

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035336**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.05.29

(21) Номер заявки
201690969

(22) Дата подачи заявки
2014.12.05

(51) Int. Cl. **A61K 35/44** (2015.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ СВЯЗАННОГО СО СТАРЕНИЕМ КОГНИТИВНОГО
РАССТРОЙСТВА ИЛИ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

(31) **61/913,812; 62/069,044**

(32) **2013.12.09; 2014.10.27**

(33) **US**

(43) **2016.09.30**

(86) **PCT/US2014/068897**

(87) **WO 2015/088915 2015.06.18**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЗЕ БОАРД ОФ ТРАСТИЗ ОФ
ЗЕ ЛЕЛАНД СТЭНФОРД
ДЖУНИОР ЮНИВЕРСИТИ; Ю. С.
ГОВЕРНМЕНТ ЭЗ РЕПРЕЗЕНТИД
БАЙ ЗЕ ДЕПАРТМЕНТ ОФ
ВЕТЕРАНС ЭФФЭЙРС (US)**

(56) THOMSON et al., "Young blood for a keener mind" NewScientist, 2012, Vol. 216, Issue. 2887, page 10. See the whole document
WO-A1-2013142135
US-A1-20060198851
US-A1-20100324079
VILLEDA et al., "Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice" Nature Medicine, June 2014, Vol. 20, No. 6, pp. 659-663

(72) Изобретатель:
**Вилледа Саул А., Ангст Мартин С.,
Луо Цзян, Уисс-Корай Антон,
Кастеллано Джозеф М., Мидделдорп
Джинте (US)**

(74) Представитель:
**Лыу Т.Н., Угрюмов В.М., Гизатуллина
Е.М., Глухарёва А.О., Дементьев
В.Н., Карпенко О.Ю., Клюкин В.А.,
Строкова О.В., Христофоров А.А.
(RU)**

(57) Описан способ лечения связанного со старением когнитивного расстройства или заболевания у субъекта. Способ по изобретению включает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества продукта, содержащего молодую плазму крови, полученную от донора или доноров, которые имеют возраст 40 лет или менее, при этом из указанной молодой плазмы крови удалены белки, имеющие среднюю молекулярную массу ниже 3,5 кДа. Также описаны набор для использования в указанном способе, способ получения молодой плазмы крови и применение продукта, содержащего молодую плазму крови, для лечения связанного со старением когнитивного расстройства или заболевания.

035336
B1

035336
B1

Ссылка на родственные заявки

В соответствии с 35 U.S.C. § 119(e) данная заявка испрашивает приоритет по дате подачи предварительной заявки на патент США 62/069044, поданной 27 октября 2014 г., и предварительной заявки на патент США 61/913812, поданной 9 декабря 2013 г., которые приведены здесь в качестве ссылок.

Уровень техники

Старение организма сопровождается накоплением изменений с течением времени. В плане нервной системы старение сопровождается структурными и нейрофизиологическими изменениями, которые вызывают снижение когнитивной функции и подверженность дегенеративным расстройствам у здоровых субъектов (Heeden, T. & Gabrieli, J.D., Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.* 5(2), 87-96 (2004); Raz, N. et al. Neuroanatomical correlates of cognitive aging: evidence from structural magnetic resonance imaging. *Neuropsychology* 12(1), 95-114 (1998); Mattson, M.P. & Magnus, T., Ageing and neuronal vulnerability. *Nat. Rev. Neurosci.* 7(4), 278-294 (2006); Rapp, P.R. & Heindel, W.C., Memory systems in normal and pathological aging. *Curr. Opin. Neurol.* 7(4), 294-298 (1994)). Данные изменения включают утрату синапсов, вызывающую ухудшение функции нейронов. Таким образом, несмотря на то, что в процессе естественного старения обширная гибель нейронов не наблюдается, нейроны в стареющем мозге являются уязвимыми в плане сублетальных связанных со старением изменений структуры, синаптической связности и молекулярного процессинга в синапсе, все из которых ухудшают когнитивную функцию.

Помимо естественной утраты синапсов в рамках естественного старения, утрата синапсов представляет собой раннее патологическое событие, присущее множеству нейродегенеративных состояний, и является самым явным признаком нейронных и когнитивных нарушений, связанных с данными состояниями. Действительно, старение остается наиболее доминантным фактором риска в плане связанных с деменцией нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера (БА) (Bishop, N.A., Lu, T., & Yankner, B.A., Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature* 464(7288), 529-535 (2010); Heeden, T. & Gabrieli, J.D., Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.* 5(2), 87-96 (2004); Mattson, M.P. & Magnus, T., Ageing and neuronal vulnerability. *Nat. Rev. Neurosci.* 7(4), 278-294 (2006)).

С увеличением продолжительности жизни человека все большая доля населения страдает связанными со старением когнитивными нарушениями, что делает критически важным поиск путей сохранения когнитивной функции путем защиты или даже противодействия эффектам старения (Hebert, L.E. et al. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch. Neurol.* 60(8), 1119-1122 (2003); Bishop, N.A., et al., Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature* 464(7288), 529-535 (2010)).

Сущность изобретения

Изобретение относится к способу лечения связанного со старением когнитивного расстройства или заболевания у субъекта. Аспекты способа включают введение продукта, содержащего молодую плазму крови, нуждающемуся в этом субъекту, например субъекту, страдающему или имеющему риск развития связанного со старением расстройства или заболевания. Более конкретно, согласно первому варианту осуществления изобретения способ лечения связанного со старением когнитивного расстройства или заболевания у субъекта включает введение субъекту эффективного количества продукта, содержащего молодую плазму крови, полученную от донора или доноров, которые имеют возраст 40 лет или менее, при этом из указанной молодой плазмы крови удалены белки, имеющие среднюю молекулярную массу ниже 3,5 кДа.

Согласно одному аспекту указанного варианта осуществления настоящего изобретения продукт, содержащий молодую плазму крови, не включает эритроциты и/или лейкоциты.

Согласно еще одному аспекту указанного варианта осуществления настоящего изобретения продукт, содержащий молодую плазму крови, является ацеллюлярным.

Согласно еще одному аспекту указанного варианта осуществления настоящего изобретения связанное со старением когнитивное расстройство выбрано из группы, состоящей из трудности концентрации внимания, трудности обучения сложным задачам и концепциям; снижение памяти; снижение скорости обработки информации; трудности восприятия пространственного соотношения между объектами; трудности продуцирования и понимания языка; беглости речи; трудности решения проблем и принятия решений.

Согласно еще одному аспекту указанного варианта осуществления настоящего изобретения полученная плазма получена из пуповины.

Согласно еще одному аспекту указанного варианта осуществления настоящего изобретения содержащий молодую плазму продукт не включает белки, имеющие среднюю молекулярную массу 25 кДа или менее.

Согласно другому аспекту указанного варианта осуществления настоящего изобретения содержащий молодую плазму продукт не включает белки, имеющие среднюю молекулярную массу 50 кДа или менее.

Согласно еще одному аспекту указанного варианта осуществления настоящего изобретения содер-

жащий молодую плазму продукт не включает IgG.

Согласно еще одному аспекту указанного варианта осуществления настоящего изобретения связанное со старением когнитивное расстройство представляет собой гиппокамп-опосредованное связанное со старением когнитивное расстройство.

Согласно еще одному аспекту указанного варианта осуществления настоящего изобретения связанное со старением заболевание или расстройство представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, лобно-височную деменцию, боковой амиотрофический склероз, рассеянный склероз, глаукому, миотоническую дистрофию, прогрессирующий надъядерный паралич, спинальную мышечную атрофию, системную атрофию, атаксию, сосудистую деменцию или иные виды деменции.

Согласно еще одному аспекту указанного варианта осуществления настоящего изобретения субъект представляет собой человека.

Изобретение также относится к набору для использования в вышеуказанном способе, причем набор содержит два или более контейнера, каждый из которых включает продукт, содержащий молодую плазму крови; и информацию, включающую данные о возрасте донора молодой плазмы крови.

Настоящее изобретение также относится к способу получения молодой плазмы крови для использования в вышеуказанном способе, при этом способ включает удаление белков, имеющих среднюю молекулярную массу ниже 3,5 кДа, из молодой плазмы крови, полученной от донора или доноров, которые имеют возраст 40 лет или менее.

Наконец, настоящее изобретение относится к применению продукта, содержащего молодую плазму крови, для лечения связанного со старением когнитивного расстройства или заболевания у субъекта, где плазма получена, как указано выше.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Геномный анализ гетерохронных парабионтов с применением микрочипов позволяет идентифицировать связанный с пластичностью профиль экспрессии в старом гиппокампе. Анализ с применением микрочипов проводили на гиппокампе старых (возрастом 18 месяцев) изохронных и гетерохронных парабионтов спустя 5 недель после операции. N=4 мышей на группу. Для всех анализов подвергнутые даун-регуляции гены показаны в виде оттенков синего цвета, а подвергнутые ап-регуляции гены показаны в виде оттенков желтого цвета; а - схематическое изображение парабиотических пар. Изохронные пары показаны серым цветом, а гетерохронные пары показаны красным цветом; b - тепловая карта была получена с помощью неконтролируемой иерархической кластеризации с набором данных по генам, дифференциально экспрессируемым в гиппокампах старых изохронных и гетерохронных парабионтов, с использованием порогового значения $p < 0,01$ и d-значения > 2 на основе анализа значимости микрочипов (Significance Analysis of Microarrays, SAM); c - иерархическая кластеризация связанных с синаптической пластичностью генов, идентифицированных с помощью AmiGO (Gene Ontology) с использованием порогового значения $p < 0,01$ и d-значения $> 1,5$ на основе SAM. Цветные столбцы в b и c показывают Z-значения; d - биологические маршруты, связанные с синаптической пластичностью, были идентифицированы в качестве части высшей сигнальной сети ($p < 0,05$) с применением программного обеспечения Ingenuity Pathway Analysis (IPA) на основе генов, дифференциально экспрессируемых у изохронных и гетерохронных парабионтов. Предполагаемые молекулярные взаимодействия, идентифицированные с помощью IPA, показаны серым цветом.

Фиг. 2. Гетерохронный парабиоз стимулирует образование синапсов и синаптическую пластичность в стареющем мозге, a-g - гистологический и электрофизиологический анализ, проведенный на старых (возрастом 18 недель) изохронных и гетерохронных парабионтах, подвергнутых анализу спустя 5 недель после операции. N=5-6 мышей на группу; a - иммуногистохимическое детектирование Egr1, cFos и фосфорилированного циклического связывающегося с цАМФ-зависимым элементом белка (CREB) в DG (зубчатой извилине) гиппокампа старых изохронных и гетерохронных парабионтов. Стрелки изображают отдельные клетки (шкала масштаба: 100 мкм); b-d - количественный анализ на основе окрашивания с использованием иммунной метки Egr1 (b), c-Fos (c) и фосфорилированного CREB (d). Анализировали 5 секций на одну мышь; e, f - репрезентативное изображение окрашивания по методу Гольджи (e) и количественный анализ плотности дендритных шипиков на третичных ветвях (f). Анализировали 5 нейронов на одну мышь; g - амплитуда популяционного спайка (PSA) в DG старых парабионтов. Показаны репрезентативные уровни долговременной потенциации (LTP) для изохронных и гетерохронных парабионтов. Данные показаны в виде среднее \pm SEM (стандартная ошибка среднего); * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; t-критерий (b-d).

Фиг. 3. Введение молодой крови улучшает зависящие от гиппокампа результаты обучения и память у старых мышей; a-c - старых (возрастом 18 месяцев) мышей подвергали когнитивному тестированию после лечения молодой (возрастом 3 месяца) или старой (возрастом 18 месяцев) плазмой 8 раз в течение 24 дней (100 мкл/внутривенная инъекция). N=8 мышей на группу; a - схематическое изображение хронологического порядка, примененного для лечения плазмой и когнитивного тестирования. b, c - результаты зависящего от гиппокампа обучения и памяти анализировали с помощью способа на основе контекстно-зависимого страха (b) и радиального лабиринта с водой (RAWM) (c) с последующим лечением плазмой;

b - время замирания спустя 24 ч после тренировки в процентах; c - количество неправильно выбранных входов перед нахождением платформы. Данные показаны в виде: среднее \pm SEM; *P<0,05; **P<0,01; t-критерий (b), ANOVA, апостериорный анализ Бонферрони (c).

Фиг. 4. Изохронный парабиоз не изменяет экспрессию маркеров синаптической пластичности. Гистологический анализ маркеров синаптической пластичности был осуществлен на DG гиппокампа старых (возрастом 18 месяцев) изохронных парабионтов и неспаренных контролей одинакового возраста. N=5-6 мышей на группу; a-c - количественный анализ на основе окрашивания с использованием иммунной метки Egr1 (b), c-Fos (c) и фосфорилированного CREB (d). Анализировали 5 секций на одну мышшь. Столбцы означают среднее + SEM; n.s. - несущественный; t-критерий.

Фиг. 5. Гетерохронный парабиоз не изменяет дендритную комплексность или базальную синаптическую трансмиссию; a-c - анализ на основе метода Гольджи проводили с применением программного обеспечения NeuroLucida (v10, MBF Bioscience) на 5 нейронах на одну мышшь (возрастом 18 месяцев), общее количество составило 25 нейронов. N=5 на группу; a - результаты анализа по методу Шолла наносили на график в виде среднего количества пересечений в пересчете на одну оболочку на один нейрон против расстояния от сомы; b, c - нейронные трассировки применяли для количественного анализа среднего количества первичных, вторичных и третичных дендритных ветвей (b) и общей длины дендритов (c), d - кривые типа вход-выход свидетельствуют об отсутствии статистических различий в синаптической силе, ключевом параметре базальной синаптической трансмиссии, между старыми изохронными и гетерохронными парабионтами. Столбцы означают среднее + SEM; n.s. - несущественный; t-критерий.

Фиг. 6. Результаты зависящего от гиппокампа обучения и памяти ухудшаются у старых мышей; a-e - результаты обучения и память оценивали при естественном старении у молодых (возрастом 3 месяцев) по сравнению со старыми (возрастом 18 месяцев) взрослыми животными с применением способов на основе контекстно-зависимого страха (a-c) и RAWM (d-e); a - молодые и старые животные демонстрировали аналогичное базисное время замирания при тренировке на основе контекстно-зависимого страха; b - при подвергании контекстно-зависимому страху старые мыши демонстрировали пониженное время замирания при тестировании контекстной памяти; c - различия в плане вызываемой внешним стимулом памяти спустя 24 ч после тренировки не были определены; e - старая мышшь демонстрирует нарушенное обучение и память при нахождении платформы на фазе тестирования задачи RAWM. Когнитивные нарушения подвергали количественному анализу в виде количества неправильно выбранных рукавов перед нахождением искомой платформы. Различия в скорости плавания между молодыми и старыми животными не были определены. Данные получены для 8 животных на одну группу. Столбцы означают среднее + SEM; n.s. - несущественный; t-критерий.

Фиг. 7. Подвергание действию молодой крови не оказывает влияния на связанную с внешним стимулом память или скорость плавания; a-c - старым взрослым мышам-самцам (возрастом 18 месяцев) внутривенно инъецировали плазму (100 мкл/инъекция), полученную от молодых (возрастом 3 месяца) или старых (возрастом 18 месяцев) животных 8 раз в течение 24 дней; a - животные, которым внутривенно инъецировали молодую или старую плазму, демонстрировали одинаковое базисное время замирания при тренировке; b - при повторном подвергании действию контекстного стимула (звуку и свету) в новом контексте спустя 24 ч после тренировки различия в плане связанной с внешним стимулом памяти между группами отсутствовали; c - скорость плавания мышей, подвергнутых действию старой или молодой плазмы, в рамках этапа тренировки RAWM. Данные получены для 8 животных на одну группу. Столбцы означают среднее + SEM; n.s. - несущественный; t-критерий.

Фиг. 8. Результаты зависящего от гиппокампа обучения и памяти при подвергании воздействию старой крови не изменялись; a-e - обучение и память анализировали у не подвергнутых воздействию плазмы старых взрослых мышей (возрастом 18 месяцев) с применением способов на основе контекстно-зависимого страха и RAWM и сравнивали со старыми мышами, которым внутривенно инъецировали плазму (100 мкл/инъекция), полученную от старых (возрастом 18 месяцев) животных, 8 раз в течение 24 дней. N=8 мышей на группу. Различия в плане базисного времени замирания при тренировке на основе контекстно-зависимого страха (a) и различия в плане замирания при тестировании на основе контекстного (b) или связанного с внешним стимулом (c) страха отсутствовали; d - различия в плане пространственного обучения и памяти в рамках способа на основе RAWM отсутствовали; e - различия в плане скорости плавания между животными, получавшими старую плазму, и животными, не получавшими плазму, отсутствовали. Столбцы означают среднее + SEM; n.s. - несущественный; t-критерий.

Фиг. 9. Денатурированная молодая плазма устраняет положительные когнитивные эффекты лечения плазмой у старых мышей; a - процентная величина замирания, наблюдаемая у старых мышей, подвергнутых действию PBS, молодой плазмы или молодой денатурированной плазмы в течение первой минуты подвергания действию того же контекста, что и тренировочная среда (n=10-12/группа); b - процентная величина замирания у старых мышей, подвергнутых действию PBS, молодой плазмы или денатурированной молодой плазмы в рамках задачи с применением внешнего стимула, при которой мышшь подвергали новому контексту, но тому же звуку и свету, что и во время тренировки (n=10-12/группа). Bars represent mean \pm SEM. Группы сравнивали с помощью однонаправленного вариационного анализа

(ANOVA) с последующим апостериорным анализом Тьюки для множественных сравнений (* $P < 0,05$).

Фиг. 10. Три еженедельные введения молодой крови улучшают зависимое от гиппокампа обучение и память и нейрогенез у старых мышей; а - схематичная иллюстрация хронологического порядка, примененного для лечения плазмой, когнитивного тестирования и гистологических анализов. Три 150 мкл инъекции молодой плазмы (возрастом 2-3 месяца) или PBS вводили внутривенно, каждую один раз в неделю (в 0, 7 и 14 день). После третьей инъекции проводили 3-дневный анализ на основе радиального лабиринта с водой (RAWM), для одной группы (смешанное лечение) - с 21-го дня, для другой группы - с 24-го дня. Тест на основе контекстно-зависимого страха (FC) проводили в 30-й день (тренировка) и 31-й день (тестирование). Всем мышам ежедневно инъецировали BrdU (50 мг/кг) внутрибрюшинно в течение 3 дней перед умерщвлением, после которого анализировали нейрогенез; b - количество неправильно выбранных входов перед нахождением платформы в день тренировки (день 1) и дни тестирования (2 и 3 день). Подвергнутая лечению плазмой группа согласованно показывала лучшие результаты в 2 и 3 день, чем группа, подвергнутая лечению PBS. Один блок означает 3 испытания, с - количественный анализ обучения в рамках RAWM, показывающий количество ошибок, сделанных в 1 день, блок 1 по сравнению с 3 днем, блок 15. Подвергнутая обработке молодой плазмой группа делала значительно меньше ошибок в блоке 15 по сравнению с блоком 1; d - нормализованное связанное с замиранием поведение в рамках теста на основе контекстно-зависимого страха показывает значительно большее замирание у подвергнутой лечению молодой плазмой группы по сравнению с подвергнутой лечению PBS группой, что согласуется с улучшенной памятью в рамках данной задачи; e - мыши, подвергнутые лечению молодой плазмой, показывают значительно большее количество BrdU-положительных клеток в зубчатой извилине (DG) гиппокампа по сравнению с группой, подвергнутой лечению PBS. Данные показаны в виде среднее \pm SEM; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; ANOVA, апостериорный анализ Бонферрони (b), t-критерий (c-e).

Фиг. 11. (a) Схематичное изображение трех различных типов парабиоза у мышей: изохронный дикого типа (WT iso), изохронный APP (APP iso) и гетерохронный APP (APP het). Изохронные пары представляют собой мышей одного возраста и того же возраста, что и APP мыши из гетерохронной пары, которые соединены с молодой (возрастом 2-3 месяца) мышью дикого типа. Одна группа состояла из старых (возрастом 16-20 месяцев) мышей-самцов, а другая - из мышей-самок среднего возраста (10-12 месяцев). Все пары хирургически соединяли на срок 5 недель. (b) Количественный анализ иммуногистохимического детектирования амилоидных бляшек (3D6 окрашивание) в гиппокампе старых APP iso (n = 6) и APP het (n = 4) мышей. (c) Результаты измерения уровней нерастворимых Ap и AP42 в гиппокампе старых мышей-самцов APP iso (n = 6) и APP het (n = 4) с помощью ELISA. (d-e) Количественный анализ синаптофизин-иммунореактивности (d) и калбиндин-иммунореактивности (e) в молекулярном слое зубчатой извилины старых самцов парабионтов; WT iso (n = 6), APP iso (n = 6), APP het (n = 4). (f) Количественный анализ калбиндин-иммунореактивности в молекулярном слое зубчатой извилины самок парабионтов среднего возраста; WT iso (n = 9), APP iso (n = 11), APP het (n = 9). Все данные показаны в виде среднее \pm SEM, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, t-критерий Стьюдента (b), двунаправленный ANOVA, апостериорный анализ Шидака (c), однонаправленный ANOVA, апостериорный анализ Тьюки (d-f).

Фиг. 12. Введение плазмы молодой крови восстанавливает синаптическую активность и кальций-зависимые белки и улучшает когнитивную функцию у hAPP^{LS} мышей; (a) схематичное изображение 4 подвергавшихся лечению групп мышей дикого типа (WT) или hAPP^{LS}, подвергнутых лечению PBS или молодой плазмой (150 мкл на инъекцию в хвостовую вену, 8 раз в течение 30 дней); (b) количественный анализ синаптофизин-иммунореактивности в молекулярном слое зубчатой извилины WT pbs (n = 14), WT plm (n = 13), APP pbs (n = 11) и APP plm (n = 13) мышей; (c) количественный анализ калбиндин-иммунореактивности в молекулярном слое зубчатой извилины WT pbs (n = 15), WT plm (n = 13), APP pbs (n = 10) и APP plm (n = 12) мышей; (d-e) Вестерн-блот анализ проводили на лизатах гиппокампа из всех 4 подвергнутых лечению групп, n = 8 на одну группу; (d) репрезентативный вестерн-блот для ERK (44/42 кДа), фосфорилированного ERK (44/42 кДа; pERK) и нейрон-специфичной энolahзы (NSE) для контроля нагрузки; (e) количественный анализ соотношения pERK/ERK, определенного на основе денситометрии полос с применением программного обеспечения ImageJ; (f-g) когнитивное тестирование APP мышей, которым делали 8 внутривенных инъекций PBS (n = 11) или молодой плазмы (n = 13); (f) рабочая память, проанализированная на основе спонтанного чередования в рамках теста с использованием Y-образного лабиринта в течение 5 мин. Пунктирная линия означает уровень вероятности (50%); (g) зависящие от гиппокампа результаты обучения и память, проанализированные с помощью способа на основе контекстно-зависимого страха, обозначенные в виде процентной величины замирания в том же контексте спустя 48 ч после тренировки. Одну мышью исключили из APP pbs группы вследствие аномального поведения, связанного с замиранием, которое было определено с помощью способа ROUT для идентификации выпадающих результатов. Все данные показаны в виде среднее \pm SEM, # $P < 0,1$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,0001$, однонаправленный ANOVA, апостериорный анализ Тьюки (b-c, e), t-критерий Стьюдента (f-g).

Фиг. 13. Мышам возрастом 18 месяцев (N=4-5/группа) 7 раз в течение 2 недель внутривенно инъецировали фракционированную плазму, полученную от C57Bl/6J мышей возрастом 2-3 месяца. Один объем молодой плазмы фракционировали с применением диализных мембран для эксклюзии на основе молекулярной массы, которые обеспечивали исключение молекул с молекулярной массой ниже указан-

ной (т.е. 3,5 кДа, 25 кДа, 50 кДа и 3,5 кДа + уменьшение содержания IgG). Гиппокампы подвергнутых лечению мышей выделяли и анализировали на предмет генной экспрессии с применением чипов Affymetrix для всего генома. Тепловая карта показывает практически полную сегрегацию благодаря лечению в рамках повышенной (красный цвет) или пониженной (синий цвет) общей генной экспрессии.

Фиг. 14. Мышам возрастом 12 месяцев внутривенно инъецировали 150 мкл PBS или 150 мкл плазмы (PLM) от мышей возрастом 2 месяца дважды в неделю в течение 4 недель. Связанные с плазмой факторы анализировали с применением белкового микрочипа (а) или цитокинного анализа Luminex (b-c); а - тепловая карта, показывающая шесть связанных с плазмой факторов, которые были значительно повышены или понижены у мышей возрастом 12 месяцев при введении плазмы молодой крови. Неконтролируемая полная кластеризация на основе связей обеспечивает отделение PLM образцов от PBS образцов (b-c). Интерлейкин-22 (IL-22) и фактор ингибирования лейкемии (LIF) были повышены у мышей возрастом 12 месяцев спустя 4 недели после введения плазмы молодой крови по сравнению с PBS.

Фиг. 15. NSG мыши демонстрируют возрастные изменения в плане (а) даблкортина (DCX) + клеток в зубчатой извилине, (b) CD68 окрашивание в виде процентной доли общей площади гиппокампа и (c) общее количество cfos-положительных клеток в зубчатой извилине. (среднее \pm SEM; критерий Стьюдента; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,0001$).

Фиг. 16. (а) Уровни замирания у старых NSG мышей значительно ниже, чем у молодых NSG мышей в последние 90 с при помещении в камеру, где они ранее подвергались тренировке для возникновения ассоциации со страхом; (b) количественный анализ уровней замирания в последних интервалах теста с применением способа на основе контекстно-зависимого страха у молодых и старых NSG мышей из (а); (c) старые NSG мыши демонстрируют недостаточные результаты через несколько дней и в рамках испытаний в тот же день в плане нахождения выхода из лабиринта Барнеса; (d) старые NSG мыши также демонстрируют недостаточные результаты по сравнению с молодыми NSG мышами в плане ежедневных общих результатов; (e) скорость обучения, разница между результатами отдельных испытаний в рамках исходного испытания являются значительно более высокими у молодых NSG мышей. (Среднее \pm SEM; критерий Стьюдента для сравнений с применением 2 групп и, если допустимо, двунаправленный вариационный анализ с повторными измерениями с последующим апостериорным анализом Бонферрони для корректировки множественных сравнений; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$).

