MD/EP 3484502 T2 2022.01.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenţia de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **MD/EP 3484502** (13) **T2**

(51) Int. Cl:*A61K 35/16* (2015.01.01)
A61P 35/00 (2006.01.01)
A61P 25/28 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENŢIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2019 0622

(22) Data de depozit: 2017.04.27

(96) Numărul cererii şi data de depozit a cererii de brevet european: 17841780.4, 2017.04.27

(97) Numărul de publicare şi data publicării de către OEB a cererii de brevet european:3484502, 2019.05.22

(31) Numărul cererii prioritare: 201662376529 P; 201662412258 P

(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.08.18; 2016.10.24

(33) Ţara cererii prioritare: US; US

(49) Data publicării traducerii fascicului de brevet european validat: BOPI nr. 01/2022, 2022.01.31

(80) Data publicării menţiunii acordării de către OEB: EPB nr. 34/2021, 2021.08.25

(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 07/2019, 2019.07.31

(71) Solicitant: ALKAHEST, INC., US

(72) Inventatori: BELL David, ES; GALLAGER Ian, US; BRAITHWAITE Steven P., US; MINAMI S. Sakura, US; DANG Vu, US; MCCRACKEN Joe, US; NIKOLICH Karoly, US

(73) Titular: ALKAHEST, INC., US

(74) Mandatar autorizat: SOKOLOVA Sofia

MD/EP 3484502 T2 2022.01.31

(54) Fracţiuni de plasmă sanguină utilizate pentru tratamentul tulburărilor cognitive asociate cu îmbătrânirea

(57) Rezumat:

1

Sunt descrise metode şi compoziţii pentru tratarea şi/sau prevenirea afecţiunilor legate de îmbătrânire. Compoziţiile utilizate în metode includ fracţiuni derivate din plasma sanguină cu eficacitate în tratarea şi/sau

2

prevenirea afecţiunilor legate de îmbătrânire, cum ar fi tulburările neurocognitive.

Revendicări: 6

Figuri: 23

(54) Blood plasma fractions as a treatment for aging-associated cognitive disorders

(57) Abstract:

1

Methods and compositions for treating and/or preventing aging-related conditions are described. The compositions used in the methods include fractions derived from blood plasma with efficacy in treating and/or

2

preventing aging-related conditions such as neurocognitive disorders.

Claims: 6

Fig.: 23

Descriere:
(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)

DOMENIUL INVENŢIEI

Prezenta invenţie se referă la prevenirea şi tratarea bolii asociate cu îmbătrânirea. Invenţia se referă la utilizarea produşilor sanguini, cum ar fi fracţiuni de plasmă sanguină, pentru a trata şi/sau preveni afecţiuni asociate cu îmbătrânirea, cum ar fi tulburări neurocognitive şi neurodegenerative.

BAZA INVENŢIEI

Îmbătrânirea este un factor de risc important pentru mai multe boli umane, inclusiv deficienţă cognitivă, cancer, artrită, pierderea vederii, osteoporoză, diabet, boala cardiovasculară şi accident vascular cerebral. Pe lângă pierderea normală a sinapselor în timpul îmbătrânirii naturale, pierderea sinapselor este un eveniment patologic timpuriu comun pentru multe afecţiuni neurodegenerative şi este cea mai bună corelare cu deficienţa neuronală şi cognitivă asociată cu aceste afecţiuni. Astfel, îmbătrânirea rămâne cel mai dominant factor de risc pentru boli neurodegenerative legate de demenţă cum ar fi boala Alzheimer (AD) (Bishop, N.A. et al., Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. Nature 464(7288), 529-535 (2010); Heeden, T. et al., Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience. Nat. Rev. Neurosci. 5(2), 87-96 (2004); Mattson, M.P., et al., Ageing and neuronal vulnerability. Nat. Rev. Neurosci. 7(4), 278-294 (2006)). Îmbătrânirea afectează toate ţesuturile şi funcţiile corpului, inclusiv sistemul nervos central, şi un declin al funcţiilor precum cogniţia poate afecta sever calitatea vieţii. US 2014/328856 A1 descrie o compoziţie IgG pentru Alzheimer. WO 2009/155069 A1 specifică utilizarea unei compoziţii îmbogăţite cu trombocite pentru tratarea tulburărilor neurodegenerative. Tratamentul pentru declinul cognitiv şi tulburările neurodegenerative a avut însă succes limitat în prevenirea şi inversarea deficienţei. Este important aşadar să se identifice tratamente noi pentru menţinerea integrităţii cognitive prin protejare, contracararea sau inversarea efectelor îmbătrânirii.

REZUMAT

Obiectul invenţiei este definit de revendicările anexate.

Prezenta invenţie se bazează pe producerea şi utilizarea produşilor sanguini pentru tratarea şi/sau prevenirea tulburărilor legate de vârstă, cum ar fi afecţiuni cu deficienţă cognitivă, demenţă legată de vârstă şi boala neurodegenerativă. Prezenta invenţie recunoaşte, printre altele, nevoia de terapii noi pentru tratarea şi/sau prevenirea deficienţei cognitive, a demenţei legate de vârstă şi a bolii neurodegenerative. Obţinute din sânge şi plasmă sanguină, compoziţiile din prezenta se referă la o soluţie pentru eşecurile şi neajunsurile terapiilor curente prin utilizarea fracţiunilor plasmatice sanguine care prezintă eficienţă în tratarea şi/sau prevenirea deficienţei cognitive, a demenţei legate de vârstă şi a bolii neurodegenerative. În plus, prezenta invenţie se referă la proteine identificate în fracţiuni plasmatice sanguine care pot prezenta eficienţă ca tratamente sau agenţi de prevenire pentru deficienţa cognitivă şi demenţa legată de vârstă sau reprezintă ţinte pentru inhibare de către agenţi suplimentari.

Prezenta invenţie recunoaşte de asemenea că diferenţele legate de conţinutul de proteine între fracţiuni plasmatice sanguine diferite (de ex. fracţiuni, efluenţi, "fracţiuni de plasmă", fracţiune de proteine plasmatice, soluţie de albumină umană) pot fi responsabile de prevenirea şi/sau îmbunătăţirea anumitor deficienţe cognitive şi ameliorarea bolii neurodegenerative. Exemplificativ şi nelimitativ, aplicările prezentei invenţii demonstrează că doar o concentraţie mai mare de albumină a preparatelor de soluţie de albumină umană (HAS) nu reprezintă forţa motrice din spatele cogniţiei îmbunătăţite asociate cu preparatele de fracţiune proteică plasmatică (PPF) cu concentraţii mai mici de albumină.

Sângele şi plasma sanguină de la donatori tineri au prezentat îmbunătăţire şi inversare a efectelor pre-existente ale îmbătrânirii creierului, inclusiv la nivel molecular, structural, funcţional şi cognitiv. (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)). Prezenta invenţie se referă la fracţiuni şi efluenţi din plasma sanguină, dintre care unii s-au utilizat în mod tradiţional pentru tratarea şocului, şi la descoperirea că sunt eficienţi ca metode de tratare a deficienţei cognitive asociate cu îmbătrânirea.

Conform unor aspecte ale invenţiei, se prevăd fracţiuni de produşi sanguini din plasma sanguină pentru utilizare în tratarea deficienţei cognitive asociate cu îmbătrânirea, a demenţei legate de vârstă şi/sau a bolii neurodegenerative. Aspectele utilizării pentru tratament includ administrarea unei fracţiuni de plasmă sanguină la un individ care suferă sau prezintă risc de dezvoltare a deficienţei cognitive asociate cu îmbătrânirea sau a bolii neurodegenerative. Alte aspecte ale utilizării includ administrarea unei fracţiuni de plasmă sanguină obţinute de la un grup de donatori având un interval specific al vârstei la un individ care suferă sau prezintă risc de dezvoltare a deficienţei cognitive asociate cu îmbătrânirea. Se divulgă de asemenea reactivi, dispozitive şi kituri care îşi găsesc utilizare în punerea în practică a metodelor din prezenta.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Desenele anexate ilustrează aplicări ale invenţiei şi, împreună cu descrierea, ajută la explicarea invenţiei. Aceste desene sunt prezentate ilustrativ şi nelimitativ: se menţionează că diferitele elemente ale desenelor pot să nu fie reprezentate la scară.

Figura 1. Figura 1 indică timpul petrecut în poziţie ridicată al şoarecilor NSG în vârstă de 3 luni sau 13 luni trataţi cu control, PPF1 sau HAS1 amplasaţi într-o cameră în câmp deschis timp de 15 minute.

Figura 2. Figura 2 indică viteza de mişcare a şoarecilor NSG în vârstă de 3 luni sau 13 luni trataţi cu control, PPF1 sau HAS1 amplasaţi într-o cameră în câmp deschis timp de 15 minute.

Figura 3. Figura 3 indică distanţa parcursă de şoareci NSG în vârstă de 3 luni sau 13 luni trataţi cu control, PPF1 sau HAS1 amplasaţi într-o cameră în câmp deschis timp de 15 minute.

Figura 4. Figura 4 indică timpul petrecut în braţul nou de către şoarecii NSG în vârstă de 3 luni sau 13 luni în testul labirintului Y cu repere care au fost trataţi cu control, PPF1 sau HAS1.

Figura 5. Figura 5 indică raportul de timp petrecut de şoarecii NSG în vârstă de 3 luni sau 13 luni în braţele noi faţă de cele familiare (raport nou:familiar) în testul labirintului Y cu repere, şoarecii fiind trataţi cu control, PPF1 sau HAS1.

Figura 6. Figura 6 indică viteza de mişcare a şoarecilor NSG în vârstă de 3 luni sau 13 luni trataţi cu control, PPF1 sau HAS1 în testul labirintului Y cu repere.

Figura 7. Figura 7 indică distanţa parcursă de şoarecii NSG în vârstă de 3 luni sau 13 luni în testul labirintului Y cu repere, şoarecii fiind trataţi cu control, PPF1 sau HAS1.

Figura 8A. Figura 8A indică procentajul de timp în poziţie nemişcată în testul de condiţionare a fricii contextuale cu privire la memorie la şoareci NSG în vârstă de 3 luni şi 13 luni trataţi cu control, PPF1 sau HAS1.

Figura 8B. Figura 8B indică procentajul de timp în poziţie nemişcată în testul de condiţionare a fricii cu repere auditive cu privire la memorie la şoareci NSG în vârstă de 3 luni şi 13 luni trataţi cu control, PPF1 sau HAS1.

Figura 9. Figura 9 cuantifică procentajul de timp în poziţie nemişcată în ultimele 90 de secunde ale testului de condiţionare a fricii cu repere cu privire la memorie la şoareci NSG în vârstă de 3 luni şi 13 luni trataţi cu control, PPF1 sau HAS1.

Figura 10A. Figura 10A reprezintă latenţa în labirintul Barnes care testează memoria spaţială. Se raportează latenţa până la găsirea găurii ţintă a şoarecilor NSG în vârstă de 3 luni şi 13 luni trataţi cu control, PPF1 sau HAS1.

Figura 10B. Figura 10B cuantifică media ultimelor 3 teste indicate în Figura 10A.

Figura 11A. Figura 11A cuantifică numărul celulelor cu colorare pozitivă pentru Doublecortin (Dcx), un marker pentru neuronii nou născuţilor în girusul dentat al şoarecilor NSG în vârstă de 3 luni şi 13 luni trataţi cu control, PPF1 sau HAS1 de două ori pe săptămână până la 6 luni.

Figura 11B. Figura 11B cuantifică numărul celulelor cu colorare pozitivă pentru Ki67, un marker pentru celulele care se înmulţesc în girusul dentat al şoarecilor NSG în vârstă de 3 luni şi 13 luni trataţi cu control, PPF1 sau HAS1 de două ori pe săptămână până la 6 luni.

Figura 12. Figura 12 cuantifică numărul celulelor cu colorare pozitivă pentru Dcx la şoareci NSG în vârstă de 13 luni trataţi cu control, PPF1, 1X HAS1 concentrat sau 5X HAS1 concentrat de trei ori pe săptămână timp de cinci săptămâni.

Figura 13. Figura 13 cuantifică numărul celulelor cu colorare pozitivă pentru Ki67 la şoareci NSG în vârstă de 13 luni trataţi cu control, PPF1, 1X HAS1 concentrat sau 5X HAS1 concentrat de trei ori pe săptămână timp de cinci săptămâni.

Figura 14A. Figura 14A indică numărul perioadelor de ridicare într-o cameră în câmp deschis la şoareci NODscid trataţi de două ori pe săptămână prin injecţie intravenoasă în vena din coadă cu ser fiziologic (control) sau PPF1 începând cu vârsta de 6 luni. Ridicarea s-a măsurat pe o perioadă de 15 minute după introducerea şoarecilor în camera în câmp deschis.

Figura 14B. Figura 14B raportează viteza de mişcare într-o cameră în câmp deschis a şoarecilor trataţi de două ori pe săptămână prin injecţie intravenoasă în vena din coadă cu ser fiziologic (control) sau PPF1 începând cu vârsta de 6 luni. Viteza s-a măsurat pe o perioadă de 15 minute după introducerea şoarecilor în camera în câmp deschis.

Figura 14C. Figura 14C raportează distanţa parcursă într-o cameră în câmp deschis de şoareci trataţi de două ori pe săptămână prin injecţie intravenoasă în vena din coadă cu ser fiziologic (control) sau PPF1 începând cu vârsta de 6 luni. Viteza s-a măsurat pe o perioadă de 15 minute după introducerea şoarecilor în camera în câmp deschis.

Figura 15. Figura 15 indică latenţa în labirintul Barnes şi învăţarea şi memoria spaţială dependentă de hipocamp. Se raportează latenţa până la găsirea găurii ţintă a şoarecilor NSG în vârstă (12 luni) trataţi cu 150 µL ser fiziologic de control, plasmă tânără, efluent I sau efluent II/III.

Figura 16. Figura 16 raportează efectul plasmei umane tinere, PPF1 şi al serului fiziologic de control asupra învăţării şi memoriei spaţiale dependente de hipocamp la şoareci NSG masculi în vârstă (12 luni). Şoarecii au fost trataţi cu 150 µL de plasmă umană tânără limpezită (plasmă tânără), PPF1 sau ser fiziologic de trei ori pe săptămână (i.v.) timp de 4 săptămâni, apoi de două ori pe săptămână în săptămânile 5 şi 6, acestea fiind săptămânile în care s-a efectuat testarea. Se raportează latenţa până la găsirea găurii labirintului Barnes pentru fiecare grup de tratament.

Figura 17. Figura 17 raportează efectul plasmei umane tinere, PPF1 şi al serului fiziologic de control asupra latenţei medii de găsire a găurii ţintă a labirintului Barnes pentru ultimele trei teste pentru fiecare zi de testare. Şoarecii NSG în vârstă (12 luni) au fost trataţi cu 150 µL de plasmă umană tânără limpezită (plasmă tânără), PPF1 sau ser fiziologic de trei ori pe săptămână (i.v.) timp de 4 săptămâni, şi apoi de două ori pe săptămână în săptămânile 5 şi 6, acestea fiind săptămânile în care s-a efectuat testarea.

Figura 18. Figura 18 raportează efectul plasmei umane tinere, PPF1 şi al serului fiziologic de control asupra supravieţuirii celulelor, determinat prin detecţia BrdU. Şoarecii NSG în vârstă (12 luni) au fost trataţi cu 150 µL de plasmă umană tânără limpezită (plasmă tânără), PPF1 sau ser fiziologic de trei ori pe săptămână (i.v.) timp de 4 săptămâni, şi apoi de două ori pe săptămână în săptămânile 5 şi 6, acestea fiind săptămânile în care s-a efectuat testarea comportamentală. Secţiunile de hipocamp s-au analizat după sacrificare.

Figura 19. Figura 19 indică efectele controlului, PPF1 şi HAS1 asupra proliferării neurosferelor în cultura corticală. Figura indică imagini exemplificative ale neurosferelor din culturi corticale după 21 de zile in vitro, reprezentate pentru Tuj1, DAPI sau Tuj1 şi DAPI.

Figura 20. Figura 20 indică efectele controlului, PPF1 şi HAS1 asupra lungimii procesului neuronal în cultura corticală.

Figura 21. Figura 21 indică efectele vehiculului, PPF1 şi HAS1 asupra creşterii sferelor şi procesului în cultura corticală. Colorarea cu galben evidenţiază sferele şi colorarea cu roz evidenţiază procesul neuronal determinat printr-un algoritm de software IncuCyte (Essen BioScience, Inc., Ann Arbor, MI).

Figura 22A. Figura 22A reprezintă cuantificarea numărului de neurosfere ca procentaj de vehicul din cortexurile embrionilor de şoarece E14-15 suspendaţi în mediu bazal neural suplimentat cu B27 şi 2 mM Glutamax (vehicul), PPF1 (10% dintr-o soluţie de bază 5%) sau HAS1 (10% dintr-o soluţie de bază 5%).

Figura 22B. Figura 21B reprezintă cuantificarea lungimii procesului neuronal ca procentaj de vehicul din cortexurile embrionilor de şoarece E14-15 suspendaţi în mediu bazal neural suplimentat cu B27 şi 2 mM Glutamax (vehicul), PPF1 (10% dintr-o soluţie de bază 5%) sau HAS1 (10% dintr-o soluţie de bază 5%).

Figura 22C. Figura 21C reprezintă cuantificarea punctelor de ramificare a procesului neuronal ca procentaj de vehicul din cortexurile embrionilor de şoarece E14-15 suspendaţi în mediu bazal neural suplimentat cu B27 şi 2 mM Glutamax (vehicul), PPF1 (10% dintr-o soluţie de bază 5%) sau HAS1 (10% dintr-o soluţie de bază 5%).

Figura 22D. Figura 22D reprezintă cuantificarea dimensiunii neurosferelor ca procentaj de vehicul din cortexurile embrionilor de şoarece E14-15 suspendaţi în mediu bazal neural suplimentat cu B27 şi 2 mM Glutamax (vehicul), PPF1 (10% dintr-o soluţie de bază 5%) sau HAS1 (10% dintr-o soluţie de bază 5%).

Figura 23. Figura 23 reprezintă cuantificarea numărului de neurosfere cu colorare pozitivă pentru Sox2, care s-au tratat cu vehicul de control (mediu bazal neural suplimentat cu B27 şi 2 mM Glutamax), PPF1 (10% dintr-o soluţie de bază 5%) sau HAS1 (10% dintr-o soluţie de bază 5%). Colorarea Sox2 este un indicator al unui potenţial al neurosferelor pentru neurogeneză.

DESCRIERE DETALIATĂ

1. Introducere

Prezenta invenţie se referă la identificarea şi descoperirea metodelor şi compoziţiilor pentru tratarea şi/sau prevenirea deficienţei cognitive, inclusiv demenţa asociată cu vârsta şi boala neurodegenerativă. Se descriu în prezenta metode şi compoziţii pentru tratarea subiecţilor care suferă de astfel de tulburări. Utilizările şi compoziţiile descrise în prezenta sunt utile în: prevenirea deficienţei cognitive, demenţei asociate cu vârsta şi bolii neurodegenerative; ameliorarea simptomelor deficienţei cognitive, demenţei asociate cu vârsta şi bolii neurodegenerative; încetinirea evoluţiei deficienţei cognitive asociate cu îmbătrânirea, demenţei asociate cu vârsta şi bolii neurodegenerative; şi/sau inversarea evoluţiei deficienţei cognitive asociate cu îmbătrânirea, demenţei asociate cu vârsta şi bolii neurodegenerative. O implementare a descrierii include utilizarea fracţiunilor plasmatice sanguine pentru tratament, cum ar fi una sau mai multe fracţiuni sau efluenţi care se obţin din procese de fracţionare sanguină, de ex., procesul de fracţionare Cohn descris mai jos. Descrierea include utilizarea fracţiunii plasmatice (o soluţie alcătuită din albumină umană normală, globuline alpha şi beta, globulină gamma şi alte proteine în mod individual sau sub formă de complecşi, denumită în continuare "fracţiune plasmatică"). În plus, descrierea include utilizarea fracţiunii proteice plasmatice (PPF) sau a fracţiunii de soluţie de albumină umană (HAS) ca tratament. Descrierea include utilizarea efluenţilor din procese de

fracţionare sanguină cum ar fi efluentul I sau efluentul II/III descrişi mai jos. În plus, se poate folosi o fracţiune de plasmă sanguină din care s-au îndepărtat în mare măsură toţi factorii coagulanţi pentru a reţine eficienţa şi pentru a reduce în acelaşi timp eiscul de tromboze (de exemplu, vezi cererea de brevet U.S. nr. 62/236,710).

Se va înţelege că terminologia folosită în prezenta are scopul de a descrie nelimitativ doar anumite aplicări, obiectul prezentei invenţii fiind limitat numai de revendicările anexate.

Acolo unde se prevede un interval de valori, se va înţelege că este divulgată în mod specific fiecare valoare din acel interval, până la zecimea unităţii limitei inferioare, dacă nu se indică altceva în context, între limita superioară şi cea inferioară a acelui interval. Este inclus în invenţie fiecare interval mai mic între orice valoare menţionată sau o valoare inclusă într-un interval menţionat şi orice valoare menţionată sau inclusă în intervalul respectiv. Limita superioară şi cea inferioară ale acestor intervale mai mici pot fi incluse sau excluse în mod independent din interval şi este inclus în invenţie fiecare interval în care se includ una, nici una sau ambele limite în intervalele mai mici, sub rezerva oricărei limite excluse în mod specific în intervalul menţionat. Acolo unde intervalul menţionat include una sau ambele limite, sunt incluse în invenţie şi intervalele care exclud una sau ambele limite incluse.

2. Definiţii

Dacă nu se definesc în alt mod, toţi termenii tehnici şi ştiinţifici folosiţi în prezenta au sensul înţeles în mod uzual în domeniu. Deşi se pot utiliza metode şi materiale similare sau echivalente cu cele descrise în prezenta în punerea în practică sau testarea prezentei invenţii, se descriu acum câteva metode şi materiale posibile şi preferate.

Trebuie menţionat că, în sensul folosit în prezenta şi în revendicările anexate, formele de singular "un" şi "o" includ şi pluralul dacă nu se indică altceva în mod evident în context. Astfel, de exemplu, referirea la "o celulă" include mai multe astfel de celule şi referirea la "peptidă" include una sau mai multe peptide şi echivalenţe ale acestora, de ex. polipeptide, cunoscute în domeniu etc..

