

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042179**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.01.20

(21) Номер заявки
201992388

(22) Дата подачи заявки
2018.04.24

(51) Int. Cl. *A61K 38/38* (2006.01)
A61K 35/14 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(54) СХЕМА ПРИМЕНЕНИЯ ПЛАЗМЫ КРОВИ И ПРЕПАРАТОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ КОГНИТИВНЫХ И ДВИГАТЕЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ

(31) 62/490,519; 62/584,571; 62/623,468;
62/641,194

(32) 2017.04.26; 2017.11.10; 2018.01.29;
2018.03.09

(33) US

(43) 2020.02.25

(86) PCT/US2018/029189

(87) WO 2018/200560 2018.11.01

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

(72) Изобретатель:
Брайтуэйт Стивен П., Зирр Эва,
Галлагер Изн, Хьюбер Нина,
Минами С. Сакура (US)

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

(56) BOADA, M. 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*, 2016, Vol. 31, pages 473-481, See abstract

VILLEDA, SAUL A. et al., "Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice", *Nature Medicine*, 2014, Vol. 20, No. 6, pages 659-663, See abstract
US-A1-20090111740

HUGHES, R.A.C. et al., "Clinical applications of intravenous immunoglobulins in neurology", *Clinical and Experimental Immunology*, 2009, Vol. 158, Suppl. 1, pages 34-42, pages 38-40, See abstract
WO-A1-2015088915

(57) В изобретении описаны способы и композиции для лечения и/или профилактики возрастных патологических состояний. Композиции, используемые в способах, включают плазму крови и фракции плазмы крови, полученные из плазмы крови, характеризующиеся эффективностью при лечении и/или профилактике возрастных патологических состояний, таких как когнитивные расстройства. Эти способы относятся к схеме прерывистого применения плазмы крови или фракций плазмы крови.

B1**042179****042179****B1**

Перекрестные ссылки на родственные заявки

В соответствии с § 119 (е) раздела 35 Свода законов США данная заявка испрашивает приоритет даты подачи: предварительной заявки на патент США № 62/490519, поданной 26 апреля 2017 г.; предварительной заявки на патент США № 62/584571, поданной 10 ноября 2017 г.; предварительной заявки на патент США № 62/623468, поданный 29 января 2018 г., и предварительной заявке на патент США № 62/641194, поданный 9 марта 2018 г.; содержание которых включено в данный документ посредством ссылки.

Область техники

Данное изобретение относится к профилактике и лечению возрастных заболеваний. Изобретение относится к применению препаратов крови, таких как фракции плазмы крови для лечения и/или профилактики возрастных патологических состояний, таких как когнитивные расстройства, двигательные расстройства и нейровоспалительные заболевания, с использованием различных парадигм дозирования.

Уровень техники

Приведенное далее является информацией об уровне техники и не признается в качестве предшествующего уровня техники для данного изобретения.

Старение является важным фактором риска для различных заболеваний человека, включая когнитивные нарушения, рак, артрит, потерю зрения, остеопороз, диабет, сердечно-сосудистые заболевания и инсульт. Помимо обычной потери синапсов во время естественного старения, потеря синапсов является ранним патологическим событием, общим для многих нейродегенеративных состояний, и является лучшим коррелятом нейрональных и когнитивных нарушений, связанных с этими состояниями. Таким образом, старение остается единственным доминирующим фактором риска развития нейродегенеративных заболеваний, связанных с деменцией, таких как болезнь Альцгеймера (БА) (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 нейродегенерация и снижение функций, таких как когнитивные или двигательные навыки, может оказывать серьезное влияние на качество жизни. Лечение когнитивного снижения, двигательных нарушений и нейродегенеративных расстройств имеет ограниченный успех в предотвращении и восстановлении нарушенных функций. Поэтому важно определить новые способы лечения для поддержания когнитивной целостности путем защиты от противодействия или обращения действия старения. Кроме того, при разработке новых вариантов лечения необходимо исследовать парадигмы применения для оптимизации эффективности таких вариантов лечения.

Хотя эксперименты по парабиозу между старыми и молодыми мышами продемонстрировали, что когнитивные функции могут быть улучшены у старых мышей при гетерохронном обмене крови с молодыми мышами, последние данные указывают, что не существует усиления нейрогенеза у старых мышей исключительно за счет переливания молодой крови (Rebo, J. et al. A single heterochronic blood exchange reveals rapid inhibition of multiple tissues by old blood. *Nat. Comm* (2016)). Кроме того, есть сомнения, что когнитивные функции в результате инфузий молодой плазмы и нейрогенез связаны между собой. Таким образом, до сих пор не было описано схемы применения с использованием плазмы крови или фракций плазмы крови, которая стимулирует нейрогенез и улучшает когнитивную функцию.

Краткое описание изобретения

Данное изобретение основано на получении и применении препаратов крови для лечения и/или профилактики возрастных расстройств, таких как когнитивные нарушения, возрастная деменция, нарушение двигательной функции, нейровоспаление и нейродегенеративное заболевание. В данном изобретении признается, среди прочего, необходимость новых вариантов терапии для лечения и/или профилактики когнитивных нарушений, возрастной деменции, двигательного нарушения, нейровоспаления и нейродегенеративного заболевания. Полученные из крови и плазмы крови композиции по данному изобретению относятся к разрешению несостоятельности и недостатков современных вариантов терапии за счет применения фракций плазмы крови, демонстрирующих эффективность при лечении и/или профилактике когнитивного нарушения, возрастной деменции, двигательного нарушения, нейровоспаления и нейродегенеративного заболевания.

В данном изобретении определили, что белки плазмы крови имеют средний период полужизни, равный 2-3 суток. В данном изобретении используют схему применения плазмы крови или фракции плазмы, которая оптимизирует нейрогенез, выживаемость клеток, снижает нейровоспаление и улучшает когнитивную деятельность или двигательную функцию у субъекта, получающего лечение. Было обнаружено, что схема применения по данному изобретению стимулирует все эти процессы (нейрогенез, выживаемость клеток, улучшение когнитивной деятельности, снижение нейровоспаления, а также улучшение двигательной функции) у субъектов, и было обнаружено, что все эти процессы были активными даже спустя недели после последней дозы.

Вариант осуществления изобретения включает лечение субъекта, у которого диагностировали когнитивное нарушение, путем введения субъекту эффективного количества плазмы крови или фракции

плазмы. Другой вариант осуществления изобретения включает введение эффективного количества плазмы крови или фракции плазмы, а затем мониторинг субъекта в отношении улучшения когнитивной функции. Другой вариант осуществления изобретения включает лечение субъекта, у которого диагностировали когнитивное нарушение, путем введения субъекту эффективного количества плазмы крови или фракции плазмы, причем плазму крови или фракцию плазмы вводят таким образом, что это приводит к улучшению когнитивной функции или нейрогенеза.

Вариант осуществления изобретения включает лечение субъекта, у которого диагностировали нейродегенеративное двигательное расстройство, такое как, в качестве примера, но не ограничения, болезнь Паркинсона, путем введения субъекту эффективного количества плазмы крови или фракции плазмы. Другой вариант осуществления изобретения включает введение эффективного количества плазмы крови или фракции плазмы, а затем мониторинг субъекта в отношении улучшения двигательной функции. Другой вариант осуществления изобретения включает лечение субъекта, у которого диагностировали нейродегенеративное двигательное расстройство, путем введения субъекту эффективного количества плазмы крови или фракции плазмы, причем плазму крови или фракцию плазмы вводят таким образом, что это приводит к улучшению двигательной функции или нейрогенеза.

Вариант осуществления изобретения включает лечение субъекта, у которого диагностировали нейровоспаление или расстройство, связанное с нейровоспалением, путем введения субъекту эффективного количества плазмы крови или фракции плазмы. Другой вариант осуществления изобретения включает введение эффективного количества плазмы крови или фракции плазмы, а затем мониторинг субъекта в отношении снижения нейровоспаления. Другой вариант осуществления изобретения включает лечение субъекта, у которого диагностировали нейровоспаление или расстройство, связанное с нейровоспалением, путем введения субъекту эффективного количества плазмы крови или фракции плазмы, причем плазму крови или фракцию плазмы вводят таким образом, что это приводит к снижению нейровоспаления.

Другой вариант осуществления изобретения включает введение плазмы крови или фракции плазмы по схеме применения в течение по меньшей мере двух последовательных суток. Еще один вариант осуществления изобретения включает введение плазмы крови или фракции плазмы по схеме применения в течение по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 последовательных суток (также называемой в данном документе "схемой прерывистого применения", "прерывистым применением", "прерывисто применяемой", "дозой для прерывистого применения"). Еще один вариант осуществления изобретения включает введение плазмы крови или фракции плазмы в течение 2 последовательных суток и после даты последнего введения. Другой вариант осуществления изобретения включает введение плазмы крови или фракции плазмы по схеме применения в течение 2-14 непоследовательных суток, причем каждый разрыв между дозами может составлять 0-3 суток. Другой вариант осуществления изобретения включает мониторинг субъекта в отношении улучшения когнитивной или двигательной функции, снижения нейровоспаления или улучшения нейрогенеза по меньшей мере через 3 суток после даты последнего введения. Другой вариант осуществления изобретения включает мониторинг субъекта в отношении улучшения когнитивной или двигательной функции, снижения нейровоспаления, или улучшения нейрогенеза после того, как был достигнут средний период полужизни белков в плазме крови или фракции плазмы.

В некоторых случаях прерывистое применение в соответствии с данным изобретением включает введение первого набора доз, например, как описано выше, за которым следует период без применения, например "период без применения", за которым, в свою очередь, следует введение другой дозы или набора доз. Длительность этого периода "без применения" может варьироваться, но в некоторых вариантах осуществления составляет 7 суток или дольше, например 10 суток или дольше, включая 14 суток или дольше, причем в некоторых случаях длительность периода без применения колеблется от 15 до 365 суток, например от 30 до 90 суток, и в том числе от 30 до 60 суток. Таким образом, варианты осуществления способов включают несистематическое (т.е. прерывистое применение), например несистематическое введение препарата плазмы крови. В некоторых вариантах осуществления схему прерывистого применения с последующим периодом без применения повторяют некоторое количество раз, по необходимости, причем в некоторых случаях эту схему продолжают применять в течение 1 года или более, например 2-х лет или более, в том числе всю жизнь субъекта. Другой вариант осуществления изобретения включает введение плазмы крови или фракции плазмы по схеме применения в течение 5 последовательных суток, с периодом без применения, равным 2-3 суток, с последующим введением в течение 2-14 последовательных суток.

В данном изобретении также предполагается, что различия в содержании белка между различными фракциями плазмы крови (например, фракциями, элюатом, фракцией белков плазмы, раствором альбумина человека) могут быть ответственны за профилактику и/или улучшение некоторых когнитивных или двигательных нарушений и облегчение нейродегенеративного заболевания. В качестве примера, а не ограничения, варианты осуществления данного изобретения демонстрируют, что одна лишь более высокая концентрация альбумина в препаратах рекомбинантного альбумина человека или раствора альбумина человека (HAS) не является движущей силой, стоящей за улучшением когнитивной деятельности, улучшением двигательной функции, снижением нейровоспаления, выживаемостью клеток или нейрогенезом,

связанными с препаратами фракции белков плазмы (PPF) с более низкими концентрациями альбумина.

Кровь и плазма крови от молодых доноров продемонстрировали улучшение и обращение 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 фракции и элюату плазмы крови, некоторые из которых традиционно используются для лечения шока пациента, а также к открытию того, что они являются эффективными в качестве способов лечения возрастных когнитивных нарушений, снижения двигательной функции и нейровоспаления или заболеваний, связанных с нейродегенерацией.

В соответствии с аспектами данного изобретения, предложены способы лечения возрастных когнитивных нарушений, возрастной деменции, двигательных нарушений, нейровоспаления и/или нейродегенеративных заболеваний с использованием фракций препарата крови плазмы крови. Аспекты способов включают введение фракции плазмы крови человеку, страдающему от или подверженному риску развития возрастных когнитивных нарушений, двигательного нарушения, нейровоспаления или нейродегенеративного заболевания. Дополнительные аспекты способов включают введение фракции плазмы крови, полученной от группы доноров определенного диапазона возраста, человеку, страдающему от или подверженному риску развития возрастных когнитивных нарушений, двигательного нарушения, нейровоспаления или нейродегенеративного заболевания. Другие аспекты способов включают введение плазмы крови или фракций плазмы с использованием схемы прерывистого применения. Также предложены реагенты, устройства и наборы, которые используются в осуществлении способов согласно данному изобретению.

В одном варианте осуществления изобретения фракция плазмы крови может представлять собой, например, одну из нескольких фракций плазмы крови, полученных в процессе фракционирования крови, таком, как процесс фракционирования по Кону, описанный ниже. В другом варианте осуществления фракция плазмы крови может относиться к типу, в данном документе называемому "фракцией плазмы", которая представляет собой раствор, состоящий из нормального альбумина человека, альфа- и бета-глобулинов, гамма-глобулина и других белков, либо индивидуально, либо в виде комплексов. В другом варианте осуществления фракция плазмы крови может относиться к типу фракции плазмы крови, известному специалисту в данной области техники как "фракция белков плазмы" (PPF - "Plasma Protein Fraction"). В другом варианте осуществления фракция плазмы крови может представлять собой фракцию "раствора альбумина человека" (HAS - "Human Albumin Solution"). В еще одном варианте осуществления фракция плазмы крови может представлять собой ту, в которой по существу все из факторов свертывания крови удалены для того, чтобы сохранить эффективность фракции с пониженным риском тромбозов. Варианты осуществления данного изобретения могут также включать введение, например, фракции, полученной от молодого донора или группы молодых доноров. Другой вариант осуществления изобретения может включать мониторинг улучшения когнитивной деятельности, улучшения двигательной функции, снижения нейровоспаления или повышения нейрогенеза у субъекта, которого лечат фракцией плазмы крови.

Вариант осуществления изобретения включает лечение субъекта, у которого диагностировали когнитивное нарушение, нейродегенеративное двигательное нарушение или заболевание, связанное с нейровоспалением, путем введения субъекту эффективного количества плазмы крови или фракции плазмы. Другой вариант осуществления изобретения включает введение эффективного количества плазмы крови или фракции плазмы, а затем мониторинг субъекта в отношении улучшения когнитивной функции, улучшения двигательной функции, снижения нейровоспаления или повышения нейрогенеза. Другой вариант осуществления изобретения включает введение плазмы крови или фракции плазмы по схеме применения в течение по меньшей мере двух последовательных суток и мониторинг субъекта в отношении улучшения когнитивной функции, улучшения двигательной функции, снижения нейровоспаления или повышения нейрогенеза в течение по меньшей мере 2 суток после даты последнего введения. Другой вариант осуществления изобретения включает введение плазмы крови или фракции плазмы по схеме применения в течение по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 суток и мониторинг субъекта в отношении улучшения когнитивной функции, улучшения двигательной функции, снижения нейровоспаления или повышения нейрогенеза в течение по меньшей мере 3 суток после даты последнего введения. Еще один вариант осуществления изобретения включает введение плазмы крови или фракции плазмы по схеме применения в течение последовательных 2 суток и после даты последнего введения, мониторинг в отношении улучшения когнитивной функции, улучшения двигательной функции, снижения нейровоспаления или повышения нейрогенеза после того, как был достигнут средний период полужизни белков в плазме крови или фракции плазмы.

Вариант осуществления изобретения включает лечение субъекта, у которого диагностировали когнитивное нарушение, нарушение двигательной функции, нейровоспаление или снижение нейрогенеза, путем введения субъекту эффективного количества плазмы крови или фракции плазмы со схемой упражнений после введения. Другой вариант осуществления данного изобретения включает дальнейшую схему упражнений, которая назначена субъекту. Другой вариант осуществления данного изобретения

включает выполнение субъектом упражнений с более высокой интенсивностью и/или с большей частотой, чем в случае выполнения субъектом упражнений до введения. Другой вариант осуществления данного изобретения включает выполнение субъектом упражнений с аналогичной интенсивностью и/или с такой же частотой, что и в случае выполнения субъектом упражнений до введения.

Вариант осуществления изобретения включает лечение субъекта, у которого диагностировали когнитивное нарушение, нарушение двигательной функции, нейровоспаление или снижение нейрогенеза, путем введения субъекту эффективного количества плазмы крови или фракции плазмы в случае субъекта, который проходит, будет проходить или прошел терапию стволовыми клетками. Другой вариант осуществления изобретения включает введение субъекту эффективного количества плазмы крови или фракции плазмы, при этом субъект проходит, будет проходить, или прошел терапию стволовыми клетками, и при этом используемые в терапии стволовые клетки могут представлять собой эмбриональные стволовые клетки, не эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК), стволовые клетки пуповинной крови, стволовые клетки амниотической жидкости и т.п. Другой вариант осуществления изобретения включает лечение с помощью эффективного количества плазмы крови или фракции плазмы субъекта, у которого диагностировали травматическое повреждение спинного мозга, инсульт, заболевания сетчатки, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, потерю слуха, болезнь сердца, ревматоидный артрит или тяжелые ожоги, а субъект проходит, будет проходить или прошел терапию стволовыми клетками.

Включение посредством ссылки

Все публикации и заявки на патенты, упомянутые в данном описании, включены в качестве ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на патент была конкретно и индивидуально указана, как включенная в качестве ссылки.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1А изображено расстояние, пройденное в тесте открытого поля, для мышей, которым вводили PPF1 с использованием схемы прерывистого применения и схемы применения 3х/неделя.

На фиг. 1В изображено время, проведенное в центре открытого поля, для мышей, которым вводили PPF1 с использованием схемы прерывистого применения и схемы применения 3х/неделя.

На фиг. 2 изображена масса тела в течение времени мышей, которым вводили PPF1 с использованием схемы прерывистого применения и схемы применения 3х/неделя.

На фиг. 3 представлено количество DCX-меченых клеток в гранулярном слое зубчатой извилины у мышей, которым вводили PPF1 с использованием схемы прерывистого применения и схемы применения 3х/неделя.

На фиг. 4 представлено количество БДУ-меченых клеток в гранулярном слое зубчатой извилины у мышей, которым вводили PPF1 с использованием схемы прерывистого применения и схемы применения 3х/неделя.

На фиг. 5 представлено количество DCX-меченых клеток в гранулярном слое зубчатой извилины у мышей, которым вводили PPF1 с использованием схемы прерывистого применения и схемы применения 3х/неделя плазмы молодого человека ("МП") или плазмы старого человека ("СП").

На фиг. 6 представлено количество БДУ-меченых клеток в гранулярном слое зубчатой извилины у групп мышей, которым вводили PPF1 с использованием схемы прерывистого применения и схемы применения 3х/неделя МП или СП.

На фиг. 7 представлена задержка нахождения целевого отверстия на одно испытание в сутки для мышей, которым вводили PPF1 или МП с использованием схемы прерывистого применения.

На фиг. 8 представлено количество DCX-меченых клеток в гранулярном слое зубчатой извилины у групп мышей, которым вводили плазму молодого человека (МП), плазму старого человека (СП) или PPF1 с использованием схемы прерывистого применения.

На фиг. 9 представлено количество БДУ-меченых клеток в гранулярном слое зубчатой извилины у групп мышей, которым вводили плазму молодого человека (МП), плазму старого человека (СП) или PPF1 с использованием схемы прерывистого применения.

На фиг. 10 приведен процент от общего числа входов, сделанных в любое знакомое или новое плечо, от общих числа входов, сделанных в каждое плечо группой лечения в испытании с Y-лабиринтом. Мышам в возрасте двенадцати месяцев прерывисто вводили PPF1 или 5х концентрированную PPF1.

На фиг. 11 представлено соотношение количества входов в новое плечо по сравнению со знакомым плечом в тесте с Y-лабиринтом. Мышам в возрасте двенадцати месяцев прерывисто вводили PPF1 или 5х концентрированную PPF1.

На фиг. 12 представлено количество БДУ-меченых клеток в срезе гиппокампа у двенадцатимесечных мышей, которым вводили PPF1 или 5х концентрированную PPF1 с использованием схемы прерывистого применения.

На фиг. 13 представлено количество DCX-меченых клеток в срезе гиппокампа у двенадцатимесечных мышей, которым вводили PPF1 или 5х концентрированную PPF1 с использованием схемы прерывистого применения.

На фиг. 14 представлено количество DCX-меченых клеток в гранулярном слое зубчатой извилины у

10,5-месячных мышей линии NSG, которым вводили PPF1 или солевой раствор с использованием схемы прерывистого применения с использованием одной из следующих схем: (1) 5 последовательных суток [PPF1-5d] (2) 7 последовательных суток [PPF1-7d] (3) 5 последовательных суток с дополнительными 5 последовательными сутками ("бустерного") дозирования через 6 недель после завершения первоначального дозирования [PPF1-5d-B] или (4) 7 последовательных суток с дополнительными 7 последовательными сутками ("бустерного") дозирования на 6 неделю после завершения первоначального дозирования [PPF1-7d-B].

На фиг. 15 представлено количество БДУ-меченых клеток в гранулярном слое зубчатой извилины у 10,5-месячных мышей линии NSG, которым вводили PPF1 или солевой раствор с использованием схемы прерывистого применения с использованием одной из следующих схем: (1) 5 последовательных суток [PPF1-5d] (2) 7 последовательных суток [PPF1-7d] (3) 5 последовательных суток с дополнительными 5 последовательными сутками ("бустерного") дозирования через 6 недель после завершения первоначального дозирования [PPF1-5d-B] или (4) 7 последовательных суток с дополнительными 7 последовательными сутками ("бустерного") дозирования на 6 неделю после завершения первоначального дозирования [PPF1-7d-B].

На фиг. 16 представлено количество ЭДУ-меченых клеток в гранулярном слое зубчатой извилины у 10,5-месячных мышей линии NSG, которым вводили PPF1 или солевой раствор с использованием схемы прерывистого применения с использованием одной из следующих схем: (1) 5 последовательных суток [PPF1-5d] (2) 7 последовательных суток [PPF1-7d] (3) 5 последовательных суток с дополнительными 5 последовательными сутками ("бустерного") дозирования через 6 недель после завершения первоначального дозирования [PPF1-5d-B] или (4) 7 последовательных суток с дополнительными 7 последовательными сутками ("бустерного") дозирования на 6 неделю после завершения первоначального дозирования [PPF1-7d-B].

На фиг. 17 представлено количество DCX-меченых клеток в гранулярном слое зубчатой извилины у 3- и 6-месячных животных линии NSG, которым вводили PPF1 или солевой раствор, с колесами активности или без них.

На фиг. 18 представлено количество Ki67 положительно-меченых клеток в гранулярном слое зубчатой извилины у 3- и 6-месячных животных линии NSG, которым вводили PPF1 или солевой раствор, с колесами активности или без них.

На фиг. 19 представлено количество положительно-меченых БДУ клеток в гранулярном слое зубчатой извилины у 3- и 6-месячных животных линии NSG, которым вводили PPF1 или солевой раствор, с колесами активности или без них.

На фиг. 20 представлено количество оборотов колеса в течение заданных периодов времени для 11-месячных мышей линии NSG, которым вводили PPF1 или солевой раствор с использованием схемы прерывистого применения. Затемненные области указывают на темный цикл, а обведенные области указывают на применение теста горячей пластинки.

На фиг. 21A представлено количество БДУ-меченных клеток в гранулярном слое зубчатой извилины в трех группах лечения 10,5-месячных мышей линии NSG, которым вводили молодую плазму, рекомбинантный альбумин человека ("рчАльбумин") и контрольный солевой раствор.

На фиг. 21B представлено количество DCX-меченных клеток в гранулярном слое зубчатой извилины в трех группах лечения 10,5-месячных мышей линии NSG, которым вводили молодую плазму, рекомбинантный альбумин человека ("рчАльбумин") и контрольный солевой раствор.

На фиг. 22 приведена степень повышения активности нейронной сети в диссоциированных смешанных нейронных клетках, полученных из коры головного мозга мышей E16, которым вводили контроль, PPF1, HAS1 или рчАльбумин.

На фиг. 23 представлены четыре парадигмы введения осветленной плазмы старого человека (старая плазма) или физиологического раствора, вводимых 8-недельным (молодым) мышам NSG.

На фиг. 24A представлено VCAM-1-положительное мечение в гиппокампе у 8-недельных (молых) мышей NSG, которым вводили два раза в неделю старую плазму, через 48 ч после введения последней дозы.

На фиг. 24B представлено VCAM-1-положительное мечение в гиппокампе у 8-недельных (молых) мышей NSG, которым вводили три раза в неделю старую плазму, через 48 ч после введения последней дозы.

На фиг. 24C представлено VCAM-1-положительное мечение в гиппокампе у 8-недельных (молых) мышей NSG, которым вводили старую плазму с использованием схемы прерывистого применения, через 48 ч после введения последней дозы.

На фиг. 24D представлено VCAM-1-положительное мечение в гиппокампе у 8-недельных (молых) мышей NSG, которым вводили старую плазму с использованием схемы прерывистого применения, через 21 сутки после введения последней дозы.

На фиг. 25A представлено количество DCX-положительных клеток в зубчатой извилине у 8-недельных (молых) мышей NSG, которым вводили два раза в неделю старую плазму, через 48 ч после введения последней дозы.

На фиг. 25B представлено количество DCX-положительных клеток в зубчатой извилине у 8-недельных (молодых) мышей NSG, которым вводили три раза в неделю старую плазму, через 48 ч после введения последней дозы.

На фиг. 25C представлено количество DCX-положительных клеток в зубчатой извилине у 8-недельных (молодых) мышей NSG, которым вводили старую плазму с использованием схемы прерывистого применения, через 21 сутки после введения последней дозы.

На фиг. 26 представлена временная динамика задержки выхода из лабиринта Барнеса и указано время, необходимое для достижения и входа в выходное отверстие для 8-недельных (молодых) мышей NSG, которым вводили старую плазму и солевой раствор. Мышам вводили в течение 7 последовательных суток плазму старого человека или солевой раствор и тестировали через 4 недели после последней инъекции.

На фиг. 27 показана средняя задержка выхода в течение последних трех испытаний в лабиринте Барнеса на 4-е сутки тестирования 8-недельных (молодых) мышей NSG, которым вводили в течение 7 последовательных суток плазму старого человека или солевой раствор. Тестирование проводили через 4 недели после последней инъекции.

На фиг. 28 показана разница в задержке выхода между испытаниями 1 и 3 в лабиринте Барнеса для 8-недельных (молодых) мышей NSG, которым вводили в течение 7 последовательных суток плазму старого человека или солевой раствор. Тестирование проводили через 4 недели после последней инъекции.

На фиг. 29 представлены результаты количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР), количественной оценки уровней мРНК DCX, везикулярного глутаматного рецептора (vglut1), синапсина 1 (syn1), бета-III тубулина (tuj1), а также нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) у 8-недельных (молодых) мышей NSG, которым вводили в течение 7 последовательных суток плазму старого человека или солевой раствор.

На фиг. 30 изображена парадигма дозирования для 8-недельных (молодых) мышей NSG, которым вводили 35 мг/кг каиновой кислоты или солевого раствора, а затем вводили или PPF1 или солевой раствор ежесуточно в течение 5 последовательных суток.

На фиг. 31A представлен процент CD68-положительной области на участке CA1 гиппокампа мышей, которым осуществляли введение в соответствии с парадигмой, изображенной на фиг. 28.

На фиг. 31B представлен процент GFAP-положительной области на участке CA1 гиппокампа мышей, которым осуществляли введение в соответствии с парадигмой, изображенной на фиг. 28.

На фиг. 32 представлено количество клеток, окрашенных на БДУ в зубчатой извилине у 6-месячных мышей NSG, которым вводили PPF1 или контрольный солевой раствор с использованием схемы прерывистого применения в течение 7 последовательных суток с одновременным введением БДУ. Первые два столбца составляют когорту, которую анализировали через 7 суток после последнего введения PPF1/контрольного солевого раствора и БДУ; вторые два столбца составляют когорту, которую анализировали через 14 суток после последнего введения PPF1/контрольного солевого раствора и БДУ.

На фиг. 33 изображено увеличение количества пролиферирующих клеток (Ki67+) в зубчатой извилине у 6-месячных мышей NSG через 10 суток после завершения введения PPF1 с использованием схемы прерывистого применения.

