток с супрессией p57kip2; и
- 3) совместное культивирование нейронов ПНС и миелинизирующих шванновских клеток.

#### 1.1. Подготовка модели 1 шванновских клеток крысы.

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

#### 1.2. Подготовка модели 2 шванновских клеток с супрессией p57kip2.

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

#### 1.3. Подготовка модели 3 совместной культуры нейронов ПНС и миелинизирующих шванновских клеток.

В этой модели были созданы совместные культуры миелинизирующих нейронов/ШК. Культуры были приготовлены из ганглиев заднего корешка эмбрионов крыс линии Вистар или мышей линии C57/BL6, содержащих как незрелые чувствительные нейроны, так и предшественников шванновских клеток ПНС. Это совместное культивирование имитирует ситуацию *in vivo* и предоставляет возможность изучения процесса окончательного обертывания/миелинизации и возможности влияния на это сложное взаимодействие введением иммуноглобулинов. Оптимизацию условий и подготовки совместной культуры выполняли в соответствии с установленными протоколами, используемыми в лаборатории изобретателей, или протоколом, опубликованным Räsänen et al. (2008) с некоторыми изменениями. Стимуляцию ВВИГ проводили параллельно для инициации процесса миелинизации с помощью диализированных препаратов ВВИГ/буфера. Диализ ВВИГ/буфера проводили против среды клеточной культуры без добавок. Все эксперименты проводили с одной концентрацией ВВИГ: 20 мг/мл. Продолжительность стимуляции определяли с помощью анализа кинетики миелинизации (образование междоузлия) через 3 и 6 дней после добавления диализированного ВВИГ/буфера.

#### 1.4. Морфология клеток.

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

#### 1.5. Смерть/пролиферация клеток.

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

клетках и, следовательно, используется в качестве маркера клеточной смерти. Клетки фиксировали после двух различных продолжительностей BrdU- импульса, 8 и 24 ч.

#### 1.6. Экспрессия генов.

Экспрессию генов анализировали в модели 1 (крысиные ШК в культуре - раздел 1.1) и модели 2 (ШК с супрессией p57kip2 - раздел 1.2), подвергнутых стимуляции вплоть до 9 дней для модели 1 и стимуляции до 7 дней (9 дней трансфекции) для модели 2 с применением как недиализированных и диализированных препаратов ВВИГ/буфера. Диализированные препараты SYNAGIS использовали в качестве контроля IgG1 на наивных ШК (модель 1). Диализ ВВИГ/буфера/SYNAGIS проводили против среды клеточной культуры без добавок. Все эксперименты проводили с одной концентрацией ВВИГ: 20 мг/мл. Транскрипцию генов миелина (P<sub>0</sub>, MBP) и Fc рецепторов (CD64, CD32 и CD16) измеряли с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени.

Пример 2. Реакции шванновских клеток на инкубирование с ВВИГ.

#### 2.1. Морфология.

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

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

#### 2.2. Смерть/пролиферация клеток (модель 1).

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

#### 2.3. Экспрессия генов.

Стимуляция не трансфицированных ШК (модель 1) недиализированными и диализированными препаратами ВВИГ/буфер привела к небольшой положительной регуляции P<sub>0</sub> и сильной положительной регуляции MBP генов в течение первых 3 дней обработки, но не после длительной инкубации. Стимуляция клеток с супрессией p57kip2 (модель 2) недиализированными и диализированными препаратами ВВИГ/буфер также привела к аналогичным результатам в отношении экспрессии генов миелина. Экспрессия и положительная регуляция обоих генов миелина были значительно сильнее в клетках с супрессией p57kip2 по сравнению с контрольными трансфицированными клетками. Наблюдения за генной регуляцией Fc рецепторов показали, что шванновские клетки экспрессируют CD64 и CD32, и что продолжительная супрессия p57kip2 приводит к значительной положительной регуляции этих генов. В незрелых ШК существовал определяемый уровень экспрессии Fc рецептора CD64. В дифференцирующихся шванновских клетках (при супрессии внутреннего ингибитора p57kip2) уровни CD64 значительно повышались со стимуляцией ВВИГ.

