

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **039316**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.01.12**

**(51)** Int. Cl. *A61K 38/38* (2006.01)  
*A61K 35/14* (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201990257**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.04.27**

---

**(54) ФРАКЦИИ ПЛАЗМЫ КРОВИ В КАЧЕСТВЕ ЛЕЧЕНИЯ КОГНИТИВНЫХ  
РАССТРОЙСТВ, СВЯЗАННЫХ СО СТАРЕНИЕМ**

---

**(31)** 62/376,529; 62/412,258

**(32)** 2016.08.18; 2016.10.24

**(33)** US

**(43)** 2019.07.31

**(86)** PCT/US2017/029953

**(87)** WO 2018/034712 2018.02.22

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

**(72)** Изобретатель:  
Бэлл Дэвид (IE), Николич Кароли,  
Данг Ву, Брейтуэйт Стивен П.,  
Галлагер Иэн, Минами С. Сакура,  
Маккракен Джо (US)

**(74)** Представитель:  
Угрюмов В.М., Глухарёва А.О.,  
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,  
Осипенко Н.В., Лебедев В.В.,  
Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин  
Ш.Ф., Парамонова К.В., Николаева  
О.А. (RU)

**(56)** BOADA et al., "Treatment of Alzheimer disease using combination therapy with plasma exchange and haemapheresis with albumin and intravenous immunoglobulin: Rationale and treatment approach of the AMBAR (Alzheimer Management By Albumin Replacement) study", *Neurologia*, Vol. 31, No. 7, pages 473-481 (29 July 2016). See abstract; page 479. US-A1-20090111740

HUGHES et al., "Clinical applications of intravenous immunoglobulins in neurology", *Clinical and Experimental Immunology*, Vol. 158, suppl.1, pages 34-42 (2009). See abstract; pages 38-40.

VILLEDA et al., "Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice", *Nature Medicine*, Vol. 20, No. 6, pages 659-663 (2014). See the whole document. US-A-4900720

---

**(57)** Описаны способы и композиции для лечения и/или предотвращения связанных со старением состояний. Указанные композиции, используемые в указанных способах, включают фракции, полученные из плазмы крови, демонстрирующие эффективность при лечении и/или профилактике связанных со старением состояний, таких как нейрокогнитивные расстройства.

---

**B1**

**039316**

**039316  
B1**

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

В соответствии с разделом 35 Кодекса законов США § 119 (e) заявка на данное изобретение заявляет приоритет по дате подачи предварительной заявки на патент США № 62/412258, поданной 24 октября 2016 г.; описание которой включено в данный документ посредством ссылки.

### **Область техники**

Данное изобретение относится к профилактике и лечению заболеваний, связанных со старением. Изобретение относится к применению продуктов крови, таких как фракции плазмы крови, для лечения и/или предотвращения состояний, связанных со старением, таких как нейрокогнитивные и нейродегенеративные расстройства.

### **Уровень техники**

Нижеследующее описание предлагается только в качестве справочной информации и не признается предшествующим уровнем техники для данного изобретения.

Старение является важным фактором риска для многих заболеваний человека, включая когнитивные нарушения, рак, артрит, потерю зрения, остеопороз, диабет, сердечно-сосудистые заболевания и инсульт. В дополнение к нормальной потере синапсов в ходе естественного старения, потеря синапсов является ранним патологическим событием, общим для многих нейродегенеративных состояний, и наилучшим образом коррелирует с нейрональными и когнитивными нарушениями, связанными с этими состояниями. По существу, старение остается самым доминирующим фактором риска нейродегенеративных заболеваний, связанных с деменцией, таких как болезнь Альцгеймера (AD) (Bishop, N.A. et al., *Neural mechanisms of ageing and cognitive decline*. *Nature*, 464(7288), 529-535 (2010); Heeden, T. et al., *Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience*. *Nat. Rev. Neurosci.* 5(2), 87-96 (2004); Mattson, M.P., et al., *Ageing and neuronal vulnerability*. *Nat. Rev. Neurosci.* 7(4), 278-294 (2006)). Старение влияет на все ткани и функции организма, включая центральную нервную систему, а снижение таких функций, как когнитивная способность, может серьезно повлиять на качество жизни. Лечение снижения когнитивных способностей и нейродегенеративных расстройств имело ограниченный успех в профилактике и реверсии нарушений. Поэтому важно определить новые методы лечения для поддержания когнитивной целостности путем защиты от старения, противодействия ему или реверсии его эффектов.

### **Сущность изобретения**

Данное изобретение основано на производстве и использовании продуктов крови для лечения и/или предотвращения возрастных расстройств, таких как состояния с когнитивными нарушениями, возрастная деменция и нейродегенеративные заболевания. Данное изобретение признает, среди прочего, необходимость новых терапий для лечения и/или профилактики когнитивных нарушений, возрастной деменции и нейродегенеративных заболеваний. Полученные из крови и плазмы крови композиции по данному изобретению относятся к решению проблемы неудач и недостатков современных терапий путем использования фракций плазмы крови, проявляющих эффективность в лечении и/или профилактике когнитивных нарушений, возрастной деменции и нейродегенеративных заболеваний. Дополнительно, данное изобретение относится к белкам, идентифицированным во фракциях плазмы крови, которые либо могут сами проявлять эффективность в качестве лекарственных или профилактических средств для когнитивных нарушений и возрастной деменции, либо являются мишенями для ингибирования дополнительными агентами.

Данное изобретение также признает, что различия в содержании белка между различными фракциями плазмы крови (например, фракциями, эффуентами (effluents), "фракциями плазмы" ("Plasma Fractions")), белковой фракцией плазмы, раствором человеческого альбумина) могут отвечать за предотвращение и/или улучшение определенных когнитивных нарушений и облегчение нейродегенеративных заболеваний. В качестве примера, а не с целью ограничения, варианты осуществления данного изобретения демонстрируют, что просто более высокая концентрация альбумина в препаратах раствора человеческого альбумина (HAS) не является движущей силой, обеспечивающей улучшенную когнитивную способность, связанную с препаратами белковой фракции плазмы (БФП) с более низкими концентрациями альбумина.

Кровь и плазма крови молодых доноров продемонстрировали улучшение и реверсию ранее существовавших эффектов старения мозга, в том числе на молекулярном, структурном, функциональном и когнитивном уровнях. (Saul A. Villeda, et al. *Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice*. *Nature Medicine*, 20 659-663 (2014)). Данное изобретение относится к фракциям и эффуентам плазмы крови, некоторые из которых традиционно использовались для лечения шока пациента, и к открытию того, что они являются эффективными в качестве способов лечения когнитивных нарушений, связанных со старением.

Таким образом, в соответствии с аспектами данного изобретения предлагаются способы лечения связанных со старением когнитивных нарушений, возрастной деменции и/или нейродегенеративных заболеваний с использованием фракций продуктов плазмы крови. Аспекты способов включают введение фракции плазмы крови индивидууму, страдающему или подверженному риску развития ассоциированного со старением когнитивного нарушения или нейродегенеративного заболевания. Дополнительные аспекты способов включают введение фракции плазмы крови, полученной от пула доноров определенно-

го возрастного диапазона, индивидууму, страдающему или подверженному риску развития когнитивных нарушений, связанных со старением. Также предусматриваются реагенты, устройства и их наборы, которые находят применение при практической реализации способов по данному изобретению.

В варианте реализации изобретения фракция плазмы крови может представлять собой, например, одну из нескольких фракций плазмы крови, полученных в результате процесса фракционирования крови, такого как процесс фракционирования по Кону (Cohn), описанный ниже. В другом варианте реализации фракция плазмы крови может относиться к типу, называемому в данном документе "фракция плазмы", который представляет собой раствор, состоящий из нормального человеческого альбумина, альфа- и бета-глобулинов, гамма-глобулина и других белков, по отдельности или в виде комплексов. В другом варианте реализации фракция плазмы крови может относиться к типу фракции плазмы крови, известному специалистам в данной области как "белковая фракция плазмы" (БФП). В другом варианте реализации фракция плазмы крови может представлять собой фракцию "раствора человеческого альбумина" (HAS). В еще одном варианте реализации фракция плазмы крови может представлять собой фракцию, из которой удалены по существу все факторы свертывания, с целью сохранения эффективности фракции при уменьшенном риске тромбозов. Варианты реализации изобретения могут также включать введение, например, фракции, полученной от молодого донора или от пулов молодых доноров. Другой вариант реализации изобретения может включать мониторинг улучшения когнитивных функций у субъекта, получающего лечение фракцией плазмы крови.

#### **Включение посредством ссылок**

Все публикации и патентные заявки, упомянутые в этом описании, включены в данный документ посредством ссылок в такой же степени, как если бы для каждой отдельной публикации или патентной заявки была специально и отдельно указано про ее включение посредством ссылки.

#### **Краткое описание графических материалов**

Прилагаемые графические материалы иллюстрируют варианты реализации изобретения и вместе с описанием служат для пояснения изобретения. Эти графические материалы предлагаются в качестве иллюстрации, а не с целью ограничения: обращаем внимание на то, что различные элементы графических материалов могут быть выполнены без соблюдения масштаба.

На фиг. 1 представлено время, проведенное в вертикальной стойке, для получавших контроль, PPF1 или HAS1 мышей NSG в возрасте 3 или 13 месяцев, которых помещали на 15 мин в камеру открытого поля.

На фиг. 2 представлена скорость движения для получавших контроль, PPF1 или HAS1 мышей NSG в возрасте 3 или 13 месяцев, которых помещали в камеру открытого поля на 15 мин.

На фиг. 3 представлена пройденная дистанция для получавших контроль, PPF1 или HAS1 мышей NSG в возрасте 3 или 13 месяцев, которых помещали на 15 мин в камеру открытого поля.

На фиг. 4 представлено время, проведенное мышами NSG в возрасте 3 или 13 месяцев, получавшими контроль, PPF1 или HAS1 в новом рукаве лабиринта в сигнальном (cued) тесте с Y-образным лабиринтом.

На фиг. 5 представлено соотношение времени, проведенного мышами NSG в возрасте 3 или 13 месяцев в новых и знакомых рукавах лабиринта (соотношение новый:знакомые) в сигнальном тесте с Y-образным лабиринтом, при введении мышам контроля, PPF1 или HAS1.

На фиг. 6 представлена скорость движения мышей NSG в возрасте 3 или 13 месяцев, получавших контроль, PPF1 или HAS1, в сигнальном тесте с Y-образным лабиринтом.

На фиг. 7 представлена пройденная дистанция перемещения мышей NSG в возрасте 3 или 13 месяцев в сигнальном тесте с Y-образным лабиринтом, при введении мышам контроля, PPF1 или HAS1.

На фиг. 8А представлен процент времени замирания в контекстном тесте памяти условно-рефлекторной реакции страха (contextual fear conditioning test for memory) у мышей NSG в возрасте 3 или 13 месяцев, получавших контроль, PPF1 или HAS1.

На фиг. 8В представлен процент времени замирания в слуховом сигнальном тесте памяти условно-рефлекторной реакции страха у мышей NSG в возрасте 3 и 13 месяцев, получавших контроль, PPF1 или HAS1.

На фиг. 9 количественно представлен процент времени замирания на протяжении последних 90 секунд сигнального теста памяти условно-рефлекторной реакции страха у мышей NSG в возрасте 3 и 13 месяцев, получавших контроль, PPF1 или HAS1.

На фиг. 10А представлен латентный период лабиринта Барнса, используемого для тестирования пространственной памяти. Представлен латентный период достижения целевого отверстия у мышей NSG в возрасте 3 и 13 месяцев, получавших контроль, PPF1 или HAS1.

Фиг. 10В представляет количественную оценку средних значений для последних 3 испытаний, изображенных на фиг. 10А.

На фиг. 11А представлено количественное определение числа клеток с положительным окрашиванием на даблкортин (Doublecortin, Dcx), являющийся маркером новообразующихся нейронов, в зубчатой извилине мышей NSG в возрасте 3 и 13 месяцев, получавших контроль, PPF1 или HAS1 дважды в неделю на протяжении периода до 6 месяцев.

На фиг. 11В представлено количественное определение числа клеток с положительным окрашиванием на Ki67, являющийся маркером пролиферирующих клеток, в зубчатой извилине мышей NSG в возрасте 3 и 13 месяцев, получавших контроль, PPF1 или HAS1 дважды в неделю на протяжении периода до 6 месяцев.

На фиг. 12 представлена количественная оценка числа клеток с положительным окрашиванием на Dcx у 13-месячных мышей NSG, получавших контроль, PPF1, 1X концентрированный HAS1 или 5X концентрированный HAS1, три раза в неделю в течение пяти недель.

На фиг. 13 представлена количественная оценка числа клеток с положительным окрашиванием на Ki67 у 13-месячных мышей NSG, получавших контроль, PPF1, 1X концентрированный HAS1 или 5X концентрированный HAS1, три раза в неделю в течение пяти недель.

На фиг. 14А представлено число подъемов на задние лапы в камере открытого поля у мышей NOD-scid, получавших два раза в неделю внутривенной инъекцией в хвостовую вену физиологический раствор (контроль) или PPF1, начиная с возраста 6 месяцев. Число подъемов на задние лапы измеряли в течение 15 мин после помещения мышей в камеру открытого поля.

На фиг. 14В представлена скорость движения в камере открытого поля мышей, которым дважды в неделю вводили внутривенной инъекцией в хвостовую вену физиологический раствор (контроль) или PPF1, начиная с возраста 6 месяцев. Скорость измеряли в течение 15 мин после помещения мышей в камеру открытого поля.

На фиг. 14С представлено расстояние, пройденное в камере открытого поля, для мышей, которым дважды в неделю вводили внутривенной инъекцией в хвостовую вену физиологический раствор (контроль) или PPF1, начиная с возраста 6 месяцев. Скорость измеряли в течение 15 мин после помещения мышей в камеру открытого поля.

Фиг. 15 изображает латентный период лабиринта Барнса и гиппокамп-зависимое пространственное обучение и память. Представлено время достижения целевого отверстия у стареющих мышей NSG (в возрасте 12 месяцев), получавших 150 мкл контроля физиологического раствора, молодой плазмы, эф-флюента I или эф-флюента II/III.

Фиг. 16 представляет влияние молодой человеческой плазмы, PPF1 и контроля физиологического раствора на гиппокамп-зависимое пространственное обучение и память у стареющих самцов мышей NSG (в возрасте 12 месяцев). Мыши получали 150 мкл осветленной молодой человеческой плазмы (молодая плазма), PPF1 или физиологического раствора три раза в неделю внутривенно (i.v.) в течение 4 недель, а затем два раза в неделю на протяжении недель 5 и 6, которые были неделями проведения описываемого тестирования. Представлен латентный период достижения убежища (hold) в лабиринте Барнса для каждой экспериментальной группы.

Фиг. 17 представляет влияние молодой человеческой плазмы, PPF1 и контроля физиологического раствора на средний латентный период нахождения целевого отверстия лабиринта Барнса для последних трех испытаний каждого дня испытаний. Стареющие мыши NSG (в возрасте 12 месяцев) получали 150 мкл осветленной молодой человеческой плазмы (молодая плазма), PPF1 или физиологического раствора три раза в неделю внутривенно (i.v.) в течение 4 недель, а затем два раза в неделю на протяжении недель 5 и 6, которые были неделями проведения тестирования.

Фиг. 18 представляет влияние молодой человеческой плазмы, PPF1 и контроля физиологического раствора на выживаемость клеток, определяемую по детектированию BrdU (бромдезоксипуридина). Стареющие мыши NSG (в возрасте 12 месяцев) получали 150 мкл осветленной молодой человеческой плазмы (молодая плазма), PPF1 или физиологического раствора три раза в неделю внутривенно (i.v.) в течение 4 недель, а затем два раза в неделю на протяжении недель 5 и 6, которые были неделями проведения поведенческого тестирования. После умерщвления проводили анализ срезов гиппокампа.

На фиг. 19 представлено влияние контроля, PPF1 и HAS1 на пролиферацию нейросфер в культуре коры головного мозга. На фигуре представлены примеры изображений нейросфер из кортикальных культур после 21 дня *in vitro*, визуализированных для Tuj1, DAPI или Tuj1 и DAPI.

На фиг. 20 представлено влияние контроля, PPF1 и HAS1 на суммарную длину нейритов в культуре коры головного мозга.

На фиг. 21 представлено влияние носителя, PPF1 и HAS1 на рост сфер и отростков в культуре коры головного мозга. Желтая окраска представляет сферы, а розовая окраска представляет нейриты, определенные с помощью программного алгоритма IncuCyte (Essen BioScience, Inc., Ann Arbor, MI).

На фиг. 22А представлено количественное определение числа нейросфер, в процентах от группы носителя, в коре головного мозга эмбрионов мышей E14-15, суспендированной в нейрональной базальной среде, дополненной B27 и 2 mM глутамакса (Glutamax) (носитель), PPF1 (10% от 5% маточного раствора) или HAS1 (10% от 5% маточного раствора).

На фиг. 22В представлено количественное определение длины нейритов, в процентах от группы носителя, в коре головного мозга эмбрионов мышей E14-15, суспендированной в нейрональной базальной среде, дополненной B27 и 2 mM глутамакса (носитель), PPF1 (10% от 5% маточного раствора) или HAS1 (10% от 5% маточного раствора).

На фиг. 22С представлено количественное определение числа точек ветвления нейритов, в процен-

тах от группы носителя, в коре головного мозга эмбрионов мышей E14-15, суспензированной в нейрональной базальной среде, дополненной B27 и 2 мМ глутамакса (носитель), PPF1 (10% от 5% маточного раствора) или HAS1 (10% от 5% маточного раствора).

На фиг. 22D представлено количественное определение размера нейросфер, в процентах от группы носителя, в коре головного мозга эмбрионов мышей E14-15, суспензированной в нейрональной базальной среде, дополненной B27 и 2 мМ глутамакса (носитель), PPF1 (10% от 5% маточного раствора) или HAS1 (10% от 5% маточного раствора).

На фиг. 23 представлено количественное определение числа нейросфер с положительным окрашиванием на Sox2, которые были обработаны контрольным носителем (нейрональная базальная среда с добавлением B27 и 2 мМ глутамакса), PPF1 (10% от 5% маточного раствора) или HAS1 (10% от 5% маточного раствора). Окрашивание Sox2 является индикатором потенциала нейросферы к нейрогенезу.