На фиг. 34 представлены срезы зубчатой извилины и субвентрикулярной зоны у 6-месячных мышей NSG через 10 суток после завершения введения PPF1 с использованием схемы прерывистого применения.

На фиг. 35A проиллюстрировано направление развития клеток в зубчатой извилине у 6-месячных мышей NSG, которым вводили или PPF1 или контрольный солевой раствор по 7-суточной схеме прерывистого применения, в которой вводили БДУ в течение 5 суток подряд непосредственно перед началом схемы прерывистого применения. Степень колокализации NeuN+ с окрашиванием БДУ показывает степень, в которой клетки-предшественники нейронов стали нейронами. Степень колокализации GFAP+ с окрашиванием БДУ показывает степень, в которой клетки-предшественники нейронов стали астроцитами.

На фиг. 35B представлены результаты аналогичного эксперимента, что и на фиг. 35, но у 12-месячных мышей NSG.

На фиг. 36A проиллюстрировано направление развития клеток в зубчатой извилине у 3-месячных мышей NSG, которым вводили или старую плазму, или контрольный солевой раствор по 7-суточной схеме прерывистого применения, в которой вводили БДУ в течение 5 суток подряд непосредственно перед началом схемы прерывистого применения. Степень колокализации NeuN+ с окрашиванием БДУ показывает степень, в которой клетки-предшественники нейронов стали нейронами.

На фиг. 36B представлены результаты эксперимента, подробно описанного на фиг. 36A, но с указанием степени колокализации GFAP+ с окрашиванием БДУ, что указывает на степень, в которой клетки-предшественники нейронов стали астроцитами.

На фиг. 37 представлено количество cFos-положительных клеток во (A) всем головном мозге, (B) коре головного мозга и (C) изокортексе 18-месячных мышей, которым вводили PPF1 или солевой раствор с использованием схемы прерывистого применения в течение 7 суток.

На фиг. 38 представлено количество cFos-положительных клеток в (А) коре лобной доли, (В) орбитальной коре (С) инфраламбальной коре и (D) преламбальной коре 18-месячных мышей, которым вводили PPF1 или солевой раствор с использованием схемы прерывистого применения в течение 7 суток.

На фиг. 39 представлено количество cFos-положительных клеток в (А) придаточном обонятельном ядре и (В) обонятельном бугорке 18-месячных мышей, которым вводили PPF1 или солевой раствор с использованием схемы прерывистого применения в течение 7 суток.

На фиг. 40 изображена воксельная визуализация на основе статистики корковой локальной активации в лобной коре (FRP), орбитальной коре (ORB), инфраламбальной коре (ILA), преламбальной коре (PL) и придаточном обонятельном ядре (AON) у 18-месячных мышей, которым вводили PPF1 или солевой раствор с использованием схемы прерывистого применения в течение 7 суток.

На фиг. 41А представлен процент иммунореактивной области CD68 в гиппокампе у 22-месячных мышей C57BL/6J дикого типа, которым вводили PPF1 или солевой раствор с использованием схемы прерывистого применения в течение 7 суток.

На фиг. 41В представлен процент иммунореактивной области Iba-1 в гиппокампе у 22-месячных мышей C57BL/6J дикого типа, которым вводили PPF1 или солевой раствор с использованием схемы прерывистого применения в течение 7 суток.

На фиг. 41С представлен процент иммунореактивной области GFAP в гиппокампе у 22-месячных мышей C57BL/6J дикого типа, которым вводили PPF1 или солевой раствор с использованием схемы прерывистого применения в течение 7 суток.

На фиг. 42А приведено процентное изменение в окрашивании БДУ у 23-месячных мышей C57BL/6J дикого типа, которым вводили PPF1, по сравнению с солевым контролем на 6, 9 и 12 неделю после введения с использованием схемы прерывистого применения в течение семи последовательных суток.

На фиг. 42В приведено процентное изменение в окрашивании DCX у 23-месячных мышей C57BL/6J дикого типа, которым вводили PPF1, по сравнению с солевым контролем на 6, 9 и 12 неделю после введения с использованием схемы прерывистого применения в течение семи последовательных суток.

На фиг. 43А и 43В указаны результаты измерений массы тела у 4-4,5-месячных самцов альфа-синуклеиновых мышей (линия 61) (модель болезни Паркинсона), которым вводили PPF1 или контрольный раствор с использованием схемы прерывистого применения в течение семи последовательных суток.

На фиг. 44 указаны результаты гнездостроения у 4-4,5-месячных самцов альфа-синуклеиновых мышей (линия 61) (модель болезни Паркинсона), которым вводили PPF1 или контрольный раствор с использованием схемы прерывистого применения в течение семи последовательных суток.

На фиг. 45А и 45В указаны результаты сгрызания макаронины и связанного с этим улучшения двигательной функции у 4-4,5-месячных самцов альфа-синуклеиновых мышей (линия 61) (модель болезни Паркинсона), которым вводили PPF1 или контрольный раствор с использованием схемы прерывистого применения в течение семи последовательных суток.

На фиг. 46 указаны результаты испытаний висения на проволоке у 4-4,5-месячных самцов альфа-синуклеиновых мышей (линия 61) (модель болезни Паркинсона), которым вводили PPF1 или контрольный раствор с использованием схемы прерывистого применения в течение семи последовательных суток.

На фиг. 47А изображены различные формы и размеры шеста, используемые в пяти различных испытаниях возрастающей сложности ходьбы по шесту.

На фиг. 47В указаны результаты пяти различных испытаний ходьбы по шесту у 4-4,5-месячных самцов альфа-синуклеиновых мышей (линия 61) (модель болезни Паркинсона), которым вводили PPF1 или контрольный раствор с использованием схемы прерывистого применения в течение семи последовательных суток. Испытания ходьбы по шесту осуществляли через 72 ч после последней вводимой дозы.

На фиг. 47С указаны результаты пяти различных испытаний ходьбы по шесту у 4-4,5-месячных самцов альфа-синуклеиновых мышей (линия 61) (модель болезни Паркинсона), которым вводили PPF1 или контрольный раствор с использованием схемы прерывистого применения в течение семи последовательных суток. Испытания ходьбы по шесту осуществляли через 3 недели после последней вводимой дозы.

На фиг. 48А-48F указаны гистологические результаты окрашивания стриатума и гиппокампа у 4-4,5-месячных самцов альфа-синуклеиновых мышей (линия 61) (модель болезни Паркинсона), которым вводили PPF1 или контрольный раствор с использованием схемы прерывистого применения в течение семи последовательных суток. Исследованные гистологические маркеры включают CD68, Iba-1 и NeuN.

На фиг. 49 представлена задержка выхода в лабиринте Барнеса у 12-месячных мышей NSG, которым вводили PPF1, HAS1 или контрольный раствор с использованием схемы прерывистого применения в течение семи последовательных суток.

Подробное описание изобретения

1. Введение

Данное изобретение относится к идентификации и обнаружению способов и композиций для лечения и/или профилактики когнитивных и двигательных нарушений, включая возрастную деменцию или снижение двигательной функции, и/или нейродегенеративное заболевание. В данном документе описаны

способы и композиция для лечения субъектов, страдающих от таких нарушений, которые являются аспектами данного изобретения. Кроме того, в данном документе описаны схемы применения, которые стимулируют нейрогенез или снижение нейровоспаления, и/или улучшение когнитивных или двигательных функций у субъектов, страдающих от когнитивных или двигательных нарушений. Способы и композиции, описанные в данном документе, являются пригодными для: профилактики когнитивных или двигательных нарушений, возрастной деменции, нейровоспаления и/или нейродегенеративного заболевания; ослабления симптомов когнитивных или двигательных нарушений, возрастной деменции, нейровоспаления и/или нейродегенеративного заболевания; замедления прогрессирования возрастных когнитивных или двигательных нарушений, возрастной деменции, нейровоспаления и/или нейродегенеративного заболевания; и или обращения прогрессирования возрастных когнитивных или двигательных нарушений, возрастной деменции, нейровоспаления и/или нейродегенеративного заболевания. Реализация изобретения включает применение фракций плазмы крови в качестве лечения, например, одной или более фракций или элюатов, полученных в результате процессов фракционирования крови, например процесса фракционирования по Кону, описанного ниже. Вариант осуществления данного изобретения включает применение фракции плазмы (раствора, состоящего из нормального альбумина человека, альфа- и бета-глобулинов, гамма-глобулина и других белков, либо индивидуально, либо в виде комплексов, далее в документе называемого "фракцией плазмы"). Другой вариант осуществления данного изобретения включает применение фракции белков плазмы (PPF) в качестве лечения. Другой вариант осуществления данного изобретения включает применение раствора альбумина человека (HAS) в качестве лечения. Еще один вариант осуществления включает применение элюатов процессов фракционирования крови, таких как элюат I или элюат II/III, описанные ниже. Дополнительный вариант осуществления включает фракцию плазмы крови, из которой были удалены по существу все факторы свертывания крови с тем, чтобы сохранить эффективность при одновременном снижении риска тромбозов (например, см. заявки на патент США №№ 62/236710 и 63/376529, которые включены в качестве ссылки в данное описание в полном объеме).

Перед подробным описанием данного изобретения, необходимо принять во внимание, что это изобретение не ограничено конкретными описанными способом или композицией, поскольку они, конечно, могут варьироваться. Следует также понимать, что употребляемая в данном документе терминология применяется только для описания конкретных вариантов осуществления и не имеет ограничительного характера, поскольку объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Обсуждаемые в данном документе публикации представлены исключительно в отношении их содержания до даты подачи настоящей заявки. Ничто в настоящем документе не следует интерпретировать как признание того, что данное изобретение не имеет права датировать такую публикацию более ранним числом в силу более раннего изобретения. Более того, даты представленных публикаций могут отличаться от фактических дат публикаций, что требует независимого подтверждения.

Когда приводится диапазон значений, следует понимать, что также описывается каждое промежуточное значение с точностью до десятого знака нижнего предела, если из контекста явно не следует иное, между верхним и нижним пределами этого диапазона. Каждый меньший диапазон между любым указанным значением или промежуточным значением в указанном диапазоне и любым другим указанным или промежуточным значением в этом указанном диапазоне охватывается данным изобретением. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут независимо быть включены в диапазон или исключены из него, а любой диапазон, в котором любой, ни один или оба предела включены в меньшие диапазоны, также находится в рамках изобретения, кроме любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключающие один или оба этих включенных предела, также включены в данное изобретение.

Следует отметить, что в формулу изобретения могут вноситься правки с целью исключения любых необязательных элементов. Следовательно, данное утверждение должно служить в качестве предварительного основания для использования такой исчерпывающей терминологии, как "исключительно", "только" и т.п. в связи с указанием элементов формулы изобретения, или использования "отрицательно" признака.

Как будет понятно специалистам в данной области техники после прочтения этого описания, каждый из отдельных вариантов осуществления изобретения, описанных и проиллюстрированных в данном документе, имеет отдельные компоненты и признаки, которые могут быть легко разъединены или объединены с признаками любого из других нескольких вариантов осуществления изобретения без отступления от объема или сущности настоящего изобретения. Любой указанный способ можно осуществить с помощью указанной последовательности действий или с помощью любой другой логически возможной последовательности.

2. Определения.

Если не указано иное, все употребляемые в данном документе технические и научные термины имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в данной области техники, к которой имеет отношение данное изобретение. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные опи-

санным в данном документе, также можно использовать при практической реализации или испытании настоящего изобретения, далее будут описаны некоторые возможные и предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки с целью раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми цитируются эти публикации. Следует понимать, что данное изобретение заменяет любое раскрытие включенной в данный документ публикации в той степени, в которой существует противоречие.

Следует отметить, что употребление в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения форм единственного числа включает в себя отсылку на множественное число, если в контексте явно не указано иное. Таким образом, например, отсылка к "клетке" включает множество таких клеток, а отсылка к "пептиду" включает отсылку к одному или более пептидам и их эквивалентам, например полипептидам, известным специалистам в данной области техники, и т.д.

При описании способов данного изобретения термины "хозяин", "субъект", "индивидуум" и "пациент" используются взаимозаменяемо и относятся к любому млекопитающему, нуждающемуся в таком лечении в соответствии с описанными способами. Такие млекопитающие включают, например, людей, овец, коров, лошадей, свиней, собак, кошек, приматов, отличных от человека, мышей и крыс. В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, отличное от человека. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой сельскохозяйственное животное. В других вариантах осуществления субъект представляет собой домашнее животное. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В определенных случаях субъект представляет собой человека. 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, как в животных моделях заболеваний), а также приматов, отличных от человека (например, шимпанзе и обезьян). Таким образом, субъекты по изобретению включают, среди прочего, млекопитающих, например людей и других приматов, таких как шимпанзе и другие виды человекообразных обезьян и обезьян; и тому подобное, при этом в некоторых вариантах осуществления субъектами являются люди. Термин субъект также подразумевает включение человека или организма любого возраста, массы или другими физическими характеристиками, при этом субъектами могут быть взрослый, ребенок, младенец или новорожденный.

Под "молодым" или "молодым индивидом" понимают индивида, который находится в хронологическом возрасте 40 лет или моложе, например 35 лет или моложе, в том числе 30 лет или моложе, например 25 лет или моложе или 22 года или моложе. В некоторых случаях индивид, который служит в качестве источника препарата крови, содержащего молодую плазму, является таким, возраст которого составляет 10 лет или моложе, например 5 лет или моложе, в том числе 1 год или моложе. В некоторых случаях субъект является новорожденным, а источником препарата плазмы является пуповина, причем препарат плазмы собирают из пуповины новорожденных. Таким образом, "молодой" и "молодой индивид" может относиться к субъекту, возраст которого составляет от 0 до 40 лет, например составляет 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 лет. В других случаях, "молодой" и "молодой индивид" может относиться к биологическому (в отличие от хронологического) возрасту, например, индивида, который не продемонстрировал уровни воспалительных цитокинов в плазме, которые демонстрируют сравнительно старшие индивиды. И наоборот, "молодой" и "молодой индивид" может относиться к биологическому (в отличие от хронологического) возрасту, например, индивида, который демонстрирует более высокие уровни противовоспалительных цитокинов в плазме по сравнению с уровнями у сравнительно старших индивидов. В качестве примера, а не ограничения, воспалительный цитокин представляет собой эотаксин, а кратная разница между молодым субъектом или молодым индивидом и пожилыми индивидами составляет по меньшей мере 1,5 раза. Аналогично, кратная разница между старшим и более молодым индивидами в других воспалительных цитокинах может быть использована для обозначения биологического возраста (см. заявку на патент США № 13/575437, которая включена в данный документ посредством ссылки). Как правило, индивид здоров, например у индивида отсутствуют гематологические злокачественные опухоли или аутоиммунные заболевания во время забора.

Под "индивидом, страдающим от или подверженным риску развития возрастных когнитивных нарушений" подразумевается индивид, который прожил более 50% от его ожидаемой продолжительности жизни, например более 60%, например более 70%, например более 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или даже 99% его ожидаемой продолжительности жизни. Возраст индивида будет зависеть от рассматриваемых видов. Таким образом, этот процент основан на прогнозируемой продолжительности жизни рассматриваемых видов. Например, в случае человека, такой индивид имеет возраст 50 лет или старше, например 60 лет или старше, 70 лет или старше, 80 лет или старше, 90 лет или старше, и обычно не старше 100 лет, например 90 лет, то есть возраст между около 50 и 100, например 50...55...60...65...70...75...80...85...90...95...100 лет или старше, или любой возраст между 50-1000, и страдает от возрастного патологического состояния, как дополнительно описано ниже, например когнитивного нарушения, связанного с естественным процессом старения; индивид, который имеет возраст 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. возраст около 50-100, например

50...55...60...65...70...75...80...85...90...95...100 лет, который до сих пор не продемонстрировал симптомы, возрастных патологических состояний, например когнитивного нарушения; индивид любого возраста, который страдает от когнитивного нарушения из-за возрастного заболевания, как дополнительно описано ниже, и индивид любого возраста, у которого диагностировали возрастное заболевание, которое обычно сопровождается когнитивным нарушением, причем индивид до сих пор не продемонстрировал симптомы когнитивного нарушения. Соответствующий возраст для субъектов, отличных от человека, известен и применим в данном документе.

Используемый в данном документе термин "лечение" относится к любому из: (i) профилактики заболевания или расстройства, или (ii) уменьшения или устранения симптомов заболевания или расстройства. Лечение может быть осуществлено профилактически (до начала заболевания) или терапевтически (после начала заболевания). Эффект может быть профилактическим с точки зрения полного или частичного предотвращения заболевания или его симптомов и/или может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения заболевания и/или неблагоприятного явления, связанного с этим заболеванием. Таким образом, термин "лечение", используемый в данном документе, охватывает любое лечение возрастного заболевания или расстройства у млекопитающих и включает: (a) предотвращение появления заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но у которого это заболевание еще не диагностировано; (b) ингибирование заболевания, т.е. прекращение его развития; или (c) облегчение заболевания, т.е. регрессию заболевания. Лечение может привести к различным физическим проявлениям, например модуляции экспрессии гена, омоложению тканей или органов и т.д. Терапевтический агент может быть введен до, во время или после начала заболевания. Лечение текущего заболевания, при котором лечение стабилизирует или уменьшает нежелательные клинические симптомы пациента, представляет особый интерес. Такое лечение может быть выполнено до полной потери функции в пораженных тканях. Терапия по изобретению может быть введена во время симптоматической стадии заболевания, и, в некоторых случаях, после симптоматической стадии заболевания.

В некоторых вариантах осуществления возрастное патологическое состояние, которое лечат, является возрастным нарушением в когнитивной способности индивида. Под когнитивной способностью или "познанием" понимают психические процессы, которые включают внимание и концентрацию, изучение сложных задач и концепций, память (приобретение, удержание и извлечение новой информации в краткосрочной и/или долгосрочной перспективе), обработку информации (обращение с информацией, полученной с помощью пяти органов чувств), функцию зрительно-пространственной ориентации (визуальное восприятие, восприятие глубины, использование умственных образов, копирование рисунков, создание объектов или форм), употребление и понимание языка, беглость речи (подбор слов), решение проблем, принятие решений и исполнительные функции (планирование и определение приоритетов). Под "когнитивным расстройством" понимают постепенное снижение в одной или более из этих способностей, например расстройство памяти, языка, мышления, суждения и т.д. Под "нарушением когнитивной способности" и "когнитивным нарушением" подразумевают снижение когнитивной способности по сравнению со здоровым человеком, например здоровым человеком в соответствующей возрастной группе, или по сравнению со способностью индивида в более ранний момент времени, например за 2 недели, 1, 2, 3, 6 месяцев, 1, 2 года, 5 или 10 лет или более. Под "возрастным когнитивным нарушением" понимают ухудшение когнитивной способности, которое, как правило, связано со старением, в том числе, например когнитивные нарушения, связанные с естественным процессом старения, например легкое когнитивное нарушение (ЛКН); и когнитивное нарушение, связанное с возрастным расстройством, т.е. расстройством, частота которого увеличивается с возрастом, например нейродегенеративным состоянием, таким как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, лобно-височная деменция, болезнь Хантингтона, боковой амиотрофический склероз, рассеянный склероз, глаукома, миотоническая дистрофия, сосудистая деменция и т.п.

В некоторых вариантах осуществления возрастное патологическое состояние, которое лечат, является возрастным нарушением двигательной способности у индивида. Под двигательной способностью подразумевают двигательные процессы, которые включают способность выполнять сложные нервно-мышечные действия, которые обеспечивают движение, такие как мелкая моторика, обеспечивающая небольшие или точные движения (например, письмо, завязывание обуви) и крупная моторика для больших движений (например, ходьба, бег, удары ногами). Под "двигательным расстройством" понимают постепенное снижение в одной или более из этих способностей, например расстройство движений или крупной моторики и т.д. Под "нарушением двигательной способности" и "двигательным нарушением" подразумевают снижение двигательной способности/двигательного навыка по сравнению со здоровым человеком, например здоровым человеком в соответствующей возрастной группе, или по сравнению со способностью индивида в более ранний момент времени, например за 2 недели, 1, 2, 3, 6 месяцев, 1, 2 года, 5 или 10 лет или более. Под "возрастным двигательным нарушением" понимают ухудшение двигательной способности, которое, как правило, связано со старением, в том числе, например, двигательные нарушения, связанные с естественным процессом старения, и двигательное нарушение или расстройство, связанное с возрастным расстройством, то есть расстройством, частота которого увеличивается с возрастом, например нейродегенеративным состоянием, таким как болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический

склероз и т.п.

В некоторых вариантах осуществления возрастное состояние, которое лечат, является возрастным повышением нейровоспаления у индивида. Под "нейровоспалением" подразумевают биохимические и клеточные реакции нервной системы на травмы, инфекции или нейродегенеративные заболевания. Такие ответы направлены на снижение активирующих факторов путем вовлечения иммунитета центральной нервной системы для защиты от потенциального вреда. Нейродегенерация возникает в центральной нервной системе и при этом проявляются признаки потери структуры и функции нейронов. Нейровоспалительные заболевания или состояния или заболевания, связанные с нейровоспалением, включает в качестве примера, но не ограничения, нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера; болезнь Паркинсона, рассеянный склероз и т.п.

Препараты крови, содержащие компоненты плазмы. При практическом применении способов согласно данному изобретению, препарат крови, содержащий компоненты плазмы, вводят индивиду, нуждающемуся в этом, например, индивиду, страдающему или имеющему риск развития когнитивных или двигательных нарушений, нейровоспаления и/или возрастной деменции. В связи с этим, способы согласно вариантам осуществления данного изобретения включают введение препарата крови, содержащего компоненты плазмы крови от индивида ("донорный индивид" или "донор"), индивиду, который, по меньшей мере, подвержен риску развития или страдает от когнитивного или двигательного нарушения, нейровоспаления, нейродегенерации и/или возрастной деменции (далее "реципиентный индивид" или "реципиент"). Под "препаратом крови, содержащим компоненты плазмы" подразумевают любой препарат, полученный из крови, который содержит плазму (например, цельную кровь, плазму крови или их фракции). Термин "плазма" используется в его обычном смысле для обозначения жидкого компонент крови соломенного/бледно-желтого цвета, состоящего из примерно 92% воды, 7% белков, таких как альбумин, гамма-глобулин, анти-гемофильный фактор и другие факторы свертывания крови, а также 1% минеральных солей, сахаров, жиров, гормонов и витаминов. Неограничивающие примеры препаратов крови, содержащих плазму, пригодных для применения в способах согласно данному изобретению, включают цельную кровь, обработанную антикоагулянтом (например, ЭДТК, цитратом, оксалатом, гепарином и т.д.), препараты крови, полученные путем фильтрации цельной крови, чтобы удалить лейкоциты ("лейкоредукция"), препараты крови, состоящие из плазмы, полученной плазмаферезом или аферезом, свежезамороженную плазму, препараты крови, состоящие в основном из очищенной плазмы, и препараты крови, состоящие в основном из фракций плазмы. В некоторых случаях препарат плазмы, который используется, не является препаратом плазмы цельной крови, под чем подразумевается, что препарат не является цельной кровью, поэтому в нем отсутствуют один или более компонентов, присутствующих в цельной крови, таких как эритроциты, лейкоциты и т.д., по меньшей мере, в той степени, в которой эти компоненты присутствуют в цельной крови. В некоторых случаях препарат плазмы по существу, если не полностью, является свободным от клеток, причем в таких случаях содержание клеток может составлять 5% по объему или менее, например 1% или менее, в том числе 0,5% или менее, при этом в некоторых случаях свободные от клеток фракции плазмы крови представляют собой те композиции, которые полностью лишены клеток, т.е. они не содержат клетки.

Сбор препаратов крови, содержащих компоненты плазмы. Варианты осуществления способов, описанных в данном документе, включают введение препаратов крови, содержащих компоненты плазмы, которые могут быть получены от доноров, в том числе людей-добровольцев. Термин "полученный от человека" может относиться к таким продуктам. Способы получения содержащих плазму препаратов крови от доноров хорошо известны в данной области техники (см., например, AABB TECHNICAL MANUAL, (Mark A. Fung, et al., eds., 18th ed. 2014), включенную в данный документ в качестве ссылки).

В одном варианте осуществления кровь получают посредством венопункции. В другом варианте осуществления венопункция представляет собой единичную венопункцию. В другом варианте осуществления не применяют восполнение объема крови физиологическим раствором. В предпочтительном варианте осуществления метод плазмафереза используют для получения препаратов крови, содержащих плазму. Плазмаферез может включать удаление объема плазмы с поправкой на массу с возвращением клеточных компонентов донору. В предпочтительном варианте осуществления цитрат натрия используется во время плазмафереза, чтобы предотвратить слипание клеток. Объем собранной от донора плазмы предпочтительно составляет от 690 до 880 мл после введения цитрата и предпочтительно соотносится с массой донора.

3. Фракции плазмы.

Во время Второй мировой войны возникла потребность в стабильном плазмозаменителе, который можно было использовать на поле боя, когда солдаты теряли большое количество крови. В результате были разработаны способы получения лиофилизированной плазмы. Однако использование лиофилизированной плазмы было затруднено в боевых ситуациях, так как для ее восстановления требуется стерильная вода в качестве альтернативы доктор Э. Кон предположил, что можно использовать альбумин, и приготовил готовый к применению стабильный раствор, который можно вводить незамедлительно для лечения шока (см. Johan, Current Approaches to the Preparation of Plasma Fractions in (Biotechnology of Blood) 165 (Jack Goldstein ed., 1st ed. 1991)). В процедуре доктора Кона для очищения фракций плазмы

использовался холодный этанол благодаря его денатурирующему действию и использовалось изменение pH и температуры для достижения разделения.

Вариант осуществления описанных в данном документе способов включает введение субъекту фракций плазмы. Фракционирование представляет собой процесс, с помощью которого определенные подгруппы белков отделяют от плазмы. Технология фракционирования известна в данной области техники и основана на этапах, разработанных Cohn et al. в 1940-х годах (E. Cohn, Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. 68 J Am Chem Soc 459 (1946), включенная в данный документ в качестве ссылки). Этот процесс включает несколько этапов, а каждый этап включает применение определенных концентраций этанола, а также сдвигов pH, температуры и осмотического давления, которые приводят к избирательному осаждению белка. Преципитаты также разделяют с помощью центрифугирования или преципитации. Оригинальный "процесс фракционирования по Кону" включает разделение белков через преципитаты на пять фракций, обозначенные как фракция I, фракция II+III, фракция IV-1, фракция IV-4 и фракция V. Альбумин был первоначально идентифицирован как конечный продукт (фракция V) этого процесса. В соответствии с вариантами осуществления изобретения каждая фракция (или элюат из предшествующего этапа разделения) содержит или потенциально содержит терапевтически полезные фракции белка (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 ссылки). Для того чтобы получить конкретные белковые фракции, можно корректировать приведенные выше экспериментальные параметры.

Совсем недавно, фракционирование достигло дополнительной сложности и, следовательно, составляет дополнительные варианты осуществления данного изобретения. Это недавнее увеличение сложности произошло за счет введения хроматографии, что привело к выделению новых белков из существующих фракций, таких как криопреципитат, крио-обедненная плазма и фракции Кона; повышения выделения IgG путем интеграции хроматографии и процесса фракционирования этанолом; и снижения/инактивации/удаления вирусов (Id.) Для захвата белков при физиологических pH и ионной силе может быть использована анионообменная хроматография. Это сохраняет функциональную активность белков и/или фракций белков. Гепарин и моноклональные антитела также используют в аффинной хроматографии. Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что параметры, описанные выше, могут быть изменены для получения фракций, содержащих конкретные желаемые белки плазмы.