În descrierea metodelor, termenii "gazdă", "subiect", "individ" şi "pacient" se folosesc interschimbabil şi se referă la orice mamifer care necesită un astfel de tratament conform metodelor divulgate. Aceste mamifere includ, de ex., oameni, ovine, bovine, cabaline, porcine, canine, feline, primate, şoareci şi şobolani. În anumite aplicări, subiectul este un mamifer non-uman. În unele aplicări, subiectul este un animal de fermă. În alte aplicări, subiectul este un animal de companie. În unele aplicări, subiectul este mamifer. În anumite cazuri, subiectul este uman. Alţi subiecţi pot include animale domestice (de ex., câini şi pisici), animale de fermă (de ex., vite, porci, capre, cai etc.), rozătoare (de ex., şoareci, cobai şi şobolani, de ex., cum ar fi în modele animale de boală), precum şi primate non-umane (de ex., cimpanzei şi maimuţe). Astfel, subiecţii includ nelimitativ mamifere, de ex., oameni şi alte primatee, cum ar fi cimpanzei şi alte specii de maimuţe; etc., în anumite aplicări subiecţii fiind oameni. Termenul subiect include şi o persoană sau un organism de orice vârstă, greutate sau alte caracteristici fizice, unde subiectul poate fi un adult, un copil, un sugar sau un nou născut.

Prin "tânăr" sau "individ tânăr" se înţelege un individ având vârsta cronologică de 40 de ani sau mai puţin, de ex., 35 de ani sau mai puţin, inclusiv 30 de ani sau mai puţin, de ex., 25 de ani sau mai puţin sau 22 de ani sau mai puţin. În unele cazuri, individul reprezentând sursa de produs sanguin cuprinzând plasmă tânără are 10 ani sau mai puţin, de ex., 5 ani sau mai puţin, inclusiv 1 an sau mai puţin. În unele cazuri, subiectul este un nou născut şi sursa de produs plasmatic este cordonul ombilical, unde produsul plasmatic este recoltat din cordonul ombilical al nou născutului. Prin urmare, "tânăr" şi "individ tânăr" se pot referi la un subiect cu vârsta între 0 şi 40 de ani, de ex., 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 sau 40 de ani. În alte cazuri, "tânăr" şi "individ tânăr" se pot referi la o vârstă biologică (spre deosebire de cea cronologică) cum ar fi un individ care nu a prezentat nivelurile de citokine inflamatorii în plasmă prezentate de indivizi mai în vârstă. Invers, "tânăr" şi "individ tânăr" se pot referi la la o vârstă biologică (spre deosebire de cea cronologică) cum ar fi un individ care prezintă niveluri mai mari de citokine anti-inflamatorii în plasmă comparativ cu nivelurile indivizilor mai în vârstă. Exemplificativ şi nelimitativ, citokina inflamatoare este Eotaxin şi diferenţa dintre un subiect tânăr sau individ tânăr şi indivizi mai în vârstă este de cel puţin 20%. În mod similar, diferenţa dintre indivizi mai în vârstă şi mai tineri cu privire la alte citokine inflamatorii se poate folosi pentru referire la o vârstă biologică. *(vezi* cererea de brevet U.S. Pat. nr. 13/575,437). De obicei, individul este sănătos, de ex., individul nu are malignitate hematologică sau boală autoimună la momentul recoltării.

Prin "un individ care suferă sau prezintă risc de deficienţă cognitivă asociată cu îmbătrânirea" se înţelege un individ care a trecut de 50% din durata estimată a vieţii, cum ar fi mai mult de 60%, *de ex.,* mai mult de 70%, cum ar fi mai mult de 75%, 80%, 85%, 90%, 95% sau chiar 99% din durata estimată a vieţii. Vârsta individului va depinde de specia în cauză. Astfel, acest procentaj se bazează pe speranţa de viaţă estimată a speciei respective. De exemplu, la om, un astfel de individ are vârsta de 50 de ani sau mai mult, *de ex.,* 60 de ani sau mai mult, 70 de ani sau mai mult, 80 de ani sau mai mult, 90 de ani sau mai mult, şi de obicei nu mai mult de 100 de ani, cum ar fi 90 de ani., *i.e.,* între vârstele de aproximativ 50 şi 100, *de ex.,* 50... 55... 60... 65... 70... 75... 80... 85... 90... 95... 100 de ani sau mai mult sau orice vârstă

între 50 - 1000, care suferă de o afecţiune asociată cu îmbătrânirea descrisă mai jos, de ex., deficienţa cognitivă asociată cu procesul natural de îmbătrânire; un individ de aproximativ 50 de ani sau mai mult, *de ex.,* 60 de ani sau mai mult, 70 de ani sau mai mult, 80 de ani sau mai mult, 90 de ani sau mai mult, şi de obicei nu mai mult de 100 de ani, *i.e.,* între vârstele de aproximativ 50 şi 100, *de ex.,* 50... 55... 60... 65... 70... 75... 80... 85... 90... 95 . . . 100 de ani, care nu a început încă să manifeste simptome ale unei afecţiuni asociate cu îmbătrânirea *de ex.*, deficienţa cognitivă; un individ de orice vârstă care suferă de o deficienţă cognitivă din cauza unei boli asociate cu îmbătrânirea, descrise mai jos, şi un individ de orice vârstă care a fost diagnosticat cu o boală asociată cu îmbătrânirea însoţită în mod tipic de deficienţă cognitivă, unde individul nu a început încă să manifeste simptome ale deficienţei cognitive. Vârstele corespondente ale subiecţilor non-umani sunt cunoscute şi se aplică în prezenta.

În sensul folosit în prezenta, "tratament" se referă la oricare dintre (i) prevenirea bolii sau tulburării sau (ii) reducerea sau eliminarea simptomelor bolii sau tulburării. Tratamentul poate fi efectuat profilactic (înaintea declanşării bolii) sau terapeutic (în urma declanşării bolii). Efectul poate fi profilactic prin prevenirea completă sau parţială a unei boli sau a unui simptom al acesteia şi/sau poate fi terapeutic printr-o vindecare parţială sau completă a unei boli şi/sau a unui efect advers atribuibil bolii. Astfel, termenul "tratament", în sensul folosit în prezenta, acoperă orice tratament al unei boli sau tulburări legate de vârstă la un mamifer şi include: (a) prevenirea apariţiei bolii la un subiect care poate fi predispus la boală, dar care nu a fost încă diagnosticat cu aceasta; (b) inhibarea bolii, i.e., oprirea evoluţiei acesteia; sau (c) ameliorarea bolii, i.e., determinarea regresiunii acesteia. Tratamentul poate duce la o varietate de manifestări fizice diferite, de ex., modularea expresiei genice, întinerirea ţesuturilor sau organelor etc.. Agentul terapeutic se poate administra înaintea, în timpul sau în urma declanşării bolii. Tratamentul bolii în curs, unde tratamentul stabilizează sau reduce simptomele clinice indezirabile ale pacientului, este deosebit de interesant. Un astfel de tratament poate fi efectuat înainte de pierderea completă a funcţiei în ţesuturile afectate. Terapia se poate administra în timpul stadiului simptomatic al bolii şi, în unele cazuri, după stadiul simptomatic al bolii.

În unele aplicări, afecţiunea asociată cu îmbătrânirea tratată este o deficienţă asociată cu îmbătrânirea a capacităţii cognitive a unui individ. Prin capacitate cognitivă sau "cogniţie" se înţeleg procesele mentale care includ atenţia şi concentrarea, activităţile şi conceptele complexe de învăţare, memoria (dobândire, reţinere şi recuperarea informaţiilor noi pe termen scurt şi/sau lung), procesarea informaţiilor (abordarea informaţiilor colectate prin cele cinci simţuri), funcţia vizuală spaţială (percepţie vizuală, percepţia adâncimii, folosirea imaginilor mentale, copierea desenelor, construirea obiectelor sau formelor), prezentarea şi înţelegerea limbajului, fluenţa verbală (găsirea cuvintelor), rezolvarea problemelor, luarea deciziilor şi funcţii executorii (planificare şi prioritizare). Prin "declin cognitiv" se înţelege o scădere progresivă a uneia sau mai multora dintre aceste capacităţi, de ex., o scădere de memorie, limbaj, gândire, judecată etc.. Prin "o deficienţă a capacităţii cognitive" şi "deficienţă cognitivă" se înţelege o scădere a capacităţii cognitive faţă de un individ sănătos, de ex., un individ sănătos cu vârstă echivalentă, sau faţă de capacitatea individului la un moment anterior, de ex., înainte cu 2 săptămâni, 1 lună, 2 luni, 3 luni, 6 luni, 1 an, 2 ani, 5 ani sau 10 ani sau mai mult. Prin "deficienţă cognitivă asociată cu îmbătrânirea" se înţelege o deficienţă a capacităţii cognitive care este asociată în mod tipic cu îmbătrânirea, inclusiv, de exemplu, deficienţa cognitivă asociată cu procesul natural al îmbătrânirii, de ex., deficienţa cognitivă uşoară (M.C.I.); şi deficienţa cognitivă asociată cu o tulburare asociată cu îmbătrânirea, adică o tulburare observată mai frecvent odată cu înaintarea în vârstă, de ex., o afecţiune neurodegenerativă cum ar fi boala Alzheimer, boala Parkinson, demenţa frontotemporală, boala Huntington, scleroza laterală amiotrofică, scleroza multiplă, glaucom, distrofia miotonică, demenţa vasculară etc..

Produşi sanguini cuprinzând componente plasmatice. În punerea în practică a metodelor din prezenta, produşii sanguini cuprinzând componente plasmatice se utilizează în tratarea unei deficienţe cognitive, unde produsul sanguin cuprinzând componente plasmatice se administrează unui individ în nevoie, de ex., unui individ care suferă sau prezintă risc de o deficienţă cognitivă şi/sau demenţă legată de vârstă. Astfel, utilizarea unui produs sanguin include administrarea unui produs sanguin cuprinzând componente plasmatice de la un individ ("individ donator" sau "donator") la un individ care cel puţin prezintă risc sau suferă de deficienţă cognitivă şi/sau demenţă legată de vârstă ("individ primitor" sau "primitor"). Prin "produs sanguin cuprinzând componente plasmatice" se înţelege orice produs derivat din sânge care conţine plasmă (de ex. sânge integral, plasmă sanguină sau fracţiuni ale acesteia). Termenul "plasmă' se utilizează în sensul său convenţional şi se referă la componenta lichidă de culoare gălbuie a sângelui alcătuită din circa 92% apă, 7% proteine cum ar fi albumină, globulină gamma, factor anti-hemofilic şi alţi factori coagulanţi, şi 1% săruri minerale, zaharuri, grăsimi, hormoni şi vitamine. Exemplele nelimitative de produşi sanguini cuprinzând plasmă adecvaţi pentru utilizare în metodele din prezenta includ sânge integral tratat cu anti-coagulant (de ex., EDTA, citrat, oxalat, heparină etc.), produşi sanguini obţinuţi prin filtrarea sângelui integral pentru îndepărtarea globulelor albe ("reducerea leucocitelor"), produşi sanguini constând din plasmă obţinută plasmaferetic sau aferetic, plasmă

proaspătăt congelată, produşi sanguini constând în esenţă din plasmă purificată şi produşi sanguini constând în esenţă din fracţiuni plasmatice. În unele cazuri, produsul plasmatic folosit este un produs plasmatic care nu se obţine din sânge integral, adică produsul nu este sânge integral prin aceea că îi lipsesc una sau mai multe componente care se găsesc în sânge integral, cum ar fi eritrocite, leucocite etc., cel puţin în măsura în care aceste componente sunt prezente în sângele integral. În unele cazuri, produsul plasmatic este în mare măsură, dacă nu complet, acelular, în aceste cazuri conţinutul celular putând fi de 5% din volum sau mai puţin, cum ar fi 1% sau mai puţin, inclusiv 0.5% sau mai puţin, unde, în unele cazuri, fracţiunile plasmatice acelulare sunt acele compoziţii cărora le lipsesc complet celulele, adică nu includ celule.

Colectarea produşilor sanguini cuprinzând componente plasmatice. Utilizarea produşilor sanguini descrişi în prezenta include administrarea produşilor sanguini cuprinzând componente plasmatice care pot proveni de la donatori, inclusiv voluntari umani. Termenul "derivat uman" se poate referi la astfel de produşi. Metodele de colectare a produşilor sanguini cuprinzând plasmă de la donatori sunt bine cunoscute în domeniu. (Vezi, de ex., AABB TECHNICAL MANUAL, (Mark A. Fung, et al., eds., ed. 18, 2014)).

Într-o aplicare, donaţiile se obţin prin venipuncţie. Într-o altă aplicare, venipuncţia este doar o singură venipuncţie. Într-o altă aplicare, nu se utilizează înlocuitor de volum cu ser fiziologic. Într-o aplicare, se utilizează procesul de plasmafereză pentru a obţine produşii sanguini cuprinzând plasmă. Plasmafereza poate cuprinde îndepărtarea unui volum de plasmă ajustat la greutate cu returnarea componentelor celulare la donator. Într-o aplicare, se utilizează citrat de sodiu în timpul plasmaferezei pentru a preveni coagularea celulară. Volumul de plasmă colectat de la un doantor este de preferinţă între 690 şi 880 mL după administrarea citratului şi de preferinţă se coordonează cu greutatea donatorului.

3. Fracţiuni plasmatice sanguine

În timpul celui de-al doilea război mondial a apărut o nevoie de expansor plasmatic stabil care să poată fi utilizat pe front când soldaţii pierdeau cantităţi mari de sânge. Prin urmare, s-au dezvoltat metode de preparare a plasmei liofilizate. Totuşi, utilizarea plasmei liofilizate a fost dificilă în situaţii de luptă fiindcă reconstituirea necesita apă sterilă. Ca o alternativă, Dr. E.J. Cohn a sugerat utilizarea albuminei şi a preparat o soluţie stabilă gata de utilizare care putea fi introdusă imediat pentru tratarea şocului. (*Vezi* JOHAN VANDERSANDE, CURRENT APPROACHES TO THE PREPARATION OF PLASMA FRACTIONS in (BIOTECHNOLOGY OF BLOOD) 165 (Jack Goldstein ed., 1st ed. 1991)). Procedura lui Dr. Cohn de purificare a fracţiunilor de plasmă a utilizat etanol rece pentru efectul său de denaturare şi foloseşte modificările de pH şi temperatură pentru separare.

Produşii sanguini descrişi în prezenta pentru utilizare în metodele descrise în prezenta includ administrarea fracţiunilor de plasmă la un subiect. Fracţionarea este procesul prin care anumite subseturi de proteine se separă din plasmă. Tehnologia de fracţionare este cunoscută în domeniu şi se bazează pe etapele dezvoltate de Cohn *et al.* în timpul anilor 1940. (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)). Sunt implicate mai multe etape în acest proces, fiecare etapă presupunând concentraţii specifice de etanol, precum şi modificări de pH, temperatură şi osmolalitate care duc la precipitare proteică selectivă. Precipitaţii se separă de asemenea prin centrifugare sau precipitare. "Procesul de fracţionare Cohn" original a cuprins separarea proteinelor prin precipitaţi în cinci fracţiuni, denumite fracţiunea I, fracţiunea II+III, fracţiunea IV-1, fracţiunea IV-4 şi fracţiunea V. Albumina a fost produsul final identificat iniţial (fracţiunea V) al acestui proces. Fiecare fracţiune (sau efluent dintr-o etapă de separare anterioară) conţine sau poate conţine fracţiuni proteice utile terapeutic. *(Vezi* Thierry Bumouf, 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); şi 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) şi brevetele U.S. nr. 3869431, 5110907, 5219995, 7531513 şi 8772461). Se poate efectua ajustarea parametrilor experimentali de mai sus pentru a obţine fracţiuni proteice specifice.

Mai recent, fracţionarea a atins o şi mai mare complexitate. Această creştere recentă a complexităţii a apărut prin: introducerea cromatografiei ducând la izolarea proteinelor noi de fracţiuni existente precum crioprecipitat, criosupernatant şi fracţiuni Cohn; creşterea recuperării IgG prin integrarea cromatografiei şi procesului de fracţionare a etanolului; şi reducerea/inactivarea/îndepărtarea virală. *(Id.)* Pentru captarea proteinelor la pH fiziologic şi concentraţie ionică, se poate utiliza cromatografie cu schimb de anioni. Aceasta conservează activitatea funcţională a proteinelor şi/sau fracţiunilor proteice. Se folosesc şi heparină şi anticorpi monoclonali în cromatografia de afinitate. Persoanele cu competenţe în domeniu vor recunoaşte că parametrii descrişi mai sus pot fi ajustaţi pentru a obţine fracţiuni conţinând proteine plasmatice dorite în mod specific.

Într-o aplicare a invenţiei, plasma sanguină este fracţionată într-un mediu industrial. Plasma congelată se dezgheaţă la 1°C până la 4°C. Centrifugarea la rece continuă se aplică pe plasma decongelată

şi crioprecipitatul este izolat. Crioprecipitatul recuperat este congelat la -30°C sau la o iemperatură mai mică şi se depozitează. Crioprecipitatul ("criosupernatant") este procesat imediat pentru captarea (de exemplu prin cromatografie primară) factorilor de coagulare labili cum ar fi complexul factorului IX şi componentele sale, precum şi inhibitori de protează cum ar fi antitrombina şi inhibitorul esterazei C1. Centrifugarea în serie şi izolarea precipitaţilor se pot aplica în etape consecutive. Aceste tehnici sunt cunoscute în domeniu şi sunt descrise, de exemplu, în brevetele U.S. nr. 4624780, 5219995, 5288853 şi cererile de brevet U.S. nr. 20140343255 şi 20150343025.

Într-o aplicare a invenţiei, fracţiunea plasmatică poate cuprinde o fracţiune de plasmă conţinând o concentraţie substanţială de albumină. Într-o altă aplicare, fracţiunea plasmatică poate cuprinde o fracţiune de plasmă conţinând o concentraţie substanţială de IgG sau imunoglobulină intravenoasă (IGIV) (de ex. Gamunex-C®). Într-o altă aplicare, fracţiunea plasmatică poate conţine o fracţiune de plasmă IGIV, cum ar fi Gamunex-C® care a fost epuizată substanţial de imunoglobulină (IgG) prin metode bine cunoscute în domeniu, cum ar fi de exemplu, depleţia mediată de proteina A. (Vezi Keshishian, H., et al., Multiplexed, Quantitative Workflow for Sensitive Biomarker Discovery in Plasma Yields Novel Candidates for Early Myocardial Injury, Molecular & Cellular Proteomics, 14 la 2375-93 (2015)). Într-o aplicare suplimentară, fracţiunea plasmatică sanguină poate fi una din care se îndepărtează în mare măsură toţi factorii de coagulare pentru a reţine fracţiunea cu risc redus de tromboze. De exemplu, fracţiunea plasmatică poate fi o fracţiune de plasmă descrisă în brevetul US nr. 62/376,529 depus în 18 august 2016.

4. Produşi de albumină

Pentru persoanele cu competenţe în domeniu există două categorii generale de produşi plasmatici de albumină ("APP"): fracţiune proteică plasmatică (PPF) şi soluţie de albumină umană (HAS). PPF se obţine dintr-un proces cu un randament mai mare decât HAS, dar are o puritate minimă mai mică a albuminei decât HAS (>83% pentru PPF şi > 95% pentru HAS). (Production of human albumin solution: a continually developing colloid, P. Matejtschuk et al., British J. of Anaesthesia 85(6): 887-95, la 888 (2000)). În plus, unii au remarcat că PPF are un dezavantaj din cauza prezenţei "contaminanţilor" proteici cum ar fi PKA. *Id.* În consecinţă, preparatele PPF şi-au pierdut popularitatea ca produşi plasmatici de albumină şi au fost chiar eliminate din farmacopeile unor ţări. *Id.* În contradicţie cu aceste preocupări, invenţia utilizează în mod benefic aceşti "contaminanţi". Pe lângă globulinele α, β şi γ, precum şi PKA menţionată anterior, metodele divulgate utilizează proteine suplimentare sau alţi factori din "contaminanţi" care favorizează procese cum ar fi neurogeneza, supravieţuirea celulelor neuronale şi cogniţie îmbunătăţită.

Persoanele cu competenţe în domeniu vor recunoaşte că există mai multe surse comerciale de PPF ("preparate PPF comerciale"). Acestea includ Plasma-Plex™ PPF (Armour Pharmaceutical Co., Tarrytown, NY), Plasmanate™ PPF (Grifols, Clayton, NC), Plasmatein™ (Alpha Therapeutics, Los Angeles, CA) şi Protenate™ PPF (Baxter Labs, Inc. Deerfield, IL).

Persoanele cu competenţe în domeniu vor recunoaşte de asemenea că există mai multe surse comerciale de HAS ("preparate HAS comerciale"). Acestea includ Albuminar™ (CSL Behring), AlbuRx™ (CSL Behring), Albutein™ (Grifols, Clayton, NC), Buminate™ (Baxatla, Inc., Bannockburn, IL), Flexbumin™ (Baxatla, Inc., Bannockburn, IL) şi Plasbumin™ (Grifols, Clayton, NC).

A. Fracţiune proteică plasmatică (umană) (PPF)

Conform Administraţiei SUA pentru Alimente şi Medicamente ("FDA"), "fracţiunea proteică plasmatică (umană)" sau PPF este denumirea corespunzătoare a produsului definit ca "o soluţie sterilă de proteină alcătuită din albumină şi globulină, derivate din plasma umană". (Code of Federal Regulations "CFR" 21 CFR 640.90). Materialul sursă al PPF este plasma recuperată din sânge integral preparată conform 21 CFR 640.1 - 640.5 sau plasma sursă preparată conform 21 CFR 640.60 - 640.76.

PPF este testată pentru a stabili că îndeplineşte următoarele standarde conform 21 CFR 640.92:

(a) Produsul final va fi o soluţie 5.0 +/- 0.30% de proteină; şi

(b) Proteina totală în produsul final va consta din cel puţin 83% albumină şi nu mai mult de 17% globuline. Maxim 1% din proteina totală va fi globulina gamma. Compoziţia proteică se determină printr-o metodă aprobată pentru fiecare producător de directorul Centrului de evaluare şi cercetare biologică, Administraţiei pentru Alimente şi Medicamente.