Важно отметить, что контроли моноклонального IgG1 (синагис, авастин и герцептин) не продемонстрировали существенного влияния на экспрессию генов миелина. Стимуляция клеток с супрессией p57kip2 (модель 2) недиализированными и диализированными препаратами ВВИГ/буфер индуцировала экспрессию генов миелина в такой же степени. Снова экспрессия MBP сильно индуцировалась при стимуляции ВВИГ, тогда как экспрессия P<sub>0</sub> индуцировалась обработкой умеренно. Обратите внимание, что индукцию гена миелина можно было наблюдать в течение семидневного периода стимуляции, и поэтому она не ограничивается ранними этапами. Кроме того, было обнаружено, что экспрессия гена p57kip2 кодирует внутренний ингибитор дифференциации шванновских клеток и была значительно снижена в контрольных трансфицированных (недифференцирующихся) клетках.

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

паратами ВВИГ.

#### 2.4. Краткое изложение данных.

В первые 18 месяцев исследования было обнаружено, что первичные ШК реагируют на инкубацию с ВВИГ изменением морфологии клеток, что сопровождается ускоренным ростом клеточных выступов на ранних стадиях процесса дифференциации. Было также обнаружено, что инкубация с ВВИГ приводит к снижению пролиферации шванновских клеток, не влияя на выживаемость клеток. Более того, экспрессию двух основных генов миелина,  $P_0$  и MBP индуцировали в незрелых, а также в дифференцирующихся ШК после стимуляции ВВИГ. Данные демонстрируют, что первичные шванновские клетки крысы экспрессировали Fc рецептор CD64 и что в дифференцирующихся шванновских клетках (при супрессии внутреннего ингибитора p57kip2) уровни CD64 значительно повышались при воздействии ВВИГ. Данные также предоставляют убедительные свидетельства положительной регуляции Fc рецепторов (в частности CD64) в дифференцирующихся ШК. Кроме того, было продемонстрировано специфическое связывание человеческих ВВИГ на поверхности шванновских клеток. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что ШК могут демонстрировать иммунную компетентность. Пониженная скорость пролиферации без признаков апоптоза, а также индукция генов миелина в сочетании с ускоренным ростом клеточных выступов позволяют предположить стимулирование процесса дифференциации в незрелых ШК посредством ВВИГ. Это были первые результаты *in vitro*, демонстрирующие, что шванновские клетки способны не только реагировать на иммуноглобулины, но и специфически связываться с ними, и что стимуляция ВВИГ может стимулировать созревание предшественников шванновских клеток.

#### Пример 3. Экспрессия генов.

Для дополнительного исследования ВВИГ-зависимых эффектов на экспрессию генов дифференцирующихся (клетки с супрессией p57kip2, модель 2) и недифференцирующихся (контрольные супрессированные клетки, модель 2) шванновских клеток авторы настоящего изобретения собрали 16 образцов РНК из 4 независимых экспериментов для анализа GeneChip Array (выполняется согласно Miltenyi Biotec, Германия). Проверку образца проводили путем определения уровней экспрессии генов MBP,  $P_0$ , p57kip2 и CD64.

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

Таблица 1  
Сравнение недифференцирующихся шванновских клеток  $\pm$ ВВИГ

Гены с положительной регуляцией после обработки (название геновой последовательности)	Гены с отрицательной регуляцией после обработки (название геновой последовательности)
Tytr1	RGD1562551
Tytr1	Ctnna2
Col24a1	Olr832
Fat3	Phgr1
Tmem72	RGD1566220
Tesc	Nedd9
Il18	Slc12a3
Mt1a	Arhgef9
Slc40a1	Gckr
Asgr1	TC636329
LOC678704	A_64_P023581
TC609365	Ptprr
Bcl6b	Olr749
A_64_P063062	Nebi
Npas2	RGD1562545
Gpx2	Hes5
Matn1	Mpzl2
A_64_P022503	Ezr
Fbxo32	Cryab
Pls1	Fcgr2b
A_64_P094596	
A_64_P025678	
Olig1	
Sox2	
Plp1	

Таблица 2  
Сравнение дифференцирующихся шванновских клеток  $\pm$ ВВИГ

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

Для того чтобы подтвердить наблюдаемую индукцию экспрессии генов миелина (в частности, P<sub>0</sub> и MBP) на уровне белка, авторы настоящего исследования провели вестерн-блот анализ клеток с супрессией p57kip2 в сравнении с контрольными супрессированными клетками (модель 2) после обработки диализованным ВВИГ/буфером. Авторы смогли продемонстрировать, что уровни белка P<sub>0</sub> и в меньшей степени MBP в дифференцирующихся шванновских клетках после обработки ВВИГ были увеличены.