В одном из вариантов осуществления данного изобретения плазму крови фракционируют в промышленных условиях. Замороженную плазму размораживают при 1-4°C. Непрерывное центрифугирование с охлаждением применяют к талой плазме и выделяют криопреципитат. Восстановленный криопреципитат замораживают при -30°C или ниже и сохраняют. Криопреципитат-обедненную ("крио-обедненную") плазму незамедлительно обрабатывают для захвата (с помощью, например, первичной хроматографии) лабильных факторов свертывания крови, таких как комплекс фактор IX и его компоненты, а также ингибиторов протеазы, таких как антитромбин и ингибитор C1 эстеразы. Последовательное центрифугирование и выделение преципитата можно применять на последующих этапах. Такие методы известны специалистам в данной области техники и описаны, например, в патентах США №№ 4624780, 5219995, 5288853 и заявках на патент США №№ 20140343255 и 20150343025, содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления изобретения фракция плазмы может содержать фракцию плазмы, содержащую значительную концентрацию альбумина. В другом варианте осуществления изобретения фракция плазмы может содержать фракцию плазмы, содержащую значительную концентрацию IgG или внутривенного иммуноглобулина (IGIV) (например, Gamunex-C®). В другом варианте осуществления изобретения фракция плазмы может содержать фракцию плазмы IGIV, такую как Gamunex-C®, которая была по существу истощена в отношении иммуноглобулина (IgG) с помощью методов, хорошо известных специалисту в данной области техники, таких как, например, опосредованное протеином А истощение (см. Keshishian, H., et al., Multiplexed, Quantitative Workflow for Sensitive Biomarker Discovery in Plasma Yields Novel Candidates for Early Myocardial Injury, Molecular & Cellular Proteomics, 14 at 2375-93 (2015)). В дополнительном варианте осуществления изобретения фракция плазмы крови может представлять собой ту, в которой по существу все из факторов свертывания крови удалены для того, чтобы сохранить эффективность фракции с пониженным риском тромбозов. Так, например, фракция плазмы может представлять собой фракцию плазмы, описанную в патенте США № 62/376529, который подан 18 августа 2016 г.; содержание которого в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

4. Препараты альбумина.

Специалистам в данной области техники известно, что существует две основные категории препа-

ратов альбумина плазмы ("APP"): фракция белка плазмы ("PPF") и раствор альбумина человека ("HAS"). PPF является производным процесса с более высоким выходом, чем HAS, но имеет более низкую минимальную чистоту альбумина, чем имеет HAS (>83% для PPF и >95% для HAS) (Production of human albumin solution: a continually developing colloid, P. Matejtschuk et al., British J. of Anaesthesia 85(6): 887-95, at 888 (2000)). В некоторых случаях PPF имеет чистоту альбумина, равную 83-95% или, в альтернативном варианте, 83-96%. Чистота альбумина может быть определена с помощью электрофореза или других анализов количественного определения, таких как, например, масс-спектрометрия. Кроме того, некоторые отметили, что PPF имеет недостаток из-за присутствия белковых "примесей", таких как РКА. Id. Как следствие, препараты PPF потеряли популярность как препараты альбумина плазмы, и даже были исключены из Фармакопеи некоторых стран. Id. В отличие от этих проблем, данное изобретение делает полезным использование этих "примесей". Кроме α -, β - и γ -глобулинов, а также вышеупомянутого РКА, способы по изобретению используют дополнительные белки или другие факторы из "примесей", которые способствуют таким процессам как нейрогенез, выживаемость нервных клеток, улучшение когнитивной или двигательной функции и снижение нейровоспаления.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что существуют, или существовали, несколько коммерческих источников PPF ("коммерческие препараты PPF") Они включают Plasma-Plex™ PPF (Armour Pharmaceutical Co., Тарритаун, штат Нью-Йорк), Plasmanate™ PPF (Grifols, Клейтон, штат Северная Каролина), Plasmatein™ (Alpha Therapeutics, Лос-Анджелес, штат Калифорния) и Protenate™ PPF (Baxter Labs, Inc. Дирфилд, штат Иллинойс).

Специалистам в данной области техники также будет понятно, что существуют, или существовали, несколько коммерческих источников HAS ("коммерческие препараты HAS") Они включают Albuminar™ (CSL Behring), AlbuRx™ (CSL Behring), Albutein™ (Grifols, Клейтон, штат Северная Каролина), Buminate™ (Baxatla, Inc., Бэннокберн, штат Иллинойс), Flexbumin™ (Baxatla, Inc., Бэннокберн, штат Иллинойс) и Plasbumin™ (Grifols, Клейтон, штат Северная Каролина).

а. Фракция белков плазмы (человека) (PPF).

В соответствии с комиссией по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США ("FDA"), "фракция белков плазмы (человека)", или PPF, является собственным наименованием препарата называемого "стерильный раствор белка, состоящий из альбумина и глобулина, полученных из плазмы человека" (Свод федеральных правил "CFR" 21 CFR 640.90, который в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки). Исходный материал PPF представляет собой плазму, выделенную из цельной крови, полученную, как предписано в 21 CFR 640.1 - 640.5 (который включен в данный документ посредством ссылки), или источник плазмы, полученный, как предписано в 21 CFR 640.60 - 640.76 (который включен в данный документ посредством ссылки).

PPF проверяют, чтобы определить соответствие следующим стандартам по 21 CFR 640.92 (который включен в данный документ посредством ссылки):

(а) конечный препарат должен представлять собой 5,0 +/- 0,30-процентный раствор белка и

(б) общий белок в конечном препарате должен состоять по меньшей мере из 83% альбумина, и не более чем 17% глобулинов. Не более 1% от общего количества белка должен составлять гамма-глобулин. Состав белка определяют по методу, который был одобрен для каждого производителя Директором Центра оценки и изучения биологических препаратов комиссии по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств.

В данном документе "фракция белков плазмы" или "PPF" относится к стерильному раствору белка, состоящего из альбумина и глобулина, полученных из плазмы крови человека, с содержанием альбумина, равным по меньшей мере 83% с не более чем 17% глобулинов (включая глобулины α_1 , α_2 , β и γ) и других белков плазмы, и не более 1% гамма-глобулина, как определено с помощью электрофореза (Hink, J.H., Jr., et al., Preparation and Properties of a Heat-Treated Human Plasma Protein Fraction, VOX SANGUINIS 2(174) (1957)). PPF может также относиться к твердой форме, которая при суспендировании в растворителе, имеет аналогичный состав. Фракция общего глобулина может быть определена путем вычитания альбумина от общего белка (Busher, I, Serum Albumin and Globulin, CLINICAL METHODS: THE HISTORY, PHYSICAL, AND LABORATORY EXAMINATIONS, Chapter 10, Walker H.K., Hall W.D., Hurst J.D., eds (1990)).

б. Альбумин (человека) (HAS).

Согласно FDA "альбумин (человека)" (также упоминаемый в данном документе как "HAS") является собственным наименованием препарата, называемого "стерильный раствор альбумина, полученного из плазмы человека" (Свод федеральных правил "CFR" 21 CFR 640.80, который в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки.) Исходный материал для альбумина (человека) представляет собой плазму, восстановленную из цельной крови, как предписано в 21 CFR 640.1 - 640.5 (который включен в данный документ посредством ссылки), или источник плазмы, полученный, как предписано в 21 CFR 640.60 - 640.76 (который включен в данный документ посредством ссылки). Другие требования к альбумину (человека), перечислены в 21 CFR 640.80 - 640.84 (который включен в данный документ посредством ссылки).

Альбумин (человека) проверяют, чтобы определить соответствие следующим стандартам по 21 CFR 640.82:

(а) концентрация белка. Конечный препарат должен соответствовать одной из следующих концентраций: 4,0 +/- 0,25-процентный; 5,0 +/- 0,30-процентный; 20,0 +/- 1,2-процентный и 25,0 +/- 1,5-процентный раствор белка;

(б) композиция белка. По меньшей мере 96% общего белка в конечном препарате должен составлять альбумин по определению методом, который был одобрен для каждого производителя Директором Центра оценки и изучения биологических препаратов комиссии по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств.

В данном документе "альбумин (человека)" или "HAS" относится к стерильному раствору белка, состоящего из альбумина и глобулина, полученных из плазмы крови человека, с содержанием альбумина, равным по меньшей мере 95% не более чем 5% глобулинов (включая глобулины α_1 , α_2 , β и γ) и другие белки плазмы. HAS может также относиться к твердой форме, которая при суспендировании в растворителе, имеет аналогичный состав. Фракция общего глобулина может быть определена путем вычитания альбумина от общего белка.

Как может быть признано обычными специалистами в данной области техники, фракции PPF и HAS могут также быть лиофилизированы или находиться в другой твердой форме. Такие препараты, с соответствующими добавками, могут быть использованы для изготовления, например, таблеток, порошков, гранул или капсул. Твердая форма может быть преобразована в препараты для инъекций путем ее 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 пропиленгликоль; и, если желательно, с обычными добавками, такими как солюбилизаторы, изотонические агенты, суспендирующие агенты, эмульгаторы, стабилизаторы и консерванты.

5. Фракции с уменьшенным количеством факторов свертывания.

В другом варианте осуществления изобретения используют фракцию плазмы крови, из которой удалены по существу все факторы свертывания крови для того, чтобы сохранить эффективность фракции с пониженным риском тромбозов. Удобно то, что препарат крови может быть получен от молодого донора или группы молодых доноров и может быть освобожден от IgM, с тем чтобы обеспечить препарат молодой крови, который является АВ0-совместимым. В настоящее время плазма, которую переливают, является совместимой по типу крови АВ0, так как присутствие естественных антител к антигенам А и В может привести к реакциям трансфузии. По-видимому IgM отвечает за трансфузионные реакции, когда пациенты получают плазму, не являющуюся АВ0-совместимой. Удаление IgM из препаратов или фракций крови помогает устранить трансфузионные реакции у субъектов, которым вводят препараты крови и фракции плазмы крови по изобретению.

Соответственно, в одном варианте осуществления данное изобретение относится к способу лечения или профилактики у субъекта возрастного патологического состояния, такого как когнитивное или двигательное нарушение, нейровоспаление или нейродегенерация. Способ включает введение субъекту препарата крови или фракции крови, полученной из цельной крови от индивида или группы индивидов, причем препарат крови или фракция крови по существу лишены (а) по меньшей мере одного фактора свертывания и/или (б) IgM. В некоторых вариантах осуществления индивид(ы), от которых получены препарат крови или фракция крови, представляют собой молодых индивидов. В некоторых вариантах осуществления препарат крови по существу лишен по меньшей мере одного фактора свертывания крови и IgM. В определенных вариантах осуществления препарат крови по существу лишен фибриногена (фактора I). В дополнительных вариантах осуществления препарат крови по существу лишен эритроцитов и/или лейкоцитов. В других вариантах осуществления препарат крови по существу лишен клеток. В других вариантах осуществления препарат крови получен из плазмы. Такие варианты осуществления данного изобретения, кроме того, поддерживаются заявкой на патент США № 62/376529, поданной 18 августа 2016 г., которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

6. Лечение при помощи обогащенных белком препаратов белка плазмы.

В дополнительных вариантах осуществления изобретения используют фракцию плазмы с уменьшенной концентрацией альбумина по сравнению с PPF, но с увеличенным количеством глобулинов и других белков плазмы (тех, которые были названы "примесями"). Варианты осуществления, такие как с PPF, HAS, элюатом I и элюатом II/III, все эффективно лишены факторов свертывания крови. Такие фракции плазмы далее называются "обогащенные белком препараты белка плазмы". Например, в варианте осуществления изобретения может использоваться обогащенный белком препарат белка плазмы, состоящий из 82% альбумина и 18% глобулинов α , β и γ и других белков плазмы. В другом варианте осуществления изобретения может использоваться обогащенный белком препарат белка плазмы, состоящий из 81% альбумина и 19% глобулинов α , β и γ и/или других белков плазмы. В другом варианте осуществления изобретения может использоваться обогащенный белком препарат белка плазмы, состоящий из 80% альбумина и 20% глобулинов α , β и γ и/или других белков плазмы. В дополнительных вариантах

осуществления изобретения могут использоваться обогащенные белком препараты белка плазмы, состоящие из 70-79% альбумина и, соответственно, 21-30% глобулинов α , β и γ и/или других белков плазмы. В дополнительных вариантах осуществления изобретения могут использоваться обогащенные белком препараты белка плазмы, состоящие из 60-69% альбумина и, соответственно, 31-40% глобулинов α , β и γ и/или других белков плазмы. В дополнительных вариантах осуществления изобретения могут использоваться обогащенные белком препараты белка плазмы, состоящие из 50-59% альбумина и, соответственно, 41-50% глобулинов α , β и γ и/или других белков плазмы. В дополнительных вариантах осуществления изобретения могут использоваться обогащенные белком препараты белка плазмы, состоящие из 40-49% альбумина и, соответственно, 51-60% глобулинов α , β и γ и/или других белков плазмы. В дополнительных вариантах осуществления изобретения могут использоваться обогащенные белком препараты белка плазмы, состоящие из 30-39% альбумина и, соответственно, 61-70% глобулинов α , β и γ и/или других белков плазмы. В дополнительных вариантах осуществления изобретения могут использоваться обогащенные белком препараты белка плазмы, состоящие из 20-29% альбумина и, соответственно, 71-80% глобулинов α , β и γ и/или других белков плазмы. В дополнительных вариантах осуществления изобретения могут использоваться обогащенные белком препараты белка плазмы, состоящие из 10-19% альбумина и, соответственно, 81-90% глобулинов α , β и γ и/или других белков плазмы. В дополнительных вариантах осуществления изобретения могут использоваться обогащенные белком препараты белка плазмы, состоящие из 1-9% альбумина и, соответственно, 91-99% глобулинов α , β и γ и/или других белков плазмы. В другом варианте осуществления изобретения могут использоваться обогащенные белком препараты белка плазмы, состоящие из 0% альбумина и 100% глобулинов α , β и γ и других белков плазмы.

Варианты осуществления данного изобретения, описанные выше, могут также иметь общие концентрации гамма-глобулина 1-5%.

Специфические концентрации белков во фракции плазмы могут быть определены с использованием методов, хорошо известных человеку, имеющему обычную квалификацию в данной области техники. В качестве примера, а не ограничения, такие методы включают электрофорез, масс-спектрометрию, ИФА и вестерн-блот анализ.

7. Получение фракций плазмы.

Способы получения PPF и других фракций плазмы хорошо известны обычным специалистам в данной области техники. Вариант осуществления данного изобретения обеспечивает сбор крови, используемой при получении фракции белков плазмы человека, в колбах с цитратом или антикоагулянтным питательным раствором декстрозы для ингибирования свертывания крови, с последующим разделением фракций I, II+III, IV и PPF, согласно способу, описанному в 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 может быть собрана при 2-8°C. Плазму впоследствии можно отделить посредством центрифугирования при 7°C, удалить и сохранять при -20°C. Затем плазму можно разморозить при 37°C и фракционировать, предпочтительно в течение 8 ч после изъятия с хранения при -20°C.

Плазму можно отделять от фракции I, используя 8% этанол при pH 7,2 и температуре -2-2,5°C с концентрацией белка 5,1-5,6%. Холодный 53,3-процентный этанол (176 мл/л плазмы) с ацетатным буфером (200 мл 4 М раствора ацетата натрия, 230 мл ледяной уксусной кислоты и H₂O до 1 л) могут быть добавлены с помощью пипетки со скоростью, например, 450 мл/мин при понижении температуры плазмы до -2°C. Фракция I может быть отделена и удалена из элюата (элюата I) посредством ультрацентрифугирования. Фибриноген может быть получен из фракции I в соответствии с методами, хорошо известными обычным специалистом в данной области техники.

Фракцию II+III можно отделить от элюата I путем разведения элюата до 21% этанола при рНе 6,8, при температуре -6°C, с концентрацией белка, равной 4,3%. Холодный 95-процентный этанол (176 мл/л элюата I) с 10 М уксусной кислоты, используемой для корректировки pH может быть добавлен с помощью пипетки со скоростью, например, 500 мл/мин при понижении температуры элюата I до -6°C. Полученный осадок (фракция II+III) может быть удален посредством центрифугирования при -6°C. Гамма-глобулин может быть получен из фракции II+III с использованием способов, хорошо известных обычными специалистам в данной области техники.

Фракцию IV-1 можно отделить от элюата II+III (элюат II/III) путем разведения элюата до 19% этанола при pH 5,2, при температуре -6°C, с концентрацией белка, равной 3%. H₂O и 10 М уксусную кислоту, используемую для регулировки pH можно добавлять непрерывно с помощью пипетки, поддерживая при этом элюат II/III при -6°C в течение 6 ч. Осажденную фракцию VI-1 можно осажать при -6°C в течение 6 ч, а затем отделять от элюата посредством центрифугирования при той же температуре. Стабильную фракцию белка плазмы можно выделить из элюата IV-1 путем регулирования концентрации этанола до 30% при pH 4,65, температуре -7°C и концентрации белка, равной 2,5%. Это может быть достигнуто путем доведения pH элюата IV-1 холодным спиртом с кислотой (две части 2 М уксусной кислоты и одна часть 95-процентного этанола). При поддержании температуры -7°C, на каждый литр корректируемого элюата I-IV добавляют 170 мл холодного этанола (95%). Белки, которые могут быть осажде-

ны, отстаивают в течение 36 ч, а затем удаляют посредством центрифугирования при -7°C .

Выделенные белки (стабильная фракция белков плазмы) можно высушить (например, путем сублимационной сушки), чтобы удалить спирт и H_2O . Полученный высушенный порошок можно растворить в стерильной дистиллированной воде, например, с использованием 15 л воды/кг порошка, с раствором, доведенным до pH 7,0 с помощью 1 М NaOH. Конечная 5-процентная концентрация белка может быть достигнута путем добавления стерильной дистиллированной воды, содержащей натрий ацетил триптофанат, каприлат натрия и NaCl, доведения до конечной концентрации 0,004 М ацетил триптофаната, 0,004 М каприлата и 0,112 М натрия. И, наконец, раствор может быть отфильтрован при температуре 10°C для получения прозрачного раствора, а затем термической обработан для инактивации патогенных микроорганизмов при 60°C в течение по меньшей мере 10 ч.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что каждую из различных фракций и элюатов, описанных выше, можно использовать в способах по данному изобретению для лечения заболевания. Например, но не в качестве ограничения, элюат I или элюаты II/III могут быть использованы для лечения таких заболеваний, как когнитивные, двигательные и нейродегенеративные расстройства, и являются вариантами осуществления данного изобретения.

Предыдущие способы получения фракций плазмы и фракции белков плазмы (PPF) являются только иллюстративными и включают только варианты осуществления данного изобретения. Специалисту в данной области техники будет понятно, что эти способы могут отличаться. Например, pH, температуру и концентрацию этанола, среди прочего, можно регулировать, чтобы получать различные вариации фракций плазмы и фракции белков плазмы в различных вариантах осуществления и способах по данному изобретению. В другом примере дополнительные варианты осуществления данного изобретения предполагают использование нанофильтрации для удаления/инактивации патогенных микроорганизмов из фракций плазмы и фракции белков плазмы.

Дополнительный вариант осуществления данного изобретения предусматривает способы и композиции с использованием и/или содержащие дополнительные фракции плазмы. Например, изобретение, помимо всего прочего, демонстрирует, что конкретные концентрации альбумина не являются критическими для улучшения когнитивной или двигательной активности. Таким образом, фракции с уменьшенной концентрацией альбумина, такие как те фракции, имеющие менее 83% альбумина, рассматриваются в данном изобретении.

8. Лечение.

Аспекты способов по изобретению, описанные в данном документе, включают лечение субъекта препаратом крови, содержащим плазму, таким как фракция плазмы крови, например, как описано выше. Вариант осуществления включает лечение субъекта-человека препаратом крови, содержащим плазму. Специалисту в данной области техники будет понятно, что способы лечения пациентов препаратом крови, содержащим плазму, известны в данной области техники. В качестве примера, но не ограничения, один из вариантов осуществления способов согласно изобретению, описанных в данном документе, включает введение свежемороженой плазмы субъекту для лечения и/или профилактики когнитивного или двигательного нарушения, нейровоспаления, нейродегенерации и/или возрастной деменции. В одном варианте осуществления препарат крови, содержащий плазму, вводят незамедлительно, например в течение около 12-48 ч после получения от донора, индивиду, страдающему или подверженному риску когнитивного или двигательного нарушения, нейровоспаления, нейродегенерации и/или возрастной деменции. В таких случаях, препарат может храниться в холодильнике, например, при $0-10^{\circ}\text{C}$. В другом варианте осуществления свежемороженая плазма является той, которую сохраняли в замороженном виде (криоконсервация) при -18°C или ниже. До введения свежемороженую плазму размораживают, и после разморозки вводят субъекту через 60-75 мин после того, как начался процесс размораживания. Каждый субъект предпочтительно получает единичную порцию свежемороженой плазмы (200-250 мл), при этом свежемороженая плазма предпочтительно получена от доноров заранее определенного возрастного диапазона. В одном варианте осуществления изобретения свежемороженая плазма предоставлена от (получена от) молодых индивидов. В другом варианте осуществления изобретения свежемороженая плазма предоставлена от (получена от) доноров того же пола. В другом варианте осуществления изобретения свежемороженая плазма предоставлена от (получена от) доноров возрастном диапазоне 18-22 года.

В одном варианте осуществления изобретения, препараты крови, содержащие плазму подвергают скринингу на тип крови после того, как они были предоставлены. В другом варианте осуществления данного изобретения, препараты крови, содержащие плазму, проверяют на наличие агентов инфекционных заболеваний, таких как ВИЧ-I и II, HBV (вирус гепатита B), HCV (вирус гепатита C), HTLV (Т-лимфотропный вирус человека) I и II, антитела к коровьему антигену вируса гепатита B (HBc) в соответствии с требованиями 21 CFR 640.33 и рекомендациями, содержащимися в руководствах FDA.

В еще одном варианте осуществления данного изобретения субъекту вводят фракцию плазмы. В одном варианте осуществления изобретения фракция плазмы представляет собой PPF или HAS. В еще одном варианте осуществления изобретения фракция плазмы представляет собой один из коммерческих препаратов PPF или коммерческих препаратов HAS. В другом варианте осуществления данного изобре-

тения фракция плазмы представляет собой PPF или HAS, полученная от группы индивидов определенного возрастного диапазона, таких как молодые люди, или представляет собой модифицированную фракцию PPF или HAS, которая была подвергнута дополнительному фракционированию или обработке (например, PPF или HAS, в которых частично или по существу удалены один или более специфических белков). В другом варианте осуществления изобретения фракция плазмы представляет собой фракцию плазмы IGIV, которая была существенно обеднена в отношении иммуноглобулина (IgG). Фракция крови, которая является "по существу обедненной" или в которой специфические белки, такие как IgG, "по существу удалены", относится к фракции крови, содержащей менее чем около 50% от количества, которое наблюдается в эталонном препарате или цельной плазме крови, например менее чем 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, 0,1%, необнаруживаемый уровень, или любое целое число между этими величинами, измеренное с использованием стандартных анализов, хорошо известных в данной области техники.

9. Введение.

Аспекты способов по изобретению, описанные в данном документе, включают лечение субъекта препаратом крови, содержащим плазму, таким как фракция плазмы крови или фракция плазмы, например, как описано выше. Вариант осуществления включает лечение субъекта-человека препаратом крови, содержащим плазму. Специалисту в данной области техники будет понятно, что способы лечения пациентов препаратом крови, содержащим плазму, известны в данной области техники. В качестве примера, но не ограничения, один из вариантов осуществления способов согласно изобретению, описанных в данном документе, включает введение свежемороженой плазмы субъекту для лечения и/или профилактики когнитивного или двигательного нарушения, нейровоспаления, нейродегенерации и/или возрастной деменции. В одном варианте осуществления препарат крови, содержащий плазму вводят незамедлительно, например в течение около 12-48 ч после получения от донора, индивиду, страдающему или подверженному риску когнитивного или двигательного нарушения, нейровоспаления, нейродегенерации и/или возрастной деменции. В таких случаях, препарат может храниться в холодильнике, например, при 0-10°C. В другом варианте осуществления свежемороженая плазма является той, которую сохраняли в замороженном виде (криоконсервация) при -18°C или ниже. До введения свежемороженую плазму размораживают, и после разморозки вводят субъекту через 60-75 мин после того, как начался процесс размораживания. Каждый субъект предпочтительно получает единичную порцию свежемороженой плазмы (200-250 мл), при этом свежемороженая плазма предпочтительно получена от доноров заранее определенного возрастного диапазона. В одном варианте осуществления изобретения свежемороженая плазма предоставлена от (получена от) молодых индивидов. В другом варианте осуществления изобретения свежемороженая плазма предоставлена от (получена от) доноров того же пола. В другом варианте осуществления изобретения свежемороженая плазма предоставлена от (получена от) доноров возрастном диапазоне 18-22 года.

В одном варианте осуществления изобретения, препараты крови, содержащие плазму подвергают скринингу на тип крови после того, как они были предоставлены. В другом варианте осуществления данного изобретения, препараты крови, содержащие плазму, проверяют на наличие агентов инфекционных заболеваний, таких как ВИЧ-I и II, HBV (вирус гепатита B), HCV (вирус гепатита C), HTLV (Т-лимфотропный вирус человека) I и II, антитела к коровьему антигену вируса гепатита B (HBc) в соответствии с требованиями 21 CFR 640.33 и рекомендациями, содержащимися в руководствах FDA.

В еще одном варианте осуществления данного изобретения субъекту вводят фракцию плазмы. В одном варианте осуществления изобретения фракция плазмы представляет собой PPF или HAS. В еще одном варианте осуществления изобретения фракция плазмы представляет собой один из коммерческих препаратов PPF или коммерческих препаратов HAS. В другом варианте осуществления данного изобретения фракция плазмы представляет собой PPF или HAS, полученная от группы индивидов определенного возрастного диапазона, таких как молодые люди, или представляет собой модифицированную фракцию PPF или HAS, которая была подвергнута дополнительному фракционированию или обработке (например, PPF или HAS, в которых частично или по существу удалены один или более специфических белков). В другом варианте осуществления изобретения фракция плазмы представляет собой фракцию плазмы IGIV, которая была существенно обеднена в отношении иммуноглобулина (IgG). Фракция крови, которая является "по существу обедненной" или в которой специфические белки, такие как IgG, "по существу удалены", относится к фракции крови, содержащей менее чем около 50% от количества, которое наблюдается в эталонном препарате или цельной плазме крови, например менее чем 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, 0,1%, необнаруживаемый уровень, или любое целое число между этими величинами, измеренное с использованием стандартных анализов, хорошо известных в данной области техники.

Вариант осуществления изобретения включает лечение субъекта, у которого диагностировали когнитивное или двигательное нарушение, нейродегенерацию или нейровоспаление, путем введения субъекту эффективного количества плазмы крови или фракции плазмы. Другой вариант осуществления изобретения включает введение эффективного количества плазмы крови или фракции плазмы, а затем мониторинг субъекта в отношении улучшения когнитивной или двигательной функции или снижения нейро-

воспаления или повышения нейрогенеза. Другой вариант осуществления данного изобретения включает лечение субъекта с диагнозом когнитивного или двигательного нарушения, нейродегенерации или нейровоспаления путем введения субъекту эффективного количества плазмы крови или фракции плазмы, причем плазму крови или фракцию плазмы вводят таким образом, что это приводит к улучшению когнитивной или двигательной функции, снижению нейровоспаления или повышению нейрогенеза после достижения среднего или медианного времени полужизни белков плазмы крови или фракции белков плазмы, по отношению к самой последней введенной дозе (что называется в данном документе "прерывистым применением" или "прерывистой дозой"). Другой вариант осуществления изобретения включает введение плазмы крови или фракции плазмы по схеме применения в течение по меньшей мере двух последовательных суток и мониторинг субъекта в отношении улучшения когнитивной или двигательной функции, снижения нейровоспаления или улучшения нейрогенеза в течение по меньшей мере 3 суток после даты последнего введения. Другой вариант осуществления изобретения включает введение плазмы крови или фракции плазмы по схеме применения в течение по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 последовательных суток и мониторинг субъекта в отношении улучшения когнитивной или двигательной функции, снижения нейровоспаления или повышения нейрогенеза в течение по меньшей мере 3 суток после даты последнего введения. Еще один вариант осуществления изобретения включает введение плазмы крови или фракции плазмы по схеме применения в течение по меньшей мере последовательных 2 суток и после даты последнего введения, мониторинг в отношении улучшения когнитивной или двигательной функции, снижения нейровоспаления или повышения нейрогенеза, после того, как был достигнут средний период полужизни белков в плазме крови или фракции плазмы. Другой вариант осуществления изобретения включает введение плазмы крови или фракции плазмы по схеме применения в течение 2-14 непоследовательных суток, причем каждый разрыв между дозами может составлять 0-3 суток.