În sensul folosit în prezenta, "fracţiunea proteică plasmatică" sau "PPF" se referă la o soluţie sterilă de proteină alcătuită din albumină şi globulină, derivate din plasmă umană, cu un conţinut de albumină de cel puţin 83% şi nu mai mult de 17% globuline (inclusiv globuline α1, α2, β şi γ) şi alte proteine plasmatice, şi nu mai mult de 1% globulină gamma determinată prin electroforeză. (Hink, J.H., Jr., et al., Preparation and Properties of a Heat-Treated Human Plasma Protein Fraction, VOX SANGUINIS 2(174) (1957)). PPF se poate referi şi la o formă solidă care, când este suspendată în solvent, are compoziţie similară. Fracţiunea de globulină totală poate fi determinată scăzând albumina din

proteina totală. (Busher, J., Serum Albumin and Globulin, CLINICAL METHODS: THE HISTORY, PHYSICAL, and LABORATORY
EXAMINATIONS, Chapter 10, Walker HK, Hall WD, Hurst JD, eds. (1990)).

B. Albumina (umană) (HAS)

Conform FDA, "albumina (umană)" (denumită în prezenta şi "HAS") este denumirea corespunzătoare a produsului definit ca "soluţie sterilă de albumină derivată din plasmă umană". (Code of Federal Regulations "CFR" 21 CFR 640). Materialul sursă pentru albumină (umană) este plasma recuperată din sânge integral preparat conform 21 CFR 640.1-640.5 sau plasma sursă preparată conform 21 CFR 640.60-640.76. Alte cerinţe pentru albumina (umană) sunt indicate în 21 CFR 640.80 - 640.84.

Albumina (umană) este testată pentru a stabili că îndeplineşte următoarele standarde conform 21 CFR 640.82:

(a) *Concentraţie proteică.* Produsul final se va conforma uneia dintre următoarele concentraţii: 4.0 +/- 0.25%; 5.0 +/-0.30%; 20.0 +/-1.2%; şi 25.0 +/-1.5% soluţie proteină.

(b) *Compoziţie proteică.* Cel puţin 96% din proteina totală din produsul final va fi albumină, determinată printr-o metodă aprobată pentru fiecare producător de directorul Centrului de evaluare şi cercetare biologică, Administraţiei pentru Alimente şi Medicamente.

În sensul folosit în prezenta, "albumina (umană)" sau "HAS" se referă la o soluţie sterilă de proteină alcătuită din albumină şi globulină, derivate din plasma umană, cu un conţinut de albumină de cel puţin 95%, nu mai mult de 5% globuline (inclusiv globuline α1, α2, β şi γ) şi alte proteine plasmatice. HAS se poate referi de asemenea la o formă solidă care, suspendată într-un solvent, are compoziţie similară. Fracţiunea de globulină totală poate fi determinată scăzând albumina din proteina totală.

După cum vor recunoaşte persoanele cu competenţe în domeniu, fracţiunile PPF şi HAS pot fi de asemenea liofilizate sau în altă formă solidă. Aceste preparate, cu aditivi corespunzători, se pot folosi pentru a produce tablete, pulberi, granule sau capsule, de exemplu. Forma solidă poate fi realizată în preparate injectabile prin dizolvare, suspensie sau emulsionare într-un solvent apos sau neapos, cum ar fi ulei vegetal sau alte uleiuri similare, gliceride de acid alifatic sintetice, esteri ai acizilor alifatici superiori sau propilenglicol; şi, dacă se doreşte, cu aditivi convenţionali cum ar fi solubilizatori, agenţi izotonici, agenţi de suspensie, emulgatori, stabilizatori şi conservanţi.

5. Fracţiuni cu factori coagulanţi reduşi

În invenţie se utilizează o fracţiune de plasmă sanguină din care se îndepărtează în mare măsură toţi factorii de coagulare pentru a reţine eficienţa fracţiunii cu risc redus de tromboze. În mod convenabil, produsul sanguin poate proveni de la donator tânăr sau un grup de donatori tineri şi poate fi epuizat de IgM pentru a furniza un produs sanguin tânăr compatibil ABO. În prezent, plasma pentru transfuzie este compatibilă cu tipul sanguin ABO deoarece prezenţa anticorpilor naturalu la antigenele A şi B poate duce la reacţii de transfuzie. IgM pare să fie responsabilă de reacţiile de transfuzie când pacienţii primesc plasmă necompatibilă ABO. Îndepărtarea IgM din produşii sanguini sau fracţiuni ajută la eliminarea reacţiilor de transfuzie la subiecţi cărora li se administrează produşii sanguini şi fracţiunile plasmatice sanguine.

Prin urmare, se divulgă produşi sanguini pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a unei afecţiuni legate de îmbătrânire cum ar fi deficienţa cognitivă sau neurodegenerarea la un subiect. Metoda cuprinde: administrarea la subiect a unui produs sanguin sau a unei fracţiuni sanguine obţinute din sângele integral al unui individ sau grup de indivizi, unde produsul sanguin sau fracţiunea sanguină este în mare măsură lipsit(ă) de (a) cel puţin un factor de coagulare şi/sau (b) IgM. În unele aplicări, individul/indivizii de la care se obţine produsul sanguin sau fracţiunea sanguină sunt indivizi tineri. În unele aplicări, produsul sanguin este în mare măsură lipsit de cel puţin un factor de coagulare şi IgM. În anumite aplicări, produsul sanguin este în mare măsură lipsit de fibrinogen (Factor I). În alte aplicări, produsul sanguin este în mare măsură lipsit de eritrocite şi/sau leucocite. În alte aplicări, produsul sanguin este în mare măsură acelular. În alte aplicări, produsul sanguin este obţinut din plasmă. Aceste aplicări sunt divulgate şi în cererea de brevet U.S. nr. 62/376,529 depusă în 18 august 2016.

6. Produşi proteici plasmatici îmbogăţiţi cu proteine

Alte aplicări utilizează fracţiuni de plasmă cu concentraţie redusă a albuminei comparativ cu PPF, dar cu cantităţi crescute de globuline şi alte proteine plasmatice (denumite de unii "contaminanţi"). Aplicările, la fel ca PPF, HAS, efluentul I şi efluentul II/III, sunt toate efectiv lipsite de factori de coagulare. Aceste fracţiuni plasmatice sunt denumite în continuare "produşi proteici plasmatici îmbogăţiţi cu proteine". De exemplu, se poate folosi un produs proteic plasmatic îmbogăţit cu proteine alcătuit din 82% albumină şi 18% globuline α, β şi γ şi alte proteine plasmatice. O altă aplicare a descrierii poate folosi un produs proteic plasmatic îmbogăţit cu proteine alcătuit din 81% albumină şi 19% globuline α, β şi γ şi/sau alte proteine plasmatice. O altă aplicare poate folosi un produs proteic plasmatic îmbogăţit cu proteine alcătuit din 80% albumină şi 20% globuline α, β şi γ şi/sau alte proteine plasmatice. Alte aplicări

pot folosi produşi proteici plasmatici îmbogăţiţi cu proteine alcătuit din 70-79% albumină şi un procentaj corespunzător de 21-30% globuline α, β şi γ şi alte proteine plasmatice. Alte aplicări pot folosi produşi proteici plasmatici îmbogăţiţi cu proteine alcătuit din 60-69% albumină şi un procentaj corespunzător de 31-40% globuline α, β şi γ şi alte proteine plasmatice. Alte aplicări pot folosi produşi proteici plasmatici îmbogăţiţi cu proteine alcătuit din 50-59% albumină şi un procentaj corespunzător de 41-50% globuline α, β şi γ şi alte proteine plasmatice. Alte aplicări pot folosi produşi proteici plasmatici îmbogăţiţi cu proteine alcătuit din 40-49% albumină şi un procentaj corespunzător de 51-60% globuline α, β şi γ şi alte proteine plasmatice. Alte aplicări pot folosi produşi proteici plasmatici îmbogăţiţi cu proteine alcătuit din 30-39% albumină şi un procentaj corespunzător de 61-70% globuline α, β şi γ şi alte proteine plasmatice. Alte aplicări pot folosi produşi proteici plasmatici îmbogăţiţi cu proteine alcătuit din 20-29% albumină şi un procentaj corespunzător de 71-80% globuline α, β şi γ şi alte proteine plasmatice. Alte aplicări pot folosi produşi proteici plasmatici îmbogăţiţi cu proteine alcătuit din 10-19% albumină şi un procentaj corespunzător de 81-90% globuline α, β şi γ şi alte proteine plasmatice. Alte aplicări pot folosi produşi proteici plasmatici îmbogăţiţi cu proteine alcătuit din 1-9% albumină şi un procentaj corespunzător de 91-99% globuline α, β şi γ şi alte proteine plasmatice. O altă aplicare poate folosi produşi proteici plasmatici îmbogăţiţi cu proteine alcătuit din 0-1% albumină şi 99-100% globuline α, β şi γ şi alte proteine plasmatice.

Aplicările descrise mai sus pot avea de asemenea concentraţii de globulină gamma totală de 0-5%.

Concentraţiile specifice ale proteinelor într-o fracţiune de plasmă pot fi determinate folosind tehnici bine cunoscute în domeniul relevant. Exemplificativ şi nelimitativ, aceste tehnici includ electroforeza, spectrometria de masă, analiza ELISA şi analiza Western blot.

7. Prepararea fracţiunilor plasmatice sanguine

Metodele de preparare a PPF şi a altor fracţiuni plasmatice sunt bine cunoscute în domeniu. O aplicare a descrierii permite colectarea sângelui folosit în prepararea fracţiunii proteice plasmatice în recipiente cu citrat sau soluţie de citrat dextroză anticoagulantă pentru inhibarea coagulării, cu separarea mai departe a fracţiunilor I, II + III, IV şi PPF conform metodei descrise în Hink *et al. (Vezi* Hink, J.H., Jr., et al., Preparation and Properties of a Heat-Treated Human Plasma Protein Fraction, Vox SANGUINIS 2(174) (1957)). Conform acestei metode, amestecul poate fi colectat la 2 - 8°C. Plasma poate fi separată ulterior prin centrifugare la 7°C, îndepărtată şi depozitată la -20°C. Plasma poate fi apoi decongelată la 37°C şi fracţionată, de preferinţă în opt ore după îndepărtare de la depozitare la -20°C.

Plasma poate fi separată din fracţiunea I folosind 8% etanol la pH 7.2 şi o temperatură de -2 până la -2.5°C cu concentraţie proteică de 5.1 până la 5.6%. Se poate adăuga 53.3% etanol rece (176 mL/L de plasmă) cu tampon acetat (200 mL 4M acetat de sodiu, 230 mL acid acetic glacial *quantum satis* până la 1 L cu H_2O) folosind jeturi la o viteză, de exemplu, de 450 mL/minut în timpul coborârii temperaturii plasmei la -2°C. Fracţiunea I poate fi separată şi îndepărtată din efluent (Efluent I) prin ultracentrifugare. Se poate obţine fibrinogen din fracţiunea I conform metodelor bine cunoscute în domeniu.

Fracţiunea II + III poate fi separată din efluentul I prin ajustarea efluentului la 21% etanol la pH 6.8, temperatură de -6°C, cu concentraţie proteică de 4.3%. Se poate adăuga 95% etanol rece (176 mL/L de efluent I) cu 10 M acid acetic folosit pentru ajustarea pH folosind jeturi la o viteză, de exemplu, de 500 mL/minut în timpul coborârii temperaturii efluentului I la -6°C. Precipitatul rezultat (fracţiune II + III) poate fi îndepărtat prin centrifugare la -6°C. Globulina gamma poate fi obţinută din fracţiunea II + III folosind metode bine cunoscute în domeniu.

Fracţiunea IV-1 poate fi separată din efluentul II + III ("efluent II/III") prin ajustarea efluentului la 19% etanol la pH 5.2, temperatură de -6°C şi concentraţie proteică de 3%. H_2O şi 10 M acid acetic care se utilizează pentru ajustarea pH se pot adăuga folosind jeturi, menţinând efluentul II/III la -6°C timp de 6 ore. Fracţiunea VI-1 precipitată poate fi lăsată la -6°C 6 ore şi separată apoi din efluent prin centrifugare la aceeaşi temperatură. Fracţiunea proteică plasmatică stabilă poate fi recuperată din efluent IV-1 prin ajustarea concentraţiei etanolului la 30% la pH 4.65, temperatură -7°C şi concentraţie proteică de 2.5%. Aceasta se poate realiza ajustând pH-ul efluentului IV-1 cu acid-alcool rece (două părţi 2 M acid acetic şi o parte etanol 95%). Menţinând o temperatură de -7°C, în fiecare litru de efluent IV-1 ajustat se adaugă 170 mL etanol (95%) rece. Proteinele care se precipită pot fi lăsate să se depună 36 de ore, după care se îndepărtează prin centrifugare la -7°C.

Proteinele recuperate (fracţiunea proteică plasmatică stabilă) pot fi uscate (de ex. prin liofilizare) pentru îndepărtarea alcoolului şi H_2O. Pulberea uscată rezultată poate fi dizolvată în apă distilată sterilă, de exemplu folosind 15 litri de apă/kg de pulbere, cu soluţia ajustată la pH 7.0 cu 1 M NaOH. Se poate obţine o concentraţie finală de 5% proteină adăugând apă distilată sterilă conţinând sodiu acetil triptofanat, sodiu caprilat şi NaCl, ajustând la concentraţii finale de 0.004 M acetil triptofanat, 0.004 M caprilat şi 0.112 M sodiu. În sfârşit, soluţia poate fi filtrată la 10°C pentru a obţine o soluţie limpede, după care se tratează termic pentru inactivarea patogenilor la 60°C timp de cel puţin 10 ore.

Persoanele cu competenţe în domeniu vor recunoaşte că se poate utiliza fiecare din diferitele fracţiuni şi efluenţi descrişi mai sus în metodele de tratare a bolii. De exemplu, şi nelimitativ, efluentul I sau efluentul II/III se poate utiliza pentru tratarea unor boli precum tulburări cognitive şi neurodegenerative şi reprezintă aplicări ale invenţiei.

Metodele precedente de preparare a fracţiunilor plasmatice sanguine şi a fracţiunii proteice plasmatice (PPF) sunt doar exemplificative şi reprezintă doar moduri de realizare a invenţiei. Persoanele cu competenţe în domeniu vor recunoaşte că aceste metode pot varia. De exemplu, pH-ul, temperatura şi concentraţia etanolului, printre altele, pot fi ajustate pentru a produce diferite variaţii ale fracţiunilor de plasmă şi ale fracţiunii proteice plasmatice în diferitele aplicări şi metode. Într-un alt exemplu, alte aplicări au în vedere utilizarea nanofiltrării pentru îndepărtarea/inactivarea patogenilor din fracţiuni plasmatice şi fracţiunea proteică plasmatică.

O altă aplicare are în vedere metode şi compoziţii care utilizează şi/sau cuprind alte fracţiuni plasmatice sanguine. De exemplu, printre altele, descrierea demonstrează că nu sunt esenţiale concentraţii specifice ale albuminei pentru îmbunătăţirea activităţii cognitive. Prin urmare, invenţia are în vedere fracţiuni cu concentraţie redusă a albuminei, cum ar fi fracţiunile având sub 83% albumină.

8. Tratament

Se descrie în prezenta un produs sanguin cuprinzând plasmă, cum ar fi o fracţiune de plasmă sanguină, de ex., descrisă mai sus, pentru utilizare în tratarea unui subiect. O aplicare include utilizarea în tratarea unui subiect uman cu un produs sanguin cuprinzând plasmă. Persoanele cu competenţe în domeniu vor recunoaşte că utilizarea produşilor sanguini cuprinzând plasmă în metodele de tratare a subiecţilor este recunoscută în domeniu. Exemplificativ şi nelimitativ, o aplicare descrisă în prezenta cuprinde administrarea plasmei proaspete congelate la un subiect pentru tratarea şi/sau prevenirea deficienţei cognitive şi/sau demenţei legate de vârstă. Într-o aplicare, produsul sanguin cuprinzând plasmă se administrează imediat, de ex., în circa 12-48 de ore de la colectare de la un donator la individul care suferă sau prezintă risc de deficienţă cognitivă şi/sau demenţă legată de vârstă. În aceste cazuri, produsul poate fi depozitat la rece, de ex., 0-10°C. Într-o altă aplicare, plasma proaspătă congelată este depozitată congelată (crioconservată) la -18°C sau mai puţin. Înainte de administrare, plasma proaspătă congelată este decongelată şi apoi se administrează unui subiect la 60-75 de minute după începerea procesului de decongelare. Fiecare subiect primeşte de preferinţă o singură unitate de plasmă proaspătă congelată (200-250 mL), plasma proaspătă congelată provenind de preferinţă de la donatori cu un interval de vârstă predeterminat. Într-o aplicare, plasma proaspătă congelată este donată de (obţinută de la) indivizi tineri. Într-o altă aplicare, plasma proaspătă congelată este donată de (obţinută de la) donatori de acelaşi sex. Într-o altă aplicare, plasma proaspătă congelată este donată de (obţinută de la) donatori cu vârsta între 18-22 de ani. Într-o aplicare, subiecţii sunt trataţi de două ori pe săptămână cu 3-4 zile între perfuzii. Într-o aplicare, tratamentul continuă până la atingerea unui obiectiv specific.

Într-o aplicare, produşii sanguini cuprinzând plasmă sunt analizaţi după donare cu privire la tipul sanguin. Într-o altă aplicare, produşii sanguini cuprinzând plasmă sunt analizaţi cu privire la agenţi infecţioşi cum ar fi HIV I & II, HBV, HCV, HTLV I & II, anti-HBc conform cerinţelor 21 CFR 640.33 şi recomandărilor conţinute în documentele ghid ale FDA.

Într-o altă aplicare, subiectul este tratat cu o "fracţiune de plasmă". Într-o aplicare, fracţiunea plasmatică este PPF sau HAS. Într-o altă aplicare, fracţiunea plasmatică este unul dintre preparatele PPF comerciale sau preparatele HAS comerciale. Într-o altă aplicare fracţiunea plasmatică este PPF sau HAS obţinută de la un grup de indivizi de un interval specific al vârstei, cum ar fi indivizi tineri, sau este o fracţiune PPF sau HAS modificată care a fost supusă fracţionării sau procesării suplimentare (de ex. PPF sau HAS cu una sau mai multe proteine specifice parţial sau în mare măsură îndepărtate). Într-o altă aplicare, fracţiunea plasmatică este o fracţiune de plasmă IGIV epuizată în mare măsură de imunoglobulină (IgG). O fracţiune sanguină "în mare măsură epuizată" sau care are proteine specifice "în mare măsură îndepărtate", cum ar fi IgG, se referă la o fracţiune sanguină care conţine mai puţin decât circa 50% din cantitate care apare în produsul de referinţă sau plasma din sânge integral, cum ar fi mai puţin de 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, .25%, .1%, niveluri nedetectabile sau orice număr întreg între aceste valori, măsurate prin teste standard bine cunoscute în domeniu.

9. Monitorizare

Prezenta invenţie se referă la metode de monitorizare a efectului unui medicament asupra unui subiect pentru tratarea deficienţei cognitive şi/sau demenţei legate de vârstă, metoda cuprinzând compararea funcţiei cognitive înainte şi după tratament. Persoanele cu competenţe în domeniu recunosc că există metode bine cunoscute de evaluare a funcţiei cognitive. De exemplu, şi nelimitativ, metoda poate cuprinde evaluarea funcţiei cognitive pe baza istoricului medical, istoricului familial, examinărilor fizice şi neurologice de către clinicieni specializaţi în demenţă şi funcţia cognitivă, testelor de laborator şi evaluării neuropsihologice. Alte aplicări includ: evaluarea conştiinţei, cum ar fi folosirea scalei de comă Glasgow (EMV); examinarea stării mentale, inclusiv punctajul testului mental abreviat (AMTS) sau mini-

testul de examinare a stării mentale (MMSE) (Folstein et al., J. Psychiatr. Res 1975; 12:1289-198); evaluarea globală a funcţiilor superioare; estimarea presiunii intracraniene cum ar fi prin fundoscopie.

Într-o aplicare, se pot folosi examinările sistemului nervos periferic pentru evaluarea funcţiei cognitive, inclusiv oricare dintre următoarele: simţul mirosului, câmpul şi acuitatea vizuale, mişcările ochilor şi pupile (simpatic şi parasimpatic), funcţia senzorială a feţei, forţa muşchilor faciali şi ai centurii scapulare, auz, gust, mişcare faringiană şi reflex, mişcările limbii, care se pot testa individual (de ex. acuitatea vizuală poate fi testată printr-o diagramă Snellen; un ciocan pentru testarea reflexelor inclusiv la nivelul muşchiului masticator, tendonului bicepsului şi tricepsului, tendonului genunchiului, reflexul gleznei şi plantar (i.e. semnul Babinski); forţa muşchilor adesea pe scara MRC de la 1 la 5; tonus muscular şi semne de rigiditate.

10. Administrare

O fracţiune de plasmă sanguină poate fi administrată subiectului. Într-o aplicare, fracţiunea de plasmă sanguină se administrează prin perfuzie intravenoasă. Debitul perfuziei poate varia, dar într-o aplicare viteza perfuziei este 5-8 mL/minut. Persoanele cu competenţe în domeniu vor recunoaşte că debitul perfuziei poate depinde de starea subiectului şi răspunsul la administrare.