Пример 4. Связанные с иммунной системой белки.

Было важно подтвердить прямое связывание иммуноглобулина с поверхностью шванновских клеток. Применение антител к Fab-специфическим F(ab)<sub>2</sub> человека и антител к Fc $\gamma$ -специфическим F(ab)<sub>2</sub> человека показало, что иммуноглобулины человека в ВВИГ специфически связывается с поверхностью шванновских клеток. Живые шванновские клетки в культуре стимулировали посредством ВВИГ, промывали, фиксировали, а затем отдельно окрашивали против фрагментов Fab человека, фрагментов Fc $\gamma$  человека или против обоих эпитопов в комбинации двойного окрашивания. Специфическое связывание с поверхностью может быть локализовано в перинуклеарной области клеток. Эти исследования связывания проводились с наивными шванновскими клетками (модель 1) с применением ВВИГ и контролей IgG1 (авастин и герцептин), а также с дифференцирующимися шванновскими клетками (модель 2) с применением ВВИГ. Для решения вопроса о том, экспрессируется ли на поверхности шванновских клеток также белок рецептора CD64, были начаты эксперименты окрашивания двумя антителами к CD64. Для определения того, экспрессируется ли на поверхности шванновских клеток также белок рецептора CD64, были выполнены эксперименты окрашивания двумя антителами к CD64. Оказалось, что одно антитело к CD64 специфически связывается с рецептором CD64 крысы на шванновских клетках, и диффузное окрашивание рецептора распределялось по клеточной поверхности недифференцирующихся клеток. Для сравнения окрашивание рецептора на дифференцирующихся клетках концентрировалось в клеточной соме выше перинуклеарной области. Обнаруженные CD64 сигналы не совпадают с сигналами связывания ВВИГ (сравнение иммунологических окрашиваний).

Пример 5. Образование междоузлия.

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

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

Пример 6. Концепция восстановления нервов *in vivo*.

6.1. Краткое описание.

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

(и.п. инъекции). Нервам предоставляли возможность регенерации в течение еще трех месяцев, до тех пор пока животных не умерщвляли.

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

## 6.2. Способы.

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

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

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

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

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

## 6.3. Результаты.

Для того чтобы исследовать степень восстановления функции целевых органов после лигирования концов нервов был проведен еженедельный набор функциональных тестов. Чувствительную функцию оценивали с помощью теста реакции отдергивания пальцев 4 и 5 после применения болевых стимулов (тест щипка пинцетом). Мышечную силу и регенерацию мышечных волокон проанализировали с помощью теста с разведением лап. Эти два функциональных теста, а также наблюдение за массой животных (параметр здоровья и благополучия) выполняли еженедельно. Животных дополнительно подвергали еженедельному наблюдению следов и дорожек ходьбы (т.е. "анализу дефиле"), чтобы оценить функциональное восстановление седалищных нервов.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Использование конъюгированного с Су3 антитела против человеческого антитела Fab продемонстрировало специфическое связывание ВВИГ с поверхностью шванновских клеток. Остается показать, происходит ли это за счет взаимодействия с Fc рецептором CD64 или же специфические эпитопы шванновских клеток распознаются благодаря Fab-опосредованному связыванию. Для этой цели шванновские клетки (модель 1) либо контактируют с фракциями Fc и F(ab)<sub>2</sub> переваренного папаина ВВИГ, или связанные ВВИГ на шванновских клетках подвергают перевариванию папаином *in situ*. Кроме того, применение FITC-конъюгированного антитела против человеческого Fc в комбинации с Су3 конъюгированным антителом против человеческого Fab, как ожидается, приведет к папаин-чувствительным окрашиваниям. Два антитела к CD64 применяют к недифференцирующимся и дифференцирующимся (модель 2) шванновским клеткам для того, чтобы определить, экспрессируется ли CD64 на поверхности шванновских клеток также как рецепторный белок. В случае, если связывание ВВИГ действительно опосредуется через этот Fc рецептор, ожидается, что CD64 сигналы совпадают с ВВИГ связыванием (иммунологические окрашивания). В дополнение с этой целью исследуют, может ли увеличение уровней белка CD64 наблюдаться как следствие процесса дифференциации (вестерн-блот).