В некоторых случаях прерывистое применение в соответствии с данным изобретением включает введение первого набора доз, например, как описано выше, за которым следует период без применения, например "период без применения", за которым, в свою очередь, следует введение другой дозы или набора доз. Длительность этого периода "без применения" может варьироваться, но в некоторых вариантах осуществления она составляет 7 суток или дольше, например 10 суток или дольше, включая 14 суток или дольше, причем в некоторых случаях длительность периода без применения колеблется от 15 до 365 суток, например от 30 до 90 суток, и в том числе от 30 до 60 суток. Таким образом, варианты осуществления способов включают несистематическое (т.е. не непрерывное) применение, например несистематическое введение препарата плазмы крови. В некоторых вариантах осуществления схему прерывистого применения с последующим периодом без применения повторяют некоторое количество раз, по необходимости, причем в некоторых случаях эту схему продолжают применять в течение 1 года или более, например 2-х лет или более, в том числе всю жизни субъекта. Другой вариант осуществления изобретения включает введение плазмы крови или фракции плазмы по схеме применения в течение 5 последовательных суток, с периодом без применения, равным 2-3 суток, с последующим введением в течение 2-14 последовательных суток.

Биохимически, под "эффективным количеством" или "эффективной дозой" активного агента подразумевается количество активного агента, которое будет ингибировать, вызывать антагонизм, снижать, уменьшать или подавлять на около 20% или более, например на 30% или более, на 40% или более, или на 50% или более, в некоторых случаях, на 60% или более, 70% или более, 80% или более, или на 90% или более, в некоторых случаях на около 100%, т.е. до незначительных количеств, а в некоторых случаях, вызывать обратное прогрессирование когнитивного расстройства, нейровоспаления, нейродегенерации или возрастной деменции.

10. Фракция белков плазмы.

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

В другом варианте осуществления PPF состоит из 88% нормального альбумина человека, 12% альфа- и бета-глобулинов и не более чем 1% гамма-глобулина, что определено с помощью электрофореза. Другие варианты осуществления данного варианта осуществления, используемые при осуществлении способов по данному изобретению, включают, например, вариант осуществления в виде 5% раствора PPF, забуференного карбонатом натрия и стабилизированного 0,004 М каприлатом натрия и 0,004 М ацетилтриптофаном. Дополнительные препараты, в том числе с измененным процентом 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 осуществлении способов по данному изобретению.

11. Фракции плазмы доноров конкретного возраста.

Дополнительные варианты осуществления данного изобретения включают введение фракции белков плазмы, полученной из плазмы индивидов определенных возрастных диапазонов. Вариант осуществления включает введение PPF или HAS, которые были получены из плазмы молодых индивидов. В другом варианте осуществления данного изобретения молодые индивиды относятся к одному определенно-

му возрасту или определенному диапазону возраста. В еще одном варианте осуществления изобретения, средний возраст доноров меньше, чем у субъекта или меньше, чем средний возраст субъектов, подлежащих лечению.

Определенные варианты осуществления данного изобретения включают создание пула крови или плазмы от особей определенного возраста и фракционирование плазмы крови, как описано выше, чтобы получить препарат фракции белков плазмы, таких как PPF или HAS. В альтернативном варианте осуществления данного изобретения, фракцию белков плазмы или конкретную фракцию белков плазмы получают от конкретных индивидов, находящихся в указанном возрастном диапазоне.

12. Показания к применению.

Способы согласно изобретению и препараты крови, содержащие плазму и фракции, находят применение в лечении, включая предотвращение, возрастных патологических состояний, таких как нарушения когнитивной или двигательной способности индивидов, например когнитивные расстройства, в том числе (но не ограничиваясь этим) возрастная деменция, иммунологические патологические состояния, рак, и физическое и функциональное снижение; и двигательные расстройства, такие как (но не ограничиваясь этим) болезнь Паркинсона. Индивиды, страдающие или подверженные риску развития возрастного когнитивного или двигательного нарушения, нейровоспаления и/или нейродегенерации, которые получают пользу от лечения препаратом крови, содержащим плазму, согласно данному изобретению, например, с помощью способов, описанных в данном документе, включают индивидов, которые находятся в возрасте 50 лет и старше, например 60 лет или старше, 70 лет или старше, 80 лет или старше, 90 лет или старше и 100 лет или старше, то есть, в возрасте от около 50 до 100, например 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или около 100 лет, и страдают от когнитивных или двигательных нарушений, нейровоспаления, и/или нейродегенерации, связанных с естественным процессом старения, например легкого когнитивного нарушения (ЛКН); и индивидов, которые находятся 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, то есть, в возрасте от около 50 до 90, например 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или около 100 лет, у которых еще не начали проявляться признаки когнитивных или двигательных нарушений, нейровоспаления и/или нейродегенерации. Примеры когнитивных и двигательных, нейровоспалительных и/или нейродегенеративных нарушений, которые возникают из-за естественного старения, включают следующие:

a. Легкое когнитивное нарушение (ЛКН).

Легкое когнитивное нарушение представляет собой умеренное нарушение познания, которое проявляется как проблемы с памятью или другими психическими функциями, такими как планирование, следование инструкции или принятие решений, которые ухудшились с течением времени, в то время как общая психическая функция и повседневная деятельность не ухудшились. Таким образом, хотя обычно не происходит значительная гибель нейронов, нейроны в стареющем мозге уязвимы для сублетальных возрастных изменений в структуре, синаптической целостности и молекулярной обработке в синапсе, все из которых ухудшают когнитивные функции.

Индивиды, страдающие или подвержены риску развития возрастных когнитивных нарушений, которые получают пользу от лечения препаратом или фракцией крови, содержащими плазму, согласно данному изобретению, например, с помощью способов, описанных в данном документе, также включают индивидов любого возраста, которые страдают от нарушения когнитивной функции вследствие возрастного расстройства, и индивидов любого возраста, у которых диагностировали возрастное расстройство, которое, как правило, сопровождается когнитивными нарушениями, причем у индивида еще не начали проявляться симптомы когнитивных нарушений. Примеры таких возрастных расстройств включают следующие.

b. Болезнь Альцгеймера.

Болезнь Альцгеймера является прогрессирующей, неотвратимой потерей когнитивной функции, связанной с избыточным количеством старческих бляшек в коре головного мозга и подкорковом сером веществе, которое также содержит β -амилоид и нейрофибриллярные клубки, состоящие из тау-белка. Общая форма поражает лиц > 60 лет, и ее частота повышается с возрастом. На ее долю приходится более 65% деменций в пожилом возрасте.

Причина болезни Альцгеймера не известна. Болезнь возникает в семьях с частотой около 15-20% случаев. Остальные, так называемые спорадические случаи имеют некоторые генетические детерминанты. Заболевание имеет аутосомно-доминантный генетический профиль в случаях с наиболее ранним началом и некоторых случаях с поздним началом, но с различной пенетрантностью в позднем возрасте. Факторы окружающей среды находятся в центре внимания активного исследования.

В ходе заболевания в коре головного мозга, гиппокампе и подкорковых структурах (включая селективную потерю клеток в базальном ядре Мейнерта), голубом пятне и в дорсальном ядре шва исчезают синапсы, и в конечном счете, нейроны. Церебральное использование и перфузия глюкозы снижаются в некоторых областях мозга (теменная доля и кора височной доли на ранней стадии заболевания, префронтальная кора на поздней стадии заболевания). Нейритные или старческие бляшки (состоящие из нейритов, астроцитов и глиальных клеток вокруг сердечника амилоида) и нейрофибриллярные клубки (состоящие из спаренных спиральных филаментов) играют определенную роль в патогенезе болезни Альц-

геймера. Старческие бляшки и нейрофибриллярные клубки возникают при нормальном старении, но они гораздо более распространены у людей с болезнью Альцгеймера.

с. Болезнь Паркинсона.

Болезнь Паркинсона (БП) представляет собой идиопатическое, медленно прогрессирующее дегенеративное заболевание ЦНС, характеризующееся замедлением и снижением движения (брадикинезия), мышечной ригидностью, тремором покоя (дистония), мышечной заторможенностью и постуральной неустойчивостью. Первоначально рассматриваемое в первую очередь как двигательное расстройство, БП в настоящее время признается также причиной депрессии и эмоциональных изменений. БП также может влиять на познание, поведение, сон, вегетативные функции и сенсорные функции. Наиболее распространенные когнитивные нарушения включают функции нарушения концентрации и внимания, рабочую память, исполнительную функцию, употребление языка и зрительно-пространственной ориентации. Характерной чертой БП является симптомы, связанные с пониженной двигательной функцией, которым обычно предшествуют те, которые связаны с когнитивными нарушениями, что помогает в диагностике заболевания.

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

Болезнь Паркинсона впервые диагностируют у примерно 60000 американцев каждый год, и в настоящее время ею поражено около одного миллиона американцев. Даже если БП не является фатальной сама по себе, ее осложнения являются четырнадцатой ведущей причиной смерти в Соединенных Штатах. В настоящее время БП не может быть вылечена, и назначают, как правило, симптоматическое лечение, с хирургическим вмешательством, предписанным при более поздних, тяжелых случаях.

Варианты лечения БП включают введение лекарственных средств для компенсации дефицита двигательной функции. Эти варианты увеличивают или заменяют нейромедиатор, дофамин, концентрации которого в мозге у пациентов с БП являются низкими. Такие препараты включают карбидопу/леводопу (которые создают больше дофамина в головном мозге); апоморфин, прамипексол, ропинирол и ролитин (агонисты дофамина); селегилин и разагилин (ингибиторы МАО-В, которые предотвращают разрушение дофамина); энтакапон и толкапон (ингибиторы пирокатехин-О-метилтрансферазы [COMT], которые делают леводопу более доступной в головном мозге); бензтропин и тригексифенидил (антихолинэргетики) и амантадин (контроль тремора и ригидности). Упражнения/физическую терапию также часто назначают, чтобы помочь поддерживать физическую и умственную функцию.

Современные методы лечения, которые лечат симптомы БП, не обеспечивают излечение, и не в состоянии предотвратить прогрессирование заболевания. Кроме того, в настоящее время лекарственные препараты, как правило, теряют эффективность на поздней стадии БП. Наиболее назначаемый препарат, леводопа, обычно приводит к неблагоприятным эффектам в пределах от 5 до 10 лет после начала приема лекарственного средства. Эти побочные эффекты могут быть серьезными и могут привести к двигательным флуктуациям и непредсказуемым колебаниям в управлении двигательными функциями между дозами, а также подергиванию/дрожанию (дискинезии), которыми трудно управлять и которые являются такими же инвалидизирующими, как и собственные симптомы БП. Таким образом, сохраняется потребность в новых методах лечения с новыми механизмами действия, которые можно применять вместе или в комбинации с существующими лекарственными средствами против БП.

d. Паркинсонизм.

Вторичный паркинсонизм (также называемый как атипичная болезнь Паркинсона или Паркинсон плюс) является результатом утраты или препятствования действию дофамина в базальных ганглиях вследствие других идиопатических дегенеративных заболеваний, лекарственных препаратов или экзогенных токсинов. Наиболее частой причиной вторичного паркинсонизма является прием внутрь антипсихотических лекарственных средств или резерпина, которые вызывают паркинсонизм, блокируя дофаминовые рецепторы. Менее распространенные причины включают отравление оксидом углерода или марганцем, гидроцефалию, структурные повреждения (опухоли, инфаркты, влияющие на средний мозг или базальные ганглии), субдуральные гематомы и дегенеративные заболевания, включая нигростриатную дегенерацию. Некоторые расстройства такие, как прогрессивный надъядерный паралич (ПНП), множественная системная атрофия (МСА), кортикобазальная дегенерация (КБД) и деменция с тельцами Леви (ДТЛ) могут проявлять симптомы паркинсонизма, прежде чем могут возникнуть кардинальные симптомы, необходимые для конкретного диагноза, и, таким образом, могут быть помечены как "паркинсонизм".

е. Лобно-височная деменция.

Лобно-височная деменция (ЛВД) представляет собой состояние, являющееся результатом прогрессирующей дегенерации лобной доли головного мозга. Со временем дегенерация может перейти на височную долю. Вторая после болезни Альцгеймера (БА) по распространенности, ЛВД составляет 20% деструктивных случаев деменции. Симптомы подразделяются на три группы в зависимости от пострадавших

функций лобной и височной доли:

Поведенческий вариант ЛВД (пвЛВД), с симптомами включает вялость и аспонтанность с одной стороны, и растормаживание с другой стороны; прогрессирующая неплавная афазия (ПНПА), при которой наблюдаются перебои в беглости речи за счет трудности артикуляции, фонологических и/или синтаксических ошибок, но сохраняется понимание слов; и семантическая деменция (СД), при которой пациенты сохраняют свободную с нормальной фонетику и синтаксис, но имеют возрастающую сложность в назывании и понимании слов. Другие когнитивные симптомы, общие для всех пациентов с ЛВД, включают нарушения в исполнительной функции и способности к концентрации внимания. Другие когнитивные способности, в том числе восприятие, пространственные навыки, память и практика, как правило, остаются незатронутыми. ЛВД может быть диагностирована путем наблюдения на структурных сканах МРТ атрофии лобной доли и/или передней височной доли.

Существует ряд форм ЛВД, любую из которых можно лечить или предотвращать с использованием способов и композиций согласно данному изобретению. Например, одна из форм лобно-височной деменции представляет собой семантическую деменцию (СД). СД характеризуется потерей семантической памяти как в вербальном, так и невербальном доменах. Пациенты с СД часто жалуются на затруднения с подбором слов. Клинические признаки включают свободную афазия, аномию, нарушенное понимание смысла слов и ассоциативную визуальную агнозию (неспособность сопоставить семантически связанные изображения или объекты). По мере того как заболевание прогрессирует, часто наблюдаются поведенческие и личностные изменения, аналогичные тем, которые наблюдаются при лобно-височной деменции, хотя описаны случаи "чистой" семантической деменции с несколькими поздними поведенческими симптомами. Структурная визуализация МРТ демонстрирует характерный профиль атрофии в височной доле (преимущественно в левой), с большей вовлеченностью нижней, чем верхней, и большей атрофией передней по сравнению с задней височной долей.

В качестве другого примера, другая форма лобно-височной деменции является болезнью Пика (PiD, также PcD). Отличительной чертой заболевания является сосредоточение тау-белков в нейронах, скопление в окрашиваемые серебром, сферические агрегаты, известные как "тельца Пика". Симптомы включают потерю речи (афазия) и деменцию. Пациенты с орбитофронтальной дисфункцией могут стать агрессивными и социально неприемлемыми. Они могут совершить кражу или продемонстрировать навязчивое или повторяющееся стереотипное поведение. Пациенты с дорсомедиальной или дорсолатеральной лобной дисфункцией могут демонстрировать отсутствие беспокойства, апатию или пониженную спонтанность. Пациенты могут демонстрировать отсутствие самоконтроля, аномальное самосознание и неспособность оценить смысл. Пациенты с двусторонней потерей серого вещества в постеролатеральной орбитофронтальной коре и правой передней островковой коре могут демонстрировать изменения пищевого поведения, такие как патологическая тяга к сладкому. У пациентов с более фокальной потерей серого вещества в передней орбитофронтальной коре головного мозга может развиваться гиперфагия. В то время как некоторые из симптомов, первоначально могут быть смягчены, заболевание прогрессирует, и пациенты часто умирают в течение двух-десяти лет.

f. Болезнь Хантингтона.

Болезнь Хантингтона (БХ) представляет собой наследственное прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся развитием эмоциональных, поведенческих и психических нарушений; потерей интеллектуальных или когнитивных функций; и нарушением движения (двигательные нарушения). Классические признаки БХ включают развитие хореи -непроизвольных, быстрых, нерегулярных, судорожных движений, которые могут повлиять на лицо, руки, ноги или туловище, - а также снижение когнитивных функций, включая постепенную потерю обработки мысли и приобретенных интеллектуальных способностей. Может наблюдаться ухудшение памяти, абстрактного мышления и суждений; неправильное восприятие времени, места, или личности (дезориентация); повышенная тревожность и изменения личности (распад личности). Хотя симптомы обычно становятся очевидными в течение четвертого или пятого десятилетия жизни, возраст начала является переменным и колеблется от раннего детства до конца зрелого возраста (например, 70 или 80 лет).

БХ передается в семьях как аутосомно-доминантный признак. Расстройство возникает в результате аномально длинных последовательностей или "повторов" кодируемых команд в пределах гена на хромосоме 4 (4p16.3). Прогрессирующая потеря функции нервной системы связана с результатами БХ от потери нейронов в определенных областях мозга, в том числе базальных ганглиев и коры головного мозга.

g. Боковой амиотрофический склероз.

Боковой амиотрофический склероз (БАС) является быстро прогрессирующим, приводящим к летальному исходу, неврологическим заболеванием, которое поражает двигательные нейроны. Мышечная слабость и атрофия и признаки дисфункции клеток переднего рога спинного мозга наиболее часто первоначально отмечают в руках, реже в ногах. Сайт начала является случайным, а прогрессирование асимметрично. Судороги являются общими, и им может предшествовать слабость. Редко пациент живет 30 лет; 50% умирают в течение 3 лет от начала заболевания, 20% живут 5 лет, а 10% живут 10 лет.

Диагностические признаки включают начало во время средней или поздней взрослой жизни и прогрессирующие общее вовлечение двигательной функции без сенсорных нарушений. Скорость нервной

проводимости является нормальными до поздней стадии заболевания. Недавние исследования продемонстрировали когнитивные нарушения, а также, в частности, снижение непосредственной вербальной памяти, зрительной памяти, языка и исполнительных функций.

Уменьшение площади тела клетки, количества синапсов и общей длины синапсов наблюдалось даже в нейронах нормального вида у пациентов с БАС. Было высказано предположение, что, когда пластичность активной зоны достигает своего предела, продолжающаяся потеря синапсов может привести к функциональным нарушениям. Стимуляция формирования новых синапсов или предотвращение потери синапсов может поддерживать функции нейронов у этих пациентов.

h. Рассеянный склероз.

Рассеянный склероз (РС), характеризуется различными симптомами и признаками дисфункции ЦНС, с ремиссиями и повторяющимися обострениями. Наиболее общие симптомы представляют собой парестезии в одной или более конечностях, в торсе или на одной стороне лица; слабость или неуклюжесть ноги или руки; или нарушения зрения, например частичную слепоту и боль в одном глазу (ретробульбарный неврит зрительного нерва), помутнение зрения или скотомы. Общие когнитивные нарушения включают нарушения памяти (приобретение, удержание и извлечение новой информации), внимания и концентрации (в частности, разделенное внимание), обработки информации, исполнительных функций, функций зрительно-пространственной ориентации и беглости речи. Общие ранние симптомы представляют собой глазной паралич, который приводит к двоению в глазах (диплопия), временную слабость одной или более конечностей, небольшую скованность или необычную утомляемость конечности, незначительных нарушения походки, трудности с контролем мочевого пузыря, головокружение и легкие эмоциональные нарушения; все они указывают на рассеянное поражение ЦНС и часто возникают за месяцы или годы до того, как болезнь распознают. Избыток тепла может усугубить симптомы и признаки.

Течение болезни сильно варьируется, является непредсказуемым и у большинства пациентов, ремиттирующим. Сначала эпизоды могут быть разделены месяцами или годами ремиссии, особенно когда болезнь начинается с ретробульбарного неврита зрительного нерва. Тем не менее, у некоторых пациентов возникают частые приступы, и они быстро становятся нетрудоспособными; у некоторых течение болезни может быть быстро прогрессирующим.

i. Глаукома.

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

j. Миотоническая дистрофия.

Миотоническая дистрофия (МД) является мультисистемным аутосомно-доминантным заболеванием, характеризующимся дистрофической мышечной слабостью и миотонией. Молекулярный дефект представляет собой экспансированный тринуклеотидный (CTG) повтор в 3'-нетранслируемой области гена миотонинпротеинкиназы в хромосоме 19q. Симптомы могут возникать в любом возрасте, а диапазон клинической тяжести широк. Миотония выражена в мышцах рук, а птоз является обычным симптомом даже в легких случаях. В тяжелых случаях отмечается периферическая мышечная слабость, часто с катарактой, преждевременное облысение, маскообразное лицо, сердечная аритмия, тестикулярная атрофия и эндокринные нарушения (например, сахарный диабет). Умственная отсталость является обычным симптомом при тяжелых врожденных формах, в то время как возрастное снижение лобных и височных когнитивных функций, в частности языка и исполнительных функций, наблюдаются в более легких взрослых формах заболевания. Люди с сильным поражением умирают в районе 50 лет.

k. Деменция.

Деменция описывает класс расстройств, имеющих симптомы, поражающие мышление и социальные способности достаточно сильно, чтобы мешать повседневной деятельности. Другие случаи деменции в дополнение к деменции, наблюдаемой на более поздних стадиях возрастных расстройств, обсуждаемых выше, включают сосудистую деменцию и деменции с тельцами Леви, описанные ниже.

При сосудистой деменции или "мультиинфарктной деменции" когнитивные нарушения вызваны проблемами в поступлении крови в мозг, как правило, из-за серии незначительных инсультов, а иногда, за счет одного крупного инсульта до или после других более мелких инсультов. Сосудистые повреждения могут быть результатом диффузного цереброваскулярного заболевания, такого как болезнь мелких сосудов или очаговые поражения, или оба варианта. Пациенты, страдающие от сосудистой деменции, имеют когнитивные нарушения, острые или подострые, после острого цереброваскулярного нарушения, после чего наблюдается прогрессирующее снижение когнитивной способности. Когнитивные нарушения аналогичны тем, которые наблюдаются при болезни Альцгеймера, в том числе нарушения в языке, памяти, сложной визуальной обработке или исполнительных функциях, хотя соответствующие изменения в мозге не связаны с патологией БА, но с хроническим снижением кровотока в головном мозге, что, в конце концов, приводит к деменции. Нейровизуализация при помощи однофотонной эмиссионной компьютер-

ной томографии (ОФЭКТ) и позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) может быть использована для подтверждения диагноза мультиинфарктной деменции в сочетании с оценками, включающими исследование психического состояния.

Деменция с тельцами Леви (ДТЛ, также известная под различными другими названиями, включая деменцию с тельцами Леви, диффузную болезнь с тельцами Леви, кортикальную болезнь с тельцами Леви и старческую деменцию типа Леви) является одним из видов деменции анатомически характеризующимся наличием телец Леви (сгустков белка альфа-синуклеина и убиквитина) в нейронах, обнаруживаемых при посмертной гистологии мозга. Ее основной особенностью является снижение когнитивных функций, в частности исполнительных функций. Внимательность и краткосрочная память будут возрастать и падать.

Устойчивые или повторяющиеся зрительные галлюцинации с яркими и детальными картинками часто являются ранними диагностическими симптомами. ДТЛ часто путают на ее ранних стадиях с болезнью Альцгеймера и/или сосудистой деменцией, хотя, болезнь Альцгеймера обычно начинается довольно постепенно, а ДТЛ часто имеет быстрое и острое начало. Симптомы ДТЛ также включают двигательные симптомы, аналогичные болезни Паркинсона. ДТЛ отличается от деменции, которая иногда возникает при болезни Паркинсона, по временным рамкам, в которых симптомы возникают деменции по сравнению с симптомами болезни Паркинсона. Болезнь Паркинсона с деменцией (БПД) диагностируется при начале деменции более чем через год после начала болезни Паркинсона. ДТЛ диагностируют, когда когнитивные симптомы начинаются в то же время или в течение года после появления симптомов болезни Паркинсона.

1. Прогрессирующий надъядерный паралич.

Прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП) является расстройством мозга, которое вызывает серьезные и прогрессирующие проблемы с контролем походки и равновесием, а также сложными движениями глаз и проблемы с мышлением. Одним из классических признаков болезни является неспособность должным образом сфокусировать взгляд, что происходит из-за повреждения в области мозга, которая координирует движение глаз. Некоторые индивиды описывают этот эффект как расплывчатость. Пораженные индивиды часто демонстрируют изменения настроения и поведения, в том числе депрессию и апатию, а также прогрессирующую слабую деменцию. Длинное название расстройства указывает на то, что заболевание начинается медленно и продолжает ухудшаться (прогрессировать), и вызывает слабость (паралич), повреждая определенные части мозга выше гороховидных структур, называемых ядрами, которые контролируют движения глаз (надъядерный). ПНП был впервые описан как отдельное расстройство в 1964 году, когда трое ученых опубликовали работу, в которой приводили различия данного патологического состояния и болезни Паркинсона. Его иногда называют как синдромом Стила-Ричардсона-Ольшевского, по фамилиям тех ученых, которые определили данное расстройство. Хотя ПНП прогрессирует с ухудшением, никто не умирает от самого ПНП.

m. Атаксия.

Люди с атаксией имеют проблемы с координацией, поскольку у них пострадали части нервной системы, которые контролируют движение и баланс. Атаксия может поражать пальцы, кисти, руки, ноги, тело, речь и движения глаз. Слово атаксия часто используется для описания симптомов несогласованности, которые могут быть связаны 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, которые являются первичными целями Национального фонда атаксии.

n. Множественная системная атрофия.

Множественная системная атрофия (МСА) представляет собой дегенеративное неврологическое расстройство. МСА связана с дегенерацией нервных клеток в определенных областях головного мозга. Эта дегенерация клеток вызывает проблемы с движением, равновесием и другими вегетативными функциями организма, такими как контроль мочевого пузыря или регуляция кровяного давления.

Причина МСА неизвестна, и никаких конкретных факторов риска выявлено не было. Около 55% случаев приходится на мужчин, с типичным возрастом начала с конца 50 лет до начала 60 лет. При МСА часто проявляются некоторые из тех же симптомов, что и при болезни Паркинсона. Тем не менее, пациенты с МСА обычно демонстрируют минимальный, в случае наличия, ответ на дофаминовые препараты, используемые при болезни Паркинсона.

o. Дряхлость.

Синдром дряхлости ("дряхлость") представляет собой гериатрический синдром, характеризующийся функциональным и физическим спадом включая снижение подвижности, мышечную слабость, физическую медлительность, плохую переносимость, низкую физическую активность, плохое питание и непроизвольную потерю массы. Такое снижение часто сопровождается и является следствием таких заболеваний, как когнитивная дисфункция и рак. Однако дряхлость может возникнуть даже без болезни. Лица, страдающие от дряхлости, имеют повышенный риск негативного прогноза от переломов, случайных падений, инвалидности, сопутствующих заболеваний 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 дряхлости, чаще имеют более высокие расходы на здравоохранение (Id.)

Общие симптомы дряхлости можно определить с помощью определенных видов исследований. Например, непреднамеренная потеря массы включает потерю по меньшей мере 10 фунтов или более чем 5% от массы тела в предыдущем году; слабость мышц может быть определена путем снижения силы захвата на 20% от исходного уровня (с учетом пола и индекса массы тела); физическая медлительность может быть основана на времени, необходимом, чтобы пройти расстояние в 15 футов; слабая выносливость может быть определена путем самостоятельного предоставления индивидом данных об истощении; а низкая физическая активность может быть измерена с использованием стандартизированного вопросника (Z. Palace et al., *The Frailty Syndrome, Today's Geriatric Medicine* 7(1), at 18 (2014)).

В некоторых вариантах осуществления представленные способы и композиции находят применение в замедлении прогрессирования возрастного когнитивного, двигательного, нейровоспалительного или другого возрастного нарушения или патологического состояния. Другими словами, когнитивные, двигательные, нейровоспалительные или другие способности или состояния индивида будут снижаться более медленно после лечения с помощью описанных способов, чем до или в отсутствие лечения с помощью описанных способов. В некоторых таких случаях рассматриваемые способы лечения включают измерение прогрессирования снижения когнитивных, двигательных, нейровоспалительных или других возрастных способностей или симптомов после лечения, а также определение того, что уменьшается прогрессирование снижения. В некоторых таких случаях определение производят путем сравнения с эталоном, например, скоростью снижения у индивида до лечения, например, определенной путем измерения когнитивных, двигательных, нейровоспалительных или других возрастных способностей или состояний для двух или более моментов времени перед введением препарата крови согласно данному изобретению.