În aplicările în care trebuie să se administreze o cantitate eficientă a unui agent activ la mamiferul adult, cantitatea sau dozajul este eficient(ă) când se administrează pe o perioadă adecvată de timp, cum ar fi o săptămână sau mai mult, inclusiv două săptămâni sau mai mult, cum ar fi 3 săptămâni sau mai mult, o lună sau mai mult, 2 luni sau mai mult, 3 luni sau mai mult, 4 luni sau mai mult, 5 luni sau mai mult, 6 luni sau mai mult, 1 an sau mai mult etc., pentru a indica o scădere a afecţiunii, de ex., deficienţa cognitivă sau întârzierea deficienţei cognitive şi/sau îmbunătăţirea cognitivă la mamiferul adult. De exemplu, o doză eficientă este doza care, administrată pe o perioadă de timp adecvată, va încetini de ex. cu circa 20% sau mai mult, de ex., cu 30% sau mai mult, cu 40% sau mai mult sau cu 50% sau mai mult, în unele cazuri cu 60% sau mai mult, cu 70% sau mai mult, cu 80% sau mai mult sau cu 90% sau mai mult, de exemplu, va opri declinul cognitiv la un pacient care suferă de îmbătrânire naturală sau o tulburare asociată cu îmbătrânirea. În unele cazuri, o cantitate sau o doză eficientă a produsului sanguin nu doar va încetini sau opri înaintarea bolii, ci va induce şi inversarea afecţiunii, adică va determina o îmbunătăţire a capacităţii cognitive. De exemplu, în unele cazuri, o cantitate eficientă este cantitatea care, când se administrează pe o perioadă adecvată de timp, de obicei cel puţin circa o săptămână, poate circa două săptămâni sau mai mult, până la o perioadă de circa 3 săptămâni, 4 săptămâni, 8 săptămâni sau mai mult va îmbunătăţi capacităţile cognitive ale unui individ care suferă de o deficienţă cognitivă asociată cu îmbătrânirea, de exemplu, de 1.5 ori, 2 ori, 3 ori, 4 ori, 5 ori, în unele cazuri 6 ori, 7 ori, 8 ori, 9 ori sau 10 ori sau mai mult faţă de cogniţia de dinaintea administrării produsului sanguin sau fracţiunii. În unele cazuri, o cantitate sau o doză eficientă a agentului activ nu doar va încetini sau opri înaintarea bolii, ci va induce şi inversarea afecţiunii, adică va determina o îmbunătăţire a funcţiei cognitive. De exemplu, în unele cazuri, o cantitate eficientă este cantitatea care, când se administrează pe o perioadă adecvată de timp, va îmbunătăţi simptomele unui individ care suferă de declin sau deficienţă cognitivă, de exemplu de 1.5 ori, 2 ori, 3 ori, 4 ori, 5 ori, în unele cazuri 6 ori, 7 ori, 8 ori, 9 ori sau 10 ori sau mai mult faţă de indivizii netrataţi înainte de administrarea agentului.

În alte aplicări, fracţiunea de plasmă sanguină sau fracţiunea de plasmă se administrează conform unuia sau mai multor regimuri de dozaj descrise în cererea de brevet U.S. nr. 62/490,519. Prin urmare, o aplicare include tratarea unui subiect diagnosticat cu o deficienţă cognitivă prin administrarea la subiect a unei cantităţi eficiente de plasmă sanguină sau fracţiune de plasmă, unde plasma sanguină sau fracţiunea de plasmă se administrează într-o manieră care duce la funcţie cognitivă sau neurogeneză îmbunătăţită după atingerea timpului de înjumătăţire mediu al proteinelor plasmatice sanguine sau proteinelor din fracţiunea de plasmă, în raport cu doza cea mai recentă administrată (denumită în prezenta "dozaj intermitent"). O altă aplicare include administrarea plasmei sanguine sau fracţiunii de plasmă printr-un regim de dozaj de cel puţin două zile consecutive şi monitorizarea subiectului cu privire la funcţia cognitivă îmbunătăţită cel puţin 3 zile de la data ultimei administrări. O altă aplicare include administrarea plasmei sanguine sau fracţiunii de plasmă printr-un regim de dozaj de cel puţin 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 sau 14 zile consecutive şi monitorizarea subiectului cu privire la funcţia cognitivă îmbunătăţită cel puţin 3 zile de la data ultimei administrări. O altă aplicare include administrarea plasmei sanguine sau fracţiunii de plasmă printr-un regim de dozaj de cel puţin 2 zile consecutive şi, după data ultimei administrări, monitorizarea cu privire la îmbunătăţire cognitivă după atingerea timpului de înjumătăţire mediu al proteinelor în plasma sanguină sau fracţiunea de plasmă. O altă aplicare include administrarea plasmei sanguine sau fracţiunii de plasmă printr-un regim de dozaj de 2 până la 14 zile neconsecutive, unde fiecare interval între doze poate fi între 0-3 zile fiecare. În unele cazuri, dozajul intermitent include administrarea unui prim set de doze, de ex., aşa cum se descrie mai sus, urmată de o perioadă în care mu se administrează dozaj, de ex., o "perioadă fără dozaj", urmată la rândul său de administrarea unei alte doze sau set de doze. Durata acestei perioade "fără dozaj" poate varia, dar în unele aplicări este de 7 zile sau mai mult, cum ar fi 10 zile sau mai mult, inclusiv 14 zile sau mai mult, în unele

cazuri perioada fără dozaj fiind cuprinsă între 15 şi 365 de zile, cum ar fi 30 până la 90 de zile, inclusiv 30 până la 60 de zile. Astfel, aplicările metodelor includ dozaj non-cronic (i.e., necontinuu), de ex., administrare non-cronică a unui produs de plasmă sanguină. În unele aplicări, tiparul dozajului intermitent, urmat de o perioadă fără dozaj, se repetă de mai multe ori, după caz, în unele cazuri acest tipar continuând 1 an sau mai mult, cum ar fi 2 ani sau mai mult, până la şi inclusiv durata de viaţă a subiectului. Plasma sanguină sau fracţiunea de plasmă se poate administra printr-un regim de dozaj de 5 zile consecutive, cu o perioadă fără dozaj de 2-3 zile, urmată de administrare 2-14 zile consecutive.

Din punct de vedere biochimic, printr-o "cantitate eficientă" sau "doză eficientă" a agentului activ se înţelege o cantitate a agentului activ care va inhiba, antagoniza, scădea, reduce sau suprima cu circa 20% sau mai mult, de ex., cu 30% sau mai mult, cu 40% sau mai mult sau cu 50% sau mai mult, în unele cazuri cu 60% sau mai mult, cu 70% sau mai mult, cu 80% sau mai mult sau cu 90% sau mai mult, în unele cazuri cu circa 100%, i.e., la cantităţi neglijabile, şi în unele cazuri, va inversa evoluţia deficienţei cognitive sau demenţei asociate cu vârsta.

11. Fracţiune proteică plasmatică

O fracţiune de plasmă se poate administra subiectului. Fracţiunea plasmatică folosită în metodele divulgate poate fi fracţiune proteică plasmatică (PPF). PPF poate fi selectată dintre preparatele PPF comerciale.

Într-o altă aplicare, PPF este alcătuită din 88% albumină umană normală, 12% globuline alpha şi beta şi nu mai mult de 1% globulină gamma, aşa cum se determină prin electroforeză. Aplicările includ, de exemplu, o soluţie 5% de PPF tamponată cu carbonat de sodiu şi stabilizată cu 0.004 M sodiu caprilat şi 0.004 M acetiltriptofan. Se pot folosi şi alte compoziţii, inclusiv cele care modifică procentajul PPF (de ex. circa 1% până la circa 10%, circa 10% până la circa 20%, circa 20% până la 25%, circa 25% până la 30%) în soluţie, precum şi concentraţiile solventului şi stabilizatorilor.

12. Fracţiuni de plasmă la o vârstă specifică a donatorului

O aplicare a invenţiei include administrarea unei fracţiuni de plasmă sanguină sau unei fracţiuni de plasmă obţinute din plasma indivizilor la anumite intervale de vârstă. Alte aplicări includ administrarea unei fracţiuni proteice plasmatice obţinute din plasma indivizilor la anumite intervale de vârstă. O aplicare include administrarea unei PPF sau HAS obţinute din plasma indivizilor tineri. Într-o altă aplicare, indivizii tineri au o singură vârstă specifică sau un interval specific de vârstă. Într-o altă aplicare, vârsta medie a donatorilor este mai mică decât cea a subiectului sau mai mică decât vârsta medie a subiecţilor trataţi.

Anumite aplicări includ colectarea sângelui sau plasmei de la indivizi cu intervale specifice de vârstă şi fracţionarea plasmei sanguine aşa cum s-a descris mai sus pentru a obţine un produs de fracţiune proteică plasmatică precum PPF sau HAS. Într-o aplicare alternativă, fracţiunea proteică plasmatică sau fracţiunea proteică plasmatică specifică se obţine de la indivizi specifici care se încadrează într-un interval de vârstă specificat. Într-o altă aplicare, fracţiunea de plasmă sanguină, fracţiunea de plasmă sau produsul specific al fracţiunii proteice plasmatice se obţine de la un grup de indivizi tineri, termenul "tânăr" putând fi determinat de vârsta cronologică sau biologică, aşa cum s-a descris mai sus, şi vârsta(ele) indivizilor pot fi o vârstă sau un interval specific de vârstă.

13. Indicaţii

Metodele şi produşii sanguini cuprinzând plasmă şi fracţiunile din prezenta îşi găsesc utilizare în tratarea, inclusiv prevenirea, afecţiunilor asociate cu îmbătrânirea, cum ar fi tulburări ale capacităţii cognitive a indivizilor, de ex., tulburări cognitive, inclusiv (nelimitativ) demenţa asociată cu vârsta, afecţiuni imunologice, cancer şi declin fizic şi funcţional. Indivizii care suferă de sau prezintă risc de dezvoltare a unei deficienţe cognitive asociate cu îmbătrânirea care vor beneficia în urma tratamentului cu produs sanguin cuprinzând plasmă, de ex., prin metodele divulgate în prezenta, includ indivizi având circa 50 de ani sau mai mult, de ex., 60 de ani sau mai mult, 70 de ani sau mai mult, 80 de ani sau mai mult, 90 de ani sau mai mult şi 100 de ani sau mai mult, i.e., între vârsta de circa 50 şi 100, de ex., 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 sau circa 100 de ani, şi care suferă de deficienţă cognitivă asociată cu procesul natural al îmbătrânirii, de ex., deficienţă cognitivă uşoară (M.C.I.); şi indivizi având circa 50 de ani sau mai mult, de ex., 60 de ani sau mai mult, 70 de ani sau mai mult, 80 de ani sau mai mult, 90 de ani sau mai mult şi de obicei nu mai mult de 100 de ani, i.e., între vârstele de circa 50 şi 90, de ex., 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 sau circa 100 de ani, care nu au început încă să prezinte simptome ale deficienţei cognitive. Exemplele tulburărilor cauzate de îmbătrânirea naturală includ următoarele:

A. <u>Deficienţa cognitivă uşoară (M.C.I.)</u> este o perturbare modestă a cogniţiei care se manifestă sub formă de probleme cu memoria sau alte funcţii mentale, cum ar fi planificarea, urmarea instrucţiunilor sau luarea deciziilor, care s-a agravat în timp pe când funcţia mentală generală şi activităţile zilnice nu sunt perturbate. Astfel, deşi nu are loc în mod tipic moarte neuronală semnificativă, neuronii din creierul care îmbătrâneşte sunt vulnerabili la modificări sub-letale legate de vârstă ale structurii, integrităţii sinaptice şi procesării moleculare la sinapse, toate acestea perturbând funcţia cognitivă.

Indivizii care suferă de sau prezintă risc de dezvoltare a unei deficienţe cognitive asociate cu îmbătrânirea care vor beneficia în urma tratamentului cu produsul sanguin cuprinzând plasmă sau fracţiunea din prezenta, de ex., prin metodele divulgate în prezenta, includ şi indivizi de orice vârstă care suferă de o deficienţă cognitivă din cauza unei tulburări asociate cu îmbătrânirea; şi indivizi de orice vârstă care au fost diagnosticaţi cu o tulburare asociată cu îmbătrânirea însoţită în mod tipic de deficienţă cognitivă, unde individul nu a început încă să prezinte simptomele deficienţei cognitive. Exemplele unor astfel de tulburări asociate cu îmbătrânirea includ următoarele:

B. Boala Alzheimer. Boala Alzheimer este o pierdere progresivă, inexorabilă a funcţiei cognitive asociată cu un număr excesiv de plăci senile în cortexul cerebral şi materia cenuşie subcorticală, care conţine şi b-amiloid şi noduri neurofibrilare constând din proteina tau. Forma comună afectează persoane > 60 de ani şi incidenţa creşte odată cu înaintarea în vârstă. Reprezintă mai mult de 65% din demenţele la persoanele în vârstă.

Cauza bolii Alzheimer este necunoscută. Boala se transmite în familii la circa 15 până la 20% dintre cazuri. Restul cazurilor, aşa numite sporadice, au unii determinanţi genetici. Boala are un tipar genetic autozomal dominant în majoritatea cazurilor cu declanşare timpurie şi unele cazuri cu declanşare târzie, dar o penetranţă variabilă. Factorii de mediu fac obiectul unei investigaţii active.

Pe parcursul bolii, sinapsele şi în cele din urmă neuronii se pierd în cortexul cerebral, hipocamp şi structurile subcorticale (inclusiv pierdere celulară selectivă în nucleul bazal al lui Meynert), locus coeruleus şi nucleus raphae dorsalis. Utilizarea şi perfuzia glucozei cerebrale se reduc în unele zone ale creierului (lobul parietal şi cortexul temporal în boala incipientă, cortexul prefrontal în boala avansată). Plăcile neuritice sau senile (alcătuite din neurite, astrocite şi celule gliale în jurul unui miez amiloid) şi nodurile neurofibrilare (alcătuite din fibre răsucite împerecheate) au un rol în patogeneza bolii Alzheimer. Plăcile senile şi nodurile neurofibrilare apar odată cu îmbătrânirea normală, dar sunt mult mai prevalente la persoane cu boala Alzheimer.

C. *Boala Parkinson.* Boala Parkinson (PD) este o tulburare SNC idiopatică, cu progresie lentă, degenerativă, caracterizată prin mişcare lentă şi scăzută, rigiditate musculară, tremurături şi instabilitate posturală. Considerată iniţial o tulburare în principal motorie, PD este recunoscută acum ca afectând şi cogniţia, comportamentul, somnul, funcţia autonomă şi funcţia senzorială. Cele mai comune deficienţe cognitive includ o deficienţă de atenţie şi concentrare, memoria de lucru, funcţia executivă, limbajul productiv şi funcţia vizuală şi spaţială.

În boala Parkinson primară, neuronii pigmentaţi din substantia nigra, locus coeruleus şi alte grupe celulare dopaminergice din trunchiul cerebral se pierd. Cauza este necunoscută. Pierderea neuronilor din substantia nigra, care se proiectează în nucleul caudat şi putamen, duce la depleţia neurotransmiţătorului dopamina în aceste zone. Debutul este în general după 40 de ani, cu incidenţă mai mare în grupurile cu vârstă mai înaintată.

Parkinsonismul secundar rezultă din pierderea sau interferenţa cu acţiunea dopaminei în ganglionii bazali din cauza altor boli degenerative idiopatice, medicamente sau toxine exogene. Cauza cea mai frecventă a parkinsonismului secundar este ingestia medicamentelor antipsihotice sau a rezerpinei, care produc parkinsonism prin blocarea receptorilor dopaminici. Cauzele mai puţin frecvente includ intoxicaţie cu monoxid de carbon sau mangan, hidrocefalie, leziuni structurale (tumori, infarcturi care afectează mezencefalul sau ganglionii bazali), hematom subdural şi tulburări degenerative, inclusiv degenerare striatonigrală.

D. *Demenţa frontotemporală.* Demenţa frontotemporală (FTD) este o afecţiune rezultată din deteriorarea progresivă a lobului frontal al creierului. În timp, degenerarea poate avansa în lobul temporal. A doua ca prevalenţă după boala Alzheimer (AD), FTD reprezintă 20% din cazurile de demenţă pre-senilă. Simptomele sunt clasificate în trei grupuri pe baza funcţiilor lobilor frontali şi temporali afectaţi:

Varianta comportamentală FTD (bvFTD), cu simptome incluzând letargie şi aspontaneitate pe de-o parte şi dezinhibare pe de altă parte; afazie nonfluentă progresivă (PNFA), în care se observă o perturbare a vorbirii fluente din cauza dificultăţii de articulare, a erorilor fonologice şi/sau sintactice, dar se menţine înţelegerea cuvintelor; şi demenţa semantică (SD), în care pacienţii rămân fluenţi cu fonologie şi sintaxă normale, dar cu dificultate crescută de numire şi înţelegere a cuvintelor. Alte simptome cognitive comune tuturor pacienţilor FTD includ o perturbare a funcţiei executive şi a capacităţii de concentrare. Alte capacităţi cognitive, inclusiv percepţia, aptitudinile spaţiale, memoria şi rutina rămân în mod tipic intacte. FTD poate fi diagnosticată observând atrofia lobului frontal şi/sau temporal anterior în scanările MRI structurale.

Există mai multe forme de FTD, oricare dintre acestea putând fi tratate sau prevenite folosind metodele şi compoziţiile din prezenta. De exemplu, o formă a demenţei frontotemporale este demenţa semantică (SD). SD se caracterizează printr-o pierdere a memoriei semantice în domeniile atât verbale, cât şi non-verbale. Pacienţii SD se prezintă adesea plângându-se de dificultăţi de găsire a cuvintelor. Semnele clinice includ afazie fluentă, anomie, înţelegere perturbată a sensului cuvintelor şi agnozie vizuală asociativă (incapacitate de potrivire semantică a imaginilor sau obiectelor asociate). Pe măsură ce boala

înaintează, se observă adesea modificări modificări comportamentale şi de personalitate similare cu cele observate în demenţa frontotemporală, deşi au fost descrise cazuri de demenţă semantică 'pură' cu câteva simptome comportamentale târzii. Imagistica MRI structurală prezintă un tipar caracteristic de atrofie în lobii temporali (predominant pe stânga), cu implicare inferioară mai mare decât cea superioară şi atrofie mai mare a lobului temporal anterior decât a celui posterior.

Ca un alt exemplu, o altă formă a demenţei frontotemporale este boala Pick (PiD, de asemenea PcD). O caracteristică definitorie a bolii este acumularea proteinelor tau în neuroni, care se acumulează în agregate sferice care se colorează argintiu cunoscute sub numele de "corpi Pick". Simptomele includ pierderea vorbirii (afazie) şi demenţă. Pacienţii cu disfuncţie orbitofrontală pot deveni agresivi şi social neadecvaţi. Pot să fure sau să demonstreze comportamente stereotip obsesive sau repetitive. Pacienţii cu disfuncţie frontală dorsomedială sau dorsolaterală pot demonstra lipsă de interes, apatie sau spontaneitate scăzută. Pacienţii pot demonstra o absenţă de auto-monitorizare, conştiinţă de sine anormală şi o incapacitate de apreciere a sensului. Pacienţii cu pierdere de materie cenuşie în cortexul orbitofrontal posterolateral bilateral şi insula anterioară dreaptă pot demonstra modificări în comportamentele alimnetare, cum ar fi o predilecţie patologică pentru dulciuri. Pacienţii cu pierdere de materie cenuşie mai focală în cortexul orbitofrontal anterolateral pot dezvolta hiperfagie. Deşi unele dintre simptome pot fi iniţial ameliorate, boala progresează şi pacienţii mor deseori în doi până la zece ani.

E. *Boala Huntington.* Boala Huntington (HD) este o tulburare neurodegenerativă progresivă ereditară caracterizată prin dezvoltarea anomaliilor emoţionale, comportamentale şi psihiatrice; pierderea funcţionării intelectuale sau cognitive; şi anomalii de mişcare (perturbării motorii). Semnele clasice ale HD includ dezvoltarea coreei - mişcări involuntare, rapide, neregulate, spasmodice care pot afecta faţa, braţele, picioarele sau trunchiul - precum şi declin cognitiv, inclusiv pierderea treptată a procesării gândurilor şi a capacităţilor intelectuale dobândite. Poate exista tulburare de memorie, gândire abstractă şi judecată; percepţii improprii ale timpului, locului sau identităţii (dezorientare); agitaţie crescută; şi modificări de personalitate (dezintegrarea personalităţii). Deşi simptomele devin în mod tipic evidente în deceniile patru sau cinci de viaţă, vârsta la debut este variabilă şi variază din copilărie timpurie până la maturitate târzie (de ex., 70 sau 80 de ani).

HD se transmite în familii ca o trăsătură autozomală dominantă. Tulburarea apare ca urmare a secvenţelor anormal de lungi sau "repetiţiilor" de instrucţiuni codificate într-o genă pe cromozomul 4 (4p16.3). Pierderea progresivă a funcţiei sistemului nervos asociată cu HD rezultă din pierderea neuronilor în anumite zone ale creierului, inclusiv ganglionii bazali şi cortexul cerebral.

F. *Scleroza laterală amiotrofică.* Scleroza laterală amiotrofică (ALS) este o boală neurologică rapid progresivă, invariabil fatală, care atacă neuronii motorii. Se observă iniţial slăbiciune musculară şi atrofie şi semne de disfuncţie a celulelor cornului anterior cel mai adesea la mâini şi mai rar la picioare. Locul debutului este aleatoriu şi progresia este asimetrică. Crampele sunt comune şi pot preceda slăbiciunea. Rareori un pacient supravieţuieşte 30 de ani; 50% mor în 3 ani de la declanşare, 20% trăiesc 5 ani şi 10% trăiesc 10 ani.

Caracteristicile diagnosticului includ debut la maturitate mijlocie sau târzie şi implicare motorie progresivă, generalizată, fără anomalii senzoriale. Vitezele de conducere nervoasă sunt normale până într-o fază târzie a bolii. Studiile recente au documentat şi prezentarea deficienţelor cognitives, în special o scădere a memoriei verbale imediate, a memoriei vizuale, limbajului şi funcţiei executive.

S-a raportat o scădere a suprafeţei corpilor celulari, a numărului sinapselor şi a lungimii sinaptice totale chiar şi în neuroni cu aspect normal ai pacienţilor ALS. S-a sugerat că, atunci când plasticitatea zonei active îşi atinge limita, o pierdere continuă a sinapselor poate duce la deficienţă funcţională. Favorizarea formării sinapselor noi sau prevenirea pierderii sinapselor poate menţine funcţia neuronală a acestor pacienţi.

G. *Scleroza multiplă.* Scleroza multiplă (MS) se caracterizează prin diferite simptome şi semne de disfuncţie SNC, cu remisiuni şi exacerbări recurente. Simptomele cele mai frecvente sunt parestezii într-una sau mai multe extremităţi, în trunchi sau pe o parte a feţei; slăbiciune sau stângăcie într-un picior sau o mână; sau perturbări vizuale, de ex., orbire parţială şi durere într-un ochi (nevrită optică retrobulbară), scăderea vederii sau scotoame. Deficienţele cognitive comun includ tulburări de memorie (dobândirea, reţinerea şi recuperarea informaţiilor noi), atenţie şi concentrare (în special atenţie împărţită), procesarea informaţiilor, funcţii executive, funcţii vizuale şi spaţiale şi fluenţa verbală. Simptomele timpurii comune sunt paralizia oculară care duce la vedere dublă (diplopie), slăbiciune temporară a uneia sau mai multor extremităţi, uşoară rigiditate sau oboseală neobişnuită a unui membru, perturbări minore de mers, dificultate de control al vezicii, vertigo şi uşori perturbări emoţionale; toate indică implicare SNC difuză şi adesea apar cu luni sau ani înainte de recunoaşterea bolii. Excesul de căldură poate accentua simptomele şi semnele.