Фиг. 17. Тепловая карта, демонстрирующая высокую степень кластеризации в плане экспрессии белков в возрастной группе среди образцов плазмы, полученных от доноров пуповины человека (N=15), молодых доноров (N=19) или пожилых доноров (N=16). Блоки означают отдельные секретируемые сигнальные белки, которые подвергаются обогащению (желтый цвет) или снижению (синий цвет) относительно уровней экспрессии данного белка среди всех возрастных групп. Показанные белки представляют собой белки, которые являлись значимыми после проведения SAM с временной корреляцией ($q < 5\%$).

Фиг. 18. Инъекции плазмы человека (hPLM) от молодых или старых доноров старым NSG мышам выявили изменения в процентной доле площади, подвергнутой окрашиванию CD68, в гиппокампе (слева) или коре (справа) по сравнению с подвергнутыми действию индифферентного вещества NSG мышами (среднее \pm SEM; критерий Стьюдента; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$).

Фиг. 19. После нормализации уровней замирания в рамках задачи на основе контекстно-зависимого страха (день 2) с учетом замирания, наблюдаемого при тренировке (день 1), молодая плазма человека (hPLM) повышает контекстную память на 4,5 мин по сравнению со старыми NSG мышами, подвергнутыми лечению старой hPLM (среднее \pm SEM; t-критерий Стьюдента на указанном интервале; * $P < 0,05$).

Фиг. 20. Уровни генной экспрессии, определенных на основе кПЦР, у старых NSG мышей, подвергнутых лечению плазмой пуповины человека или молодой плазмой, по сравнению с подвергнутыми действию индифферентного вещества мышами. Изменения в плане экспрессии немедленно-ранних генов (Egr1, Junb, fos) анализировали в мозгах, полученных от старых NSG мышей, подвергавшихся внутривенному введению плазмы человека или индифферентного вещества в течение 3 недель (среднее \pm SEM; критерий Стьюдента; * $P < 0,05$).

Фиг. 21. Уровни дополнительных связанных с пластичностью генов BDNF и Camk2a измеряли с помощью кПЦР у старых NSG мышей, подвергаемых лечению плазмой пуповины человека или индифферентным веществом (среднее \pm SEM; критерий Стьюдента; * $P < 0,05$).

Фиг. 22. (а) Количественный анализ уровней замирания у старых NSG мышей, подвергаемых лечению плазмой пуповины человека или индифферентным веществом, в последние 90 с при помещении в камеру, где они ранее подвергались тренировке для возникновения ассоциации со страхом; (b) старые NSG мыши, подвергаемые лечению плазмой пуповины, демонстрируют повышенную обучаемость и память к 4 дню и в рамках испытаний в тот же день в плане нахождения выхода из лабиринта Барнеса; (c) мыши, подвергнутые лечению плазмой пуповины, также демонстрируют повышенную обучаемость и память по сравнению с подвергнутыми воздействию индифферентного вещества NSG мышами в плане ежедневных общих результатов; (d) скорость обучения, разница между результатами отдельных испытаний в рамках исходного испытания являются значительно более высокими у мышей, подвергнутых лечению плазмой пуповины, по сравнению с подвергнутыми воздействию индифферентного вещества мы-

шами, в рамках третьего испытания (среднее \pm SEM; критерий Стьюдента для сравнений с применением 2 групп и, если допустимо, двунаправленный вариационный анализ с повторными измерениями с последующим апостериорным анализом Бонферрони для корректировки множественных сравнений; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Фиг. 23. (a) Срезы, полученные из мозгов мышей, подвергавшихся лечению плазмой пуповины, демонстрируют увеличенную долговременную потенциацию (LTP) при анализе путем измерения амплитуд популяционного спайка в зубчатой извилине после стимуляции в перфорирующем пути гиппокампа; (b) количественный анализ фазы поддержки PSA, показанной в (a) (среднее \pm SEM; критерий Стьюдента; * $P < 0,05$).

Фиг. 24. (a) Количественный анализ числа подвергнутых действию TRAP клеток, опосредующих экспрессию эффекторного белка из cfos в зубчатой извилине (DG) у TRAP-FOS мышей, подвергнутых действию индифферентного вещества, старой плазмы человека (hPLM) или hPLM пуповины; (b) количественный анализ числа подвергнутых действию TRAP NeuN-положительных (нейронных) клеток, опосредующих экспрессию эффекторного белка из cfos в зубчатой извилине (DG) у TRAP-FOS мышей, подвергнутых действию индифферентного вещества, старой hPLM или hPLM пуповины; (c) количественный анализ числа подвергнутых действию TRAP клеток, опосредующих экспрессию эффекторного белка из cfos в участке CA1 у TRAP-FOS мышей, подвергнутых действию индифферентного вещества, старой hPLM или hPLM пуповины; (d) количественный анализ числа подвергнутых действию TRAP NeuN-положительных клеток, опосредующих экспрессию эффекторного белка из cfos в участке CA1 у TRAP-FOS мышей, подвергнутых действию индифферентного вещества, старой hPLM или hPLM пуповины (среднее \pm SEM; однонаправленный ANOVA с последующим апостериорным анализом Тьюки для корректировки множественных сравнений; * $P < 0,05$).

Подробное описание изобретения

Изобретение относится к способам и композициям для лечения связанных со старением состояний у субъекта, например состояний, связанных с когнитивными нарушениями, возрастной деменции или возрастного снижения физиологической функции периферического органа(органов). Аспекты способов включают введение продукта на основе крови, включающей молодую плазму, нуждающемуся в этом субъекту, например субъекту, страдающему или имеющему риск развития связанного со старением состояния, например связанного со старением когнитивного нарушения или патологических типов деменции. Изобретение также относится к композициям и включающим их наборам, которые могут применяться при реализации на практике способов по данному изобретению.

Перед описанием настоящих способов и композиций следует отметить, что данное изобретение необходимо понимать в качестве не ограничивающегося конкретным описанным способом или композицией, поскольку они, разумеется, могут варьироваться. Следует также понимать, что используемая здесь терминология предназначена только для цели описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

При указании диапазона значений следует понимать, что в него также входит каждое промежуточное значение до десятой доли единицы нижнего предела, если из контекста явно не следует иное, между верхним и нижним пределами данного диапазона. Изобретение охватывает каждый меньший диапазон между любым указанным значением или промежуточным значением в указанном диапазоне и любым иным указанным или промежуточным значением в данном указанном диапазоне. Верхние и нижние пределы данных меньших диапазонов могут быть независимо включены в диапазон или исключены из него, при этом каждый диапазон, в котором один, ни один или оба предела включены в меньшие диапазоны, также охватывается данным изобретением за исключением какого-либо явным образом исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, то диапазоны за исключением одного или обоих данных включенных пределов также включены в изобретение.

Если не определено иным образом, все используемые здесь технические и научные термины имеют те же значения, какие обычно понимаются средним специалистом в данной области, к которой относится данное изобретение. Несмотря на то, что при реализации на практике или тестировании настоящего изобретения могут применяться любые способы и материалы, являющиеся аналогичными или эквивалентными тем, которые описаны здесь, далее будут описаны некоторые потенциальные и предпочтительные способы и материалы. Все указанные здесь публикации приведены в качестве ссылки для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми указаны данные публикации. Следует понимать, что настоящее описание заменяет любое описание указанной публикации в случае противоречия.

Как будет очевидно специалистам в данной области при чтении настоящего описания, каждый из описанных и поясненных с помощью примеров отдельных вариантов осуществления имеет отдельные компоненты и особенности, которые могут быть легко отделены или скомбинированы с особенностями любого из нескольких иных вариантов осуществления без выхода за рамки области или духа настоящего изобретения. Любой указанный способ может быть осуществлен в рамках указанной очередности или любой иной очередности, которая является возможной с логической точки зрения.

Следует отметить, что в соответствии с используемым здесь значением и прилагаемой формулой изобретения формы существительных в единственном числе включают формы во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, термин "клетка" включает множество данных клеток, а термин "пептид" включает один или несколько пептидов и их эквивалентов, известных специалистам в данной области, например полипептиды, и так далее.

Рассматриваемые здесь публикации приведены исключительно в плане их описания до даты подачи настоящей заявки. Ничто из указанного здесь не должно рассматриваться в качестве допущения того, что настоящее изобретение не дает права датировать более ранним числом такую заявку на основании более раннего изобретения. Кроме того, указанные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, которые могут нуждаться в независимом подтверждении.

Описание способов

Как указано выше, аспекты изобретения включают способы лечения связанных со старением состояний у субъекта. Под связанным со старением состоянием подразумевается состояние, например болезненное состояние или иное нежелательное состояние, которое сопровождается старением организма. Связанное со старением состояние может иметь ряд различных проявлений, например связанное со старением повреждение центральных или периферических органов тела, такое как, без ограничения, повреждение клеток, повреждение тканей, дисфункция органов, связанное со старением снижение продолжительности жизни и карциногенез, при этом конкретные представляющие интерес органы и ткани включают, без ограничения, кожу, нейроны, мышцы, поджелудочную железу, мозг, почку, легкое, желудок, кишечник, селезенку, сердце, соединительную ткань, яички, яичник, матку, печень и кости. В некоторых случаях лечение субъекта в соответствии с данными способами приводит к изменению в центральном органе, например в органе, связанном с центральной нервной системой, таким как мозг, спинной мозг и так далее, при этом данное изменение может иметь ряд различных проявлений, например, описанных более подробно ниже, включая, без ограничения, молекулярные, структурные и/или функциональные. В некоторых случаях лечение субъекта в соответствии с данными способами приводит к изменению в периферическом органе, таком как печень, мышцы, сердце, кровь и так далее, при этом данное изменение может иметь ряд различных проявлений, например описанных более подробно ниже.

В некоторых вариантах осуществления связанное со старением состояние, которое подвергают лечению, представляет собой связанное со старением ухудшение когнитивной способности у субъекта. Под когнитивной способностью или "познавательной способностью" подразумеваются ментальные процессы, которые включают внимание и концентрацию, обучение сложным задачам и концепциям, память (извлечение, сохранение и поиск новой информации за короткое и/или длительное время), обработку информации (работа с информацией, полученной с помощью пяти чувств), восприятие пространственного соотношения между объектами (визуальное восприятие, восприятие глубины, использование ментального воображения, копирование рисунков, конструирование объектов или фигур), продуцирование и понимание языка, беглость речи (поиск слов), решение проблем, принятие решений и связанные с исполнением функции (планирование и определение приоритетов). Под "когнитивным снижением" понимают прогрессирующее снижение одной или нескольких из данных способностей, например снижение памяти, языковых навыков, мышления, суждения и так далее. Под "нарушением когнитивной способности" и "когнитивным нарушением" понимают снижение когнитивной способности по сравнению со здоровым субъектом, например здоровым субъектом того же возраста, или по сравнению со способностью данного субъекта в более ранний момент времени, например 2 недели, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 6 месяцев, 1 год, 2 года, 5 лет или 10 лет назад или более. Под "связанным со старением когнитивным нарушением" подразумевается нарушение когнитивной способности, которое обычно связано со старением, включая, например, когнитивное нарушение, связанное с процессом естественного старения, например легкое когнитивное нарушение (ЛКН), и когнитивное нарушение, ассоциированное со связанным со старением заболеванием, а именно заболеванием, которое возникает с увеличивающейся частотой и увеличивающимся дряхлением, например нейродегенеративным состоянием, таким как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, лобно-височная деменция, болезнь Хантингтона, боковой амиотрофический склероз, рассеянный склероз, глаукома, миотоническая дистрофия, сосудистая деменция и им подобные.

Под "лечением" и ему подобными терминами в целом подразумевают получение требуемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Данный эффект может являться профилактическим в плане полного или частичного предотвращения заболевания или его симптома и/или может являться терапевтическим в плане частичного или полного излечения заболевания и/или неблагоприятного эффекта, присущего заболеванию. Термин "лечение" в соответствии с используемым здесь значением означает любое лечение заболевания у млекопитающего и включает предотвращение возникновения заболевания у субъекта, который может быть предрасположенным к данному заболеванию, но еще не был продиагностирован в качестве имеющего его; (b) ингибирование заболевания, т.е. прекращение его прогрессирования; или (c) облегчение заболевания, т.е. опосредование регрессии заболевания. Лечение может приводить к ряду различных физических проявлений, например модулированию генной экспрессии, омоложению ткани или органов и т.д. Терапевтический агент может быть введен до, в течение или после развития заболевания или повреждения. Лечение текущего заболевания, при котором лечение обеспечивает стабиль-

лизацию или уменьшение нежелательных клинических симптомов у пациента, представляет особенный интерес. Такое лечение может осуществляться до полной утраты функции пораженных тканей. Терапия для субъекта может быть введена в течение симптоматической стадии заболевания, а в некоторых случаях после симптоматической стадии заболевания.

В некоторых случаях, когда связанное со старением состояние представляет собой связанное со старением когнитивное ухудшение, лечение с применением способов по настоящему изобретению замедляет или снижает прогрессирование связанного со старением когнитивного ухудшения. Другими словами, когнитивные способности у субъекта ухудшаются более медленно после лечения с применением описанных способов, чем до или при отсутствии лечения с применением описанных способов. В некоторых случаях лечение с применением способов по настоящему изобретению обеспечивает стабилизацию когнитивных способностей у субъекта. Например, прогрессирование когнитивного ухудшения у субъекта, страдающего связанным со старением когнитивным ухудшением, останавливается после лечения с применением описанных способов. В качестве другого примера когнитивное ухудшение у субъекта, например субъекта в возрасте 40 лет или более, который страдает связанным со старением когнитивным ухудшением, предотвращается после лечения с применением описанных способов. Другими словами, (дальнейшее) когнитивное нарушение не наблюдается. В некоторых случаях лечение с применением способов по настоящему изобретению обеспечивает снижение или обращение когнитивного нарушения, например, в виде наблюдаемых улучшенных когнитивных способностей у субъекта, страдающего связанным со старением когнитивным ухудшением. Другими словами, когнитивные способности субъекта, страдающего связанным со старением когнитивным ухудшением, после лечения с применением описанных способов, являются лучшими, чем до лечения с применением описанных способов, т.е. они улучшаются при лечении. В некоторых случаях лечение с применением способов по настоящему изобретению устраняет когнитивное нарушение. Другими словами, когнитивные способности субъекта, страдающего связанным со старением когнитивным ухудшением, восстанавливаются, например, до их уровня, когда субъект был в возрасте 40 лет или менее, после лечения с применением описанных способов, например, в виде улучшенных когнитивных способностей у субъекта, страдающего связанным со старением когнитивным ухудшением.

При реализации данных способов на практике включающий молодую плазму продукт на основе крови вводят нуждающемуся в этом субъекту, например субъекту, страдающему или имеющему риск развития связанного со старением состояния, например связанного со старением когнитивного нарушения или возрастной деменции. Таким образом, способы в соответствии с вариантами осуществления изобретения включают введение включающего плазму продукта от молодого субъекта ("субъекта-донора" или "донора") субъекту, имеющему, по меньшей мере, риск развития связанного со старением когнитивного нарушения, т.е. субъекту, страдающему или имеющему риск развития связанного со старением когнитивного нарушения ("субъект-реципиент" или "реципиент"). Под "включающим плазму продуктом на основе крови" подразумевают любой продукт, полученный из крови, которая включает плазму. Термин "плазма" используют в его стандартном значении для описания жидкого компонента крови цвета соломы/бледно-желтого цвета, состоящего из около 92% воды, 7% белков, таких как альбумин, гамма-глобулин, антигеофильный фактор и иных факторов свертывания и 1% минеральных солей, сахаров, жиров, гормонов и витаминов. Неограничивающие примеры включающих плазму продуктов на основе крови, являющихся подходящими для применения в рамках данных способов, включают цельную кровь, обработанную антикоагулянтами (например, ЭДТА, цитратом, оксалатом, гепарином и там далее), продукты на основе крови, полученные путем фильтрации цельной крови для удаления белых кровяных клеток ("лейкоредукция"), и продукт на основе крови, состоящий, по существу, из очищенной плазмы. В некоторых случаях применяемый включающий молодую плазму продукт представляет собой включающий плазму продукт на основе нецельной крови, что означает, что данный продукт не представляет собой цельную кровь, поскольку он не включает один или несколько компонентов, присутствующих в цельной крови, таких как эритроциты, лейкоциты, и так далее, во всяком случае в степени, в которой данные компоненты присутствуют в цельной крови. В некоторых случаях включающий молодую плазму продукт является, по существу (если не полностью), ацеллюлярным, при этом в данных случаях клеточное содержимое может составлять 5% или менее, например 1% или менее, включая 0,5% или менее.

Термины "субъект", "хозяин" и "пациент" используются здесь взаимозаменяемым образом и означают любой субъект, являющийся млекопитающим, для которого требуется проведение диагностики, лечения или терапии, в частности людей. Как правило, донор и реципиент будут относиться к одному виду. Виды млекопитающих, которые могут подвергаться лечению с применением настоящих способов, включают собак и кошек, лошадей, коров, овец и т.д., а также приматов, в частности людей. Настоящие способы, композиции и реагенты также могут применяться в рамках моделей на основе животных, в частности малых млекопитающих, например, мышей/крыс, зайцеобразных и так далее, например, в рамках экспериментальных исследований. Приведенное ниже описание сосредоточено на применении настоящих способов, композиций, реагентов, устройств и наборов для людей, однако для среднего специалиста в данной области будет очевидно, что приведенное описание может быть легко модифицировано для применения на других представляющих интерес млекопитающих на основе имеющих в данной облас-

ти знаний.

Под "молодым субъектом" подразумевается субъект в возрасте 40 лет или менее, например 35 лет или менее, включая 30 лет или менее, например, 25 лет или менее. В некоторых случаях субъект, который служит в качестве источника включающего молодую плазму продукта на основе крови, представляет собой субъекта в возрасте 10 лет или менее, например 5 лет или менее, включая 1 год или менее. В некоторых случаях субъект представляет собой новорожденного, а источник продукта с плазмой представляет собой пуповину, при этом продукт с плазмой собирают из пуповины новорожденного. Таким образом, термин "молодой субъект" может означать субъекта в возрасте от 0 до 40 лет, например 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 лет. Как правило, субъект является здоровым, например, субъект не имеет гематологического заболевания или аутоиммунного заболевания в момент сбора.

Термин "субъект, страдающий или имеющий риск развития связанного со старением когнитивного нарушения" включает субъекта в возрасте около 50 лет или более, например 60 лет или более, 70 лет или более, 80 лет или более и, как правило, не более 100 лет, например, в возрасте 90 лет, т.е. от около 50 до около 100 лет, например в возрасте около 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90 лет, который имеет связанное со старением состояние, например когнитивное нарушение, связанное с процессом естественного старения, например ЛКН; субъекта в возрасте около 50 лет или более, например 60 лет или более, 70 лет или более, 80 лет или более, 90 лет или более и обычно не более 100 лет, т.е. от около 50 и до около 100, например около 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или около 100 лет, который еще не начал демонстрировать симптомы связанного со старением состояния, например когнитивного нарушения; субъекта любого возраста, который страдает когнитивным нарушением вследствие связанного со старением заболевания, например болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, лобно-височной деменции, болезни Хантингтона, бокового амиотрофического склероза, рассеянного склероза, глаукомы, миотонической дистрофии, деменции и им подобных, и субъекта любого возраста, у которого было диагностировано связанное со старением заболевание, которое обычно сопровождается когнитивным нарушением, например болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, лобно-височная деменция, прогрессирующий надъядерный паралич, болезнь Хантингтона, боковой амиотрофический склероз, спинальная мышечная атрофия, рассеянный склероз, системная атрофия, глаукома, атаксия, миотоническая дистрофия, деменция и им подобное, при этом субъект еще не начал демонстрировать симптомы когнитивного нарушения.

В некоторых случаях донор продукта на основе крови (т.е. молодой субъект) является отличным от реципиента (т.е. субъекта, страдающего или имеющего риск развития связанного со старением когнитивного нарушения). Другими словами, продукт на основе крови является аллогенным по отношению к реципиенту. В некоторых подобных случаях предназначенный для введения продукта на основе крови выбирают на основе группы крови донора и группы крови реципиента. Под группой крови подразумевают присутствие или отсутствие А и В антигенов и Rh антигена в красных кровяных тельцах донора и реципиента. Например, как хорошо известно в данной области, субъект может не иметь ни А, ни В антигенов в своих красных кровяных клетках (и, таким образом, будет иметь в своей плазме антитела, специфичные по отношению к А, и к В антигенам), при этом в данном случае субъект будет иметь "группу О". Субъект может иметь А антиген и не иметь В антиген в своих красных кровяных клетках (и, таким образом, будет иметь в своей плазме антитела, специфичные по отношению к В антигену, но не А антигену), при этом в данном случае субъект будет иметь "группу А". Субъект может иметь В антиген и не иметь А антиген в своих красных кровяных клетках (и, таким образом, антитела, специфичные по отношению к А антигену, но не В антигену, в своей плазме), при этом в данном случае субъект будет иметь "группу В". Субъект может иметь и А, и В антигены в своих красных кровяных клетках (и, таким образом, не иметь в своей плазме антитела, специфичные ни к А, ни к В антигену), при этом в данном случае субъект будет иметь "группу АВ". Как хорошо известно в данной области, безопасное переливание донорской крови реципиенту может осуществляться если донор имеет группу О, а реципиент - любую группу; если донор имеет группу А, а реципиент имеет группу А или группу В; если донор имеет группу В, а реципиент имеет группу В или группу АВ; или если донор имеет группу АВ и реципиент имеет группу АВ. Кроме того, как хорошо известно в данной области, Rh антиген может присутствовать или отсутствовать, т.е. субъект может являться Rh-положительным или Rh-отрицательным соответственно. Как хорошо известно в данной области, безопасное переливание донорской крови реципиенту может осуществляться, если донор имеет группу Rh⁺, а реципиент имеет группу Rh⁺; или если донор имеет группу Rh⁻, а реципиент имеет группу Rh⁺ или Rh⁻. В других подобных случаях, например, если продукт на основе крови представляет собой фракционированный продукт, который не включает клетки с А/В или Rh антигенами, например продукт на основе крови, который состоит, по существу, из плазмы, реципиенту может быть введен продукт на основе крови от донора, имеющего любую группу крови.

В других случаях донор и реципиент представляют собой одного и того же субъекта, т.е. от субъекта получают кровь и переносят обратно этому же субъекту продукт, который приготовлен из той же крови, например, спустя 10 лет или более, например спустя 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90 лет. Другими словами, продукт на основе крови является аутогенным по отношению к реципиенту. Например, кровь может быть получена от субъекта при возрасте субъекта около 40 лет или менее, например от 10 до 40 лет, например 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 лет; и перенесена обратно этому же субъекту при возрасте

субъекта около 50 лет или более, например в возрасте от 50 до 90 лет, например 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или около 100 лет. Таким образом, в определенных вариантах осуществления изобретения кровь получают от субъекта, консервируют и переносят обратно этому же субъекту в более старом возрасте.

Как указано выше, продукт на основе крови, являющийся подходящим для применения в рамках настоящих способов, представляет собой включающий плазму продукт на основе крови, приготовленный из крови, полученной от молодого субъекта. Кровь может быть получена вручную, с помощью автоматизированного оборудования или их некоторой комбинации. Может быть получен удобный объем, который не угрожает жизни донора. В некоторых случаях получают объем 200-600 мл содержащего плазму продукта на основе крови, например 300-550 мл или 450-500 мл. Полученная кровь может быть обработана агентом, который предотвращает коагуляцию, т.е. антикоагулянт, например ЭДТА, цитратом, оксалатом, гепарином и т.д. Например, при получении крови в нее может быть добавлен антикоагулянт. В качестве другого примера, контейнер, в котором собирают кровь, может включать антикоагулянт. В кровь также могут быть добавлены другие агенты, например буферы, консерванты, например, фосфат, декстроза, аденин, глицерин, глюкоза, раффиноза и т.д.; агенты, которые убивают вирусы, например детергент для разбавления и т.д.