Способы и композиции согласно данному изобретению также находят применение в стабилизации когнитивных, двигательных, нейровоспалительных или других способностей или состояний у индивида, например индивида, страдающего от возрастного когнитивного расстройства, или индивида, подверженного риску возрастного когнитивного расстройства. Например, индивид может демонстрировать некоторые возрастные когнитивные нарушения, а прогрессирование когнитивных нарушений, наблюдаемое перед лечением описанными способами, будет приостановлено после лечения с помощью описанных способов. В качестве другого примера, индивид может иметь риск развития возрастного когнитивного нарушения (например, человек может быть в возрасте 50 лет или старше, или, возможно, ему был поставлен диагноз возрастного расстройства), а когнитивные способности индивида остаются по существу неизменными, то есть снижение когнитивной способности невозможно обнаружить, после лечения с помощью описанных способов, по сравнению с состоянием до лечения с помощью описанных способов.

Способы и композиции согласно данному изобретению также находят применение в снижении когнитивных, двигательных, нейровоспалительных или других возрастных повреждений у индивида, страдающего от возрастного расстройства. Другими словами, после лечения способами согласно данному изобретению у индивида происходит улучшение нарушенной способности. Например, когнитивные или двигательные способности у индивида повышаются, например, в 2 раза или более, 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, в том числе в 50 раз или более, в 60 раз или более, в 70 раз или более, в 80 раз или более, 90 раз или более или 100 раз или более или более, после лечения с помощью способов согласно данному изобретению по сравнению с когнитивной или двигательной способностью, наблюдаемой у индивида до лечения с помощью способов по данному изобретению.

В некоторых случаях лечение с помощью способов и композиций по данному изобретению восстанавливает когнитивную, двигательную или другие способности у индивида, страдающего от возрастного когнитивного или двигательного нарушения, например, до их уровня, когда человек был в возрасте около 40 лет или меньше. Другими словами, когнитивная или двигательная недостаточность аннулируются. Способы диагностики и мониторинга в отношении улучшения.

13. В некоторых случаях среди различных способов диагностики и мониторинга прогрессирования заболевания и улучшения при когнитивных заболеваниях, двигательных нарушениях, нейродегенеративных заболеваниях и/или нейровоспалительных заболеваниях, по необходимости, используют следующие виды оценок, отдельно или в сочетании с субъектами, страдающими от нейродегенеративных заболеваний. Следующие виды способов представлены в качестве примеров и не ограничиваются перечисленными способами. Любые удобные способы мониторинга заболевания, по необходимости, могут быть использованы при осуществлении изобретения. Эти способы также предусмотрены в способах по данному изобретению.

а. Общее познание.

Варианты осуществления способов по данному изобретению дополнительно включают способы мониторинга эффекта лекарственного средства или лечения на субъекта, подлежащего лечению когнитивных нарушений и/или возрастной деменции, причем способ включает сравнение когнитивной функции до и после лечения. Специалисты в данной области техники признают, что существуют известные способы оценки когнитивной функции. Для примера, но не в качестве ограничения, способ может вклю-

чать оценку когнитивных функций на основе медицинского анамнеза, семейного анамнеза, физических и неврологических осмотров врачами, специализирующимися на деменции и когнитивных функциях, лабораторных тестов и нейропсихологических оценок. Дополнительные варианты, которые предусмотрены в изобретении, включают оценку сознания, например, с использованием коматозной шкалы Глазго (EMV); экспертизу психического состояния, в том числе сокращенную оценку проверки умственных способностей (AMTS) или минитест умственных способностей (MMSE) (Folstein et al., J. Psychiatr. Res 1975; 12:1289-198); глобальную оценку высших функций; оценку внутричерепного давления, например, путем исследования глазного дна. В одном варианте осуществления мониторинг эффекта когнитивных нарушений и/или возрастной деменции включает улучшение, составляющее 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 баллов, по когнитивной подшкале шкалы оценки тяжести болезни Альцгеймера (ADAS-COG).

В одном варианте осуществления для оценки когнитивной функции могут быть использованы исследования периферической нервной системы, включая любое из следующего: ощущение запаха, поле зрения и остроту зрения, движения глаз и зрачков (симпатические и парасимпатические), сенсорную функцию лица, прочность мимических мышц и мышц плечевого пояса, слух, вкус, фарингальное движение и рефлекс, движения языка, которые могут быть исследованы по отдельности (например, острота зрения может быть проверена с помощью диаграммы Snellen; неврологический молоток может быть использован для проверки рефлексов, включая жевательные рефлекс, рефлекс сухожилий бицепса и трицепса, коленного сухожилия, ахиллов рефлекс и подошвенный рефлекс (т.е. рефлекс Бабинского), силу мышц часто по шкале MRC 1-5; мышечный тонус и признаки ригидности.

b. Болезнь Паркинсона.

Варианты осуществления способов по данному изобретению дополнительно включают способы мониторинга эффекта лекарственного средства или лечения на субъекта, подлежащего лечению двигательных нарушений, причем способ включает сравнение двигательной функции до и после лечения. Специалисты в данной области техники признают, что существуют известные способы оценки двигательной функции. Для примера, но не в качестве ограничения, способ может включать оценку двигательной функции на основе медицинского анамнеза, семейного анамнеза, физических и неврологических осмотров врачами, специализирующимися на нейродегенерации и двигательных нарушениях, лабораторных тестов и нейродегенеративных оценок. Дополнительные варианты осуществления, подразумеваемые в изобретении, включают работу с оценочными шкалами, обсуждаемыми ниже.

Несколько оценочных шкал были использованы для оценки прогрессирования БП. Наиболее широко используемые шкалы включают унифицированную шкалу оценки симптомов болезни Паркинсона (UPDRS, которая была введена в 1987 г.) (J. Rehabil Res. Dev., 2012 49(8): 1269-76) и шкалу Хена и Яру (Neurology, 1967 17(5): 427-42). Дополнительные шкалы включают шкалу UPDRS, улучшенную международным обществом изучения двигательных расстройств (MDS) (MDS-UPDRS), а также шкалу повседневной активности Шваба и Ингланда (ADL).

В шкале UPDRS оценивается 31 пункт, которые составляют три подшкалы: (1) ментальность, поведение и настроение; (2) ежедневные занятия и (3) оценка двигательной активности. Шкала Хена и Яру делит БП на пять стадий с дискретными подстадиями: 0 - нет признаков заболевания; 1 - симптомы только с одной стороны; 1,5 - симптомы с одной стороны, но с вовлечением шеи и позвоночника; 2 - симптомы с обеих сторон без каких-либо нарушений баланса; 2,5 - легкие симптомы с обеих сторон с восстановлением при выполнении теста на устойчивость; 3 - нарушение баланса со степенью заболевания от легкой до умеренной; 4 - тяжелая инвалидность, но с сохранением способности ходить или стоять без посторонней помощи; и 5 - потребность в коляске или прикованность к постели без посторонней помощи. Шкала повседневной активности Шваба и Ингланда классифицирует БП в процентах (от 100% - полная независимость до 10% - полная зависимость).

Общая двигательная функция может быть оценена с помощью широко используемых шкал, в том числе и общей шкалы двигательных функций (GMF). По ней оценивают три компонента: зависимость, боль и неуверенность (Aberg A.C., et al (2003) Disabil. Rehabil. 2003 May 6;25(9):462-72.). Двигательная функция также может быть оценена с помощью домашнего мониторинга или носимых датчиков. Например, походка (скорость локомоции, изменчивость, ригидность ног) может быть измерена акселерометром; поза (наклон туловища) - гироскопом; движение ног - акселерометром; движение рук - акселерометром и гироскопом; тремор (амплитуда, частота, длительность, асимметрия) - акселерометром; падение - акселерометром; заторможенность походки - акселерометром; дискинезия - акселерометром, гироскопом и инерциальными датчиками; брадикинезия (продолжительность и частоту) - акселерометром плюс гироскопом, а афазия (наклон) - микрофоном (Pastorino M., et al., Journal of Physics: Conference Series 450 (2013) 012055).

c. Рассеянный склероз.

В дополнении к мониторингу в отношении улучшения симптомов, связанных с познанием, прогрессирование или улучшение нейродегенерации, связанной с рассеянным склерозом (РС), можно отслеживать с использованием методов, хорошо известных специалистам в данной области техники. В качестве примера, но не ограничения, мониторинг может осуществляться с помощью таких методов, как: мониторинг цереброспинальной жидкости (ЦСЖ); магнитно-резонансная томография (МРТ) для обна-

ружения повреждений и развития демиелинизирующих бляшек; исследование вызванных потенциалов; и мониторинг походки.

Анализ ЦСЖ может быть выполнен, например, путем люмбальной пункции, чтобы получить давление, внешний вид и содержание ЦСЖ. Нормальные значения обычно находятся в следующем диапазоне: давление (70-180 мм H₂O); внешний вид прозрачный и бесцветный; общий белок (15-60 мг/100 мл); IgG составляет 3-12% от общего белка; глюкоза 50-80 мг/100 мл; число клеток 0-5 лимфоцитов и отсутствие эритроцитов; хлорид (110-125 мЭкв/л). Аномальные результаты могут указывать на присутствие или прогрессирование рассеянного склероза.

МРТ является другим методом, который может быть выполнен, чтобы отслеживать прогрессирование и улучшение заболевания. Типичные критерии для мониторинга РС с помощью МРТ включают внешний вид неоднородных областей аномального белого вещества в полушарии головного мозга и в паравентрикулярных областях, присутствие поражений в мозжечке и/или стволе мозга, а также в шейных или грудных отделах спинного мозга.

Вызванные потенциалы могут быть использованы для мониторинга прогрессирования и улучшения РС у субъектов. Вызванные потенциалы измеряют замедление электрических импульсов, например, в визуальном вызванном ответе (VER), слуховых вызванных ответах в стволе мозга BAER) и соматосенсорных вызванных ответах (SSER). Аномальные ответы помогают определить наличие снижения скорости проводимости в центральных сенсорных путях.

Мониторинг походки также может быть использован для контроля прогрессирования и улучшения заболевания у субъектов с РС. РС часто сопровождается нарушениями подвижности и аномальной походкой частично из-за усталости. Мониторинг может быть выполнен, например, с использованием мобильных устройств мониторинга, носимых субъектами (Moon, Y., et al., Monitoring gait in multiple sclerosis with novel wearable motion sensors, PLOS One, 12(2):e0171346 (2017)).

d. Болезнь Хантингтона.

В дополнении к мониторингу в отношении улучшения симптомов, связанных с познанием, прогрессирование или улучшение нейродегенерации, связанной с болезнью Хантингтона (БХ), можно отслеживать с использованием методов, хорошо известных специалистам в данной области техники. В качестве примера, но не ограничения, мониторинг может осуществляться с помощью таких методов, как: двигательная функция; поведение; функциональная оценка; и визуализация.

Примеры двигательной функции, которые могут отслеживаться как показатель прогрессирования или улучшения заболевания, включают хорею и дистонию, ригидность, брадикинезию, глазодвигательную дисфункцию, а также изменения походки/баланса. Методики проведения мониторинга этих показателей хорошо известны специалистам в данной области техники (см. Tang C., et al., Monitoring Huntington's disease progression through preclinical and early stages, Neurodegener Dis Manag 2(4):421-35 (2012)).

Психиатрические эффекты БХ предоставляют возможности для мониторинга прогрессирования и улучшения заболевания. Например, можно проводить психиатрическую диагностику для того, чтобы определить, страдает ли субъект от депрессии, раздражительности, возбуждения, тревоги, апатии и психоза с паранойей (Id.)

Функциональная оценка также может быть использована для мониторинга прогрессирования или улучшения заболевания. Были представлены методы оценки общей функциональности (Id.), причем оценка часто снижается на один пункт в год в некоторых группах БХ.

МРТ или ПЭТ также могут быть использованы для мониторинга прогрессирования или улучшения заболевания. Например, при БХ наблюдается потеря нейронов стриарного отростка, а изменение числа этих нейронов может отслеживаться у субъектов. Методики для определения изменения нейронов у субъектов с БХ включают визуализацию связывания рецептора дофамина D2 (Id.)

e. ALS.

В дополнении к мониторингу в отношении улучшения симптомов, связанных с познанием, прогрессирование или улучшение нейродегенерации, связанной амиотрофическим боковым склерозом (АБС), можно отслеживать с использованием методов, хорошо известных специалистам в данной области техники. В качестве примера, но не ограничения, мониторинг может осуществляться с помощью таких методов, как: функциональная оценка; определение мышечной силы; измерение функции дыхания; измерение потери нижнего двигательного нейрона (LMN); и измерение дисфункции верхнего двигательного нейрона (UMN).

Функциональная оценка может быть выполнена с использованием функциональной шкалы, хорошо известной специалистам в данной области техники, такой как функциональная шкала оценки АБС (ALSFRS-R), которая оценивает симптомы, связанные с бульбарной, лимбической и дыхательной функцией. Скорость изменения полезна для прогнозирования выживаемости, а также прогрессирования или улучшения заболевания. Другая мера включает в себя Комбинированную оценку функции и выживаемости (CAFS), ранжирование клинических результатов субъектов путем объединения времени выживаемости с изменением ALSFRS-R (Simon N.G., et al., Quantifying Disease Progression in Amyotrophic Lateral Sclerosis, Ann Neural 76:643-57 (2014)).

Мышечная сила может быть исследована и количественно оценена посредством использования

оценки мануального мышечного тестирования (ММТ). Это подразумевает усреднение измерений, полученных для нескольких групп мышц, с использованием шкалы классификации мышечной силы совета медицинских исследований (MRC) (Id.) Ручная динамометрия (ННД) также может быть использована, среди других методов (Id.)

Дыхательная функция может быть измерена с использованием портативных устройств спирометрии, используемой для получения форсированной жизненной емкости (FVC) на исходном уровне, чтобы предсказать прогрессирование или улучшение заболевания. Кроме того, максимальное давление вдоха, носовое давление вдоха (SNIP) и FVC во время еды могут быть определены и использованы для мониторинга прогрессирования/улучшения заболевания (Id.)

Потеря нижних двигательных нейронов является другим показателем, который может быть использован для мониторинга прогрессирования или улучшения заболевания АБС. Нейрофизиологический индекс может быть определен путем измерения электрически вызванного ответа мышц (СМАР) в исследованиях проводимости двигательного нерва, параметры которых включают амплитуду СМАР и частоту F-волны (Id. and de Carvalho M., et al., Nerve conduction studies in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 23:344-352, (2000)). Также может быть оценено количество нижних двигательных нейронов (MUNE). В MUNE оценивают количество остаточных двигательных аксонов, обслуживающих мышцу, посредством оценки вклада отдельных двигательных единиц в максимальный ответ СМАР, и используют для определения прогрессирования или улучшения заболевания (Simon N.G., et al., ранее). Дополнительные методы для определения потери LMN включают тестирование нервной возбудимости, электрическую импедансную монографию и применение ультразвука к мышцам, чтобы обнаружить изменения толщины мышц.

Дисфункция верхних двигательных нейронов является другим показателем, который может быть использован для мониторинга прогрессирования или улучшения заболевания АБС. Методы определения дисфункции включают выполнение МРТ или ПЭТ-сканирования головного мозга и спинного мозга, транскраниальной магнитной стимуляции; и определение уровней биомаркеров в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ).

f. Глаукома.

В дополнении к мониторингу в отношении улучшения симптомов, связанных с познанием, прогрессирование или улучшение нейродегенерации, связанной с глаукомой, можно отслеживать с использованием методов, хорошо известных специалистам в данной области техники. В качестве примера, но не ограничения, мониторинг может осуществляться с помощью таких методов, как определение внутриглазного давления; оценка диска зрительного нерва или головки зрительного нерва в отношении ущерба; тестирование поле зрения на периферическую потерю зрения; и визуализация диска зрительного нерва и сетчатки для топографического анализа.

g. Прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП).

В дополнении к мониторингу в отношении улучшения симптомов, связанных с познанием, прогрессирование или улучшение нейродегенерации, связанной с прогрессирующим надъядерным параличом (ПНП), можно отслеживать с использованием методов, хорошо известных специалистам в данной области техники. В качестве примера, но не ограничения, мониторинг может осуществляться с помощью таких методов, как: функциональная оценка (повседневной деятельности или ADL); оценка двигательных функций; определение психиатрических симптомов; и объемная и функциональная магнитно-резонансная томография (МРТ).

Уровень функции субъекта с точкой зрения независимости, частичной зависимости от других или полной зависимости может быть полезен для определения прогрессирования или улучшения заболевания (см. Duff, K., et al., Functional impairment in progressive supranuclear palsy, *Neurology* 80:380-84, (2013)). Рейтинговая шкала прогрессирующего надъядерного паралича (PSPRS) является рейтинговой шкалой, которая содержит двадцать восемь показателей в шести категориях: повседневная деятельность (по истории); поведение; бульбарная, глазная двигательная функция, лимбическая двигательная и походка/промежуточная функция. Результат представляет собой балл в диапазоне 0-100. Шесть пунктов оценивали в 0-2, а двадцать два пункта оценивали в 0-4 при возможной общей оценке 100. Баллы PSPRS являются практическими показателями и надежными прогностическими параметрами выживаемости пациентов. Они также чувствительны к прогрессированию заболевания и полезны для мониторинга прогрессирования или улучшения заболевания (Golbe L.I., et al., A clinical rating scale for progressive supranuclear palsy, *Brain* 130:1552-65, (2007)).

Раздел ADL из UPDRS (унифицированной шкалы оценки симптомов болезни Паркинсона) также может быть использован для количественного определения функциональной активности у пациентов с ПНП (Duff K., et al., ранее). Кроме того, шкала повседневной активности Шваба и Ингланда (SE-ADL) может быть использована для оценки независимости (Id.) Кроме того, разделы двигательной функции UPDRS полезны в качестве надежного измерения для оценки прогрессирования заболевания у пациентов с ПНП. Двигательный раздел может содержать, например, 27 различных показателей для количественной оценки двигательной функции у пациентов с ПНП. Примеры включают тремор в покое, ригидность, постукивание пальцем, осанку и походку). Прогрессирование или улучшение заболевания у субъекта может быть также оценено путем выполнения нейропсихологической оценки на исходном уровне, про-

веденной обученным медицинским персоналом, оценки с использованием нейропсихиатрического опросника (NPI), чтобы определить частоту и тяжесть нарушений поведения (например, бред, галлюцинации, возбуждение, депрессию, беспокойство, эйфорию, апатию, расторможенность, раздражительность и аберрантное двигательное поведение).

Функциональная МРТ (фМРТ) может быть использована для мониторинга прогрессирования или улучшения заболевания. фМРТ представляет собой метод с использованием МРТ для измерения изменений активности головного мозга в определенных областях мозга, как правило, на основе кровотока в этих регионах. Считается, что кровотоки коррелируют с активацией области мозга. Пациенты с нейродегенеративным расстройством, таким как ПНП, могут быть подвергнуты физическим или психическим испытаниям до или во время сканирования в сканере МРТ. В качестве примера, но не ограничения, тесты могут представлять собой устоявшуюся парадигму управления силой, когда пациентов просят произвести усилие рукой, наиболее пораженной ПНП, и измеряют максимальное произвольное сокращение (MVC) с помощью фМРТ сразу после выполнения теста. Burciu, R.G., et al., *Distinct patterns of brain activity in progressive supranuclear palsy and Parkinson's disease*, *Mov. Disord.* 30(9):1248-58 (2015)).

Объемная МРТ представляет собой метод, в котором МРТ-сканеры определяют различия в объеме области мозга. Это может быть сделано, например, путем контрастирования различных расстройств, или путем определения различий в объеме области мозга у пациента с течением времени. Объемная МРТ может быть использована для определения прогрессирования или улучшения заболевания при нейродегенеративных расстройствах, таких как ПНП. Методика хорошо известна специалистам в данной области техники (Messina D., et al., *Patterns of brain atrophy in Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy, Parkinsonism and Related Disorders*, 17(3):172-76 (2011)). Примеры областей мозга, которые могут быть измерены, включают, но не ограничиваются этим, внутричерепной объем, кору головного мозга, кору мозжечка, таламус, хвостатое ядро, скорлупу, паллидум, гиппокамп, миндалины, боковые желудочки, третий желудочек, четвертый желудочек и ствол головного мозга.

h. Нейрогенез.

Данное изобретение также предполагает лечение или улучшение нейрогенеза у субъекта со снижением или нарушением нейрогенеза, которое может проявиться, например, посредством снижения когнитивной или двигательной функции, или посредством связи с нейровоспалением. Вариант осуществления данного изобретения включает введение, в качестве примера, но не ограничения, плазмы крови, фракции плазмы или PPF субъекту со сниженным или нарушенным нейрогенезом с использованием схемы прерывистого применения.

Вариант осуществления данного изобретения также предусматривает определение уровня нейрогенеза до, во время и/или после введения плазмы крови, фракции плазмы или PPF. Сообщалось о неинвазивных методах оценки нейрогенеза (Tamura Y. et al., *J. Neurosci* (2016) 36(31):8123-31). Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), используемая с индикатором, [18F] FLT, в комбинации с ингибитором транспортера ГЭБ пробенецидом, делает возможным накопление индикатора в нейрогенных областях головного мозга. Такая визуализация позволяет провести оценку нейрогенеза у пациентов, которым проводят лечение нейродегенеративных заболеваний.

i. Нейровоспаление.

Данное изобретение также предполагает лечение или улучшение нейровоспаления у субъекта с повышенным нейровоспалением, которое может проявиться, например, посредством снижения когнитивной или двигательной функции, или посредством связи с нейрогенезом или нейродегенерацией. Вариант осуществления данного изобретения включает введение, в качестве примера, но не ограничения, плазмы крови, фракции плазмы или PPF субъекту с нейровоспалением с использованием схемы прерывистого применения.

Вариант осуществления данного изобретения также предусматривает определение уровня нейровоспаления до, во время и/или после введения плазмы крови, фракции плазмы или PPF. Сообщалось о неинвазивных методах оценки нейровоспаления, таких как TSPO позитронно-эмиссионная томография (TSPO PET) с использованием ¹¹C-PK11195 и других подобных индикаторов (см. Vivash L., et al., *J. Nucl. Med.* 2016, 57:165-68 и Janssen B., et al., *Biochim. et Biophys. Acta*, 2016, 425-41, включенные в данный документ в качестве ссылки). Инвазивные методы оценки нейровоспаления включают извлечение спинномозговой жидкости и обнаружение, например, уровней экспрессии нейровоспалительных маркеров или факторов, таких как (но не ограничиваясь этим) простагландин E2, циклооксигеназа-2, ФНО-альфа, ИЛ-6, ИФН-гамма, ИЛ-10, эотаксин, бета-2 микроглобулин, ФРЭС, нейротрофический фактор, полученный из глиальной линии клеток, хиотриозидаза-1, ММР-9, мотива СХС хемокина 13, комплекс терминальных фрагментов системы комплемента, хитиназа-3-подобный белок 1 и остеоопонтин (см. Vinther-Jensen T., et al., *Nerul Neurimmunol Neuroinflamm*, 2016, 3(6): e287 и Mishra et al., *J. Neuroinflamm.*, 2017, 14:251, включенные в данный документ в качестве ссылки).

14. Комбинация стволовых клеток и терапия с использованием схемы прерывистого применения.

Вариант осуществления изобретения включает лечение субъекта, у которого диагностировали когнитивное нарушение, нарушение двигательной функции, нейровоспаление или снижение нейрогенеза, путем введения субъекту эффективного количества плазмы крови или фракции плазмы в случае субъекта, который проходит, будет проходить или прошел терапию стволовыми клетками. Другой вариант

осуществления изобретения включает введение субъекту эффективного количества плазмы крови или фракции плазмы, при этом субъект проходит, будет проходить, или прошел терапию стволовыми клетками, и при этом используемые в терапии стволовые клетки могут представлять собой эмбриональные стволовые клетки, не эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК), стволовые клетки пуповинной крови, стволовые клетки амниотической жидкости и тому подобное.

Терапия стволовыми клетками и методы для выполнения такой терапии известны специалистам в данной области техники (Andres R.H., et al., Brain 2011, 134; 1777-89; Daadi M.M., et al., Cell Transplant 2013, 22(5):881-92; Horie N., et al., Stem Cells 2011 29(2):doi: 10.1002/stem.584; Thomsen G.M., et al., Stem Cells 2018, doi: 10.1002/stem.2825; заявки на патент США №№ 09/973198; 12/258210; 12/596884 и 13/290439, все из которых включены в данное описание посредством ссылки). Другой вариант осуществления включает лечение субъекта, у которого диагностировали травматическое повреждение спинного мозга, инсульт, заболевания сетчатки, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, нарушение слуха, болезнь сердца, ревматоидный артрит или тяжелые ожоги, или который нуждается в пересадке костного мозга, при этом субъект проходит, будет проходить или прошел терапию стволовыми клетками, эффективным количеством плазмы крови или фракции плазмы.

15. Способы скрининга композиций.

Также предложены способы скрининга композиций в отношении активности в лечении когнитивных или двигательных нарушений, снижении нейровоспаления или повышении нейрогенеза. Такие способы предусмотрены в данном изобретении и включают способы, описанные в экспериментальных примерах, приведенных ниже. Композиции, которые могут быть подвергнуты скринингу в вариантах осуществления данного изобретения, включают: биологические композиции (например, белки, комбинации белков, антитела, низкомолекулярные антагонисты); фракции плазмы или другие композиции крови. Результаты, полученные способами скрининга композиций, включают, но не ограничиваются этим: результаты наличия воспаления/маркеров воспаления в гиппокампе (например, зубчатой извилине) или других областях ЦНС; результаты пролиферации клеток в гиппокампе или других областях ЦНС; выживаемость клеток в гиппокампе или других областях ЦНС; направление развития клеток (например, астроцитов, новых нейронов) пролиферирующих клеток-предшественников нейронов (NPC) в гиппокампе или других областях ЦНС; и нейрогенез в гиппокампе или других областях ЦНС.

Дополнительные варианты методов скрининга композиций на активность в лечении когнитивного или двигательного нарушения, снижения нейровоспаления или повышения нейрогенеза включают определение острых эффектов композиций на воспаление гиппокампа и пролиферацию, включающее: осуществление 5-7 последовательных ежедневных доз БДУ с одновременным введением в течение 5-7 последовательных суток композиции, скрининг которой проводят, или контроля (прерывистое применение) у грызунов или в другой животной модели. В срок до 10 суток (т.е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 суток) после завершения прерывистой схемы применения композиции, скрининг которой проводят, определяют количество клеток в зубчатой извилине по окрашиванию БДУ, и определяют процент площади с окрашиванием CD-68 (показатель воспаления).

Другой вариант осуществления методов скрининга композиций на активность в лечении когнитивного или двигательного нарушения, снижении нейровоспаления или повышении нейрогенеза включает введение БДУ в течение 5 последовательных суток (раз в сутки) до начала схемы прерывистого применения в течение 5-7 суток композиции, скрининг которой проводят, или контроля у грызунов или в другой животной модели. Спустя четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или двенадцать недель определяют выживаемость клеток гиппокампа как число клеток в зубчатой извилине, окрашенных БДУ, нейрогенез определяют как число клеток в зубчатой извилине, окрашенных даблкортином (DCX), а направление развития клеток-предшественников нейронов, которые становились астроцитами (ассоциированными со старением) или нейронами (не ассоциированными со старением), определяют путем колокализации БДУ с маркерами GFAP или Neun соответственно.

Другой вариант осуществления методов скрининга композиций на активность в лечении когнитивных или двигательных нарушений, снижении нейровоспаления или повышении нейрогенеза включает введение БДУ и композиции, скрининг которой проводят, или контроля одновременно (и ежедневно) в течение 5-7 суток и последующее определение степени нейрогенеза по окрашиванию DCX в гиппокампе или направления клеточного развития пролиферирующих NPC, как описано выше.