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

Стандартные условия культивирования шванновских клеток (поддержка и дифференциация) отличаются высокими концентрациями эмбриональной телячьей сыворотки (до 10% от объема). Поэтому возможно, что иммуноглобулины, присутствующие в сыворотке, уменьшают ВВИГ-зависимые реакции шванновских клеток. Чтобы проверить это, сывороточную концентрацию снижают до нижнего предела, необходимого для того, чтобы обеспечить клеточное выживание и дифференциацию шванновских клеток, стимулированных ВВИГ, и измеряют уровни экспрессии МВР (модели 1 и 2), а также морфологические параметры (модель 2). Недавние исследования авторов настоящего изобретения показали, что дифференциация шванновских клеток в решающей степени зависит от метилтрансферазы гистонов, усилителя *zeste* гомолога 2 (*EZH2*; Heinen et al., в пересмотре). После супрессии активности *EZH2* культивируемые шванновские клетки демонстрируют реакции дедифференциации, подобные тем, которые наблюдаются при патологии нервов. В рамках будущих исследований такие дедифференцирующие шванновские клетки будут стимулировать ВВИГ, чтобы определить экспрессию маркера шванновских клеток и генов миелина. Последние из которых, как было продемонстрировано, отрицательно регулируются ниже контрольных уровней. Будет интересно увидеть, способно ли лечение иммуноглобулинами не только стимулировать реакции дифференциации/созревания (как это видно в модели 2; т.е. при супрессии ингибиторного гена *p57kip2*), но также влиять на процессы дедифференциации (например, нормализацию уровней экспрессии генов миелина).