В некоторых случаях кровь может быть подвергнута фракционированию, например, для удаления лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, антител и т.д., а включающая плазму фракция, т.е. "включающий плазму продукт на основе крови", оставлен для последующего применения. Например, цельная кровь может быть подвергнута фракционированию с помощью фильтрации, центрифугирования и т.д. после завершения сбора. В качестве другого примера цельная кровь может быть подвергнута фракционированию при получении от донора, при этом не являющиеся плазмой компоненты могут быть возвращены в кровотоку донора. Например, фракционированная кровь, включающая плазму, может быть собрана с помощью афереза. Под "аферезом" подразумевается автоматический забор крови, при котором собранная кровь поступает через машину, которая отделяет определенные компоненты, например, лейкоциты, красные кровяные клетки, плазму и т.д., и возвращает оставшиеся компоненты крови в кровотоку донора. В некоторых случаях аферез представляет собой плазмаферез, т.е. аферез, при котором плазму отделяют, а оставшиеся компоненты крови возвращают в кровотоку донора. В некоторых подобных случаях включающий плазму продукт на основе крови состоит, по существу, из плазмы. В некоторых вариантах осуществления включающий плазму продукт на основе крови, т.е. цельной крови или ее включающей плазму части, также обрабатывают для удаления одного или нескольких полипептидных фракций, таких как полипептидная фракция, имеющая среднюю молекулярную массу ниже заранее определенного порогового значения. В то время как предварительно определенное пороговое значение может варьироваться, представляющие интерес пороговые значения включают, без ограничения, 3,5 кДа, 10 кДа, 25 кДа, 50 кДа. В некоторых случаях может быть также удален определенный протеинкиназный компонент, например IgG и т.д. Под "средней молекулярной массой" подразумевается масса полипептида, определяемая путем подсчета на основе умножения общего количества аминокислот в полипептиде с применением средней величины молекулярной массы 110 кДа для каждой из них. Из уровня техники известен ряд способов удаления полипептидов, которые имеют молекулярные массы, являющиеся равными или меньшими относительно определенных значений, из жидких образцов. Например, продукт на основе крови может быть подвергнут хроматографии на основе размерной эксклюзии (SEC), например хроматографии на основе гель-фильтрации, при которой включающий плазму продукт на основе крови пропускают через слой сфер, имеющих поры, которые задерживают белки с молекулярной массой, являющейся равной или меньшей относительно определенных значений, тем самым обеспечивая уменьшение содержания данных малых полипептидов в проходящем потоке. В качестве другого примера, продукт на основе крови может быть подвергнут гидродинамической хроматографии (ГДХ), при которой парабола ламинарного течения образца в капилляре, которая возникает при ламинарном течении по трубке или наполненной колонке, вынуждает более крупные частицы двигаться в более быстром потоке в центре трубки, а малые частицы - задерживаться вдоль медленного потока ближе к стенкам трубки. Для удаления из продукта на основе крови белков, которые имеют равную или меньшую указанную пороговую среднюю молекулярную массу, может применяться любой подходящий из способов, например SEC, ГДХ и им подобные. Конкретные представляющие интерес фракции, которые могут применяться в рамках указанных вариантов осуществления изобретения, включают, без ограничения, фракции, в которых полипептиды, имеющие среднюю молекулярную массу 3,5 кДа или менее, были удалены; фракции, в которых полипептиды, имеющие среднюю молекулярную массу 10 кДа или менее, были удалены; фракции, в которых полипептиды, имеющие среднюю молекулярную массу 25 кДа или менее, были удалены; фракции, в которых полипептиды, имеющие среднюю молекулярную массу 50 кДа или менее, были удалены; и фракции, в которых полипептиды, имеющие среднюю молекулярную массу, равную или меньшую любого из указанных выше пороговых значений (например, 3,5 кДа, 10 кДа, 25 кДа, 50 кДа) или менее, и IgG были удалены. Другими словами, продукт на основе крови может рассматриваться в качестве включающего плазму продукта на основе крови, не включающего молекулы с определенной молекулярной массой (например, 3,5 кДа; 10 кДа; 25 кДа; 50 кДа). В некоторых случаях вводимая фракция не является денатури-

рованной фракцией.

Полученный таким образом включающий плазму продукт на основе крови, например цельной крови или ее включающей плазму фракции, может быть введен субъекту, страдающему или имеющему риск развития связанного со старением состояния, например когнитивного нарушения. В некоторых вариантах осуществления включающий плазму продукт на основе крови вводят немедленно, например в течение приблизительно 12-48 ч после сбора, субъекту, страдающему или имеющему риск развития связанного со старением когнитивного нарушения. В таких случаях продукт на основе крови может храниться в охлажденном виде, например, при температуре 0-10°C. В других вариантах осуществления включающий плазму продукт на основе крови консервируют, например, с помощью таких способов, как криоконсервация и других, которые известны в данной области, до момента введения реципиенту.

Например, препарат может быть заморожен, например, в течение от около 24 до около 48 ч после сбора, т.е. от непосредственного момента сбора до приблизительно 48 ч после сбора, и может храниться при температуре около -20°C или менее, например -80°C или менее, в некоторых случаях -90°C или менее, или -135°C или менее, например, -196°C. В некоторых случаях препарат на основе крови является свежемороженым, например, является свежемороженой плазмой (СЗП). В других случаях могут быть добавлены химические консерванты для обеспечения консервирования, например криоконсервант, например диметилсульфоксид (ДМСО). См., например, Kreher et al. (2003) *Journal of Immunological Methods* 278:79-93; Reimann, et al. (2000) *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7:352-359; и Romeu et al. (1992) *J. Immunol. Methods* 154:7-10. Криоконсерванты в частности применяются для поддержания жизнеспособности клеток в продукте на основе крови, например, если включающий плазму продукт на основе крови также включает лейкоциты, эритроциты и так далее. Например, 20% или большее количество клеток выживут при оттаивании, например 40% или более, 60% или более, 80% или более, в некоторых случаях 90% или более, например, 95% или более, 97% или более или 99% или более клеток будут являться жизнеспособными после удаления консерванта. Продукт на основе крови может быть подвергнут консервации до или после удаления белков с массой ниже пороговой, например, как описано выше, например, имеющих молекулярную массу, равную или меньшую 3,5 кДа, 10 кДа, 25 кДа, 50 кДа. В некоторых случаях продукт на основе крови будет подвергнут консервации до указанного удаления. В других случаях продукт на основе крови будет подвергнут консервации после указанного удаления. В соответствии с данными способами или способами из уровня техники продукт на основе крови может храниться в течение одного года или более, например 2, 3, 4 или 5 лет или более, в некоторых случаях 10, 20, 30 или 40 лет или более, например, в течение 50, 60, 70 или 80 лет. При оттаивании продукта на основе крови консервант, в случае его применения, может быть замещен в препарате для введения субъекту любым удобным раствором, например любым подходящим изотоническим раствором.

Включающий плазму продукт на основе плазмы может быть введен с применением любого удобного протокола введения продукта на основе крови субъекту. В некоторых случаях продукт на основе крови вводят внутривенно. Продукт на основе крови может быть смешан с внутривенными растворами, известными из уровня техники, например 5% декстрозы в воде, изотоническим электролитным раствором, таким как изотонический солевой раствор (0,9%), и т.д. Продукт на основе крови может быть введен с помощью любого подходящего обеспечивающего доступ устройства, например иглы для внутривенных инъекций, компрессорного пистолета, периферической канюли, центральной в/в линии и так далее, имплантируемого разреза, туннельной линии, центральных венных линий, периферических вставленных центральных катетеров и им подобных. Введение может осуществляться через любую вену, которая обычно применяется для переливания, например через подключичную, внутреннюю яремную, бедренную, верхнюю полую вену, нижнюю полую вену, вену правого предсердия и т.д., в объеме и со скоростью, которые обычно применяются для переливания, как известно из уровня техники, например, 10-20 мл на 1 кг массы тела субъекта в расчете на одну дозу при скорости около 5 мл/мин.

При реализации на практике настоящих способов субъекту, страдающему или имеющему риск развития связанного со старением состояния, например когнитивного нарушения или возрастной деменции, вводят эффективное количество включающего молодую плазму продукта для лечения связанного со старением состояния, например связанного со старением когнитивного нарушения. В клиническом плане эффективное количество или дозировка продукта на основе крови представляет собой количество включающего молодую плазму продукта, которое при введении в течение подходящего периода времени, обычно по меньшей мере в течение примерно одной недели и, возможно, около двух недель или более, вплоть до периода около 3 недель, 4 недель, 8 недель или более, будет обеспечивать снижение когнитивного ухудшения и/или когнитивное улучшение у субъекта, страдающего нарушенной познавательной способностью или иным типом дегенеративного состояния вследствие естественного старения или связанного со старением расстройства. Например, эффективная доза представляет собой дозу, которая при введении в течение подходящего периода времени, такого как по меньшей мере около одной недели и может быть около двух недель или более, вплоть до периода около 3 недель, 4 недель 8 недель или более, будет замедлять, например, на около 20% или более, например, на 30% или более, на 40% или более или на 50% или более, в некоторых случаях на 60% или более, на 70% или более, на 80% или более или на

90% или более, например, останавливать, когнитивное ухудшение у пациента, страдающего естественным старением или связанным со старением заболеванием. В некоторых случаях эффективное количество или дозировка продукта на основе крови будет не только замедлять или останавливать прогрессирование болезненного состояния, но также будет индуцировать обращение состояния, т.е. будет вызывать улучшение когнитивной способности. Например, в некоторых случаях эффективное количество представляет собой количество, которое при введении в течение подходящего периода времени, обычно в течение по меньшей мере около одной недели и может быть около двух недель или более, вплоть до периода около 3 недель, 4 недель, 8 недель или более, будет улучшать когнитивные способности субъекта, страдающего связанным со старением когнитивным нарушением, например 1,5-кратно, 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно, 5-кратно, в некоторых случаях 6-кратно, 7-кратно, 8-кратно, 9-кратно или 10-кратно или более по сравнению с познавательной способностью до введения продукта на основе крови.

Тесты познавательной способности и тест IQ для измерения когнитивной способности, например, внимания и концентрации, способности обучаться сложным задачам и концепциям, памяти, способности обрабатывать информацию, восприятия пространственного соотношения между объектами, продуцирования и понимания языка, способности решать проблемы и принимать решения и способности осуществлять связанные с исполнением функции, являются хорошо известными из уровня техники, при этом любой из них может применяться для измерения когнитивной способности субъекта до и/или в течение и после лечения субъекта продуктом на основе крови, например, для подтверждения того, что было введено эффективное количество. Они включают, например, общую врачебную оценку восприятия (GPCOG); анализ нарушения памяти; мини-тестирование умственного состояния (MMSE); калифорнийский тест на основе вербального обучения, второе издание, короткая форма, для памяти; тест системы исполнительных функций Делиса-Каплана; шкалу для анализа болезни Альцгеймера (ADAS-Cog); шкалу для психогериатрического анализа (PAS); и им подобные. Прогрессирование функциональных мозговых улучшений может быть детектировано с помощью способов сканирования мозга, таких как магнитно-резонансное тестирование (МРТ) или позитрон-эмиссионная томография (PET) и им подобных. Для отслеживания активности, связанной с повседневной жизнью, исполнительных функций, мобильности и т.д. может применяться широкий диапазон дополнительных функциональных анализов. В некоторых вариантах осуществления способ включает этап измерения когнитивной способности и детектирование пониженной скорости когнитивного ухудшения, стабилизации когнитивной способности и/или улучшения когнитивной способности после введения продукта на основе крови по сравнению с когнитивной способностью субъекта до введения продукта на основе крови. Такие измерения могут быть проведены спустя неделю или большее время после введения продукта на основе крови, например спустя 1 неделю, 2 недели, 3 недели или более, например, 4 недели, 6 недель или 8 недель или более, например 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев или 6 месяцев или более.

С точки зрения биохимии, под "эффективным количеством" или "эффективной дозой" продукта на основе крови для предотвращения или лечения связанного со старением когнитивного нарушения подразумевается количество продукта на основе крови, которое будет ингибировать, выступать антагонистом, снижать, понижать или подавлять на около 20% или более, например на 30% или более, на 40% или более или на 50% или более, в некоторых случаях на 60% или более, на 70% или более, на 80% или более или на 90% или более, в некоторых случаях приблизительно на 100%, т.е. до максимальных величин, и в некоторых случаях обращать понижение синаптической пластичности и утрату синапсов, которая происходит в процессе естественного старения или при прогрессировании связанного со старением расстройства. Другими словами, клетки, подвергнутые контакту с эффективным количеством продукта на основе крови, будут становиться более отзывчивыми ко внешним стимулам, например, связанным с активностью внешним стимулам, которые стимулируют образование и сохранение синапсов.

Улучшение синаптической пластичности может наблюдаться *in vitro* и *in vivo* в виде индуцирования долговременной потенциации. Например, индуцирование LTP в нейронных сетях может наблюдаться у бодрствующих субъектов, например, с помощью способов неинвазивного стимулирования, применяемых в отношении бодрствующих субъектов, для индуцирования LTP-подобных долговременных изменений локализованной нейронной активности (Cooke SF, Bliss TV (2006) Plasticity in the human central nervous system. *Brain*. 129(Pt 7): 1659-73); картирования пластичности и повышенной активности нейронной сети у субъектов, например, с применением позитрон-эмиссионной томографии, функционального магнитно-резонансного сканирования и/или транскраниальной магнитной стимуляции (Cramer and Bastings (2000) Mapping clinically relevant plasticity after stroke. *Neuropharmacology*. 39(5): 842-51); и с помощью детектирования нейронной пластичности после обучения, т.е. улучшений памяти, например, путем анализа связанной с получением активности мозга (Buchmann A., et al. (2008) Prion protein M129V polymorphism affects retrieval-related brain activity. *Neuropsychologia*. 46(9):2389-402) или, например, с помощью сканирования ткани мозга с применением функционального магнитно-резонансного сканирования (фМРС) с последующим репетиционным праймингом с использованием знакомых и незнакомых объектов (Soldan A., et al. (2008) Global familiarity of visual stimuli affects repetition-related neural plasticity but not repetition priming. *Neuroimage*. 39(1):515-26; Soldan A., et al. (2008) Aging does not affect brain patterns of repetition effects associated with perceptual priming of novel objects. *J. Cogn Neurosci*. 20(10): 1762-76). В

некоторых вариантах осуществления данный способ включает этап измерения синаптической пластичности и детектирования сниженной скорости утраты синаптической пластичности, стабилизации синаптической пластичности и/или повышения синаптической пластичности после введения продукта на основе крови по сравнению с синаптической пластичностью субъекта до введения продукта на основе крови. Такие измерения могут быть проведены спустя неделю или большее время после введения продукта на основе крови, например спустя 1 неделю, 2 недели, 3 недели или более, например 4 недели, 6 недель или 8 недель или более, например 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев или 6 месяцев или более.

Результат расчета эффективного количества предназначенного для введения продукта на основе крови может варьироваться. Конечное предназначенное для введения количество будет зависеть от вводимого продукта на основе крови, способа введения и природы подвергаемого лечению расстройства или состояния. В некоторых случаях продукт на основе крови вводят однократно. В других случаях продукт на основе крови вводят несколько раз, например регулярно, например еженедельно, ежемесячно, два раза в год или один раз в год. Например, продукт на основе крови могут вводить еженедельно в течение 2 недель или более, например 3 недель, 4 недель, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, более 8 недель и т.д. В качестве другого примера продукт на основе крови могут вводить ежемесячно, например в течение 2 месяцев или более, например 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 месяцев или более 12 месяцев. В качестве другого примера продукт на основе крови могут вводить два раза в год или один раз в год. Специалистам в данной области будет очевидно, что в течение указанных периодов времени может быть введена исходная доза и далее могут быть введены вспомогательные дозы, которые в некоторых случаях будут являться сниженными.

В некоторых вариантах осуществления продукт на основе крови субъекта может быть получен в комбинации с активным ингредиентом, имеющим активность, подходящую для лечения связанного со старением когнитивного нарушения. Например, было показано, что ряд активных агентов обладает некоторой эффективностью в плане лечения когнитивных симптомов болезни Альцгеймера (например, потери памяти, замешательства и проблем с мышлением и рассуждением), например ингибиторы холинэстеразы (например, донепезил, ривастигмин, галантамин, такрин), мемантин и витамин E. В качестве другого примера было показано, что ряд агентов обладает некоторой эффективностью в плане лечения поведенческих или психиатрических симптомов болезни Альцгеймера, например циталопрам (Целекса), флуоксетин (Прозак), пароксефин (Паксил), сертралин (Золофт), тразодон (Дезирел), лоразепам (Ативан), оксазепам (Серакс), арипипразол (Абилифай), клозапин (Клозарил), галоперидол (Галдол), оланзапин (Зипрекса), кветиапин (Сероквель), рисперидон (Риспердал) и zipразидон (Геодон). В некоторых вариантах осуществления продукт на основе крови субъекта вводят до второго агента. В некоторых вариантах осуществления продукт на основе крови субъекта вводят после второго агента. В некоторых вариантах осуществления продукт на основе крови субъекта вводят совместно со вторым агентом. В определенных подобных вариантах осуществления продукт на основе крови субъекта включает один или несколько данных дополнительных агентов.

В некоторых аспектах настоящих способов способ также включает этап измерения познавательной способности и/или синаптической пластичности после лечения, например, с применением способов, которые описаны здесь или известны из уровня техники, и определение того, что скорость когнитивного снижения или утраты синаптической пластичности была снижена и/или что когнитивная способность или синаптическая пластичность были повышены у субъекта. В некоторых подобных случаях данное определение осуществляют путем сравнения результатов тестирования познавательной способности или синаптической пластичности с результатами теста, проведенного у того же субъекта в более раннее время, например на 2 недели раньше, на 1 месяц раньше, на 2 месяца раньше, на 3 месяца раньше, на 6 месяцев раньше, на 1 год раньше, на 2 года раньше, на 5 лет раньше или на 10 лет раньше или более.

В некоторых вариантах осуществления настоящие способы также включают диагностирование субъекта в качестве имеющего когнитивное нарушение, например, с применением способов, которые описаны здесь или известны в данной области, для измерения познавательной способности и синаптической пластичности перед введением субъекту включающего плазму продукта на основе крови. В некоторых случаях данное диагностирование будет включать измерение познавательной способности и/или синаптической пластичности и сравнение результатов теста познавательной способности или синаптической пластичности с одним или несколькими контролями, например положительным контролем и/или отрицательным контролем. Например, контроль может представлять собой результаты теста, пройденного одним или несколькими субъектами одного возраста, которые испытывают связанные с возрастом когнитивные нарушения (т.е. положительные контроли) или не испытывают связанные с возрастом когнитивные нарушения (т.е. отрицательные контроли). В качестве другого примера контроль может представлять собой результаты теста, пройденного тем же субъектом в более раннее время, например на 2 недели раньше, на 1 месяц раньше, на 2 месяца раньше, на 3 месяца раньше, на 6 месяцев раньше, на 1 год раньше, на 2 года раньше, на 5 лет раньше или на 10 лет раньше или более.

В некоторых вариантах осуществления настоящие способы также включают диагностирование субъекта в качестве имеющего связанное со старением заболевание, например болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, лобно-височную деменцию, прогрессирующий надъядерный паралич, болезнь Хан-

тингтона, боковой амиотрофический склероз, спинальную мышечную атрофию, рассеянный склероз, системную атрофию, глаукому, атаксию, миотоническую дистрофию, деменцию и им подобные. Способы диагностики данных связанных со старением заболеваний хорошо известны в данной области, при этом любые из них могут применяться средним специалистом в данной области для диагностирования субъекта. В некоторых вариантах осуществления настоящие способы также включают диагностирование субъекта в качестве имеющего связанное со старением заболевание и в качестве имеющего когнитивное нарушение.

Как указано выше, аспекты изобретения также включают лечение связанных со старением состояний у субъекта, которые не являются состояниями связанного со старением когнитивного нарушения. Например, аспекты изобретения включают введение включающих молодую плазму продуктов для лечения связанного со старением ухудшения функционирования периферических органов. Как показано в разделе "Примеры" ниже, связанные с омоложением и регенерацией эффекты включающих молодую плазму продуктов наблюдали в мышцах, печени, мозге, сердце и поджелудочной железе. В некоторых вариантах осуществления периферический орган, который получит пользу от введения молодой плазмы, будет включать, без ограничения, мышцы, печень, мозг, сердце, поджелудочную железу, а также другие периферические органы. В некоторых вариантах осуществления орган, который получит пользу от системного введения плазмы, будет представлять собой кровь реципиента. В частности, факторы межклеточных связей, которые изменяются с возрастом, будут восстановлены до более молодых уровней; например воспалительные факторы, которые повышаются с возрастом, будут снижены, в то время как трофические факторы, которые снижаются с возрастом, будут повышены.

В некоторых случаях данные способы приводят к изменению уровней экспрессии одного или нескольких генов в одной или нескольких тканях хозяина, например, по сравнению с подходящим контролем (таким как описанный в разделе "Примеры" ниже). Изменение уровня экспрессии определенного гена может являться 0,5-кратным или более, например 1,0-кратным или более, включая 1,5-кратное или более. Ткань может варьироваться, и в некоторых случаях представлять собой ткань нервной системы, например ткань центральной нервной системы, включая ткань мозга, например ткань гиппокампа. В некоторых случаях один или несколько генов, чья экспрессия подвергается модулированию, например, является повышенной, представляет собой ген, кодирующий продукт, который является членом связанного с пластичностью сигнального пути (т.е. ген, регулирующий синаптическую пластичность), например Tlr4, Grial, Kcnj10, Kdr, Ncam, Sdfl, Egr1, Fos белки, например c-Fos, Drd1a, Stxbpl, Mef2c, Cntn2, Junb, Bdnf и CamK2a и т.д. В некоторых случаях модулирование генной экспрессии в гиппокампе выражается в виде повышенной пластичности гиппокампа, например, по сравнению с подходящим контролем. В некоторых случаях один или несколько генов, чья экспрессия подвергается модулированию, например, является повышенной, представляет собой ген, кодирующий продукт, который является членом сети, связанной с синаптической пластичностью и обучением и памятью, такой как, без ограничения, RELN, NTRK3, ERNA4 и т.д.

В некоторых случаях лечение приводит к повышению уровней экспрессии одного или нескольких белков в одной или нескольких тканях хозяина, например, по сравнению с подходящим контролем (таким как описанный в разделе "Примеры" ниже). Изменение уровня белка может являться 0,5-кратным или более, например 1,0-кратным или более, включая 1,5-кратное или более, при этом в некоторых случаях уровень может достигать уровня здорового субъекта дикого типа, например 50% или менее, например 25% или менее, включая 10% или менее, например 5% или менее уровня здорового субъекта дикого типа. Ткань может варьироваться и в некоторых случаях представлять собой ткань нервной системы, например ткань центральной нервной системы, включая ткань мозга, например ткань гиппокампа. Представляющие интерес белки-мишени включают, без ограничения, синаптические белки, например, синаптофизин, кальций-связывающие белки, например калбиндин.

В некоторых случаях данные способы приводят к одному или нескольким структурным изменениям в одной или нескольких тканях. Ткань может варьироваться и в некоторых случаях представлять собой ткань нервной системы, например ткань центральной нервной системы, включая ткань мозга, например ткань гиппокампа. Представляющие интерес структурные изменения включают повышение плотности дендритных шипиков зрелых нейронов в зубчатой извилине (DG) гиппокампа, например, по сравнению с подходящим контролем. В некоторых случаях модулирование структуры гиппокампа проявляется в виде повышенного образования синапсов, например, по сравнению с подходящим контролем. В некоторых случаях данные способы могут приводить к повышению долговременной потенциации, например, по сравнению с подходящим контролем.

В некоторых случаях данные способы могут приводить к повышению обучаемости и памяти, например, по сравнению с подходящим контролем. Улучшение в плане обучаемости и памяти может быть оценено с помощью ряда различных способов, например способов на основе контекстно-зависимого страха и/или радиального лабиринта с водой (RAWM), описанных в разделе "Примеры" ниже. При измерении с применением контекстно-зависимого страха лечение в некоторых случаях к увеличенному замиранию при тестировании памяти, которая связана с контекстом, но не внешним стимулом. При измерении с помощью RAWM, лечение приводит в некоторых случаях к увеличенной обучаемости и

памяти о расположении платформы на стадии тестирования в рамках данной задачи. В некоторых случаях лечение проявляется в виде повышенного когнитивного улучшения в плане зависящей от гиппокампа обучаемости и памяти, например, по сравнению с подходящим контролем.

В некоторых случаях лечение в соответствии с описанными здесь способами приводит к системным изменениям в плане белков межклеточного взаимодействия в крови, при этом данные изменения могут обладать плейотропными полезными эффектами на множество тканей. Представляющие интерес белки, уровни которых могут быть повышены после лечения с возникновением благотворного эффекта, включают, без ограничения, факторы роста, включая IL-22, LIF и т.д.

Аспекты изобретения также включают способы скрининга композиций-кандидатов на предмет активности в плане лечения связанных со старением состояний, например на возможность применения в рамках способов по изобретению. Варианты осуществления способов включают введение композиции-кандидата подходящему животному-модели и оценку животного-модели после введения для анализа наличия требуемой активности у композиции-кандидата. Представляющие интерес животные-модели включают модели на основе не являющихся человеком млекопитающих, например мышей, которые способны переносить продукты крови человека, например плазму, с возникновением неблагоприятных эффектов, связанных с иммунной реакцией. Такие животные включают модели на основе мышей, которые не имеют функциональную иммунную систему, таких как NOD/SCID (NSG) мыши (Shultz et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J. Immunol.* 174, 6477-6489 (2005)). Композиция-кандидат может представлять собой любую композицию, такую как, но без ограничения, описанные выше продукты на основе крови. Животные могут быть подвергнуты анализу с помощью ряда различных способов, включая анализ уровня генной экспрессии, уровень белков, структурный уровень и поведенческий уровень, например, с применением любого из данных анализов и описанных здесь протоколов.

Применение

Настоящие способы и включающие молодую плазму продукты на основе крови могут применяться при лечении, включая профилактику, связанных со старением состояний у субъектов, таких как нарушения в плане когнитивной способности. Субъекты, страдающие или имеющие риск развития связанного со старением когнитивного нарушения, которые получают пользу от лечения настоящим включающим плазму продуктом на основе крови, например, с помощью описанных здесь способов, включают субъектов в возрасте около 50 лет или более, например 60 лет или более, 70 лет или более, 80 лет или более и, как правило, не более 100 лет, т.е. в возрасте от около 50 до около 100 лет, например в возрасте около 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или около 100 лет, и которые страдают когнитивным нарушением, связанным с процессом естественного старения, например легким когнитивным нарушением (ЛКН); и субъектов в возрасте около 50 лет или более, например 60 лет или более, 70 лет или более, 80 лет или более и, как правило, не более 100 лет, т.е. в возрасте от около 50 до около 100 лет, например в возрасте около 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или около 100 лет, которые еще не начали демонстрировать симптомы когнитивного нарушения. Примеры когнитивных нарушений, которые вызываются естественным старением, включают следующие.

Легкое когнитивное нарушение (ЛКН) представляет собой среднее ухудшение познавательной способности, которое проявляется в виде проблем с памятью или другими умственными функциями, такими как планирование, следование инструкциям или принятие решений, которые ухудшаются с течением времени, в то время как общая умственная функция и повседневная активность не затронута. Таким образом, несмотря на то, что обширная гибель нейронов обычно не наблюдается, нейроны в стареющем мозге являются уязвимыми в плане сублетальных связанных со старением изменений структуры, синаптической связности и молекулярного процессинга в синапсе, все из которых ухудшают когнитивную функцию.