Другой вариант осуществления методов скрининга композиций на активность в лечении когнитивных или двигательных нарушений, снижении нейровоспаления или повышении нейрогенеза включают введение по схеме прерывистого применения композиции, скрининг которой проводят, или контроля и определение улучшения когнитивной или двигательной функции у грызунов или в другой животной модели, как описано в приведенных ниже примерах.

16. Реагенты, устройства и наборы.

Также предложены реагенты, устройства и наборы для практической реализации одного или более из описанных выше способов. Рассматриваемые реагенты, устройства и наборы могут сильно различаться.

Реагенты и устройства, представляющие интерес, включают упомянутые выше в отношении способов получения препаратов крови, содержащих плазму, для переливания субъекту, нуждающемуся в этом,

например антикоагулянты, криоконсерванты, буферы, изотонические растворы и т.д.

Наборы могут также включать пакеты для сбора крови, трубки, иглы, центрифужные пробирки и т.п. В других вариантах осуществления наборы, описанные в данном документе, содержат два или более контейнеров препаратов плазмы крови, таких как фракции белка плазмы, например три или более, четыре или более, пять или более, в том числе шесть или более контейнеров препарата плазмы крови. В некоторых случаях число различных контейнеров препарата плазмы крови в комплекте может быть 9 или более, 12 или более, 15 или более, 18 или более, 21 или более, 24 или более, 30 и более, в том числе 36 или более, например 48 или более. Каждый контейнер может быть связан с идентификационной информацией, которая включает различные данные о препарате плазмы крови, содержащемся в контейнере, причем идентификационная информация может включать одно или более из возраста донора препарата плазмы крови, подробных данных об обработке препарата плазмы крови, например, был ли препарат плазмы обработан для удаления белков выше средней массы молекулы (например, как описано выше), подробных данных о типе крови и т.д. В некоторых случаях каждый контейнер в наборе содержит идентификационную информацию о плазме крови, содержащейся в нем, а идентификационная информация включает информацию о возрасте донора препарата плазмы крови, например идентификационная информация обеспечивает подтверждения данных о возрасте донора препарата плазмы крови (например, идентификационная информация может представлять собой возраст донора в момент забора крови). В некоторых случаях каждый контейнер из набора содержит препарат плазмы крови от донора практически того же возраста, то есть все контейнеры содержат препарат от доноров, которые являются практически одного, если не одного, возраста. Под практически таким же возрастом подразумевается, что возраст различных доноров, от которых получают препараты плазмы крови для наборов, отличается в некоторых случаях на 5 лет или менее, например 4 года или менее, например 3 года или менее, в том числе 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, например в виде этикетки, чип RFID и т.д., идентификационная информация может быть предназначенной для чтения человеком, машиночитаемой, и т.д. Контейнеры могут иметь любую удобную конфигурацию. В то время как объем контейнеров может варьироваться, в некоторых случаях объемы находятся в диапазоне от 10 до 5000 мл, например от 25 до 2500 мл, например, от 50 до 1000 мл, в том числе от 100 до 500 мл. Контейнеры могут быть жесткими или гибкими и могут быть изготовлены из любого удобного материала, например полимерных материалов, в том числе пластиковых материалов медицинского класса. В некоторых случаях контейнеры имеют конфигурацию пакета или мешка. В дополнении к контейнерам, такие наборы могут дополнительно содержать устройство введения, например, как описано выше. Компоненты таких наборов могут быть предоставлены в любой подходящей упаковке, например коробке или аналогичной структуре, выполненной с возможностью удержания контейнера и других компонентов набора.

В дополнение к вышеуказанным компонентам, наборы по данному изобретению могут дополнительно содержать инструкции для осуществления способов согласно данному изобретению. Эти инструкции могут присутствовать в наборах согласно данному изобретению в различных формах, одна или более из которых могут присутствовать в наборе. Одна из форм, в которых эти инструкции могут присутствовать, представляет собой печатную информацию на соответствующем носителе или материале, например листе или листах бумаги, на которых напечатана информация, в упаковке набора, во вкладыше, и т.д. Другое средство будет представлять собой машиночитаемый носитель, например дискету, CD, портативный флэш-накопитель, и т.д., на котором была записана информация. Еще одним средством, которое может присутствовать, является адрес веб-сайта, который может быть использован в сети Интернет, чтобы получить доступ к информации на удаленном сайте. Любые удобные средства могут присутствовать в наборах.

17. Упражнение.

Упражнение можно охарактеризовать аэробной или анаэробной активностью, и оно может включать активность по сжиганию большого количества калорий и активность по сжиганию умеренного количества калорий. Упражнение может включать силовые тренировки (например, упражнения с весом или изометрические упражнения). Упражнение также может включать, например, бег, езду на велосипеде, ходьбу, танцы, походы, плавание, йогу, тай-чи, упражнения на баланс, сгибание ног, прыжки через скакалку, серфинг, греблю, вращение или сгибание рук или ног, садоводство, уборку, активные игры, такие как боулинг, аэробика, пилатес и боевые искусства.

Схема упражнений может включать выполнение одного упражнения с определенной частотой, или комбинации упражнений с определенной частотой. Частота может составлять один, два, три, четыре, пять, шесть или семь раз в неделю. Частота может изменяться от недели к неделе. Схема упражнений может оставаться на том же уровне интенсивности и/или частоты, которые субъект практиковал до введения композиций по изобретению. Схема упражнений также может быть на более высоком уровне интенсивности и/или частоты по сравнению с уровнями, которые субъект практиковал до введения композиций по изобретению. Схема упражнений может быть предложена или предписана специалистом здравоохранения или фитнес-тренером, или схема упражнений может быть инициирована самим субъектом.

18. Экспериментальные примеры.

а. Пример 1.

Осветленную плазму молодого человека (молодая плазма) или имеющуюся в продаже PPF ("PPF1") вводили старым мышам с ослабленным иммунитетом (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1 Wj1/SzJ, линия "NSG"). PPF1 представляет собой PPF с приблизительно 88% нормального альбумина человека (по отношению к общему количеству белка), 12% альфа- и бета-глобулинов и не более 1% гамма-глобулина, что определено с помощью электрофореза. За исключением особо оговоренных случаев, PPF1 вводят в примерах в данном документе в естественных условиях с использованием 5% раствора (мас./об., 50 г/л). Все мыши были распределены между группами лечения по 4 различным критериям: оценка гнездования в домашней клетке, начальная масса тела, расстояние, пройденное в тесте "открытого поля", и % времени, проведенный в центре открытого поля. После определения группы мышам вводили внутривенно (в/в) препарат БДУ (5-бром-2'-дезоксисуридин) в ФСБ (фосфатный буферный солевой раствор) при конечной концентрации, равной 10 мг/мл, дозированный по 150 мг/кг в течение 5 суток. Вслед за этим мышам вводили внутривенно (в/в) 3 раза в неделю 150 мкл PPF1 в течение 4 недель. Тестирование поведения проводили на 5 и 6 неделю, когда мыши получали 2 инъекции в неделю, чтобы избежать инъекций во время дней одновременного исследования. Мыши были умерщвлены через 24 ч после последней в/в инъекции, получив в общей сложности 16 инъекций в течение 6 недель. Двум дополнительным когортам мышей вводили внутривенно (в/в) в течение семи суток подряд 150 мкл PPF1 или физиологического раствора (прерывистое применение). Тестирование поведения проводили на 5 и 6 неделю в то же самое время, что и в группе по 3 раза в неделю.

Анализ поведения были проанализированы с использованием программного обеспечения CleverSys (Рестон, штат Вирджиния). CleverSys TopScan V3.0 использовали для отслеживания поведения мыши в нулевом лабиринте, лабиринте Барнеса, открытом поле и Y-лабиринте. Лабиринты Барнеса были построены CleverSys. Измеритель силы захвата был разработан и произведен Columbus Instruments (Колумбус, штат Огайо). Y-лабиринт и камеры открытого поля были построены в соответствии со спецификациями San Diego Instruments (Сан-Диего, штат Калифорния). Гистологический анализ срезов гиппокампа выполняли на микроскопе Leica (Буффало Гроув, штат Иллинойс) модели DM5500B с цветной камерой DCF7000T светлопольного/флуоресцентного микроскопа.

Тест поведения.

На фиг. 1A показано, что группы, которым прерывисто вводили PPF1, демонстрировали тенденцию к увеличению расстояния, пройденного в тесте открытого поля, по сравнению как с контрольной группой физиологического раствора, так и группой, получавшей PPF1 три раза в неделю. Этот результат указывает на тенденцию к увеличению подвижности в группе с прерывистым введением. На фиг. 1B показано, что группы, которым прерывисто вводили PPF1, демонстрировали тенденцию к увеличению процента времени, проведенного в центре открытого поля, по сравнению как с контрольной группой физиологического раствора, так и группой, получавшей PPF1 три раза в неделю. Этот результат указывает на тенденцию к снижению тревожности в группе с прерывистым введением.

Масса тела.

Фиг. 2 представляет собой диаграммы влияния PPF1 на массу тела. В обеих группах, получавших PPF1 (посредством прерывистого дозирования или три раза в неделю), не обнаруживалось ни одного отрицательного воздействия от инъекций.

Гистология.

На фиг. 3 представлено количество положительно-меченых DCX клеток в гранулярном слое зубчатой извилины. Наблюдалось значительное повышение нейрогенеза между группой, получавшей прерывистое дозирование PPF1, по сравнению с группой, получавшей лечение три раза в неделю, и группой физиологического раствора. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. $**P < 0,01$ однофакторный ANOVA (дисперсионный анализ) с апостериорным анализом множественного сравнения Даннетта (n: солевой раствор = 8, прерывистое применение PPF1 = 10, PPF1 3х/неделя = 10). На фиг. 4 представлено количество положительно-меченых БДУ клеток в гранулярном слое зубчатой извилины трех групп мышей, получавших раздельное лечение. Наблюдалось значительное повышение выживаемости клеток между группой, получавшей прерывистое дозирование PPF1, по сравнению с группой, получавшей лечение три раза в неделю, и группой физиологического раствора. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. $****P < 0.0001$, $* < 0,05$ однофакторный ANOVA (дисперсионный анализ) с апостериорным анализом множественного сравнения Даннетта (n: солевой раствор = 8, прерывистое дозирование PPF1 = 10, PPF1 3х/неделя = 10).

Анализ срезов гиппокампа выполняли на микроскопе Leica (Буффало Гроув, штат Иллинойс) модели DM5500B с цветной камерой DCF7000T светлопольного/флуоресцентного микроскопа. Окрашивание антителом Ki67 Abcam (ab15580) при соотношении 1:500, а вторичное антитело представляло собой антитело козы против антитела кролика (Alex Fluor 555) (ab150090) при соотношении 1:300.

b. Пример 2.

Осветленную плазму молодого человека (МП), плазму старого человека (СП) или имеющуюся в

продаже PPF ("PPF1") вводили старым мышам с ослабленным иммунитетом (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1 Wj1/SzJ, линия "NSG"). Все мыши были распределены между группами лечения по 4 различным критериям: оценка гнездования в домашней клетке, начальная масса тела, расстояние, пройденное в тесте "открытого поля", и % времени, проведенный в центре открытого поля. После определения группы, мышам вводили внутрибрюшинно (в/б) препарат БДУ в ФСБ (фосфатный буферный солевой раствор) при конечной концентрации, равной 10 мг/мл, дозированный по 150 мг/кг в течение 5 суток. Вслед за этим мышам вводили внутривенно (в/в): 1) три раза в неделю в течение 6 недель ("3х/неделя"); 2) три раза в течение одной недели ("3х"); 3) 7 суток в течение одной недели по 150 мкл осветленной плазмы молодого человека или PPF1. Дополнительной группе мышей в прерывистом режиме в/в вводили солевой раствор в течение 7 суток. Последней группе мышей вводили плазму старого человека 3 раза в течение одной недели или 7 суток в течение одной недели. Всех мышей умерщвляли через 6 недель после начала введения молодой или старой плазмы, PPF1 или базового раствора.

Гистология.

На фиг. 5 представлено количество положительно-меченых DCX клеток в гранулярном слое зубчатой извилины у девяти отдельно обработанных групп мышей, которым вводили плазму молодого человека (МП) или плазму старого человека (СП), или PPF1, или солевой раствор. Мыши, получавшие PPF1 посредством прерывистого введения или получавшие лечение три раза в неделю, продемонстрировали повышение нейрогенеза по сравнению с другими группами. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего; * $P < 0.05$, ANOVA с апостериорным анализом Даннетта, введение PPF1 (прерывистое введение или 3х/неделя) и введение солевого раствора (n: солевой р-р = 4, прерывистое введение PPF1 = 5, PPF1 3х/неделя = 5, PPF1 3х = 4, МП прерывистое введение = 6, МП 3х/неделя=6, МП 3х = 4, СП прерывистое введение = 6, СП 3х = 6).

На фиг. 6 представлено количество положительно-меченых БДУ клеток в гранулярном слое зубчатой извилины у девяти отдельно обработанных групп мышей, которым вводили плазму молодого человека (МП) или плазму старого человека (СП), или PPF1, или солевой раствор. Мыши, которым вводили PPF1, продемонстрировали значительное повышение выживаемости клеток по сравнению с другими группами, причем мыши, которым прерывисто вводили PPF1, проявляли большую значительную разницу, чем мыши, которым вводили PPF1 три раза в неделю. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего; ** < 0.01 , * $P < 0.05$, ANOVA с апостериорным анализом Даннетта, введение PPF1 (прерывистое введение или 3х/неделя) и введение солевого раствора (n: солевой р-р = 4, прерывистое введение PPF1 = 5, PPF1 3х/неделя = 5, PPF1 3х = 4, МП прерывистое введение = 6, МП 3х/неделя=6, МП 3х = 4, СП прерывистое введение = 6, СП 3х = 6).

с. Пример 3.

Осветленную плазму молодого человека (МП), плазму старого человека (СП) или имеющуюся в продаже PPF ("PPF1") вводили старым мышам с ослабленным иммунитетом (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1 Wj1/SzJ, линия "NSG"). Мышам вводили 7 ежесуточных внутривенных (в/в) доз в течение 1 недели.

Все мыши были распределены между группами лечения по 4 различным критериям: оценка гнездования в домашней клетке, начальная масса тела, расстояние, пройденное в тесте "открытого поля", и % времени, проведенный в центре открытого поля. После определения группы, мышам вводили внутрибрюшинно (в/б) препарат БДУ в ФСБ (фосфатный буферный солевой раствор) при конечной концентрации, равной 10 мг/мл, дозированный по 150 мг/кг в течение 5 суток. Всем мышам вводили внутривенно (в/в) в течение семи суток подряд (что называется прерывистым применением) 150 мкл плазмы молодого или старого человека, PPF1 или солевого раствора. Через три недели после завершения прерывистого применения мышам вводили внутрибрюшинно (в/б) препарат ЭДУ (5-этил-2'-дезоксидеоксиуридин) в ФСБ (фосфатный буферный солевой раствор) при конечной концентрации, равной 10 мг/мл, дозированный по 30 мг/кг в течение 5 суток. Испытание в лабиринте Барнеса проводил в течение 8 недель (6 недель после окончания прерывистого дозирования).

Анализ поведения были проанализированы с использованием программного обеспечения CleverSys (Рестон, штат Вирджиния). CleverSys TopScan V3.0 использовали для отслеживания поведения мыши в лабиринте Барнеса. Лабиринт Барнеса был построен CleverSys. Анализ срезов гиппокампа выполняли на микроскопе Leica (Буффало Гроув, штат Иллинойс) модели DM5500B с цветной камерой DCF7000T светлопольного/флуоресцентного микроскопа.

Тест поведения.

На фиг. 7 представлена задержка нахождения целевого отверстия на одно испытание в сутки для каждой группы лечения, определенная с помощью лабиринта Барнеса. Мыши, получавшие прерывистое дозирование PPF1, продемонстрировали значительное снижение задержки в испытании для нескольких отдельных сеансов тестирования, что указывает на улучшение когнитивной способности. * $P < 0.05$ среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего; t-критерий для независимых выборок (n: солевой раствор = 13, PPF1 = 13, СП = 14, МП = 14).

Гистология.

На фиг. 8 представлено количество положительно-меченых DCX клеток в гранулярном слое зубчатой

той извилины у четырех отдельно обработанных групп мышей, которым вводили плазму молодого человека (МП) или плазму старого человека (СП), или PPF1, или солевой раствор. Наблюдалось значительное повышение нейрогенеза при прерывистом применении PPF1 и прерывистом применении плазмы молодого человека по сравнению с лечением физиологическим раствором. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего; **** $P < 0,0001$, ** $P < 0,01$, однофакторный ANOVA с апостериорным анализом множественного сравнения Даннетта (n: солевой раствор = 14, PPF1 = 14, СП = 14, МП = 15).

На фиг. 9 представлено количество БДУ-меченых клеток в гранулярном слое зубчатой извилины у мышей, которым вводили плазму молодого человека (МП) или плазму старого человека (СП), или PPF1, или солевой раствор. Наблюдалось значительное повышение выживаемости клеток при прерывистом применении PPF1 и прерывистом применении МП по сравнению с лечением физиологическим раствором. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего; **** $P < 0,0001$; однофакторный ANOVA с апостериорным анализом множественного сравнения Даннетта (n: солевой раствор = 14, PPF1 = 14, СП = 14, МП = 15).

d. Пример 4.

Имеющуюся в продаже PPF ("PPF1") вводили старым мышам с ослабленным иммунитетом (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1 Wj1/SzJ, линия "NSG"). Мышам в возрасте двенадцати месяцев вводили в хвостовую вену 7 ежесуточных внутривенных (в/в) доз в течение 1 недели. После лечения мышей оставляли в условиях своей домашней клетки в течение 4,5 недель до тестирования поведения. Все инъекции и поведенческое тестирование проводили в течение 7 недель для каждой когорты, а общий срок проведения составил 9 недель. Все мыши получали БДУ в/б в течение 5 суток до первого дозирования. Мышей умерщвляли через одни сутки после завершения последнего теста поведения.

Анализы поведения были проанализированы с использованием программного обеспечения CleverSys (Рестон, штат Вирджиния). CleverSys TopScan V3.0 использовали для отслеживания поведения мыши в лабиринте Y.

Тест поведения.

На фиг. 10 приведен процент от общего числа входов, сделанных в знакомое или новое плечо, от общих числа входов, сделанных в каждое плечо группой лечения в испытании Y-лабиринтом. Мышам в возрасте двенадцати месяцев прерывисто вводили солевой раствор, PPF1 или 5x концентрированную PPF1. Мыши, которым прерывисто вводили PPF1 и PPF1 (5x), продемонстрировали значительное увеличение входа в новое плечо по сравнению с количеством входов в новое плечо у мышей, которым вводили солевой раствор, что свидетельствует об улучшении когнитивной способности. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. * $P < 0,05$, парный t-критерий.

На фиг. 11 представлено соотношение количества входов в новое плечо по сравнению со знакомым плечом Y-лабиринта для каждой группы лечения. Мышам в возрасте двенадцати месяцев прерывисто вводили солевой раствор, PPF1 или 5x концентрированную PPF1. Мыши, которым прерывисто вводили PPF1 и PPF1 (5x), продемонстрировали тенденцию к увеличению вхождения в новое плечо по сравнению с мышами, которым вводили физиологический раствор. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего.

Гистология.

На фиг. 12 представлено количество положительно-меченых БДУ клеток во всех срезах гиппокампа. Мыши, которым прерывисто вводили PPF1, продемонстрировали тенденцию к повышению выживаемости клеток по сравнению с мышами, которым вводили солевой раствор и PPF1 (5x). Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего.

На фиг. 13 представлено количество положительно-меченых DCX клеток в срезах всего гиппокампа. Мыши, которым прерывисто вводили PPF1 и PPF1 (5x), продемонстрировали тенденцию к повышению нейрогенеза по сравнению с мышами, которым вводили солевой раствор. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего.

e. Пример 5.

Имеющуюся в продаже PPF ("PPF1") вводили старым мышам (возрастом 10,5 месяцев) с ослабленным иммунитетом (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1 Wj1/SzJ, линия "NSG"). Все мыши были распределены между группами лечения по четырем различным критериям: оценка гнездования в домашней клетке, начальная масса тела, расстояние, пройденное в тесте "открытого поля", и процент времени, проведенный в центре открытого поля. После определения группы, мышам вводили внутрибрюшинно (в/б) препарат БДУ в ФСБ (фосфатный буферный солевой раствор) при конечной концентрации, равной 10 мг/мл, дозированный по 150 мг/кг в течение 5 суток. Вслед за этим мышам вводили PPF1 внутривенно (в/в): 1) 5 последовательных суток [PPF1-5d] 2) 7 последовательных суток [PPF1-7d] 3) 5 последовательных суток с дополнительными 5 последовательными сутками бустерного (B) дозирования на 6 неделю после завершения первоначального дозирования [PPF1-5d-B] 4) 7 последовательных суток с дополнительными 7 последовательными сутками бустерного (B) дозирования на 6 неделю после завершения первоначального дозирования [PPF1-7d-B]. Дополнительной группе вводили физиологический раствор в течение 7 по-

следовательных суток с дополнительными 7 последовательными сутками дозирования через 6 недель после завершения первоначального дозирования [SAL-7d-B]. Через пять недель после прерывистого применения, мышам вводили в/б ЭДУ (5-этил-2'-дезоксидеоксиуридин) в ФСБ при конечной концентрации, равной 10 мг/мл, дозированный по 30 мг/кг в течение 5 суток. Всех мышей умерщвляли через 12 недель после окончания прерывистого введения PPF1 или базового раствора.

Анализ срезов гиппокампа выполняли на микроскопе Leica (Буффало Гроув, штат Иллинойс) модели DM5500B с цветной камерой DCF7000T светлопольного/флуоресцентного микроскопа. На фиг. 14 представлено количество положительно-меченых DCX клеток в гранулярном слое зубчатой извилины у животных, получавших PPF1 и солевой раствор. Эти результаты демонстрируют, что существует значительное улучшение в группе, получавшей лечение в течение 5 последовательных суток с последующей бустерной дозой, что сравнимо с группой, получавшей лечение в течение 7 последовательных суток. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего; PPF1-7d, PPF1-5d-B против солевого раствора * $P < 0,05$, ANOVA с апостериорным анализом Даннетта (n: солевой раствор = 5, PPF1-5d = 8, PPF1-7d = 7, PPF1-5d-B = 8, PPF1-7d-B = 7).

На фиг. 15 представлено количество положительно-меченых БДУ клеток в гранулярном слое зубчатой извилины у животных, получавших PPF1 и солевой раствор. Эти результаты демонстрируют, что с точки зрения пролиферирующих клеток, стимулирование значительно возрастает в группе, получавшей лечение в течение 5 последовательных суток с последующей бустерной дозой, по сравнению группами, получавшими лечение в течение 5 или 7 последовательных суток без последующей бустерной дозы. Кроме того, бустерное лечение значительно повышает выживаемость клеток в целом. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего; PPF1-5d-B, PPF1-7d-B против солевого раствора ***, $P < 0,001$, * $P < 0,05$, ANOVA с апостериорным анализом Даннетта. PPF1-5d против PPF1-5d-B + $P < 0,05$, Т-критерий для независимых выборок, (n: солевой раствор = 7, PPF1-5d = 8, PPF1-7d = 7, PPF1-5d-B = 8, PPF1-7d-B = 7).

На фиг. 16 представлено количество положительно-меченых ЭДУ клеток в гранулярном слое зубчатой извилины у животных, получавших молодую плазму, PPF1 и солевой раствор. Эти результаты демонстрируют, что эффекты, наблюдаемые с бустерной дозой, не связаны с повышением общего числа присутствующих пролиферирующих клеток, но связаны с усилением механизма выживаемости, вызванным введением бустерной дозы. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего; (n: солевой раствор = 4, PPF1-5d = 7, PPF1-7d = 6, PPF1-5d-B = 7, PPF1-7d-B = 6).

f. Пример 6.

Имеющуюся в продаже PPF ("PPF1") вводили взрослым мышам (возрастом 3 и 6 месяцев) с ослабленным иммунитетом (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1 Wjl/SzJ, линия "NSG"). Все мыши были распределены между группами лечения по четырем различным критериям: оценка гнездования в домашней клетке, начальная масса тела, расстояние, пройденное в тесте "открытого поля", и % времени, проведенный в центре открытого поля. После определения группы, мышам вводили внутрибрюшинно (в/б) препарат БДУ в ФСБ (фосфатный буферный солевой раствор) при конечной концентрации, равной 10 мг/мл, дозированный по 150 мг/кг в течение 5 суток. Вслед за этим мышам вводили солевой раствор или PPF1 внутривенно (в/в) в течение 7 последовательных суток (прерывистое применение). Подмножеству мышей, которым вводили как солевой раствор так и PPF1, в клетки установили колеса активности. Мышей умерщвляли через 3 суток, 10 суток или 42 суток после завершения прерывистого применения.

На фиг. 17 представлено количество положительно-меченых DCX клеток в гранулярном слое зубчатой извилины у 3-месячных животных NSG, которым вводили PPF1 или солевой раствор, с колесами активности или без них. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего; колесо активности через 42 суток против солевого раствора через 42 суток ***, $P < 0,0001$, * $P < 0,05$, ANOVA с апостериорным анализом Даннетта. Колесо активности против PPF1 через 42 суток +++ $P < 0,001$, t-критерий для независимых выборок (n: солевой раствор через 3 суток = 8, PPF1 через 3 суток = 8, PPF1 через 10 суток = 7, базовый раствор через 42 суток = 8, PPF1 через 42 суток = 8, Колесо активности через 42 суток = 8, колесо активности + PPF1 через 42 суток = 8). На фиг. 17 также представлено количество положительно-меченых DCX клеток в гранулярном слое зубчатой извилины у 6-месячных животных NSG, которым вводили PPF1 или солевой раствор, с колесами активности или без них. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего; колесо активности через 42 суток против солевого раствора через 42 суток ****, $P < 0,0001$, ** $P < 0,01$, ANOVA с апостериорным анализом Даннетта. Колесо активности против PPF1 через 42 суток +++ $P < 0,001$, t-критерий для независимых выборок. PPF1 через 42 суток против солевого раствора через 42 суток + $P < 0,05$, t-критерий для независимых выборок (n: солевой раствор через 3 суток = 7, PPF1 через 3 суток = 8, PPF1 через 10 суток = 6, солевой раствор через 42 суток = 8, PPF1 через 42 суток = 6, Колесо активности через 42 суток = 8, колесо активности + PPF1 через 42 суток = 9).

На фиг. 18 представлено количество положительно-меченых Ki67 клеток в гранулярном слое зубчатой извилины у 3-месячных животных NSG, которым вводили PPF1 или солевой раствор, с колесами активности или без них. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего; колесо

активности + PPF1 через 42 суток против солевого раствора через 42 суток ***, $P < 0,001$, ANOVA с апостериорным анализом Даннетта (n: солевой раствор через 3 суток = 6, PPF1 через 3 суток = 6, PPF1 через 10 суток = 7, солевой раствор через 42 суток = 8, PPF1 через 42 суток = 8, Колесо активности через 42 суток = 8, колесо активности + PPF1 через 42 суток = 8).

На фиг. 18 также представлено количество положительно-меченых Ki67 клеток в гранулярном слое зубчатой извилины у 6-месячных животных NSG, которым вводили PPF1 или солевой раствор, с колесами активности или без них. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего; колесо активности через 42 суток против солевого раствора через 42 суток ***, $P < 0,001$, * $P < 0,05$, ANOVA с апостериорным анализом Даннетта (n: солевой раствор через 3 суток = 7, PPF1 через 3 суток = 7, PPF1 через 10 суток = 8, солевой раствор через 42 суток = 8, PPF1 через 42 суток = 7, Колесо активности через 42 суток = 7, колесо активности + PPF1 через 42 суток = 9).

На фиг. 19 представлено количество положительно-меченых БДУ клеток в гранулярном слое зубчатой извилины у 3-месячных и 6-месячных животных NSG, которым вводили PPF1 или солевой раствор, с колесами активности или без них. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего; колесо активности + PPF1 через 42 суток против базового раствора через 42 суток ***, $P < 0,001$, ANOVA с апостериорным анализом Даннетта (**** $P < 0,0001$; *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$, ANOVA с апостериорным анализом Даннетта).