#### **Подробное описание сущности изобретения**

##### **1. Вступление.**

Данное изобретение относится к идентификации и обнаружению способов и композиций для лечения и/или профилактики когнитивных нарушений, включая возрастную деменцию и нейродегенеративные заболевания. Описанные здесь способы и композиции для лечения субъектов, страдающих такими расстройствами, являются аспектами данного изобретения. Способы и композиции, описанные в данном документе, полезны в: предотвращении когнитивных нарушений, возрастной деменции и нейродегенеративных заболеваний; улучшении симптомов когнитивных нарушений, возрастной деменции и нейродегенеративных заболеваний; замедлении прогрессирования связанных со старением когнитивных нарушений, возрастной деменции и нейродегенеративных заболеваний; и/или реверсии прогрессирования связанных со старением когнитивных нарушений, возрастной деменции и нейродегенеративных заболеваний. Осуществление изобретения включает использование в качестве лечения фракций плазмы крови, таких как одна или несколько фракций или эфлюентов, полученных в результате процессов фракционирования крови, например, таких как процесс фракционирования по Кону, описанный ниже. Вариант реализации изобретения включает использование фракции плазмы (раствора, состоящего из нормального человеческого альбумина, альфа- и бета-глобулинов, гамма-глобулина и других белков, взятых по отдельности либо в виде комплексов, далее называемого "фракция плазмы" ("Plasma Fraction")). Другой вариант реализации изобретения включает использование для лечения белковой фракции плазмы (Plasma Protein Fraction, PPF). Другой вариант реализации изобретения включает использование для лечения фракции раствора человеческого альбумина (HAS). Еще один вариант реализации включает использование эфлюентов из процессов фракционирования крови, таких как эфлюент I или эфлюент II/III, описанные ниже. Дополнительный вариант реализации включает фракцию плазмы крови, из которой были удалены практически все факторы свертывания с целью сохранения эффективности при одновременном снижении риска тромбозов (например, см. патентную заявку США № 62/236710, которая в полном объеме включена в данное описание посредством ссылки).

Перед подробным описанием данного изобретения отметим, что следует понимать, что это изобретение не ограничивается конкретно описанными способом или композицией, так как они, конечно, могут меняться. Также следует понимать, что употребляемая в данном документе терминология предназначена исключительно для описания конкретных вариантов реализации изобретения и не является ограничивающей, так как объем данного изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

Публикации, описываемые в данном документе, приведены исключительно по причине их раскрытия до даты подачи заявки на данное изобретение. Ничто в данном документе не следует интерпретировать как допущение того, что данное изобретение не может предшествовать такой публикации в силу ранее сделанного изобретения. Кроме того, указанные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, которые могут нуждаться в независимом подтверждении.

Следует понимать, что при указании диапазона значений любое промежуточное значение, вплоть до десятых долей от величины нижнего предела, если иное явным образом не следует из контекста, находящееся между верхним и нижним пределами указанного диапазона, также считается конкретно раскрытым. Каждый меньший диапазон, находящийся между любым указанным значением или промежуточным значением в указанном диапазоне и любым другим указанным или промежуточным значением в указанном диапазоне, включен в объем данного изобретения. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут независимо входить в такой диапазон или не входить в него, и каждый диапазон, для которого любое из, или ни одно из, или оба предельных значения входят в меньшие диапазоны, также включены в объем данного изобретения, за исключением любого явным образом исключенного предельного значения в указанном диапазоне. В тех случаях, когда указанный диапазон включает одно или оба предельных значения, диапазоны, исключающие любое одно или оба эти предельные значения, также включены в объем изобретения.

Следует отметить, что формула изобретения может быть составлена таким образом, чтобы исключить любой необязательный элемент. По существу, это утверждение должно служить обоснованием антецедентного характера использования такой исключительной терминологии, как "единственно", "толь-

ко" и т.п., в связи с перечислением элементов притязаний или использованием "отрицательного" ограничения.

Как будет понятно квалифицированным специалистам в данной области техники после прочтения этого описания, каждый из отдельных вариантов реализации, описанных и проиллюстрированных в данном документе, имеет отдельные компоненты и признаки, которые могут быть легко выделены из, или объединены с признаками любого из других нескольких вариантов реализации без выхода за пределы объема или сущности данного изобретения. Любой изложенный метод может быть выполнен в порядке перечисления событий или в любом другом логически возможном порядке.

## 2. Определения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном описании, имеют значения, которые обычно подразумеваются рядовым специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Хотя при осуществлении или тестировании данного изобретения могут использоваться любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, некоторые возможные и предпочтительные способы и материалы описаны ниже. Все публикации, упомянутые в данном документе, включены в него посредством ссылки для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми цитируются указанные публикации. Следует понимать, что данное описание заменяет собой любое описание включенной публикации в случае наличия противоречий.

Следует отметить, что в данном описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают множественное число, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на "клетку" включает в себя множество таких клеток, а ссылка на "пептид" включает ссылку на один или несколько пептидов и их эквивалентов, например полипептиды, известные специалистам в данной области, и т.д.

При описании способов по данному изобретению термины "хозяин", "субъект", "индивидуум" и "пациент" используются взаимозаменяемо и относятся к любому млекопитающему, нуждающемуся в таком лечении в соответствии с раскрытыми способами. Такие млекопитающие включают, например, людей, овец, коров, лошадей, свиней, собак, кошек, не являющихся людьми приматов, мышей и крыс. В определенных вариантах реализации субъект представляет собой не являющееся человеком млекопитающее. В некоторых вариантах реализации субъект является сельскохозяйственным животным. В других вариантах реализации субъект является домашним животным. В некоторых вариантах реализации субъект является млекопитающим. В определенных случаях субъект является человеком. Другие субъекты могут включать домашних животных (например, собак и кошек), домашний скот (например, коров, свиней, коз, лошадей и т.п.), грызунов (например, мышей, морских свинок и крыс, например, в случае животных моделей заболевания), а также приматов, не являющихся человеком (например, шимпанзе и обезьян). По существу, субъекты по изобретению включают, без ограничений, млекопитающих, например людей и других приматов, таких как шимпанзе и другие виды высших обезьян и обезьян; и т.п., причем в определенных вариантах реализации субъектами являются люди. Термин "субъект" также подразумевает включение особи или организма любого возраста, веса или других физических характеристик, причем субъектами могут быть взрослый, ребенок, младенец или новорожденный.

Под "молодым" или "молодым индивидуумом" подразумевается индивидуум, который имеет календарный возраст 40 лет или меньше, например 35 лет или меньше, в том числе 30 лет или меньше, например, 25 лет или меньше или 22 года или меньше. В некоторых случаях индивидуумом, который служит источником продукта крови, содержащего молодую плазму, является индивидуум в возрасте 10 лет или меньше, например 5 лет или меньше, в том числе 1 год или меньше. В некоторых случаях субъектом является новорожденный, и источником продукта плазмы является пуповина, причем продукт плазмы собирают из пуповины новорожденного. Таким образом, "молодой" и "молодой индивидуум" могут относиться к субъекту в возрасте от 0 до 40 лет, например 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 лет. В других случаях "молодой" и "молодой индивидуум" могут относиться к биологическому (в противоположность календарному) возрасту, такому как у индивидуума, не демонстрирующего таких уровней воспалительных цитокинов в плазме, какие наблюдаются у сравнительно более старых индивидуумов. И наоборот, такие "молодые" и "молодые индивидуумы" могут относиться к биологическому (в противоположность календарному) возрасту, такому как у индивидуума, демонстрирующего более высокие уровни противовоспалительных цитокинов в плазме по сравнению с уровнями у сравнительно более старых индивидуумов. В качестве примера, и без ограничений, воспалительный цитокин представляет собой эотаксин, и относительная разница (fold difference) между молодым субъектом или молодым индивидуумом и более старыми индивидуумами составляет по меньшей мере 20%. Аналогично, относительная разница между более старыми и более молодыми индивидуумами по другим воспалительным цитокинам может использоваться для указания на биологический возраст. (См., патентную заявку США № 13/575437, которая включена в данный документ посредством ссылки). Обычно индивидуум является здоровым, например индивидуум не имеет гематологического злокачественного заболевания или аутоиммунного заболевания во время взятия материала (time of harvest).

Под "индивидуумом, страдающим от или подверженным риску связанного со старением когнитив-

ного нарушения", подразумевается индивидуум в возрасте, составляющем более 50% от его ожидаемой продолжительности жизни, например, более 60%, например, более 70%, например, более 75, 80, 85, 90, 95 или даже 99% от его ожидаемой продолжительности жизни. Возраст индивидуума будет зависеть от вида, о котором идет речь. Таким образом, эти процентные значения основаны на прогнозируемой продолжительности жизни для рассматриваемого вида. Например, у людей это человек в возрасте 50 лет или старше, например 60 лет или старше, 70 лет или старше, 80 лет или старше, 90 лет или старше и, как правило, не старше 100 лет, например 90 лет, т.е. в возрасте от 50 до 100 лет, например 50, ..., 55, ..., 60, ..., 65, ..., 70, ..., 75, ..., 80, ..., 85, ..., 90, ..., 95, ..., 100 лет или старше, или любой возраст от 50 до 100 (1000) лет, который страдает от состояния, связанного со старением, как дополнительно описано ниже, например когнитивных нарушений, связанных с естественным процессом старения; человек, которому около 50 лет или старше, например 60 лет или старше, 70 лет или старше, 80 лет или старше, 90 лет или старше и, как правило, не старше 100 лет, т.е. в возрасте от 50 до 100 лет, например 50, ..., 55, ..., 60, ..., 65, ..., 70, ..., 75, ..., 80, ..., 85, ..., 90, ..., 95, ..., 100 лет, у которых еще не начались симптомы старения например, когнитивные нарушения; человек любого возраста, страдающий от когнитивных нарушений вследствие заболевания, связанного со старением, как дополнительно описано ниже, и человек любого возраста, у которого диагностировано заболевание, связанное со старением, которое обычно сопровождается когнитивными нарушениями, причем у человека еще не начались проявления симптомов когнитивных нарушений. Соответствующие значения возраста для субъектов, не являющихся человеком, известны и предназначены для применения в данном документе.

В используемом в данном документе значении термин "лечение" относится к чему-то из (i) предотвращения заболевания или расстройства или (ii) ослабления или устранения симптомов заболевания или расстройства. Лечение может проводиться профилактически (до начала заболевания) или терапевтически (после начала заболевания). Эффект может быть профилактическим в смысле полного или частичного предотвращения заболевания или его симптома и/или терапевтическим в смысле частичного или полного излечения заболевания и/или нежелательного эффекта, присущего указанному заболеванию. Таким образом, термин "лечение" в используемом в данном документе значении охватывает любое лечение связанного со старением заболевания или расстройства у млекопитающего и включает (a) профилактику возникновения заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к данному заболеванию, но не имеет установленного диагноза данного заболевания; (b) ингибирование заболевания, т.е. остановку его развития; или (c) облегчение заболевания, т.е. обеспечение регрессии заболевания. Лечение может приводить к различным физическим проявлениям, например к модуляции экспрессии генов, омоложению тканей или органов и т.д. Терапевтический агент может быть введен до, во время или после начала заболевания. Лечение текущего заболевания, когда лечение стабилизирует или ослабляет нежелательные клинические симптомы у пациента, представляет особый интерес. Такое лечение может проводиться до наступления полной потери функции пораженных тканей. Терапия по данному изобретению может проводиться на симптоматической стадии заболевания и в некоторых случаях после симптоматической стадии заболевания.

В некоторых вариантах реализации связанное со старением состояние, лечение которого проводят, представляет собой связанное со старением нарушение когнитивной способности у индивидуума. Под когнитивными способностями или "познанием" понимают умственные процессы, которые включают внимание и концентрацию, усвоение сложных задач и понятий, память (получение, сохранение и извлечение новой информации в краткосрочной и/или долгосрочной перспективе), обработку информации (работу с информацией, собранной пятью чувствами), визуально-пространственную функцию (визуальное восприятие, восприятие глубины, использование умственных образов, копирование рисунков, конструирование объектов или фигур), создание и понимание языка, беглость речи (подбор слов), решение проблем, принятие решений и исполнительные функции (планирование и расстановку приоритетов). Под "когнитивным снижением" понимают прогрессивное снижение одной или нескольких из этих способностей, например снижение памяти, речи, мышления, суждения и т.д. Под "ухудшением когнитивных способностей" и "когнитивными нарушениями" понимают снижение когнитивных способностей по сравнению со здоровым человеком, например здоровым человеком соответствующего возраста, или по сравнению со способностями человека в более ранний момент времени, например, на 2 недели, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 6 месяцев, 1 год, 2 года, 5 лет или 10 лет или более, раньше. Под "когнитивными нарушениями, связанными со старением" подразумевают нарушение когнитивных способностей, которое обычно связано со старением, включая, например, когнитивные нарушения, связанные с процессом естественного старения, например легкие когнитивные нарушения (M.C.I.); и когнитивные нарушения, связанные с расстройством, связанным со старением, т.е. расстройством, которое наблюдается с возрастающей частотой с усиливающимся физиологическим старением, например нейродегенеративным состоянием, таким как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, лобно-височная деменция, болезнь Хантингтона, амиотрофический боковой склероз, рассеянный склероз, глаукома, миотоническая дистрофия, сосудистая деменция и т.п.

Продукты крови, содержащие компоненты плазмы.

При осуществлении способов по данному изобретению продукт крови, содержащий компоненты

плазмы, вводят нуждающемуся в этом индивидууму, например индивидууму, страдающему от или подверженному риску возникновения когнитивного нарушения и/или возрастной деменции. Таким образом, способы в соответствии с вариантами реализации изобретения включают введение продукта крови, содержащего компоненты плазмы от индивидуума ("индивидуума-донора" или "донора"), индивидууму, который, по меньшей мере, подвержен риску возникновения или страдает когнитивными нарушениями и/или возрастной деменцией ("индивидуум-реципиент" или "реципиент"). Под "продуктом крови, содержащим компоненты плазмы" подразумевается любой полученный из крови продукт, который содержит плазму (например, цельная кровь, плазма крови или ее фракции). Термин "плазма" используется в общепринятом значении для обозначения светло-желтого/бледно-желтого жидкого компонента крови, состоящего примерно из 92% воды, 7% белков, таких как альбумин, гамма-глобулин, антигеофильный фактор и другие факторы свертывания, и 1% минеральных солей, сахаров, жиров, гормонов и витаминов. Неограничительные примеры плазмасодержащих продуктов крови, пригодных для использования в способах по изобретению, включают цельную кровь, обработанную антикоагулянтом (например, ЭДТА, цитратом, оксалатом, гепарином и т.д.), продукты крови, полученные путем фильтрации цельной крови для удаления белых кровяных клеток ("лейкоредукция"), продукты крови, состоящие из плазмы, полученной плазмаферезом или аферезом, свежемороженную плазму, продукты крови, состоящие по существу из очищенной плазмы, и продукты крови, состоящие по существу из фракций плазмы. В некоторых случаях используемый продукт плазмы представляет собой продукт плазмы, полученный из нецельной крови, это означает, что продукт не является цельной кровью, т.е. в нем отсутствуют один или несколько компонентов, присутствующих в цельной крови, таких как эритроциты, лейкоциты и т.д., по крайней мере, в той степени, в которой эти компоненты присутствуют в цельной крови. В некоторых случаях продукт плазмы является по существу, если не полностью, бесклеточным, причем в таких случаях содержание клеток может составлять 5% по объему или менее, например, 1% или менее, включая 0,5% или менее, причем в некоторых случаях бесклеточные фракции плазмы представляют собой композиции, в которых полностью отсутствуют клетки, т.е. они не содержат клеток.

Сбор препаратов крови, содержащих компоненты плазмы.

Варианты осуществления способов, описанных в данном документе, включают введение продуктов крови, содержащих компоненты плазмы, которые могут быть получены от доноров, включая людей-добровольцев. Термин "полученный от человека" может относиться к таким продуктам. Способы сбора плазмасодержащих продуктов крови от доноров хорошо известны в данной области техники (см., например, AABV TECHNICAL MANUAL (Mark A. Fung, et al., eds., 18<sup>th</sup> ed. 2014), включенный в данный документ посредством ссылки).

В одном варианте реализации донорскую кровь получают путем венепункции. В другом варианте реализации венепункция представляет собой разовую венепункцию. В другом варианте реализации не используется замена объемом физиологического раствора. В варианте реализации для получения плазмы, содержащей продукты крови, используется процесс плазмафереза. Плазмаферез может включать отбор определяемого по весу объема плазмы с возвратом клеточных компонентов донору. В варианте реализации во время плазмафереза используют цитрат натрия с целью предотвращения агрегирования клеток. Объем плазмы, отобранной у донора, предпочтительно составляет от 690 до 880 мл после введения цитрата и предпочтительно согласуется с весом донора.

### 3. Фракции плазмы крови.

Во время Второй мировой войны возникла необходимость в стабильном заменителе плазмы, который можно было бы использовать на поле битвы при потере солдатами большого количества крови. В результате были разработаны методы приготовления лиофилизированной плазмы. Однако использование лиофилизированной плазмы в боевой обстановке было затруднено, поскольку для восстановления требовалась стерильная вода. В качестве альтернативы д-р Э. Дж. Кон (Dr. E.J. Cohn) предложил использовать альбумин и приготовил готовый к применению стабильный раствор, который можно было бы ввести немедленно для лечения шока (см. Johan Vandersande, Current Approaches to the Preparation of Plasma Fractions in (Biotechnology of Blood) 165 (Jack Goldstein ed., 1<sup>st</sup> ed. 1991)). В предложенной д-ром Коном процедуре очистки фракций плазмы применяют холодный этанол из-за его денатурирующего эффекта и используют изменения pH и температуры для обеспечения разделения.

Вариант осуществления способов, описанных в данном документе, включает введение субъекту фракций плазмы. Фракционирование - это процесс, при котором определенные подгруппы белков выделяют из плазмы. Технология фракционирования известна в данной области техники и основана на стадиях, разработанных Коном и др. в 1940-х гг. (E. Cohn, Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. 68, J. Am. Chem. Soc. 459 (1946), включена в данный документ посредством ссылки). Этот процесс включает несколько этапов, каждый из которых предусматривает определенные концентрации этанола, а также изменения pH, температуры и осмоляльности, приводящие к селективному осаждению белка. Осадки также отделяют путем центрифугирования или осаждения. Первоначальный "процесс фракционирования по Кону" предусматривал разделение белков через преципитаты на пять фракций, обозначенных как фракция I, фракция II+III, фракция IV-1, фракция IV-4 и фракция V. Альбу-



мин был первоначально идентифицирован как конечный продукт (фракция V) этого процесса. В соответствии с вариантами реализации изобретения каждая фракция (или эффлюент с предыдущей стадии разделения) содержит или потенциально содержит терапевтически полезные белковые фракции (см. Thierry Burnouf, *Modern Plasma Fractionation*, 21(2), *Transfusion Medicine Reviews* 101 (2007); Adil Denizli, *Plasma fractionation: conventional and chromatographic methods for albumin purification*, 4, *J. Biol. & Chem.* 315, (2011); и T. Brodniewicz-Proba, *Human Plasma Fractionation and the Impact of New Technologies on the Use and Quality of Plasma-derived Products*, 5, *Blood Reviews*, 245 (1991), и патенты США № 3869431, 5110907, 5219995, 7531513 и 8772461, которые включены в данный документ посредством ссылок). Может быть произведена корректировка вышеуказанных экспериментальных параметров с целью получения конкретных белковых фракций.

В последнее время фракционирование стало еще более сложным и, по существу, включает дополнительные варианты реализации изобретения. Это недавнее увеличение сложности произошло благодаря использованию хроматографии, приводящей к выделению новых белков из имеющихся фракций, таких как криопреципитат, криопреципитат-обедненная плазма (cryo-poor plasma) и фракции Кона; увеличению выхода IgG за счет объединения хроматографии и процесса этанольного фракционирования и снижению/инактивации/удалению вирусных частиц (там же). Для захвата белков при физиологических значениях pH и ионной силы может быть использована анионообменная хроматография. Это сохраняет функциональную активность белков и/или белковых фракций. Гепарин и моноклональные антитела также используются в аффинной хроматографии. Специалисту в данной области техники будет понятно, что параметры, описанные выше, могут быть отрегулированы для получения конкретных желаемых фракций, содержащих плазменные белки.

