

RÉGIMEN DE DOSIFICACIÓN PARA EL TRATAMIENTO DE DETERIOROS COGNITIVOS Y MOTORES CON PLASMA DE SANGRE Y PRODUCTOS DE PLASMA DE SANGRE

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

De conformidad con 35 USC § 119(e), esta solicitud reivindica la prioridad para las fechas de presentación de la: Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No. 62/701,411 presentada el 20 de julio de 2018; la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No. 62/862,364 presentada el 17 de junio de 2019; cuyas divulgaciones se incorporan acá por referencia.

Esta solicitud también es una solicitud de continuación en parte de la Solicitud de Patente de Estados Unidos 15/961,618 presentada el 24 de abril de 2018, donde dicha solicitud, de acuerdo con 35 U.S.C. § 119 (e), reivindica prioridad de las fechas de presentación de: la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No. 62/490,519 presentada el 26 de abril de 2017; Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No. 62/584,571 presentada el 10 de noviembre de 2017; Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No. 62/623,468 presentada el 29 de enero de 2018; y Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No. 62/641,194 presentada el 9 de marzo de 2018; cuyas descripciones se incorporan en la presente como referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a la prevención y tratamiento de enfermedades asociadas al envejecimiento. La invención se refiere al uso de productos de sangre, tales como fracciones de plasma de sangre para tratar y/o prevenir afecciones asociadas con el envejecimiento, tales como trastornos cognitivos, trastornos motores y neuroinflamación usando diversos paradigmas de dosificación.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Lo siguiente se ofrece solo como información antecedente y no se admite como técnica previa a la presente invención.

El envejecimiento es un factor de riesgo importante para múltiples enfermedades humanas, incluyendo el deterioro cognitivo, cáncer, artritis, pérdida de visión, osteoporosis, diabetes, enfermedad cardiovascular y apoplejía. Además de la pérdida de sinapsis normal durante el envejecimiento natural, la pérdida de sinapsis es un evento patológico temprano común en muchas afecciones neurodegenerativas y es la mejor correlación con el deterioro neuronal y cognitivo asociado con estas afecciones. Como tal, el envejecimiento sigue siendo el factor de riesgo más dominante de las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la demencia, tales como enfermedad de Alzheimer (EA)

(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)). El envejecimiento afecta a todos los tejidos y funciones del cuerpo, incluyendo el sistema nervioso central, y la neurodegeneración y disminución de funciones tal como la cognición o habilidades motoras pueden afectar gravemente la calidad de vida. El tratamiento para la disminución cognitiva, deterioro motor y trastornos neurodegenerativos ha tenido un éxito limitado en la prevención y reversión del deterioro. Por lo tanto, es importante identificar nuevos tratamientos para mantener la integridad cognitiva mediante la protección, contrarresto o reversión de los efectos del envejecimiento. Además, cuando se desarrollan nuevos tratamientos, se deben investigar los paradigmas de dosificación para optimizar la eficacia de esos tratamientos.

Aunque los experimentos de parabiosis entre ratones viejos y jóvenes han mostrado que la función cognitiva puede ser mejorada en ratones viejos en el intercambio de sangre heterocrónico con ratones jóvenes, reportes recientes encuentran que no hay neurogénesis aumentada en ratones viejos por un intercambio de sangre de jóvenes. (Rebo, J. *et al.* *A single heterochronic blood exchange reveals rapid inhibition of multiple tissues by old blood*. Nat. Comm. (2016)). Además, existe la duda que la función cognitiva resultante de las infusiones de plasma joven y la neurogénesis están vinculadas. Por lo tanto, aún no se había descrito un régimen de dosificación que usa plasma de sangre o fracciones de plasma de sangre que estimule la neurogénesis y función cognitiva mejorada.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se basa en la producción y uso de productos de sangre para tratar y/o prevenir trastornos relacionados con la edad, tales como afecciones de deterioro cognitivo, demencia relacionada con la edad, deterioro de la función motora, neuroinflamación y enfermedad neurodegenerativa. La presente invención reconoce, entre otras cosas, la necesidad de nuevas terapias para el tratamiento y/o prevención del deterioro cognitivo, demencia relacionada con la edad, deterioro motor, neuroinflamación y enfermedad neurodegenerativa. Derivadas de la sangre y plasma de sangre, las presentes composiciones de la invención se refieren a una solución para los fracasos y defectos de las terapias actuales a través del uso de fracciones de plasma de sangre que exhiben eficacia en el tratamiento y/o prevención del deterioro cognitivo, demencia relacionada con la edad, deterioro motor, neuroinflamación y enfermedad neurodegenerativa.

La invención reconoce que las proteínas de plasma de sangre tienen una semivida promedio de 2-3 días. La invención usa un régimen de dosificación de plasma de sangre o fracción de plasma que optimiza la neurogénesis, supervivencia celular,

neuroinflamación disminuida y mejora de la función cognitiva o motora en el sujeto tratado. El régimen de dosificación de la invención se ha encontrado que desencadena todos estos procesos (neurogénesis, supervivencia celular, cognición mejorada, neuroinflamación disminuida, y función motora mejorada) en sujetos, y se ha encontrado que todos los procesos son activos incluso semanas después de la dosis final.

Una modalidad de la invención incluye tratar un sujeto diagnosticado con un deterioro cognitivo mediante la administración al sujeto de una cantidad efectiva de plasma de sangre o fracción de plasma. Otra modalidad de la invención incluye administrar la cantidad efectiva de plasma de sangre o fracción de plasma y, posteriormente, monitorear al sujeto en busca de la función cognitiva mejorada. Otra modalidad de la invención incluye tratar un sujeto diagnosticado con un deterioro cognitivo mediante la administración al sujeto de una cantidad efectiva de plasma de sangre o fracción de plasma en donde el plasma de sangre o fracción de plasma se administra de una manera que da como resultado una función cognitiva mejorada o neurogénesis.

Una modalidad de la invención incluye tratar un sujeto diagnosticado con un trastorno motor neurodegenerativo tal como, a modo de ejemplo y no de limitación, enfermedad de Parkinson, administrando al sujeto una cantidad efectiva de plasma de sangre o fracción de plasma. Otra modalidad de la invención incluye administrar la cantidad efectiva de plasma de sangre o fracción de plasma y, posteriormente, monitorear al sujeto en busca de una función motora mejorada. Otra modalidad de la invención incluye tratar un sujeto diagnosticado con un trastorno motor neurodegenerativo administrando al sujeto una cantidad efectiva de plasma de sangre o fracción de plasma en donde el plasma de sangre o fracción de plasma se administra de una manera que da como resultado una función motora mejorada o neurogénesis.

Una modalidad de la invención incluye tratar un sujeto diagnosticado con neuroinflamación o un trastorno asociado con la neuroinflamación administrando al sujeto una cantidad efectiva de plasma de sangre o fracción de plasma. Otra modalidad de la invención incluye administrar la cantidad efectiva de plasma de sangre o fracción de plasma y, posteriormente, monitorear al sujeto en busca de neuroinflamación reducida. Otra modalidad de la invención incluye tratar un sujeto diagnosticado con neuroinflamación o un trastorno asociado con la neuroinflamación administrando al sujeto una cantidad efectiva de plasma de sangre o fracción de plasma en donde el plasma de sangre o fracción de plasma se administra de una manera que da como resultado una neuroinflamación reducida.

Otra modalidad de la invención incluye administrar el plasma de sangre o fracción de plasma a través de un régimen de dosificación de al menos dos días secuenciales. Una modalidad adicional de la invención incluye administrar el plasma de sangre o fracción de plasma a través de un régimen de dosificación de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,

13 o 14 días secuenciales (referido como “dosificación pulsada”, “dosis pulsada”, “dosificación por pulsos”, “dosis por pulsos”, o “dosificado por pulsos” en la presente). Todavía otra modalidad de la invención incluye administrar el plasma de sangre o fracción de plasma a través de un régimen de dosificación de al menos 2 días secuenciales y después de la última fecha de administración. Otra modalidad de la invención incluye administrar el plasma de sangre o fracción de plasma a través de un régimen de dosificación de 2 a 14 días no consecutivos en donde cada intervalo entre dosis puede estar entre 0-3 días cada uno. Otra modalidad de la invención incluye monitorear al sujeto en busca de la función cognitiva o motora mejorada, neuroinflamación disminuida o neurogénesis mejorada al menos 3 días después de la última fecha de administración. Otra modalidad de la invención incluye monitorear al sujeto en busca de la función cognitiva o motora mejorada, neuroinflamación disminuida o neurogénesis mejorada más allá de cuando se ha alcanzado la semivida promedio de las proteínas en el plasma de sangre o fracción de plasma.

En algunos casos, la dosificación pulsada de acuerdo con la invención incluye la administración de un primer conjunto de dosis, por ejemplo, como se describe anteriormente, seguido de un periodo de no dosificación, por ejemplo, un “periodo libre de dosificación”, que a su vez es seguido por la administración de otra dosis o conjunto de dosis. La duración de este periodo “libre de dosificación”, puede variar, pero en algunas modalidades, es 7 días o más, tal como 10 días o más, incluyendo 14 días o más, en donde en algunos casos, el periodo libre de dosificación varía desde 15 a 365 días, tal como 30 a 90 días e incluyendo 30 a 60 días. Como tal, las modalidades de los métodos incluyen dosificación no crónica (es decir, no continua), por ejemplo, administración no crónica de un producto de plasma de sangre. En algunas modalidades, el patrón de dosificación pulsada seguido de un periodo libre de dosificación se repite una serie de veces, según se desee, donde en algunos casos este patrón se continúa durante 1 año o más, tal como 2 años o más, hasta e incluyendo la vida del sujeto. Otra modalidad de la invención incluye administrar el plasma de sangre o fracción de plasma a través de un régimen de dosificación de 5 días secuenciales, con un periodo libre de dosificación de 2-3 días, seguido de la administración durante 2-14 días secuenciales.