Эти результаты демонстрируют, что существует значительное усиление нейрогенеза с PPF1 и колесом активности по сравнению с базовым раствором через 6 недель после дозирования у 3-месячных мышей NSG. Кроме того существует значительное усиление нейрогенеза с PPF1 и колесом активности по сравнению с колесом активности отдельно через 6 недель после дозирования у 3 мышей NSG. Также существует значительное усиление нейрогенеза с PPF1 и колесом активности по сравнению с базовым раствором через 6 недель после дозирования у 6-месячных мышей NSG. Эти результаты также демонстрируют, что существует значительное усиление нейрогенеза с PPF1 и колесом активности по сравнению с колесом активности отдельно через 6 недель после дозирования у 6 мышей NSG. Также существует значительное усиление пролиферации клеток-предшественников с PPF1 и колесом активности по сравнению с базовым раствором через 6 недель после дозирования у 3-месячных и 6-месячных мышей NSG.

Эти данные у взрослых мышей NSG в возрасте 6 месяцев указывают на возможные синергетические эффекты физических упражнений и введения PPF1, что приводит к значительному повышению нейрогенеза по сравнению с упражнением или лечением PPF1 отдельно. Это поддерживает потенциальную полезность лечения PPF1 в сочетании со схемой упражнений в клинических условиях. Кроме того, эти данные свидетельствуют о том, что существует значительный потенциал нейрогенеза в мозге, который может быть достигнут путем нескольких независимых или перекрывающихся механизмов.

g. Пример 7.

PPF1 или контрольный солевой раствор вводили двум группам лечения 11-месячных мышей с ослабленным иммунитетом (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1 Wj1/SzJ, линия "NSG"). Все мыши получали в/в инъекции 150 мкл PPF1 или солевого раствора на одну дозу в течение семи суток подряд. Колесо активности (MedAssociates) помещали в клетки мышей, обозначенных как бегуны (n = 8, n = 8 для PPF1 и солевого раствора), начиная с 7 недели исследования. Количество оборотов колеса регистрировали в течение 5 суток подряд, днем и ночью.

На фиг. 20 представлено количество оборотов колеса в течение заданных периодов времени, с затененной областью, указывающей темный цикл, t-критерий для независимых выборок был использован для оценки статистической значимости общего пробега как для групп, получавших лечение, так и для групп, не получавших лечение, в светлые и темные циклы. Профили проявления ритмики были извлечены и охарактеризованы с использованием анализа временных и частотных данных для серии из 13 временных точек, отдельно для каждой мыши из групп, получавших лечение, так и для групп, не получавших лечение, с пятью сериями из 13 временных точек на мышь. Период, фаза и амплитуда представляли собой параметры, определенные для каждого ритма, и их сравнивали между двумя группами с использованием t-критерия для независимых выборок. Мыши, которым вводили PPF1, пробежали значительно больше, чем животные, которые не получали лечения, что является показателем повышенной двигательной активности. Мышей подвергали тесту горячей пластинки, чтобы проконтролировать относительно нормальных болевых ощущений в их лапах. Потеря чувствительности могла повлиять на предыдущие поведенческие показания. Тестирование горячей пластинкой привело к небольшому увеличению активности после возвращения в клетку колеса активности, что видно по скачку оборотов колеса, указанных в обведенном сегменте фиг. 20.

h. Пример 8.

Рекомбинантный альбумин человека ("рчАльбумин", Albumedix, Ltd, Ноттингем, Соединенное Королевство), осветленную плазму молодого человека ("МП") или контрольный солевой раствор вводили 10,5-месячным мышам с ослабленным иммунитетом (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1 Wj1/SzJ, линия "NSG"). Все животные получали 50 мг/кг БДУ в/б в 1 неделю до 7-суточного прерывистого применения. РчАльбумин и МП разбавляли до 50 мг/мл в воде для инъекций (ВДИ, 0,9% солевой раствор). Все мыши полу-

чали в/в инъекции 150 мкл рчАльбумина, МП или солевого раствора на одну дозу в течение 7 суток подряд. Мышей умерщвляли через 6 недель после последних суток лечения.

На фиг. 21А продемонстрировано количество выживших клеток во всех 3 группах, определенное количеством БДУ-меченых клеток в зубчатой извилине ("DG"). Молодая плазма значительно увеличила выживаемость клеток по сравнению с физиологическим раствором и рчАльбумином, тогда как рчАльбумин не оказал существенного влияния на выживаемость клеток. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего ($***P < 0,001$, t-критерий для независимых выборок).

На фиг. 21В продемонстрировано количество окрашивания DCX во всех 3 группах, определенное количеством DCX-положительных меченых клеток в зубчатой извилине ("DG"). Молодая плазма значительно увеличила нейрогенез по сравнению с солевым раствором и рчАльбумином, в то время как рчАльбумин был связан со снижением нейрогенеза, по сравнению с контрольным солевым раствором. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего ($**P < 0,01$, $***P < 0,001$, t-критерий для независимых выборок).

i. Пример 9.

Диссоциированные смешанные нейронные клетки, полученные из коры головного мозга мыши E16, высевали и выращивали на 48-луночном мультиэлектродном планшете (Axion Biosystems). Каждая лунка содержит 16 электродов, которые находятся в физическом контакте с посеянными нейронными клетками, и измеряет тонкие изменения в свойствах клеточных мембран. Эта установка позволяет оценить различные параметры, чтобы получить информацию о нейронной пиковой активности поведения при нагревании на уровне одного электрода, а также информацию о степени нейронной связи путем оценки синхронности нейронных свойств нагрева между несколькими электродами внутри лунки.

Нейронные культуры поддерживали в присутствии условий обработки начиная с 1 суток. Условия обработки включали среду Neurobasal плюс добавку B27, содержащую 10% (об./об.): рекомбинантный альбумин человека ("рчАльбумин", Albumedix, Ltd, Ноттинген, Соединенное Королевство); PPF1 или HAS1. ФСБ представлял собой контроль. Нейронную активность измеряли на 7-е и 14-е сутки в культуре.

На фиг. 22 представлено, что 7 суток обработки PPF1 привели к увеличению активности нейронной сети по сравнению с контролем, обработкой рчАльбумином или HAS1. HAS1 представляет собой имеющийся в продаже HAS с более чем 95% альбумина человека (по отношению к общему количеству белка) в 5% растворе (мас./об., 50 г/л), полученный методом фракционирования в холодном спирте, и полученный из объединенной человеческой плазмы от доноров. Как PPF1, так и HAS1 поставляли в 5% растворе (мас./об., 50 г/л) и разбавляли в соотношении 1:10 средой Neurobasal с добавкой B27. Влияние PPF1 на активность нейронной сети сохраняется на протяжении 14 суток в культуре. Это указывает на то, что PPF1 связан с активизацией созревания нейронной сети. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего ($*P < 0,05$, t-критерий для независимых выборок).

j. Пример 10.

Осветленную плазму крови старого человека (СП) или стерильный солевой раствор вводили 8-недельным (молодым) мышам с ослабленным иммунитетом (NOD.Cg-Prkdcid Il2rgtm1 Wjl/SzJ, линия "NSG"). В каждом эксперименте мышей распределяли по массе в разные группы лечения. Все мышам вводили в/б в течение 5 последовательных суток 150 мг/кг БДУ в стерильном ФСБ. После введения БДУ осуществляли в/в введение старой плазмы в различных парадигмах лечения при 150 мкл на дозу. Все парадигмы указаны на фиг. 23.

Парадигма 1 включает инъекции два раза в неделю, в общей сложности 10 инъекций в течение 5 недель. Гистологический анализ проводили через 48 ч после последней дозы плазмы. Парадигма 2 включает инъекции три раза в неделю, в общей сложности 10 инъекций в течение 4 недель, с гистологическим анализом через 48 ч после последней дозы. В парадигме 3 мышам осуществляли введение ежесуточно в течение 7 последовательных суток и с гистологическим анализом через 48 ч после последней дозы. В парадигме 4 мышам осуществляли введение ежесуточно в течение 7 последовательных суток и с анализом через 21 сутки после последней дозы. Мозг мышей, которым вводили старую плазму, был проанализирован в отношении маркера эндотелиального воспаления VCAM-1 в гиппокампе и в отношении количества новообразованных нейронов, на которое указывают даблкортин (DCX)-положительные клетки в зубчатой извилине. VCAM-1 визуализировали на Hamamatsu NanoZoomer HT (Hamamatsu) после иммуногистохимии на 30 мкм свободно плавающих срезах и анализировали с использованием программного обеспечения Image Pro (Media кибернетика). DCX-положительные клетки в зубчатой извилине подсчитывали живыми на широкопольном микроскопе Leica (Leica).

Анализ процента VCAM-1-положительной области в гиппокампе (фиг. 24) демонстрирует, что эндотелиальное воспаление значительно увеличивается через 48 ч после последнего введения плазмы с тенденцией дозирования два раза в неделю (фиг. 24А), и значительно увеличивалась после введения три раза в неделю (фиг. 24В) и прерывистого применения (фиг. 24С). Уровни VCAM-1 уже не были значительно повышены через 21 сутки после введения последней дозы плазмы (фиг. 24D).

Воздействие на даблкортин наблюдалось только после 3-4 недельного периода времени, так что ко-

личество DCX-положительных клеток было проанализировано в зубчатой извилине в парадигмах 1, 2 и 4. Анализ продемонстрировал, что не было никакого эффекта старой плазмы на нейрогенез при парадигмах дозирования с введением два раза в неделю (фиг. 25A) или три раза в неделю (фиг. 25B), однако прерывистое применение в течение 7 последовательных суток (фиг. 25C) приводило к значительному снижению количества DCX-положительных клеток. Эти данные позволяют предположить, что только прерывистое применение плазмы старого человека оказывает существенное воздействие на нейрогенез.

к. Пример 11.

Мышей NSG возрастом 8 недель, которым вводили в течение 7 последовательных суток плазму старого человека (65-68-летнего происхождения), тестировали с использованием модифицированного лабиринта Барнеса на 4 неделю после последней инъекции старой плазмы. На фиг. 26 представлена временная динамика задержки выхода из лабиринта Барнеса и указано время, необходимое для достижения и входа в выходное отверстие для мышей NSG, которым вводили старую плазму и солевой раствор. Не наблюдалось никаких существенных различий в задержке выхода между группами, но на 4-е сутки мыши, которым вводили старую плазму, выполняли его хуже, чем мыши, получавшие контрольный солевой раствор. Эти данные указывают на снижение обучения и памяти, связанных с функцией гиппокампа, в задаче на пространственную память. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. Двухфакторный ANOVA, апостериорный критерий Шидека.

На фиг. 27 показана средняя задержка выхода в течение последних трех испытаний в лабиринте Барнеса на 4-е сутки. Мыши, которым вводили старую плазму, продемонстрировали тенденцию к более высокой задержке выхода, что указывает на нарушение функции памяти. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего, (t-критерий для независимых выборок).

На фиг. 28 представлена разница в задержке выхода между испытаниями 1 и 3 в лабиринте Барнеса, и продемонстрировано, что эти испытания могут быть использованы в качестве меры обучения в течение одних суток. Мыши, которым вводили старую плазму, имели значительно более низкую разность в задержке выхода между этими исследованиями, что указывает на снижение способности к обучению. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (* $P < 0,05$, t-критерий для независимых выборок).

На фиг. 29 представлены результаты кПЦР, которая была использована для количественного определения уровней мРНК различных маркеров, связанных с нейрогенезом и синаптической функцией. Относительные уровни экспрессии даблкортина (DCX), маркера для новообразованных нейронов, были уменьшены в соответствии с гистологическим анализом этого маркера. Кроме того, наблюдались тенденции к снижению уровня vglut1 (везикулярного глутаматного транспортера 1), маркера глутаматэргических синапсов, синаптического маркера syn1 (синапсина 1), tuji1 (бета-тубулина III) и bdnf (нейротрофического фактора головного мозга). Это снижение указывает на общее нарушение синаптической и нейронной сети в мозге мышей, которым вводили старую плазму. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (* $P < 0,05$, t-критерий для независимых выборок).

л. Пример 12.

Молодых (8-недельных) мышей с ослабленным иммунитетом (NOD.Cg-Prkdcscid Il2gtrtm 1 Wj1/SzJ, линия "NSG") распределяли по массе в разные группы лечения. Животным инъецировали подкожно (п/к) 35 мг/кг каиновой кислоты (Sigma) в стерильном солевом растворе или контрольный солевой раствор. Периферическое введение каиновой кислоты приводило к острой судорожной активности, воспалению в гиппокампе, а в подгруппе мышей также к гибели нейронов в области CA1 гиппокампа. Через 2 ч после инъекции каиновой кислоты, мышам внутривенно вводили 150 мкл PPF1 или солевого раствора. Введение PPF1 или солевого раствора продолжали ежедневно в течение в общей сложности 5 суток (фиг. 30). Ткань собирали для анализа на 6-е сутки. Воспалительные изменения в области CA1 гиппокампа были проанализированы после иммунофлуоресцентного окрашивания на активацию микроглии (CD68) и активацию астроцитов (GFAP). Срезы визуализировали на Hamamatsu NanoZoomer HT (Hamamatsu) после иммуногистохимии на 30 мкм свободно плавающих срезах и анализировали с использованием программного обеспечения Image Pro (Media кибернетика).

Анализ процента CD68-положительной области в области CA1 гиппокампа демонстрирует, что введение каиновой кислоты приводит к повышенной иммунореактивности CD68, что предполагает увеличение активации микроглии (фиг. 31A). Пять суток введения PPF1 привело к значительному снижению процентного содержания CD68-положительной области и, следовательно, снижению активации микроглии. Аналогичным образом, анализ процента GFAP-положительной области (фиг. 31B) демонстрирует значительное увеличение после введения каиновой кислоты, которое значительно снижается после дозирования PPF1. Данные свидетельствуют о том, что PPF1 имеет острое противовоспалительное действие в мозге мышей, которым вводили каиновую кислоту. * $P < 0,05$ однофакторный ANOVA с апостериорным анализом множественного сравнения Даннетта.

м. Пример 13.

Мышам NSG в возрасте 6 месяцев вводили ежедневно в течение одной недели (7 суток), в/в, PPF1 или контрольный солевой раствор в дозе 150 мкл (10 мг/мл). Всем мышам вводили БДУ, 50мг/кг БДУ в/б

один раз в сутки в те же сутки, когда они получили PPF1 или контрольный солевой раствор. Мышей разделяли на две когорты. Первую когорту умерщвляли в сутки, непосредственно после 7 суток одновременного лечения БДУ и PPF1. Вторую когорту умерщвляли на 7 суток позже, а животные получали дополнительные 7 суток ежедневного введения БДУ.

На фиг. 32 представлено количество окрашенных клеток в зубчатой извилине когорт 1 и 2 (слева направо). Обе когорты продемонстрировали возросшую пролиферацию клеток в зубчатой извилине по сравнению с контрольным солевым раствором (** $p < 0,001$, t-критерий для независимых выборок).

п. Пример 14.

Мышам NSG в возрасте 3 или 6 месяцев вводили ежедневно в течение одной недели (7 суток), в/в, PPF1 или базовый солевой раствор. Мышей затем умерщвляли через 3, 10 или 42 суток после того, как были введены 7 суточных доз. Мозг окрашивали Ki67, ядерным маркером, который присутствует только в пролиферирующих клетках, который метит нервные стволовые клетки и клетки-предшественники в лезвии зубчатой извилины. На фиг. 33 видно, что у 6-месячных мышей наблюдалось увеличение общего числа клеток-предшественников (Ki67-положительных или "Ki67 +") в зубчатой извилине на 10 суток после окончания 7-суточной последовательной схемы прерывистого применения PPF1. На фиг. 34 представлено окрашивание (светлые области) Ki67 в зубчатой извилине на 10 суток у мышей NSG после окончания 7-суточной последовательной схемы прерывистого применения PPF1. Это показывает, что один из возможных механизмов действия PPF1 в повышении общей выживаемости клеток и нейрогенеза на 42 суток после прекращения дозирования может быть связан с повышением общего числа клеток-предшественников (нервные стволовые клетки).

о. Пример 15.

Имеющуюся в продаже PPF ("PPF1") или контрольный солевой раствор вводили двум различным популяциям мышей в возрасте 6 и 12 месяцев с ослабленным иммунитетом (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm 1 Wj1/SzJ, линия "NSG"). Все животные получали 50 мг/кг БДУ на 1 неделю до 7-суточного прерывистого применения тестируемого агента. Все мыши получали в/в инъекции 150 мкл PPF1 или солевого раствора на одну дозу в течение 7 суток подряд. Одну когорту из каждой группы лечения использовали для исследования пролиферации и умерщвляли через 6 недель после последней введенной дозы.

На фиг. 35А представлено, что когорты 6-месячных мышей, которым вводили PPF1, продемонстрировали значительное увеличение количества клеток-предшественников, которые дифференцировались в нейроны (NeuN+) по сравнению с контрольным солевым раствором, а также уменьшение количества клеток-предшественников, которые дифференцировались в астроциты (GFAP+), по сравнению с контролем. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (** $P < 0,01$, t-критерий для независимых выборок).

На фиг. 35В представлено, что когорты 12-месячных мышей, которым вводили PPF1, продемонстрировали значительное увеличение количества клеток-предшественников, которые дифференцировались в нейроны (NeuN+) по сравнению с контрольным солевым раствором, а также статистически незначимую разницу в количестве клеток-предшественников, которые дифференцировались в астроциты, по сравнению с контролем. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (** $P < 0,01$, t-критерий для независимых выборок).

р. Пример 16.

Осветленную плазму крови старого человека (старая плазма) или стерильный солевой раствор вводили 3-месячным мышам (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm 1 Wj1/SzJ, линия "NSG"). В каждом эксперименте мышей распределяли по массе в разные группы лечения. Все мышам вводили в/б в течение 5 последовательных суток 150 мг/кг БДУ в стерильном солевом растворе. Вслед за инъекцией БДУ осуществляли в/в введение старой плазмы или стерильного солевого раствора при дозе, равной 150 мкл в сутки, в течение 7 последовательных суток и анализировали гистологически через 4 недели после последней дозы.

На фиг. 36 представлено направление клеточного развития БДУ-меченых пролиферирующих нервных клеток-предшественников через 4 недели после последней дозы. У мышей, которым вводили старую плазму, выжившие БДУ-меченые клетки значительно меньше дифференцировались в нейроны, чем в астроциты. Это указывает на то, что плазма старого человека меняет направление развития нервных клеток-предшественников у молодых мышей в сторону линии астроцитов (фиг. 37В) и особенно негативно сказывается на количестве новообразованных нейронов в зубчатой извилине (фиг. 36А) ($n = 12$ в каждой группе). Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (** $P < 0,001$; *** $P < 0,0001$, t-критерий для независимых выборок).

q. Пример 17.

Кортикальная активация.

Старые (18-месячные) мыши C57BL/6 ежедневно получали в/в инъекции 150 мкл PPF1 или 0,9% стерильного солевого раствора в течение 7 суток. Через 2,5 ч после последнего введения тестируемого агента, мышей умерщвляли путем транскардиальной перфузии 0,9% солевого раствора с последующим добавлением 4% формальдегида при глубокой анестезии кетаминном и ксилазином. Мозг препарировали, фиксировали, а затем обрабатывали с помощью процедуры iDisco для визуализации cFos-положительных

клеток посредством флуоресцентной микроскопии плоскостного освещения (LSFM) с разрешением вокселя $2 \times 2 \times 3$ мкм. Визуализированные образцы мозга выравнивали в виде 3D объемных объектов, а активированные cFos-положительные клетки обнаруживали путем вычисления. Статистическое сравнение между группами проводили с помощью отрицательной биномиальной регрессии с поправкой на множественные сравнения по ложной скорости обнаружения (* указывает на значение q менее чем 0,05).

Анализ мозга мышей продемонстрировал общее увеличение количества cFos-положительных клеток в общем объеме мозга, а также в коре головного мозга и изокортексе у 18-месячных мышей, которым вводили PPF1 (фиг. 37). При использовании биномиальной регрессии, скорректированной для множественных сравнений, различия этого увеличения общего количества cFos-положительных клеток не достигли значимости. Однако анализ более определенных кортикальных областей, таких как фронтальная, орбитальная, инфраламбальная и прелимбальная кора, продемонстрировал значительное повышение количества cFos-положительных клеток (фиг. 38), указывающее на повышенную активность нейронов. Повышенная активность в зоне префронтальной коры коррелирует с повышенной когнитивной функцией, предполагая, что обработка PPF1 приводит к когнитивным улучшениям у старых мышей C57BL/6. Подобное значительное увеличение количества cFos-положительных клеток было обнаружено также в придаточном обонятельном ядре и обонятельном бугорке (фиг. 39). Эти области связаны с обработкой обонятельной информации, а повышение активности указывает на повышенную обонятельную функцию. Воксельные визуализации на основе статистики активации cFos в красном продемонстрировали увеличение сигнала cFos в коре головного мозга мышей, которым вводили PPF1 (фиг. 40).

г. Пример 18.

Имеющуюся в продаже PPF ("PPF1") или контрольный солевой раствор вводили 22-месячным мышам дикого типа (ДТ) (C57BL/6J, "ДТ", Код линии 0664, Jackson Labs, Бар харбор, Мэн). Все животные получали 50 мг/кг БДУ в 1 неделю до 7-суточного прерывистого дозирования. В результате все мыши получали в/в инъекции 150 мкл PPF1 или солевого раствора на одну дозу в течение семи суток подряд. Мышей умерщвляли через 10 суток после последней инъекции PPF1 или солевого раствора, а образцы мозга готовили для гистологии.

На фиг. 41А представлен процент CD68 иммунореактивной площади в гиппокампе ($n = 10, 10$). На фиг. 41В представлен процент Iba-1 иммунореактивной площади в гиппокампе ($n = 10, 10$). На фиг. 41С представлен процент GFAP иммунореактивной площади в гиппокампе ($n = 10, 10$). Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, t-критерий для независимых выборок). Эти результаты демонстрируют значительное снижение микроглиальных маркеров CD68 и Iba-1 в гиппокампе старых мышей, которым вводили PPF1.

с. Пример 19.

Имеющуюся в продаже PPF ("PPF1") или контрольный солевой раствор вводили 23-месячным мышам дикого типа (ДТ) (C57BL/6J, "ДТ", Код линии 0664, Jackson Labs, Бар харбор, Мэн). Все животные получали 50 мг/кг БДУ в 1 неделю до 7-суточного последовательного прерывистого дозирования. В результате все мыши получали в/в инъекции 150 мкл PPF1 или солевого раствора на одну дозу в течение семи суток подряд. Одну когорту из каждой группы лечения использовали для исследования гистологических маркеров нейровоспаления и умерщвляли через 6 недель после последней введенной дозы.

На фиг. 42А представлено процентное изменение в экспрессии БДУ по сравнению с контрольным солевым раствором на 6, 9 и 12 неделю после дозирования, которое является показателем выживаемости клеток в гиппокампе. Животные получали 7 суток подряд схему прерывистого применения.

На фиг. 42В представлено процентное изменение в экспрессии даблкортина (DCX) по сравнению с контрольным солевым раствором на 6, 9 и 12 неделю после дозирования, которое является показателем нейрогенеза клеток в гиппокампе. Животные получали 7 суток подряд схему прерывистого применения.

t. Пример 20.

Тридцать (30) самцов альфа-синуклеиновых трансгенных мышей (линия 61, дикий фон C57BL/6J) в возрасте от 4 до 4,5 месяцев разделяли на две группы по 15 и обрабатывали PPF1 или базовым раствором в течение семи (7) суток подряд. PPF1 вводили в/в по 5 мкл на 1 г массы тела. Альфа-синуклеиновые мыши служили в качестве трансгенной модели болезни Паркинсона и сверхэкспрессировали белок альфа-синуклеин. Эта трансгенная модель не является иммунодефицитной, в отличие от мышей NSG.

Через одни сутки после последнего введения PPF1 или базового раствора все мыши были подвергнуты тестированию на когнитивную и двигательную функцию, такую как гнездостроение, сгрызание макаронины, висение на проволоке, тест вращающегося стержня и ходьба по шесту. Сгрызание макаронины, висение на проволоке и ходьбу по шесту осуществляли во второй раз в конце исследования. Тестирование проводили в случайном порядке.

Животных взвешивали один раз в неделю. На фиг. 43А и 43В представлено, что не было никаких существенных различий между альфа-синуклеиновыми трансгенными мышами ("Tg"), которым вводили PPF1 и базовый раствор (veh).

На фиг. 44 представлены результаты гнездостроения. Мышей содержали индивидуально в клетках, содержащих подстилочный материал из щепы и один квадрат прессованного хлопка ("nestlet"). Ни один

другой подстилочный материал (например, древесные волокна) не присутствовал. Nestlet был внесен за сутки до оценки состояния гнезда за примерно 2-3 ч до того, как была инициирована темная фаза, а последующее строительное поведение было оценено на следующие сутки эксперимента в течение примерно 2-3 ч после того, как началась световая фаза. Промежуток времени между внесением хлопкового квадрата и оценкой следующего статуса был одинаковым для всех исследований. По пятибалльной шкале оценивали манипулирование nestlet и строение созданного гнезда (Deacon, R.M. 2006, Assessing nest building in mice. Nat Protoc 1:1117-19). Как показано на фиг. 44, наблюдалось повышение тенденции в гнездовом поведении у мышей, которым вводили PPF1, по сравнению с мышами, которым вводили базовый раствор.

На фиг. 45A и 45B показано, что наблюдалось значительное увеличение сгрызания макаронины у группы, которой вводили PPF1, по сравнению с группой, которой вводили базовый раствор, через 3 недели после последнего введения, что указывает на улучшение двигательной функции (фиг. 45B). Тест был разработан для изучения дефицита двигательной функции у мелких грызунов. Животных переносили в экспериментальную комнату по меньшей мере за 2 ч до тестирования. Крышку клетки, бутылку с водой и пищевые гранулы удаляли, а маленький кусочек сухой макаронины (приблиз. 5 мм) помещали в клетку. Микрофон помещали выше кусочка макаронины. Запись начинали как только животное начинало есть. Оценивали количество укусов, необходимое для сгрызания, и частоту укусов, а профиль сгрызания анализировали с использованием программного обеспечения Avisoft SASLab Pro. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (* $P < 0,05$, t-критерий для независимых выборок).

На фиг. 46 приведены результаты испытаний висения на проволоке, с помощью которых оценивают нервно-мышечные аномалии двигательной силы. Наблюдалось значительное увеличение времени до падения в группе, которой вводили PPF1, по сравнению с группой, которой вводили базовый раствор, через 3 недели после последнего введения. Для того чтобы выполнить испытание, использовали крышку клетки из металлической проволоки, а по периметру располагали клейкую ленту, чтобы предотвратить хождение мыши по краю. Животное помещали на верхнюю часть крышки клетки. Крышку слегка встряхивали три раза, чтобы заставить мышшь захватить проволоку, а затем крышку переворачивали вверх дном. Крышку закрепляли на высоте приблизительно 50-60 см над мягкой подкладкой, достаточно высоко, чтобы предотвратить спрыгивание мыши вниз, но не достаточно высоко, чтобы причинить вред в случае падения. Измеряли задержку до падения, и использовали 300-секундную отсечку. Как правило, мыши дикого типа могут висеть вниз головой в течение нескольких минут.

На фиг. 47A-47C представлены результаты испытания ходьбы по шесту. На фиг. 47A представлены различные формы и размеры шеста (квадратные или цилиндрические шесты), используемые в пяти различных испытаниях возрастающей сложности. На фиг. 47B приведены результаты пяти испытаний через 72 ч после последнего введения. На фиг. 47C приведены результаты пяти испытаний через 3 недели после последнего введения. Мыши, которым вводили PPF1, продемонстрировали значительно более высокий успех при прохождении шеста во время испытания 5 тестирования 1 (через 72 ч после введения) и во время испытания 4 тестирования 2 (через 3 недели после введения). Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (** $P < 0,01$, биномиальный критерий).

На фиг. 48A-48F представлены гистологические результаты окрашивания стриатума и гиппокампа. На фиг. 48A представлено окрашивание CD68 в стриатуме. На фиг. 48B представлено окрашивание CD68 в гиппокампе. На фиг. 48C представлено окрашивание Iba-1 в стриатуме. На фиг. 48D представлено окрашивание Iba-1 в гиппокампе.