В варианте реализации изобретения плазму крови фракционируют в промышленных условиях. Замороженную плазму оттаивают при температуре от 1 до 4°C. Размороженную плазму подвергают непрерывному центрифугированию при охлаждении и выделяют криопреципитат. Извлеченный криопреципитат замораживают при -30°C или ниже и хранят. Криопреципитат-обедненную плазму ("cryo-poor") немедленно обрабатывают для захвата (например, с помощью первичной хроматографии) лабильных факторов коагуляции, таких как комплекс фактора IX и его компонентов, а также ингибиторов протеаз, таких как антитромбин и ингибитор С1-эстеразы. Последовательное центрифугирование и выделение преципитата могут быть использованы на последующих этапах. Такие методы известны рядовому специалисту в данной области техники и описаны, например, в патентах США № 4624780, 5219995, 5288853 и патентных заявках США № 20140343255 и 20150343025, описания которых в полном объеме включены в данный документ посредством ссылок.

В варианте реализации изобретения плазменная фракция может включать плазменную фракцию, содержащую значительную концентрацию альбумина. В другом варианте реализации изобретения плазменная фракция может включать фракцию плазмы, содержащую значительную концентрацию IgG или внутривенного иммунного глобулина (IGIV) (например, Gamunex-C®). В другом варианте реализации изобретения плазменная фракция может включать плазменную фракцию IGIV, такую как Gamunex-C®, которая была в существенной степени обеднена иммунным глобулином (IgG) способами, хорошо известными рядовому специалисту в данной области, такими как, например, белок А-опосредованное обеднение (см. Keshishian, H., et al., *Multiplexed, Quantitative Workflow for Sensitive Biomarker Discovery in Plasma Yields Novel Candidates for Early Myocardial Injury*, *Molecular & Cellular Proteomics*, 14, p. 2375-93 (2015)). В дополнительном варианте реализации фракция плазмы крови может представлять собой фракцию, из которой были удалены по существу все факторы свертывания для сохранения эффективности фракции при уменьшенном риске тромбозов. Например, плазменная фракция может представлять собой плазменную фракцию, как описано в патенте США № 62/376529, поданном 18 августа 2016 г.; описание которого в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

#### 4. Продукты альбумина.

Рядовые специалисты в данной области техники знают две основные категории продуктов альбумина плазмы ("APP"): белковую фракцию плазмы (PPF) и раствор человеческого альбумина (HAS). PPF получают в результате процесса, дающего более высокий выход, чем для HAS, но имеет более низкую минимальную чистоту альбумина, чем HAS (>83% для PPF и >95% для HAS). (*Production of human albumin solution: a continually developing colloid*, P. Matejtschuk et al., *British J. of Anaesthesia*, 85(6):887-95, 888 (2000)). Кроме того, некоторые авторы отмечают, что у PPF есть недостатки из-за присутствия белковых "загрязнителей", таких как РКА (протеинкиназа А), там же. Как следствие, препараты PPF утратили популярность как продукты альбумина плазмы и даже были исключены из Фармакопей некоторых стран, там же. Вопреки этим опасениям, в изобретении выгодно используются эти "загрязнители". Помимо  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ -глобулинов, а также вышеупомянутого РКА, способы по изобретению используют дополнительные белки или другие факторы в "загрязнителях", которые способствуют таким процессам, как нейрогенез, выживание нейрональных клеток и улучшенная познавательная способность.

Квалифицированным специалистам в данной области техники известно, что существуют или существовали несколько коммерческих источников PPF ("коммерческие препараты PPF"). К ним относятся

Plasma-Plex™ PPF (Armor Pharmaceutical Co., Tarrytown, NY), Plasmanate™ PPF (Grifols, Clayton, NC), Plasmatein™ (Alpha Therapeutics, Los Angeles, CA) и Protenate™ PPF (Baxter Labs, Inc. Deerfield, IL).

Квалифицированным специалистам в данной области также известно, что существует или существовало несколько коммерческих источников HAS ("коммерческие препараты HAS"). К ним относятся Albuminar™ (CSL Behring), AlbuRx™ (CSL Behring), Albutein™ (Grifols, Clayton, NC), Buminat™ (Baxatla, Inc., Bannockburn, IL), Flexbumin™ (Baxatla, Inc., Bannockburn, IL) и Plasbumin™ (Grifols, Clayton, NC).

А. Белковая фракция плазмы (человека) (PPF).

Согласно Управлению по контролю за пищевыми продуктами и медикаментами США ("FDA"), "белковая фракция плазмы (человека)" или PPF - это собственное название продукта, определяемого как "стерильный раствор белка, состоящего из альбумина и глобулина, полученного из человеческой плазмы". (Свод федеральных нормативных актов США ("CFR") 21 CFR 640. 90, который включен в данный документ посредством ссылки). Исходным материалом для PPF является плазма, извлеченная из цельной крови, приготовленной в соответствии с предписаниями 21 CFR 640. 1-640. 5 (включены в данный документ посредством ссылки), или исходная плазма, приготовленная в соответствии с предписаниями 21 CFR 640. 60-640. 76 (включены в данный документ посредством ссылки).

PPF подвергают тестированию, чтобы определить его соответствие следующим стандартам, согласно 21 CFR 640. 92 (включен в данный документ посредством ссылки):

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

(б) общий белок в конечном продукте должен содержать не менее 83% альбумина и не более 17% глобулинов. Гамма-глобулин должен составлять не более 1% от общего белка. Состав белка определяется методом, одобренным для каждого производителя директором Центра оценки и исследования биологических продуктов (Center for Biologics Evaluation and Research) Управления по контролю за пищевыми продуктами и медикаментами США.

В используемом в данном документе значении, термин " белковая фракция плазмы" или "PPF" относится к стерильному раствору белка, состоящего из альбумина и глобулина, полученного из плазмы человека, с содержанием альбумина не менее 83% и не более 17% глобулинов (включая  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ -глобулины) и других белков плазмы и не более 1% гамма-глобулина, по результатам определения методом электрофореза. (Hink, J.H., Jr., et al., Preparation and Properties of a Heat-Treated Human Plasma Protein Fraction, Vox Sanguinis, 2(174) (1957)). PPF также может относиться к твердой форме, которая, при суспендировании в растворителе, имеет аналогичный состав. Общая доля глобулинов может быть определена путем вычитания альбумина из общего белка. (Busher, J., Serum Albumin and Globulin, Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations, Chapter 10, Walker HK, Hall WD, Hurst JD, eds. (1990)).

В. Альбумин (человеческий) (HAS).

Согласно FDA, "Альбумин (человеческий)" (также называемый в данном документе "HAS") - собственное название продукта, определяемого как "стерильный раствор альбумина, полученного из плазмы человека". (Свод федеральных нормативных актов США ("CFR") 21 CFR 640. 80, который включен в данный документ посредством ссылки). Исходным материалом для альбумина (человеческого) является плазма, извлеченная из цельной крови, приготовленная в соответствии с предписаниями 21 CFR 640. 1-640. 5 (включены в данный документ посредством ссылки), или исходная плазма, приготовленная в соответствии с предписаниями 21 CFR 640. 60-640. 76 (включены в данный документ посредством ссылки). Другие требования к альбумину (человеческому) перечислены в 21 CFR 640.80-640.84 (включены в данный документ посредством ссылки).

Альбумин (человеческий) подвергают тестированию для определения того, соответствует ли он следующим стандартам, согласно 21 CFR 640. 82:

(А) Концентрация белка. Конечный продукт должен соответствовать одному из следующих значений концентрации:  $4,0 \pm 0,25\%$ ;  $5,0 \pm 0,30\%$ ;  $20,0 \pm 1,2\%$  и  $25,0 \pm 1,5\%$ -ный раствор белка.

(Б) Белковый состав. По крайней мере 96% от общего белка в конечном продукте должно приходиться на альбумин при определении методом, одобренным для каждого производителя директором Центра оценки и исследования биологических продуктов Управления по контролю за пищевыми продуктами и медикаментами США.

Используемый здесь термин "альбумин (человеческий)" или "HAS" относится к стерильному раствору белка, состоящего из альбумина и глобулина, полученного из плазмы человека, с содержанием альбумина не менее 95%, с не более чем 5% глобулинов (включая  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ -глобулины) и других белков плазмы. HAS также может относиться к твердой форме, которая при суспендировании в растворителе имеет аналогичный состав. Общая доля глобулинов может быть определена путем вычитания альбумина из общего белка.

Как понятно рядовому специалисту в данной области техники, фракции PPF и HAS также могут быть лиофилизированными или находиться в другой твердой форме. Такие препараты с соответствующими добавками можно использовать, например, для изготовления таблеток, порошков, гранул или кап-

сул. Твердые формы могут быть использованы для составления препаратов для инъекции путем растворения, суспендирования или эмульгирования в водном или неводном растворителе, таком как растительные или другие подобные масла, синтетические глицериды алифатических кислот, сложные эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоля; и, при желании, с обычными добавками, такими как соллобилизаторы, изотонические агенты, суспендирующие агенты, эмульгаторы, стабилизаторы и консерванты.

5. Фракции с пониженным содержанием факторов свертывания.

В другом варианте реализации изобретения используют фракцию плазмы крови, из которой были удалены по существу все факторы свертывания с целью сохранения эффективности фракции при уменьшенном риске тромбозов. Удобно, чтобы продукт крови мог быть получен от молодого донора или пула молодых доноров и мог быть лишен IgM для обеспечения продукта молодой крови, совместимого по системе АВО. В данное время переливаемая плазма соответствует группе крови АВО, так как присутствие природных антител к антигенам А и В может привести к реакциям переливания. IgM, по-видимому, ответственен за трансфузионные реакции, когда пациенты получают плазму, не соответствующую АВО. Удаление IgM из продуктов или фракций крови помогает устранить трансфузионные реакции у субъектов, которым вводят продукты крови и фракции плазмы крови по изобретению.

Соответственно, в одном варианте реализации изобретение касается способа лечения или предотвращения состояния, связанного со старением, такого как когнитивное нарушение или нейродегенерация у субъекта. Способ включает введение субъекту продукта крови или фракции крови, полученной из цельной крови от индивидуума или пула индивидуумов, причем продукт крови или фракция крови по существу не содержат (а) по меньшей мере одного фактора свертывания крови и/или (б) IgM. В некоторых вариантах реализации индивидуум(ы), от которых получают продукт крови или фракцию крови, являются молодыми особами. В некоторых вариантах реализации продукт крови по существу не содержит по меньшей мере одного фактора свертывания крови и IgM. В определенных вариантах реализации продукт крови по существу не содержит фибриногена (фактор I). В дополнительных вариантах реализации в продукте крови по существу отсутствуют эритроциты и/или лейкоциты. В дополнительных вариантах реализации продукт крови является по существу бесклеточным. В других вариантах реализации продукт крови получают из плазмы. Такие варианты реализации изобретения дополнительно подтверждаются патентной заявкой США № 62/376529, поданной 18 августа 2016 г., которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

6. Продукты белков плазмы, обогащенные белком.

Дополнительные варианты реализации изобретения используют фракции плазмы с пониженной концентрацией альбумина по сравнению с PPF, но с повышенным количеством глобулинов и других белков плазмы (которые некоторые авторы называют "загрязнителями"). Варианты реализации, такие как с PPF, HAS, эффлюентом I и эффлюентом II/III, все по существу не содержат факторов свертывания. Такие фракции плазмы в дальнейшем называются "белково-обогащенные продукты белков плазмы". Например, вариант реализации изобретения может использовать белково-обогащенный продукт белков плазмы, состоящий из 82% альбумина и 18%  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ -глобулинов и других белков плазмы. Другой вариант реализации изобретения может использовать обогащенный белками белковый продукт плазмы, состоящий из 81% альбумина и 19%  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ -глобулинов и/или других белков плазмы. В другом варианте реализации изобретения может быть использован обогащенный белками белковый продукт плазмы, состоящий из 80% альбумина и 20%  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ -глобулинов и/или других белков плазмы. Дополнительные варианты реализации изобретения могут использовать обогащенные белком белковые продукты плазмы, состоящие из 70-79% альбумина и, соответственно, 21-30%  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ -глобулинов и других белков плазмы. Дополнительные варианты реализации изобретения могут использовать обогащенные белком белковые продукты плазмы, состоящие из 60-69% альбумина и, соответственно, 31-40%  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ -глобулинов и других белков плазмы. Дополнительные варианты реализации изобретения могут использовать обогащенные белком белковые продукты плазмы, состоящие из 50-59% альбумина и, соответственно, 41-50%  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ -глобулинов и других белков плазмы. Дополнительные варианты реализации изобретения могут использовать обогащенные белком белковые продукты плазмы, состоящие из 40-49% альбумина и, соответственно, 51-60%  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ -глобулинов и других белков плазмы. Дополнительные варианты реализации изобретения могут использовать обогащенные белком белковые продукты плазмы, состоящие из 30-39% альбумина и, соответственно, 61-70%  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ -глобулинов и других белков плазмы. Дополнительные варианты реализации изобретения могут использовать обогащенные белком белковые продукты плазмы, состоящие из 20-29% альбумина и, соответственно, 71-80%  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ -глобулинов и других белков плазмы. Дополнительные варианты реализации изобретения могут использовать обогащенные белком белковые продукты плазмы, состоящие из 10-19% альбумина и, соответственно, 81-90%  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ -глобулинов и других белков плазмы. Дополнительные варианты реализации изобретения могут использовать обогащенные белком белковые продукты плазмы, состоящие из 1-9% альбумина и, соответственно, 91-99%  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ -глобулинов и других белков плазмы. В дополнительном варианте реализации изобретения могут использоваться обогащенные белком белковые продукты плазмы, которые содержат 0-1% альбумина и 99-

100%  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ -глобулинов и других белков плазмы.

Варианты реализации изобретения, описанные выше, также могут иметь общую концентрацию гамма-глобулина 0-5%.

Конкретные концентрации белков во фракции плазмы могут быть определены с использованием методик, хорошо известных рядовым специалистам в данной области. В качестве примера, без ограничений, такие методики включают электрофорез, масс-спектрометрию, ИФА-анализ (ELISA) и вестерн-блоттинг.

#### 7. Приготовление фракций плазмы крови

Способы приготовления PPF и других плазменных фракций хорошо известны рядовым специалистам в данной области. Один из вариантов реализации изобретения позволяет собирать кровь, используемую для приготовления фракции белка плазмы человека, в колбы с раствором цитрата или антикоагулянта цитрат декстроза для ингибирования коагуляции, с дальнейшим разделением фракций I, II+III, IV и PPF согласно способу, раскрытому Hink et al. (см. Hink, J.H., Jr., et al., Preparation and Properties of a Heat-Treated Human Plasma Protein Fraction, Vox Sanguinis 2 (174) (1957), которая включена в данный документ посредством ссылки). Согласно этому способу смесь можно собирать до 2-8°C. Затем плазму можно отделить центрифугированием при 7°C, удалить и хранить при -20°C. Затем плазму можно размораживать при 37°C и фракционировать предпочтительно в течение 8 ч после извлечения из хранилища при -20°C.

Плазму можно отделить от фракции I, используя 8% этанол при pH 7,2 и температуре от -2 до -2,5°C, с концентрацией белка от 5,1 до 5,6%. Холодный 53,3% этанол (176 мл/л плазмы) с ацетатным буфером (200 мл 4 М ацетата натрия, 230 мл ледяной уксусной кислоты, сколько потребуется (quantum satis) H<sub>2</sub>O до 1 л) может быть добавлен с использованием струй с расходом, например, 450 мл/мин, при понижении температуры плазмы до -2°C. Фракция I может быть отделена и удалена из эффлюента (эффлюент I) путем ультрацентрифугирования. Фибриноген может быть получен из фракции I способами, хорошо известными рядовым специалистам в данной области.

Фракция II+III может быть отделена от эффлюента I путем доведения эффлюента до 21% этанола при pH 6,8, температуре -6°C, с концентрацией белка 4,3%. Холодный 95%-ный этанол (176 мл/л эффлюента I) с 10 М уксусной кислотой, используемой для корректировки pH, можно добавлять с помощью струй с объемным расходом, например, 500 мл/мин во время понижения температуры эффлюента I до -6°C.

Полученный осадок (фракция II+III) можно удалить центрифугированием при -6°C. Гамма-глобулин может быть получен из фракции II+III с использованием способов, хорошо известных рядовым специалистам в данной области.

Фракцию IV-1 можно выделить от эффлюента II+III ("эффлюент II/III") путем доведения эффлюента до 19% этанола при pH 5,2, температуре -6°C и концентрации белка 3%. H<sub>2</sub>O и 10 М уксусную кислоту, используемую для регулирования pH, можно добавлять с помощью струй, поддерживая при этом эффлюент II/III при -6°C в течение 6 ч. Осажденная фракция VI-1 может отстаиваться при -6°C в течение 6 ч с последующим отделением от эффлюента центрифугированием при той же температуре. Стабильная белковая фракция плазмы может быть извлечена из эффлюента IV-1 путем доведения концентрации этанола до 30 процентов при pH 4,65, температуре -7°C и концентрации белка 2,5 процента. Это может быть достигнуто путем корректировки pH эффлюента IV-1 с помощью холодной кислоты-спирта (две части 2 М уксусной кислоты и одна часть 95% этанола). Поддерживая температуру -7°C, добавляют 170 мл холодного этанола (95%) на 1 л откорректированного эффлюента IV-1. Белкам, которые выпадают в осадок, можно дать отстояться в течение 36 ч, а затем удалить их центрифугированием при -7°C.

Выделенные белки (стабильная фракция белков плазмы) могут быть высушены (например, сублимационной сушкой) для удаления спирта и H<sub>2</sub>O. Полученный высушенный порошок можно растворить в стерильной дистиллированной воде, например используя 15 л воды/кг порошка, и pH раствора доводят до 7,0 с помощью 1 М NaOH. Конечная концентрация белка 5% может быть достигнута путем добавления стерильной дистиллированной воды, содержащей ацетилтриптофанат натрия, каприлат натрия и NaCl, до конечных концентраций 0,004 М ацетилтриптофаната, 0,004 М каприлата и 0,112 М натрия. Наконец, раствор может быть отфильтрован при 10°C для получения прозрачного раствора и затем подвергнут термообработке для инактивации патогенов при 60°C в течение не менее 10 ч.

Рядовому специалисту в данной области техники будет понятно, что каждая из различных фракций и эффлюентов, описанных выше, может использоваться в способах по изобретению для лечения заболевания. Например, без ограничений, эффлюенты I или эффлюенты II/III могут использоваться для лечения таких заболеваний, как когнитивные и нейродегенеративные нарушения, и являются вариантами реализации изобретения.

Описанные выше способы получения фракций плазмы крови и белковой фракции плазмы (PPF) являются только иллюстративными и касаются только вариантов реализации изобретения. Рядовому специалисту в данной области техники будет понятно, что эти способы могут варьироваться. Например, pH, температура и концентрация этанола, среди прочего, могут быть отрегулированы для получения различных вариантов фракций плазмы и белковой фракции плазмы в различных вариантах реализации и спосо-

бах по изобретению. В другом примере дополнительные варианты реализации изобретения предусматривают использование нанофильтрации для удаления/инактивации патогенов из фракций плазмы и белковой фракции плазмы.