La presente invención también reconoce que las diferencias en el contenido de proteínas entre diferentes fracciones de plasma de sangre (por ejemplo, fracciones, efluentes, fracción de proteínas de plasma, solución de albúmina humana) pueden ser responsables de prevenir y/o mejorar ciertos deterioros cognitivos o motores y aliviar enfermedades neurodegenerativas. A modo de ejemplo, y sin limitación, las modalidades de la presente invención demuestran que solo una concentración de albúmina humana mayor de albúmina humana recombinante o preparaciones de solución de albúmina humana (HAS) no es la fuerza impulsora detrás de la cognición mejorada, función motora mejorada, neuroinflamación

reducida, supervivencia celular, o neurogénesis asociada con preparaciones de fracción de proteína de plasma (PPF) con concentraciones de albúmina menores.

La sangre y plasma de sangre de donadores jóvenes han mostrado una mejora y reversión de los efectos preexistentes del envejecimiento cerebral, incluso a niveles molecular, estructural, funcional y cognitivo. (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)). La presente invención se refiere a fracciones y efluentes del plasma de sangre, algunos de los cuales se han usado tradicionalmente para tratar el shock del paciente, y el descubrimiento que son efectivos como métodos de tratamiento del deterioro cognitivo asociado con el envejecimiento, función motora reducida y neuroinflamación o enfermedad neurodegenerativa relacionada.

De acuerdo con aspectos de la invención, a continuación se proporcionan métodos de tratamiento del deterioro cognitivo asociado con el envejecimiento, demencia relacionada con la edad, deterioro motor, neuroinflamación, y/o enfermedad neurodegenerativa usando fracciones de producto de sangre de plasma de sangre. Los aspectos de los métodos incluyen administrar una fracción de plasma de sangre a un individuo que padece o está en riesgo de desarrollar deterioro cognitivo asociado con el envejecimiento, deterioro motor, neuroinflamación o enfermedad neurodegenerativa. Los aspectos adicionales de los métodos incluyen administrar una fracción de plasma de sangre derivada de un grupo de donadores de un rango de edad específico a un individuo que padece o está en riesgo de desarrollar deterioro cognitivo asociado con el envejecimiento, deterioro motor, neuroinflamación o enfermedad neurodegenerativa. Los aspectos adicionales de los métodos incluyen la administración de plasma de sangre o fracciones de plasma usando un régimen de dosificación pulsada. También se proporcionan reactivos, dispositivos y kits de los mismos que se usan en la práctica de los métodos en cuestión.

En una modalidad, la fracción de plasma de sangre puede ser, por ejemplo, una de varias fracciones de plasma de sangre obtenidas de un proceso de fraccionamiento de sangre, tal como el proceso de fraccionamiento de Cohn descrito a continuación. En otra modalidad, la fracción de plasma de sangre puede ser del tipo, referido en la presente “fracción de plasma”, que es una solución comprendida de albúmina humana normal, globulinas alfa y beta, globulina gamma y otras proteínas, ya sea individualmente o como complejos. En otra modalidad, la fracción de plasma de sangre puede ser un tipo de fracción de plasma de sangre conocida por los expertos en la técnica como una “fracción de proteína de plasma” (PPF). En otra modalidad, la fracción de plasma de sangre puede ser una fracción de “solución de albúmina humana” (HAS). En todavía otra modalidad, la fracción de plasma de sangre puede ser una en la que se remueven sustancialmente todos los factores de coagulación para retener la eficacia de la fracción con un riesgo reducido de trombosis. Las modalidades de la invención

también pueden incluir administrar, por ejemplo, una fracción derivada de un donador joven o grupos de donadores jóvenes. Otra modalidad de la invención puede incluir el monitoreo de la mejora cognitiva, función motora mejorada, neuroinflamación disminuida o neurogénesis aumentada en un sujeto tratado con una fracción de plasma de sangre.

Una modalidad de la invención incluye tratar un sujeto diagnosticado con un deterioro cognitivo, deterioro motor neurodegenerativo o una enfermedad asociada con la neuroinflamación administrando al sujeto una cantidad efectiva de plasma de sangre o fracción de plasma. Otra modalidad de la invención incluye administrar la cantidad efectiva de plasma de sangre o fracción de plasma y monitorear posteriormente al sujeto en busca de una función cognitiva mejorada, función motora mejorada, neuroinflamación disminuida, o neurogénesis aumentada. Otra modalidad de la invención incluye administrar el plasma de sangre o fracción de plasma a través de un régimen de dosificación de al menos dos días secuenciales y monitorear al sujeto en busca de una función cognitiva mejorada, función motora mejorada, neuroinflamación disminuida o neurogénesis aumentada al menos 2 días después de la última fecha de administración. Una modalidad adicional de la invención incluye administrar el plasma de sangre o fracción de plasma a través de un régimen de dosificación de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días y monitorear al sujeto en busca de la función cognitiva mejorada, función motora mejorada, neuroinflamación disminuida o neurogénesis aumentada al menos 3 días después de la última fecha de administración. Todavía otra modalidad de la invención incluye administrar el plasma de sangre o fracción de plasma a través de un régimen de dosificación de al menos 2 días secuenciales y después de la última fecha de administración, monitoreo de la mejora cognitiva, función motora mejorada, neuroinflamación disminuida o neurogénesis aumentada después que se ha logrado la semivida promedio de las proteínas en el plasma de sangre o fracción de plasma.

Una modalidad de la invención incluye tratar un sujeto diagnosticado con un deterioro cognitivo, función motora deteriorada, neuroinflamación o una disminución de la neurogénesis administrando al sujeto una cantidad efectiva de plasma de sangre o fracción de plasma, con el sujeto siguiendo un régimen de ejercicio después de la administración. Otra modalidad de la invención incluye seguir un régimen de ejercicio que se prescribe al sujeto. Otra modalidad de la invención incluye al sujeto que se ejercita a una mayor intensidad y/o mayor frecuencia que el sujeto que se ejercita antes de la administración. Otra modalidad de la invención incluye que el sujeto se ejercite a una intensidad y/o frecuencia similar a la que el sujeto se ejercita antes de la administración.

Una modalidad de la invención incluye tratar un sujeto diagnosticado con un deterioro cognitivo, función motora deteriorada, neuroinflamación o una disminución de la neurogénesis administrando al sujeto una cantidad efectiva de plasma de sangre o fracción de plasma en un sujeto que está siendo sometido, se someterá, o ha recibido terapia con

células madre. Otra modalidad de la invención incluye administrar a un sujeto una cantidad efectiva de plasma de sangre o fracción de plasma donde el sujeto está siendo sometido, se someterá o ha recibido terapia con células madre, y en donde las células madre usadas en la terapia pueden ser células madre embrionarias, células madre no embrionarias, células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), células madre de sangre del cordón umbilical, células madre de líquido amniótico y similares. Otra modalidad de la invención incluye tratar un sujeto diagnosticado con lesión traumática de la médula espinal traumática, apoplejía, enfermedad de la retina, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, pérdida de audición, enfermedad cardíaca, artritis reumatoide o quemaduras graves, y que está siendo sometido, se someterá o ha recibido terapia con células madre, con una cantidad efectiva de plasma de sangre o fracción de plasma.

INCORPORACIÓN COMO REFERENCIA

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en esta especificación se incorporan en la presente como referencia en la misma medida que si cada publicación individual o solicitud de patente se indicara específica e individualmente para ser incorporada como referencia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1A representa la distancia recorrida en una prueba de campo abierto en ratones tratados con PPF1 usando dosis por pulsos y regímenes de dosificación de 3 x/semana.

La Figura 1B representa el tiempo pasado en el centro del campo abierto en ratones tratados con PPF1 usando dosis por pulsos y regímenes de dosificación de 3 x/semana.

La Figura 2 representa el peso corporal con el tiempo para ratones tratados con PPF1 usando dosis por pulsos y regímenes de dosificación de 3 x/semana.

La Figura 3 reporta el número de células marcadas con DCX dentro de la capa de gránulos del giro dentado en ratones tratados con PPF1 usando dosis por pulsos o regímenes de dosificación de 3x/semana.

La Figura 4 reporta el número de células marcadas con BrdU dentro de la capa de gránulos del giro dentado en ratones tratados con PPF1 usando dosis por pulsos o regímenes de dosificación de 3x/semana.

La Figura 5 reporta el número de células marcadas con DCX dentro de la capa de gránulos del giro dentado en ratones tratados con PPF1 usando dosis por pulsos o regímenes de dosificación de 3x/semana, plasma humano joven ("YP"), o plasma humano viejo ("OP").

La Figura 6 reporta el número de células marcadas con BrdU dentro de la capa de gránulos del giro dentado en grupos de ratones tratados con PPF1 usando dosis por pulsos o regímenes de dosificación de 3x/semana, YP u OP.

La Figura 7 reporta la latencia para encontrar el agujero objetivo por ensayo por día para ratones dosificados por pulsos con PPF1 o YP.

La Figura 8 reporta el número de células marcadas con DCX dentro de la capa de gránulos del giro dentado en grupos de ratones tratados con plasma humano joven (YP), plasma humano viejo (OP) o PPF1 usando un régimen de dosificación por pulsos.