Parcursul este foarte variat, imprevizibil şi, la majoritatea pacienţilor, recurent. La început, luni sau ani de remisiune pot separa episoadele, în special când boala debutează cu nevrită optică retrobulbară. Totuşi,

unii pacienţii au atacuri frecvente şi sunt rapid incapacitaţi; pentru câţiva parcursul poate fi progresiv rapid.

H. *Glaucom.* Glaucomul este o boală neurodegenerativă comună care afectează celule ganglionare retiniene (RGC). Dovezile susţin existenţa programelor de degenerare compartimentalizată în sinapse şi dendrite, inclusiv în RGC. Dovezile recente indică de asemenea o corelare între deficienţa cognitivă la adulţi mai în vârstă şi glaucom (Yochim BP, et al. Prevalence of cognitive impairment, depression, and anxiety symptoms among older adults with glaucoma. J Glaucoma. 2012;21(4):250-254).

I. *Distrofie miotonică.* Distrofia miotonică (DM) este o tulburare multisitemică autozomală dominantă caracterizată prin slăbiciune musculare distrofică şi miotonie. Defectul molecular este o repetiţie trinucleotidică amplificată (CTG) în regiunea netranslatată 3' a genei protein kinazei miotonina pe cromozomul 19q. Simptomele pot apărea la orice vârstă şi gama severităţii clinice este largă. Miotonia este proeminentă în muşchii mâinilor şi ptoza este comună chiar şi în cazuri uşoare. În cazuri severe, apare slăbiciune musculară periferică pronunţată, adesea cu cataracte, pierdere prematură a părului, faţă alungită, aritmii cardiace, atrofie testiculară şi anomalii endocrine (de ex., diabet zaharat). Retardul mental este comun în formele congenitale severe, în timp ce se observă un declin legat de îmbătrânire al funcţiilor cognitive frontale şi temporale, în special limbajul şi funcţiile executive, în formele adulte mai uşoare ale tulburării. Persoanele sever afectate mor pe la începutul vârstei de 50 de ani.

J. *Demenţa.* Demenţa descrie o clasă de tulburări având simptome care afectează gândirea şi capacităţile sociale suficient de sever pentru a perturba funcţionarea zilnică. Alte cazuri de demenţă pe lângă demenţa observată în stadiile târzii ale tulburărilor asociate cu îmbătrânirea discutate mai sus includ demenţa vasculară şi demenţa cu corpi Lewy, descrise mai jos.

În demenţa vasculară sau "demenţă multi-infarct", deficienţa cognitivă este cauzată de probleme în alimentarea cu sânge a creierului, în mod tipic printr-o serie de accidente vasculare minore sau uneori un accident vascular mare precedat sau urmat de alte accidente vasculare mai mici. Leziunile vasculare pot fi rezultatul bolii cerebrovasculare difuze, cum ar fi boala vaselor mici sau leziunile focale sau ambele. Pacienţii care suferă de demenţă vasculară prezintă tulburări cognitive, acut sau subacut, după un eveniment cerebrovascular acut, după care se observă un declin cognitiv progresiv. Deficienţele cognitive sunt similare cu cele observate în boala Alzheimer, inclusiv deficienţele de limbaj, memorie, procesare vizuală complexă sau funcţia executivă, deşi modificările conexe ale creierului nu sunt cauzate de patologia AD, ci de fluxul sanguin cronic redus în creier, rezultând în cele din urmă demenţa. Neuroimagistica prin tomografie computerizată cu emisie de fotoni unici (SPECT) şi tomografie cu emisie de pozitroni (PET) poate fi utilizată pentru a confirma un diagnostic de demenţă multi-infarct coroborat cu evaluări care implică examinarea stării mentale.

Demenţa cu corpi Lewy (DLB, cunoscută şi sub o varietate de alte nume, inclusiv demenţa corpilor Lewy, boala difuză cu corpi Lewy, boala corticală cu corpi Lewy şi demenţa senilă de tip Lewy) este un tip de demenţă caracterizat anatomic prin prezenţa corpilor Lewy (grupuri de proteine alpha-sinucleină şi ubiquitină) în neuroni, detectabile în histologia cerebrală post mortem. Caracteristica sa principală este declinul cognitiv, în special al funcţionării executive. Alerta şi memoria pe termen scurt vor creşte şi vor scădea.

Halucinaţiile vizuale persistente sau recurente cu imagini vii şi detaliate sunt adesea un simptom diagnostic precoce. DLB este adesea confundată în stadiile incipiente cu boala Alzheimer şi/sau demenţa vasculară, deşi boala Alzheimer începe de obicei destul de treptat, iar DLB are adesea un debut rapid sau acut. Simptomele DLB includ, de asemenea, simptome motorii similare cu cele ale bolii Parkinson. DLB se distinge de demenţa care apare uneori în boala Parkinson prin intervalul de timp în care apar simptomele de demenţă în raport cu simptomele Parkinson. Boala Parkinson cu demenţă (POD) ar fi diagnosticul atunci când debutul demenţei este la mai mult de un an de la debutul Parkinson. DLB este diagnosticată atunci când simptomele cognitive încep în acelaşi timp sau în decurs de un an de la simptomele Parkinson.

K. *Paralizie supranucleară progresivă.* Paralizia supranucleară progresivă (PSP) este o tulburare a creierului care cauzează probleme grave şi progresive de control al mersului şi echilibrului, alături de mişcarea complexă a ochilor şi probleme de gândire. Unul dintre semnele clasice ale bolii este incapacitatea fixării corecte a ochilor, care apare din cauza leziunilor din zona creierului care coordonează mişcările oculare. Unii indivizi descriu acest efect ca o înceţoşare. Indivizii afectaţi prezintă adesea modificări ale dispoziţiei şi comportamentului, inclusiv depresie şi apatie, precum şi demenţă uşoară progresivă. Numele lung al tulburării indică faptul că boala începe încet şi continuă să se înrăutăţească (progresivă) şi provoacă slăbiciune (paralizie) prin deteriorarea anumitor părţi ale creierului deasupra structurilor mici numite nuclei care controlează mişcările ochilor (supranucleare). PSP a fost descrisă pentru prima dată ca o tulburare distinctă în 1964, când trei oameni de ştiinţă au publicat o lucrare care distinge afecţiunea de boala Parkinson. Uneori este denumit sindrom Steele-Richardson-Olszewski, reflectând numele combinate ale oamenilor de ştiinţă care au definit tulburarea. Deşi PSP se înrăutăţeşte progresiv, nimeni nu moare din cauza PSP în sine.

L. Ataxie. Persoanele cu ataxie au probleme de coordonare, deoarece sunt afectate părţi ale sistemului nervos care controlează mişcarea şi echilibrul. Ataxia poate afecta degetele, mâinile, braţele, picioarele, corpul, vorbirea şi mişcările ochilor. Cuvântul ataxie este adesea folosit pentru a descrie un simptom de necoordonare care poate fi asociat cu infecţii, leziuni, alte boli sau modificări degenerative ale sistemului nervos central. Ataxia este, de asemenea, utilizată pentru a desemna un grup de boli degenerative specifice ale sistemului nervos numite ataxii ereditare şi sporadice, care sunt temele principale de interes ale Fundaţiei Naţionale pentru Ataxie.

M. Atrofia multisistemică. Atrofia multisistemică (MSA) este o tulburare neurologică degenerativă. MSA este asociată cu degenerarea celulelor nervoase din anumite zone ale creierului. Această degenerare celulară provoacă probleme de mişcare, echilibru şi alte funcţii autonome ale corpului, cum ar fi controlul vezicii urinare sau reglarea tensiunii arteriale.

Cauza MSA este necunoscută şi nu au fost identificaţi factori de risc specifici. Aproximativ 55% din cazuri apar la bărbaţi, cu vârsta tipică de debut la sfârşitul anilor '50 până la începutul anilor '60. MSA prezintă adesea unele dintre aceleaşi simptome ca boala Parkinson. Cu toate acestea, pacienţii cu MSA prezintă în general un răspuns minim sau deloc la medicamentele dopaminergice utilizate pentru Parkinson.

N. Fragilitate. Sindromul de fragilitate ("fragilitatea") este un sindrom geriatric caracterizat prin declin funcţional şi fizic, inclusiv scăderea mobilităţii, slăbiciune musculară, lentoare fizică, rezistenţă slabă, activitate fizică scăzută, subnutriţie şi scădere involuntară în greutate. Un astfel de declin este adesea însoţit şi este o consecinţă a unor boli precum disfuncţia cognitivă şi cancer. Cu toate acestea, fragilitatea poate apărea chiar şi fără boală. Persoanele care suferă de fragilitate au un risc crescut de prognostic negativ din cauza fracturilor, căderilor accidentale, dizabilităţilor, comorbidităţii şi mortalităţii premature. (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). În plus, persoanele care suferă de fragilitate au o incidenţă crescută a cheltuielilor mai mari de îngrijire a sănătăţii. (Id.)

Simptomele frecvente ale fragilităţii pot fi determinate prin anumite tipuri de teste. De exemplu, pierderea neintenţionată în greutate implică o pierdere de cel puţin 10 lbs. sau mai mare de 5% din greutatea corporală în anul precedent; slăbiciunea musculară poate fi determinată de capacitate de strângere redusă în procentajul inferior de 20% la referinţă (ajustat cu privire la sex şi IMC); lentoarea fizică se poate baza pe timpul necesar pentru a parcurge o distanţă de 15 picioare; rezistenţa slabă poate fi determinată de auto-raportarea epuizării individului; iar activitatea fizică scăzută poate fi măsurată folosind un chestionar standardizat. (Z. Palace et al., The Frailty Syndrome, Today's Geriatric Medicine 7(1), at 18 (2014)).

În unele aplicări, metodele şi compoziţiile din prezenta îşi găsesc utilizare în încetinirea progresului deficienţei cognitive asociate cu îmbătrânirea. Cu alte cuvinte, abilităţile cognitive ale individului vor scădea mai lent în urma tratamentului prin metodele divulgate decât înainte de sau în absenţa tratamentului prin metodele divulgate. În unele astfel de cazuri, metodele de tratament din prezenta includ măsurarea progresiei declinului cognitiv după tratament şi determinarea reducerii înaintării declinului cognitiv. În unele astfel de cazuri, determinarea se face prin compararea cu o referinţă, de exemplu, rata declinului cognitiv la individ înainte de tratament, de ex., determinată prin măsurarea cognitivă anterior la două sau mai multe intervale înainte de administrarea produsului sanguin din prezenta.

Metodele şi compoziţiile din prezenta îşi găsesc de asemenea utilizare în stabilizarea capacităţilor cognitive ale unui individ, de ex., un individ care suferă de declin cognitiv asociat cu îmbătrânirea sau un individ care prezintă risc de declin cognitiv asociat cu îmbătrânirea. De exemplu, individul poate demonstra o oarecare deficienţă cognitivă asociată cu îmbătrânirea şi evoluţia deficienţei cognitive observată înainte de tratament cu metodele divulgate va fi oprită în urma tratamentului prin metodele divulgate. Ca un alt exemplu, individul poate prezenta risc de dezvoltare a unui declin cognitiv asociat cu îmbătrânirea (de ex., individul poate avea vârsta de 50 de ani sau mai mult sau poate să fi fost diagnosticat cu o tulburare asociată cu îmbătrânirea) şi capacităţile cognitive ale individului sunt în mare măsură neschimbate, adică nu se poate detecta declin cognitiv, în urma tratamentului prin metodele divulgate comparativ cu starea de dinaintea tratamentului cu metodele divulgate.

Metodele şi compoziţiile din prezenta îşi găsesc de asemenea utilizare în reducerea deficienţei cognitive la un individ care suferă de deficienţă cognitivă asociată cu îmbătrânirea. Cu alte cuvinte, capacitatea cognitivă este îmbunătăţită la individ în urma tratamentului cu metodele din prezenta. De exemplu, capacitatea cognitivă a individului este mărită, de ex., de 2 ori sau mai mult, 5 ori sau mai mult, 10 ori sau mai mult, 15 ori sau mai mult, 20 de ori sau mai mult, 30 de ori sau mai mult sau 40 de ori sau mai mult, inclusiv 50 de ori sau mai mult, 60 de ori sau mai mult, 70 de ori sau mai mult, 80 de ori sau mai mult, 90 de ori sau mai mult sau 100 de ori sau mai mult, în urma tratamentului cu metodele din prezenta faţă de capacitatea cognitivă observată la individ înaintea tratamentului prin metodele din prezenta. În unele cazuri, tratamentul cu metodele şi compoziţiile din prezenta reface capacitatea

cognitivă a individului care suferă de declin cognitiv asociat cu îmbătrânirea, de ex., la nivelul de când individul avea circa 40 de ani sau mai puţin. Cu alte cuvinte, deficienţa cognitivă este anulată.

14. Metode de diagnostic şi monitorizare pentru îmbunătăţirea bolii neurocognitive

În unele cazuri, din varietatea de metode de diagnostic şi monitorizare a evoluţiei bolii şi a îmbunătăţirii bolii neurocognitive, se utilizează următoarele tipuri de evaluări individual sau în combinaţie cu subiecţi care suferă de boală neurodegenerativă, după caz. Tipurile următoare de metode sunt prezentate exemplificativ şi nelimitativ.

A. Cogniţie generală

Invenţia cuprinde de asemenea metode de monitorizare a efectului unui medicament sau tratament asupra unui subiect pentru tratarea deficienţei cognitive şi/sau a demenţei legate de vârstă, metoda cuprinzând compararea funcţiei cognitive înainte şi după tratament. Persoanele cu competenţe în domeniu recunosc că există metode bine cunoscute de evaluare a funcţiei cognitive. De exemplu, şi nelimitativ, metoda poate cuprinde evaluarea funcţiei cognitive pe baza istoricului medical, istoricului familial, a examenelor fizice şi neurologice de către clinicieni specializaţi în demenţă şi funcţie cognitivă, teste de laborator şi evaluare neuropsihologică. Alte aplicări includ: evaluarea conştiinţei, cum ar fi utilizarea scalei de comă Glasgow (EMV); examinarea stării mentale, inclusiv punctajul testului mental abreviat (AMTS) sau mini-testul de examinare a stării mentale (MMSE) (Folstein et al., J. Psychiatr. Res 1975; 12:1289-198); evaluarea globală a funcţiilor superioare; estimarea presiunii intracraniene cum ar fi prin fundoscopie.

Într-o aplicare, se pot folosi examinările sistemului nervos periferic pentru evaluarea funcţiei cognitive, inclusiv oricare dintre următoarele: simţul mirosului, câmpul şi acuitatea vizuale, mişcările ochilor şi pupile (simpatic şi parasimpatic), funcţia senzorială a feţei, forţa muşchilor faciali şi ai centurii scapulare, auz, gust, mişcare faringiană şi reflex, mişcările limbii, care se pot testa individual (de ex. acuitatea vizuală poate fi testată printr-o diagramă Snellen; un ciocan pentru testarea reflexelor inclusiv la nivelul muşchiului masticator, tendonului bicepsului şi tricepsului, tendonului genunchiului, reflexul gleznei şi plantar (i.e. semnul Babinski); forţa muşchilor adesea pe scara MRC de la 1 la 5; tonus muscular şi semne de rigiditate.

15. Reactivi, dispozitive şi kituri

Se divulgă de asemenea reactivi, dispozitive şi kituri pentru punerea în practică a uneia sau mai multora dintre metodele descrise mai sus. Reactivii, dispozitivele şi kiturile din invenţie pot varia în mare măsură.

Reactivii şi dispozitivele de interes le includ pe cele menţionate mai sus cu privire la metodele de preparare a produsului sanguin cuprinzând plasmă în vederea transfuziei la un pacient în nevoie, de exemplu, anti-coagulante, crioconservanţi, soluţii tampon, soluţii izotonice etc..

Kiturile pot cuprinde de asemenea pungi de colectare a sângelui, tuburi, ace, tuburi de centrifugă etc.. În alte aplicări, kiturile descrise în prezenta includ două sau mai multe recipiente de produs plasmatic sanguin cum ar fi fracţiune proteică plasmatică, cum ar fi trei sau mai multe, patru sau mai multe, cinci sau mai multe, inclusiv şase sau mai multe recipiente de produs plasmatic sanguin. În unele cazuri, numărul recipientelor distincte de produs plasmatic sanguin în kit poate fi 9 sau mai mare, 12 sau mai mare, 15 sau mai mare, 18 sau mai mare, 21 sau mai mare, 24 sau mai mare, 30 sau mai mare, inclusiv 36 sau mai mare, de ex., 48 sau mai mare. Fiecare recipient poate avea informaţii de identificare asociate incluzând diferite date legate de produsul plasmatic sanguin conţinut, unde informaţiile de identificare pot include una sau mai multe dintre vârsta donatorului produsului de plasmă sanguină, detalii de procesare privind produsul de plasmă sanguină, de ex., dacă produsul a fost procesat pentru îndepărtarea proteinelor peste o greutate moleculară medie (aşa cum s-a descris mai sus), detaliile tipului sanguin etc. În unele cazuri, fiecare recipient din kit include informaţii de identificare legate de plasma sanguină conţinută şi informaţiile de identificare includ informaţii privind vârsta donatorului produsului de plasmă sanguină, de ex., informaţiile de identificare confirmă datele legate de vârsta donatorului produsului de plasmă sanguină (aceste informaţii de identificare putând fi vârsta donatorului la momentul recoltării). În unele cazuri, fiecare recipient din kit conţine un produs plasmatic sanguin de la un donator având în mare măsură aceeaşi vârstă, i.e., toate recipientele includ produs de la donatori care au în mare măsură aceeaşi vârstă sau au chiar aceeaşi vârstă. Prin în mare măsură aceeaşi vârstă se înţelege că diferiţii donatori de la care se obţin produşii de plasmă sanguină din kituri diferă, în unele cazuri, cu 5 ani sau mai puţin, cum ar fi 4 ani sau mai puţin, de ex., 3 ani sau mai puţin, inclusiv 2 ani sau mai puţin, cum ar fi 1 an sau mai puţin, de ex., 9 luni sau mai puţin, 6 luni sau mai puţin, 3 luni sau mai puţin, inclusiv 1 lună sau mai puţin. Informaţiile de identificare pot fi prezente pe orice componentă convenabilă a recipientului, cum ar fi o etichetă, un cip RFID etc.. Informaţiile de identificare pot fi citibile de om, de computer etc., după cum se doreşte. Recipientele pot avea orice configuraţie convenabilă. Deşi volumul recipientelor poate varia, în unele cazuri volumul este cuprins între 10 ml şi 5000 mL, cum ar fi 25 mL până la 2500 mL, de ex., 50 ml până la 1000 mL, inclusiv 100 mL până la 500 mL. Recipientele pot fi rigide sau flexibile şi pot fi fabricate din orice material convenabil, de ex., materiale polimerice, inclusiv materiale plastice din

clasa medicală. În unele cazuri, recipientele au formă de pungă sau săculeţ. Pe lângă recipiente, aceste kituri mai pot cuprinde dispozitive de administrare, de ex., descrise mai sus. Componentele acestor kituri pot fi prevăzute în orice ambalaj adecvat, de ex., o cutie sau o structură similară, configurată să includă recipientele şi alte componente.

Pe lângă componentele de mai sus, kiturile vor include de asemenea instrucţiuni de punere în practică a metodelor din prezenta. Aceste instrucţiuni pot fi prezente în kituri într-o varietate de forme, dintre care pot fi prezente una sau mai multe în kit. O formă în care pot fi prezente aceste aceste instrucţiuni este sub formă de informaţii tipărite pe un suport sau substrat adecvat, de exemplu, o bucată sau bucăţi de hârtie pe care sunt tipărite informaţiile, în ambalajul kitului, într-un prospect etc.. Un alt mijloc ar fi un mediu care poate fi citit de computer, de exemplu, o dischetă, un CD, o unitate flash portabilă etc., pe care au fost înregistrate informaţiile. Un alt mijloc care poate fi prezent este o adresă de website care poate fi utilizată prin internet pentru a accesa informaţiile de la distanţă. Pot fi prezente în kituri orice mijloace convenabile.

16. Proceduri experimentale

Următoarele exemple sunt prezentate pentru a oferi o divulgare completă şi o descriere a modului de realizare şi utilizare a prezentei descoperiri şi nu înseamnă că experimentele de mai jos sunt toate sau singurele experimente efectuate. S-au depus eforturi pentru a asigura precizia cu privire la numerele utilizate (de ex., cantităţi, temperatură etc.), dar ar trebui luate în considerare unele erori experimentale şi abateri. Cu excepţia cazului în care se indică altceva, părţile sunt părţi din greutate, greutatea moleculară este greutatea moleculară medie, temperatura este în grade Celsius şi presiunea este aproape de cea atmosferică.

Metodele generale în biochimia moleculară şi celulară pot fi găsite în texte standard precum Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook et al., HaRBor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999); Protein Methods (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996); Nonviral Vectors for Gene Therapy (Wagner et al. eds., Academic Press 1999); Viral Vectors (Kaplift & Loewy eds., Academic Press 1995; Immunology Methods Manual (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997); şi Cell and Tissue Culture: Laboratory Precedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998). Reactivii, vectorii de clonare şi kiturile pentru manipulări genetice la care se face referire în prezenta invenţie sunt disponibili de la furnizori comerciali cum ar fi BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich şi Clontech.

A. Materiale şi reactivi.

Serul fiziologic USP s-a achiziţionat de la Hospira (Lake Forest, IL). Injecţiile s-au efectuat cu ace 27.5G sau 30G, la un volum de 150 µL per injecţie. PPF din comerţ ("PPF1"), cum ar fi preparatele PPF comerciale descrise mai sus, în soluţie 5%, s-au depozitat la 4°C. HAS din comerţ ("HAS1"), cum ar fi preparatele HAS comerciale descrise mai sus, în soluţie 5%, s-au depozitat la 4°C.

B. Furnizarea şi îngrijirea animalelor.

S-au folosit coloniile de şoareci NOD.CB17-Prkdcscid/NcrCrl ("NODscid," cod 394, Charles River, MA) (Bosma, M. et al., The scid mouse mutant. 137 Curr Top Microbiol Immunol 197 (1988)) şi NOD scid gamma ("NSG", cod 005557, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Fiecare şoarece a primit un număr de identificare unic ataşat de ureche. Toţi şoarecii au fost adăpostiţi individual în condiţii specifice lipsite de patogeni într-un ciclu de 12 ore lumină şi 12 ore întuneric, toate animalele fiind manipulate şi utilizate în conformitate cu îndrumările standard aprobate de IACUC.