Субъекты, страдающие или имеющие риск развития связанного со старением когнитивного нарушения, которые получают пользу при лечении настоящим включающим плазму продуктом на основе крови, например, с помощью описанных здесь способов, также включают субъектов любого возраста, которые страдают когнитивным нарушением вследствие связанного со старением заболевания; и субъектов любого возраста, которые были диагностированы в качестве имеющих связанное со старением заболевание, которое обычно сопровождается когнитивным нарушением, при этом субъект еще не начал демонстрировать симптомы когнитивного нарушения. Примеры данных связанных со старением заболеваний включают следующие.

Болезнь Альцгеймера (БА). Болезнь Альцгеймера представляет собой прогрессирующую неуклонную утрату когнитивной функции, связанную с избыточным количеством старческих бляшек в коре головного мозга и подкоркового серого вещества, которое также содержит β -амилоидные и нейрофибрилярные сплетения, состоящие из тау-белка. Обычная форма поражает субъектов в возрасте >60 лет, при этом частота возникновения повышается с увеличением возраста. Она отвечает за 65% случаев деменции у пожилых.

Причина болезни Альцгеймера неизвестна. Заболевание имеет семейную историю примерно в от 15 до 20% случаев. Остальные, так называемые спорадические случаи, имеют некоторые генетические де-

терминанты. Заболевание обладает аутосомным доминантным генетическим паттерном в большинстве случаев раннего развития и некоторых случаях позднего развития, но варьирующуюся частоту возникновения в поздние годы жизни. В фокусе активного исследования находятся факторы внешней среды.

При течении заболевания утрачиваются синапсы и, в конце концов, нейроны коры головного мозга, гиппокампа в подкорковых структурах (включая утрату некоторых клеток в базальном ядре Мейнерта), голубоватого пятна и ядра шва. Использование глюкозы мозгом и перфузия являются сниженными в некоторых участках мозга (теменной доле и височной коре на ранней стадии заболевания, префронтальной коре на поздней стадии заболевания). Аксональные и сенильные бляшки (состоящие из аксонов, астроцитов и глиальных клеток вокруг амилоидного ядра) и нейрофибриллярные сплетения (состоящие из спаренных спиралевидных волокон) играют роль в патогенезе болезни Альцгеймера. Сенильные бляшки и нейрофибриллярные сплетения возникают при нормальном старении, однако они намного более распространены у субъектов с болезнью Альцгеймера.

Болезнь Паркинсона. Болезнь Паркинсона (БП) представляет собой идиопатическое, медленно прогрессирующее дегенеративное заболевание ЦНС, характеризующееся замедленным и пониженным движением, мышечной ригидностью, тремором в покое и нестабильностью осанки. Первоначально рассматриваемое в качестве преимущественно двигательного заболевания БП в настоящее время считают также затрагивающей познавательную способность, поведение, сон, вегетативную функцию и сенсорную функцию. Наиболее частые когнитивные нарушения включают нарушение внимания и концентрации, рабочей памяти, исполнительской функции, продуцирование языка и восприятие пространственного соотношения между объектами.

При первичной болезни Паркинсона пигментированные нейроны черного вещества, голубоватого пятна и другие группы дофаминергических стволовых клеток мозга утрачиваются. Причина неизвестна. Утрата нейронов черного вещества, которые располагаются до хвостатого ядра и путамена, приводит к уменьшению количества нейротрансмиттера дофамина в данных участках. Развитие, как правило, начинается после 40 лет, при этом повышенная частота присуща старшим возрастным группам.

Вторичный паркинсонизм возникает вследствие утраты или вмешательства в работу дофамина в базальном ганглии вследствие иных идиопатических дегенеративных заболеваний, лекарств или экзогенных токсинов. Наиболее частой причиной вторичного паркинсонизма является потребление антипсихотических лекарств или резерпина, который продуцирует паркинсонизм вследствие блокирования дофаминовых рецепторов. Менее частые причины включают отравление угарным газом или марганцем, гидроцефалию, структурные поражения (опухоли, инфаркты, затрагивающие средний мозг или базальный ганглий), субдуральную гематому и дегенеративные заболевания, включая стрионигральную дегенерацию.

Лобно-височная деменция. Лобно-височная деменция (ЛВД) представляет собой состояние, возникающее вследствие прогрессирующего повреждения лобной доли мозга. С течением времени данное повреждение может затрагивать височную долю. Уступая по распространенности только болезни Альцгеймера (АД), ЛВД составляет 20% случаев пресенильной деменции. Симптомы классифицируют на три группы на основе затронутых функций лобной и височной долей: Симптомы поведенческой ЛВД (пЛВД) включают летаргию и спонтанные движения одной руки и растормаживание другой руки; прогрессирующую экспрессивную афазию (ПСА), при которой наблюдается ухудшение речи вследствие сложности произношения, фонологических и/или синтаксических ошибок, но сохраняется понимание слов; и семантическую деменцию (СД), при которой пациенты сохраняют способность говорить с нормальной фонологией и синтаксисом, но имеют повышенные трудности при назывании предметов и понимании слов. Другие когнитивные симптомы, присущие всем пациентам с ЛВД, включают нарушение исполнительской функции и способности фокусироваться. Другие когнитивные способности, включая восприятие, пространственные навыки, память и праксис, обычно сохраняются. ЛВД может быть диагностирована в случае наблюдения выявленной атрофии лобной доли и/или передней височной доли при МРТ сканировании.

Существует ряд форм ЛВД, любая из которых может подвергаться лечению или профилактике с применением настоящих способов и композиций. Например, одна форма лобно-височной деменции представляет собой семантическую деменцию (СД). СД характеризуется утратой семантической памяти в речевом и неречевом отделах. Пациенты с СД часто жалуются на трудности, связанные со вспоминанием слов. Клинические признаки включают беглую афазию, аномию, нарушение понимания значения слов и ассоциативная визуальная агнозия (неспособность сравнивать семантически связанные картины или объекты). При прогрессировании заболевания часто наблюдаются поведенческие и личностные изменения, аналогичные тем, которые встречаются при лобно-височной деменции, хотя были описаны случаи "чистой" семантической деменции несколькими поздними поведенческими симптомами. Структурное МРТ сканирование показывает характерный паттерн атрофии в височных долях (в основном слева) с более крупным поражением снизу, чем сверху и большей атрофией передней области височной доли, чем задней.

В качестве другого примера рассматривается иная форма лобно-височной деменции, которая представляет собой болезнь Пика (БПи, также БПк). Характерной особенностью данного заболевания является

ся повышение количества тау-белков в нейронах, накопление в виде серебристых сферических образований, известных как "тельца Пика". Симптомы включают утрату речи (афазия) и деменцию. Пациенты с орбитофронтальной дисфункцией могут становиться агрессивными и асоциальными. Они могут воровать или демонстрировать навязчивое или повторяющееся стереотипное поведение. Пациенты с дорсомедиальной или дорсолатеральной фронтальной дисфункцией могут демонстрировать недостаток интереса, апатию или пониженную спонтанность. Пациенты могут демонстрировать отсутствие самоконтроля, ненормальное самосознание и неспособность оценивать смысл. Пациенты с утратой серого вещества в билатеральной дорсолатеральной орбитофронтальной коре и правом переднем островке могут демонстрировать изменения в пищевом поведении, такие как патологическое пристрастие к сладкому. У пациентов с более фокальной утратой серого вещества в переднелатеральной орбитофронтальной коре может развиваться гиперфагия. В то время как некоторые из данных симптомов первоначально могут быть облегчены, заболевание прогрессирует и пациенты зачастую умирают в течение периода от двух до десяти лет.

Болезнь Хантингтона. Болезнь Хантингтона (БХ) представляет собой наследственное прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся развитием эмоциональных, поведенческих и психиатрических нарушений; утратой интеллектуальной или когнитивной функции; двигательными нарушениями (расстройства движения). Классические признаки БХ включают развитие хорей - невольных быстрых нерегулярных отрывистых движений, которые могут затрагивать лицо, руки, ноги или туловище, а также когнитивное ухудшение, включая постепенную утрату мыслительной активности и приобретенных интеллектуальных способностей. Могут присутствовать нарушение памяти, абстрактного мышления и суждения, неправильное восприятие времени, места или идентичности (дезориентация), повышенная возбудимость и изменения личности (распад личности). Несмотря на то, что симптомы, как правило, становятся заметными в период четвертого или пятого десятилетия жизни, возраст возникновения варьируется в диапазоне от раннего детства до позднего взрослого возраста (например, 70 или 80 лет).

БХ передается в семьях в качестве аутосомного доминантного признака. Заболевание возникает в результате необычно длинных последовательностей "повторов" закодированных инструкций в гене на хромосоме 4 (4p16.3). Прогрессирующая утрата функции нервной системы, связанная с БХ, связана с утратой нейронов в определенных участках мозга, включая базальный ганглий и кору головного мозга.

Боковой амиотрофический склероз. Боковой амиотрофический склероз (БАС) представляет собой быстро прогрессирующее неизменно смертельное неврологическое заболевание, которое поражает моторные нейроны. Мышечная слабость и атрофия и признаки дисфункции клеток передних рогов спинного мозга первоначально наиболее часто отмечаются в области кистей рук и реже в области ступней. Участок возникновения является случайным, а прогрессирование является асимметричным. Судороги являются распространенным явлением и могут предшествовать слабости. В редких случаях пациент проживает 30 лет; 50% умирают в течение 3 лет после начала заболевания, 20% живут 5 лет и 10% живут 10 лет. Диагностические признаки включают возникновение в среднем и позднем периоде взрослой жизни и прогрессирующее общее двигательное поражение без сенсорных нарушений. Скорость нервной проводимости является нормальной до поздней стадии заболевания. Недавние исследования позволили также обнаружить презентацию когнитивных нарушений, в частности ухудшение непосредственной вербальной памяти, визуальной памяти, языковой и исполнительской функции.

Снижение площади тела клеток, количества синапсов и общей длины синапсов было отмечено даже в нормально выглядящих нейронах пациентов с БАС. Было сделано предположение, что когда пластичность активной зоны достигает предела, непрерывная утрата синапсов может вести к функциональному нарушению. Стимулирование образования новых синапсов или предотвращение утраты синапсов может поддерживать функционирование нейронов у данных пациентов.

Рассеянный склероз. Рассеянный склероз (РС) характеризуется различными симптомами и признаками дисфункции ЦНС с ремиссиями и повторяющимися обострениями. Наиболее частыми симптомами являются парестезии в одной или нескольких конечностях, в туловище или на одной стороне лица; слабость или неуклюжесть ноги или руки; или визуальные нарушения, например частичная слепота или боль в одном глазу (ретробульбарный оптический неврит), тусклость зрения или скотома. Стандартные когнитивные нарушения включают нарушения памяти (извлечение, сохранение и поиск новой информации), внимания и концентрации (в частности рассеянное внимание), обработки информации, исполнительных функций, восприятия пространственного соотношения между объектами и вербальной функции. Стандартные ранние симптомы представляют собой паралич глазодвигательного нерва, приводящий к двоению в глазах (диплопии), временной слабости в одной или нескольких конечностях, небольшое жесткости или необычной утомляемости в одной конечности, небольших нарушениях походки, сложности в плане контролирования мочевого пузыря, головокружение и легкие эмоциональные нарушения; все из которых свидетельствуют о множественном поражении ЦНС и часто возникают за несколько месяцев или лет до диагностирования заболевания. Избыточное тепло может подчеркивать симптомы и признаки.

Течение является крайне отличающимся, непредсказуемым и у большинства пациентов перемежающимся. Сначала месяцы или годы ремиссии могут разделять отдельные эпизоды, особенно при нача-

ле заболевания ретробульбарным оптическим невритом. Тем не менее, некоторые пациенты имеют частые приступы и быстро становятся нетрудоспособными; у некоторых течение может быстро прогрессировать.

Глаукома. Глаукома представляет собой частое нейродегенеративное заболевание, которое поражает клетки ганглиев сетчатки (КГС). Доказательство поддерживает гипотезу о существовании ограниченных дегенеративных программ в синапсах и дендритах, в том числе в КГС. Полученное недавно доказательство также указывает на корреляцию между когнитивным нарушением у пожилых субъектов и глаукомой (Yochim B.P., et al. Prevalence of cognitive impairment, depression, and anxiety symptoms among older adults with glaucoma. *J. Glaucoma*. 2012; 21(4):250-254).

Миотоническая дистрофия. Миотоническая дистрофия (МД) представляет собой аутосомальное преобладающее системное заболевание, характеризующееся слабостью дистрофических мышц и миотонией. Данный молекулярный дефект представляет собой удлинённый тринуклеотидный (СТГ) повтор в 3' не подвергнутом трансляции остатке гена миотонин-протеинкиназы в хромосоме 19q. Симптомы могут возникать в любом возрасте, при этом диапазон клинической тяжести заболевания является широким. Миотония проявляется в мышцах кистей рук, при этом опоптоз является распространённым даже в легких случаях. В тяжелых случаях возникает слабость определенных периферических мышц, зачастую с катарактами, преждевременное облысение, худое лицо, атрофия яичек и эндокринные нарушения (например, сахарный диабет). При тяжелых врожденных формах наблюдается умственная отсталость, в то время как связанное со старением понижение лобных и височных когнитивных функций, в частности языка и исполнительных функций, наблюдается при более легких взрослых формах заболевания. Субъекты с тяжелой формой заболевания умирают в возрасте чуть более 50 лет.

Деменция. Термин "деменция" описывает класс заболеваний, сопровождающихся симптомами, затрагивающими мыслительные и социальные навыки настолько серьезным образом, что они препятствуют повседневной жизни. Другие примеры деменции, помимо деменции, наблюдаемой на поздних стадиях описанных выше связанных со старением заболеваний, включают сосудистую деменцию и описанную ниже деменцию с тельцами Леви.

При сосудистой деменции или "мультиинфарктной деменции" когнитивное нарушение вызывается проблемами, связанными с поступлением крови в мозг, обычно в виде серии малых инсультов или иногда одного крупного инсульта с предшествующими или последующими другими малыми инсультами. Поражения сосудов могут являться результатом диффузного цереброваскулярного заболевания, такого как заболевание малых сосудов или очаговые поражения или ими обоими. У пациентов, страдающих сосудистой деменцией, развивается когнитивное нарушение в острой или подострой форме после острого цереброваскулярного события, после чего наблюдается прогрессирующее когнитивное ухудшение. Когнитивные ухудшения аналогичны наблюдаемым при болезни Альцгеймера, включая нарушения речи, памяти, комплексной визуальной функции или исполнительной функции, несмотря на то, что соответствующие изменения в мозге связаны не с патологией вследствие БА, а с хроническим пониженным кровотоком в мозге, который в конце концов приводит к деменции. Для подтверждения диагностированной мультиинфарктной деменции, может применяться однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ) и позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) наряду с тестированием, включающим оценку умственного статуса.

Деменция с тельцами Леви (ДТЛ, также известная под множеством других названий, включая деменцию, сопровождающуюся тельцами Леви, диффузное заболевание с тельцами Леви, кортикальное заболевание с тельцами Леви и сенильную деменцию типа Леви) представляет собой тип деменции, анатомически характеризующийся присутствием телец Леви (скоплениями α -синуклеина и белка убиквитина) в нейронах, которое детектируется на основе гистологии мозга при вскрытии. Его первичный признак представляет собой когнитивное ухудшение, в частности, в плане исполнительной функции. Внимание и кратковременная память будут увеличиваться и уменьшаться. Зачастую ранним диагностическим симптомом являются постоянные или повторяющиеся визуальные галлюцинации с яркими и подробными картинками. ДТЛ при ее ранних стадиях часто путают с болезнью Альцгеймера и/или сосудистой деменцией, хотя в то время как болезнь Альцгеймера обычно начинается достаточно постепенно, ДТЛ зачастую присуще быстрое или острое развитие. Симптомы ДТЛ также включают двигательные симптомы, аналогичные присущим болезни Паркинсона. ДТЛ отличают от деменции, которая иногда возникает при болезни Паркинсона, на основе периода времени, в течение которых проявляются симптомы деменции по сравнению с симптомами болезни Паркинсона. Болезнь Паркинсона с деменцией (БПД) диагностируют в случае, если деменция развивается за более чем один год до развития болезни Паркинсона. ДТЛ диагностируют, если когнитивные симптомы возникают в то же самое время или в течение одного года после симптомов болезни Паркинсона.

Прогрессирующий надъядерный паралич. Прогрессирующий надъядерный паралич (ИНН) представляет собой заболевание мозга, которое вызывает серьезные и прогрессирующие проблемы в плане контролирования походки и равновесия наряду со сложными движениями глаз и проблемами, связанными с мышлением. Один из классических признаков заболевания представляет собой неспособность управлять направлением взгляда, которая возникает вследствие поражений в участке мозга, который

контролирует движение глаз. Некоторые субъекты описывают данный эффект как размытость. Пораженные субъекты зачастую демонстрируют изменения настроения и поведения, включая депрессию и апатию, а также прогрессирующую легкую деменцию. Длинное название заболевания указывает на то, что заболевание развивается медленно и его степень непрерывно ухудшается (прогрессирующий) и вызывает слабость (паралич) вследствие повреждения определенных частей мозга над структурами размером с горошину, называемыми ядрами, которые контролируют движение глаз (надъядерный). ИНН был впервые описан в качестве отдельного заболевания в 1964 г., когда три ученых опубликовали статью, в которой данное состояние было отделено от болезни Паркинсона. Его иногда называют синдромом Стила-Ричардсона-Ольшевского, что соответствует комбинации имен ученых, давших определение данного заболевания. Несмотря на прогрессирующее ухудшение ИНН, никто не умирает от самого ИНН.

Атаксия. Субъекты с атаксией имеют проблемы с координацией, поскольку поражаются части нервной системы, которые контролируют движение и равновесие. Атаксия может поражать пальцы, кисти рук, руки, ноги, тело, речь и движение глаз. Слово "атаксия" зачастую используют для описания симптома, связанного с отсутствием координации, который может быть ассоциирован с инфекциями, ранениями, другими заболеваниями или дегенеративными изменениями в центральной нервной системе. Термин "атаксия" также используют для описания группы специфичных дегенеративных заболеваний нервной системы, называемых наследственными и спорадическими атаксиями, которые являются основными предметами Национальной организации по изучению атаксии.

Множественная системная атрофия. Множественная системная атрофия (МСА) представляет собой дегенеративное неврологическое заболевание. МСА связана с дегенерацией нервных клеток в определенных участках мозга. Данная клеточная дегенерация вызывает проблемы с движением, равновесием и другими автономными функциями организма, такими как контроль мочевого пузыря или регулирование кровяного давления. Причина МСА неизвестна, при этом не были идентифицированы конкретные факторы риска. Около 55% случаев встречаются у мужчин, при этом средний возраст развития составляет от конца 50 до начала 60 лет. МСА зачастую сопровождается некоторыми из тех же симптомов, что и болезнь Паркинсона. Тем не менее, пациенты с МСА в целом демонстрируют минимальную, если она вообще присутствует, чувствительность к лекарствам на основе дофамина, которые применяют при лечении болезни Паркинсона.

В некоторых вариантах осуществления настоящие способы и композиции могут применяться для замедления развития связанного со старением когнитивного нарушения. Другими словами, когнитивные способности у субъекта будут ухудшаться более медленно после лечения с применением описанных способов, чем до или при отсутствии лечения с применением описанных способов. В некоторых подобных случаях настоящие способы лечения включают измерение прогрессирования когнитивного ухудшения после лечения и определение того, что прогрессирование когнитивного ухудшения является сниженным. В некоторых подобных случаях данное определение осуществляют путем сравнения с контролем, например со степенью когнитивного ухудшения у субъекта до лечения, например, при определении на основе измерения познавательной способности за два или более момента времени до введения настоящего продукта на основе крови.

Описанные способы и композиции также могут применяться для стабилизации когнитивных способностей субъекта, например субъекта, страдающего связанным со старением когнитивным ухудшением, или субъекта, имеющего риск развития связанного со старением когнитивного ухудшения. Например, субъект может демонстрировать некоторое связанное со старением когнитивное ухудшение, при этом прогрессирование когнитивного ухудшения, наблюдаемое до лечения с применением описанных способов, будет остановлено после лечения с применением описанных способов. В качестве другого примера субъект может иметь риск развития связанного со старением когнитивного ухудшения (например, субъект может быть в возрасте 50 лет или более, или у него может быть диагностировано связанное со старением заболевание), при этом когнитивные способности субъекта являются, по существу, неизменными, т.е. когнитивное ухудшение не детектируется, после лечения с применением описанных способов по сравнению с его состоянием до лечения с применением описанных способов.

Описанные способы и композиции могут применяться для снижения когнитивного ухудшения у субъекта, страдающего связанным со старением когнитивным нарушением. Другими словами, когнитивная способность у субъекта подвергается улучшению после лечения с применением описанных способов. Например, когнитивная способность у субъекта подвергается улучшению, например 2-кратному или более, 5-кратному или более, 10-кратному или более, 15-кратному или более, 20-кратному или более, 30-кратному или более или 40-кратному или более, включая 50-кратное или более, 60-кратное или более, 70-кратное или более, 80-кратное или более, 90-кратное или более или 100-кратное или более. В некоторых случаях лечение с применением описанных способов и композиций восстанавливает когнитивную способность у субъекта, страдающего связанным со старением когнитивным ухудшением, например, до ее уровня, когда пациент был в возрасте около 40 лет или менее. Другими словами, когнитивное нарушение устраняется.

Реагенты, устройства и наборы

Изобретение также относится к реагентам, устройствам и их наборам для реализации на практике

одного или нескольких описанных выше способов. Описанные реагенты, устройства и их наборы могут сильно различаться. Представляющие интерес реагенты и устройства включают указанные выше в плане способов получения включающего плазму продукта на основе крови для переливания нуждающемуся в этом субъекту, например антикоагулянты, криоконсерванты, буферы, изотонические растворы и так далее.

Интерес также представляют устройства, такие как стерильные картриджи или колонки, включающие матрикс, который будет сохранять или задерживать поток белков, имеющих среднюю молекулярную массу 3,5 кДа или менее. Подобный картридж будет включать: (i) входное отверстие, (ii) эксклюзивный матрикс, (iii) выходное отверстие, (iv) корпус, который содержит матрикс, и (v) путь протекания жидкости через корпус, который соединяет входное отверстие с выходным. Картридж может включать опору, включающую по меньшей мере одну проводящую жидкость мембрану, один или несколько пористых слоев или множество частиц. Опора может быть образована отдельно от корпуса или в виде его непосредственной части и может быть изготовлена из любого подходящего материала, включая, например, алюминий, целлюлозу, декстран, полиакриламид, полиакрилат, полиамид или кварц. Картридж может быть сконфигурирован для разделения путем мембранной фильтрации или колоночной хроматографии и может иметь возможность связывать подходящее количество белка, например несколько граммов белка. Асептическая упаковка может окружать картридж для сохранения его, входного отверстия и выходного отверстия в стерильных и апиrogenных условиях. Корпус может иметь подходящий размер для включения объема около 200-500 мл. Также предусмотрены более крупные картриджи, например для фильтрации больших объемов продукта на основе крови. Части картриджа (например, входное отверстие, выходное отверстие и корпус) могут быть изготовлены из стекла, полипропилена, полистирола или нержавеющей стали. Внешняя помпа может обеспечивать подачу линейного давления через гибкую трубку в картридж и, таким образом, контролировать скорость потока жидкой фазы через матрикс и колонку.

Также предусмотрены наборы, включающие данные реагенты и/или картриджи. Наборы могут также включать пакеты для сбора крови, трубки, иглы, пробирки для центрифугирования и им подобные.

В других вариантах осуществления описанные здесь наборы включают два или более контейнера с включающим молодую плазму продуктом, например три или более, четыре или более, пять или более, включая шесть или более контейнеров с включающим молодую плазму продуктом. В некоторых случаях количество отдельных контейнеров с включающим молодую плазму продуктом в наборе может составлять 9 или более, 12 или более, 15 или более, 18 или более, 21 или более, 24 или более, 30 или более, включая 36 или более, например 48 или более. Каждый контейнер может иметь связанную с ним идентификационную информацию, которая включает различные данные, связанные с содержащимся в нем включающим молодую плазму продуктом, которая может включать один или несколько из следующего: возраст донора включающего молодую плазму продукта, связанные с обработкой данные для включающего молодую плазму продукта, например данные о том, что включающий плазму продукт был обработан для удаления белков сверх средней молекулярной массы (как описано выше), данные о группе крови и т.д. В некоторых случаях каждый контейнер в наборе включает идентификационную информацию о содержащейся в нем молодой плазме, при этом данная идентификационная информация включает информацию о возрасте донора включающего молодую плазму продукта, например, идентификационная информация обеспечивает подтверждение связанных с возрастом данных в отношении донора включающего молодую плазму продукта (при этом подобная идентификационная информация может представлять собой возраст донора в момент забора крови). В некоторых случаях каждый контейнер набора содержит включающий молодую плазму продукт от донора, имеющего, по существу, аналогичный возраст, т.е. все контейнеры включают продукт от доноров, которые имеют, по существу, аналогичный, если не идентичный, возраст. Под "по существу, аналогичным возрастом" подразумевается, что возраст различных доноров, от которых получены включающие молодую плазму продукты в наборах, отличается в некоторых случаях на 5 лет или менее, например на 4 года или менее, например на 3 года или менее, включая 2 года или менее, например на 1 год или менее, например на 9 месяцев или менее, 6 месяцев или менее, 3 месяца или менее, включая 1 месяц или менее. Идентификационная информация может быть расположена на любом подходящем компоненте контейнера, например на этикетке, RFID-чипе и т.д. Идентификационная информация может быть предназначена для считывания человеком, компьютером и т.д., если это требуется. Контейнеры могут иметь любую подходящую конфигурацию. Поскольку объем контейнеров может варьироваться, в некоторых случаях объемы варьируются от 10 до 5000 мл, например от 25 до 2500 мл, например от 50 до 1000 мл, включая от 100 до 500 мл. Контейнеры могут быть жесткими или гибкими и могут быть изготовлены из любого подходящего материала, например полимерных материалов, включая виды пластика для применения в медицине. В некоторых случаях контейнеры имеют конфигурацию, соответствующую пакету или мешку. Помимо контейнеров такие наборы могут также включать устройства для введения, например, описанные выше. Компоненты данных наборов могут иметь любую подходящую упаковку, например коробку или аналогичную структуру, сконфигурированную для удерживания контейнеров и других компонентов наборов.