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

### Ссылки на публикации

- Amson, Y., Shoenfeld, Y., Amital, H. (2009). Intravenous immunoglobulin therapy for autoimmune diseases. *Autoimmunity* 42(6), 553-60.
- Asakura, K., Miller, D.J., Pease, L.R. and Rodriguez, M. (1998). Targeting of IgM kappa antibodies to oligodendrocytes promotes CNS remyelination. *J. Neurosci.* 18, 7700-7708.
- Bhatheja, K. and Field, J. (2006). Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38(12):1995-9.
- Bieber, A., Asakura, K., Warrington, A., Kaveri, S.V., and Rodriguez, M. (2000). Antibody-mediated remyelination: relevance to multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 6 Suppl 2, S1-S5.
- Bieber, A.J., Warrington, A., Asakura, K., Ciric, B., Kaveri, S.V., Pease, L.R., and Rodriguez, M. (2002). Human antibodies accelerate the rate of remyelination following lysocitichin-induced demyelination in mice. *Glia* 37, 241-249.
- Burstyn-Cohen, T., Frumkin, A., Xu, Y. T., Scherer, S. S., and Klar, A. (1998). Accumulation of F-spondin in injured peripheral nerve promotes the outgrowth of sensory axons. *J. Neurosci.* 18(21), 8875-8885.
- Fu, S.Y. and Gordon, T. (1995a). Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: Prolonged axotomy. *J. Neurosci.* 15(5), 3876-3885.
- Fu, S.Y. and Gordon, T. (1995b). Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: Prolonged denervation. *J. Neurosci.* 15(5), 3886-3895.
- Heinen, A., Kremer, D., Hartung, H.P., and Küry P. (2008a). *p57(kip2)*'s role beyond Schwann cell cycle control. *Cell Cycle* 7, 2781-2786.
- Heinen, A., Kremer, D., Göttele, P., Kruse, F., Hasse, B., Lehmann, H., Hartung, H.P., and Küry, P. (2008b). The cyclin-dependent kinase inhibitor *p57kip2* is a negative regulator of Schwann cell differentiation and in vitro myelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 8748-8753.
- Küry, P., Greiner-Petter, R., Cornely, C., Jürgens, T. and Müller, H.W. (2002). Mammalian *Achaete Scute Homolog 2* Is Expressed in the Adult Sciatic Nerve and Regulates the Expression of *Krox24*, *Mob-1*, *CXCR4*, and *p57kip2* in Schwann Cells. *J. Neurosci.* 22, 7586-7595.
- Lin, H.H., Spies, J.M., Lu, J.L. and Pollard, J.D. (2007). Effective treatment of experimental autoimmune neuritis with human immunoglobulin. *J. Neurol Sci.* 256:61-7.
- Nakahara, J., Seiva, C., Shibuya, A., Aiso, S. and Asou, H. (2003). Expression of Fc receptor for immunoglobulin M in oligodendrocytes and myelin of mouse central nervous system. *Neurosci. Lett.* 337, 73-76.
- Negi, V. S., Elluru, S., Siberil, S. Graff-Dubois, S., Mouthon, L., Kazatchkine, M.D., Lacroix-Desmazes, S., Bayry, J. and Kaveri, S.V. (2007). Intravenous immunoglobulin: an update on the clinical use and mechanisms of action. *J. Clin. Immunol.* 27:233.
- Paiväläinen, S., Nissinen, M., Honkanen, H., Lahti, O., Kangas, S.M., Peltonen, J., Peltonen, S. and Heapea, A.M. (2008). Myelination in mouse dorsal root ganglion/Schwann cell cocultures. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 568-578.
- Handbook of Developmental Neurotoxicology* eds. Slikker et al. (1998), Academic Press, San Diego.
- Vargas, M.E., Watanabe, J., Singh, S.J., Robinson, W.H. and Barres, B.A. (2010). Endogenous antibodies promote rapid myelin clearance and effective axon regeneration after nerve injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107 (26), 11993-11998.
- Warrington, A.E., Bieber, A.J., Ciric, B., Pease, L.R., Van, K., V. and Rodriguez, M. (2007). A recombinant human IgM promotes myelin repair after a single, very low dose. *J. Neurosci. Res.* 85, 967-976.