C. Administrare.

Dacă nu se descrie altceva mai jos, şoarecii NSG şi NODscid au fost injectaţi cu ser fiziologic USP, 5% PPF1 sau 5% HAS1, de două ori pe săptămână prin injecţie intravenoasă în vena din coadă (150 µL per injecţie) până la 6 luni.

D. Câmp deschis

S-au folosit teste în câmp deschis pentru determinarea comportomanetului explorator al şoarecilor. Testul în câmp deschis reprezintă o arenă goală de testare, de obicei rotundă sau pătrată. Şoarecele este amplasat într-o arenă deschisă de 50cm x 50cm timp de 15 minute şi se măsoară nivelul de activitate al şoarecelui. Timpul de ridicare s-a măsurat monitorizând durata în care labele din faţă s-au aflat pe pereţii cutiei. S-au măsurat şi distanţa totală acoperită şi viteza pe durata testului. S-a folosit CleverSys TopScan V3.0 (Reston, VA) pentru monitorizarea comportamentului şoarecilor în câmp deschis. Camerele în câmp deschis au fost construite de CleverSys.

E. Labirint Y

Şoarecii au fost lăsaţi să exploreze două braţe ale unui labirint Y (start + familiar) timp de 5 minute. O oră mai târziu, şoarecii au fost lăsaţi să exploreze toate cele trei braţe şi s-au înregistrat timpul total şi numărul intrărilor în braţe.

F. Labirint Barnes

Şoarecii au fost antrenaţi patru zile consecutive într-un labirint Barnes modificat şi li s-a acordat maxim 120 de secunde pentru a găsi gaura de scăpare. *(Vezi* Barnes, C.A., Memory deficits associated

with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat, J. COMPARATIVE and PHYSIOLOGICAL PSYCHOLOGY, 93(1): 74-104 (1979); iar pentru labirintul modificat, Faizi, M. et al., Thy1-hAPP(Lond/Swe+) mouse model of Alzheimer's disease displays broad behavioral deficits in sensorimotor, cognitive and social function., BRAIN BEHAV. 2(2): 142-54, (2012)). Gaura de scăpare a rămas la fel timp de patru teste pe zi de antrenament, dar s-a modificat între zilele de antrenament. Latența până la găsirea găurii de scăpare s-a înregistrat pentru fiecare grup de șoareci în patru zile de antrenament separate.

G. Celule pozitive la DCX și Ki67

Doublecortin (DCX) este o proteină asociată cu microtubuli exprimată de celule precursoare neuronale. Este exprimată și de neuroni imaturi în structuri corticale embrionare și adulte. Când se divid activ, celulele precursoare neuronale exprimă DCX. Proteina scade după două săptămâni. Datorită acestei asocieri, este utilă ca marker al neurogenezei.

Procesarea țesuturilor cerebrale și imunohistochimia s-au efectuat pe secțiuni liber plutitoare prin tehnici bine descrise (Luo, J. et al. Glia-dependent TGF-b signaling, acting independently of the TH17 pathway, is critical for initiation of murine autoimmune encephalomyelitis. J. CLIN. INVEST. 117, 3306-3315 (2007)). Șoarecii au fost anesteziați și au primit perfuzii de 0.9% ser fiziologic. S-a îndepărtat creierul și apoi s-a fixat cu 4% paraformaldehidă tamponată cu fosfat, pH 7.4, la 4°C, înaintea imersiei prin 30% sucroză pentru crioprotejare. Creierul a fost secționat la 30 µm cu un criomicrotom la -22°C. Secțiunile s-au depozitat în mediu crioprotector. Anticorpul primar folosit a fost anti-Dcx de capră (Santa Cruz Biotechnology la 1:500 pentru experimente de dozaj de două ori pe săptămână sau 1:200 în experimentele de dozaj de trei ori pe săptămână) sau anti-Ki67 de iepure (1:500 Abcam). Colorarea anticorpului primar a fost indicată folosind anticorpi secundari biotinilați și ABCkit (Vector) cu diaminobenzidină (DAB, Sigma-Aldrich) sau anticorpi secundari conjugați fluorescent. Pentru estimarea numărului total al celulelor Dcx-pozitive per girus dentat, s-au numărat celulele imunopozitive în stratul celular granular și subgranular al girusului dentat în trei secțiuni semicerebrale coronale prin hipocamp și s-a făcut media.

H. Testul labirintului Barnes pe șoareci NSG în vârstă tratați cu plasmă tânără, efluent I sau efluent II/III

Șoarecii NSG în vârstă (12 luni) s-au separat în mai multe grupuri (n=14) și au primit 150 µL ser fiziologic, plasmă tânără, efluent I sau efluent II/III prin injecția în vena cozii înaintea începerii testelor comportamentale. Fiecare grup a fost separat în 3 cohorte, fiecare cohortă începând testele comportamentale într-o săptămână diferită.

I. Labirintul Barnes și supraviețuire celulară (colorare BrdU) la șoareci NSG în vârstă tratați de trei ori pe săptămână cu plasmă tânără sau PPF1

Șoarecii NSG masculi în vârstă (12 luni) au fost tratați intravenos prin injecție în vena cozii cu 150 µL plasmă umană tânără limpezită (plasmă tânără), PPF1 sau ser fiziologic de trei ori pe săptămână timp de patru săptămâni. Regimul a fost schimbat la de două ori pe săptămână în săptămânile 5 și 6, acestea fiind săptămânile de testare comportamentală.

Înaintea tratamentului, șoarecii au fost împărțiți în trei cohorte de câte 13-15 șoareci. Fiecare cohortă a suferit cinci zile de injecții BrdU intraperitoneal (i.p.) înaintea începerii tratamentului cu plasmă tânără, PPF1 sau ser fiziologic, așa cum s-a descris mai sus.

În săptămânile 5 și 6, s-a efectuat testarea comportamentală și s-a măsurat latența până la gaura țintă pentru fiecare șoarece în testul labirintului Barnes. Fiecare sesiune de testare a durat maxim 120 de secunde. Evenimentul de găsire a găurii țintă a fost înregistrat folosind software care a stabilit când nasul șoarecelui a intrat în zona definită ca gaură țintă.

La sfârșitul testării comportamentale, animalele au fost sacrificate și s-au cuantificat șase secțiuni per hipocamp folosind un microscop în câmp luminos pentru a determina prezența celulelor pozitive la BrdU în stratul celular granular al girusului dentat. Ca secțiuni reprezentative prin diferitele regiuni ale hipocampului, numărul mediu al celulelor pozitive BrdU s-a înmulțit cu 72, aceasta fiind numărul total al secțiunilor pentru hipocampul fiecărui animal, pentru a obține o estimare a numărului total de celule pozitive BrdU.

J. Teste de culturi de neurosfere și corticale

1. Colorare Tuj 1 și DAPI

Cortexurile de la șoareci C57 E14,15 (Lonza: M-CX-300) s-au suspendat în 12 ml de mediu bazal neural suplimentat cu B27, 2 mM Glutamax (Sigma-Aldrich). S-au adăugat 200 µL în fiecare godeu al unei plăci cu 96 de godeuri pre-acoperite cu colagen I (Corning, Inc.). După 16 ore, mediul plăcilor a fost înlocuit cu mediu de control pre-încălzit (37°C) (mediu bazal neural cu B27, 2 mM Glutamax (Gibco). În ziua 4 in vitro ("zile in vitro" sau "DIV"), mediul de cultură a fost înlocuit cu mediu de control proaspăt, mediu de control și 10% PPF1, mediu de control și 10% HAS1, vehicul și 10% PPF1 sau vehicul și 10% HAS1. Culturile s-au menținut 21 de zile cu 75% din mediu schimbat cu mediu proaspăt la fiecare 3 zile. În ziua 21 in vitro, culturile au fost spălate 3X cu PBS, fixate cu 4% Paraformaldehidă 20

de minute la temperatura camerei (TC). După fixare, culturile au fost spălate 2X cu PBS, permeabilizate cu 0.1% Triton X100 5-20 de minute. După permeabilizare, culturile au fost blocate cu 3% albumină serică bovină (Sigma-Aldrich) 60 de minute la TC. După 60 de minute, soluția de blocare a fost aspirată și culturile au fost marcate cu anticorp anti-Tujl (AbCam-1:500) la 4°C peste noapte. După marcare, culturile au fost spălate 3X cu PBS + 0.1% BSA, colorate cu anticorp anti-șoarece de măgar conjugat cu A647la 4°C peste noapte (1:1000). Culturile au fost spălate 2X cu PBS și marcate cu Hoechst 33342 (1:1000) 20 min. Probele au fost spălate 3X cu PBS după marcarea Hoechst. S-au obținut douăzeci și cinci (25) de câmpuri pentru fiecare godeu folosind mărire 10X cu ajutorul GE InCell Analyzer 2000 (GE Healthcare Life Sciences). Rezultatele sunt indicate în **Figura 19.**

2. Lungimea netă a procesului neuronal

Lungimea netă a procesului neuronal s-a determinat din culturi descrise în secțiunea anterioară. Analiza proceselor neuronale s-a efectuat cu ajutorul unui algoritm adaptat generat de GE InCell Investigator Developer Toolbox. Rezultatele probelor de control și tratate cu vehicul au fost aproape identice, prin urmare s-au combinat pentru analiza statistică. Rezultatele sunt indicate în **Figura 20.**

3. Numărul și dimensiunea sferelor din cultura cortiacală; lungimea și ramificarea procesului

Cortexurile de la șoareci C57 E14,15 (Lonza: M-CX-300) s-au suspendat în 12 ml de mediu neurobazal suplimentat cu B27, 2 mM Glutamax (Sigma-Aldrich). S-au adăugat 200 µL în fiecare godeu al unei plăci cu 96 de godeuri pre-acoperite cu polilizină și laminină. Patru zile mai târziu, 50% din mediu a fost schimbat cu mediu proaspăt și tratat cu articolul testat (vehicul, PPF1 sau HAS1) la o concentrație finală de 10%. Aceasta s-a repetat trei zile mai târziu. În ziua 7 de tratament, celulele au fost reprezentate prin contrast de fază la mărire 10X cu IncuCyte (Ann Arbor, MI) și analizate cu algoritmi "Neurite and Cell-Body" standard. S-au analizat șase reproduceri cu patru imagini per reproducere. Se indică eroarea standard. Semnificația este indicată pentru testul T bilateral ca $P < 0.5$. Rezultatele sunt indicate în **Figurile 21** și **22.**

4. Colorarea neurosferelor cu Sox2

Neuronii corticali ai șoarecilor C57 E14,15 (Lonza: M-CX-300) s-au suspendat în mediu neurobazal suplimentat cu B27, 2 mM Glutamax (Sigma-Aldrich) la 100-200K celule/ml. S-au adăugat 200 µL în fiecare godeu al unei plăci cu 96 de godeuri pre-acoperite cu colagen I (Corning, Inc.). După 16 ore, mediul plăcilor a fost înlocuit cu mediu de control pre-încălzit (37°C) (mediu neurobazal cu B27, 2 mM Glutamax (Gibco). În ziua 4 in vitro ("zile in vitro" sau "DIV"), mediul de cultură a fost înlocuit cu mediu de control proaspăt, mediu de control cu vehicul HAS (vehicul), mediu de control și 10% PPF1, mediu de control și 10 % HAS1. Culturile s-au menținut 21 de zile cu 75% din mediu schimbat cu mediu proaspăt la fiecare 3-4 zile. În ziua 21 in vitro, culturile au fost spălate 3X cu PBS, fixate cu 4% Paraformaldehidă 20 de minute la temperatura camerei (TC). După fixare, culturile au fost spălate 2X cu PBS, permeabilizate cu 0.1% Triton X100 5-20 de minute. După permeabilizare, culturile au fost blocate cu 3% albumină serică bovină (Sigma-Aldrich) 60 de minute la TC. După 60 de minute, soluția de blocare a fost aspirată și culturile au fost marcate cu anticorp anti-Tujl (AbCam-1:500) și anti SOX2 de iepure (AbCam: 1:5000) la 4°C peste noapte. După marcare, culturile au fost spălate 3X cu PBS + 0.1% BSA, colorate cu anticorp anti-șoarece de măgar 647 (AbCam) și Texas Red de oaie anti-iepure la 4°C peste noapte (1:1000). Culturile au fost spălate 2X cu PBS și marcate cu Hoechst (1:1000) 20 min. Probele au fost spălate 3X cu PBS după marcarea Hoechst. S-au obținut douăzeci și cinci (25) de câmpuri pentru fiecare godeu folosind mărire 10X cu ajutorul InCell Analyzer 2000 (GE Healthcare Life Sciences). Analiza neurosferelor și proceselor neuronale s-a efectuat cu ajutorul unui algoritm adaptat generat de GE InCell Investigator Developer Toolbox. Rezultatele probelor de control și tratate cu vehicul au fost aproape identice, prin urmare s-au combinat pentru analiza statistică. Rezultatele sunt indicate în **Figura 23.**

K. Rezultatele experimentelor in vivo

1. Testul în câmp deschis cu șoareci NSG în vârstă de 3 luni și 13 luni

Șoarecii NSG de 3 luni (tineri) sau 13 luni (bătrâni) s-au introdus într-o cameră în câmp deschis 15 minute. S-au măsurat timpul de ridicare **Figura 1,** viteza **Figura 2** și distanța **Figura 3**. Figura 1 arată că șoarecii în vârstă de 13 luni au petrecut mai puțin timp în poziție ridicată decât șoarecii în vârstă de 3 luni, dar că șoarecii tratați cu PPF1 și HAS 1 nu au diferit semnificativ de șoarecii tineri. Figura 2 arată că șoarecii în vârstă de 13 luni tratați cu ser fiziologic (control) și PPF1 au fost semnificați mai lenți decât șoarecii în vârstă de 3 luni. Totuși, șoarecii tratați cu HAS 1 au fost semnificativ mai rapizi decât șoarecii tratați cu ser fiziologic și nu au fost semnificativ diferiți de șoarecii tineri. Figura 3 arată că șoarecii bătrâni tratați cu ser fiziologic (control) și HAS1 au avut mai puțină activitate locomotorie decât șoarecii tineri și șoarecii tratați cu PPF1 au acoperit o distanță mai mare decât șoarecii tratați cu ser fiziologic. Toate datele indicate reprezintă media ± s.e.m; $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$; t-test; n = 20, 18, 18, 19. (SAL = ser fiziologic).

2. Testul labirintului Y cu şoareci NSG în vârstă de 3 luni şi 13 luni

Şoarecii NSG tineri (de 3 luni) şi bătrâni (de 13 luni) au fost testaţi în labirintul Y cu indicii ca un test de memorie. **Figura 4** arată că toţi şoarecii au petrecut semnificativ mai mult timp în braţul nou (N) decât în braţul familiar (F). **Figura 5** arată că şoarecii bătrâni trataţi cu HAS 1 au avut deficienţe semnificative de memorie pentru braţul familiar în comparaţie cu şoarecii tineri, în timp ce şoarecii trataţi cu PPF1 au prezentat tendinţă de memorie îmbunătăţită pentru braţul familiar. **Figura 6** arată că şoarecii bătrâni trataţi cu ser fiziologic şi PPF1, dar nu şi cei trataţi cu HAS 1, au fost semnificativ mai lenţi decât şoarecii tineri. **Figura 7** arată că şoarecii bătrâni trataţi cu ser fiziologic şi PPF1, dar nu şi cei trataţi cu HAS 1, au acoperit o distanţă mai mică decât şoarecii tineri. Toate datele indicate reprezintă media ± s.e.m; $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$; Test t împerecheat; n = 20, 18, 18, 19. (SAL = ser fiziologic).

3. Testul de condiţionare a fricii pentru memorie cu şoareci NSG în vârstă de 3 luni şi 13 luni

Şoarecii NSG tineri (3 luni) şi bătrâni (13 luni) au fost testaţi în testul de condiţionare a fricii cu privire la memorie. **Figura 8A** arată că şoarecii în vârstă de 13 luni au avut tendinţa să petreacă mai puţin timp nemişcaţi decât şoarecii în vârstă de 3 luni, în timp ce şoarecii trataţi cu HAS1 au petrecut aproape la fel de mult timp nemişcaţi precum şoarecii în vârstă de 3 luni. **Figura 8B** arată că în testul de memorie cu indicii auditive şoarecii de 13 luni trataţi cu control au avut cel mai slab rezultat şi au încremenit cea mai mică cantitate de timp. Şoarecii trataţi cu HAS 1 au avut tendinţa de a petrece mai mult timp nemişcaţi, indicând memorie îmbunătăţită pentru ton. **Figura 9** reprezintă cuantificarea ultimelor 90 de secunde ale testului de memorie cu indicii şi arată că şoarecii trataţi cu HAS 1 au avut tendinţa de a petrece mai mult timp nemişcaţi, indicând memorie îmbunătăţită. n = 20, 16, 17, 19. (SAL = ser fiziologic).

4. Testul labirintului Barnes pentru memorie spaţială cu şoareci NSG în vârstă de 3 luni şi 13 luni

Şoarecii NSG tineri (3 luni) şi bătrâni (13 luni) au fost testaţi în labirintul Barnes cu privire la memoria spaţială. **Figura 10A** arată că şoarecii în vârstă de 3 luni au avut cel mai bun rezultat şi au avut cea mai rapidă latenţă până la găsirea găurii ţintă la utlimul test. **Figura 10B** reprezintă cuantificarea mediei ultimelor 3 teste care demonstrează că şoarecii bătrâni trataţi cu ser fiziologic şi HAS1 au avut perturbări semnificative de memorie a găurii ţintă comparativ cu şoarecii tineri, dar şoarecii trataţi cu PPF1 nu au diferit semnificativ de şoarecii tineri. $^{**}P<0.01$; $^{***}P< 0.001$; Test t neîmperecheat; n = 20, 18, 18, 19. (SAL = ser fiziologic).

5. Imunocolorare cu şoareci NSG de 3 luni şi 13 luni

Secţiunile de creier au fost colorate pentru doublecortin (Dcx), un marker pentru neuronii nou născuţilor, sau Ki67, un marker pentru celulele proliferante în şoareci NSG în vârstă de 3 luni şi 13 luni trataţi de două ori pe săptămână cu ser fiziologic, PPF1 sau HAS1. Celule pozitive Dcx şi Ki67 au fost numărate în girusul dentat al şoarecilor NSG tineri şi bătrâni. **Figurile 11A** şi **11B** arată că toţi şoarecii bătrâni au avut numere semnificativ mai mici de celule Dcx- sau Ki67-pozitive. Şoarecii trataţi cu PPF1 şi HAS1 au avut tendinţă să prezine numere mai mari de celule Dcx- şi Ki67-pozitive comparativ cu şoarecii trataţi cu ser fiziologic.

6. Imunocolorare cu şoareci NSG în vârstă de 3 luni şi 13 luni trataţi de trei ori pe săptămână cu PPF1 şi HAS1

Secţiunile de creier au fost colorate pentru doublecortin (Dcx), un marker pentru neuronii nou născuţilor, sau Ki67, un marker pentru celulele proliferante în şoareci în vârstă de 13 luni. Şoarecii au fost trataţi de trei ori pe săptămână cu ser fiziologic, PPF1, 1X HAS1 concentrat sau 5X HAS1 concentrat. Celulele Dcx- şi Ki67-pozitive s-au numărat în girusul dentat. **Figura 12** arată că şoarecii trataţi cu PPF1 au avut tendinţă de creştere a neurogenezei (indicată de colorarea Dcx), comparativ cu animalele de control tratate cu ser fiziologic. Se arată de asemenea că HAS1 mai concentrat a avut tendinţă de neurogeneză mărită comparativ cu animalele tratate cu ser fiziologic.

Figura 13 arată că şoarecii trataţi cu PPF1 au prezentat o creştere semnificativă a proliferării celulare (indicată de colorarea Ki67), comparativ cu animalele de control tratate cu ser fiziologic. Se arată de asemenea că HAS1 mai concentrat a avut tendinţă de neurogeneză mărită comparativ cu animalele tratate cu ser fiziologic. $^{*}P < 0.05$; test t neîmperecheat faţă de grupul cu ser fiziologic; toate datele indicate reprezintă media ± s.e.m.

7. Test în câmp deschis cu şoareci NODscid

Şoarecii NODscid au fost trataţi de două ori pe săptămână prin injecţie intravenoasă în vena din coadă cu ser fiziologic sau PPF1 începând cu vârsta de 6 luni. Numărul iniţial al şoarecilor a fost 20 pentru fiecare grup. Şoarecii s-au introdus în camera în câmp deschis 15 minute şi s-a înregistrat activitatea locomotorie. **Figura 14A** arată că şoarecii trataţi cu PPF1 au prezentat tendinţă către activitate de ridicare mărită comparativ cu şoarecii trataţi cu ser fiziologic. **Figurile 14B** şi **14C** arată că şoarecii trataţi cu PPF1 au de asemenea tendinţă către viteză şi distanţă acoperită îmbunătăţite faţă de şoarecii trataţi cu ser fiziologic.

8. Labirintul Barnes cu şoareci NSG bătrâni (12 luni) trataţi cu plasmă tânără, efluent I şi efluent II/III

Şoarecii NSG în vârstă (12 luni) s-au separat în mai multe grupuri (toate cu dimensiunea n=14) şi au primit 150 µL ser fiziologic, plasmă tânără, efluent I sau efluent II/III prin injecţie în vena cozii înaintea începerii testelor comportamentale. Fiecare grup s-a separat în 3 cohorte, fiecare cohortă începând testele comportamentale într-o săptămână diferită. Şoarecii au fost testaţi într-un labirint Barnes modificat (descris mai sus) pentru a evalua învăţarea şi memoria spaţială. **Figura 15** arată că tratamentul cu plasmă tânără, efluent I sau efluent II/III a prezentat tendinţe către îmbunătăţire semnificativă a latenţei pentru şoarecii NSG în vârstă până la găsirea găurii ţintă.

9. Labirintul Barnes şi supravieţuirea celulară cu şoareci NSG bătrâni trataţi cu plasmă tânără şi PPF1

Aşa cum s-a descris mai sus, şoarecii NSG masculi bătrâni (12 luni) au fost trataţi cu 150 µL de plasmă umană tânără limpezită (plasmă tânără), PPF1 sau ser fiziologic de trei ori pe săptămână (i.v.) timp de 4 săptămâni, şi apoi de două ori pe săptămână în săptămânile 5 şi 6, acestea fiind săptămânile în care s-a efectuat testarea.