Помимо указанных выше компонентов, описанные наборы будут также включать инструкции для

реализации на практике описанных способов. Данные инструкции могут присутствовать в описанных наборах во множестве форм, одна или несколько из которых могут присутствовать в наборе. Одна форма, в которой данные инструкции могут присутствовать, представляет собой напечатанную информацию на подходящей поверхности или подложке, например на листе или листах бумаги, на которых напечатана информация, на упаковке набора, на вкладыше в упаковку, и т.д. Другими средствами будут являться читаемый компьютером носитель, например дискета, CD, портативный флэш-накопитель и т.д., на которые была записана информация. Другое средство, которое может присутствовать, представляет собой адрес веб-сайта, который может использоваться через интернет для доступа к информации на удаленном сайте. В наборах могут применяться любые подходящие средства.

Примеры

Нижеследующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области полное раскрытие и описание реализации и применения настоящего изобретения, и не предназначены для ограничения области, рассматриваемой авторами в качестве относимой к их изобретению, а также не должны рассматриваться в качестве всех или единственных проведенных экспериментов. Были предприняты усилия для обеспечения точности в плане указанных значений (например, количеств, температуры и т.д.), однако следует принимать во внимание некоторые ошибки и отклонения при проведении экспериментов. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура приведена в градусах Цельсия, а давление равно или приблизительно равно атмосферному.

Общее описание способов, применяемых в рамках молекулярной и клеточной биохимии, приведено в таких стандартных публикациях, как *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 изд. (Sambrook et al., HarBor Laboratory Press 2001); *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999); *Protein Methods* (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996); *Nonviral Vectors for Gene Therapy* (Wagner et al. eds., Academic Press 1999); *Viral Vectors* (Kaplift & Loewy eds., Academic Press 1995); *Immunology Methods Manual* (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997); и *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology* (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998), описание которых приведено здесь в качестве ссылок. Указанные в данном описании реагенты, векторы клонирования и наборы для манипуляции генами доступны от коммерческих поставщиков, таких как BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich и Clontech.

Пример 1.

Здесь показано, что подвергание старого животного действию молодой крови может противодействовать ранее существующим эффектам старения мозга на структурном, функциональном и когнитивном уровне. С помощью геномного анализа гетерохронных парабионтов с применением микрочипов, при котором соединяли системы кровотока молодых и старых животных, идентифицировали профиль экспрессии, свидетельствующий об увеличенной пластичности в гиппокампе старых мышей. Более того, в гиппокампе старых гетерохронных парабионтов наблюдали структурные улучшения в плане плотности дендритных шипиков зрелых нейронов и функциональные улучшения в плане синаптической пластичности. Наконец, внутривенное введение плазмы молодой крови старым мышам снижало связанные со старением когнитивные нарушения при тестировании на основе контекстно-зависимого страха и пространственного обучения и памяти. Эти данные совместно указывают на то, что подвергание воздействию молодой крови в поздние периоды жизни способно обращать связанные со старением изменения в старом мозге.

Материалы и способы.

Животные. Молодых C57BL/6 мышей (Jackson Laboratory) и старых C57BL/6 мышей (National Institutes on Aging) содержали в специфичных условиях при отсутствии патогенов и 12-часовом световом цикле, при этом весь уход и использование животных выполняли в соответствии с регулятивными руководствами, одобренными Комитетом по исследованиям на животных Palo Alto, VA.

После описанных ранее процедур выполняли парабиозную операцию (Villeda, S.A. et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477(7362), 90-94 (2011); Conboy, I.M. et al., Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 433 (7027), 760-764 (2005)). Выполняли зеркальные надрезы кожи на левом и правом боку и осуществляли короткие надрезы брюшной стенки. Надрезы брюшины у соседних парабионтов сшивали вместе. Локтевые и коленные суставы каждого парабионта сшивали вместе, при этом кожу каждой мыши прикрепляли степлером (9 мм Autoclip, Clay Adams) к коже соседнего парабионта. Каждой мышце подкожно инъецировали антибиотик Байтрил и Бупренекс, назначаемые при боли, и отслеживали их состояние в течение восстановления.

Генетический анализ с применением микрочипов. Гиппокампы изохронных и гетерохронных парабионтов ресеквали и экстрагировали РНК с применением реагента Trizol (Invitrogen). кДНК и кРНК последовательно синтезировали и амплифицировали с применением набора для амплификации РНК (Ambion) в соответствии с протоколом производителя. Затем кРНК подвергали гибридизации с применением чипа для микросфер Illumina MouseWG-6 v2.0 (Illumina) в соответствии с инструкциями производителя. Данные анализировали с применением программного обеспечения для анализа данных Illumina beadstu-

dio (Illumina) в соответствии с руководством производителя. Применяли программное обеспечение Cluster 3.0 для неконтролируемой иерархической кластеризации наборов данных в виде нормированных величин. Применяли программное обеспечение Java TreeView для генерирования тепловых карт. Для анализа наборов данных применяли пороговое значение при $P < 0,01$ и абсолютную величину d -значения > 2 (фиг. 2b) или d -значения $> 1,5$ (фиг. 2b), соответственно, с применением программного обеспечения для анализа значимости с использованием микрочипов (алгоритм SAM 3.00; описан в интернете по адресу www.stat.stanford.edu/~tibs/SAM/index.htm). Значительно измененные наборы зондов анализировали на статистически повышенные пути с применением программного обеспечения Ingenuity Pathway Analysis (IPA; Ingenuity Systems, www.ingenuity.com) и разделяли на категории на основе биологической функции с применением AmiGO (The Gene Ontology Consortium, описан в интернете по адресу www.godatabase.org/cgi-bin/amigo/go/cgi).

Иммуногистохимические показатели. Обработку тканей и анализ иммуногистохимических показателей проводили с применением свободноплавающих срезов в соответствии со стандартными опубликованными способами (Ruckh et al., Rejuvenation of Regeneration in the Aging Central Nervous System, *Stem Cell*. 10, 96-103 (2012)). Мышей подвергали анестезии с применением хлоралгидрата (Sigma-Aldrich), вводили 0,9% солевой раствор с помощью транскардиальной перфузии, удаляли мозги и помещали в 4% фосфатный буферный раствор параформальдегида на 48 ч перед проведением криозащиты с применением 30% сахарозы. Свободноплавающие венечные срезы (40 мкм) культивировали в течение ночи с первичными антителами кролика Egr-1 (1:500; Santa Cruz), против cFos (1:500; Millipore) или против фосфорилированного CREB (1:5000; Oncogene Research Products) и выявляли окрашивание с применением биотинилированных вторичных антител и набора ABC (Vector) с диаминобензидином (DAB, Sigma-Aldrich). Для Egr-1 и cFos подсчитывали количество отдельных клеток и проводили количественный анализ фосфорилированного CREB в виде средней интенсивности сигнала с применением программного обеспечения NIH ImageJ.

Окрашивание по методу Гольджи. После удаления мозга полушария погружали в 10 мл модифицированного раствора Гольджи-Кокса для окрашивания Jing, Deqiang and Lee, Francis, Cornell University) на 7-10 дней при комнатной температуре в темноте. Мозги переносили в 30% сахарозу в dH_2O при $4^\circ C$ на 72 ч. Срезы (150 мкм) помещали на пластинки, покрытые 0,3% желатином в dH_2O . После краткой просушки пластинки макали в 40% сахарозу 3 раза и сушили на воздухе в течение 72 ч в темноте. Пластинки погружали в dH_2O , 3×10 мин с легким потряхиванием, затем переносили в раствор для выявления окрашивания на 6 мин. Затем пластинки промывали 3×10 мин в dH_2O , обезвоживали этанолом, погружали в Histoclear и затем покрывали заливочной средой DPX. Нейроны отслеживали при 100X и весь последующий анализ проводили с применением программного обеспечения NeuroLucida (v10, MBF Bioscience). Для каждого нейрона проводили анализ Шолла путем размещения концентрических сфер с интервалом 10 мкм от сомы. Проводили количественный анализ пересечений дендритами каждой сферы и общей длины дендритов в каждой сфере. Длину дендритов суммировали по расстоянию вдоль осей x , y и z и множественных дендритных ветвей нейронов, которые содержались в рамках каждого радиуса.

Анализ внеклеточной электрофизиологии. Анализ внеклеточной электрофизиологии проводили как описано ранее (Rosenzweig, E.S. & Barnes, C.A., (2003) Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Progress Neurobiol.* 69(3), 143-179). Острые срезы гиппокампа (толщиной 400 мкм) получали от старых парабионтов. Срезы хранили в искусственной спинно-мозговой жидкости (ИСМЖ; в мМ: NaCl - 124,0; KCl - 2,5; KH_2PO_4 - 1,2; $CaCl_2$ - 2,4; $MgSO_4$ - 1,3; $NaHCO_3$ - 26,0; глюкоза - 10,0) с непрерывным окислением 5% $CO_2/95\% O_2$. Выполняли регистрацию с применением усилителя Axopatch-2B и программного обеспечения pClamp 10.2 (Axon Installments). Погруженные срезы подвергали непрерывной перфузии окисленной ИСМЖ при скорости потока 2 мл/мин, поступающего из резервуара за счет гравитации. Потенциал поля (популяционные спайки) регистрировали с применением стеклянных микроэлектродов, заполненных ИСМЖ (сопротивление: 4-8 МОм). Двухфазные импульсы тока (продолжительность одной фазы 0,2 мс, всего 0,4 мс) проводили с 10-секундными интервалами с помощью концентрического биполярного стимулирующего электрода (FHC, Inc.). При данной частотной стимуляции явная синаптическая депрессия или облегчение не наблюдалось. Для регистрации популяционных спайков поля в зубчатой извилине регистрирующий электрод размещали на боковой или медиальной стороне тыльной части зубчатой извилины. Стимулирующий электрод размещали сразу за бороздой гиппокампа для стимулирования волокон перфорантного пути. Сигналы фильтровали при частоте 1 кГц и оцифровывали при 10 кГц. Тетаническое стимулирование состояло из 2 серий по 100 импульсов (продолжительность импульса 0,4 мс, 100 Гц), подаваемых с 5-секундными интервалами между сериями. Амплитуду популяционного спайка измеряли от исходной фазы отрицательной волны. Для каждого измерения усредняли до пяти последовательных серий. Синаптическую трансмиссию анализировали с помощью построения кривых типа вход-выход, при этом силу стимулирования корректировали до ~30% от максимума. LTP рассчитывали в виде среднего долевого изменения амплитуды популяционного спайка после высокочастотной стимуляции по сравнению с его базовой амплитудой.

Контекстно-зависимый страх. Данная методика осуществляется в соответствии с описанными ранее способами (Alberini, C.M., Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol. Rev.*

89(1), 121-145 (2009)). Мышей обучают ассоциировать связанный со средой контекст (камеру для подвергания контекстно-зависимому страху) с аверсивным раздражителем (легким ударом током по лапам; безусловным раздражителем, БР), что обеспечивает возможность тестирования на предмет зависящего от гиппокампа контекстно-зависимого страха. Легкий удар током по лапам объединяли со световым и звуковым стимулом (условный раздражитель, УР) в целях дополнительного анализа зависящего от миндалевидного тела связанного со стимулом контекстно-зависимого страха. Контекстно-зависимый страх выражался в поведении, связанном с замиранием. Конкретные параметры тренировки являлись следующими: продолжительность звукового сигнала: 30 с; громкость: 70 дБ, 2 кГц; продолжительность удара током 2 с; сила: 0,6 мА. В день 1 каждую мышь помещали в камеру для подвергания контекстно-зависимому страху и позволяли свободно перемещаться в течение 2 мин перед подверганием действию 30-секундного звукового сигнала (70 дБ), оканчивающегося 2-секундным ударом током по лапам (0,6 мА). Спустя 2 мин подвергали действию второй пары УР-БР. В день 2 каждую мышь сначала помещали в камеру для подвергания контекстно-зависимому страху, содержащую точно такой же контекст, но без проведения УР или удара током по лапам. Замирание анализировали в течение 1-3 мин. Спустя 1 ч мышь помещали в новый контекст, содержащий иной запах, моющий раствор, текстуру пола, стенки камеры и ее форму. Животным позволяли свободно перемещаться в течение 2 мин перед повторным подверганием УР. Замирание анализировали в течение 1-3 мин. Замирание измеряли с применением системы для анализа видео и программного обеспечения FreezeScan (Cleversys, Inc).

Радиальный лабиринт с водой. Данная методика осуществляется в соответствии с описанным ранее протоколом (Jones, M.W. et al. A requirement for the immediate early gene *Zif268* in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat. Neurosci.* 4(3), 289-296 (2001)). Расположение целевого рукава, ведущего к платформе, остается неизменным в течение всего этапа тренировки и тестирования, в то время как начальный рукав меняется с каждым испытанием. В первый день на этапе тренировки мышей тренировали в рамках 15 испытаний, при этом испытания включали использование как видимой, так и скрытой платформы. Во второй день на этапе тестирования мышей тестировали в рамках 15 испытаний с использованием скрытой платформы. Вход в неправильный рукав считали как ошибку, при этом в рамках тренировочных блоков (три последовательных испытания) ошибки усредняли.

Сбор плазмы. Объединенную плазму мыши собирали у 200-300 молодых (в возрасте 3 месяцев) или старых (в возрасте 18 месяцев) мышей за счет внутрисердечного кровотока в момент умерщвления. Плазму получали из собранной крови с помощью ЭДТА и последующего центрифугирования. Аликвоты хранили при -80°C до их последующего использования. Перед введением плазму диализировали в PBS через эксклюзионную мембрану, обеспечивающую фильтрацию молекул с величиной молекулярной массы 3,5 кДа, для удаления ЭДТА и белков, имеющих среднюю молекулярную массу 3,5 кДа или менее. Молодых взрослых мышей систематически лечили плазмой (100 мкл/инъекция), выделенной от молодых или старых мышей, с помощью внутривенных инъекций в хвостовую вену 8 раз в течение 24 дней.

Анализ данных и статистических показателей. Данные приведены в виде средних значений \pm SEM. Статистический анализ проводили с применением программного обеспечения Prism 5.0 (GraphPad Software). Средние показатели между двумя группами сравнивали с применением непарного t-критерия Стьюдента с двумя хвостами. Сравнения средних показателей нескольких групп друг с другом или с одной контрольной группой анализировали с применением однонаправленного ANOVA и апостериорного анализа Бонферрони. Все проведенные эксперименты, связанные с гистологией, электрофизиологией и поведением, осуществляли в виде рандомизированного и слепого анализа.

Результаты.

У людей и мышей гиппокамп представляет собой область мозга, которая особенно уязвима в плане влияния старения, морфологических изменений и снижения пластичности, которые приводят к нарушениям в плане пространственной и эпизодической когнитивной функций (Andrews-Hanna, J.R. et al. Disruption of large-scale brain systems in advanced aging. *Neuron* 56(5), 924-935 (2007); Scheff, S.W. et al. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurology* 68, 1501-1508 (2007); Nicholson, D.A. et al. Reduction in size of perforated postsynaptic densities in hippocampal axospinous synapses and age-related spatial learning. *J. Neurosci.* 24, 7648-7653 (2004); Smith, T.D. et al. Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairments in aged rats. *J. Neurosci.* 20, 6587-6593 (2000); Geinisman, Y. et al. Loss of perforated synapses in the dentate gyrus: morphological substrate of memory deficits in age rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3027-3031 (1986); Heeden, T. & Gabrieli, J.D., Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.* 5(2), 87-96 (2004); Morrison, J.H. & Baxter, M.G., The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nature Rev Neurosci* 13(4), 240-250 (2012); Villeda, S.A. et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477(7362), 90-94 (2011); Raz, N. et al. Neuroanatomical correlates of cognitive aging: evidence from structural magnetic resonance imaging. *Neuropsychology* 12(1), 95-114 (1998); Mattson, M.P. & Magnus, T., Ageing and neuronal vulnerability. *Nat. Rev. Neurosci.* 7(4), 278-294 (2006); Rapp, P.R. & Heindel, W.C., Memory systems in normal and pathological aging. *Curr. Opin. Neurol.* 7(4), 294-298 (1994); Rosenzweig, E.S. & Barnes, C.A., Impact of aging on hippocampal function: plasticity,

network dynamics, and cognition. *Progress Neurobiol.* 69(3), 143-179 (2003)). Таким образом, авторы проанализировали потенциальные преимущества, связанные с действием молодой крови в стареющем гиппокампе мышей, на молекулярном, структурном, функциональном и когнитивном уровне с применением комбинации гетерохронного парабиоза (фиг. 1а) и введения плазмы крови (фиг. 3а).

Для широкого понимания того, как системное действие молодой крови влияет на стареющий гиппокамп, авторы провели геномный анализ гиппокампов старых изохронных (старый-старый) и гетерохронный (старый-молодой) парабионтов с применением микрочипов (фиг. 1а). Неконтролируемая иерархическая кластеризация позволила выявить явный профиль генной экспрессии, являющийся различающимся у изохронной и гетерохронной группы (фиг. 1b). С применением классификации биологических процессов на основе генной онтологии (ГО) авторы идентифицировали подмножество генов, экспрессируемых отличным образом у гетерохронных парабионтов, относимых к категории регулирования синаптической пластичности (фиг. 1c). Более того, Ingenuity Pathway Analysis (IPA) также позволили детектировать явную вовлеченность связанных с пластичностью сигнальных путей, которые включают Egr1 (Alberini, C.M., Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol. Rev.* 89(1), 121-145 (2009); Jones, M.W. et al. A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat. Neurosci.* 4(3), 289-296 (2001)) и циклический связывающийся с цАМФ-зависимым элементом (CREB) белок (Alberini, C.M., Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol. Rev.* 89(1), 121-145 (2009); Guzowski, J.F. et al. Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *J. Neurosci.* 21(14), 5089-5098 (2001); Sanciu, M., et al. Phosphorylated cAMP response element binding protein in the mouse brain after fear conditioning: relationship to Fos production. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 94(1-2), 15-24 (2001)) в качестве части верхней сигнальной сети у гетерохронных парабионтов (фиг. 1d). Результаты анализа с применением микрочипов совместно указывают на существование транскрипционного профиля, свидетельствующего о повышенной пластичности в гиппокампе гетерохронных парабионтов.

Для дальнейшего анализа молекулярных изменений, связанных с синаптической пластичностью, и подтверждения результатов анализа с применением микрочипов авторы проанализировали активацию подмножества факторов, которые были идентифицированы в рамках анализа с применением микрочипов. В частности, авторы проанализировали экспрессию белка, опосредуемую активируемыми немедленно-ранними генами Egr1 и c-Fos, а также фосфорилирование CREB, с помощью иммуногистохимического анализа в зубчатой извилине (DG) гиппокампа старых парабионтов (фиг. 2a-d). Авторы наблюдали повышение количества клеток, экспрессирующих Egr1 (фиг. 2a, b) и c-Fos (фиг. 2a, c) и соответствующее повышение уровней фосфорилированного CREB (фиг. 2a, d) в гетерохронных парабионтах в отличие от изохронных парабионтов. Как сообщалось ранее, в мозге парабионтов редко детектировали клетки из периферических областей (Villeda, S.A. et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477(7362), 90-94 (2011); Ajami, B. et al., Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neuro* 10(12), 1538-1543 (2007), при этом молекулярные изменения не были вызваны самой парабиозной хирургической процедурой (фиг. 4). Эти данные указывают на то, что синаптическая пластичность в гиппокампе старых животных может быть повышена путем систематического подвергания действию молодой крови.

После определения молекулярных изменений, связанных с синаптической пластичностью, авторы далее охарактеризовали структурные измерения, лежащие в основе образования синапсов у старых парабионтов. С помощью анализа Гольджи авторы проанализировали первичные зрелые нейроны в DG гиппокампа на предмет изменений в плане образования шипиков и дендритных разветвлений. Интересным является то, что авторы наблюдали, что плотность дендритных шипиков вдоль отдельных дендритов клеток гранулярных нейронов гиппокампа была повышена у гетерохронных парабионтов в отличие от изохронных парабионтов (фиг. 2e, f). Тем не менее, различий в плане разветвленности дендритов (фиг. 5a), количества дендритных ветвей (фиг. 5b) или длины дендритных ветвей (фиг. 5c) между гетерохронными и изохронными группами не наблюдали. Совместные эти структурные данные свидетельствуют о том, что подвергание старого животного действию молодой крови селективно улучшает образование синапсов в стареющем гиппокампе. Для анализа того, могут ли функциональные улучшения в старом мозге быть вызваны вследствие действия молодой крови, авторы проводили внеклеточные электрофизиологические анализы на срезах гиппокампа, полученных от старых парабионтов (фиг. 2g). В то время как долговременная потенциация (LTP) в DG изохронных парабионтов быстро достигала базисного уровня, LTP у гетерохронных парабионтов поддерживалась выше базисного уровня в рамках периода проведения анализа (фиг. 2g). Различия в плане синаптической силы между группами не наблюдались (фиг. 5d). Эти функциональные данные указывают на то, что синаптическая пластичность в гиппокампе старых животных может быть повышена путем подвергания действию молодой крови.

Учитывая то, что обучаемость и память опосредуются на клеточном уровне образованием синапсов (Rosenzweig, E.S. & Barnes, C.A., Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Progress Neurobiol.* 69(3), 143-179 (2003); Bliss, T.V. & Collingridge, G.L., A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361(6407), 31-39 (1993); Martin, S.J., Grimwood, P.D. & Morris, R.G. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci.* 23,

649-711 (2000)) with LTP serving as a putative functional correlate (Bliss, T.V. & Collingridge, G.L., A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361(6407), 31-39 (1993); Martin, S.J., Grimwood, P.D. & Morris, R.G. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 649-711 (2000)), удивительным является то, что структурные и функциональные улучшения, наблюдаемые после подвергания действию молодой крови, могут сопровождать улучшения в плане когнитивных процессов более высокого уровня. В частности, гиппокамп является фундаментально важным в плане приобретения и сохранения новых воспоминаний. Однако данные процессы крайне подвержены нарушению вследствие влияния старения (Villeda, S.A. et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477(7362), 90-94 (2011); Rapp, P.R. & Heindel, W.C., Memory systems in normal and pathological aging. *Curr. Opin. Neurol.* 7(4), 294-298 (1994)). Таким образом, для определения того, обеспечивает ли у старых мышей подвергание действию молодой крови реальное улучшение в плане нарушений, связанных с зависящей от гиппокампа обучаемостью и памятью, авторы применяли способы на основе контекстно-зависимого страха и радиального лабиринта с водой (RAWM) (фиг. 3). В качестве контроля авторы сначала тестировали группу молодых и старых не подвергавшихся лечению животных и наблюдали связанные со старением когнитивные нарушения в рамках обоих способов (фиг. 6). Далее независимой группе старых взрослых мышей внутривенно инъецировали молодую или старую плазму всего восемь раз в течение трех недель перед проведением когнитивного тестирования (фиг. 3а). При тренировке на основе контекстно-зависимого страха все мыши демонстрировали аналогичное базисное замирание вне зависимости от лечения (фиг. 7а). Тем не менее, старые мыши, получавшие молодую плазму, демонстрировали повышенное замирание в рамках тестирования контекстной памяти (фиг. 3б), но не тестирования памяти на основе внешнего стимула (фиг. 7б). Кроме того, в рамках этапа тренировки способа RAWM все мыши демонстрировали аналогичную способность к пространственному обучению (фиг. 3с) и скорость плавания (фиг. 7с). Интересно, что старые животные, которым вводили молодую плазму, демонстрировали повышенную способность к обучению и память, связанную с расположением платформы, в рамках этапа тестирования при выполнении данной задачи (фиг. 3с), что подтверждает полученные авторами данные, связанные с подверганием контекстно-зависимому страху (фиг. 3б). Важным является то, что когнитивные отличия в плане контекстно-зависимого страха или RAWM между не подвергавшимися лечению животными и получавшими плазму животными не наблюдались (фиг. 8), что свидетельствует об эффективности молодой крови. Совместно эти сведения о поведении свидетельствуют о том, что введение молодой крови - даже на поздних периодах жизни - способно обеспечивать когнитивные улучшения в плане зависящей от гиппокампа обучаемости и памяти у старых животных.

Настоящие данные совместно демонстрируют, что подвергание действию молодой крови может не только повышать регенеративную способность стареющей нервной системы, но, более того, может также устранять присутствующие ранее эффекты самого старения на структурном, функциональном и когнитивном уровне. Интересным является то, что настоящие данные не соотносятся с причинной связью между сниженным нейрогенезом и зависящим от возраста когнитивным ухудшением (Morrison, J.H. & Baxter, M.G., The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nature Rev Neurosci* 13(4), 240-250 (2012); Merrill, D.A. et al. Hippocampal cell genesis does not correlate with spatial learning ability in age rats. *J. Comp. Neurol.* 459, 201-207 (2003); Bizon, J.L. & Gallagher, M. Production of new cells in the rat dentate gyms over the lifespan: relation to cognitive decline. *Eur. J. Neurosci.* 18, 215-219 (2003); Drapeau, E. et al. Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 14385-14390 (2003); Leuner, B. et al. Diminished adult neurogenesis in the marmoset brain precedes old age. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 17169-17173 (2007); Luo, J. et al., Gliadependent TGF- β signaling, acting independently of the TH17 pathway, is critical for initiation of murine autoimmune encephalomyelitis. *J. Clin. Invest* 117 (11), 3306-3315 (2007)). В результате это свидетельствует о том, что когнитивные улучшения, наблюдаемые в рамках данного исследования после подвергания действию молодой крови, не обязательно связаны с изменениями в плане регенеративной способности, но скорее являются результатом повышения пластичности.

В конце концов полученные результаты показывают возможность применения молодой крови для терапевтического вмешательства, направленного на обращение когнитивных нарушений у пожилых субъектов путем использования скрытой пластичности, присущей старому мозгу. Важным является то, что данные исследования свидетельствуют о положительных эффектах, связанных с тем, что введение молодой крови может обеспечивать обращение клеточного и когнитивного ухудшения у субъектов, страдающих связанными со старением нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера, сверх рамок естественного старения.