La Figura 9 reporta el número de células marcadas con BrdU dentro de la capa de gránulos del giro dentado en grupos de ratones tratados con plasma humano joven (YP), plasma humano viejo (OP) o PPF1 usando un régimen de dosis por pulsos.

La Figura 10 reporta el porcentaje del número total de entradas realizadas en el brazo conocido o nuevo de entradas totales realizadas en cada brazo por grupo de tratamiento en la prueba del laberinto en Y. Los ratones de doce meses de edad se trataron con dosis por pulsos con PPF1 o PPF1 5x concentrada.

La Figura 11 reporta la relación de episodios en el brazo nuevo versus familiar de la prueba del laberinto en Y. Los ratones de doce meses de edad se trataron con dosis por pulsos con PPF1 o PPF1 5x concentrada.

La Figura 12 reporta el número de células marcadas con BrdU por sección de hipocampo en ratones de doce meses que se dosificaron por pulsos con PPF1 o PPF1 5x concentrada.

La Figura 13 reporta el número de células marcadas con DCX por sección de hipocampo en ratones de doce meses que se dosificaron por pulsos con PPF1 o PPF1 5x concentrada.

La Figura 14 reporta el número de células marcadas con DCX dentro de la capa de gránulos del giro dentado en ratones NSG de 10.5 meses de edad que se dosificaron por pulsos con PPF1 o solución salina usando uno de los siguientes regímenes: (1) 5 días secuenciales [PPF1-5d]; (2) 7 días secuenciales [PPF1-7d]; (3) 5 días secuenciales con 5 días secuenciales adicionales (“refuerzo”) de dosificación que ocurre 6 semanas después de la terminación de la dosificación inicial [PPF1-5d-B]; o (4) 7 días secuenciales con 7 días secuenciales adicionales (“refuerzo”) de dosificación que ocurre 6 semanas después de la terminación de la dosificación inicial [PPF1-7d-B].

La Figura 15 reporta el número de células marcadas con BrdU dentro de la capa de gránulos del giro dentado en ratones NSG de 10.5 meses de edad que se dosificaron por pulsos con PPF1 o solución salina usando uno de los siguientes regímenes: (1) 5 días secuenciales [PPF1-5d]; (2) 7 días secuenciales [PPF1-7d]; (3) 5 días secuenciales con 5 días secuenciales adicionales (“refuerzo”) de dosificación que ocurre 6 semanas después de la

terminación de la dosificación inicial [PPF1-5d-B]; o (4) 7 días secuenciales con 7 días secuenciales adicionales (“refuerzo”) de dosificación que ocurre 6 semanas después de la terminación de la dosificación inicial [PPF1-7d-B].

La Figura 16 reporta el número de células marcadas con EdU dentro de la capa de gránulos del giro dentado en ratones NSG de 10.5 meses de edad que se dosificaron por pulsos con PPF1 o solución salina usando uno de los siguientes regímenes: (1) 5 días secuenciales [PPF1-5d]; (2) 7 días secuenciales [PPF1-7d]; (3) 5 días secuenciales con 5 días secuenciales adicionales (“refuerzo”) de dosificación que ocurre 6 semanas después de la terminación de la dosificación inicial [PPF1-5d-B]; o (4) 7 días secuenciales con 7 días secuenciales adicionales (“refuerzo”) de dosificación que ocurre 6 semanas después de la terminación de la dosificación inicial [PPF1-7d-B].

La Figura 17 reporta el número de células marcadas con DCX dentro de la capa de gránulos del giro dentado en animales NSG de 3 y 6 meses de edad tratados con PPF1 o solución salina con o sin ruedas para correr.

La Figura 18 reporta el número de células marcadas positivamente con Ki67 dentro de la capa de gránulos del giro dentado en animales NSG de 3 y 6 meses de edad tratados con PPF1 o solución salina con o sin ruedas para correr.

La Figura 19 reporta el número de células marcadas positivamente con BrdU dentro de la capa de gránulos del giro dentado en animales NSG de 3 y 6 meses de edad tratados con PPF1 o solución salina con o sin ruedas para correr.

La Figura 20 reporta el número de revoluciones de la rueda durante periodos de tiempo determinados en ratones NSG de 11 meses de edad dosificados por pulsos con PPF1 o solución salina de control. Las áreas sombreadas indican un ciclo de oscuridad, y la región en cuadro cuando se administró una prueba de placa caliente.

La Figura 21A muestra el número de células marcadas con BrdU dentro de la capa de gránulos del giro dentado en tres grupos de tratamiento de ratones GSN de 10.5 meses de edad, tratados con plasma joven, albúmina humana recombinante (“rhAlbúmina”), y solución salina de control.

La Figura 21B muestra el número de células marcadas con DCX en la capa de gránulos del giro dentado para tres grupos de tratamiento de ratones GSN de 10.5 meses de edad, tratados con plasma joven, albúmina humana recombinante (“rhAlbúmina”), y solución salina de control.

Las Figuras 22A a 22C reportan el grado de aumento en la actividad de picos neuronales (Figuras 22A y 22B), y actividad de la red neuronal (Figura 22A y 22C) en los días 7, 12, 16 y 21 de tratamiento en placas MEA que contienen células neuronales mixtas disociadas derivadas de la corteza E16 de ratón tratadas con control, PPF1 (dos lotes diferentes), HAS1 o rhAlbúmina. La Figura 22A ilustra trenes de pico representativos de dos

placas MEA por condición de tratamiento, que muestra un patrón de encendido síncrono fuerte para las células tratadas con PPF1 cuando se compara con el control o HAS1. La Figura 22B ilustra la cuantificación de actividad de picos neuronales. La Figura 22C reporta las ráfagas de redes neuronales de cultivos neuronales de ratón primario mantenidos en la presencia de control, rHAlbumina, PPF1 (dos lotes y HAS1 por un tiempo de 21 días. N=25-45 placas de 3 experimentos independientes $\pm$ SEM, prueba t de estudiante no emparejada * $p < 0.05$, # $p < 0.01$, calculado con relación a tratamiento de vehículo en cada punto de tiempo.

La Figura 23 representa cuatro paradigmas de administración de plasma humano viejo clarificado (plasma viejo) o solución salina administrada a ratones NSG de 8 semanas de edad (jóvenes).

La Figura 24A representa el marcado positivo con VCAM-1 en el hipocampo en ratones NSG de 8 semanas de edad (jóvenes) tratados con dosificación dos veces a la semana de plasma viejo, 48 horas después que se administró la última dosis.

La Figura 24B representa el marcado positivo con VCAM-1 en el hipocampo en ratones NSG de 8 semanas de edad (jóvenes) tratados con dosificación tres veces a la semana de plasma viejo, 48 horas después que se administró la última dosis.

La Figura 24C representa el marcado positivo con VCAM-1 en el hipocampo en ratones NSG de 8 semanas de edad (jóvenes) tratados con dosificación pulsada de plasma viejo, 48 horas después que se administró la última dosis.

La Figura 24D representa el marcado positivo con VCAM-1 en el hipocampo en ratones NSG de 8 semanas de edad (jóvenes) tratados con dosificación pulsada de plasma viejo, 21 días después que se administró la última dosis.

La Figura 25A representa el número de células positivas para DCX en el giro dentado en ratones NSG de 8 semanas de edad (jóvenes) tratados con dosificación dos veces a la semana de plasma viejo, 48 horas después que se administró la última dosis.

La Figura 25B representa el número de células positivas para DCX en el giro dentado en ratones NSG de 8 semanas de edad (jóvenes) tratados con dosificación de tres veces a la semana de plasma viejo, 48 horas después que se administró la última dosis.

La Figura 25C representa el número de células positivas para DCX en el giro dentado en ratones NSG de 8 semanas de edad (jóvenes) tratados con dosificación pulsada de plasma viejo, 21 días después que se administró la última dosis.

La Figura 26 muestra el transcurso de tiempo de latencia de escape del Laberinto de Barnes y reporta el tiempo para alcanzar y entrar en el agujero de escape de los ratones NSG de 8 semanas de edad (jóvenes) tratados con plasma viejo y solución salina. Los ratones se trataron durante 7 días consecutivos con plasma humano viejo o solución salina y analizados 4 semanas después de la última inyección.

La Figura 27 representa la latencia de escape promedio en los últimos tres

ensayos de Laberinto de Barnes en el día 4 de las pruebas de ratones NSG de 8 semanas de edad (jóvenes) que se trataron durante 7 días consecutivos con plasma humano viejo o solución salina. Las pruebas ocurrieron 4 semanas después de la última inyección.

La Figura 28 representa la diferencia en la latencia de escape entre los ensayos 1 y 3 de Laberinto de Barnes en ratones NSG de 8 semanas de edad (jóvenes) que se trataron durante 7 días consecutivos con plasma humano viejo o solución salina. Las pruebas ocurrieron 4 semanas después de la última inyección.

La Figura 29 reporta los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), cuantificando los niveles de ARNm de DCX, receptor de glutamato vesicular (vglut1), sinapsina 1 (syn1), tubulina beta III (tuj1) y factor neurotrófico derivado del cerebro (bdnf) en ratones NSG de 8 semanas de edad (jóvenes) que se trataron durante 7 días consecutivos con plasma humano viejo o solución salina.

La Figura 30 representa el paradigma de dosificación para ratones NSG de 8 semanas de edad (jóvenes) tratados con 35 mg/kg de ácido kaínico o solución salina, y posteriormente tratados con PPF1 o solución salina diariamente durante 5 días consecutivos.