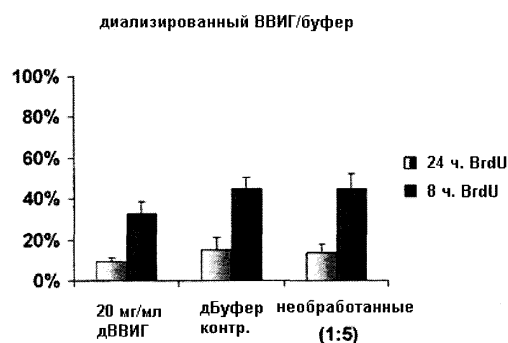


## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

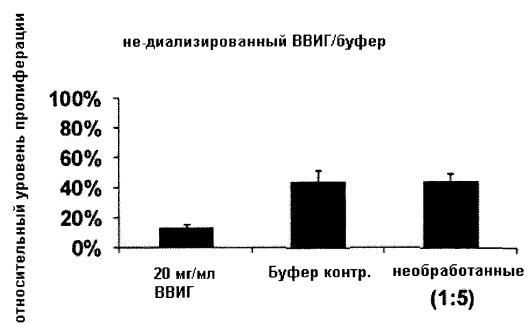
1. Способ лечения демиелинизирующей периферической нейропатии, вызванной травмой, включающий внутривенное введение поликлональных IgG млекопитающему в дозе от около 0,05 до 5 г на 1 кг массы тела, где поликлональные IgG получены из пула человеческой сыворотки.
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что млекопитающее является человеком.
3. Способ по любому из пп.1 и 2, отличающийся тем, что совместно с поликлональными IgG млекопитающему вводят противовоспалительное средство.
4. Способ по п.3, отличающийся тем, что противовоспалительное средство представляет собой аденокортикотропный гормон, кортикостероид, интерферон, глатирамера ацетат или нестероидное противовоспалительное лекарственное средство.
5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что поликлональные IgG вводят еженедельно.
6. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что поликлональные IgG вводят раз в две недели.
7. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что поликлональные IgG вводят один раз в месяц.
8. Способ по п.1, отличающийся тем, что поликлональные IgG вводят млекопитающему в дозе от около 0,5 до 2 г на 1 кг массы тела.
9. Способ лечения демиелинизирующей периферической нейропатии, вызванной травмой, у млекопитающего, включающий трансплантацию нервных клеток в место повреждения периферического нерва, вызванного травмой; введение в место повреждения периферического нерва, вызванного травмой, композиции, содержащей шванновские клетки, и внутривенное введение поликлональных IgG в дозе от около 0,05 до 5 г на 1 кг массы тела, где поликлональные IgG получены из пула человеческой сыворотки.
10. Способ по п.9, отличающийся тем, что млекопитающее является человеком.