Дополнительный вариант реализации изобретения предусматривает способы и композицию с использованием и/или включением дополнительных фракций плазмы крови. Например, изобретение, помимо прочего, демонстрирует, что конкретные концентрации альбумина не являются критическими для улучшения когнитивной активности. Следовательно, изобретение предусматривает фракции с пониженной концентрацией альбумина, такие как фракции, содержащие менее 83% альбумина.

#### 8. Лечение.

Аспекты способов по изобретениям, описанных в данном документе, включают лечение субъекта плазмой, содержащей продукт крови, такой как фракция плазмы крови, например, как описано выше. Вариант реализации включает лечение человека с помощью плазмы, содержащей продукт крови. Специалисту в данной области будет понятно, что способы лечения субъектов плазмой, содержащей продукты крови, известны в данной области. В качестве примера, без ограничений, один вариант реализации способов по изобретениям, описанных в данном документе, состоит из введения субъекту свежемороженой плазмы для лечения и/или профилактики когнитивных нарушений и/или возрастной деменции. В одном варианте реализации плазму, содержащую продукт крови, вводят индивидууму, страдающему или подверженному риску когнитивного нарушения и/или возрастной деменции, немедленно, например, на протяжении примерно 12-48 ч после забора от донора. В таких случаях продукт может храниться при охлаждении, например, при 0-10°C. В другом варианте реализации свежемороженая плазма представляет собой плазму, которая хранилась замороженной (криоконсервированной) при -18°C или ниже. Перед введением свежемороженую плазму оттаивают и после оттаивания вводят субъекту через 60-75 мин после начала процесса оттаивания. Каждый субъект предпочтительно получает одну единицу свежемороженой плазмы (200-250 мл), причем свежемороженую плазму предпочтительно получают от доноров заранее определенного возрастного диапазона. В одном варианте реализации изобретения свежемороженую плазму донируют молодые индивидуумы (получают от молодых индивидуумов). В другом варианте реализации изобретения свежемороженую плазму донируют (получают от) доноров того же пола. В другом варианте реализации изобретения свежемороженую плазму донируют (получают от) доноры в возрасте 18-22 лет. В одном варианте реализации субъекты получают лечение два раза в неделю с интервалом 3-4 дня между инфузиями. В варианте реализации изобретения лечение продолжают до тех пор, пока не будет достигнута конкретная конечная точка.

В варианте реализации изобретения плазма, содержащая продукты крови, подвергается скринингу после донирования по группам крови. В другом варианте реализации изобретения плазма, содержащая продукты крови, подвергается скринингу на инфекционные возбудители, такие как ВИЧ I и II, вирус гепатита В (HBV), вирус гепатита С (HCV), вирус Т-клеточного лейкоза человека (HTLV) I и II, коровий антиген вируса гепатита В (anti-HBc), согласно требованиям 21 CFR 640.33 и рекомендациям, содержащимся в руководствах FDA.

В еще одном варианте реализации изобретения субъекта лечат "плазменной фракцией". В варианте реализации изобретения плазменная фракция представляет собой PPF или HAS. В дополнительном варианте реализации изобретения плазменная фракция является одним из коммерческих препаратов PPF или (of) коммерческих препаратов HAS. В другом варианте реализации изобретения фракция плазмы представляет собой PPF или HAS, полученные от пула индивидуумов определенного возрастного диапазона, таких как молодые индивидуумы, или представляет собой модифицированную фракцию PPF или HAS, которая была подвергнута дополнительному фракционированию или обработке (например, PPF или HAS с одним или несколькими частично или в значительной степени удаленными конкретными белками). В другом варианте реализации фракция плазмы представляет собой фракцию внутривенного иммунного глобулина (IGIV) плазмы, которая по существу не содержит иммуноглобулина (IgG). Фракция крови, которая "по существу не содержит" или которая имеет "по существу удаленные" конкретные белки, такие как IgG, относится к фракции крови, содержащей менее чем примерно 50% от количества, содержащегося в эталонном продукте или плазме цельной крови, например менее 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,1%, неопределяемых уровней или любое целочисленное значение между этими значениями, при измерении с использованием стандартных анализов, хорошо известных в данной области.

#### 9. Мониторинг.

Другой аспект данного изобретения относится к способам мониторинга воздействия лекарственного средства на субъекта для лечения когнитивных нарушений и/или возрастной деменции, причем способ включает сравнение когнитивной функции до и после лечения. Рядовым специалистам в данной области техники известно, что существуют хорошо известные методы оценки когнитивной функции. Например, без ограничений, способ может включать оценку когнитивной функции на основе истории болезни, семейного анамнеза, физических и неврологических осмотров клиницистами, специализирующимися на деменции и когнитивной функции, лабораторных тестов и нейропсихологической оценки. Дополнительные варианты реализации, предусматриваемые изобретением, включают оценку сознания, такую как с использованием шкалы комы Глазго (EMV (реакции открывания глаз, двигательные и речевые)); обсле-

дование психического статуса, включая краткую шкалу умственного развития (AMTS) или мини-исследования психического состояния (MMSE) (Folstein et al., J. Psychiatr. Res 1975; 12:1289-198); глобальную оценку высших функций; оценку внутричерепного давления, например, с помощью фундоскопии.

В одном варианте реализации для оценки когнитивной функции могут использоваться исследования периферической нервной системы, включая любые из следующих: обоняние, поля и острота зрения, движения глаз и зрачков (симпатические и парасимпатические рефлексы), сенсорная функция лица, сила лицевых мышц и мышц плечевого пояса, слух, вкус, глоточные движения и глоточный рефлекс, движения языка, которые можно протестировать индивидуально (например, острота зрения может быть проверена с помощью таблицы Снеллена, неврологический молоток используется для тестирования рефлексов, включая мандибулярный рефлекс, рефлексы сухожилий бицепса и трицепса, рефлекс сухожилия коленного сустава, ахиллов рефлекс и плантарный рефлекс (т.е. симптом Бабинского); мышечная сила, часто по шкале MRC от 1 до 5; мышечный тонус и признаки ригидности.

#### 10. Введение.

При осуществлении способов по данному изобретению фракцию плазмы крови вводят субъекту. В одном варианте реализации фракцию плазмы крови вводят путем внутривенной инфузии. Скорость инфузии может варьироваться, но в одном варианте реализации изобретения скорость инфузии составляет 5-8 мл/мин. Рядовым специалистам в данной области техники будет понятно, что скорость инфузии может зависеть от состояния субъекта и реакции на введение.

В тех вариантах реализации, где эффективное количество активного агента вводят взрослому млекопитающему, количество или дозировка являются эффективными при введении в течение подходящего периода времени, такого как 1 неделя или дольше, включая 2 недели или дольше, например, 3 недели или дольше, 1 месяц или дольше, 2 месяца или дольше, 3 месяца или дольше, 4 месяца или дольше, 5 месяцев или дольше, 6 месяцев или дольше, 1 год или дольше и т.д., чтобы подтвердить ослабление состояния, например, когнитивных нарушений или задержку когнитивных нарушений и/или улучшение когнитивных функций у взрослого млекопитающего. Например, эффективной дозой является доза, которая при введении в течение подходящего периода времени будет замедлять, например, примерно на 20% или больше, например, на 30% или больше, на 40% или больше или на 50% или больше, в некоторых случаях на 60% или больше, на 70% или больше, на 80% или больше или на 90% или больше. Например, будет останавливать снижение когнитивных функций у пациента, страдающего от естественного старения или связанного со старением расстройство. В некоторых случаях эффективное количество или доза продукта крови будет не только замедлять или останавливать прогрессирование болезненного состояния, но также будет вызывать реверсию состояния, т.е. будет вызывать улучшение когнитивных способностей. Например, в некоторых случаях эффективное количество представляет собой количество, которое при введении в течение подходящего периода времени, обычно по меньшей мере около 1 недели и, возможно, около 2 недель или более, в зависимости от человека в течение около 3 недель, 4 недель, 8 недель или дольше, улучшает когнитивные способности индивидуума, страдающего от связанных со старением когнитивных нарушений, например, в 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, в некоторых случаях, в 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз или 10 раз или больше по сравнению с когнитивными способностями до введения продукта или фракции крови. В некоторых случаях эффективное количество или доза активного агента будут не только замедлять или останавливать прогрессирование болезненного состояния, но будут также вызывать реверсию состояния, т.е. будут вызывать улучшение когнитивной функции. Например, в некоторых случаях эффективное количество представляет собой количество, которое при введении в течение подходящего периода времени будет улучшать симптомы у индивидуума, страдающего снижением или нарушением когнитивных способностей, например, в 1,5 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, в некоторых случаях, в 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз или 10 раз или больше, по сравнению с не получавшими лечения индивидуумами до введения средства.

В других вариантах реализации фракцию плазмы крови или плазменную фракцию вводят в соответствии с одним или несколькими режимами дозирования, описанными в патентной заявке США № 62/490519, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. По существу, вариант реализации изобретения включает лечение субъекта с диагностированными когнитивными нарушениями путем введения субъекту эффективного количества плазмы крови или фракции плазмы, причем плазму крови или фракцию плазмы вводят способом, приводящим к улучшению когнитивной функции или нейрогенеза после достижения среднего или медианного периода полувыведения белков плазмы крови или белковой фракции плазмы, по отношению к последней введенной дозе (называемой в данном документе "импульсное дозирование" или "импульс дозы"). Другой вариант реализации изобретения включает введение плазмы крови или фракции плазмы в режиме дозирования, включающем по меньшей мере два последовательных дня и мониторинг улучшения когнитивной функции субъекта, по меньшей мере, через 3 дня после даты последнего введения. Дополнительный вариант реализации изобретения включает введение плазмы крови или фракции плазмы в режиме дозирования, включающем по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней подряд и мониторинг улучшения когнитивной функции субъекта по крайней мере через 3 дня после даты последнего введения. Еще один вариант реализации

изобретения включает введение плазмы крови или фракции плазмы в режиме дозирования, включающем по меньшей мере 2 последовательных дня и после даты последнего введения мониторинг улучшения когнитивной способности по истечении среднего периода полувыведения белков в плазме крови или плазменной фракции. Другой вариант реализации изобретения включает введение плазмы крови или плазменной фракции в режиме дозирования, включающем от 2 до 14 не-последовательных дней, причем каждый разрыв между дозами может составлять от 0 до 3 дней. В некоторых случаях импульсное дозирование в соответствии с изобретением включает введение первого набора доз, например, как описано выше, с последующим периодом отсутствия дозирования, например "периодом без введения доз", за которым, в свою очередь, следует введение другой дозы или набора доз. Продолжительность этого периода без введения дозы может варьироваться, но в некоторых вариантах реализации она составляет 7 дней или больше, например, 10 дней или больше, включая 14 дней или больше, причем в некоторых случаях период без введения доз составляет от 15 до 365 дней, например, от 30 до 90 дней, и в том числе от 30 до 60 дней. По существу, варианты реализации способов включают не хроническое (т.е. не непрерывное) введение доз, например не хроническое введение продукта плазмы крови. В некоторых вариантах реализации схема импульсного дозирования с последующим периодом без введения доз повторяется несколько раз, по желанию, причем в некоторых случаях эта схема продолжается в течение 1 года или больше, например, 2 лет или больше, вплоть до, и включая, на протяжении жизни субъекта. Другой вариант реализации изобретения включает введение плазмы крови или плазменной фракции в режиме дозирования на протяжении 5 последовательных дней, с периодом без введения доз в течение 2-3 дней, с последующим введением на протяжении 2-14 последовательных дней. Биохимически, под "эффективным количеством" или "эффективной дозой" активного агента подразумевается такое количество активного агента, которое будет ингибировать, противодействовать, уменьшать, уменьшать или подавлять примерно на 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 примерно на 100%, т.е. до незначительной величины, а в некоторых случаях обращать вспять прогрессирование когнитивных нарушений или деменции, связанной с возрастом.

#### 11. Белковая фракция плазмы.

При осуществлении способов по данному изобретению субъекту вводят фракцию плазмы. В одном варианте осуществления фракция плазмы представляет собой белковую фракцию плазмы (PPF). В дополнительных вариантах осуществления PPF выбирают из коммерческих препаратов PPF.

В другом варианте реализации PPF состоит из 88% нормального человеческого альбумина, 12% альфа- и бета-глобулинов и не более 1% гамма-глобулина, при определении электрофорезом. Варианты осуществления этого варианта реализации, используемые в практических способах по изобретению, включают, например, такой вариант реализации в виде 5% раствора PPF, забуференного карбонатом натрия, и стабилизированного 0,004 М каприлатом натрия и 0,004 М ацетилтриптофаном. Дополнительные составы, в том числе с модифицированными процентным содержанием PPF (например, от около 1 до около 10%, от около 10 до около 20%, от около 20 до 25%, от около 25 до 30%) в растворе, а также концентрации растворителя и стабилизаторов, могут быть использованы в практических способах по изобретению.

#### 12. Плазменные фракции доноров определенного возраста.

Вариант реализации изобретения включает введение фракции плазмы крови или плазменной фракции, полученной из плазмы индивидуумов определенных возрастных диапазонов. Дополнительные варианты реализации включают введение белковой фракции плазмы, полученной из плазмы индивидуумов определенных возрастных диапазонов. Вариант реализации включает введение PPF или HAS, которые были получены из плазмы молодых индивидуумов. В другом варианте реализации изобретения молодые индивидуумы имеют одинаковый конкретный возраст или возраст в определенном диапазоне. В еще одном варианте реализации средний возраст доноров меньше возраста субъекта или меньше среднего возраста субъектов, получающих лечение.

Определенные варианты реализации изобретения включают объединение крови или плазмы крови от индивидуумов с определенными возрастными диапазонами и фракционирование плазмы крови, как описано выше, для получения продукта белковой фракции плазмы, такого как PPF или HAS. В альтернативном варианте реализации изобретения фракцию белка плазмы или фракцию конкретного белка плазмы получают от конкретных индивидуумов, соответствующих определенному возрастному диапазону. В другом варианте реализации изобретения фракция плазмы крови, фракция плазмы или продукт конкретной фракции белка плазмы получают от пула молодых индивидуумов, для которых "молодые" могут быть определены по календарному или биологическому возрасту, как описано выше, и возраст (возрасты) индивидуумов могут быть конкретным значением возраста или возрастным диапазоном.

#### 13. Показания.

Способы и содержащие плазму продукты и фракции крови по данному изобретению находят применение при лечении, включая профилактику, связанных со старением состояний, таких как нарушения когнитивной способности индивидуумов, например когнитивные расстройства, включая (без ограничений) возрастную деменцию, иммунологические состояния, рак и ухудшение физического и функцио-

нального состояния. Лица, страдающие или подверженные риску развития связанных со старением когнитивных нарушений, которым будет полезно лечение содержащим плазму продуктом крови по данному изобретению, например, способами, раскрытыми в данном документе, включают лиц в возрасте около 50 лет или старше, например, 60 лет или старше, 70 лет или старше, 80 лет или старше, 90 лет или старше и 100 лет или старше, т.е. в возрасте примерно от 50 до 100 лет, например 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или около 100 лет, страдающих от когнитивных нарушений, связанных с естественным процессом старения, например легких когнитивных нарушений (M.C.I.); и лиц в возрасте около 50 лет или старше, например, 60 лет или старше, 70 лет или старше, 80 лет или старше, 90 лет или старше и, как правило, не старше 100 лет, т.е. в возрасте примерно от 50 до 90 лет, например 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или около 100 лет, у которых еще не начались проявления симптомов когнитивных нарушений. Примеры когнитивных нарушений, вызванных естественным старением, включают следующее.

#### А. Легкое когнитивное нарушение.

Легкое когнитивное нарушение (M.C.I.) представляет собой умеренное нарушение когнитивных способностей, проявляющееся в виде проблем с памятью или другими психическими функциями, такими как планирование, следование инструкциям или принятие решений, которые со временем ухудшаются, в то время как общая психическая функция и повседневная деятельность не нарушаются. Таким образом, хотя значительной гибели нейронов обычно не происходит, нейроны в стареющем мозге уязвимы к сублетальным возрастным изменениям структуры, синаптической целостности и молекулярного процессинга в синапсе, которые ухудшают когнитивные функции.

Лица, страдающие или подверженные риску развития когнитивного нарушения, связанного со старением, которым будет полезно лечение содержащим плазму продуктом или фракцией крови по данному изобретению, например, способами, описанными в данном документе, также включают лиц любого возраста, страдающих от когнитивных нарушений из-за расстройства, связанного со старением; и лиц любого возраста, у которых было диагностировано связанное со старением расстройство, обычно сопровождающееся когнитивными нарушениями, в том случае, когда у них еще не появились симптомы когнитивных нарушений. Примеры таких связанных со старением расстройств включают следующее.

#### В. Болезнь Альцгеймера.

Болезнь Альцгеймера - это прогрессирующая, неумолимая потеря когнитивной функции, связанная с чрезмерным количеством сенильных бляшек в коре головного мозга и подкорковом сером веществе, которые также содержат бета-амилоид и нейрофибриллярные клубки, состоящие из тау-белка. Распространенная форма поражает людей старше 60 лет, и заболеваемость увеличивается с возрастом. На ее долю приходится более 65% деменций у пожилых людей.

Причина болезни Альцгеймера не известна. Болезнь передается по наследству примерно в 15-20% случаев. Остальные, так называемые спорадические случаи, имеют некоторые генетические детерминанты. Заболевание имеет аутосомно-доминантный генетический паттерн в большинстве случаев раннего и некоторых случаях позднего развития, но демонстрирует переменную пенетрантность в старших возрастах. Факторы окружающей среды находятся в фокусе активных исследований.

В ходе болезни происходит потеря синапсов и, в конечном итоге, нейронов в коре головного мозга, гиппокампе и подкорковых структурах (включая избирательную потерю клеток в базальном ядре Мейнерта), голубом пятне (*locus coeruleus*) и дорсальных ядрах швов (*nucleus raphae dorsalis*). Использование церебральной глюкозы и перфузия снижаются в некоторых областях головного мозга (теменная доля и височные доли при ранней стадии заболевания, префронтальная кора в поздней стадии заболевания). Нейритные или сенильные бляшки (состоящие из нейритов, астроцитов и глиальных клеток вокруг амилоидного ядра) и нейрофибриллярные клубки (состоящие из парных спиральных филаментов) играют определенную роль в патогенезе болезни Альцгеймера. Сенильные бляшки и нейрофибриллярные клубки наблюдаются при нормальном старении, но они гораздо чаще встречаются у людей с болезнью Альцгеймера.

#### С. Болезнь Паркинсона.

Болезнь Паркинсона (PD) - это идиопатическое медленно прогрессирующее дегенеративное расстройство ЦНС, характеризующееся замедленными движениями и сниженной подвижностью, мышечной ригидностью, тремором в покое и нестабильностью позы. Болезнь Паркинсона первоначально считалась преимущественно моторным расстройством, но в данное время признано, что она также влияет на познание, поведение, сон, вегетативную функцию и сенсорную функцию. К наиболее распространенным когнитивным нарушениям относятся нарушение внимания и концентрации, рабочей памяти, исполнительской функции, продуцирования языка (*producing language*) и зрительно-пространственной функции.