Figura 16 raportează latenţa până la găsirea găurii labirintului Barnes pentru fiecare cohortă de tratament. Tratamentul cu PPF1 a îmbunătăţit semnificativ memoria spaţială la şoareci bătrâni comparativ cu controlul, în timp ce tratamentul cu plasmă tânără a prezentat tendinţă către memorie spaţială îmbunătăţită faţă de control. (n: ser fiziologic=12, PPF1=14, plasmă tânără=11). $^{*}P < 0.05$; medie ± s.e.m.; test T neîmperecheat.

Figura 17 raportează latenţa medie de găsire a găurii ţintă pentru ultimele trei teste pentru fiecare zi de testare. Din nou, tratamentul cu PPF1 a îmbunătăţit semnificativ memoria spaţială la şoareci bătrâni comparativ cu controlul, în timp ce tratamentul cu plasmă tânără a prezentat tendinţă către memorie spaţială îmbunătăţită faţă de control. $^{*}P < 0.05$; medie ± s.e.m.; test T neîmperecheat.

Figura 18 raportează efectul plasmei umane tinere şi PPF1 asupra supravieţuirii celulare determinat prin numărul celulelor marcate pozitiv BrdU (i.e. celule care proliferează) în stratul granular al girusului dentat al şoarecilor NSG bătrâni (12 luni). BrdU s-a administrat cinci zile (i.p.) înaintea începerii injecţiilor intravenoase de plasmă tânără, PPF1 sau ser fiziologic de control, aşa cum s-a descris mai sus. S-a observat o creştere semnificativă a supravieţuirii celulare la şoarecii trataţi atât cu plasmă umană tânără, cât şi cu PPF1 faţă de controlul cu ser fiziologic. Semnificaţia statistică s-a determinat folosind ANOVA unifactorială cu analiza post-hoc comparativă multiplă Dunnett între PPF1 şi plasmă umană tânără comparativ cu tratamentul cu ser fiziologic. (n: ser fiziologic=13; PPF1=13; plasmă tânără=11, $^{****}P > 0.0001$, test T neîmperecheat între PPF1 sau plasmă umană tânără şi tratament cu ser fiziologic).

L. Rezultatele testelor culturilor de neurosfere şi corticale *in vitro*

Figura 19 arată că PPF1 şi HAS1 modulează diferenţiat proliferarea neurosferelor în cultura corticală. Cortexurile şoarecilor E14-15 C57 s-au cultivat în plăci cu 96 de godeuri acoperite cu colagen I în mediu de cultură conţinând doar vehicul, PPF1 (10%) sau HAS1 (10%). Se indică imagini exemplificative ale neurosferelor din culturi corticale după 21 de zile in vitro, reprezentate pentru Tuj1 (beta-tubulina specifică neuronilor clasa III), DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) sau atât TuJ1, cât şi DAPI. Figura 19 arată că PPF1 creşte cantitatea de neurosfere care exprimă Tuj1 sau DAPI. Creşterea expresiei Tuj1 demonstrează că culturile corticale tratate cu PPF1 produc mai multe neurosfere care s-au diferenţiat într-un fenotip mai neuronal.

Figura 20 indică trei culturi de neuroni corticali E14-15 ai şoarecilor C57 (Lonza: M-CX-300) suspendaţi în mediu neurobazal suplimentat cu B27, 2 mM Glutamax (Sigma-Aldrich) la 100-200K celule/mL, în plăci cu 96 de godeuri acoperite cu colagen I în mediu de cultură conţinând vehicul, PPF1 (10%) sau HAS1 (10%). A apărut o lungime netă a procesului neuronal care indică neurogeneza în culturile tratate cu PPF1 comparativ cu culturile tratate cu control sau HAS 1.

Figura 21 indică trei culturi de neuroni corticali E14-15 ai şoarecilor C57 (Lonza: M-CX-300) suspendaţi în mediu neurobazal suplimentat cu B27, 2 mM Glutamax (Sigma-Aldrich) la 100-200K celule/mL, în plăci cu 96 de godeuri acoperite cu colagen I în mediu de cultură conţinând vehicul, PPF1 (10%) sau HAS1 (10%). Un algoritm de software IncuCyte disponibil de la Essen BioSciences (Ann Arbor, MI) a detectat sfere de cultură corticală (evidenţiate cu galben) şi procese (evidenţiate cu roz). S-au observat de asemenea mai multe sfere şi procese în culturile tratate cu PPF1 şi dimensiune a sferelor şi ramificare a procesului mărite în culturile tratate cu PPF1. Barele de scară sunt 300µm fiecare.

Figura 22. Figurile 22A-D raportează numărul sferelor, lungimea proceselor, punctele de ramificare a proceselor, respectiv dimensiunea sferelor. Cuantificarea s-a efectuat folosind un algoritm de software IncuCyte disponibil de la Essen BioSciences (Ann Arbor, MI). Se indică eroarea standard. Semnificaţia este indicată folosind un test t bilateral. **Figura 22A** arată că culturile tratate cu PPF1 au un număr crescut de sfere comparativ cu culturile tratate cu vehicul sau HAS 1. *(P* = 0.0006, PPF1 vs.

vehicul; P = 0.0007, PPF1 vs. HAS1). **Figura 22B** arată că culturile tratate cu PPF1 prezintă lungime crescută a proceselor comparativ cu culturile tratate cu vehicul sau HAS 1. ($P = 4e^{-8}$, PPF1 vs. vehicul; P = 0.002, PPF1 vs. HAS1; şi P = 0.018, HAS1 vs. vehicul). **Figura 22C** arată că culturile tratate cu PPF1 produc mai multe puncte de ramificare a proceselor comparativ cu culturile tratate cu vehicul sau HAS1. (P = 0.002 PPF1 vs. vehicul; P = 0.004, PPF1 vs. HAS1). **Figura 22D** arată că culturile tratate cu PPF1 sunt asociate cu dimensiune mărită a sferelor comparativ cu culturile tratate cu vehicul sau HAS1. (P = 0.002 PPF1 vs. vehicul; P = 0.004, PPF1 vs. HAS1). Împreună, rezultatele acestor date arată că tratamentul cu PPF1 (şi HAS1 într-o măsură mai puţin semnificativă) este asociat cu caracteristici care indică creştere celulară în cultura corticală şi formare de procese mărite.

Figura 23 indică numărul neurosferelor colorate pozitiv pentru Sox2, un factor de transcriere care are un rol important în menţinerea celulelor stem embrionare şi neurale. Cuantificarea s-a efectuat folosind un algoritm GE InCell Investigator Toolbox. Culturile tratate cu PPF1 au produs un număr crescut semnificativ de neurosfere colorate pozitiv pentru Sox2, indicând că tratamentul PPF1 este asociat cu o creştere a numărului de celule cu potenţial de neurogeneză.

(56) Referinţe bibliografice citate în raportul de documentare:

- BOADA et al.: "Treatment of Alzheimer disease using combination therapy with plasma exchange and haemapheresis with albumin and intravenous immunoglobulin: Rationale and treatment approach of the AMBAR (Alzheimer Management By Albumin Replacement) study", Neurologia, vol. 31, no. 7, 29 July 2016 (2016-07-29), pages 473-481, XP055529120,
- EP-A1- 1 393 740
- WO-A1-2009/155069
- HUGHES et al.: "Clinical applications of intravenous immunoglobulins in neurology", Clinical and Experimental Immunology, vol. 158, no. supple. 1, 2009, pages 34-42, XP055466979,
- VILLEDA et al.: "Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice", Nature Medicine, vol. 20, no. 6, 2014, pages 659-663, XP055202055,
- US-A- 4 900 720
- US-A1- 2009 111 740
- US-A1- 2013 121 979
- US-A1- 2014 328 856

(57) Revendicări:

1. O fracţiune proteică plasmatică (PPF) pentru utilizare în tratarea unei tulburări cognitive legate de vârstă, unde se administrează o cantitate eficientă de PPF unui subiect diagnosticat cu tulburarea cognitivă legată de vârstă, unde PPF are un conţinut proteic total constând din cel puţin 83%, dar mai puţin de 95% albumină, nu mai mult de 17% globuline şi alte proteine plasmatice şi nu mai mult de 1% globulină gamma, unde PPF provine din plasmă umană.

2. PPF pentru utilizare conform revendicării 1, unde PPF este o PPF disponibilă în comerţ.

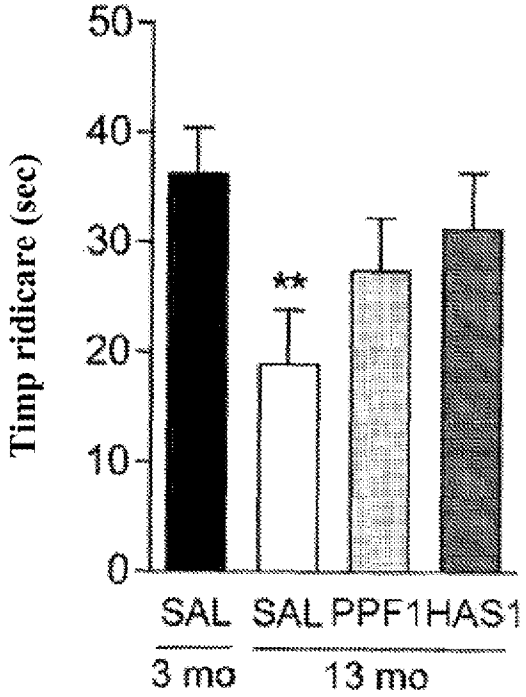
3. PPF pentru utilizare conform oricăreia din revendicările anterioare cuprinzând de asemenea monitorizarea subiectului cu privire la funcţia cognitivă îmbunătăţită.

4. PPF pentru utilizare conform oricăreia din revendicările anterioare, unde PPF provine din plasmă de la un grup de oameni sub vârsta de 40 de ani.

5. PPF pentru utilizare conform oricăreia din revendicările anterioare, unde subiectul este un mamifer.

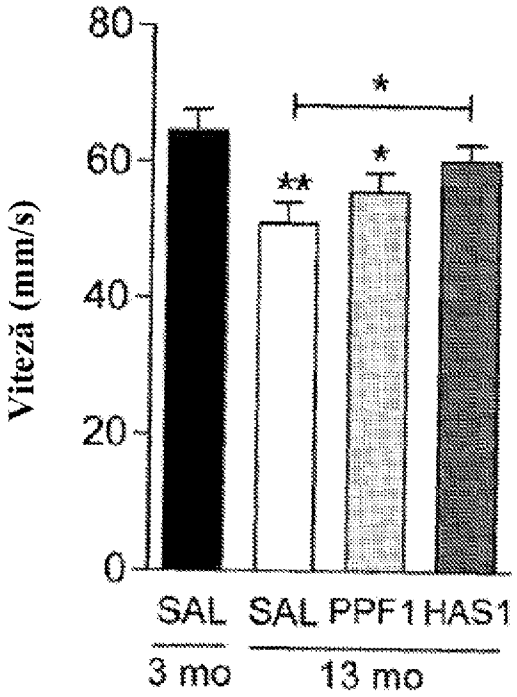
6. PPF pentru utilizare conform revendicării 7, unde mamiferul este un om.

Figura 1



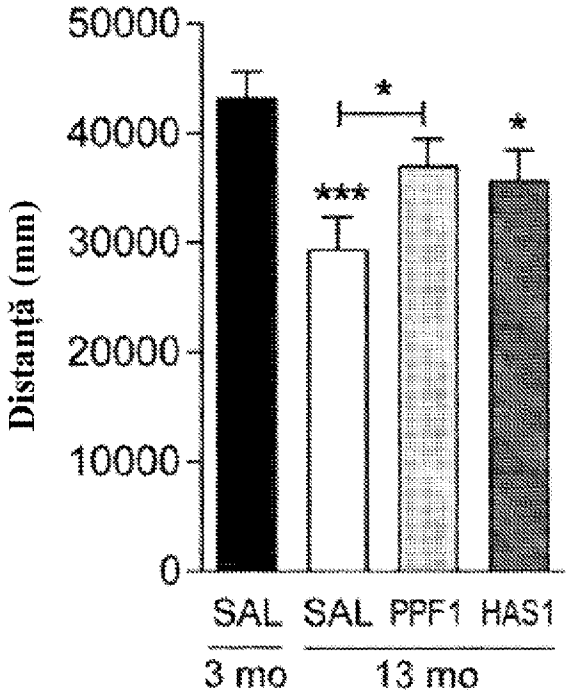
SAL = Ser fiziologic
mo = luni

Figura 2



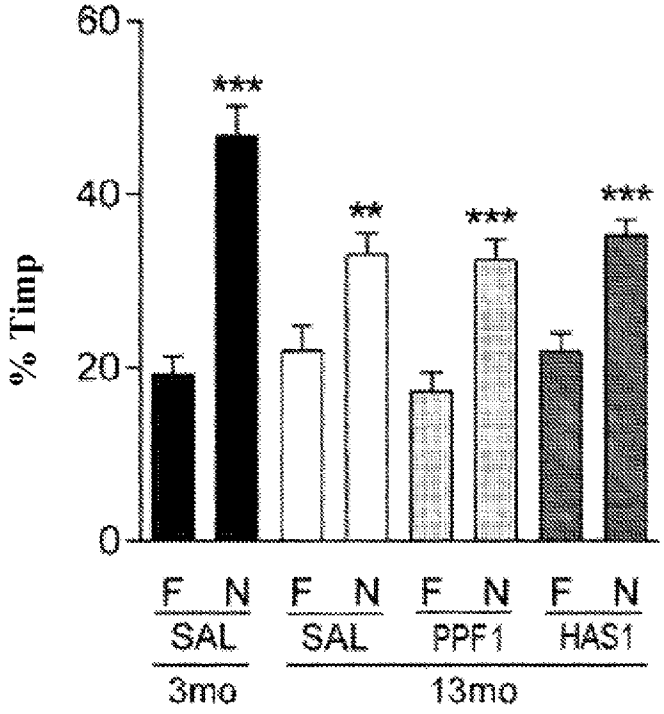
SAL = Ser fiziologic
mo = luni

Figura 3



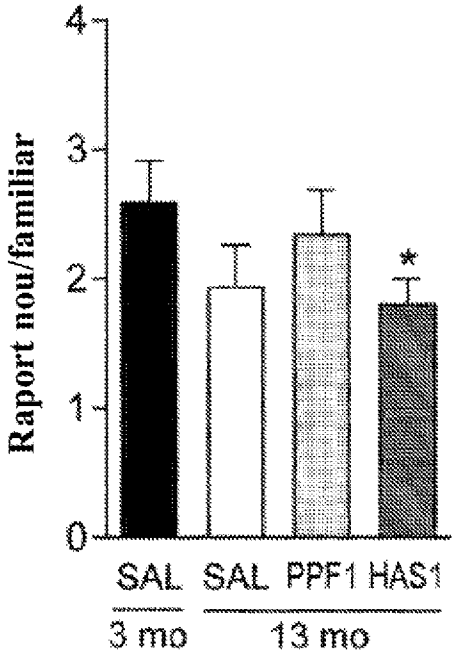
SAL = Ser fiziologic
mo = luni

Figura 4



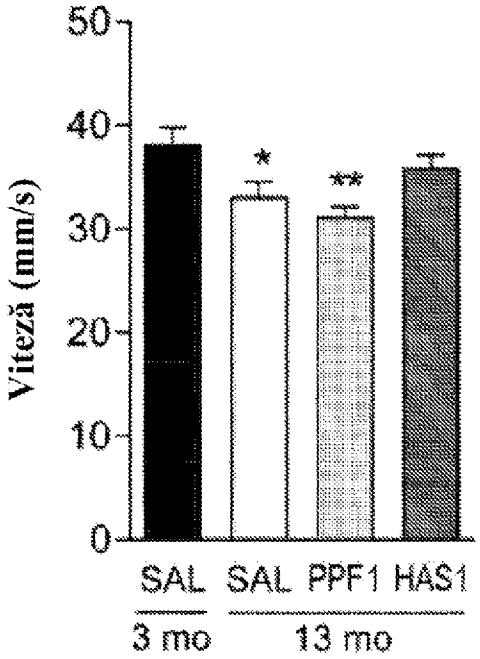
SAL = Ser fiziologic
mo = luni

Figura 5



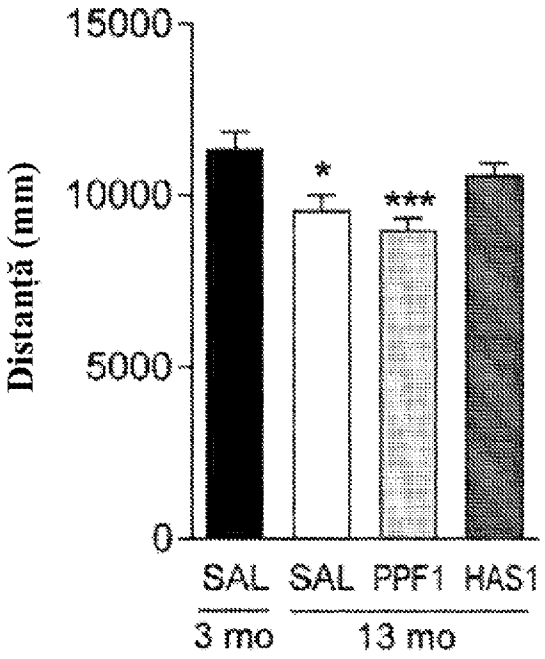
SAL = Ser fiziologic
mo = luni

Figura 6



SAL = Ser fiziologic
mo = luni

Figura 7



SAL = Ser fiziologic
mo = luni

FIGURA 8A

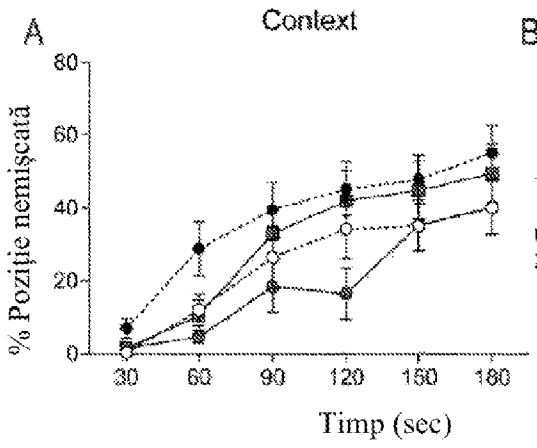
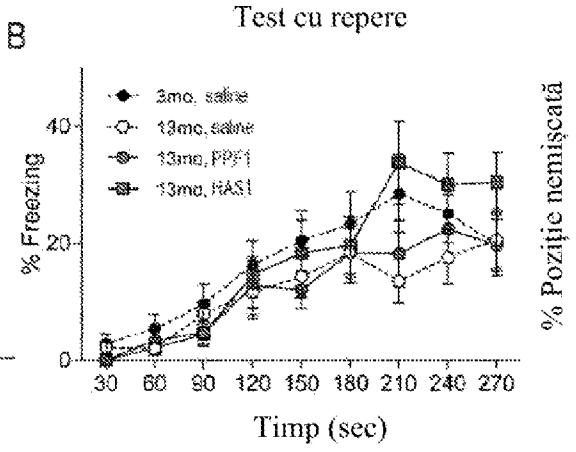
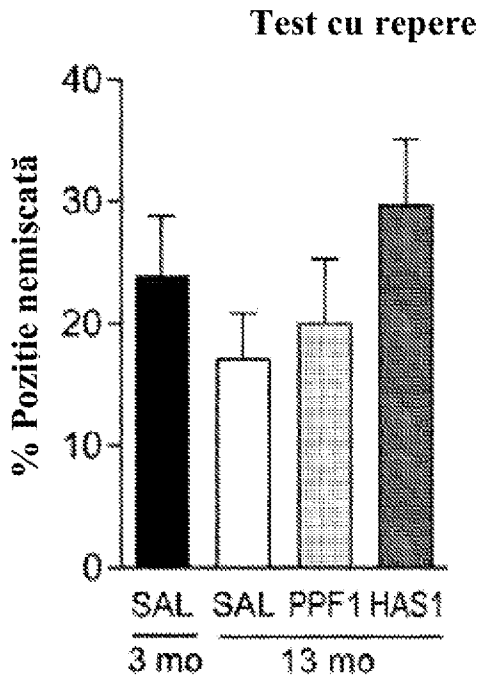