Пример 2.

Для анализа необходимости присутствия растворимых факторов в молодой плазме для опосредования связанного с омоложением влияния на познавательную способность старым мышам (возрастом 18 месяцев) вводили молодую плазму или денатурированную нагреванием плазму с помощью инъекции в хвостовую вену. В качестве контроля инъецировали PBS для анализа вероятности того, что разбавление отрицательных факторов, присутствующих в кровотоке, может лежать в основе улучшения познаватель-

ной способности. Плазму получали от молодых (возрастом 8 недель) C57B1/6J мышей и объединяли перед проведением диализа с применением эксклюзионной мембраны для частиц с молекулярной массой 3,5 кДа. Часть плазмы подвергали денатурации нагреванием в течение 2-3 мин при 95°C. Мышам делали инъекции 8 раз в течение нескольких недель и подвергали воздействию контекстно-зависимого страха для анализа зависящей от гиппокампа памяти. После первого дня тренировки, при которой мыши получали легкий удар током по лапам, объединенный со световым и звуковым импульсом, мышей помещали в тот же контекст и анализировали связанное с замиранием поведение. Затем клетку меняли и анализировали связанное с замиранием поведение для анализа наличия памяти, которая не являлась зависящей от гиппокампа (вызванной внешним стимулом). Как показано на фиг. 9, денатурация молодой плазмы устраняла положительные эффекты молодой плазмы на когнитивные способности старых мышей (фиг. 9).

Пример 3.

Для оптимизации доставки молодой плазмы проводили эксперимент, при котором плазму, полученную от мышей возрастом 2 месяца, вводили мышам возрастом 18 месяцев лишь раз в неделю (150 мкл/инъекция) в течение трех недель перед тестированием познавательной способности и гистологическим анализом (фиг. 8). Данные исследования проводили полностью в соответствии с принципом проведения слепых исследований. Как показано на фиг. 10, авторы наблюдали повышенную степень замирания в рамках способа на основе контекстно-зависимого страха, лучшие результаты в плане RAWM, и удвоенное количество BrdU+ нейронов у мышей, подвергнутых действию молодой плазмы, по сравнению с контролями того же возраста, подвергнутых действию солевого раствора.

Пример 4.

Здесь показано, что подвергание мыши, являющейся моделью болезни Альцгеймера, условиям, связанным с молодой здоровой кровью, снижает степень нейропатологии, которая, как известно, присуща данными моделям и аналогичным образом встречается у пациентов-людей с данным заболеванием.

Модели на основе трансгенных мышей с избыточным продуцированием амилоидного прекурсорного белка человека (APP), содержащего мутации, встречающиеся в семействах с аутосомной доминантной болезнью Альцгеймера, воспроизводят важные аспекты данного заболевания, включая амилоидные бляшки, нейродегенерацию и поведенческие нарушения. У трансгенных мышей со сверхэкспрессией APP751^{V717L,K670M/N671L} человека (также известных как лондонские и шведские мутации) в нейронах при контроле Thy 1.2 промотора, в частности Линии 41, полученной лабораторией Masliah (Rockenstein, E. et al. Early Formation of Mature Amyloid-P Protein Deposits in a Mutant APP Transgenic Model Depends on Levels of A β 1-42. *Journal of Neuroscience Research* 66:573-582 (2001)), развивается амилоидная патология, нейродегенерация и когнитивные нарушения (Rockenstein et al., выше). Этих мышей (hAPP^{L/S}) исследовали множество независимых академических лабораторий (Pickford et al. The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid β accumulation in mice. *J. Clin. Invest* (2008); Faizi et al. Thy1-hAPPLond/Swe+ mouse model of Alzheimer's disease displays broad behavioral deficits in sensorimotor, cognitive and social function. 2012. Wiley Periodicals, Inc. *Brain and Behavior*; Knowles et al. The p75 Neurotrophin Receptor Promotes Amyloid-13(1-42)-Induced Neuritic Dystrophy in Vitro and in Vivo *The Journal of Neuroscience*, August 26, 29 (34): 10627-10637 (2009)) и применяли в качестве модели для разработки лекарств.

Для определения влияния факторов, связанных с молодой кровью, на БА-подобное заболевание у мышей авторы применяли гетерохронный парабиоз, при котором объединяли молодых мышей и APP751^{L/S} мышей (фиг. 11a). В гиппокампе старых мышей-самцов hAPP^{L/S} воздействие молодой крови не влияло на уровни нерастворимого A β при измерении с применением иммуногистохимического и биохимического анализа (фиг. 11b, c).

Было показано, что уровень синаптических и связывающих кальций белков является согласующимся образом пониженным на ранних стадиях БА и у моделей данного заболевания на основе мышей. Количественный анализ иммунореактивности синаптофизина в пресинаптических окончаниях в молекулярном слое зубчатой извилины (DG) гиппокампа показал значительное снижение у APP изохронных парабионтов по сравнению с изохронными парабионтами дикого типа, при этом она была частично восстановлена у APP гетерохронных парабионтов (фиг. 11d). Тот же участок анализировали на предмет иммунореактивности калбиндина. Несмотря на то, что калбиндин не являлся полностью отсутствующим, в DG APP изохронных парабионтов наблюдали значительное снижение его уровня по сравнению с изохронными парабионтами дикого типа, при этом он повышался после подвергания воздействию молодой системы, что было продемонстрировано на APP гетерохронных мышцах (фиг. 11e). Самки hAPP^{L/S} мышей имели ускоренное накопление A β по сравнению с самцами и демонстрировали пониженные уровни калбиндина и синаптофизина в гиппокампе в среднем возрасте. Аналогично мышам-самцам, иммунореактивность калбиндина была восстановлена у самок APP гетерохронных парабионтов среднего возраста (фиг. 1f), что свидетельствует о том, что преимущества, связанные с молодой кровью, применимы к обоим полам.

Авторы ранее показали, что полезные эффекты гетерохронного парабиоза на стареющий мозг могут быть достигнуты частично путем системной инъекции плазмы от молодых мышей (Villeda et al. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nat. Med.* 20, 659-

663 (2014)), таким образом были проанализирована вероятность наличия аналогичных связанных с молодой плазмой полезных эффектов у hAPP^{L/S} мышей. Авторы внутривенно инъецировали молодую плазму или PBS группе hAPP^{L/S} мышей и группе однопометных мышей дикого типа (фиг. 12a). Каждая группа получала 8 инъекций в хвостовую вену в течение 4-недельного периода.

Количественный анализ иммунореактивности синаптофизина в DG всех 4 подвергнутых лечению групп показывал, что введение молодой плазмы hAPP^{L/S} мышам восстанавливал уровни экспрессии до уровней, присущих контролям дикого типа (фиг. 12b). Уровни синаптофизина у hAPP^{L/S} мышей также восстанавливались до присущих дикому типу уровней в неокортексе, который является другим участком, в котором количество синаптических окончаний было снижено у hAPP^{L/S} мышей по сравнению с другими мышами. Введение молодой плазмы не влияло на иммунореактивность калбиндина в DG мышей дикого типа. Тем не менее, значительное снижение иммунореактивности калбиндина у hAPP^{L/S} мышей по сравнению с мышами дикого типа отсутствовало при инъецировании hAPP^{L/S} мышам молодой плазмы. Данный результат свидетельствует о том, что введение плазмы может восстанавливать пути, связанные с синаптической активностью и связыванием кальция, аналогично гетерохронному парабиозу. Затем авторы анализировали влияние введения молодой плазмы на одну из основных сигнальных молекул, связанных с функционированием кальциевой системы, MAP-киназу ERK, уровень которой, как известно, является повышенным у APP мышей. Вестерн-блот-анализ фосфорилированной ERK (pERK) и ERK (фиг. 12d) продемонстрировал пониженное отношение pERK к ERK у hAPP^{L/S} мышей как результат введения плазмы (фиг. 12e), что свидетельствует о пониженной активации ERK.

Поскольку внутриклеточное кальциевое регулирование является критически важным для синаптической пластичности и памяти, а пониженные уровни синаптофизина и калбиндина при БА коррелируют с когнитивным ухудшением, авторы предположили, что восстановление уровня данных молекул и их функции путем введения молодой плазмы может обеспечивать улучшение памяти у hAPP^{L/S} мышей. Для анализа пространственной рабочей памяти у данных мышей применяли тестирование на основе Y-образного лабиринта со спонтанным чередованием (фиг. 12f). Несмотря на то, что подвергнутые воздействию PBS hAPP^{L/S} мыши демонстрировали менее чем 50% уровень вероятности ($P < 0,41$), что свидетельствовало о нарушении рабочей памяти, подвергнутые воздействию плазмы hAPP^{L/S} мыши демонстрировали увеличенный уровень вероятности ($P < 0,0082$) и делали значительно больше спонтанных чередований. Различие между общим количеством входов в рукава между двумя подвергаемыми лечению группами отсутствовало, что свидетельствует о том, что улучшения в плане рабочей памяти после лечения плазмой не были связаны с изменением активности. Для анализа ассоциативной обучаемости и памяти проводили тестирование на основе внешнего стимула и подвергания контекстно-зависимому страху. В течение этапа тренировки обе группы демонстрировали аналогичное базисное время замирания, при этом различия в плане зависящей от миндалевидного тела связанной со внешним стимулом памяти не наблюдали. Тем не менее, hAPP^{L/S} мыши, получавшие молодую плазму, демонстрировали увеличенное время замирания при тестировании зависящей от гиппокампа контекстной памяти (фиг. 12g), демонстрируя, что молодая плазма может обеспечивать устранение данных нарушений обучаемости и памяти у мышей, являющихся моделями болезни Альцгеймера.

Пример 5.

Здесь показано, что определенные фракции молодой плазмы, которые относятся к подмножеству белков и молекул, присутствующих в интактной плазме, являются достаточными для активации сетей генов, связанных с синаптической пластичностью. Более того, белки и молекулы, которые значительно отличаются в плане молекулярного размера, способны оказывать влияние на работу мозга и индуцировать изменения генной экспрессии в гиппокампе. Объединенную плазму мышей, полученную от мышей возрастом 2-3 месяца, разделяли на основе размера с применением диализных мембран с определенными пороговыми значениями молекулярной массы (3,5 кДа, 25 кДа, 50 кДа) на следующие фракции, приблизительно основанные на инклюзии на основе молекулярной массы их компонентов: >3,5 кДа, >25 кДа и >50 кДа. Дополнительную фракцию получали путем применения >3,5 кДа фракции и удаления IgG иммуноглобулинов с помощью аффинного осаждения белка G. Каждую фракцию внутривенно инъецировали (125 мкл на инъекцию) 7 раз в течение двух недель 18-месячным мышам ($n = 4-5$ мышей на фракцию); в качестве контроля инъецировали фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). В конце лечения мозги рассекали, РНК из гиппокампа экстрагировали и анализировали с применением генных чипов Affymetrix. Несколько сотен генов в мозге мышей, подвергнутых действию любой из фракций плазмы, по сравнению с подвергнутыми действию PBS мышами (фиг. 13) были значительно изменены. Биоинформационный анализ с применением программного обеспечения Ingenuity Pathway Analysis (IPA) выявил несколько сетей, связанных с синаптической пластичностью и обучаемостью и памятью (например, долговременной потенциацией, разветвленностью аксонов, поведением), которые были значительно повышены у >25 кДа фракции, но не были повышены или были менее повышены у других фракций. Заметные гены в рамках данных сетей включали известные в плане влияния на обучаемость и память, включая Reelin, нейротрофический рецептор тирозинкиназы 3 и рецептор эфрина 4А (см. таблицу).

Заболевание или функциональный путь	P-значение	Прогнозируемая функциональная активация	Z-значение активации	Выделенный ген (повышенный)
Аксоногенез	$6,7 \times 10^{-13}$	Повышена	2,87	RELN (Reelin)
Поведение	$1,22 \times 10^{-9}$	Повышена	3,31	NTRK3 (нейротрофический рецептор тирозинкиназы 3)
Разветвленность аксонов	$4,09 \times 10^{-9}$	Повышена	2,00	RELN (Reelin)
Долговременная потенция	$7,41 \times 10^{-8}$	Повышена	3,13	EPHA4 (рецептор эфрина A4)

Таблица. Проводили анализ сигнальных путей (ПА) с применением значительно измененных генов, детектированных в мозгах, подвергнутых лечению плазмой с молекулярной массой молекул свыше 25 кДа или индифферентным веществом, который позволил выявить значительно повышенные генные сети в категории "Развитие и функционирование нервной системы" в качестве сети верхнего уровня. Данная сеть состояла из 386 молекул. Конкретные пути в рамках данной сети показаны с соответствующими P-значениями и функциональным прогнозом на основе изменений в генах данной сети.

Данные результаты совместно демонстрируют, что молекулы с различной молекулярной массой способны обеспечивать активацию генов, связанных с обучаемостью и памятью, и что некоторые фракции плазмы являются достаточными в плане активации этих генов в мозге, в то время как другие являются избыточными.

Пример 6.

Здесь показано, что введение молодой плазмы старым мышам приводит к системным изменениям в крови, свидетельствующим о влиянии лечения на весь организм. В частности, мышам в возрасте 12 месяцев инъецировали плазму от 2-месячных мышей дважды в неделю в течение 4 недель ($n = 13-14$ мышей на группу). Каждая инъекция включала 150 мкл фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) или плазмы, таким образом, соответствуя приблизительно 5% массы тела мыши в расчете на одну инъекцию. Спустя четыре дня после последней инъекции у всех мышей собирали кровь и измеряли уровень >200 факторов роста и других внутриклеточных белков с применением микрочипов на основе антител или количественных анализов на основе Luminex®. Неконтролируемая кластеризация на основе полной связи основных шести белков, уровень которых был измерен с применением микрочипов, обеспечила практически идеальное различие крови, полученной от подвергнутых лечению PBS или плазмой мышей (фиг. 14а), что свидетельствует о том, что кровь и системная среда пожилых мышей, подвергнутых действию молодой плазмы, являлась значительно отличающейся. Большинство повысившихся факторов обладают известными функциями в плане регенерации тканей. Примеры факторов, уровень которых повышается в крови подвергнутых лечению плазмой старых мышей включают интерлейкин-22 (IL-22) и фактор ингибирования лейкемии (LIF) (фиг. 14б, с). Было показано, что данные факторы, уровень которых был измерен независимым образом и которые подтвердили результаты, полученные с помощью микрочипов, оказывают полезное влияние на множество тканей. Например, LIF улучшает работу сердца и регенерацию после инфаркта миокарда (Zouein et al., Eur Cytokine Netw. 24:11-9, (2013)), поддерживает регенерацию скелетных мышц (Hunt et al. Histochem Cell Biol. 139:13-34, (2013)) и обеспечивает регенерацию зрительного нерва и регенерацию аксонов (Fischer D., Leibinger M., Prog Retin Eye Res. 31:688-701, 2012). Аналогичным образом, было показано, что IL-22 демонстрирует полезное влияние на множества тканей, включая кожу, поджелудочную железу, печень и кишечник (Sabat et al. Nat Rev Drug Discov. 13:21-38, (2014)). Данные результаты совместно показывают, что лечение молодой плазмой ведет к изменениям по всему организму в плане внутриклеточных белков в крови и что данные белки оказывают плейотропное полезное влияние на множество тканей.

Пример 7.

Здесь показано, что мыши, подвергнутые лечению молодой плазмой человека, демонстрируют улучшения в плане нейронной активности в мозге, и что плазма человека из пуповины является наиболее эффективной в плане активации нейронов, и что более длительное лечение молодой плазмой человека

улучшает познавательную способность у старых мышей. Авторы ранее продемонстрировали, что молодая плазма мышей является достаточной для улучшения когнитивной функции у старых мышей, частично за счет улучшения синаптической пластичности в гиппокампе, участке мозга, который влияет на обучаемость и память (Villeda et al. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nat. Med.* 20, 659-663 (2014)). В целях демонстрации соответствующей применимости молодой плазмы в качестве восстанавливающего средства для омоложения старого мозга авторы стремились разработать модель на основе мышей, в рамках которой плазма крови человека могла быть инъецирована и перенесена без нежелательных эффектов иммунного отторжения. Было сделано предположение, что NOD/SCID (NSG) мыши (Shultz et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J. Immunol.* 174, 6477-6489 (2005)), которые не имеют функциональную иммунную систему, могут являться подходящей моделью для данной цели с учетом того, что продуцирование антител и комплементарная активация являются серьезно ослабленными. Для демонстрации ее применимости в качестве модели для анализа растворимых факторов плазмы в данном контексте старения авторы сначала анализировали способность NSG модели повторять ключевые аспекты старения мозга. Как показано на фиг. 15, авторы сначала обнаружили, что NSG мыши демонстрируют связанный со старением недостаток в плане количества новых нейронов в зубчатой извилине гиппокампа, а также повышенный микроглиоз, установленный путем окрашивания гиппокампа CD68. Авторы также обнаружили связанное со старением снижение количества cfos-положительных клеток в зубчатой извилине, которая является нейронным заменителем для семейства немедленно-ранних генов, оказывающего влияние на синаптическую пластичность.

Как показано на фиг. 16, авторы наблюдали ярко выраженное когнитивное ухудшение у NSG мышей в рамках задачи на основе контекстно-зависимого страха или когда мышь заставляли запоминать расположение выхода в рамках задачи на основе лабиринта Барнеса. Важным является то, что все связанные со старением ухудшения наблюдали с применением NSG мышей, которые были примерно среднего возраста, т.е. возраста, при котором у нормальных мышей ухудшения обычно являются малозаметными. С учетом всех этих данных модель представляется удобным инструментом для быстрого анализа эффективности лечения плазмой с применением полученного от человека материала.

Авторы далее пытались проанализировать, являются ли присутствующие в плазме человека растворимые факторы значительно отличными в рамках различных стадий старения. Авторы изолировали плазму крови, полученной от доноров плазмы пуповины, а также от молодых и пожилых субъектов, и анализировали относительные уровни приблизительно 600 секретируемых сигнальных белков с применением собственной платформы для анализа белков с применением микрочипов. Как показано на фиг. 17, существует явное отличие в плане возраста плазмы человека, особенно при сравнении образцов плазмы пуповины с образцами молодых или пожилых доноров. Присутствует явное повышение уровней многих факторов, присутствующих в плазме пуповины, по сравнению с образцами молодых и пожилых субъектов, что свидетельствует о наличии подмножества белков, которые демонстрируют зависящее от возраста снижение экспрессии. Авторы далее пытались проанализировать, изменяется ли инъецирование плазмы человека старым NSG мышам нейровоспаление, являющееся воспроизводимым фенотипом старения мозга. Как показано на фиг. 18, авторы сообщают о небольшом, но значительном снижении в плане микроглиоза в гиппокампе и коре старых NSG мышей, подвергнутых лечению молодой плазмой человека. Старая плазма человека не являлась достаточной для изменения уровня микроглиоза. Мыши, подвергнутые лечению молодой плазмой человека, демонстрировали более высокие уровни контекстно-зависимого страха по сравнению с мышами, подвергнутыми лечению старой плазмой человека, что свидетельствует о том, что молодая плазма обладает факторами, являющимися достаточными для улучшения познавательной способности (фиг. 19).

Экспрессия немедленно-ранних генов, в частности экспрессия cfos, Junb и Egr1, представляет собой хорошо широкоохарактеризованный фактор, лежащий в основе синаптической пластичности (Bailey et al., Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13445-13452 (1996)). Авторы проанализировали уровни экспрессии немедленно-ранних генов с помощью кПЦР у NSG мышей, подвергнутых лечению плазмой человека. Авторы обнаружили, что плазма пуповины и молодая плазма человека являются достаточными для повышения экспрессии немедленно-ранних генов Egr1, Junb, cfos, которые кодируют белок cfos (фиг. 20), а также Vdnf и CamK2a (фиг. 21). В целом авторы обнаружили более значительные улучшения в плане связанных с пластичностью генов у NSG мышей, подвергнутых лечению плазмой пуповины, чем у мышей, подвергнутых лечению молодой или старой плазмой человека. Данные авторов совместно свидетельствуют о том, что факторы, присутствующие в плазме пуповины, могут являться способными обеспечивать омоложение мозга при фенотипах старения, связанных с обучаемостью и памятью. Для тестирования того, является ли плазма пуповины человека способной обращать связанные со старением поведенческие ухудшения, авторы подвергали NSG мышей действию индифферентного вещества или плазмы пуповины и проводили анализ на основе контекстно-зависимого страха и тестирование с применением лабиринта Барнеса. Как показано на фиг. 22, плазма пуповины значительно повышала уровень замирания в рамках задачи на основе контекстно-зависимого страха по сравнению с мышами, подвергнутыми действию индифферентного вещества. Подвергание тех

же мышей тестированию с применением лабиринта Барнеса показало, что мыши, подвергнутые лечению плазмой пуповины, в конце концов научились запоминать расположение рукава с выходом значительно лучше, чем мыши, подвергнутые действию индифферентного вещества. Данный эффект являлся особенно значительным в итоговый день тестирования в рамках последних 3 испытаний, при которых не подвергнутые лечению NSG мыши обычно имели сложности с выполнением данной задачи. Скорость обучения, как указано на основе различия между последующими тестовыми испытаниями и исходным тренировочным испытанием в день 4, была также значительно более высокой у старых NSG мышей, подвергнутых лечению плазмой пуповины, чем у мышей, подвергнутых действию индифферентного вещества.

Авторы проанализировали, могут ли улучшения в плане долговременной потенциации, являющиеся клеточным и электрофизиологическим коррелятом повышенной синаптической силы и пластичности (Bliss and Collingridge. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39, (1993)), лежать в основе повышенной обучаемости и памяти, наблюдаемых у старых NSG мышей, подвергнутых лечению плазмой пуповины. Как показано на фиг. 23, авторы наблюдали значительно более высокие уровни LTP на срезах гиппокампа мышей, подвергнутых лечению плазмой пуповины, чем на срезах гиппокампа мышей, подвергнутых действию индифферентного вещества. Данные авторов совместно свидетельствуют о механизме, благодаря которому факторы, присутствующие в плазме пуповины, улучшают обучаемость и память в стареющем мозге, вероятно за счет повышения экспрессии генов, связанных с обучаемостью и памятью, которая в конце концов приводит к клеточным изменениям, которые лежат в основе повышенной LTP.

Данные авторов показывают, что плазма человека, в частности плазма пуповины, может обеспечить связанное с омоложением влияние на аспекты старения мозга у NSG мышей, включая изменения в плане экспрессии *cfos* в гиппокампе. Для анализа того, наблюдаются ли данные изменения также в случае условий, связанных с функциональной иммунной системой, авторы применяли модель на основе мышей TRAP-FOS, разработанную лабораторией Liqun Luo в Стэнфордском университете (Guenther et al. Permanent genetic access to transiently active neurons via TRAP: targeted recombination in active populations. *Neuron* 78, 773-784 (2013)). Резкие манипуляции часто приводят к последующим изменениям в экспрессии немедленно-ранних генов, включая экспрессию *cfos*, которая может являться сложной в плане детектирования во время проведения анализа. В рамках модели на основе направленной рекомбинации в активных популяциях (Targeted Recombination in Active Populations, TRAP) тамоксифен-зависимый CreER-T2 может быть экспрессирован зависящим от типа манипуляции образом из промотора FOS, что приводит к экспрессии флуоресцентного эффекторного белка, который остается неизменным после экспрессии. Данным образом авторы были способны обеспечить быстрое лечение плазмой пуповины человека в целях анализа быстрых изменений в плане экспрессии *cfos* с одновременным предотвращением значительной иммунной реакции. После всего лишь одной инъекции авторы обнаружили, что лечение плазмой пуповины у TRAP-FOS мышей приводило к значительно большему количеству подвергнутых действию TRAP нейронов, захватывающих флуоресцентный белок из промотора *cfos* в зубчатую извилину и CA1 гиппокампа по сравнению с TRAP-FOS мышами, подвергнутыми действию индифферентного вещества (фиг. 24). Старая плазма человека не являлась достаточной для повышения данной экспрессии. Результаты авторов демонстрируют явную функциональную значимость факторов, присутствующих в плазме человека, в плане обращения процессов старения мозга *in vivo*. С учетом результатов авторов, полученных на мышах с применением факторов плазмы человека, фракционированная плазма человека будет нацелена на те же биологические процессы в мозге человека, обеспечивая явную пользу для пациентов, имеющих связанное со старением когнитивное ухудшение.

Пример 8.

Представляющий собой человека пациент с болезнью Альцгеймера в степени от легкой до умеренной с помощью внутривенной инфузии получал 300 мл плазмы человека от донора молодой крови (в возрасте менее 30 лет). Данную процедуру повторяли, например, один раз в неделю в течение четырех недель, в течение которых сиделка записывала общие функции и занятия в рамках повседневной жизни пациента. После завершения лечения мозг пациента сканировали на предмет активности мозга в покое с применением функционального МРТ, и анализировали когнитивную функцию пациента с помощью группы нейрофизиологических тестов. В течение всего времени пациент, сиделка и лечащие врачи, осуществляющие лечение или тестирование, не знали, получал ли пациент плазму молодой крови или солевой раствор в качестве контроля. Полученные после лечения результаты измерений затем сравнивали с результатами аналогичных измерений, полученных у пациента перед началом лечения. При этом наблюдали, что пациенты, получавшие молодую плазму, демонстрировали улучшенные общие функции и активность в рамках повседневной жизни.

Без учета прилагаемых пунктов формулы изобретения настоящее описание также охарактеризовано на основе следующих пунктов.

1. Способ лечения связанного со старением состояния у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества включающего молодую плазму продукта для лечения связанного со старением состояния у субъекта.