При первичной болезни Паркинсона утрачиваются пигментированные нейроны черной субстанции, голубого пятна и других групп дофаминергических клеток ствола мозга. Причина этого не известна. Потеря нейронов черной субстанции, которые выступают в хвостатое ядро и скорлупу, приводит к истощению нейромедиатора дофамина в этих областях. Начало, как правило, после 40 лет, с увеличением заболеваемости в старших возрастных группах.

Вторичный паркинсонизм является результатом потери или нарушения действия дофамина в базальных ганглиях из-за других идиопатических дегенеративных заболеваний, лекарств или экзогенных



токсиков. Наиболее частой причиной вторичного паркинсонизма является прием антипсихотических препаратов или резерпина, которые вызывают паркинсонизм путем блокирования дофаминовых рецепторов. Менее распространенные причины включают отравление угарным газом или марганцем, гидроцефалию, структурные поражения (опухоли, инфаркты, поражающие средний мозг или базальные ганглии), субдуральную гематому и дегенеративные расстройства, включая стриатонигральную дегенерацию.

#### Д. Лобно-височная деменция.

Лобно-височная деменция (FTD) - это состояние, возникающее в результате прогрессирующего поражения лобной доли мозга. Со временем дегенерация может распространиться на височную долю. Уступая только болезни Альцгеймера (AD) по распространенности, FTD составляет 20% случаев пресенильной деменции. Симптомы подразделяются на три группы в зависимости от функций пораженных лобных и височных долей:

Поведенческий вариант FTD (bvFTD), с симптомами, включающими вялость и аспонтанность, с одной стороны, и расторможенность с другой; прогрессирующая выразительная (nonfluent) афазия (PNFA), при которой наблюдается нарушение речевой беглости из-за затруднения артикуляции, фонологических и/или синтаксических ошибок, но понимание слов сохраняется; и семантическая деменция (SD), при которой пациенты сохраняют беглость речи с нормальной фонологией и синтаксисом, но испытывают все большие трудности с называнием и пониманием слов. Другие когнитивные симптомы, общие для всех пациентов с FTD, включают нарушение исполнительной функции и способности к сосредоточению. Другие когнитивные способности, в том числе восприятие, пространственные навыки, память и практика, как правило, остаются без изменений. FTD может быть диагностирована путем наблюдений с целью выявления (of reveal) атрофии лобной доли и/или передней височной доли при структурном сканировании МРТ.

Существует целый ряд форм FTD, любую из которых можно лечить или предотвращать с использованием способов и композиций по данному изобретению. Например, одной из форм лобно-височной деменции является семантическая деменция (SD). Семантическая деменция характеризуется потерей семантической памяти как в вербальной, так и в невербальной областях. Пациенты с семантической деменцией часто жалуются на трудности с подбором слов. Клинические признаки включают сенсорную (fluent) афазию, аномию, нарушение понимания значения слов и ассоциативную визуальную агнозию (неспособность подбирать семантически связанные изображения или объекты). При прогрессировании заболевания часто наблюдаются поведенческие и личностные изменения, аналогичные тем, которые наблюдаются при лобно-височной деменции, хотя были описаны случаи "чистой" семантической деменции с небольшим количеством поздних поведенческих симптомов. Структурная МРТ демонстрирует характерную картину атрофии височных долей (преимущественно слева), причем нижняя доля вовлечена в большей степени, чем верхняя доля, и большей атрофией передних височных долей по сравнению с задними.

В качестве другого примера другой формой лобно-височной деменции является болезнь Пика (PiD, также PcD). Определяющим признаком заболевания является скопление тау-белков в нейронах, образующих окрашиваемые серебром сферические скопления, известные как "тельца Пика". Симптомы включают потерю речи (афазию) и деменцию. Пациенты с орбитофронтальной дисфункцией могут стать агрессивными и социально неадекватными. Они могут воровать или демонстрировать навязчивые или повторяющиеся стереотипные формы поведения. Пациенты с дорсомедиальной или дорсолатеральной лобной дисфункцией могут демонстрировать отсутствие заинтересованности, апатию или снижение спонтанности. Пациенты могут продемонстрировать отсутствие самоконтроля, аномалии самосознания и неспособность оценивать смысл. Пациенты с потерей серого вещества в двусторонней заднелатеральной орбитофронтальной коре и правом переднем островке могут демонстрировать изменения в пищевом поведении, такие как патологическое пристрастие к сладкому. У пациентов с более очаговой потерей серого вещества в переднелатеральной орбитофронтальной коре может развиваться гиперфагия. Хотя некоторые из симптомов могут быть первоначально смягчены, заболевание прогрессирует, и пациенты часто умирают в течение двух-десяти лет.

#### Е. Болезнь Хантингтона.

Болезнь Хантингтона (HD) является наследственным прогрессирующим нейродегенеративным расстройством, характеризующимся развитием эмоциональных, поведенческих и психических нарушений; потерей интеллектуального или когнитивного функционирования; и нарушениями движения (моторными расстройствами). Классические признаки болезни Хантингтона включают развитие хореи - непроизвольных, быстрых, нерегулярных, резких движений, которые могут затрагивать лицо, руки, ноги или туловище, а также снижение когнитивной способности, включая постепенную потерю мыслительных процессов и приобретенных интеллектуальных способностей. Возможны нарушения памяти, абстрактного мышления и суждения; неправильное восприятие времени, места или идентичности (дезориентация); повышенное возбуждение и изменения личности (распад личности). Хотя симптомы обычно проявляются в четвертой или пятой декаде, возраст начала заболевания переменчив и варьируется от раннего детства до пожилого возраста (например, 70- или 80-летних).

Болезнь Хантингтона передается в семьях как аутосомно-доминантный признак. Расстройство воз-

никает в результате аномально длинных последовательностей или "повторов" закодированных инструкций в гене на хромосоме 4 (4p16.3). Прогрессирующая потеря функции нервной системы, связанная с болезнью Хантингтона, является результатом потери нейронов в определенных областях головного мозга, включая базальные ганглии и кору головного мозга.

Ф. Боковой амиотрофический склероз.

Боковой амиотрофический склероз (БАС) - это быстро прогрессирующее неизменно фатальное неврологическое заболевание, поражающее двигательные нейроны. Мышечная слабость и атрофия и признаки дисфункции клеток переднего рога первоначально отмечаются чаще всего в руках и реже в ногах. Место возникновения является случайным, а прогрессирование - асимметричным. Спазмы являются обычными и могут предшествовать слабости. Пациент редко выживает более 30 лет; 50% умирают в течение 3 лет от начала заболевания, 20% живут 5 лет и 10% живут 10 лет.

Диагностические признаки включают начало заболевания в период средней или поздней взрослости и прогрессирующее генерализованное моторное поражение без сенсорных аномалий. Скорости нервной проводимости являются нормальными до поздней стадии заболевания. Недавние исследования задокументировали также проявление когнитивных нарушений, в частности снижение непосредственной вербальной памяти, зрительной памяти, языка и исполнительных функций.

Уменьшение площади тела клеток, числа синапсов и общей длины синапсов было описано даже в выглядящих нормальными нейронах пациентов с БАС. Предполагается, что после достижения пластичностью активной зоны своего предела продолжающаяся потеря синапсов может привести к функциональным нарушениям. Промомирование формирования новых синапсов (formation of new synapses) или предотвращение потери синапсов может поддерживать функцию нейронов у этих пациентов.

Г. Рассеянный склероз.

Рассеянный склероз (РС) характеризуется различными симптомами и признаками дисфункции ЦНС, с ремиссиями и повторяющимися обострениями. Наиболее распространенными симптомами являются парестезии в одной или нескольких конечностях, в туловище или на одной стороне лица; слабость или неповоротливость ноги или руки или нарушение зрения, например частичная слепота и боль в одном глазу (ретробульбарный зрительный неврит), слабость зрения или скотомы. Обычные когнитивные нарушения включают нарушения памяти (получение, сохранение и извлечение новой информации), внимание и концентрация (особенно разделенное внимание), обработка информации, исполнительные функции, визуально-пространственные функции и речевая беглость. Обычными ранними симптомами являются глазной паралич, приводящий к двойному зрению (диплопия), кратковременная слабость одной или нескольких конечностей, небольшая ригидность или необычная утомляемость конечности, незначительные нарушения походки, трудности с контролем мочевого пузыря, головокружение и легкие эмоциональные нарушения; все они указывают на рассеянное поражение ЦНС и часто происходят за месяцы или годы до того, как заболевание будет распознано. Избыточное тепло может усиливать симптомы и признаки.

Течение болезни очень изменчиво, непредсказуемо, и у большинства пациентов имеет ремиттирующий характер. Сначала месяцы или годы ремиссии могут разделять эпизоды, особенно если заболевание начинается с ретробульбарного неврита зрительного нерва. Однако у некоторых пациентов наблюдаются частые приступы, быстро приводящие к нетрудоспособности; у некоторых течение болезни может быстро прогрессировать.

Н. Глаукома.

Глаукома является распространенным нейродегенеративным заболеванием, которое поражает ганглиозные клетки сетчатки (ГКС). Доказательства подтверждают существование компартиментализированных программ дегенерации в синапсах и дендритах, в том числе в ГКС. Последние данные также указывают на корреляцию между когнитивными нарушениями у пожилых людей 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).

И. Миотоническая дистрофия.

Миотоническая дистрофия (МД) является аутосомно-доминантным мультисистемным расстройством, характеризующимся дистрофической мышечной слабостью и миотонией. Молекулярный дефект представляет собой экспандированный тринуклеотидный (CTG) повтор в 3'-нетранслируемой области гена миотонинпротеинкиназы на хромосоме 19q. Симптомы могут возникнуть в любом возрасте, с широким диапазоном клинической тяжести. Миотония сильно проявляется в мышцах кисти, и птоз часто встречается даже в легких случаях. В тяжелых случаях отмечается выраженная периферическая мышечная слабость, часто с катарактой, преждевременным облысением, продолговатым лицом с острыми чертами, аритмией сердца, атрофией яичек и эндокринными нарушениями (например, сахарный диабет). Умственная отсталость часто встречается при тяжелых врожденных формах, в то время как связанное со старением снижение лобных и височных когнитивных функций, особенно речевых и исполнительных функций, наблюдается при более легких формах расстройства у взрослых. Люди с тяжелыми формами заболевания умирают до достижения ими возраста около 50 лет.

#### Ж. Деменция.

Деменция описывает класс расстройств, имеющих симптомы, влияющие на мышление и социальные способности достаточно серьезно, чтобы мешать повседневному функционированию. Другие случаи деменции в дополнение к деменции, наблюдаемой на более поздних стадиях связанных со старением расстройств, описанных выше, включают сосудистую деменцию и деменцию с тельцами Леви, описанные ниже.

При сосудистой деменции, или "мультиинфарктной деменции", когнитивные нарушения вызваны проблемами с кровоснабжением мозга, как правило, серией малых инсультов, или иногда одним большим инсультом, которому предшествуют или за которым следуют другие малые инсульты. Сосудистые поражения могут быть результатом диффузного цереброваскулярного заболевания, такого как заболевание мелких сосудов, или очаговых поражений, или обоих. Пациенты, страдающие сосудистой деменцией, имеют острые или подострые когнитивные нарушения после острого цереброваскулярного события, после которого наблюдается прогрессирующее когнитивное снижение. Когнитивные нарушения сходны с наблюдаемыми при болезни Альцгеймера, включая нарушения речи, памяти, сложной визуальной обработки или исполнительской функции, хотя связанные с ними изменения в мозге вызваны не патологией БА, а хроническим снижением кровотока в мозге, в конечном итоге приводящим к деменции. Нейровизуализация методами однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (СПЕКТ) и позитронно-эмиссионной томографии (РЕТ) может использоваться для подтверждения диагноза мультиинфарктной деменции в сочетании с оценками, включающими исследование психического статуса.

Деменция с тельцами Леви (ДТЛ, также известная под множеством других названий, включая деменцию с тельцами Леви, диффузную болезнь телец Леви, корковое заболевание с тельцами Леви и сенильная деменция типа Леви) - это тип деменции, которая анатомически характеризуется наличием телец Леви (скопления альфа-синуклеина и белка убиквитина) в нейронах, обнаруживаемые при посмертной гистологии мозга. Ее основной чертой является снижение когнитивных способностей, особенно исполнительного функционирования. Восприимчивость и кратковременная память будут повышаться и снижаться.

Постоянные или повторяющиеся зрительные галлюцинации с яркими и подробными картинками часто являются ранним диагностическим симптомом. ДТЛ часто путают на ранних стадиях с болезнью Альцгеймера и/или сосудистой деменцией, хотя если болезнь Альцгеймера обычно начинается довольно постепенно, то ДТЛ часто имеет быстрое или острое начало. Симптомы ДТЛ также включают двигательные симптомы, сходные с симптомами болезни Паркинсона. ДТЛ отличается от деменции, которая иногда возникает при болезни Паркинсона, по временному интервалу появления симптомов деменции относительно симптомов Паркинсона. Диагноз болезни Паркинсона с деменцией (РОД) ставится, когда деменция начинается более чем через год после начала болезни Паркинсона. ДТЛ диагностируется, когда когнитивные симптомы начинаются одновременно или в течение года после появления симптомов Паркинсона.

#### К. Прогрессирующий надъядерный паралич.

Прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП) - это заболевание головного мозга, которое вызывает серьезные и прогрессирующие проблемы с контролем походки и баланса, а также сложных движений глаз и проблемы с мышлением. Одним из классических признаков заболевания является неспособность правильно нацеливать глаза, вызываемая поражениями в области мозга, которая координирует движения глаз. Некоторые люди описывают этот эффект как размывание (blurring). Люди с поражениями часто демонстрируют изменения настроения и поведения, включая депрессию и апатию, а также прогрессирующую мягкую деменцию. Длинное название расстройства указывает на то, что заболевание начинается медленно и продолжает ухудшаться (прогрессирующий) и вызывает слабость (паралич), повреждая определенные части мозга над структурами размером с горошину, называемыми ядрами, которые контролируют движения глаз (надъядерный). ПНП был впервые описан как отдельное расстройство в 1964 году, когда три ученых опубликовали статью с описанием отличий этого состояния от болезни Паркинсона. Иногда его называют синдромом Стила-Ричардсона-Ольшевского, объединяя имена ученых, которые дали определение этого расстройства. Хотя ПНП прогрессирует в сторону ухудшения, никто не умирает от самого ПНП.

#### Л. Атаксия.

У людей с атаксией имеются проблемы с координацией из-за поражения частей нервной системы, которые управляют движением и равновесием. Атаксия может поражать пальцы, кисти рук, руки, ноги, тело, речь и движения глаз. Слово атаксия часто используется для описания симптома нарушения координации, который может быть связан с инфекциями, травмами, другими заболеваниями или дегенеративными изменениями в центральной нервной системе. Атаксия также используется для обозначения группы специфических дегенеративных заболеваний нервной системы, называемых наследственными и спорадическими атаксиями, которым уделяет основное внимание Национальный фонд атаксии (National Ataxia Foundation).

#### М. Мультисистемная атрофия.

Мультисистемная атрофия (МСА) является дегенеративным неврологическим расстройством. МСА

связана с дегенерацией нервных клеток определённых участков мозга. Эта дегенерация клеток вызывает проблемы с движением, равновесием и другими вегетативными функциями организма, такими как контроль мочевого пузыря или регуляция кровяного давления.

Причины МСА неизвестны и конкретные факторы риска не были выявлены. Около 55% случаев наблюдается у мужчин, с типичным возрастом начала заболевания около 60 лет. МСА часто имеет некоторые из симптомов, характерных для болезни Паркинсона. Однако пациенты с МСА, как правило, демонстрируют минимальный ответ или отсутствие ответа на дофаминовые препараты, используемые для лечения болезни Паркинсона.

N. Слабость (Frailty).

Синдром слабости ("Frailty") - это гериатрический синдром, характеризующийся функциональным и физическим упадком, включая снижение подвижности, мышечную слабость, медлительность, низкую выносливость, низкую физическую активность, недоедание и непроизвольную потерю веса. Такой упадок часто сопровождается и является следствием таких заболеваний, как когнитивная дисфункция и рак. Однако слабость может возникнуть даже без болезней. Люди, страдающие от слабости, имеют повышенный риск негативного прогноза от переломов, случайных падений, инвалидности, коморбидности и преждевременной смертности. (C. Buigues, et al. Effect of a Prebiotic Formulation on Frailty Syndrome: A Randomized, Double-Blind Clinical Trial, *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 932). Кроме того, люди, страдающие от слабости, чаще имеют более высокие расходы на здравоохранение (там же).

Общие симптомы слабости могут быть определены с помощью определенных типов тестов. Например, непроизвольная потеря веса включает потерю не менее 4,5 кг (10 фунтов) или более 5% массы тела за предыдущий год; мышечная слабость может быть определена по уменьшенной силе захвата для нижних 20% от исходного уровня (с учетом пола и индекса массы тела (BMI)); физическая медлительность может быть определена по времени, необходимому для того, чтобы пройти 4,5 м (15 футов); низкая выносливость может быть определена по самооценке человеком утомления; и низкая физическая активность может быть измерена с помощью стандартизированного опросника. (Z. Palace et al., *The Frailty Syndrome, Today's Geriatric Medicine*, 7(1), 18 (2014)).

В некоторых вариантах реализации, способы и композиции по изобретению находят применение для замедления прогрессирования когнитивного нарушения, связанного со старением. Другими словами, когнитивные способности у индивидуума после лечения раскрытыми способами будут снижаться медленнее, чем до или в отсутствие лечения раскрытыми способами. В некоторых таких случаях способы лечения по изобретению включают измерение прогрессирования снижения когнитивных функций после лечения и определение уменьшения прогрессирующего снижения когнитивных функций. В некоторых таких случаях определение производится путем сравнения с эталонным показателем, например скоростью снижения когнитивных способностей у индивидуума до лечения, например, при определении путем измерения когнитивных способностей в два или больше моментов времени до введения продукта крови по данному изобретению.

Способы и композиции по данному изобретению также находят применение при стабилизации когнитивных способностей индивидуума, например индивидуума, страдающего от связанного со старением снижения когнитивных способностей, или индивидуума, которому грозит риск связанного со старением снижения когнитивных способностей. Например, индивидуум может демонстрировать некоторые связанные со старением когнитивные нарушения, и прогрессирование когнитивного нарушения, наблюдаемое до лечения раскрытыми способами, будет остановлено после лечения раскрытыми способами. В качестве другого примера индивидуум может подвергаться риску развития когнитивного упадка, связанного со старением (например, индивидуум может иметь возраст 50 лет или старше или у него может быть диагностировано связанное со старением расстройство), и когнитивные способности индивидуума практически не изменяются, т.е. когнитивное снижение не обнаруживается после лечения раскрытыми способами по сравнению с периодом до лечения раскрытыми способами.

Способы и композиции по данному изобретению также находят применение при снижении когнитивных нарушений у индивидуума, страдающего от когнитивных нарушений, связанных со старением. Другими словами, когнитивные способности улучшаются у индивида после лечения способами по изобретению. Например, когнитивная способность индивидуума увеличивается, например, в 2 раза или более, в 5 раз или более, в 10 раз или более, в 15 раз или более, в 20 раз или более, в 30 раз или более или в 40 раз или более, включая в 50 раз или более, в 60 раз или более, в 70 раз или более, в 80 раз или более, в 90 раз или более или в 100 раз или более, после лечения способами по изобретению по сравнению с когнитивными способностями, наблюдаемыми у индивидуума до начала лечения способами по изобретению. В некоторых случаях лечение способами и композициями по изобретению восстанавливает когнитивные способности у индивидуума, страдающего от связанного со старением снижения когнитивных функций, например, до их уровня во время, когда индивидууму было около 40 лет или меньше. Другими словами, когнитивные нарушения устраняются.