FIGURA 8B



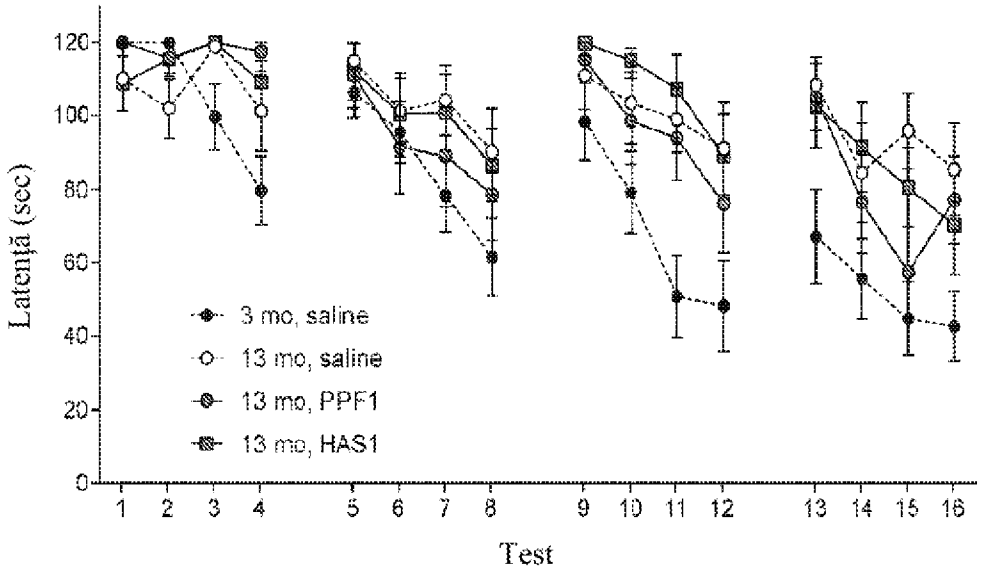
saline = ser fiziologic
mo = luni

Figura 9



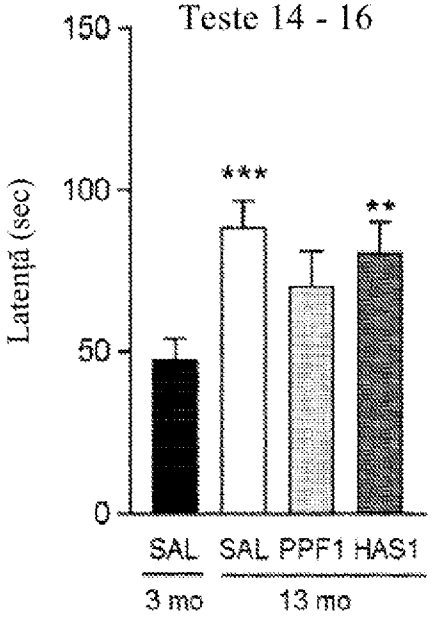
SAL = Ser fiziologic
mo = luni

Figura 10A



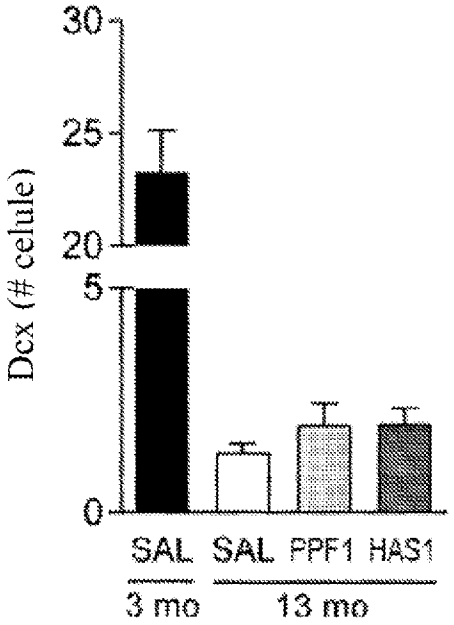
saline = ser fiziologic
mo = luni

Figura 10B



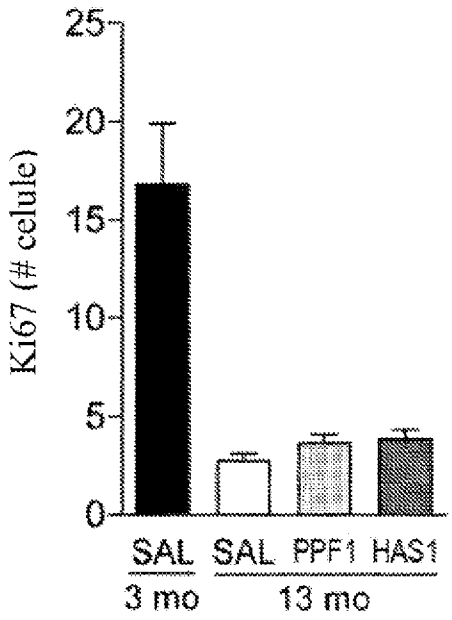
SAL = Ser fiziologic
mo = luni

FIGURA 11A



SAL = Ser fiziologic
mo = luni

FIGURA 11B



SAL = Ser fiziologic
mo = luni

Figura 12

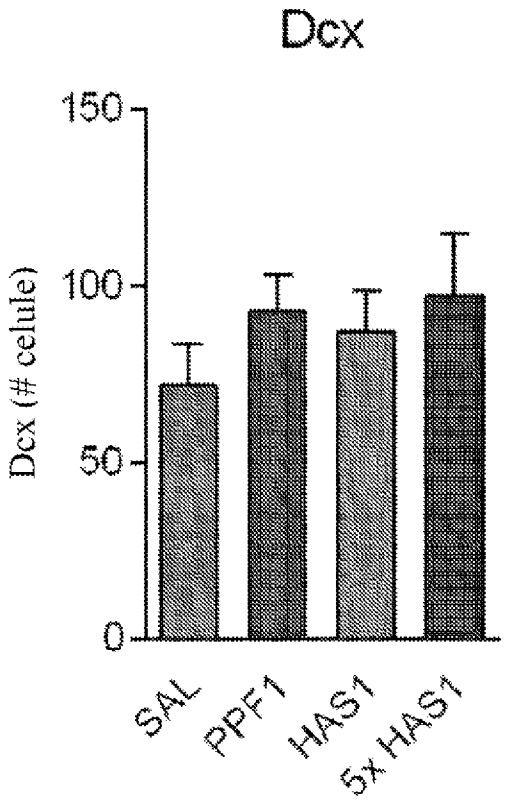


Figura 13

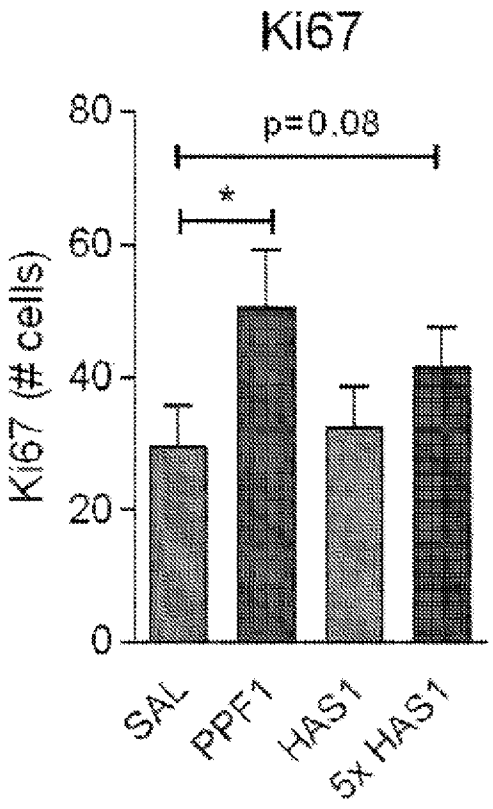


FIGURE 14A

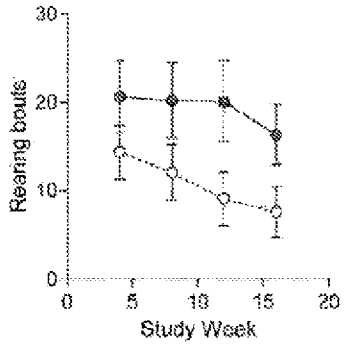


FIGURE 14B

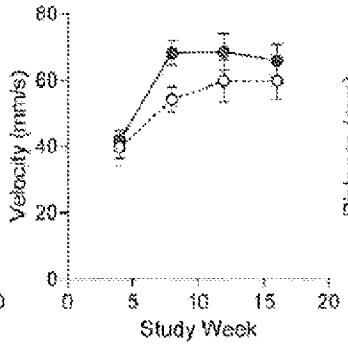


FIGURE 14C

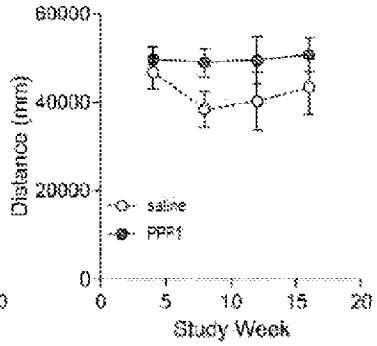


Figura 15

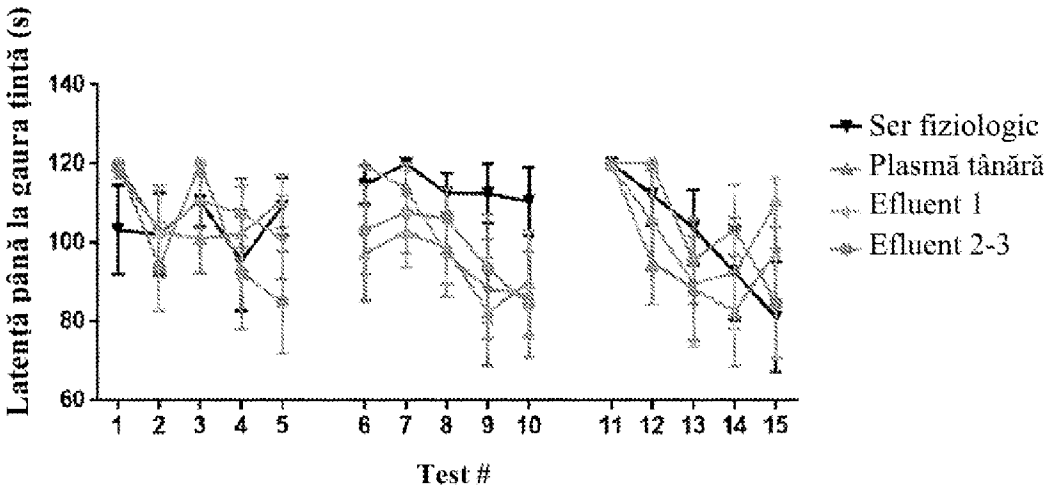


Figura 16

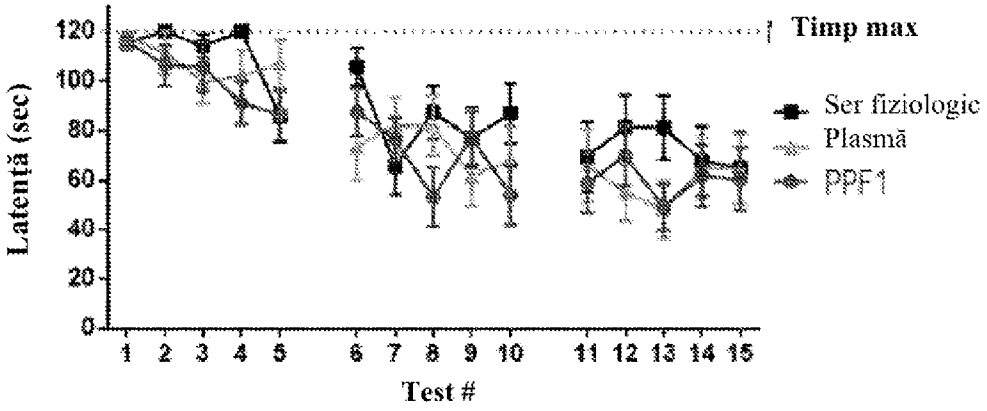


Figura 17

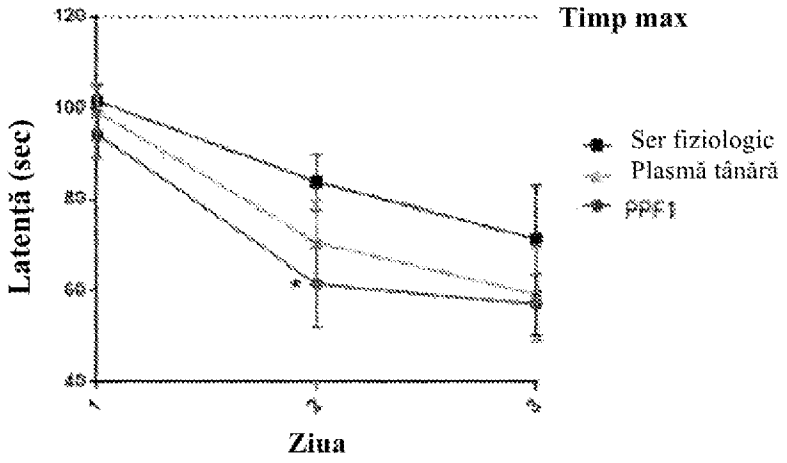


Figura 18

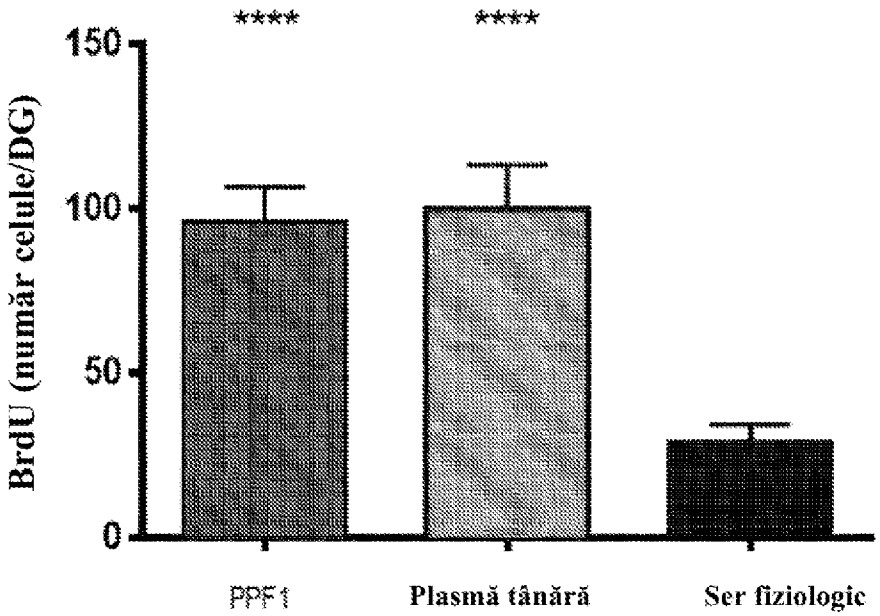


Figura 19

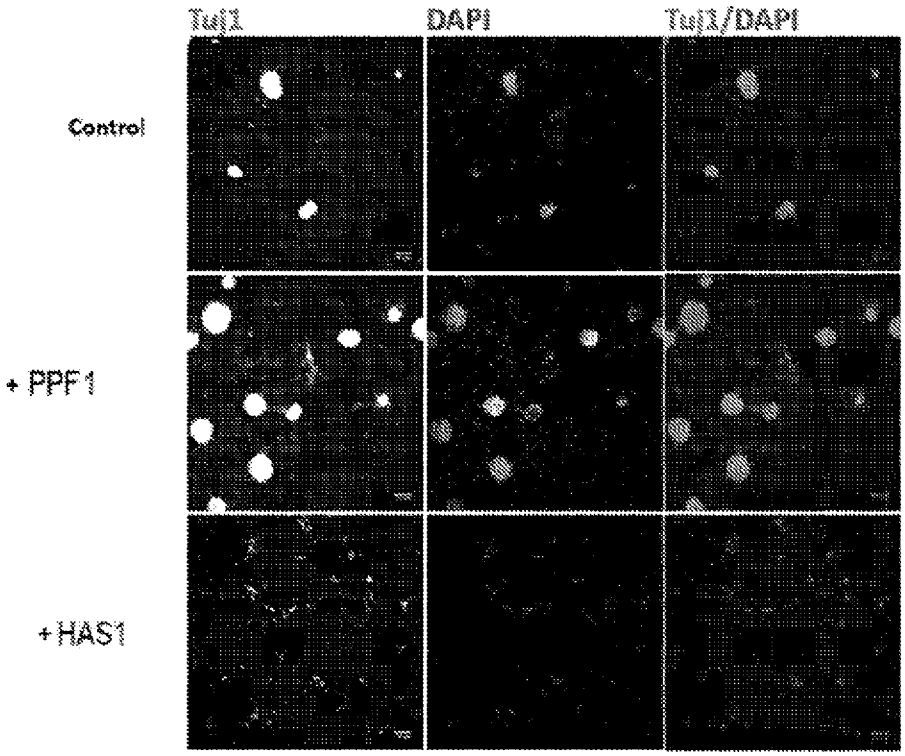


Figura 20

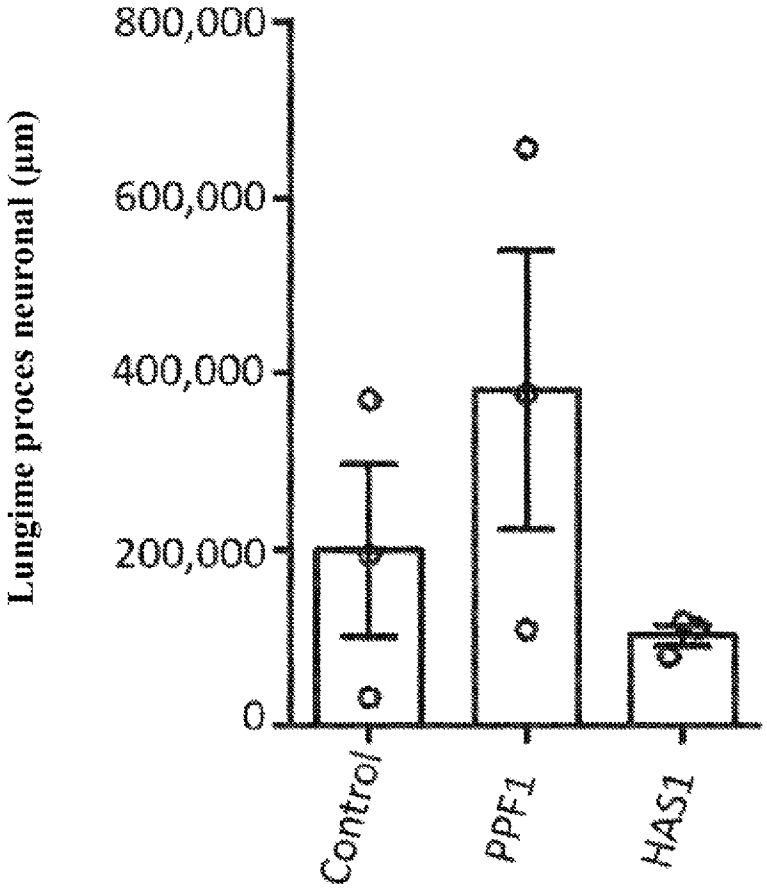

Lungime proces neuronal (µm)
800,000
600,000
400,000
200,000
0
Control
PPF1
HAS1
a
b
b

Figura 21

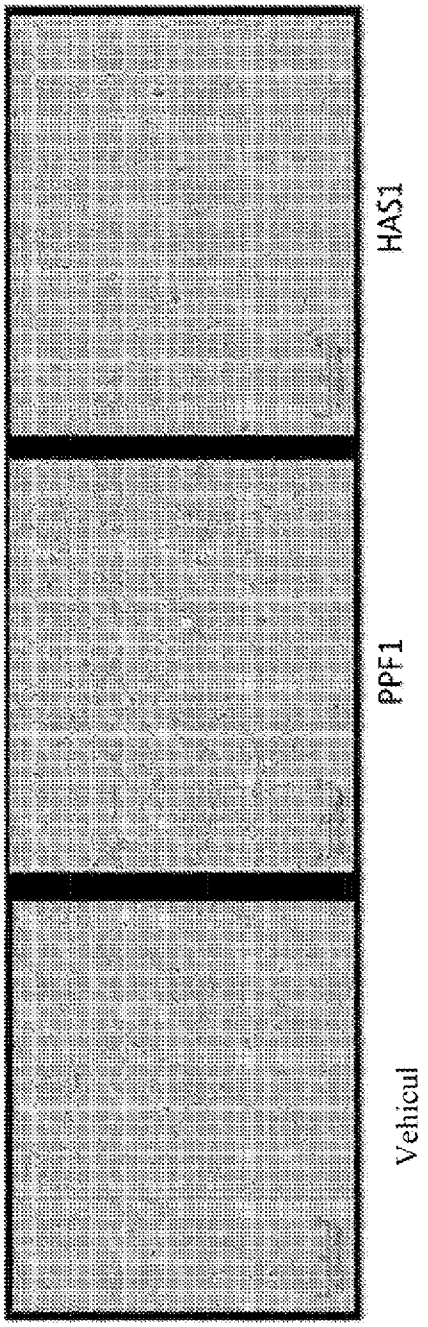


Figura 22A

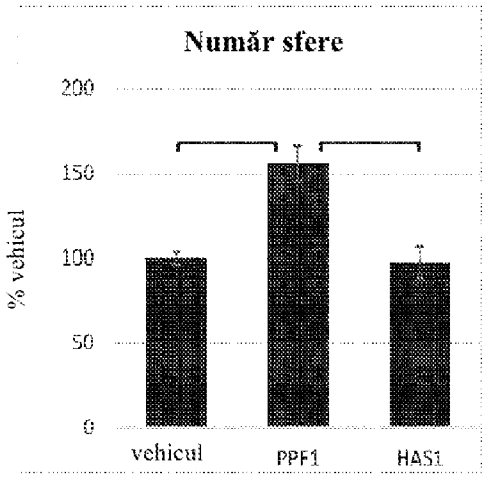
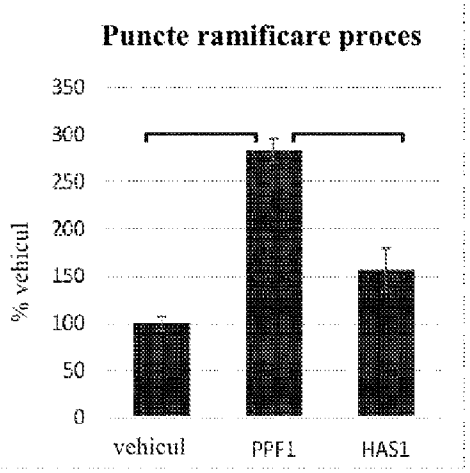


Figura 22C



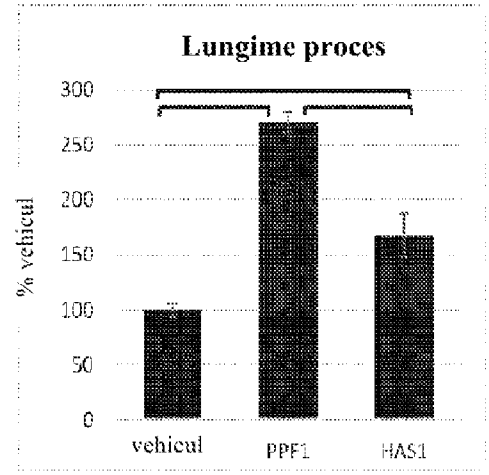


Figura 22B

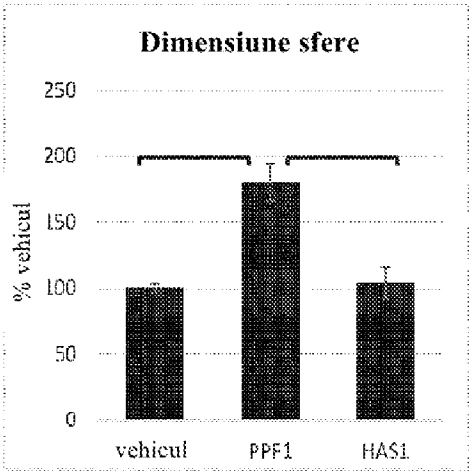


Figura 22D

Figura 23