La Figura 31A reporta el porcentaje de área positiva para CD68 en la región CA1 del hipocampo de ratones tratados según el paradigma representado en la Figura 28.

La Figura 31B reporta el porcentaje de área positiva para GFAP en la región CA1 del hipocampo de ratones tratados según el paradigma representado en la Figura 28.

La Figura 32 reporta el número de células teñidas para BrdU en el giro dentado en ratones NSG de 6 meses de edad dosificados por pulsos con PPF1 o solución salina de control durante 7 días consecutivos con la administración concurrente de BrdU. Las primeras dos columnas constituyen una cohorte analizada 7 días después del último tratamiento de PPF1/solución salina de control y BrdU; las segundas dos columnas constituyen una cohorte analizada 14 días después del último tratamiento de PPF1/solución salina de control y BrdU.

La Figura 33 representa el aumento de las células proliferantes (Ki67+) en el giro dentado de ratones NSG de 6 meses de edad 10 días después de la terminación de un régimen de dosis por pulsos con PPF1.

La Figura 34 muestra secciones del giro dentado y la zona subventricular de ratones NSG de 6 meses de edad 10 días después de la terminación de un régimen de dosis por pulsos con PPF1.

La Figura 35A reporta el destino celular de las células en el giro dentado en ratones NSG de 6 meses de edad tratados ya sea con PPF1 o solución salina de control con un régimen de dosificación por pulsos de 7 días, donde se administró BrdU durante 5 días consecutivos inmediatamente antes del comienzo del régimen de dosificación por pulsos. El grado de tinción de colocalización de NeuN+ con BrdU indica el grado al que las células neuroprogenitoras se convirtieron en neuronas. El grado de tinción de colocalización de

GFAP+ con BrdU indica el grado al que las células neuroprogenitoras se convirtieron en astrocitos.

La Figura 35B reporta los resultados de un experimento similar al de la Figura 35A, pero en ratones NSG de 12 meses de edad.

La Figura 36A reporta el destino celular de las células en el giro dentado en ratones NSG de 3 meses de edad tratados ya sea con plasma viejo o solución salina de control con un régimen de dosificación por pulsos de 7 días, donde se administró BrdU durante 5 días consecutivos inmediatamente antes del comienzo del régimen de dosificación por pulsos. El grado de tinción de colocalización de NeuN+ con BrdU indica el grado al que las células neuroprogenitoras se convirtieron en neuronas.

La Figura 36B reporta los resultados del experimento detallado en la Figura 36A, pero reporta el grado de Tinción de colocalización de GFAP+ con BrdU, indicando el grado al que las células neuroprogenitoras se convirtieron en astrocitos.

Las Figuras 37A a 37C reportan el número de células positivas para cFos en el (A) cerebro completo, (B) corteza, y (C) isocorteza de ratones de 18 meses de edad tratados con un régimen de dosificación por pulsos de 7 días de PPF1 o solución salina.

Las Figuras 38A a 38D reportan el número de células positivas para cFos en la (A) corteza frontal, (B) corteza orbital, (C) corteza infralímbica y (D) corteza prelímbica de ratones de 18 meses de edad tratados con un régimen de dosificación por pulsos de 7 días de PPF1 o solución salina.

Las Figuras 39A y 39B reportan el número de células positivas para cFos en el (A) núcleo olfativo accesorio y el (B) tubérculo olfativo de ratones de 18 meses de edad tratados con un régimen de dosificación por pulsos de 7 días de PPF1 o solución salina.

La Figura 40 representa una visualización basada en estadísticas de Voxel de la activación cortical local en la corteza frontal (FRP), la corteza orbital (ORB), la corteza infralímbica (ILA), la corteza prelímbica (PL) y el núcleo olfativo accesorio (AON) de ratones de 18 meses de edad tratados con un régimen de dosificación por pulsos de 7 días de PPF1 o solución salina.

La Figura 41A reporta el porcentaje de área inmunorreactiva a CD68 en el hipocampo en ratones tipo salvaje C57BL/6J de 22 meses de edad 10 días después del tratamiento con un régimen de dosificación por pulsos de 7 días con PPF1 o solución salina de control.

La Figura 41B reporta el porcentaje de área inmunorreactiva a Iba-1 en el hipocampo en ratones tipo salvaje C57BL/6J de 22 meses de edad 10 días después del tratamiento con un régimen de dosificación por pulsos de 7 días con PPF1 o solución salina de control.

La Figura 41C reporta el porcentaje de área inmunorreactiva a GFAP en el

hipocampo en ratones tipo salvaje C57BL/6J de 22 meses de edad 10 días después del tratamiento con un régimen de dosificación por pulsos de 7 días con PPF1 o solución salina de control.

La Figura 41D reporta el área inmunorreactiva CD68 porcentual en el hipocampo en ratones tipo salvaje C57BL/6 de 21 meses de edad 4 semanas después de tratamiento con un régimen de Dosificación de Pulso de 7 días con PPF1 o control de solución salina.

La Figura 41E reporta el área inmunorreactiva Iba-1 porcentual en el hipocampo en ratones tipo salvaje C57BL/6 de 21 meses de edad 4 semanas después de tratamiento con un régimen de Dosificación de Pulso de 7 días con PPF1 o control de solución salina.

La Figura 42A reporta el porcentaje de cambio en la tinción de BrdU en ratones C57BL/6J tipo salvaje de 23 meses de edad tratados con PPF1 en comparación con la solución salina de control 6, 9 y 12 semanas después de la dosificación usando un régimen de dosificación pulsada de siete días consecutivos.

La Figura 42B reporta el porcentaje de cambio en la tinción de DCX en ratones C57BL/6J tipo salvaje de 23 meses de edad tratados con PPF1 en comparación con la solución salina de control 6, 9 y 12 semanas después de la dosificación usando un régimen de dosificación pulsada de siete días consecutivos.

Las Figuras 43A y 43B reportan los resultados de las mediciones de peso corporal de ratones con alfa-sinucleína machos de 4 a 4.5 meses de edad (Line 61) (un modelo para la enfermedad de Parkinson) tratados con un régimen de dosificación pulsada de siete días consecutivos usando PPF1 o vehículo de control.

La Figura 44 reporta los resultados de la construcción de nidos en ratones con alfa-sinucleína machos de 4 a 4.5 meses de edad (Line 61) (un modelo para la enfermedad de Parkinson) tratados con un régimen de dosificación pulsada de siete días consecutivos usando PPF1 o vehículo de control.

Las Figuras 45A y 45B reportan los resultados de roer pasta y mejora motora asociada, respectivamente, en ratones con alfa-sinucleína machos de 4 a 4.5 meses de edad (Line 61) (un modelo para la enfermedad de Parkinson) tratados con un régimen de dosificación pulsada de siete días consecutivos usando PPF1 o vehículo de control.

La Figura 46 reporta los resultados de una prueba de suspensión en cable en ratones con alfa-sinucleína machos de 4 a 4.5 meses de edad (Line 61) (un modelo para la enfermedad de Parkinson) tratados con un régimen de dosificación pulsada de siete días consecutivos usando PPF1 o vehículo de control.

La Figura 47A muestra diferentes formas y tamaños de vigas usadas en cinco diferentes ensayos de caminata en viga de dificultad creciente.

La Figura 47B reporta los resultados de cinco diferentes ensayos de caminata en viga en ratones con alfa-sinucleína machos de 4 a 4.5 meses de edad (Line 61) (un modelo para la enfermedad de Parkinson) tratados con un régimen de dosificación pulsada de siete días consecutivos usando PPF1 o vehículo de control. Los ensayos de caminata en viga se realizaron 72 horas después de la última dosis de tratamiento.

La Figura 47C reporta los resultados de cinco diferentes ensayos de caminata en viga en ratones con alfa-sinucleína machos de 4 a 4.5 meses de edad (Line 61) (un modelo para la enfermedad de Parkinson) tratados con un régimen de dosificación pulsada de siete días consecutivos usando PPF1 o vehículo de control. Los ensayos de caminata en viga se realizaron 3 semanas después de la última dosis de tratamiento.

Las Figuras 48A a 48F reportan resultados histológicos de tinción de cuerpo estriado e hipocampo en ratones con alfa-sinucleína machos de 4 a 4.5 meses de edad (Line 61) (un modelo para la enfermedad de Parkinson) tratados con un régimen de dosificación pulsada de siete días consecutivos usando PPF1 o vehículo de control. Los marcadores histológicos examinados incluyen CD68, Iba-1 y NeuN.

La Figura 49 reporta la latencia de escape del laberinto de Barnes en ratones NSG de 12 meses de edad tratados con un régimen de dosificación pulsada de siete días consecutivos usando PPF1, HAS1 o vehículo de control.

Las Figuras 50 y 51 muestran que ratones de 24 meses de edad (24M) tienen una disminución en el marcador postsináptico PSD-95 con relación a ratones jóvenes de 3 meses de edad (3M) en regiones del cerebro que contienen una cantidad sustancial de sinapsis (hipocampo (HP), estriado (ST), y sustancia negra (SN)), pero no en regiones del cerebro que son libres de sinapsis (cuerpo calloso (CC)).

Las Figuras 52A y 52B reportan que los ratones dosificados en pulso con PPF1 tuvieron niveles significativamente mayores del marcador postsináptico PSD-95 (Figura 52A) y niveles mayores del marcador presináptico SYNAPSIN1 (Figura 52B). pruebas t no emparejadas, $*p < 0.05$.

La Figura 53 ilustra una representación histológica de secciones de hipocampo CA1 asociadas con la Figura 55.