14. Методы диагностики и мониторинга для улучшения состояния при заболеваниях, связанных с нейрокогнитивными функциями.

В некоторых случаях из различных методов диагностики и мониторинга прогрессирования заболе-

вания и улучшения состояния при заболевании, связанном с нейрокогнитивными функциями, у субъектов, страдающих нейродегенеративными заболеваниями, по желанию, используются следующие типы оценок, взятые по отдельности или в сочетаниях. Следующие типы методов представлены в качестве примеров и не ограничиваются перечисленными методами. Любые удобные способы мониторинга заболевания могут быть использованы при желании в практике изобретения. Эти методы также предусматриваются в способах по изобретению.

А. Общая когнитивная способность.

Варианты осуществления способов по изобретению дополнительно включают способы мониторинга воздействия лекарственного средства или лечения на субъекта при лечении когнитивных нарушений и/или возрастной деменции, причем способ включает сравнение когнитивной функции до и после лечения. Рядовым специалистам в данной области техники известно, что существуют хорошо известные методы оценки когнитивной функции. Например, без ограничений, способ может включать оценку когнитивной функции на основе истории болезни, семейного анамнеза, физических и неврологических осмотров клиницистами, специализирующимися на деменции и когнитивной функции, лабораторных тестов и нейропсихологической оценки. Дополнительные варианты реализации, предусматриваемые изобретением, включают оценку сознания, такую как с использованием шкалы комы Глазго (EMV (реакции открывания глаз, двигательные и речевые)); обследование психического статуса, включая краткую шкалу умственного развития (AMTS) или мини-исследования психического состояния (MMSE) (Folstein et al., J. Psychiatr. Res. 1975; 12:1289-198); глобальную оценку высших функций; оценку внутричерепного давления, например, с помощью фундоскопии.

В одном варианте реализации, исследования периферической нервной системы могут использоваться для оценки когнитивной функции, включая любые из следующих: обоняние, поля и острота зрения, движения глаз и зрачков (симпатическая и парасимпатическая), сенсорная функция лица, сила мышц лица и плечевого пояса, слух, вкус, движение глотки и глоточный рефлекс, движения языка, которые могут быть проверены индивидуально (например, острота зрения может быть проверена с помощью таблицы Снеллена; рефлекторный молоток используется для тестирования рефлексов, включая мандибулярный, сухожильный бицепса и трицепса, сухожилия коленного сустава, ахиллов и подошвенный рефлексы (т.е. рефлекс Бабинского); мышечная сила, часто по шкале MRC от 1 до 5; мышечный тонус и признаки ригидности.

15. Реагенты, устройства и наборы.

Также предусматриваются реагенты, устройства и их наборы для практического применения одного или нескольких из вышеописанных способов. Реагенты, устройства и их наборы по данному изобретению могут сильно варьироваться.

Представляющие интерес реагенты и устройства включают те, которые были упомянуты выше в отношении способов приготовления содержащего плазму продукта крови для трансфузии нуждающемуся в этом субъекту, например антикоагулянты, криоконсерванты, буферы, изотонические растворы и т.д.

Наборы могут также включать пакеты для сбора крови, трубки, иглы, пробирки для центрифугирования и т.п. В других вариантах реализации описанные в данном документе наборы включают два или больше контейнера продуктов плазмы крови, таких как белковая фракция плазмы, например, три или больше, четыре или больше, пять или больше, включая шесть или больше контейнеров продукта плазмы крови. В некоторых случаях количество отдельных контейнеров продукта плазмы крови в наборе может составлять 9 или больше, 12 или больше, 15 или больше, 18 или больше, 21 или больше, 24 или больше, 30 или больше, включая 36 или больше, например, 48 или больше. Каждый контейнер может иметь связанную с ним идентификационную информацию, которая включает в себя различные данные о содержащемся в нем продукте плазмы крови, причем эта идентификационная информация может включать один или более возраст донора продукта плазмы крови, сведения об обработке продукта плазмы крови, например, проводилась ли обработка продукта плазмы с целью удаления белков с молекулярной массой выше средней (например, как описано выше), подробная информация о группе крови и т.д. В некоторых случаях каждый контейнер в наборе включает идентификационную информацию о плазме крови, содержащейся в нем, и идентификационная информация включает информацию о возрасте донора продукта плазмы крови, например идентифицирующая информация предоставляет подтверждающие данные о возрасте донора продукта плазмы крови (причем такой идентифицирующей информацией может быть возраст донора на момент взятия крови). В некоторых случаях каждый контейнер набора содержит продукт плазмы крови от донора, по существу, одного возраста, т.е. все контейнеры включают продукт от доноров, имеющих по существу одинаковый, если не одинаковый, возраст. Под практически одинаковым возрастом подразумевается, что различные доноры, от которых получены продукты плазмы крови в наборах, отличаются в каждом случае (differ in each), в некоторых случаях на 5 лет или меньше, например, на 4 года или меньше, например, на 3 года или меньше, включая 2 года или менее, например, 1 год или менее, например, 9 месяцев или менее, 6 месяцев или менее, 3 месяца или менее, в том числе 1 месяц или менее. Идентификационная информация может присутствовать на любом удобном компоненте контейнера, таком как этикетка, чип радиочастотной метки (RFID) и т.д. Идентификационная информация может быть пригодной для считывания человеком, пригодной для считывания компьютером и т.д., по же-

ланию. Контейнеры могут иметь любую удобную конфигурацию. Хотя объем контейнеров может варьироваться, в некоторых случаях диапазон значений объемов составляет 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 пригодного материала, например из полимерных материалов, в том числе из пластмасс медицинского качества. В некоторых случаях контейнеры имеют конфигурацию баллона или пакета. В дополнение к контейнерам, такие наборы могут дополнительно включать устройства для введения, например, как описано выше. Компоненты таких наборов могут быть предоставлены в любой пригодной упаковке, например в коробке или аналогичной конструкции, предназначенной для размещения контейнеров и других компонентов набора.

В дополнение к вышеупомянутым компонентам, наборы по изобретению будут дополнительно включать инструкции по практическому осуществлению методов по изобретению. Эти инструкции могут присутствовать в наборах по изобретению в различных формах, причем в наборе могут присутствовать одна или несколько из них. Одной из форм возможного присутствия таких инструкций является печатная информация на пригодном носителе или подложке, например листе или листках бумаги, на которых напечатана информация, на упаковке набора, на вкладыше в упаковку и т.д. Другими средствами могут быть считываемый компьютером носитель, например дискета, компакт-диск (CD), портативный флэш-накопитель и т.д., на которых была записана информация. Еще одним возможным средством является адрес веб-сайта, который можно использовать в интернете для доступа к информации на удаленном сайте. В наборах могут присутствовать любые удобные средства.

#### 16. Экспериментальные процедуры.

Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить рядовым специалистам в данной области полное раскрытие и описание реализации и использования данного изобретения, и не должны означать, что описанные далее эксперименты являются всеми проведенными или единственно проведенными экспериментами. Были приняты меры к тому, чтобы обеспечить точность в отношении используемых чисел (например, количеств, температуры и т.д.), но следует учитывать наличие некоторых экспериментальных погрешностей и отклонений. Если не указано иное, части представляют собой весовые части, молекулярная масса представляет собой средневзвешенную молекулярную массу, температура указывается в градусах Цельсия, а давление равно или близко к атмосферному.

Общие способы, применяемые в молекулярной и клеточной биохимии, приведены в таких стандартных руководствах, как *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> Ed. (Sambrook et al., HarBor Laboratory Press, 2001); *Short Protocols in Molecular Biology*, 4<sup>th</sup> 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. Academic Press, 1997); и *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology* (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons, 1998), описания которых включены в данный документ посредством ссылок. Реагенты, клонирующие векторы и наборы для генетических манипуляций, упоминаемые в данном описании, являются доступными для приобретения у коммерческих поставщиков, таких как BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich и ClonTech.

#### A. Материалы и реагенты.

Физиологический раствор USP (Фармакопея США) был приобретен у Hospira (Lake Forest, IL). Инъекции выполняли иглами 27,5G или 30G, при объеме 150 мкл на инъекцию. Коммерчески доступный PPF ("PPF1"), такой как описанные выше коммерческие препараты PPF в 5% растворе, хранили при 4°C. Коммерчески доступный HAS ("HAS1"), такой как описанные выше коммерческие препараты HAS в 5% растворе, хранили при 4°C.

#### B. Поставки животных и их содержание.

Использовались штаммы мышей NOD. CB17-Prkdcscid/NcrCr1 ("NODscid", код штамма 394, Charles River, MA) (Bosma, M. et al., *The scid mouse mutant*. 137 *Curr Top Microbiol Immunol* 197 (1988)) и NODscid gamma ("NSG", код штамма 005557, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Каждой мыши пробивали ухо для присвоения уникального идентификационного номера. Всех мышей содержали по отдельности в специальных апатогенных условиях при 12-часовом световом и 12-часовом темновом цикле, и все манипуляции с животными и их использование соответствовали утвержденным IACUC (Институциональный комитет по содержанию и использованию животных) стандартным рекомендациям.

#### C. Введение.

Если иное не описано ниже, мышам NSG и NODscid вводили физиологический раствор USP, 5% PPF1 или 5% HAS1 дважды в неделю посредством внутривенной инъекции в хвостовую вену (150 мкл на инъекцию) на протяжении периода до 6 месяцев.

#### D. Открытое поле.

Тесты в открытом поле были использованы для определения исследовательского поведения мышей. Тест в открытом поле представляет собой пустую тестовую арену, обычно круглую или квадратную. Мышь помещают на арену открытого поля (open filed) размером 50×50 см на 15 мин и измеряют уровень активности мыши. Время вставания на задние лапы измеряли путем отслеживания продолжительности нахождения передних лап на стенках коробки. Также измеряли общее пройденное расстояние и скорость

на протяжении всего теста. Для отслеживания поведения мыши в открытом поле использовался CleverSys TopScan V3.0 (Reston, VA). Камеры с открытым полем были сконструированы CleverSys.

Е. Y-образный лабиринт.

Мышам позволяли обследовать два рукава Y-образного лабиринта (начальный + знакомый) в течение 5 мин. Через 1 ч мышам позволяли исследовать все три рукава, и регистрировали общее время и число заходов в рукава.

Ф. Лабиринт Барнса.

Мышей обучали четыре дня подряд в модифицированном лабиринте Барнса и давали им максимум 120 с для нахождения выходного отверстия (см. Barnes, C.A., Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat, *J. Comparative and Physiological Psychology*, 93(1):74-104 (1979); и для модифицированного лабиринта - Faizi, M. et al., Thy1-hAPP (Lond/Swe+) mouse model of Alzheimer's disease displays broad behavioral deficits in sensorimotor, cognitive and social function., *BRAIN BEHAV.* 2(2):142-54, (2012)). Выходное отверстие оставалось неизменным на протяжении четырех испытаний за день тренировки, но менялось в разные дни тренировки. Латентный период достижения выходного отверстия регистрировали для каждой когорты мышей в течение четырех отдельных тренировочных дней.

Г. DCX- и Ki67-позитивные клетки.

Даблкортин (DCX) представляет собой ассоциированный с микротрубочками белок, который экспрессируется клетками-предшественниками нейронов. Он также экспрессируется незрелыми нейронами в эмбриональных и взрослых корковых структурах. При активном делении клетки-предшественники нейронов экспрессируют DCX. Экспрессия белка снижается через две недели. Из-за такой связи он полезен в качестве маркера нейрогенеза.

Обработка тканей мозга и иммуногистохимия проводились с использованием хорошо описанных методов на свободно плавающих срезах (Luo, J. et al. Glia-dependent TGF- $\beta$  signaling, acting independently of the TNF17 pathway, is critical for initiation of murine autoimmune encephalomyelitis. *J. Clin. Invest.* 117, 3306-3315 (2007)). Мышей анестезировали и перфузировали 0,9% физиологическим раствором. Мозг извлекали и затем фиксировали забуференным фосфатом 4% параформальдегидом, pH 7,4, при 4°C, с последующим пропитыванием 30% сахарозой для криозащиты. Впоследствии делали 30 мкм срезы мозга криомикротомом при -22°C. Срезы хранили в цитопротекторной (cytoprotective) среде. В качестве первичного антитела использовали козье анти-Dcx (Santa Cruz Biotechnology, 1:500 для экспериментов по введению доз два раза в неделю, или 1:200 в экспериментах по введению доз три раза в неделю) или кроличье анти-Ki67 (Abcam 1:500). Окрашивание первичных антител выявляли с помощью биотинилированных вторичных антител и набора ABCkit (Vector) с диаминобензидином (DAB, Sigma-Aldrich) или конъюгированных с флуоресцентными агентами вторичных антител. Для оценки общего количества Dcx-позитивных клеток на зубчатую извилину, иммунопозитивные клетки в гранулярном и субгранулярном слоях клеток зубчатой извилины подсчитывали в трех коронарных срезах половины мозга (hemibrain) через гиппокамп и усредняли.

Н. Тест в лабиринте Барнса со стареющими мышами NSG, получавшими молодую плазму, эффлюент I или эффлюент II/III.

Старые мыши NSG (в возрасте 12 месяцев) были разделены на несколько групп (все с n=14) и получали 150 мкл физиологического раствора, молодой плазмы, эффлюента I или эффлюента II/III путем инъекции в хвостовую вену до начала поведенческих тестов. Каждую отдельную группу разделяли на три когорты, и каждая когорта начинала проведение поведенческих тестов в разные недели.

I. Лабиринт Барнса и выживание клеток (окрашивание BrdU) у старых мышей NSG, получавших три раза в неделю молодую плазму или PPF1.

Старые (12 месяцев) самцы мышей NSG получали внутривенно путем инъекции в хвостовую вену 150 мкл осветленной молодой плазмы человека (молодая плазма), PPF1 или физиологического раствора три раза в неделю в течение четырех недель. Схему введения меняли на два раза в неделю в течение недель 5 и 6, которые были неделями проведения поведенческого тестирования.

Перед началом эксперимента мышей разделили на три когорты по 13-15 мышей в каждой. Каждая когорта получала пять дней внутрибрюшинно (i.p.) инъекции BrdU до начала введения молодой плазмы, PPF1 или физиологического раствора, как описано выше.

В течение недель 5 и 6 проводилось поведенческое тестирование, и измерялся период задержки до достижения целевого отверстия для каждой мыши в тесте с лабиринтом Барнса. Каждый сеанс тестирования длился не более 120 с. Событие обнаружения целевого отверстия регистрировали с помощью прикладной программы, которая определяла момент вхождения носа мыши в область, определенную как целевое отверстие.

В конце поведенческого тестирования животных умерщвляли и проводили количественные определения для шести срезов на гиппокамп с использованием микроскопа со светлым полем для определения присутствия BrdU-положительных клеток в слое гранулярных клеток зубчатой извилины. Поскольку репрезентативные срезы брали из разных областей гиппокампа, среднее количество BrdU-положительных клеток умножали на 72, что представляло собой общее число срезов гиппокампа для

каждого животного, для получения оценки общего количества BrdU-положительных клеток.

J. Анализ нейросферы и культуры коры.

1. Окрашивание Tuj1 и DAPI.

Кору головного мозга мышей C57 E14,15 (Lonza:M-CX-300) суспендировали в 12 мл нейрональной базальной среды с добавкой B27, 2 mM глутамакса (Sigma-Aldrich). Добавляли по 200 мкл в каждую лунку 96-луночного планшета, предварительно покрытого коллагеном I (Corning, Inc.). Через 16 ч среду для выращивания на чашках заменяли предварительно подогретой (37°C) контрольной средой (нейрональная базальная среда с B27, 2 mM глутамакса (Gibco)). На 4 день *in vitro* ("дни *in vitro*" или "DIV") культуральные среды заменяли на свежую контрольную среду, контрольную среду с 10% PPF1, контрольную среду с 10% HAS1, носитель с 10% PPF1 или носитель с 10% HAS1. Культуры поддерживали в течение 21 дня, причем 75% сред заменяли на свежие среды каждые 3 дня. В день DIV 21 культуры промывали 3 раза PBS, затем фиксировали 4% параформальдегидом в течение 20 мин при комнатной температуре (КТ). После фиксации культуры дважды промывали PBS, а затем пермеабилizировали в 0,1% Triton X100 в течение 5-20 мин. После пермеабилizации культуры блокировали 3% бычьим сывороточным альбумином (Sigma-Aldrich) в течение 60 мин при комнатной температуре. Через 60 мин блокирующий раствор удаляли аспирацией и культуры метили антителом против Tuj1 (AbCam-1:500) при 4°C в течение ночи. После мечения культуры промывали 3 раза PBS + 0,1% BSA, затем окрашивали конъюгированным с A647 ослиным антимышиным антителом при 4°C в течение ночи (1:1000). Затем культуры дважды промывали PBS и метили Hoechst 33342 (1:1000) в течение 20 мин. Образцы промывали 3 раза PBS после мечения Hoechst. 25 полей регистрировали для каждой лунки с использованием 10-кратного увеличения с помощью анализатора GE InCell Analyzer 2000 (GE Healthcare Life Sciences). Результаты продемонстрированы на фиг. 19.

2. Суммарная длина нейритов.

Суммарную длину нейритов определяли для культур, как описано в предыдущем разделе. Анализ нейритов проводили с использованием специального алгоритма, сгенерированного с помощью программного пакета разработчика GE InCell Investigator Developer Toolbox. Результаты для контрольных и обработанных носителем образцов были практически идентичны, поэтому их объединяли для статистического анализа. Результаты продемонстрированы на фиг. 20.

3. Количество и размеры сфер в культуре коры; длина отростков и ветвление.

Кору головного мозга мышей C57 E14,15 (Lonza:M-CX-300) суспендировали в 12 мл нейрональной базальной среды с добавкой B27, 2 mM глутамакса (Sigma-Aldrich). Добавляли по 200 мкл в каждую лунку 96-луночного планшета, предварительно покрытого полилизинном и ламинином. Через четыре дня 50% среды заменяли свежей средой и обрабатывали тестируемым средством (носитель, PPF1 или HAS1) до конечной концентрации 10%. Эту процедуру повторяли через три дня. На 7 день обработки клетки визуализировали с фазовым контрастом при 10-кратном увеличении с помощью IncuCyte (Ann Arbor, MI) и анализировали с помощью стандартных алгоритмов "нейрит и тело клетки" (Neurite and Cell-Body). Были проанализированы шесть повторов, с четырьмя изображениями, полученными для каждого повтора. Указана стандартная ошибка. Значимость представлена для двустороннего T-критерия как  $P < 0,5$ . Результаты продемонстрированы на фиг. 21 и 22.

4. Окрашивание нейросфер с помощью Sox2.