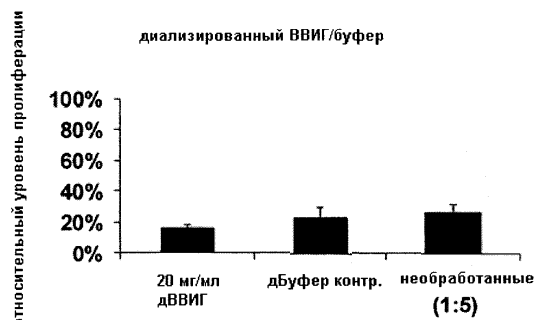
Фиг. 1А



Фиг. 1В

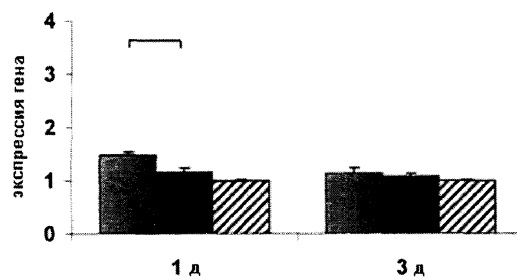


Фиг. 2А



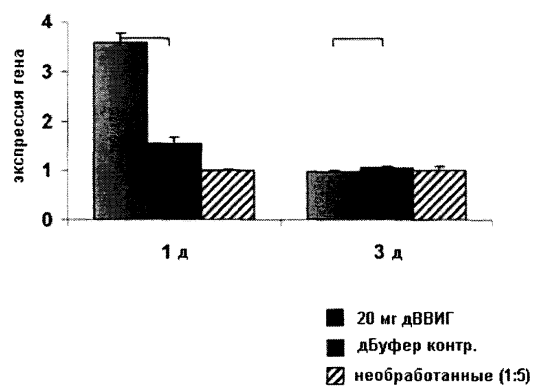
Фиг. 2В

P0



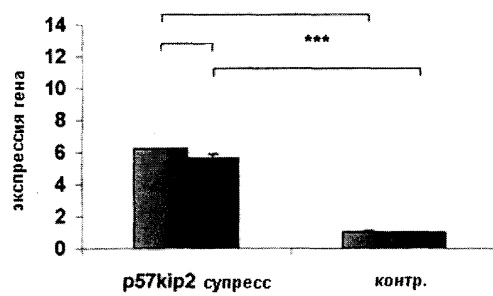
Фиг. 3А

МВР



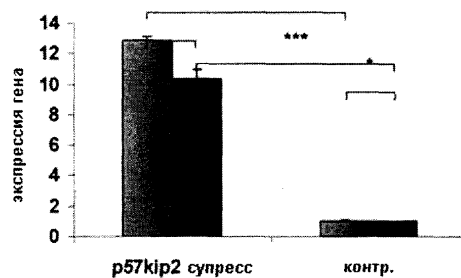
Фиг. 3В

P0



Фиг. 4А

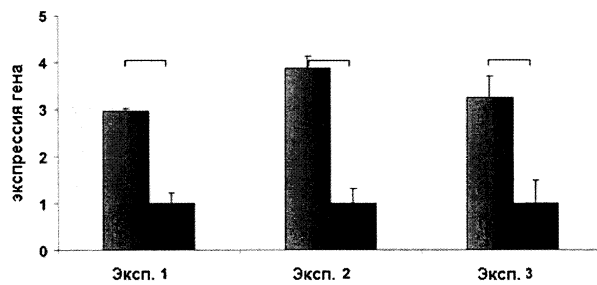
МВР



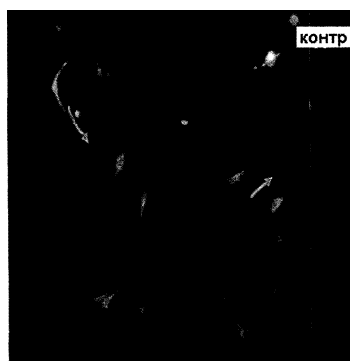
■ 20 мг дВВИГ  
 ■ дбуфер контр

Фиг. 4В

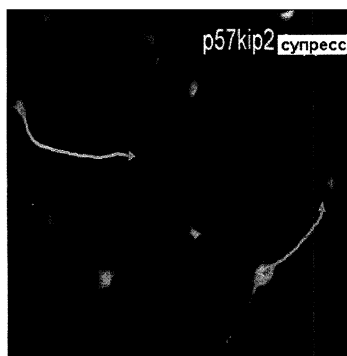
Fc рецептор CD64



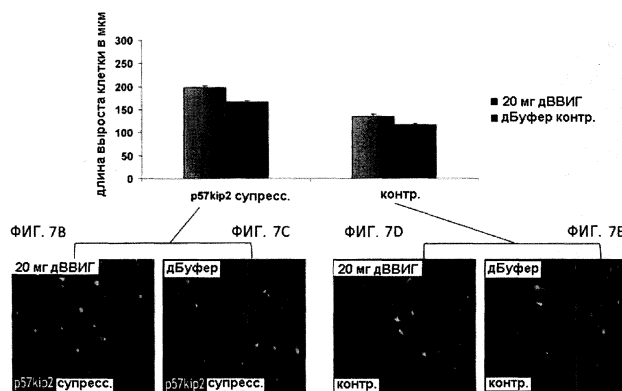
Фиг. 5



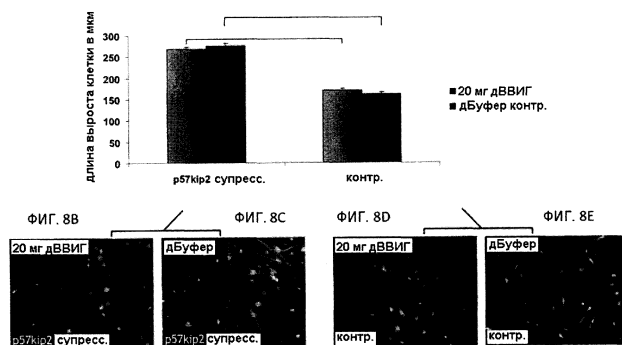
Фиг. 6А



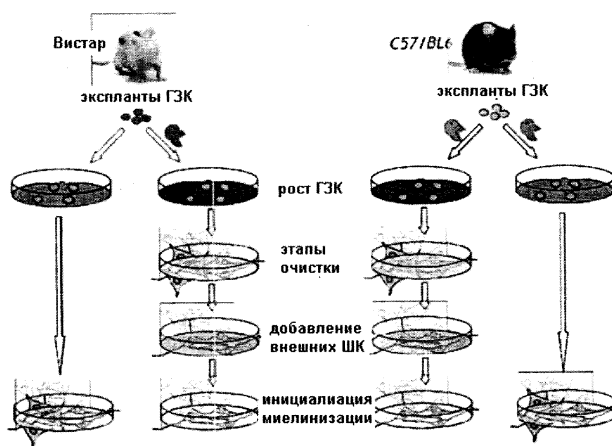
Фиг. 6В



Фиг. 7А



Фиг. 8А



Фиг. 9