Las Figuras 54A y 54B ilustran una micrografía confocal de alta resolución (Figura 54A) y una inserción ampliada (Figura 54B) con sinapsis identificados con las cabezas de flecha amarillas comprendidas del marcador presináptico SYNAPSIN1 (rojo) y el marcador postsináptico PSD-95 (blanco) yuxtapuestos.

Las Figuras 55A a 55D muestran que los ratones con dosificación pulsada con PPF1 tuvieron número significativamente mayores de marcadores pre y postsinápticos yuxtapuestos observado en micrografías de alta resolución (Figura 55A) y cuantificado (Figura 55B). El número de punta SYNAPSIN1 también se aumentó en ratones de dosificación

pulsada tratados con PPF1 en comparación con el control (Figura 55C). El número de puntas postsinápticas no se cambiaron entre los grupos de tratamiento (Figura 55D). pruebas t sin emparejar, $*p<0.05$.

La Figura 56A ilustra neuronas corticales primarias de ratón cultivadas en la presencia de Albumina humana recombinante (rhAlbumina), PPF1, o HAS1 por 14 días, con la composición celular y morfología evaluadas por inmunotinción para Map2 (neuronas) y Gfap (astrocitos) y Nestina (células progenitoras).

La Figura 56B ilustra neuronas de hipocampo primarias de ratón cultivadas en la presencia de Albumina humana recombinante (rhAlbumina), PPF1, o HAS1 por 14 días, con la composición celular y morfología evaluadas por inmunotinción para Map2 (neuronas) y Gfap (astrocitos) y Nestina (células progenitoras).

La Figura 57A muestra expresión de proteína Gfap aumentada con relación a expresión de beta actina en cultivos neuronales corticales tratados con PPF1 o HAS1 por 14 días cuando se compara con cultivos tratados con control o tratados con albumina humana recombinante. La Figura 57B muestra que el tratamiento con PPF1 o HAS1 por 14 días lleva a un aumento en población de células positivas Sox2 cuando se compara con tratamiento de control. $n=3$ experimentos independientes $\pm$ SEM, prueba t de estudiante emparejada comparada, $*p<0.05$.

La Figura 58A reporta la latencia de escape de la prueba de nadado de 2 opciones (laberinto en forma de T) en ratones NSG de 12 meses de edad dosificados en pulso con PPF1 y control de solución salina 6 semanas antes de la prueba. Los ratones tratados con PPF1 muestran una tendencia hacia latencia de escape más rápida. Salina $n=15$. PPF1 $n=10$. Todos los datos mostrados son la media $\pm$ s.e.m. ANOVA de doble vía.

La Figura 58B reporta las selecciones correctas contra la fala de la prueba de nadado de 2 opciones (laberinto en forma de T) en ratones NSG de 12 meses de edad dosificados en pulso con PPF1 y control de solución salina 6 semanas antes de la prueba. Los ratones tratados con PPF1 muestran desempeño significativamente aumentado en selección correcta. Salina $n=15$ ratones. PPF1 $n=10$. Todos los datos mostrados son la media $\pm$ s.e.m. Prueba de chi-cuadrado, $*p<0.05$.

La Figura 59 muestra una imagen confocal representativa de una circunvolución dentada en un ratón NSG de 12 meses de edad etiquetado triple con BrdU, NeuN, y GFAP. La flecha apunta a una célula etiquetada con BrdU.

La Figura 60A muestra el número total de células positivas dobles BrdU/NeuN o BrdU/GFAP en la circunvolución dentada de ratones tratados con solución salina, YP, PPF1 u OP. Los ratones tratados con PPF1 muestran significativamente más células positivas dobles BrdU/NeuN en la circunvolución dentada. Salina $n=13$, YP $n=13$, PPF1 $n=15$, OP $n=14$. Todos los datos mostrados son la media $\pm$ s.e.m. ANOVA de una vía, prueba post-hoc de

pavo. ** $P < 0.01$.

La Figura 60B muestra el % de células positivas dobles BrdU/NeuN y BrdU/GFAP de todas las células positivas BrdU en la convolución dentada de ratones tratados con solución salina, YP, PPF1, u OP. Hay una tendencia hacia una mejora de lineación neuronal después del tratamiento con PPF1. Salina $n=13$, YP $n=13$, PPF1 $n=15$, OP $n=14$. Todos los datos mostrados son la media $\pm$ s.e.m. ANOVA de una vía, prueba post-hoc de pavo.

La Figura 61A reporta la latencia de escape del laberinto Barnes en ratones NSG de 12 meses de edad dosificados en pulso con control de solución salina, plasma joven (YP) o PPF1 6 semanas antes de la prueba. Los ratones tratados con PPF1 muestran latencia de escape significativamente mejorada en comparación con animales tratados con solución salina o YP. Salina $n=13$, YP=14, PPF1 $n=13$. Todos los datos mostrados son la media $\pm$ s.e.m. ANOVA de doble vía. * $P < 0.05$.

La Figura 61B reporta la latencia de escape promedio de las pruebas 14 y 15 en la prueba de laberinto Barnes en ratones NSG de 12 meses de edad dosificados en pulso con control de solución salina, plasma joven /YP) o PPF1 6 semanas antes de la prueba. Los animales tratados con PPF1 muestran una tendencia hacia latencia de escape mejorada en comparación con ratones tratados con solución salina o YP. Salina $n=13$, YP=14, PPF $n=13$. Todos los datos mostrados son la media $\pm$ s.e.m. ANOVA de una vía, prueba post-hoc de pavo.

La Figura 62A reporta el número de células positivas de doblecortina (DCX) en la circunvolución dentada de control con solución salina de ratones NSG tratados con PPF de 4.5 (salina $n=8$, PPF1 $n=8$), 7.5 (salina $n=8$, PPF1 $n=6$) y 12 (salina $n=15$, PPF1 $n=14$) meses de edad. Hay una disminución dependiente de la edad en el número de células positivas DCX que se rescata significativamente en ratones de 7.5 y 12 meses de edad. Todos los datos son la media $\pm$ s.e.m. Prueba T sin emparejar. * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$.

La Figura 62B reporta el porcentaje de células positivas de doblecortina (DCX) del número de células positivas DCX al comienzo del tratamiento. El tratamiento con PPF1 mantiene el nivel de neurogénesis al mismo nivel que al momento del tratamiento, rescatando la disminución dependiente de la edad en números DCX. 3 meses de edad $n=8$, 6 meses de edad $n=7$, 10.5 meses de edad $n=19$, 4.5 (salina $n=8$, PPF1 $n=8$), 7.5 (salina $n=8$, PPF5 $n=6$), 12 meses de edad (salina $n=15$, PPF5 $n=14$). Todos los datos mostrados son la media $\pm$ s.e.m. Prueba T sin emparejar. * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$.

La Figura 63 reporta el % de área umbral positiva CD68 en el hipocampo de ratones NSG de 12 meses de edad tratados con solución salina o PPF1. Hay una reducción significativa en inmunorreactividad CD68 24 horas después que el tratamiento con PPF1 se completó. Salina $n=10$, PPF1 $n=10$. Prueba T sin emparejar. * $P < 0.05$.

La Figura 64A muestra imágenes representativas de inmunorreactividad CD68 en ratones tratados con solución salina o PPF1.

La Figura 64B muestra imágenes representativas de inmunorreactividad Iba-1 en ratones tratados con solución salina o PPF1.

Las Figuras 65A y 65B muestran dos regímenes de dosificación pulsada de refuerzo en ratones NSG, empezando en 6 meses de edad (Figura 65A) o 3 meses de edad (Figura 65B). Los ratones tratados inicialmente a 6 meses de edad recibieron 2 dosis de refuerzo de siete días consecutivos espaciados por 8 semanas. Los ratones tratados inicialmente a 3 meses de edad recibieron 3 dosis de refuerzo de siete días consecutivos espaciados por 8, 8, y 7 semanas. Para ambos grupos, se realizó prueba de comportamiento 6 semanas después del último régimen de dosis pulsada, en la cual todos los ratones tenían 12 meses de edad.

La Figura 66 muestra el número total de células positivas DCX en el hipocampo contado a partir de cinco secciones media del hipocampo de ratones NSG de 12 meses de edad tratados a 3 meses de edad con: vehículo, sin ejercicio; dosificado en pulso con PPF1 por 7 días; dosificado en pulso con PPF1 por 7 días luego dos regímenes de refuerzo posteriores espaciados por 8 semanas; y vehículo más ejercicio para el resto del estudio. Todos los datos son la media $\pm$ SEM, **** $P < 0.0001$, *** $P > 0.001$, ANOVA con Post hoc de Dunnett.

La Figura 67 muestra el número total de células positivas DCX en el hipocampo contado a partir de cinco secciones media del hipocampo de ratones NSG de 12 meses de edad tratados a 3 meses de edad con: vehículo, sin ejercicio; dosificado en pulso con PPF1 por 7 días; dosificado en pulso con PPF1 por 7 días luego tres regímenes de refuerzo posteriores espaciados por 8, 8, y 7 semanas; y vehículo más ejercicio para el resto del estudio.

La Figura 68 muestra el desempeño de comportamiento de laberinto Y en ratones NSG de 12 meses de edad a partir de ratones de la cohorte inicial de 6 meses de edad (ver la Figura 65A y la Figura 66). Porcentaje de entradas totales en el nuevo brazo del laberinto Y para ratones tratados con PPF1 y PPF1 más mejoradores tienden hacia memoria de aprendizaje espacial aumentada en comparación con el control.