Корковые нейроны мышей C57 E14,15 (Lonza:M-CX-300) суспендировали в нейробазальной среде, дополненной B27, 2 mM глутамакса (Sigma-Aldrich) при 100-200 тыс. клеток/мл. Добавляли по 200 мкл в каждую лунку 96-луночного планшета, предварительно покрытого коллагеном I (Corning, Inc.). Через 16 ч среду для выращивания на чашках заменяли предварительно подогретой (37°C) контрольной средой (нейрональная базальная среда с B27, 2 mM глутамакса (Gibco)). На 4 день *in vitro* ("дни *in vitro*" или "DIV") культуральные среды заменяли свежими контрольными средами, контрольными средами с носителем HAS (носитель), контрольными средами с 10% PPF1, контрольными средами с 10% HAS1. Культуры поддерживали в течение 21 дня, причем 75% сред заменяли на свежие среды каждые 3-4 дня. В день DIV 21 культуры промывали 3 раза PBS, затем фиксировали 4% параформальдегидом в течение 20 мин при комнатной температуре (КТ). После фиксации культуры дважды промывали PBS, а затем пермеабилizировали в 0,1% Triton X100 в течение 5-20 мин. После пермеабилizации культуры блокировали 3% бычьим сывороточным альбумином (Sigma-Aldrich) в течение 60 мин при комнатной температуре. Через 60 мин блокирующий раствор удаляли аспирацией и культуры метили антителом против Tuj1 (AbCam-1:500) и кроличьим анти-SOX2 (AbCam:1:5000 при 4°C в течение ночи. После мечения культуры трижды промывали PBS + 0,1% BSA, затем окрашивали ослиным антимышиным-647 (AbCam) и овечьим анти-кроличьим-Texas Red при 4°C в течение ночи (1:1000). Затем культуры дважды промывали PBS и метили Hoechst 33342 (1:1000) в течение 20 мин. Образцы промывали 3 раза PBS после мечения Hoechst. 20 или 25 полей регистрировали для каждой лунки с использованием 10-кратного увеличения с помощью анализатора InCell Analyzer 2000 (GE Healthcare Life Sciences). Анализ нейросфер и нейритов проводился с использованием пользовательского алгоритма, сгенерированного с помощью программного пакета разработчика GE InCell Investigator Developer Toolbox. Результаты для контрольных и обработанных носителем образцов были практически идентичны, поэтому их объединяли для статистического анализа. Ре-



зультаты продемонстрированы на фиг. 23.

К. Результаты экспериментов *in vivo*.

1. Тест с открытым полем с мышами NSG в возрасте 3 и 13 месяцев.

3-месячных (молодых) или 13-месячных (старых) мышей NSG помещали в камеру открытого поля на 15 мин. Были проведены измерения времени в стойке на задних лапах (фиг. 1), скорости (фиг. 2) и расстояния (фиг. 3). Фиг. 1 демонстрирует, что 13-месячные мыши проводили меньше времени в стойке на задних лапах, чем 3-месячные мыши, но мыши, получавшие PPF1 и HAS1, существенно не отличались от молодых мышей. Фиг. 2 демонстрирует, что мыши в возрасте 13 месяцев, получавшие физиологический раствор (контрольные) и PPF1, были значительно медленнее, чем мыши в возрасте 3 месяцев. Однако мыши, получавшие HAS1, были значительно быстрее, чем мыши, получавшие физиологический раствор, и не отличались существенно от молодых мышей. Фиг. 3 демонстрирует, что старые мыши, получавшие физиологический раствор (контроль) и HAS1, имели меньшую двигательную активность, чем молодые мыши, а мыши, получавшие PPF1, преодолевали большее расстояние, чем мыши, получавшие физиологический раствор. Все приведенные данные являются средними значениями  $\pm$  стандартная ошибка измерений (s.e.m.); \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001; t-критерий; n=20, 18, 18, 19 (SAL = физиологический раствор).

2. Тест с Y-образным лабиринтом с мышами NSG в возрасте 3 и 13 месяцев.

Молодых (3-месячных) и старых (13-месячных) мышей NSG тестировали в сигнальном (cued) Y-образном лабиринте в качестве теста памяти. Фиг. 4 демонстрирует, что все мыши провели в новом (N) рукаве значительно больше времени, чем в знакомом (F) рукаве. Фиг. 5 демонстрирует, что у старых мышей, получавших HAS1, было значительное нарушение памяти в отношении знакомого рукава по сравнению с молодыми мышами, тогда как у мышей, получавших PPF1, наблюдалась тенденция к улучшению памяти в отношении знакомого рукава. Фиг. 6 демонстрирует, что получавшие физиологический раствор и PPF1, но не получавшие HAS1 старые мыши, были значительно более медлительными, чем молодые мыши. Фиг. 7 демонстрирует, что старые мыши, получавшие физиологический раствор и PPF1, но не получавшие HAS1, преодолевали меньшее расстояние, чем молодые мыши. Все приведенные данные являются средними значениями  $\pm$  стандартная ошибка измерений (s.e.m.); \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001; парный t-критерий; n= 20, 18, 18, 19. (SAL = физиологический раствор).

3. Тест на память условно-рефлекторной реакции страха с мышами NSG в возрасте 3 и 13 месяцев.

Молодые (3-месячные) и старые (13-месячные) мыши NSG были протестированы в тесте памяти условно-рефлекторной реакции страха. Фиг. 8А демонстрирует, что 13-месячные мыши имели тенденцию к меньшему времени замирания, чем мыши в возрасте 3 месяцев, тогда как мыши, получавшие HAS1, проводили почти столько же времени в замершем состоянии, что и 3-месячные мыши. Фиг. 8В демонстрирует, что в сигнальном тесте на запоминание слухового сигнала мыши в возрасте 13 месяцев, получавшие контроль, показали худшие результаты и имели наименьшее время замирания. Мыши, получавшие HAS1, имели тенденцию проводить больше времени в замершем состоянии, что указывает на улучшение памяти звукового сигнала (tone). Фиг. 9 демонстрирует количественную оценку последних 90 с сигнального теста памяти и демонстрирует, что мыши, получавшие HAS1, имели тенденцию проводить больше времени в замершем состоянии, что указывает на улучшение памяти, n=20, 16, 17, 19 (SAL = физиологический раствор).

4. Тест с лабиринтом Барнса на пространственную память с мышами NSG в возрасте 3 и 13 месяцев.

Молодых (3-месячных) и старых (13-месячных) мышей NSG тестировали в лабиринте Барнса на пространственную память. Фиг. 10А демонстрирует, что 3-месячные мыши показали лучшие результаты и имели самое быстрое время достижения целевого отверстия в последнем испытании. Фиг. 10В демонстрирует количественную оценку среднего значения для последних 3 испытаний, которая демонстрирует, что старые мыши, получавшие физиологический раствор и HAS1, имели значительные нарушения памяти о целевом отверстии по сравнению с молодыми мышами, но мыши, получавшие PPF1, не отличались значительно от молодых мышей, \*\*\*P<0,01; \*\*\*\*P<0,001; непарный t-тест; n = 20, 18, 18, 19 (SAL = физиологический раствор).

5. Иммуноокрашивание у мышей NSG в возрасте 3 и 13 месяцев.

Срезы головного мозга окрашивали на даблкортин (Dcx), являющийся маркером новообразованных нейронов, или на Ki67, являющийся маркером пролиферирующих клеток у мышей NSG в возрасте 3 и 13 месяцев, которые дважды в неделю получали физиологический раствор, PPF1 или HAS1. Подсчитывали Dcx- и Ki67-позитивные клетки в зубчатой извилине молодых и старых мышей NSG. Фиг. 11А и 11В соответственно показывают, что все старые мыши имели значительно меньшее количество Dcx- или Ki67-положительных клеток. Мыши, получавшие PPF1 и HAS1, имели тенденцию к увеличению числа Dcx- и Ki67-положительных клеток по сравнению с мышами, получавшими физиологический раствор.

6. Иммуноокрашивание у мышей NSG в возрасте 3 и 13 месяцев, получавших PPF1 и HAS1 три раза в неделю

Срезы головного мозга 13-месячных мышей окрашивали на даблкортин (Dcx), маркер новообразо-

ванных нейронов, или на Ki67, маркер пролиферирующих клеток. Мыши получали три раза в неделю физиологический раствор, PPF1, 1X концентрированный HAS1 или 5X концентрированный HAS1. Подсчитывали Dcx- и Ki67-положительные клетки в зубчатой извилине. Фиг. 12 демонстрирует, что мыши, получавшие PPF1, имеют тенденцию к повышению нейрогенеза (на что указывает окрашивание Dcx) по сравнению с животными, получавшими контрольный физиологический раствор. Также видно, что более концентрированный HAS1 имеет тенденцию к усилению нейрогенеза по сравнению с животными, получавшими физиологический раствор.

Фиг. 13 демонстрирует, что мыши, получавшие PPF1, продемонстрировали значительное увеличение пролиферации клеток (на что указывает окрашивание Ki67) по сравнению с животными, получавшими контрольный физиологический раствор. Также видно, что более концентрированный HAS1 имеет тенденцию к усилению нейрогенеза по сравнению с животными, получавшими физиологический раствор. \* $P < 0,05$ ; непарный t-критерий против группы физиологического раствора; все приведенные данные являются средними значениями  $\pm$  стандартная ошибка измерений (sem).

7. Тест в открытом поле с мышами NODscid.

Мышам NODscid вводили два раза в неделю путем внутривенной инъекции в хвостовую вену физиологический раствор или PPF1, начиная с возраста 6 месяцев. Начальное количество мышей составляло 20 для каждой группы. Мышей помещали в камеру открытого поля на 15 мин и регистрировали двигательную активность. Фиг. 14А демонстрирует, что мыши, получавшие PPF1, имеют тенденцию к повышенной активности вставания на задние лапы по сравнению с мышами, получавшими физиологический раствор. Фиг. 14В и 14С демонстрируют, соответственно, что мыши, получавшие PPF1, также имеют тенденцию к повышению скорости и пройденного расстояния по сравнению с мышами, получавшими физиологический раствор.

8. Лабиринт Барнса со стареющими (в возрасте 12 месяцев) мышами NSG, получавшими молодую плазму, эфлюент I и эфлюент II/III.

Стареющие мыши NSG (в возрасте 12 месяцев) были разделены на несколько групп (все размером  $n=14$ ) и получали 150 мкл физиологического раствора, молодой плазмы, эфлюента I или эфлюента II/III путем инъекции в хвостовую вену до начала поведенческих тестов. Каждую отдельную группу разделяли на три когорты, и каждая когорта начинала проведение поведенческих тестов в разные недели. Мышей тестировали в модифицированном лабиринте Барнса (как описано выше) для оценки пространственного обучения и памяти. Фиг. 15 демонстрирует, что введение молодой плазмы, эфлюента I или эфлюента II/III создавало тенденцию к значительному улучшению периода латентности у стареющих мышей NSG при достижении целевого отверстия.

9. Лабиринт Барнса и выживание клеток у стареющих мышей NSG, получавших молодую плазму и PPF1.

Как описано выше, стареющие самцы мышей NSG (в возрасте 12 месяцев) получали 150 мкл осветленной молодой человеческой плазмы (молодая плазма), PPF1 или физиологического раствора три раза в неделю внутривенно (i.v.) в течение 4 недель, а затем два раза в неделю на протяжении недель 5 и 6, которые были неделями проведения описываемого тестирования.

Фиг. 16 демонстрирует латентный период достижения отверстия в лабиринте Барнса для каждой экспериментальной когорты. Введение PPF1 значительно улучшило пространственную память у стареющих мышей по сравнению с контролем, в то время как введение молодой плазмы демонстрировало тенденцию к улучшению пространственной памяти по сравнению с контролем. ( $n$ : физиологический раствор = 12, PPF1 = 14, молодая плазма = 11). \* $P < 0,05$ ; среднее  $\pm$  стандартная ошибка измерений (s.e.m.); непарный T-критерий.

Фиг. 17 демонстрирует средний латентный период нахождения целевого отверстия за последние три испытания для каждого дня тестирования. Введение PPF1 значительно улучшило пространственную память у стареющих мышей по сравнению с контролем, в то время как введение молодой плазмы демонстрировало тенденцию к улучшению пространственной памяти по сравнению с контролем. \* $P < 0,05$ ; среднее  $\pm$  стандартная ошибка измерений (s.e.m.); непарный T-критерий.

Фиг. 18 демонстрирует эффект молодой человеческой плазмы и PPF1 на выживаемость клеток, определяемую по количеству положительно меченных BrdU клеток (т.е. пролиферирующих клеток) в гранулярном слое зубчатой извилины стареющих (12 месяцев) мышей NSG. BrdU вводили в течение пяти дней внутрибрюшинно (i.p.) до начала внутривенных инъекций молодой плазмы, PPF1 или контроля физиологического раствора, как описано выше. Значительное увеличение выживаемости клеток наблюдалось как у мышей, получавших молодую человеческую плазму, так и у мышей, получавших PPF1, по сравнению с контролем физиологическим раствором. Статистическую значимость определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным анализом множественного сравнения Даннетта для PPF1 и молодой человеческой плазмы по сравнению с введением физиологического раствора. ( $n$ : физиологический раствор = 13; PPF1 = 13; молодая плазма = 11, \*\*\*\* $P > 0,0001$ , непарный T-критерий сравнения введения PPF1 или молодой человеческой плазмы и физиологического раствора).

L. Результаты *in vitro* анализов нейросфер и культур коры.

Фиг. 19 демонстрирует, что PPF1 и HAS1 дифференциально модулируют пролиферацию нейросфер в культуре коры головного мозга. Кору головного мозга мышей E14-15 C57 культивировали на 96-луночных планшетах, покрытых коллагеном I, в культуральной среде, содержащей только носитель, PPF1 (10%) или HAS1 (10%). Приведены примеры изображений нейросфер из корковых культур через 21 день *in vitro*, полученных для Tuj1 (нейрон-специфического бета-тубулина класса III), DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндола) или Tuj1 и DAPI вместе. Фиг. 19 демонстрирует, что PPF1 увеличивает количество нейросфер, которые экспрессируют либо Tuj1, либо DAPI. Увеличение экспрессии Tuj1 демонстрирует, что обработанные PPF1 корковые культуры продуцируют больше нейросфер, которые дифференцируются в более нейроноподобный фенотип.

Фиг. 20 изображает три культуры кортикальных нейронов мыши E14-15 C57 (Lonza:M-CX-300), суспендированных в нейробазальной среде, дополненной B27, 2 mM глутамакса (Sigma-Aldrich) при 100-200 тыс. клеток/мл, нанесенных на 96-луночные планшеты, покрытые коллагеном I, в культуральной среде, содержащей носитель, PPF1 (10%) или HAS1 (10%). Суммарная длина нейритов, свидетельствующая о нейрогенезе, имела место в культурах, обработанных PPF1, по сравнению с культурами, обработанными контролем или HAS1.

Фиг. 21 изображает три культуры кортикальных нейронов мыши E14-15 C57 (Lonza:M-CX-300), суспендированных в нейробазальной среде, дополненной B27, 2 mM глутамакса (Sigma-Aldrich) при 100-200 тыс. клеток/мл, нанесенных на 96-луночные планшеты, покрытые коллагеном I, в культуральной среде, содержащей носитель, PPF1 (10%) или HAS1 (10%). Программный алгоритм IncuCyte, предоставляемый фирмой Essen BioSciences (Ann Arbor, MI), позволил детектировать сферы корковой культуры (выделены желтым цветом) и отростки (выделены розовым цветом). Больше количество сфер и отростков наблюдалось в культурах, обработанных PPF1, и увеличенный размер сфер и ветвление отростков также наблюдались в культурах, обработанных PPF1. Все масштабные полоски по 300 мкм.

Фиг. 22A-22D демонстрируют количество сфер, длину отростков, точки ветвления отростков и размер сфер соответственно. Количественную оценку проводили с использованием программного алгоритма IncuCyte, доступного от Essen BioSciences (Ann Arbor, MI). Указана стандартная ошибка. Значимость представлена с помощью двустороннего Т-критерия. Фиг. 22A демонстрирует, что культуры, обработанные PPF1, имеют увеличенное количество сфер по сравнению с культурами, обработанными носителем или HAS1 ( $P=0,0006$ , сравнение PPF1 и носителя;  $P=0,0007$ , сравнение PPF1 и HAS1). Фиг. 22B демонстрирует, что культуры, обработанные PPF1, демонстрируют увеличенную длину отростков по сравнению с культурами, обработанными носителем или HAS1 ( $P=4e^{-8}$ , сравнение PPF1 и носителя;  $P=0,002$ , сравнение PPF1 и HAS1; и  $P=0,018$ , сравнение HAS1 и носителя). Фиг. 22C демонстрирует, что культуры, обработанные PPF1, образуют больше точек разветвления отростков по сравнению с культурами, обработанными носителем или HAS1 ( $P=0,002$ , сравнение PPF1 и носителя;  $P=0,004$ , сравнение PPF1 и HAS1). Фиг. 22D демонстрирует, что культуры, обработанные PPF1, связаны с увеличенными размерами сфер по сравнению с культурами, обработанными носителем или HAS1 ( $P=0,002$ , сравнение PPF1 и носителя;  $P=0,004$ , сравнение PPF1 и HAS1). В совокупности, эти результаты экспериментов указывают на то, что обработка PPF1 (и в меньшей степени - HAS1) связана с характеристиками, указывающими на усиление клеточного роста культуры коры и формирования отростков.

Фиг. 23 демонстрирует количество нейросфер, окрашивающихся положительно на Sox2, который представляет собой транскрипционный фактор, играющий важную роль в поддержании эмбриональных и нервных стволовых клеток. Количественная оценка была проведена с использованием алгоритма GE InCell Investigator Toolbox. Обработанные PPF1 культуры продуцировали значительно увеличенное количество нейросфер, окрашивающихся положительно на Sox2, что указывает на то, что обработка PPF1 связана с увеличением числа клеток с потенциалом нейрогенеза.

Приведенное выше описание просто иллюстрирует принципы изобретения. Следует понимать, что квалифицированные специалисты в данной области техники смогут разработать различные системы, которые, хотя и не описаны и не продемонстрированы здесь явным образом, воплощают принципы данного изобретения и включены в его сущность и объем. Кроме того, все примеры и условные формулировки, приведенные в данном документе, предназначены главным образом для того, чтобы помочь читателю понять принципы изобретения и концепции, внесенные изобретателями в развитие данной области техники, и должны рассматриваться как не ограничивающие такие конкретно перечисленные примеры и условия. Кроме того, все утверждения в данном документе, в которых излагаются принципы, аспекты и варианты осуществления изобретения, а также их конкретные примеры должны охватывать его как структурные, так и функциональные эквиваленты. Дополнительно, предполагается, что такие эквиваленты включают как известные в настоящее время эквиваленты, так и эквиваленты, которые будут разработаны в будущем, т.е. любые элементы, разработанные для выполнения такой же функции, независимо от конструкции. Следовательно, объем данного изобретения не должен ограничиваться продемонстрированными и описанными в данном документе примерными вариантами осуществления. Скорее, объем и сущность данного изобретения воплощены в прилагаемой формуле изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения когнитивного расстройства, включающий введение эффективного количества белковой фракции плазмы (БФП) субъекту с диагнозом когнитивного расстройства, где БФП имеет общее содержание белка, которое составляет по меньшей мере 83%, но менее чем 95% альбумина и не более 17% глобулина.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что не более 1% от общего белка в БФП составляет гамма-глобулин.

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что БФП представляет собой коммерчески доступную БФП.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий мониторинг субъекта на предмет улучшения когнитивной функции.