На фиг. 48E представлено окрашивание NeuN в стриатуме. На фиг. 48F представлено окрашивание NeuN в гиппокампе. На этих чертежах видно, что мыши, которым вводили PPF1, продемонстрировали снижение микроглиоза (нейровоспаления) по окрашиванию Iba-1 и CD68 как в стриатуме, так и в гиппокампе, и повышение выживаемости нейронов по окрашиванию NeuN в стриатуме и гиппокампе. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, t-критерий для независимых выборок).

и. Пример 21.

PPF1, HAS1 или контрольный солевой раствор вводили 12-месячным мышам (NOD.Cg-Prkdcid112rgtm1 Wj1/SzJ, линия "NSG"). HAS1 представляет собой имеющийся в продаже HAS с более, чем 95% альбумина человека (по отношению к общему количеству белка) в 5% растворе (мас./об., 50 г/л), полученный методом фракционирования в холодном спирте, и полученный из объединенной человеческой плазмы от доноров. За исключением особо оговоренных случаев, HAS1 вводят в примерах в данном документе в естественных условиях с использованием 5% раствора. Мышам осуществляли в/в введение PPF1, HAS1 или стерильного солевого раствора при дозе, равной 150 мкл, ежедневно в течение 7 последовательных суток и анализировали в отношении поведения через 4 недели после последней дозы.

На фиг. 49 представлена задержка выхода из лабиринта Барнеса для нахождения мышью выходного отверстия для мышей, которым вводили PPF1, HAS1 и базовый раствор. Мыши, которым вводили PPF1, находили выходное отверстие значительно быстрее, чем животные, которым вводили базовый раствор. Эти данные демонстрируют, что PPF1 эффективно усиливает когнитивную функцию у старых животных

NSG, в то время как введение HAS1 не оказывает никакого влияния на гиппокамп-зависимую память. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (*P < 0,05, t-критерий для независимых выборок).

v. Пример 22.

Клинические парадигмы с использованием PPF.

(1) БА, от легкой до умеренной.

Мужчин и женщин в возрасте 60 лет и старше, имеющих БА, от легкой до умеренной степени, случайным образом распределяют для получения 100 мл или 250 мл PPF1 раз в сутки в течение 5 суток ("прерывистое применение") на 1 неделю и 13 недель исследования с общей продолжительностью 6 месяцев. В течение двух периодов 5-суточного дозирования, субъекты находятся в стационарных отделениях и наблюдаются с целью облегчения оценки безопасности, и все субъекты проходят визит скрининга, визит для оценки исходного состояния, визиты во время лечения, последующие контрольные визиты, и визит в конце исследования/досрочного прекращения участия в исследовании. Оценку безопасности и переносимости проводят при каждом визите. Нейрокогнитивные и двигательные функции оценивают во время начального визита и во время периодических промежуточных визитов после дозирования.

Первичные конечные точки представляют собой безопасность, переносимость каждой схемы применения. Безопасность определяется частотой нежелательных явлений, возникающих во время лечения. Переносимость определяется по количеству субъектов, завершивших 8-недельный курс по меньшей мере с 5 инфузиями, и субъектов, завершивших 24-недельный курс по меньшей мере с 10 инфузиями. Выполнимость исследования определяется по количеству субъектов, завершивших курс из 5 и 10 инфузий. Вторичные конечные точки определяют потенциальные эффекты на когнитивную функцию, используя различные установленные когнитивные показатели, включая когнитивную подшкалу шкалы оценки тяжести болезни Альцгеймера. Исследовательские конечные точки включают оценку изменений в составе и распределении биомаркеров крови, а также изменения в магнитно-резонансной томографии.

(2) БА, от легкой до умеренной.

Две группы субъектов с диагнозом от легкой до умеренной БА рандомизируют для активного лечения двойным слепым образом. Все субъекты получают одну инфузию в сутки рандомизированной дозы в течение 5 суток подряд на 1 и 13 недель с длительностью исследования, составлявшей 6 месяцев. Субъектов рандомизируют в один из следующих двух уровней доз: 100 мл и 250 мл PPF1. Группы дозирования также разделяют по полу. Продолжительность введения составляет 2-2,5 ч, а скорость титрования выбирают согласно дозоспецифичному руководству, так чтобы вводить всю дозу.

Субъекты участвуют в дополнительном исследовании биомаркеров ЦСЖ (цереброспинальной жидкости). Такие субъекты проходят две люмбарные пункции для сбора ЦСЖ, первую до начальной дозы, а вторую после последней дозы. Нейрокогнитивные и двигательные функции оценивают во время начального визита, а оценку в периодические промежуточные визиты осуществляют после дозирования.

Определяют безопасность, переносимость и выполнимость каждой схемы применения. В течение исследования определяют и обобщают когнитивные оценки, включая следующие: краткая шкала оценки психического статуса (MMSE); 11-ступенчатая когнитивная подшкала шкалы оценки тяжести болезни Альцгеймера (ADAS-Cog/11); тест с доской с пазами для вставки штырей; тест на скорость определения категорий (CFT); клиническая рейтинговая шкала деменции - сумма чекбоксов (CDR-SOB); кооперативное исследование болезни Альцгеймера - активность повседневной жизни (ADCS-ADL); кооперативное исследование болезни Альцгеймера - оценка изменения по шкале общего клинического впечатления (ADCS-CGIC); опросник для оценки нейропсихиатрического состояния (NPI-Q) и нейрокогнитивные анализы Savonix, и повторение цифр в прямом и обратном порядке.

(3) Болезнь Паркинсона.

Субъектов с болезнью Паркинсона и когнитивным нарушением рандомизируют на две группы: 2 периода активного лечения и плацебо. Субъекты получают одну инфузию в сутки активного лечения или плацебо в течение 5 последовательных суток ("прерывистое дозирование") в течение первой недели исследования. В течение 13 недель обе группы получают активное лечение в течение 5 суток подряд, а продолжительность исследования составляет около 7 месяцев. Продолжительность введения составляет 2-2,5 ч, а скорость титрования выбирают согласно дозоспецифичному руководству, так чтобы вводить всю дозу.

Определяют безопасность, переносимость и выполнимость каждой схемы применения. В течение исследования определяют когнитивные и двигательные функции, включая MoCA; продолжительность и степень внимания, кратковременную память и эпизодическую память в CDR-CCB; MDS-UPDRS3; MDS-UPDRS2; SE-ADL и CISI-PD.

Изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, поскольку они могут варьироваться. Следует также понимать, что употребляемая в данном документе терминология применяется только для описания конкретных аспектов и не имеет ограничительного характера, поскольку объем данного изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Когда приводится диапазон значений, следует понимать, что данное изобретение охватывает каждое про-

межуточное значение с точностью до десятого знака нижнего предела, если в контексте явно не указано иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона, а также любое другое указанное или промежуточное значение в таком указанном диапазоне. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут независимо быть включены в меньшие диапазоны и также находятся в рамках изобретения, кроме любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключаящие один или оба этих включенных предела, также включены в данное изобретение.

Если не указано иное, все употребляемые в данном документе технические и научные термины имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в данной области техники, к которой имеет отношение настоящее изобретение. Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, также могут быть использованы при практической реализации или испытании настоящего изобретения, далее будут описаны типичные иллюстративные способы и материалы.

Все публикации и патенты, цитируемые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки, как если бы было указано, что каждая отдельная публикация или патент были специально и индивидуально включены посредством ссылки в данный документ для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми цитируются публикации. Цитирование любой публикации представлено в отношении ее описания до даты подачи и его не следует толковать как признание того, что настоящее изобретение не имеет права датировать такую публикацию более ранним числом из-за действия более раннего изобретения. Более того, даты представленных публикаций могут отличаться от фактических дат публикаций, что требует независимого подтверждения.

Следует обратить внимание на то обстоятельство, что использование в данном описании и в прилагаемой формуле изобретения форм единственного числа включает ссылки на множественное число, если в контексте явно не указано иное. Следует также отметить, что в формулу изобретения могут вноситься правки с целью исключения любых необязательных элементов. Следовательно, данное утверждение должно служить в качестве предварительного основания для использования такой исчерпывающей терминологии, как "исключительно", "только" и т.п. в связи с указанием элементов формулы изобретения, или использования "отрицательного" признака.

Как будет понятно специалистам в данной области техники после прочтения этого описания, каждый из отдельных аспектов изобретения, описанных и проиллюстрированных в данном документе, имеет отдельные компоненты и признаки, которые могут быть легко разъединены или объединены с признаками любого из других нескольких аспектов изобретения без отступления от объема или сущности настоящего изобретения. Любой указанный способ можно осуществить с помощью указанной последовательности действий или с помощью любой другой логически возможной последовательности.

Хотя вышеприведенное изобретение было проиллюстрировано и описано довольно подробно посредством иллюстраций и примеров с целью ясности понимания, должно быть очевидно специалистам в данной области в свете идей настоящего изобретения, что определенные изменения и модификации могут быть сделаны в нем без отступления от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения.

Соответственно, предшествующее просто иллюстрирует принципы изобретения. Следует понимать, что специалисты в данной области техники смогут разработать различные устройства, которые, хотя явно и не описаны и не показаны в данном документе, воплощают принципы данного изобретения и включены в его сущность и объем. Кроме того, все примеры и условные формулировки, приведенные в данном документе, в основном предназначены для того, чтобы помочь читателю понять принципы изобретения и концепции, внесенные изобретателями в развитие уровня техники, и должны рассматриваться как не ограничивающие такие конкретно перечисленные примеры и условия. Более того, все приведенные в данном документе утверждения, излагающие принципы, аспекты и аспекты изобретения, а также его конкретные примеры, предназначены для охвата как структурных, так и функциональных эквивалентов.

Кроме того, предполагается, что такие эквиваленты включают как известные в настоящее время эквиваленты, так и эквиваленты, разработанные в будущем, то есть любые разработанные элементы, которые выполняют ту же функцию, независимо от конструкции. По этой причине объем настоящего изобретения не предназначен для ограничения показанными и описанными в данном документе приводимыми в качестве примера аспектами изобретения. Скорее, объем и сущность данного изобретения воплощены в прилагаемой формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения субъекта с диагнозом когнитивного нарушения, включающий введение эффективного количества фракции белков плазмы (PPF) с использованием схемы прерывистого применения, причем PPF содержит от 83 до 95% альбумина и схема прерывистого применения включает введение PPF в течение по меньшей мере пяти последовательных суток.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что PPF представляет собой имеющуюся в продаже PPF.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что PPF представляет собой белковый препарат обогащенный белком плазмы.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что PPF получают из плазмы от группы молодых индивидов.

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что PPF получают из препарата крови млекопитающего.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что препарат крови млекопитающего представляет собой препарат крови человека.

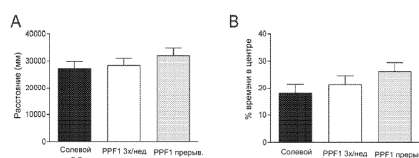
7. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий мониторинг субъекта в отношении улучшения когнитивной функции.

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

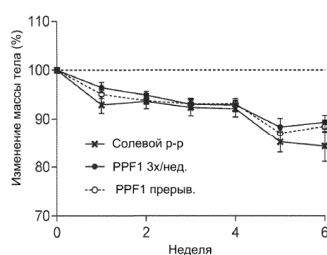
9. Способ по п.8, отличающийся тем, что млекопитающее представляет собой человека.

10. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что схема прерывистого применения включает введение PPF в течение по меньшей мере семи последовательных суток.

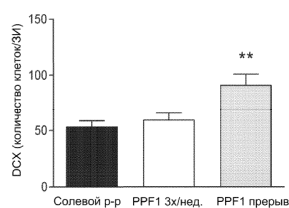
11. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что субъект следует схеме упражнений после полного введения схемы прерывистого применения, где схема упражнений предусматривает упражнения с более высокой интенсивностью и/или с большей частотой, чем в случае выполнения субъектом упражнений до введения.



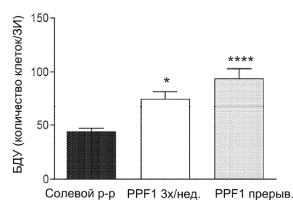
Фиг. 1



Фиг. 2

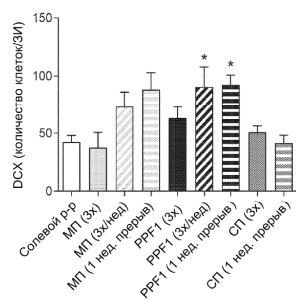


Фиг. 3

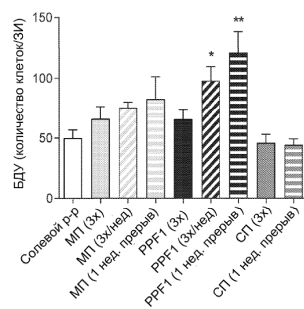


Фиг. 4

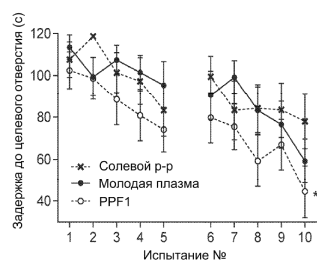
042179



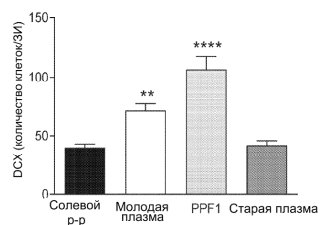
Фиг. 5



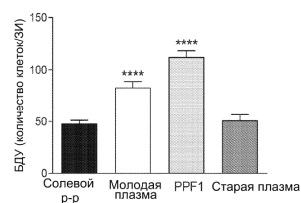
Фиг. 6



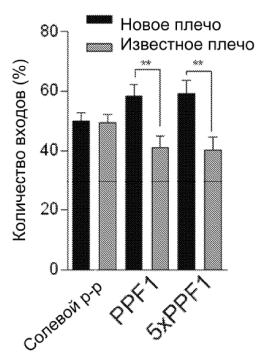
Фиг. 7



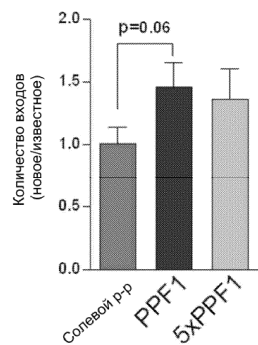
Фиг. 8



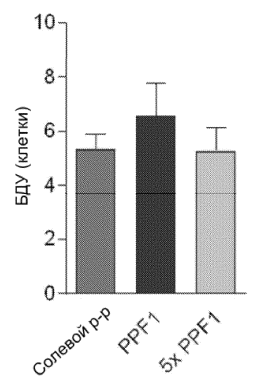
Фиг. 9



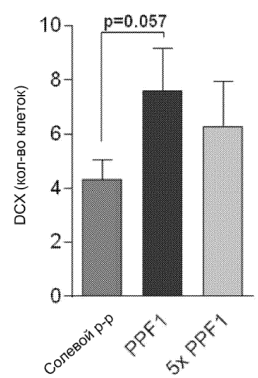
Фиг. 10



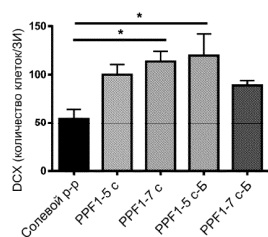
Фиг. 11



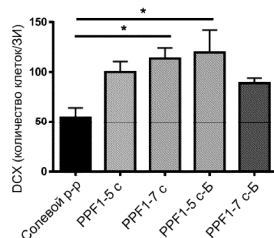
Фиг. 12



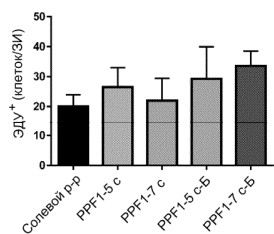
Фиг. 13



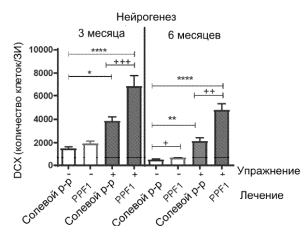
Фиг. 14



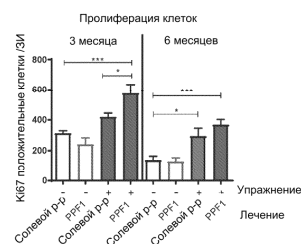
Фиг. 15



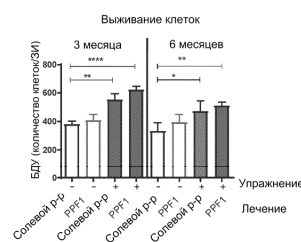
Фиг. 16



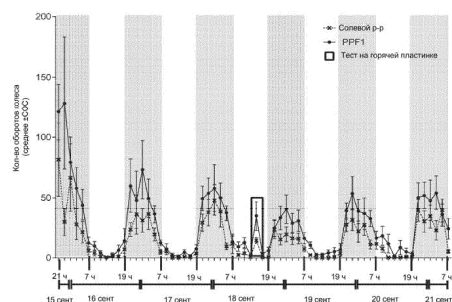
Фиг. 17



Фиг. 18



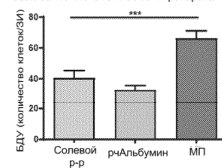
Фиг. 19



Фиг. 20

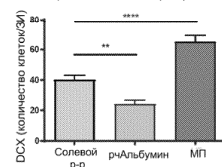
А

Выживание клеток в плазме и препаратах плазмы

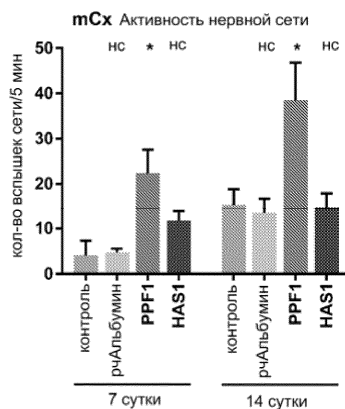


В

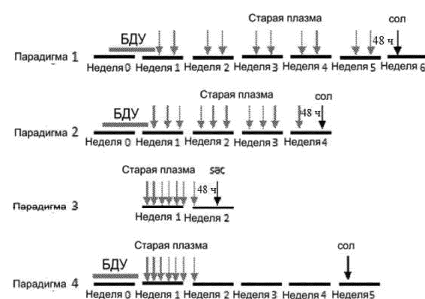
Нейрогенез в плазме и препаратах плазмы



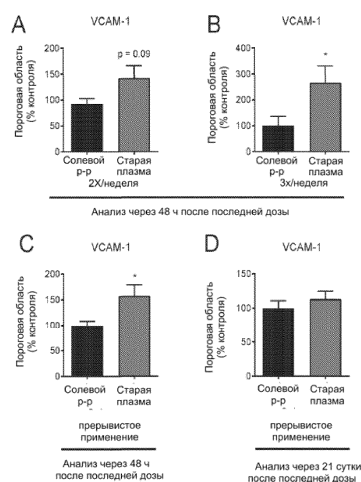
Фиг. 21



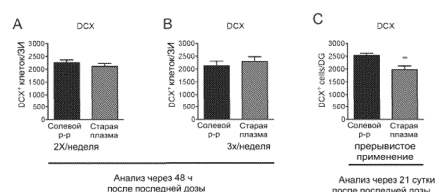
Фиг. 22



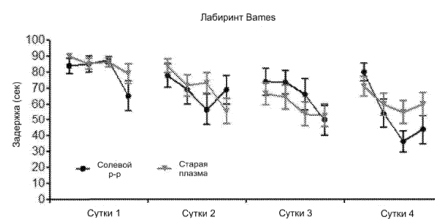
Фиг. 23



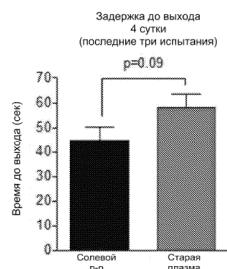
Фиг. 24



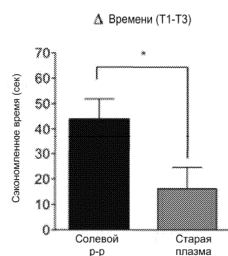
Фиг. 25



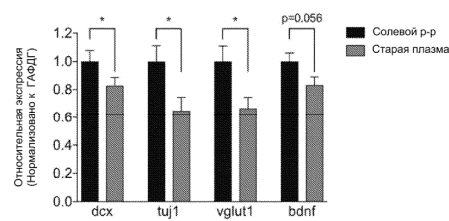
Фиг. 26



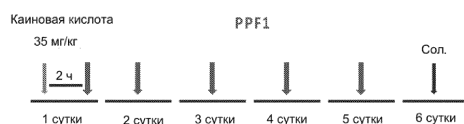
Фиг. 27



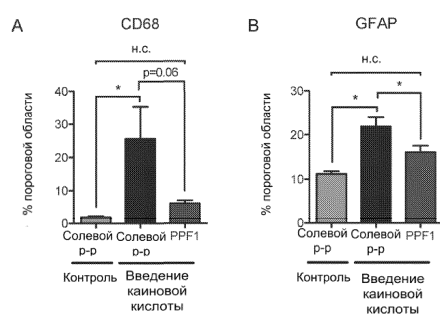
Фиг. 28



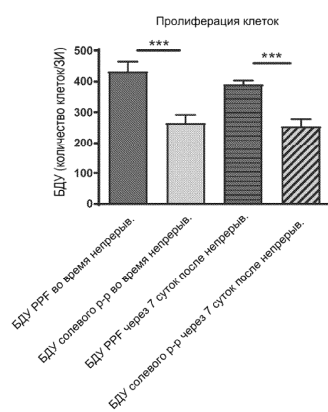
Фиг. 29



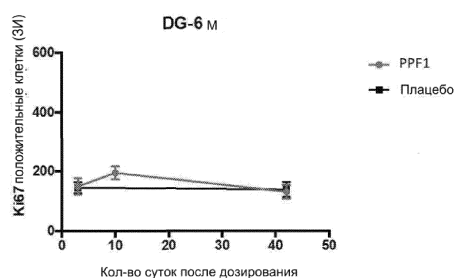
Фиг. 30



Фиг. 31



Фиг. 32

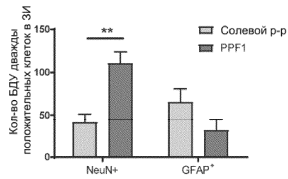


Фиг. 33

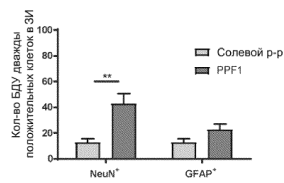


Фиг. 34

А

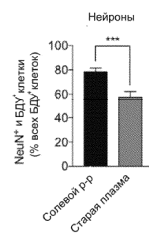


В

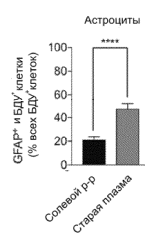


Фиг. 35

А

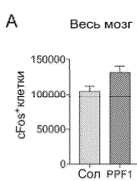


В

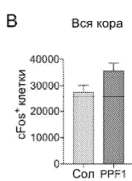


Фиг. 36

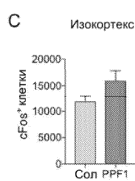
А



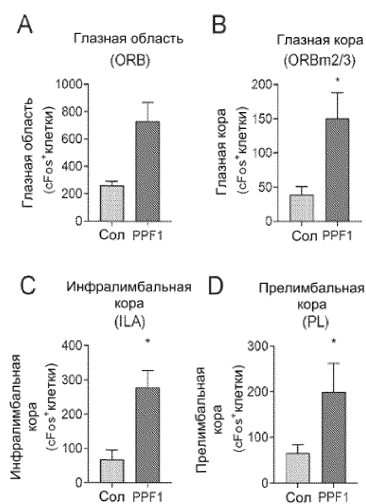
В



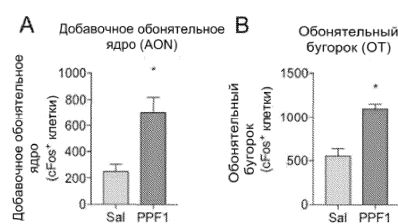
С



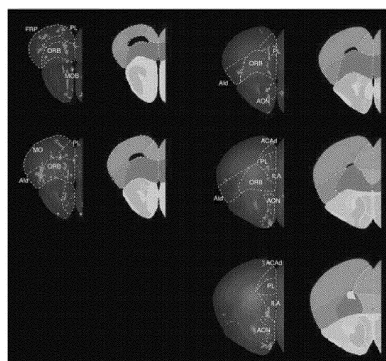
Фиг. 37



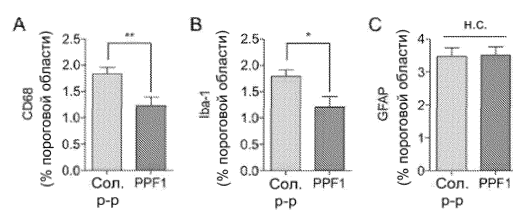
Фиг. 38



Фиг. 39

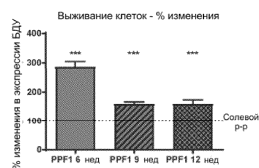


Фиг. 40

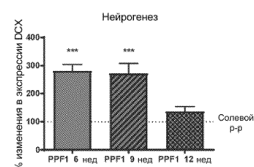


Фиг. 41

А

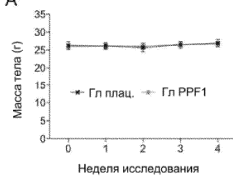


В

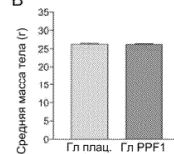


Фиг. 42

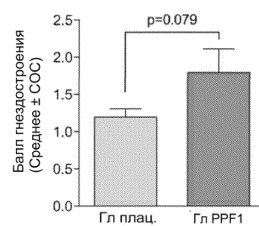
А



В

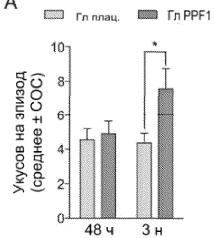


Фиг. 43

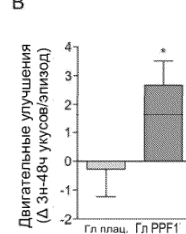


Фиг. 44

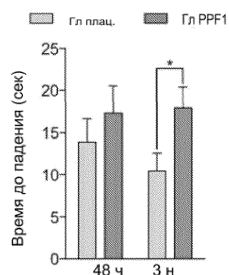
А



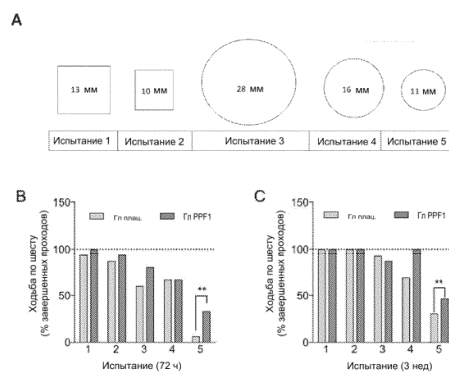
В



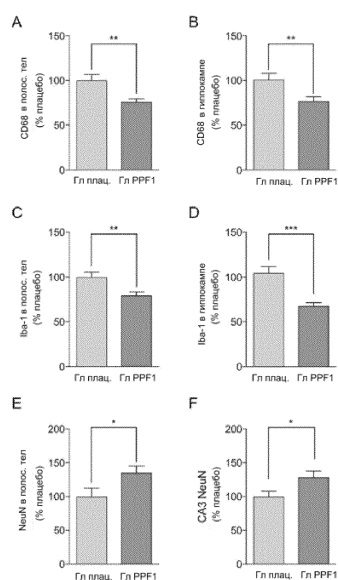
Фиг. 45



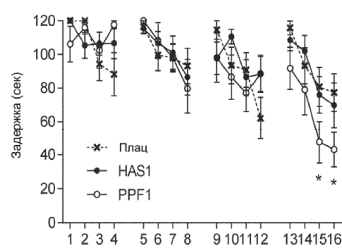
Фиг. 46



Фиг. 47



Фиг. 48



Фиг. 49