Las Figuras 69A y 69B muestran que el tratamiento con PPF1 (dos lotes diferentes) o HAS1 por 96 horas lleva a un aumento significativo en crecimiento de neuritas de neuronas corticales (Figura 69A) o de hipocampo (Figura 69B) cuando se compara con células tratadas con rHAlbumina o de control. $N = 11-16$ experimentos independientes $\pm$ SEM, ANOVA de una vía. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Las Figuras 70A y 70B muestran la expresión aumentada de marcadores sinápticos con relación al marcador neuronal general Tuj1 en niveles de mRNA (qPCR) para

SYN1 y PSD-95 (Figura 70A) y niveles de proteína (según Western blot, Figura 70B) para Syn1 en neuronas corticales primarias de ratón cultivadas en la presencia de PPF1 (dos lotes), o HAS1 por 14 días cuando se compara con células tratadas con control.

La Figura 71 reporta que pacientes humanos con Alzheimer suave a moderado tratado con 100 mL o 250 mL de PPF1 por un periodo de 5 días consecutivos no exhibieron disminución cognitiva o funcional significativa medido por las escalas de ADAS-Cog, ADCS-ADL, y CDR-SB por un periodo de seis meses.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

1. Introducción

La presente invención se refiere a la identificación y descubrimiento de métodos y composiciones para el tratamiento y/o prevención del deterioro cognitivo y motor, incluyendo la demencia asociada con la edad o disminución de la función motora y/o enfermedad neurodegenerativa. En la presente se describen métodos y composiciones para el tratamiento de sujetos que padecen tales trastornos, que son aspectos de la presente invención. En la presente también se describen regímenes de dosificación que desencadenan la neurogénesis o neuroinflamación disminuida y/o mejora cognitiva o motora en sujetos que padecen deterioro cognitivo o motor. Los métodos y composiciones descritos en la presente son útiles para: prevenir el deterioro cognitivo o motor, demencia asociada con la edad, neuroinflamación y/o enfermedad neurodegenerativa; mejorar los síntomas de deterioro cognitivo o motor, demencia asociada con la edad, neuroinflamación y/o enfermedad neurodegenerativa; ralentizar la progresión del deterioro cognitivo o motor asociado con el envejecimiento, demencia asociada con la edad, neuroinflamación y/o enfermedad neurodegenerativa; y/o revertir la progresión del deterioro cognitivo o motor asociado con el envejecimiento, demencia asociada con la edad, neuroinflamación y/o enfermedad neurodegenerativa. Una implementación de la invención incluye usar fracciones de plasma de sangre como tratamiento, tal como una o más fracciones o efluentes obtenidos de procesos de fraccionamiento de sangre, por ejemplo, como el proceso de fraccionamiento de Cohn descrito a continuación. Una modalidad de la invención incluye usar fracción de plasma (una solución comprendida de albúmina humana normal, globulinas alfa y beta, globulina gamma y otras proteínas, ya sea individualmente o como complejos, referida después “fracción de plasma”). Otra modalidad de la invención incluye usar la fracción de proteína de plasma (PPF) como tratamiento. Otra modalidad de la invención incluye usar la fracción de solución de albúmina humana (HAS) como tratamiento. Todavía otra modalidad incluye usar efluentes de procesos de fraccionamiento de sangre tal como el Efluente I o Efluente II/III descritos a continuación. Una modalidad adicional incluye una fracción de plasma de sangre de la que sustancialmente todos los factores de coagulación se han removido para retener la eficacia mientras se reduce

el riesgo de trombosis (por ejemplo, ver las Solicitudes de Patente de Estados Unidos Nos. 62/236,710 y 63/376,529, que se incorporan como referencia en su totalidad en la presente).

Antes de describir la presente invención en detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a un método o composición particular descritos, ya que, por supuesto, pueden variar. También se entiende que la terminología usada en la presente tiene el propósito de describir modalidades particulares solamente, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

Las publicaciones discutidas en la presente se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente debe interpretarse como una admisión que la presente invención no tiene derecho a anteceder tal publicación en virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar ser confirmadas independientemente.

Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor intermedio, a la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, también se describe específicamente entre los límites superior e inferior de ese rango. Cada rango menor entre cualquier valor establecido o valor intermedio en un rango establecido y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese rango establecido está comprendido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos rangos menores pueden incluirse o excluirse independientemente en el rango, y cada rango donde cualquiera, ninguno o ambos límites se incluyen en los rangos menores también se incluye dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el rango indicado. Cuando el rango indicado incluye uno o ambos límites, los rangos que excluyen uno o ambos de esos límites incluidos también se incluyen en la invención.

Cabe señalar que las reivindicaciones se pueden redactar para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración tiene la intención de servir como base antecedente para uso de una terminología exclusiva como “únicamente”, “solo” y similares en relación con la cita de elementos de reivindicación o uso de una limitación “negativa”.

Como será evidente para los expertos en la técnica al leer esta descripción, cada una de las modalidades individuales descritas e ilustradas en la presente tiene componentes y características discretas que se pueden separar fácilmente o combinarse con las características de cualquiera de las otras diversas modalidades sin apartarse del alcance o el espíritu de la presente invención. Cualquier método citado se puede realizar en el orden de los eventos citados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

2. Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos

usados en la presente tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente en la práctica o prueba de la presente invención, ahora se describen algunos métodos y materiales potenciales y preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en la presente se incorporan en la presente como referencia para divulgar y describir los métodos y/o materiales en relación con los cuales se citan las publicaciones. Se entiende que la presente descripción reemplaza cualquier descripción de una publicación incorporada en la medida en que exista una contradicción.

Debe notarse que, como se usa en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “uno” y “el” incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a “una célula” incluye una pluralidad de tales células y la referencia a “el péptido” incluye la referencia a uno o más péptidos y equivalentes de los mismos, por ejemplo, polipéptidos, conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

Al describir los métodos de la presente invención, los términos “huésped”, “sujeto”, “individuo” y “paciente” se usan indistintamente y se refieren a cualquier mamífero en necesidad de tal tratamiento de acuerdo con los métodos descritos. Tales mamíferos incluyen, por ejemplo, humanos, ovinos, bovinos, equinos, porcinos, caninos, felinos, primates no humanos, ratones y ratas. En ciertas modalidades, el sujeto es un mamífero no humano. En algunas modalidades, el sujeto es un animal de granja. En otras modalidades, el sujeto es una mascota. En algunas modalidades, el sujeto es mamífero. En ciertos casos, el sujeto es humano. Otros sujetos pueden incluir mascotas domésticas (por ejemplo, perros y gatos), ganado (por ejemplo, vacas, cerdos, cabras, caballos y similares), roedores (por ejemplo, ratones, cobayos y ratas, por ejemplo, como en modelos animales de enfermedad), así como primates no humanos (por ejemplo, chimpancés y monos). Como tal, los sujetos de la invención incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, por ejemplo, humanos y otros primates, tales como chimpancés y otros simios y especies de monos; y similares, donde en ciertas modalidades el sujeto son humanos. El término sujeto también pretende incluir a una persona u organismo de cualquier edad, peso u otra característica física, donde los sujetos pueden ser un adulto, un niño, un bebé o un recién nacido.

Por “joven” o “individuo joven” se entiende un individuo que tiene una edad cronológica de 40 años de edad o menos, por ejemplo, 35 años o menos, incluyendo 30 años de edad o menos, por ejemplo, 25 años de edad o menos o 22 años de edad o menos. En algunos casos, el individuo que sirve como fuente del producto de sangre que contiene plasma joven es uno que tiene 10 años de edad o menos, por ejemplo, 5 años de edad o menos, incluyendo 1 año de edad o menos. En algunos casos, el sujeto es un recién nacido y la fuente del producto de plasma es el cordón umbilical, donde el producto de plasma se recolecta del

cordón umbilical del recién nacido. Como tal, “joven” e “individuo joven” se pueden referir a un sujeto que está entre las edades de 0 y 40, por ejemplo, 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 años de edad. En otros casos, “joven” e “individuo joven” se pueden referir a una edad biológica (en oposición a la cronológica) tal como un individuo que no ha exhibido los niveles de citocinas inflamatorias en el plasma exhibidas en individuos comparativamente mayores. A modo de ejemplo, y no de limitación, la citocina inflamatoria es la eotaxina, y la diferencia de veces entre un sujeto joven o un individuo joven e individuos mayores es al menos 1.5 veces. De manera similar, la diferencia de veces entre individuos mayores y más jóvenes en otras citocinas inflamatorias se puede usar para referirse a una edad biológica. (Ver la Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 13/575,437 que se incorpora en la presente como referencia). Por lo general, el individuo está sano, por ejemplo, el individuo no tiene neoplasia maligna hematológica o enfermedad autoinmune en el momento de la recolección.