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что БФП получают из плазмы из пула людей моложе 40 лет.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что БФП получают из продукта крови млекопитающего.

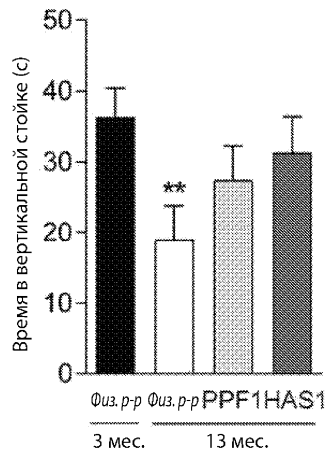
7. Способ по п.6, отличающийся тем, что продукт крови млекопитающего представляет собой продукт крови человека.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что субъект представляет собой млекопитающее.

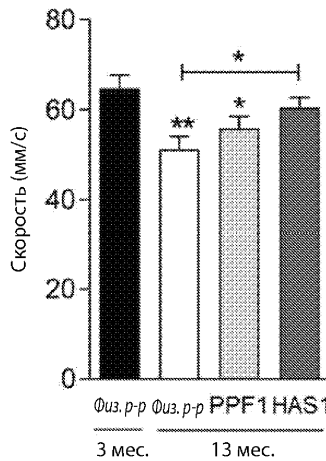
9. Способ по п.8, отличающийся тем, что млекопитающее представляет собой человека.

10. Набор для лечения субъекта от когнитивного расстройства, содержащий контейнер, включающий БФП по любому из пп.1-7 и вкладыш в упаковку.

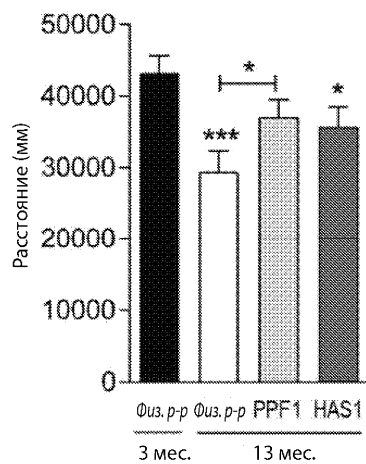
11. Способ по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что когнитивное расстройство представляет собой связанное со старением когнитивное расстройство.



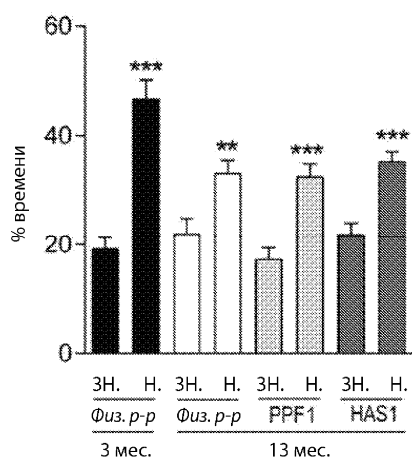
Фиг. 1



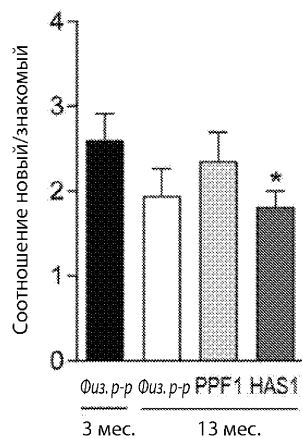
Фиг. 2



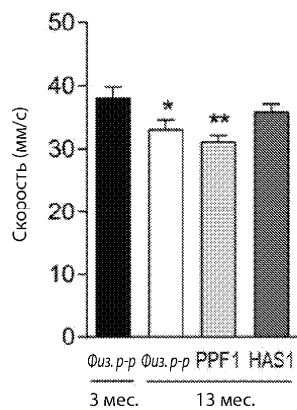
Фиг. 3



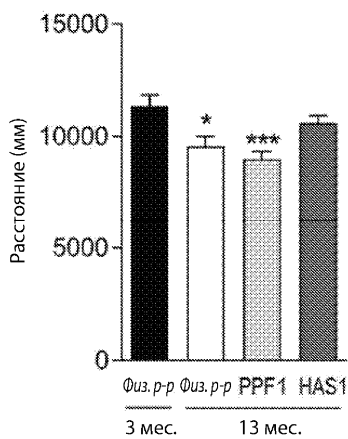
Фиг. 4



Фиг. 5

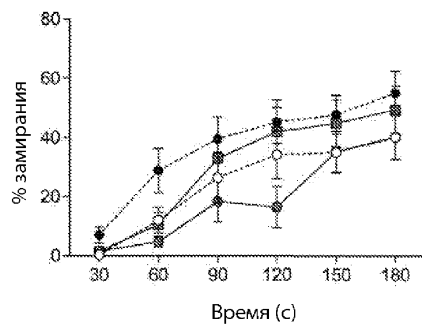


Фиг. 6



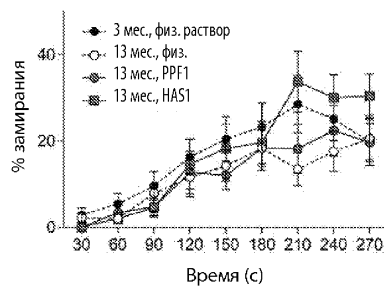
Фиг. 7

Контекстный

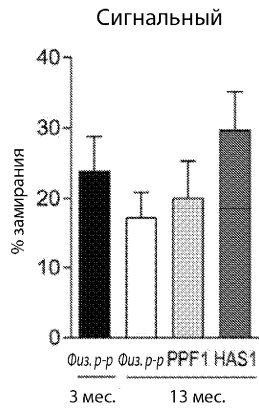


Фиг. 8А

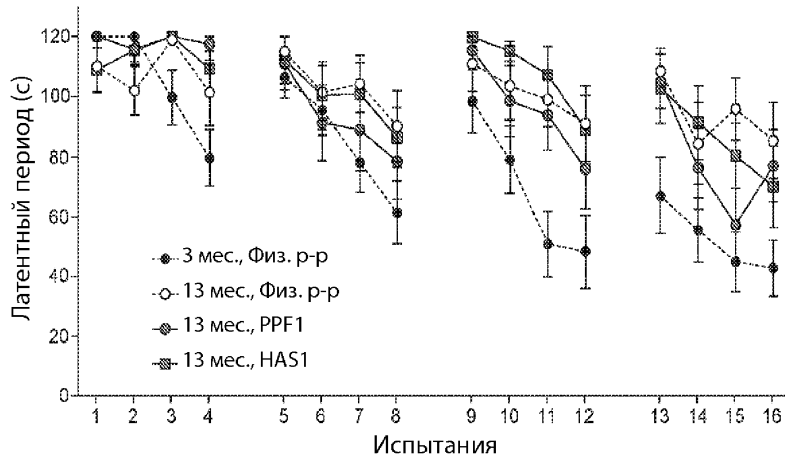
Сигнальный



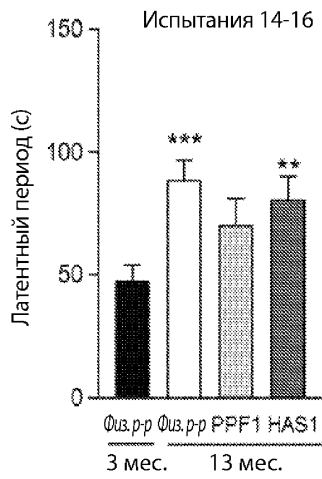
Фиг. 8В



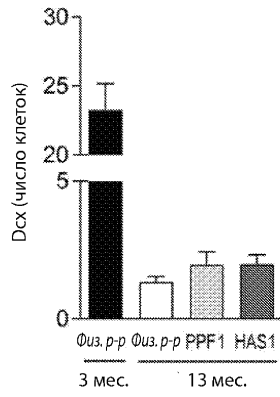
Фиг. 9



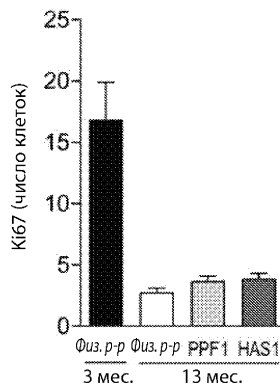
Фиг. 10А



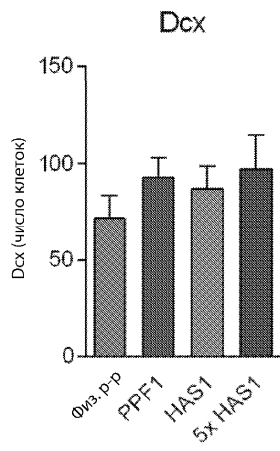
Фиг. 10В



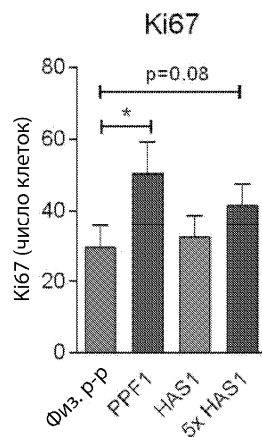
Фиг. 11А



Фиг. 11В

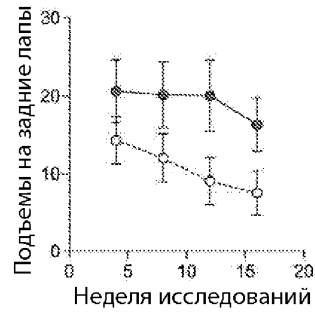


Фиг. 12

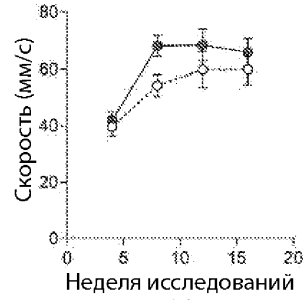


Фиг. 13

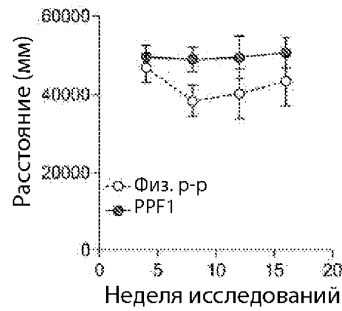




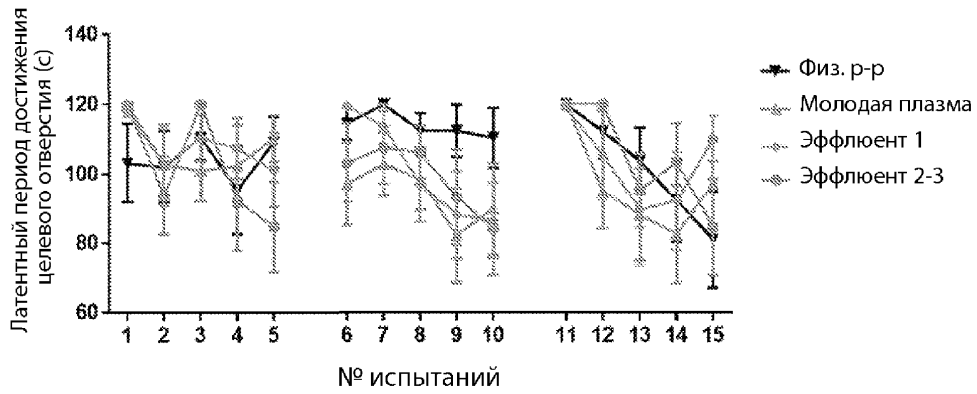
Фиг. 14А



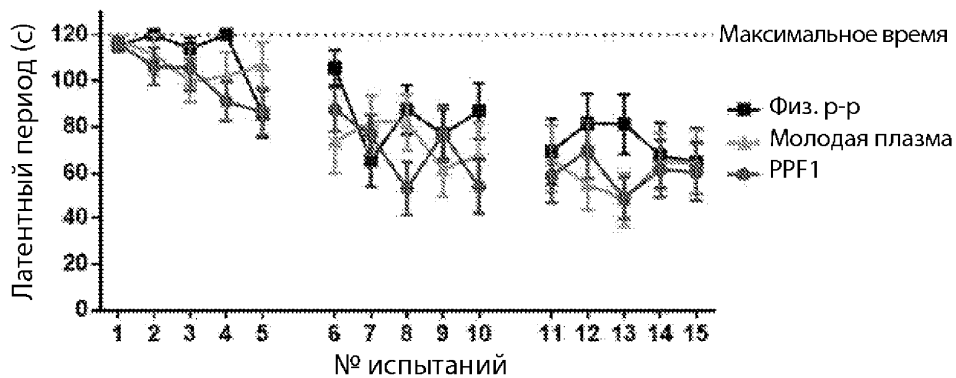
Фиг. 14В



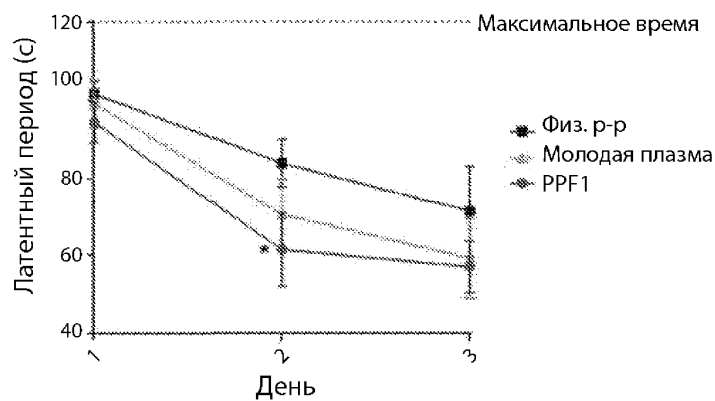
Фиг. 14С



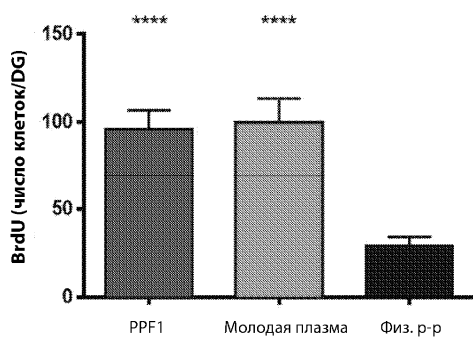
Фиг. 15



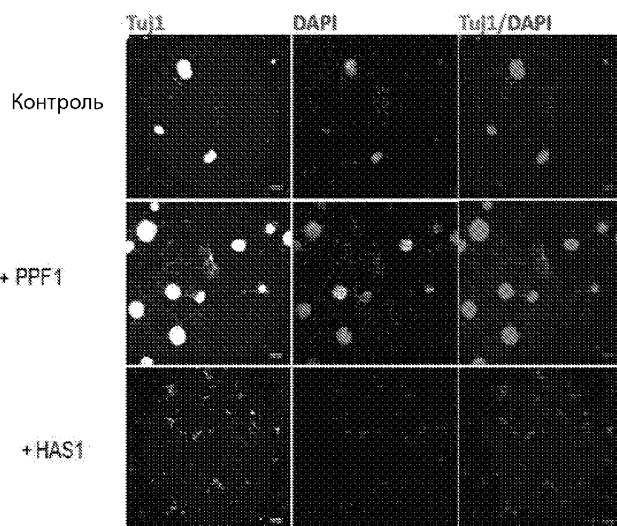
Фиг. 16



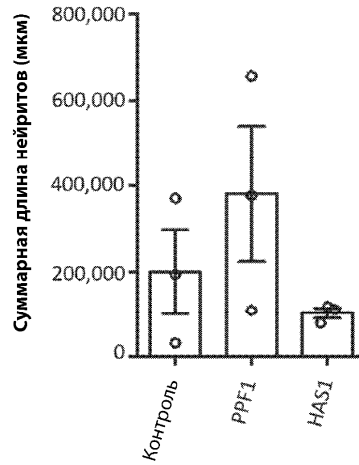
Фиг. 17



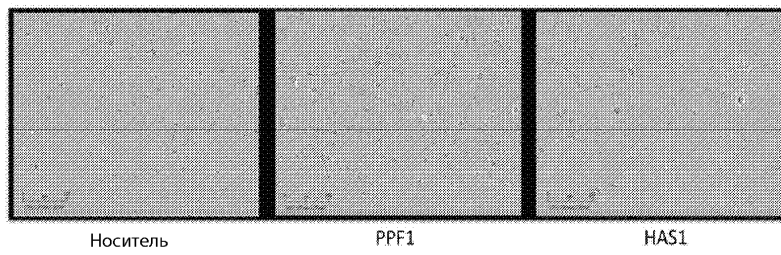
Фиг. 18



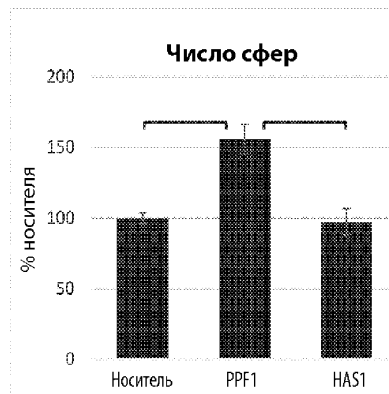
Фиг. 19



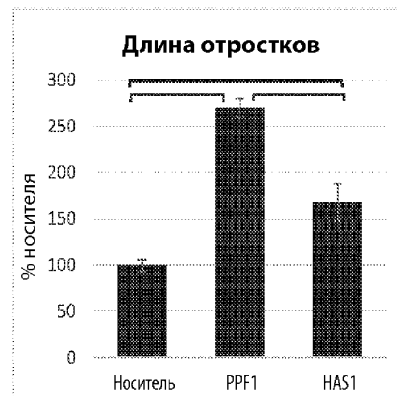
Фиг. 20



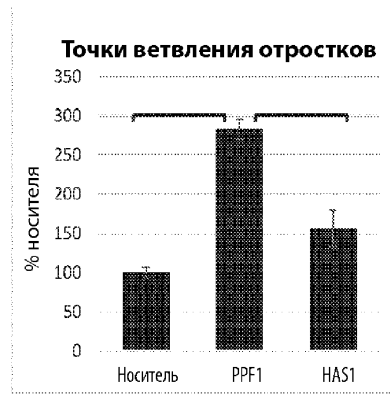
Фиг. 21



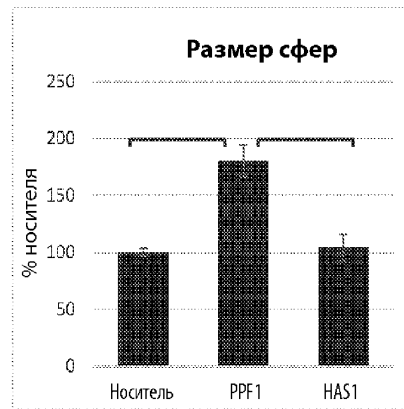
Фиг. 22А



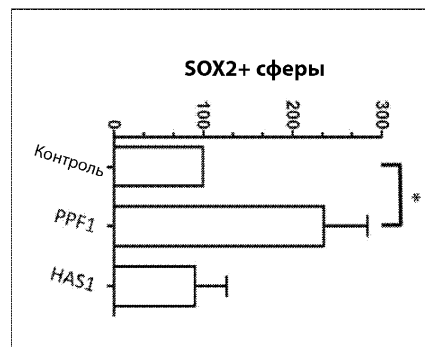
Фиг. 22В



Фиг. 22С



Фиг. 22D



Фиг. 23