2. Способ по п.1, при этом включающий молодую плазму продукт не является цельной кровью.
3. Способ по пп.1 и 2, при этом включающий молодую плазму продукт не включает эритроциты и/или лейкоциты.
4. Способ по пп.1, 2 или 3, при этом включающий молодую плазму продукт является ацеллюлярным.
5. Способ по любому из предыдущих пунктов, при этом включающий молодую плазму продукт не включает белки, имеющие среднюю молекулярную массу ниже предварительно определенного порогового значения.
6. Способ по любому из предыдущих пунктов, при этом включающий молодую плазму продукт получен от донора в возрасте 40 лет или менее.
7. Способ по п.6, при этом включающий молодую плазму продукт получен из пуповины новорожденного.
8. Способ по любому из предыдущих пунктов, при этом связанное со старением состояние представляет собой связанное со старением когнитивное нарушение.
9. Способ по п.8, при это связанное со старением когнитивное нарушение включает нарушение когнитивной способности, выбранное из группы, состоящей из внимания и концентрации, обучения простым навыкам и концепциям; памяти; обработки информации; восприятия пространственного соотношения между объектами; продуцирования и понимания языка; беглости речи; решения проблем; принятия решений; и исполнительных функций.
10. Способ по п.9, при этом связанное со старением когнитивное нарушение представляет собой когнитивное нарушение, связанное с естественным старением.
11. Способ по п.9, при этом связанное со старением когнитивное нарушение представляет собой когнитивное нарушение, ассоциированное со связанным со старением заболеванием или расстройством.
12. Способ по п.11, при этом связанное со старением заболевание или расстройство представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, лобно-височную деменцию, боковой амиотрофический склероз, рассеянный склероз, глаукому, миотоническую дистрофию, прогрессирующий надъядерный паралич, спинальную мышечную атрофию, системную атрофию, атаксию, сосудистую деменцию или иные виды деменции.
13. Способ по любому из предыдущих пунктов, при этом способ также включает измерение когнитивной способности у субъекта и детектирование понижения скорости снижения когнитивной способности у субъекта после введения включающего молодую плазму продукта.
14. Способ по любому из пп.1-12, при этом способ также включает измерение когнитивной способности у субъекта и детектирование стабилизации или улучшения в плане когнитивной способности у субъекта после введения продукта на основе крови.
15. Способ по любому из пп.1-7, при этом связанное со старением состояние представляет собой улучшение в плане функции органа.
16. Способ по п.15, при этом орган представляет собой орган центральной нервной системы.
17. Способ по п.15, при этом орган представляет собой периферический орган.
18. Способ по любому из предыдущих пунктов, при этом субъект представляет собой человека.
19. Способ по п.18, при этом возраст субъекта составляет 50 лет или более.
20. Набор, включающий два или более контейнера, при этом каждый контейнер включает включающий молодую плазму продукт и идентификационную информацию, включающую данные о возрасте донора молодой плазмы.
21. Набор по п.20, при этом данные о возрасте включают возраст донора включающего молодую плазму продукта в момент сбора.
22. Набор по пп.20-21, при этом включающий молодую плазму продукт не включает эритроциты.
23. Набор по любому из пп.20-22, при этом включающий молодую плазму продукт не включает лейкоциты.
24. Набор по любому из пп.20-23, при этом включающий молодую плазму продукт является ацеллюлярным.
25. Набор по любому из пп.20-24, при этом включающий молодую плазму продукт не включает белки, имеющие среднюю молекулярную массу ниже предварительно определенного порогового значения.
26. Набор по любому из пп.20-25, при этом включающий молодую плазму продукт получен от донора в возрасте 40 лет или менее.
27. Набор по п.26, при этом включающий молодую плазму продукт получен из пуповины новорожденного.
28. Способ получения продукта на основе крови для применения при лечении связанного со старением когнитивного нарушения у субъекта, при этом способ включает удаление белков, имеющих среднюю молекулярную массу ниже предварительно определенного порогового значения, из включающего плазму продукта на основе крови, полученного от молодого донора, для получения продукта на основе крови для применения при лечении связанного со старением когнитивного нарушения.

29. Способ по п.28, при этом удаление включает эксклюзионную хроматографию.

30. Способ по п.28 или 29, при этом включающий плазму продукт получен от молодого донора с помощью плазмафереза.

31. Способ по любому из пп.28-30, при этом включающий плазму продукт на основе крови получают с помощью способа, включающего добавление антикоагулянта в цельную кровь, полученную от молодого донора, центрифугирование обработанной антикоагулянтом крови со скоростью, являющейся эффективной для осаждения клеток в крови, и сбор супернатанта, при этом супернатант представляет собой включающий плазму продукт на основе крови.

32. Способ по п.31, при этом способ также включает криоконсервацию продукта на основе крови до или после удаления белков, имеющих среднюю молекулярную массу ниже предварительно определенного порогового значения.

33. Способ по любому из пп.28-32, при этом донор представляет собой человека.

34. Способ по п.33, при этом возраст донора составляет 40 лет или менее.

35. Продукт на основе крови для применения при лечении связанного со старением состояния у субъекта, при этом продукт на основе крови получают в соответствии с любым из пп.28-34.

Приведенное выше описание лишь иллюстрирует принципы, связанные с данным изобретением. Очевидно, что специалисты в данной области будут способны определить различные варианты, которые, несмотря на то, что они явно не описаны или не продемонстрированы здесь, соответствуют принципам изобретения, отвечают его духу и входят в охватываемую им область. Более того, все примеры и приведенные здесь условные указания предназначены исключительно для помощи читателю в плане понимания принципов изобретения и концепций для углубления знаний в данной области, при этом они должны пониматься в качестве не ограничивающих явно описанных здесь примеров и условий. Более того, все приведенные здесь указания относительно принципов, аспектов и вариантов осуществления изобретения, а также его конкретных примеров, предназначены для включения их структурных и функциональных эквивалентов. Кроме того, следует понимать, что подобные эквиваленты включают известные в настоящее время эквиваленты и эквиваленты, которые будут разработаны в будущем, т.е. любые разработанные элементы, которые выполняют ту же функцию независимо от их структуры. Объем настоящего изобретения, таким образом, не ограничен приведенными в качестве примеров вариантами осуществления, которые были продемонстрированы и описаны здесь. Скорее область и дух настоящего изобретения определены на основе прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения связанного со старением когнитивного расстройства или заболевания у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества продукта, содержащего молодую плазму крови, полученную от донора или доноров, которые имеют возраст 40 лет или менее, при этом из указанной молодой плазмы крови удалены белки, имеющие среднюю молекулярную массу ниже 3,5 кДа.

2. Способ по п.1, в котором продукт, содержащий молодую плазму крови, не включает эритроциты и/или лейкоциты.

3. Способ по п.1 или 2, в котором продукт, содержащий молодую плазму крови, является ацеллюлярным.

4. Способ по п.1, в котором связанное со старением когнитивное расстройство выбрано из группы, состоящей из трудности концентрации внимания; трудности обучения сложным задачам и концепциям; снижение памяти; снижение скорости обработки информации; трудности восприятия пространственного соотношения между объектами; трудности продуцирования и понимания языка; беглости речи; трудности решения проблем и принятия решений.

5. Способ по п.1, в котором полученная плазма получена из пуповины.

6. Способ по п.1, в котором содержащий молодую плазму продукт не включает белки, имеющие среднюю молекулярную массу 25 кДа или менее.

7. Способ по п.1, в котором содержащий молодую плазму продукт не включает белки, имеющие среднюю молекулярную массу 50 кДа или менее.

8. Способ по п.1, в котором содержащий молодую плазму продукт не включает IgG.

9. Способ по п.1, в котором связанное со старением когнитивное расстройство представляет собой гиппокамп-опосредованное связанное со старением когнитивное расстройство.

10. Способ по п.1, в котором связанное со старением заболевание или расстройство представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, лобно-височную деменцию, боковой амиотрофический склероз, рассеянный склероз, глаукому, миотоническую дистрофию, прогрессирующий надъядерный паралич, спинальную мышечную атрофию, мультисистемную атрофию, атаксию, сосудистую деменцию или иные виды деменции.

11. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором субъект представляет собой человека.

12. Набор для использования в способе по любому из пп.1-11, содержащий два или более контейнера, при этом каждый контейнер включает

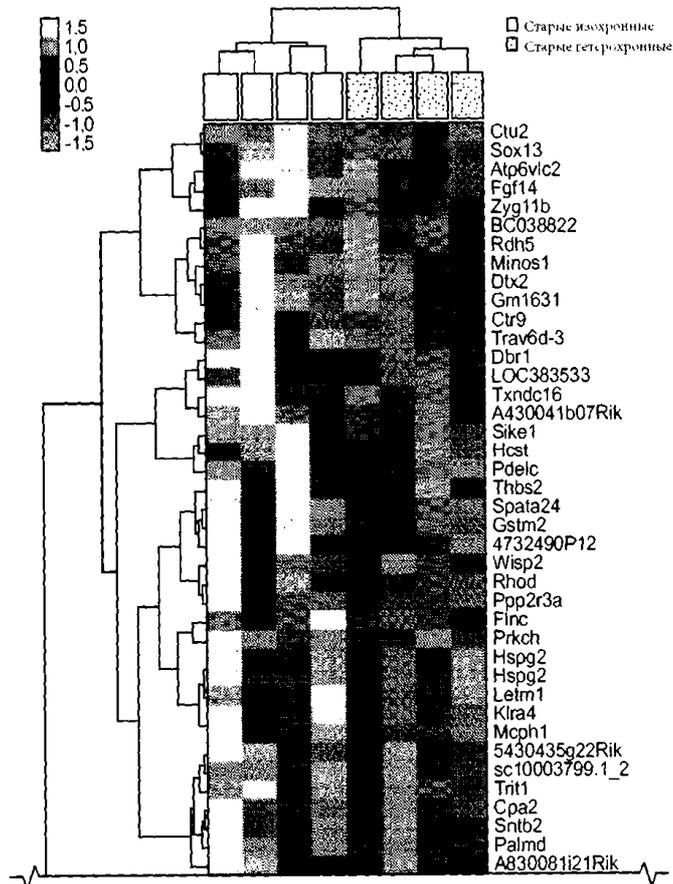
продукт, содержащий молодую плазму крови; и информацию, включающую данные о возрасте донора молодой плазмы крови.

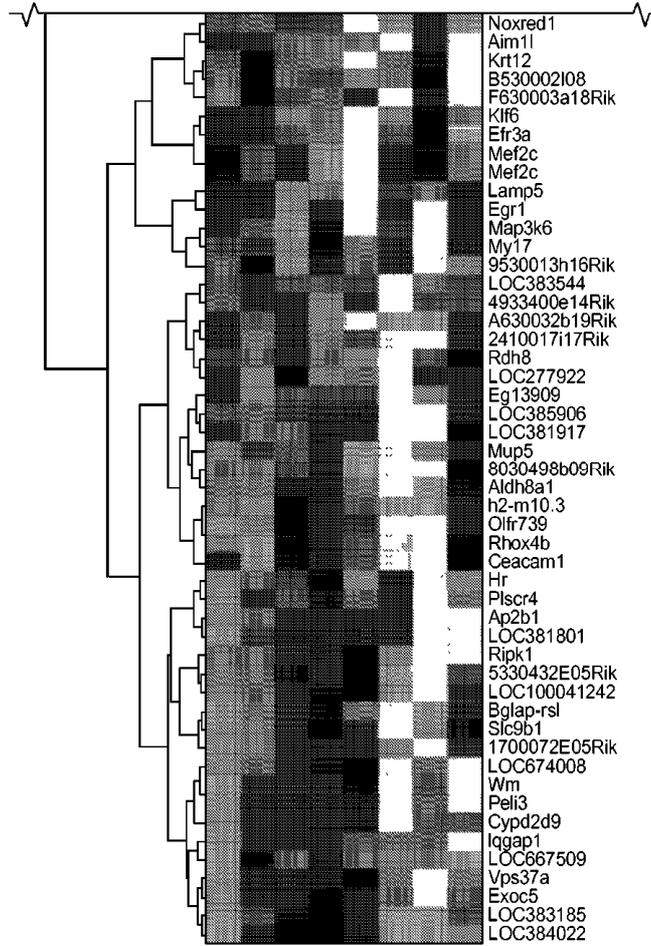
13. Способ получения молодой плазмы крови для использования в способе по любому из пп.1-11, при этом способ включает удаление белков, имеющих среднюю молекулярную массу ниже 3,5 кДа, из молодой плазмы крови, полученной от донора или доноров, которые имеют возраст, указанный в п.1.

14. Применение продукта, содержащего молодую плазму крови, для лечения связанного со старением когнитивного расстройства или заболевания у субъекта, где плазма получена в соответствии со способом по п.13.



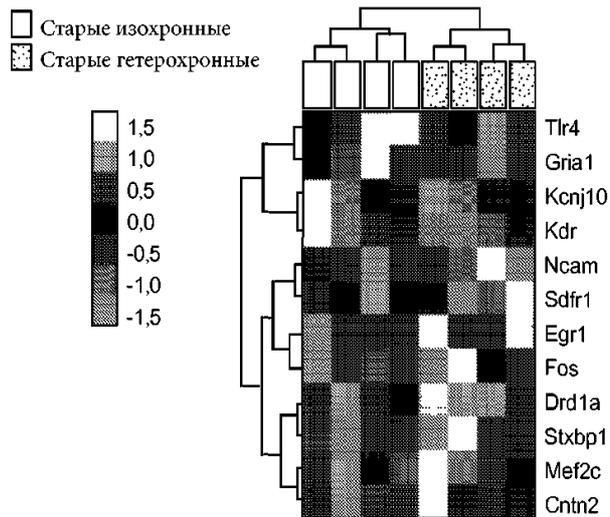
Фиг. 1а



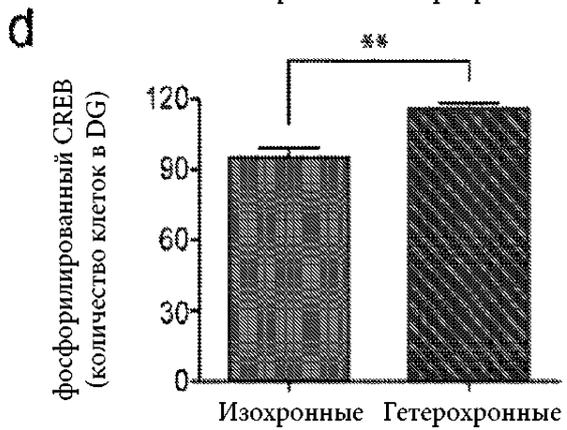
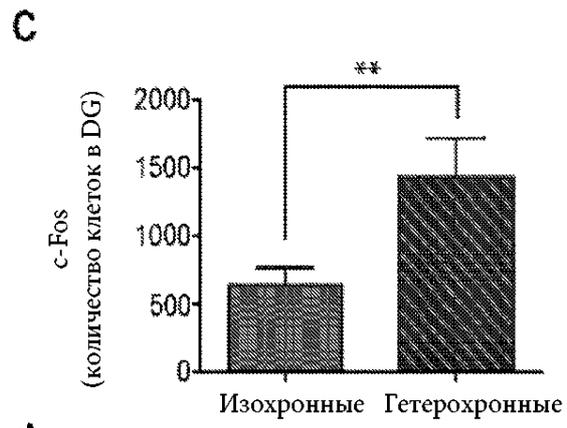
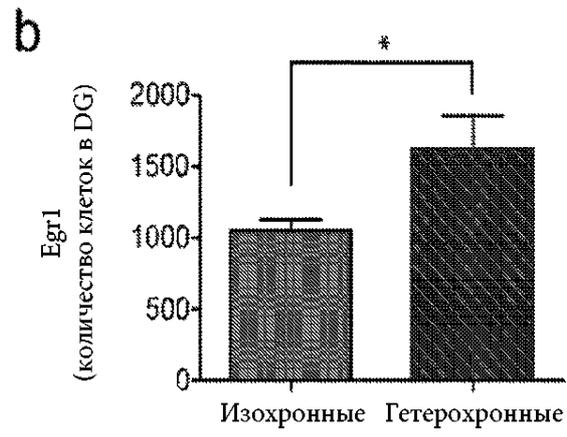


Фиг. 1b

Профиль регуляции синаптической пластичности

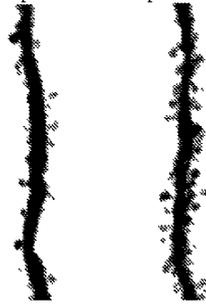


Фиг. 1c

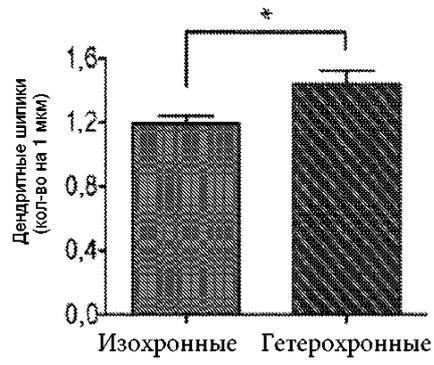


Фиг. 2b-d

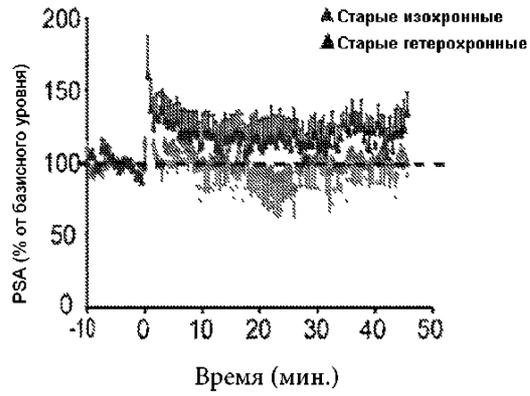
е
Старые изохронные Старые гетерохронные



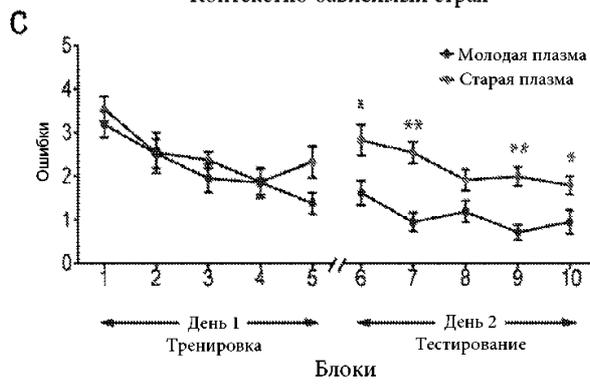
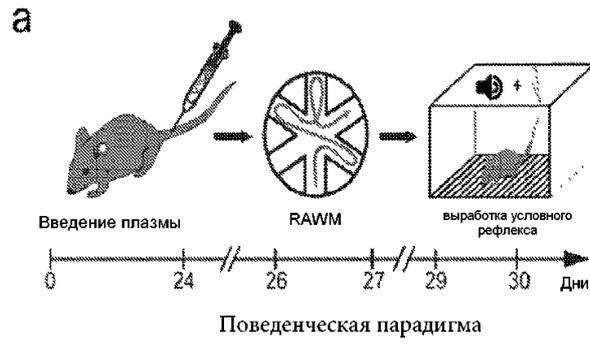
ф



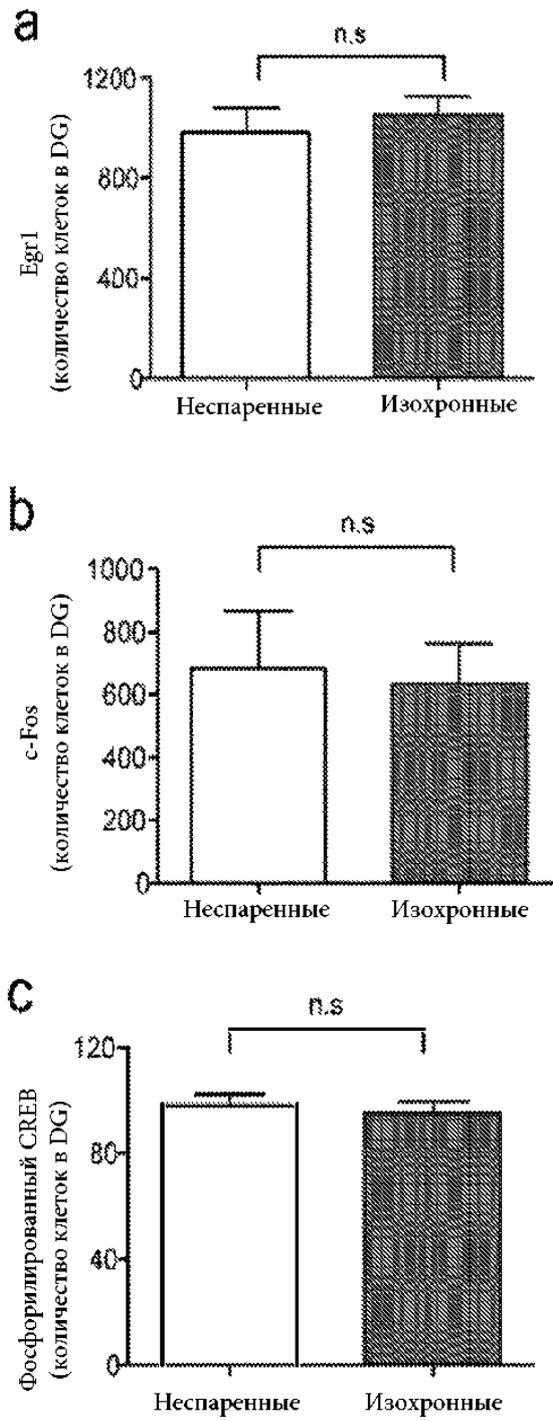
г



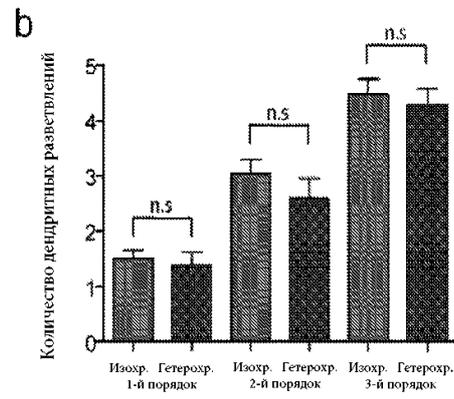
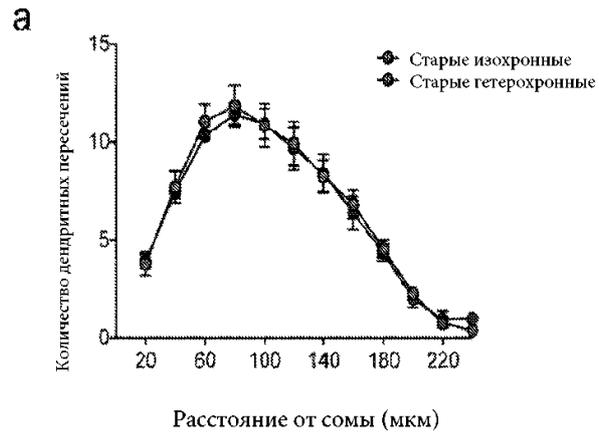
Фиг. 2e-g