Por “un individuo que padece o está en riesgo de sufrir un deterioro cognitivo asociado con el envejecimiento” se entiende un individuo que tiene aproximadamente más de 50% de su duración de vida esperada, tal como más de 60%, *por ejemplo*, más de 70%, tal como más de 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o incluso 99% de su duración de vida esperada. La edad del individuo dependerá de la especie en cuestión. Por lo tanto, este porcentaje se basa en la esperanza de vida prevista de la especie en cuestión. Por ejemplo, en humanos, tal individuo tiene 50 años de edad o más, *por ejemplo*, 60 años de edad o más, 70 años de edad o más, 80 años de edad o más, 90 años de edad o más, y generalmente no más de 100 años de edad, tal como 90 años de edad, *es decir*, entre las edades de aproximadamente 50 y 100, *por ejemplo*, 50...55...60...65...70...75...80...85...90...95...100 años de edad o más, o cualquier edad entre 50 - 1000, que padece una afección asociada con el envejecimiento como se describe adicionalmente a continuación, *por ejemplo*, deterioro cognitivo asociado con el proceso natural del envejecimiento; un individuo que tiene aproximadamente 50 años de edad o más, *por ejemplo*, 60 años de edad o más, 70 años de edad o más, 80 años de edad o más, 90 años de edad o más, y generalmente no más de 100 años de edad, tal como 90 años de edad, *por ejemplo*, entre las edades de aproximadamente 50...55...60...65...70...75...80...85...90... 95...100 años de edad, o cualquier edad entre los 50 – 1000, que aún no ha comenzado a mostrar síntomas de una afección asociada al envejecimiento, *por ejemplo*, deterioro cognitivo; un individuo de cualquier edad que padece un deterioro cognitivo debido a una enfermedad asociada al envejecimiento, como se describe adicionalmente a continuación, y un individuo de cualquier edad que ha sido diagnosticado con una enfermedad asociada al envejecimiento que generalmente está acompañada de deterioro cognitivo, donde el individuo aún no ha comenzado a mostrar síntomas de deterioro cognitivo. Las edades correspondientes para sujetos no humanos son conocidas y están destinadas a aplicarse en la presente.

Como se usa en la presente, “tratamiento” se refiere a cualquiera de (i) la prevención de la enfermedad o trastorno, o (ii) la reducción o eliminación de los síntomas de la enfermedad o trastorno. El tratamiento se puede realizar profilácticamente (antes del inicio de la enfermedad) o terapéuticamente (después del inicio de la enfermedad). El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. Por lo tanto, el término “tratamiento”, como se usa en la presente, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con el envejecimiento en un mamífero, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad ocurra en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero aún no ha sido pero aún no ha sido diagnosticado que la tiene; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar la enfermedad, es decir, causar la progresión de la enfermedad. El tratamiento puede dar como resultado una variedad de diferentes manifestaciones físicas, por ejemplo, modulación de la expresión génica, rejuvenecimiento de tejidos u órganos, etc. El agente terapéutico se puede administrar antes, durante o después del inicio de la enfermedad. El tratamiento de la enfermedad en curso, donde el tratamiento estabiliza o reduce los síntomas clínicos indeseables del paciente, es de particular interés. Tal tratamiento se puede realizar antes de la pérdida completa de la función en los tejidos afectados. La terapia en cuestión se puede administrar durante la etapa sintomática de la enfermedad y, en algunos casos, después de la etapa sintomática de la enfermedad.

En algunas modalidades, la afección asociada con el envejecimiento que se trata es un deterioro asociado con el envejecimiento en la capacidad cognitiva en un individuo. Por capacidad cognitiva, o “cognición”, se entiende los procesos mentales que incluyen atención y concentración, aprendizaje de tareas y conceptos complejos, memoria (adquisición, retención y recuperación de nueva información a corto y/o largo plazo), procesamiento de información (tratar con la información reunida por los cinco sentidos), función visuoespacial (percepción visual, percepción de profundidad, uso de imágenes mentales, copia de dibujos, construcción de objetos o formas), producción y comprensión del lenguaje, fluidez verbal (búsqueda de palabras), resolución de problemas, toma de decisiones y funciones ejecutivas (planificación y priorización). Por “disminución cognitiva” se entiende una disminución progresiva de una o más de estas capacidades, por ejemplo, una disminución de la memoria, lenguaje, pensamiento, juicio, etc. Por “un deterioro de la capacidad cognitiva” y “deterioro cognitivo”, se entiende una reducción de la capacidad cognitiva en relación con un individuo sano, por ejemplo, un individuo sano de la misma edad, o en relación con la capacidad del individuo en un punto anterior, por ejemplo, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años o 10 años o más anteriormente. Por “deterioro cognitivo asociado con el envejecimiento” se entiende un deterioro en la capacidad cognitiva

que generalmente se asocia con el envejecimiento, incluyendo, por ejemplo, deterioro cognitivo asociado con el proceso natural del envejecimiento, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (M.C.I.); y deterioro cognitivo asociado con un trastorno asociado con el envejecimiento, es decir, un trastorno que se ve con frecuencia creciente con senescencia creciente, por ejemplo, una afección neurodegenerativa tal como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, demencia frontotemporal, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, glaucoma, distrofia miotónica, demencia vascular y similares.

En algunas modalidades, la afección asociada con el envejecimiento que se trata es un deterioro asociado con el envejecimiento en la capacidad motora en un individuo. Por capacidad motora, se entiende los procesos motores que incluyen la capacidad de realizar acciones musculares y nerviosas complejas que producen movimiento, tales como habilidades motoras finas que producen movimientos pequeños o precisos (por ejemplo, escribir, atar zapatos) y habilidades motoras gruesas para movimientos grandes (por ejemplo, caminar, correr, patear). Por “disminución motora”, se entiende una disminución progresiva en una o más de estas capacidades, por ejemplo, una disminución en el movimiento de búsqueda o habilidades motoras gruesas, etc. Por “discapacidad motora” y “deterioro motor”, se entiende una reducción en la capacidad/habilidades motoras en relación con un individuo sano, por ejemplo, un individuo sano de la misma edad, o en relación con la capacidad del individuo en un punto en el tiempo anterior, por ejemplo, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años o 10 años o más anteriormente. Por “deterioro motor asociado al envejecimiento”, se entiende un deterioro o disminución de la capacidad motora que se asocia típicamente con el envejecimiento, incluyendo, por ejemplo, deterioro motor asociado con el proceso de envejecimiento natural y deterioro o disminución motora asociada con un trastorno asociado con el envejecimiento, es decir, un trastorno que se ve con frecuencia creciente con senescencia creciente, por ejemplo, una afección neurodegenerativa tal como enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y similares.

En algunas modalidades, la afección asociada con el envejecimiento que se trata es un aumento asociado con el envejecimiento de la neuroinflamación en un individuo. Por “neuroinflamación” se entiende las respuestas bioquímicas y celulares del sistema nervioso a lesiones, infecciones o enfermedades neurodegenerativas. Tales respuestas están dirigidas a disminuir los factores desencadenantes al involucrar la inmunidad del sistema nervioso central para defenderse contra posibles daños. La neurodegeneración ocurre en el sistema nervioso central y exhibe características de pérdida de estructura y función neuronal. Las enfermedades neuroinflamatorias o afecciones o enfermedades asociadas a enfermedades neuroinflamatorias, incluyen a modo de ejemplo y no de limitación, enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer; enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple y similares.

Productos de sangre que comprenden componentes de plasma. En la práctica de los métodos en cuestión, un producto de sangre que comprende los componentes de plasma se administra a un individuo en necesidad del mismo, por ejemplo, un individuo que padece o está en riesgo de padecer un deterioro cognitivo o motor, neuroinflamación y/o demencia relacionada con la edad. Como tal, los métodos de acuerdo con las modalidades de la invención incluyen administrar un producto de sangre que comprende componentes de plasma de un individuo (el “individuo donador” o “donador”) a un individuo al menos en riesgo de padecer o que padece un deterioro cognitivo o motor, neuroinflamación, neurodegeneración y/o demencia relacionada con la edad (el “individuo receptor” o “receptor”). Por un “producto de sangre que comprende componentes de plasma” se entiende cualquier producto derivado de sangre que comprende plasma (por ejemplo, sangre entera, plasma de sangre o fracciones del mismo). El término “plasma” se usa en su sentido convencional para referirse al componente líquido de sangre de color paja/amarillo pálido compuesto de aproximadamente 92% de agua, 7% de proteínas tales como albúmina, globulina gamma, factor antihemofílico y otros factores de coagulación y 1% de sales minerales, azúcares, grasas, hormonas y vitaminas. Los ejemplos no limitantes de productos de sangre que contienen plasma adecuados para uso en los métodos en cuestión incluyen sangre entera tratada con anticoagulante (por ejemplo, EDTA, citrato, oxalato, heparina, etc.), productos de sangre producidos por filtración de la sangre entera para remover los glóbulos blancos (“leuorreducción”), productos de sangre que consisten en plasma derivado plasmaferéticamente o derivado aferéticamente, plasma recién congelado, productos de sangre que consisten esencialmente en plasma purificado y productos de sangre que consisten esencialmente en fracciones de plasma. En algunos casos, el producto de plasma que se emplea es un producto de plasma de sangre no entera, lo que significa que el producto no es sangre entera, de modo que carece de uno o más componentes encontrados en la sangre entera, tales como eritrocitos, leucocitos, etc., al menos en la medida en que estos componentes están presentes en la sangre entera. En algunos casos, el producto de plasma es sustancialmente, si no completamente, acelular, donde en tales casos el contenido celular puede ser 5% en volumen o menos, tal como 1% o menos, incluyendo 0.5% o menos, donde en algunos casos las fracciones de plasma acelulares son aquellas composiciones que carecen completamente de células, es decir, no incluyen células.

Recolección de productos de sangre que comprenden componentes de plasma. Las modalidades de los métodos descritos en la presente incluyen la administración de productos de sangre que comprenden componentes de plasma que se pueden derivar de donadores, incluyendo voluntarios humanos. El término “derivado de humano” se puede referir a tales productos. Los métodos de recolección de productos de sangre que comprenden plasma de donadores son bien conocidos en la técnica. (Ver, por ejemplo, MANUAL TÉCNICO

AABB, (Mark A. Fung, et al., eds., 18th ed. 2014), incorporado en la presente como referencia).