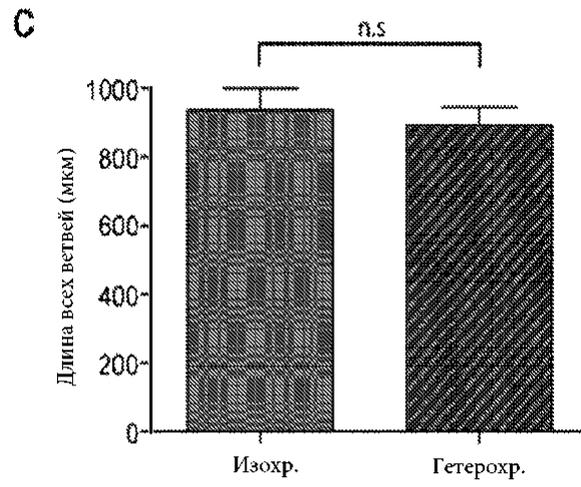
Фиг. 3а-с



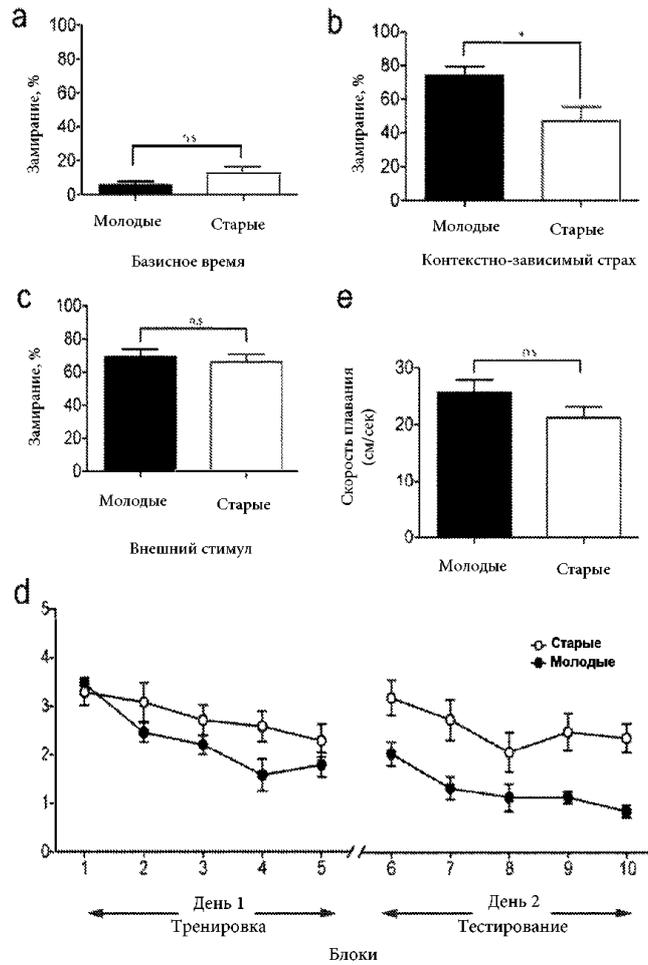
Фиг. 4а-с



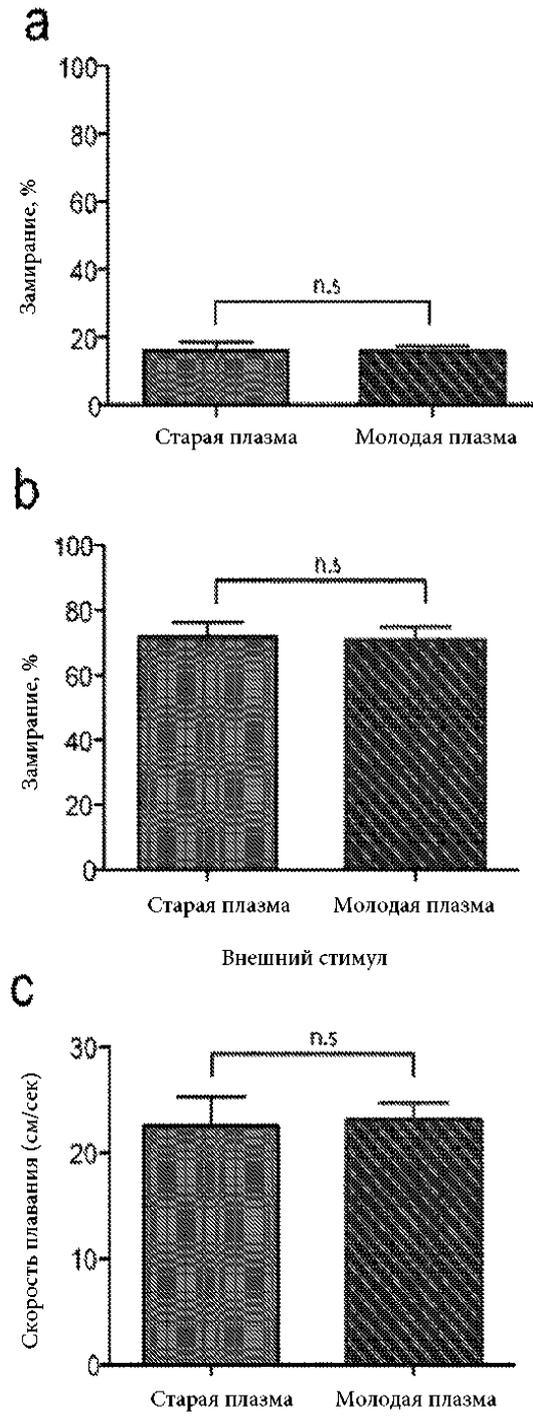
Фиг. 5a-b



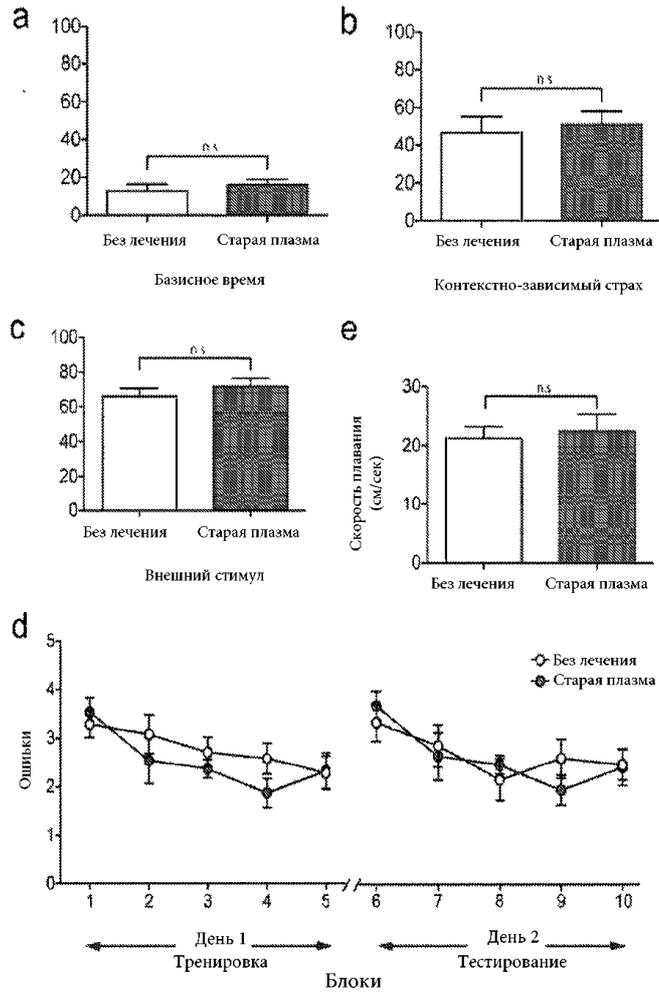
Фиг. 5с-d



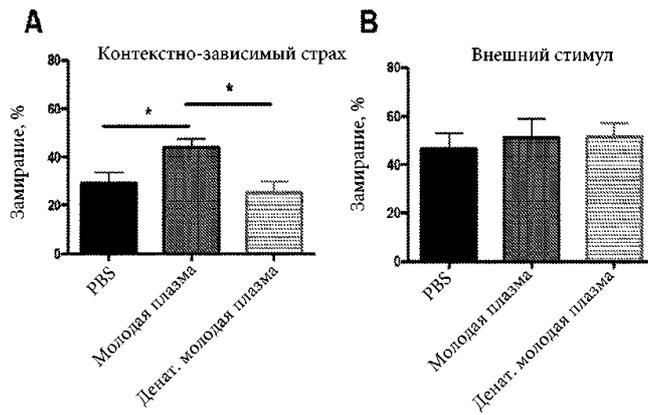
Фиг. 6а-е



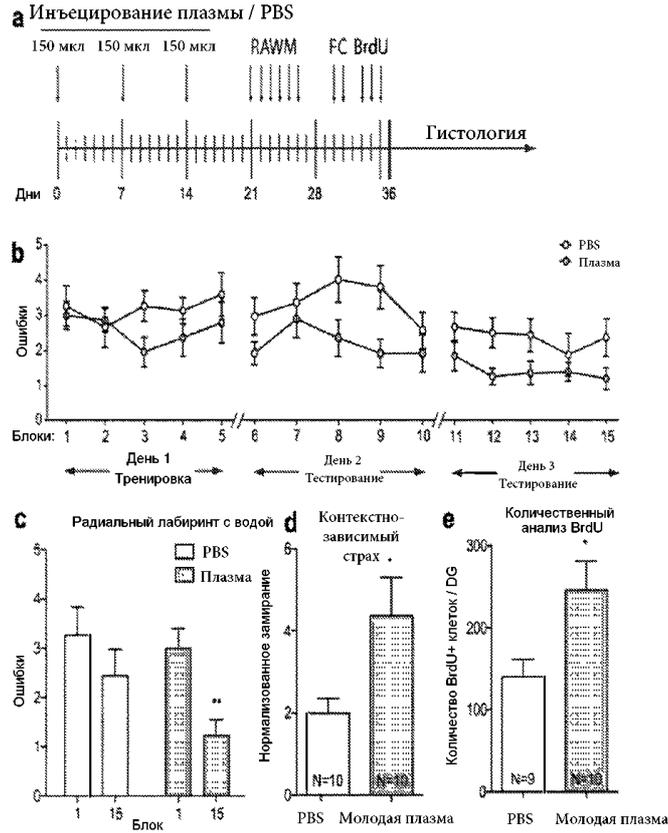
Фиг. 7а-с



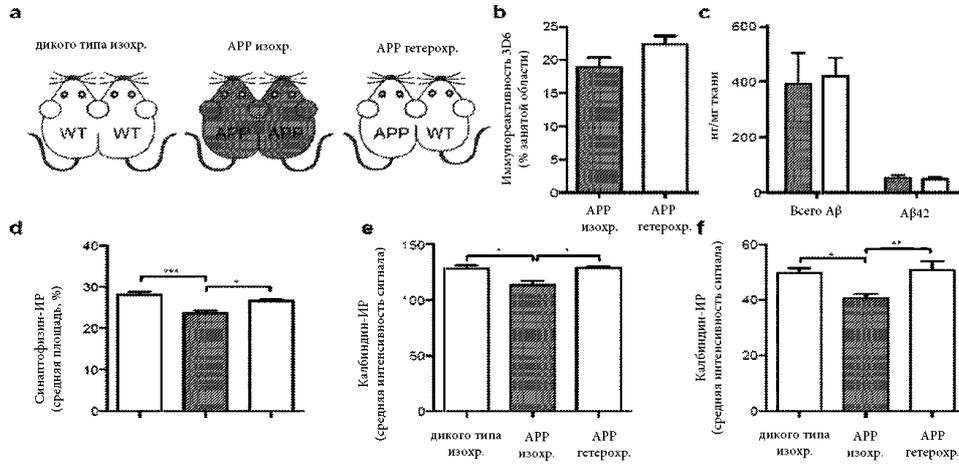
Фиг. 8а-е



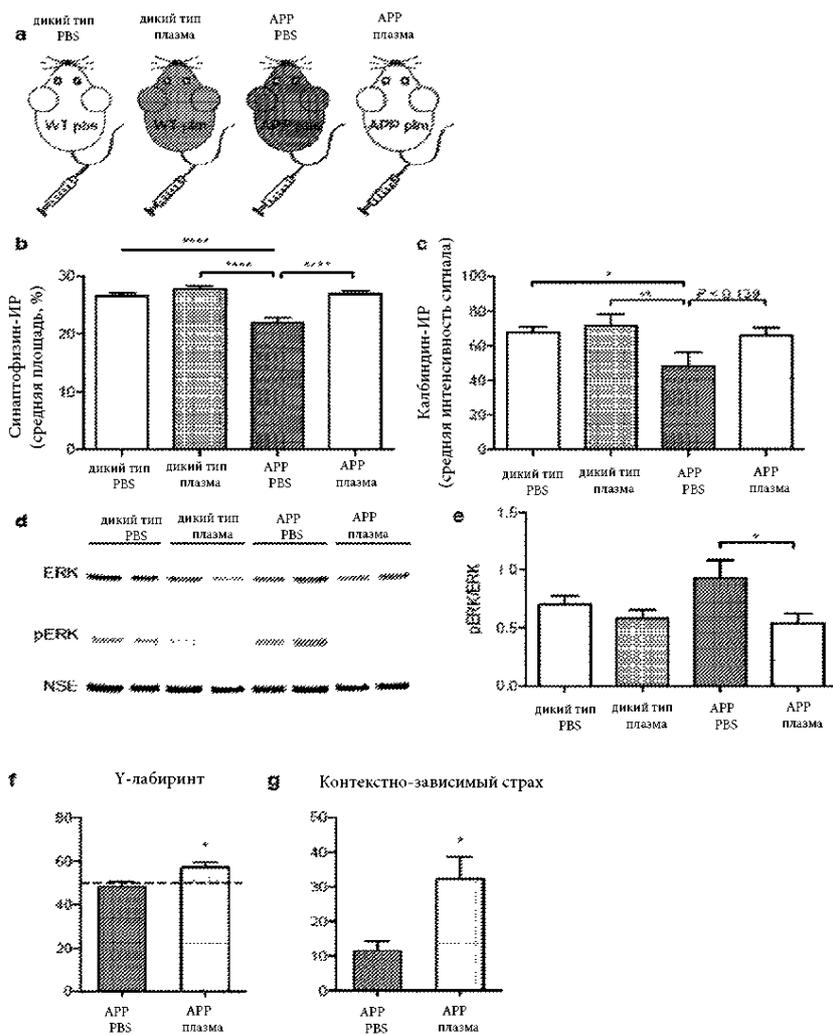
Фиг. 9



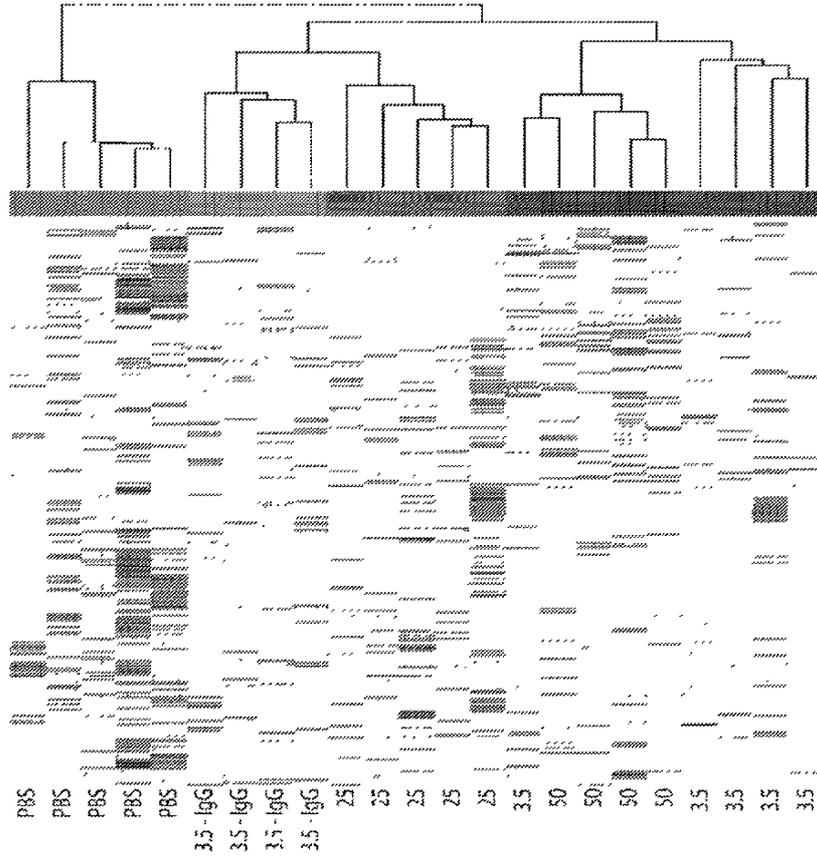
Фиг. 10



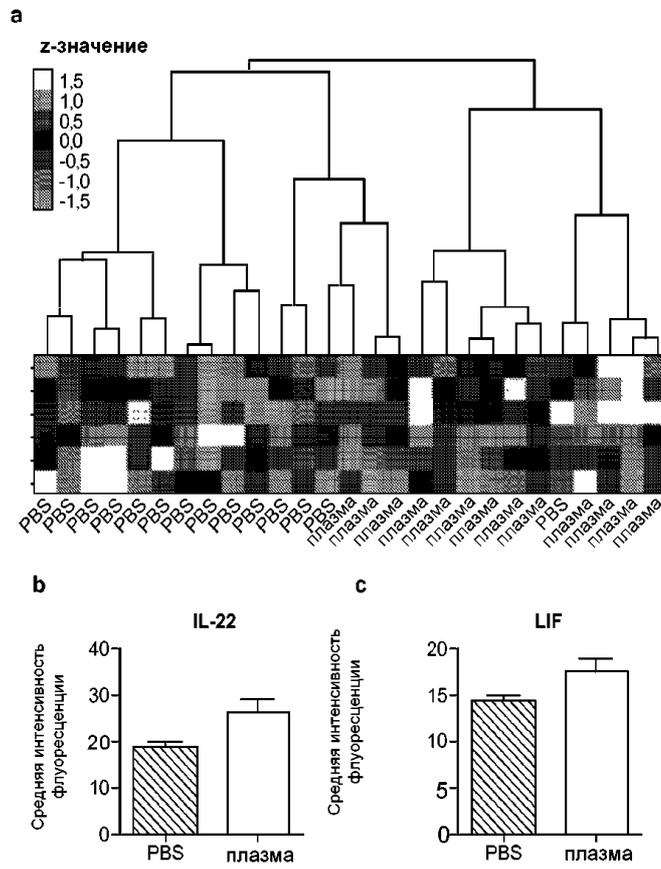
Фиг. 11



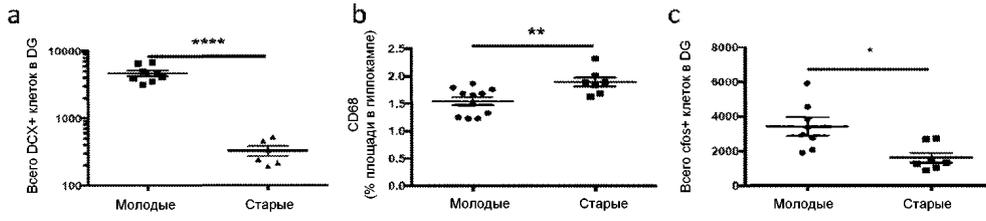
Фиг. 12



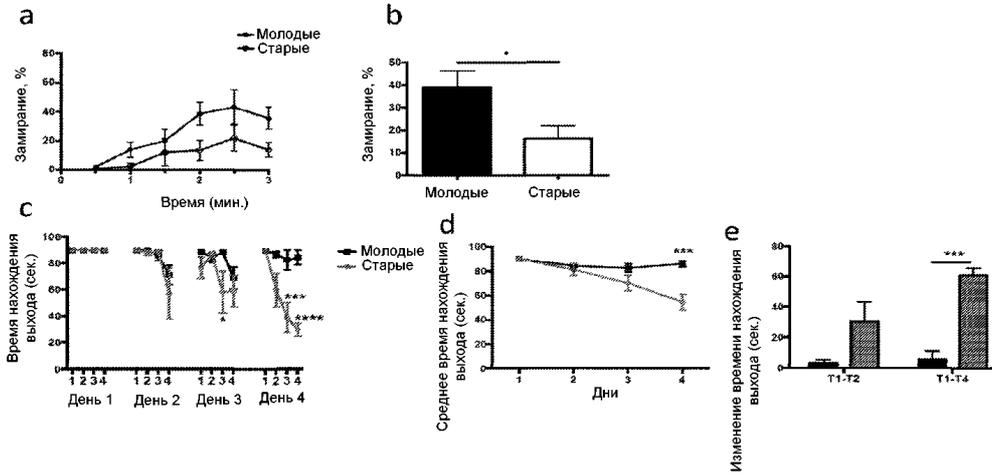
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

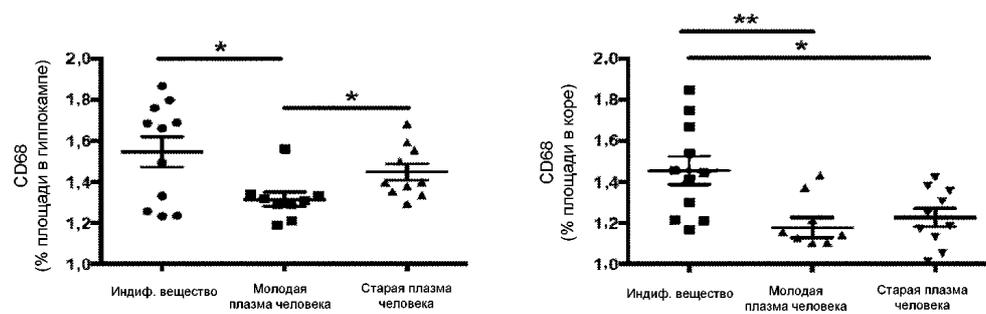


Фиг. 16



Отдельные секретируемые сигнальные белки

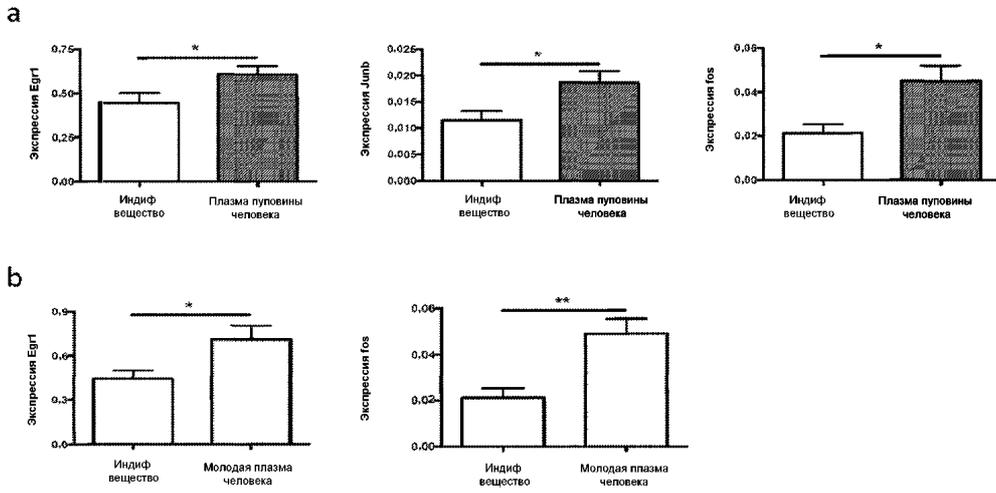
Фиг. 17



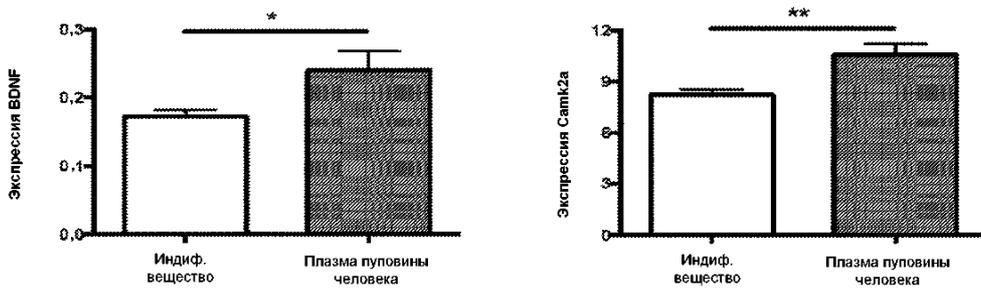
Фиг. 18



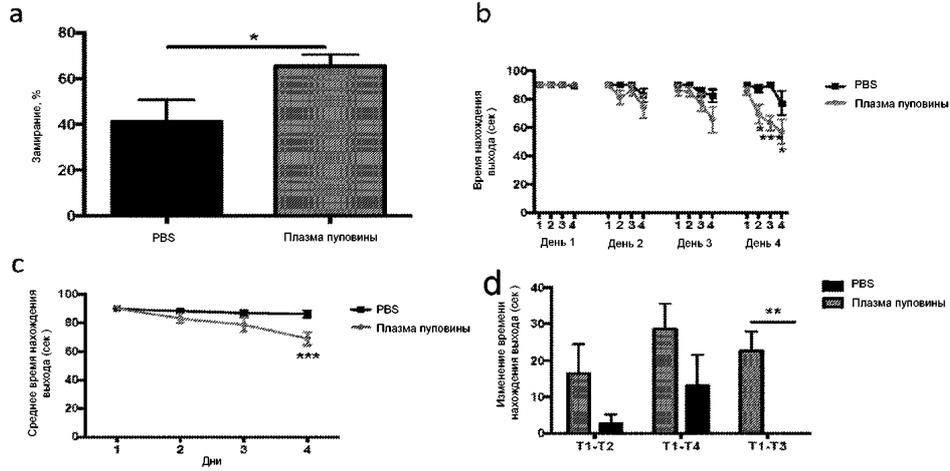
Фиг. 19



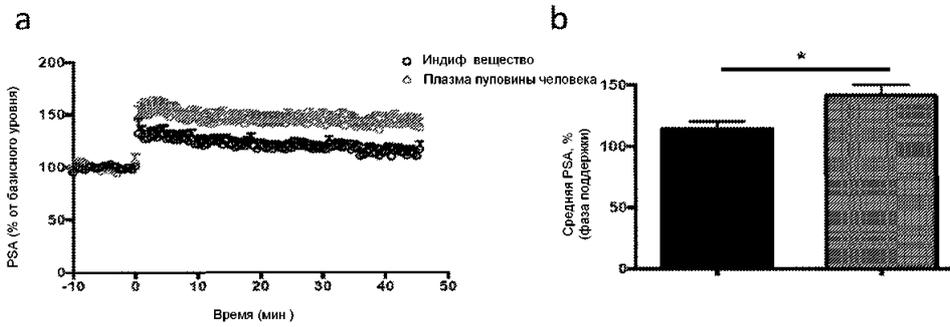
Фиг. 20



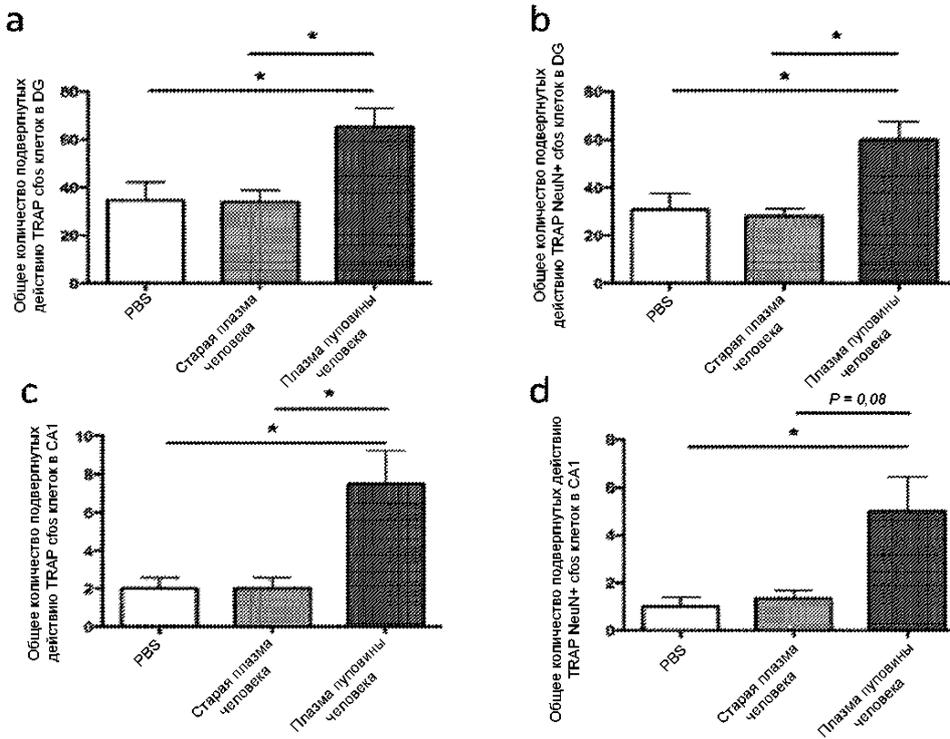
Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23



Фиг. 24