En una modalidad, las donaciones se obtienen por punción venosa. En otra modalidad, la punción venosa es solo una punción venosa única. En otra modalidad, no se emplea reemplazo de volumen de solución salina. En una modalidad preferida, el proceso de plasmaféresis se usa para obtener los productos de sangre que comprenden plasma. La plasmaféresis puede comprender la remoción de un volumen de plasma ajustado al peso con el retorno de los componentes celulares al donador. En la modalidad preferida, se usa citrato de sodio durante la plasmaféresis para prevenir la coagulación celular. El volumen de plasma recolectado de un donador está preferiblemente entre 690 a 880 ml después de la administración de citrato, y preferiblemente se coordina con el peso del donador.

3. Fracciones de Plasma

Durante la Segunda Guerra Mundial, surgió la necesidad de un expansor de plasma estable que pudiera emplearse en el campo de batalla cuando los soldados perdieran grandes cantidades de sangre. Como resultado, se desarrollaron métodos para preparar plasma liofilizado. Sin embargo, el uso de plasma liofilizado fue difícil en situaciones de combate ya que la reconstitución requirió agua estéril. Como alternativa, el Dr. E.J. Cohn sugirió que se podría usar albúmina, y preparó una solución estable lista para usar que se podría introducir inmediatamente para el tratamiento de shock. (Ver Johan, *Current Approaches to the Preparation of Plasma Fractions in (Biotechnology of Blood)* 165 (Jack Goldstein ed., 1st ed. 1991)). El procedimiento del Dr. Cohn para purificar fracciones de plasma utiliza etanol frío por su efecto desnaturalizante y emplea cambios en el pH y temperatura para lograr la separación.

Una modalidad de los métodos descritos en la presente incluye la administración de fracciones de plasma a un sujeto. El fraccionamiento es el proceso por el cual ciertos subconjuntos de proteínas se separan del plasma. La tecnología de fraccionamiento es conocida en la técnica y se basa en los pasos desarrollados por Cohn et al. durante la década de 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), incorporado en la presente como referencia). Hay varios pasos involucrados en este proceso, cada paso involucra concentraciones específicas de etanol, así como cambios de pH, temperatura y osmolalidad que resultan en la precipitación selectiva de proteínas. Los precipitados también se separan por centrifugación o precipitación. El “proceso de fraccionamiento de Cohn” original implicaba la separación de proteínas a través de precipitados en cinco fracciones, designadas fracción I, fracción II+III, fracción IV-1, fracción IV-4 y fracción V. La albúmina fue el producto final identificado originalmente (fracción V) de este proceso. De acuerdo con las

modalidades de la invención, cada fracción (o efluente de un paso de separación previo) contiene o potencialmente contiene fracciones de proteínas terapéuticamente útiles. (Ver Thierry Burnouf, *Modern Plasma Fractionation*, 21(2) *Transfusion Medicine Reviews* 101 (2007); Adil Denizli, *Plasma fractionation: conventional and chromatographic methods for albumin purification*, 4 *J. Biol. & Chem.* 315, (2011); y 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), y las Patentes de Estados Unidos Nos. 3869431, 5110907, 5219995, 7531513 y 8772461 que se incorporan en la presente como referencia). El ajuste de los parámetros experimentales anteriores se puede hacer para obtener fracciones de proteínas específicas.

Más recientemente, el fraccionamiento ha alcanzado una mayor complejidad y, como tal, comprende modalidades adicionales de la invención. Este reciente aumento en la complejidad se ha producido a través de: la introducción de cromatografía que resulta en el aislamiento de nuevas proteínas de las fracciones existentes como crioprecipitado, plasma crio pobre y fracciones de Cohn; aumento de la recuperación de IgG por la integración de la cromatografía y el proceso de fraccionamiento de etanol; y reducción/inactivación/remoción viral. (Id.) Para capturar proteínas a pH fisiológico y fuerza iónica, se puede usar cromatografía de intercambio aniónico. Esto preserva la actividad funcional de proteínas y/o fracciones de proteínas. La heparina y anticuerpos monoclonales también se usan en la cromatografía de afinidad. Un experto en la técnica reconocerá que los parámetros descritos anteriormente se pueden ajustar para obtener fracciones que contienen proteínas de plasma específicamente deseadas.

El fraccionamiento de plasma sanguínea también puede ser a base de sulfato de amonio (Ver, por ejemplo, Odunuga OO, *Biochem Compounds*, 1:3 (2013); Wingfield PT, *Curr Protoc Protein Sci*, Appx. 3 (2001), incorporado acá por referencia). Adicionar a obtener fracciones de sangre específicas, el fraccionamiento a base de sulfato de amonio ha sido empleado para reducir proteínas abundantes del plasma. (Saha S. y otros *J. Proteomics Bioinform*, 5(8) (2012), incorporado acá por referencia).

En una modalidad de la invención, el plasma de sangre se fracciona en un entorno industrial. El plasma congelado se descongela a 1°C a 4°C. La centrifugación refrigerada continua se aplica al plasma descongelado y se aísla el crioprecipitado. El crioprecipitado recuperado se congela a -30°C o menos y se almacena. El plasma pobre en crioprecipitado ("pobre en crio") se procesa inmediatamente para la captura (a través de, por ejemplo, cromatografía primaria) de factores de coagulación lábiles tal como el complejo del factor IX y sus componentes, así como inhibidores de la proteasa tal como antitrombina e inhibidor de la C1 esterasa. La centrifugación en serie y el aislamiento de precipitados se pueden aplicar en pasos posteriores. Tales técnicas son conocidas por un experto en la

técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nos. 4624780, 5219995, 5288853 y Solicitudes de Patente de Estados Unidos Nos. 20140343255 y 20150343025, cuyas descripciones se incorporan como referencia en su totalidad en la presente.

En una modalidad de la invención, la fracción de plasma puede comprender una fracción de plasma que contiene una concentración sustancial de albúmina. En otra modalidad de la invención, la fracción de plasma puede comprender una fracción de plasma que contiene una concentración sustancial de IgG o inmunoglobulina intravenosa (IGIV) (por ejemplo, Gamunex-C®). En otra modalidad de la invención, la fracción de plasma puede comprender una fracción de plasma IGIV, tal como Gamunex-C® que se ha reducido sustancialmente de inmunoglobulina (IgG) por métodos bien conocidos por un experto en la técnica, tal como por ejemplo, agotamiento mediado por la Proteína A. (Ver Keshishian, H., et al., Multiplexed, Quantitative Workflow for Sensitive Biomarker Discovery in Plasma Yields Novel Candidates for Early Myocardial Injury, *Molecular & Cellular Proteomics*, 14 at 2375-93 (2015)). En una modalidad adicional, la fracción de plasma de sangre puede ser una en la que se remueven sustancialmente todos los factores de coagulación para retener la eficacia de la fracción con un riesgo reducido de trombosis. Por ejemplo, la fracción de plasma puede ser una fracción de plasma como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 62/376,529 presentada el 18 de agosto de 2016; cuya descripción se incorpora como referencia en su totalidad en la presente.

4. Productos de Albúmina

Para aquellos expertos en la técnica, hay dos categorías generales de Productos de Plasma de Albúmina ("APP"): fracción de proteína de plasma ("PPF") y solución de albúmina humana ("HAS"). La PPF se deriva de un proceso con un rendimiento mayor que HAS pero tiene una pureza mínima de albúmina menor que HAS (> 83% para PPF y > 95% para HAS). (Production of human albumin solution: a continually developing colloid, P. Matejtschuk et al., *British J. of Anaesthesia* 85(6): 887-95, at 888 (2000)). En algunos casos, la PPF tiene una pureza de albúmina entre 83% y 95% o alternativamente 83% y 96%. La pureza de la albúmina se puede determinar por electroforesis u otros ensayos de cuantificación tal como, por ejemplo, por espectrometría de masas. Además, algunos han notado que la PPF tiene una desventaja debido a la presencia de proteínas "contaminantes" tal como PKA. Id. Como consecuencia, las preparaciones de PPF han perdido popularidad como Productos de Plasma de Albúmina, e incluso han sido eliminadas de las farmacopeas de ciertos países. Id. Contrariamente a estas preocupaciones, la invención hace un uso beneficioso de estos "contaminantes". Además de las globulinas α , β y γ , así como la PKA mencionada anteriormente, los métodos de la invención usan proteínas adicionales u otros

factores dentro de los “contaminantes” que promueven procesos tales como neurogénesis, supervivencia de células neuronales, cognición mejorada o función motora y neuroinflamación disminuida.

Los expertos en la técnica reconocerán que hay, o ha habido, varias fuentes comerciales de PPF (las “Preparaciones de PPF Comerciales”). Estas incluyen Plasma-Plex™ PPF (Armour Pharmaceutical Co., Tarrytown, NY), Plasmanate™ PPF (Grifols, Clayton, NC), Plasmatein™ (Alpha Therapeutics, Los Ángeles, CA) y Protenate™ PPF (Baxter Labs, Inc. Deerfield, IL).

Los expertos en la técnica también reconocerán que hay, o ha habido, varias fuentes comerciales de HAS (las “Preparaciones de HAS Comerciales”). Estas incluyen Albuminar™ (CSL Behring), AlbuRx™ (CSL Behring), Albutein™ (Grifols, Clayton, NC), Buminate™ (Baxatla, Inc., Bannockburn, IL), Flexbumin™ (Baxatla, Inc., Bannockburn, IL) y Plasbumin™ (Grifols, Clayton, NC).

a. Fracción de Proteína de Plasma (Humana) (PPF)

De acuerdo con la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (“FDA”), “Fracción de Proteína de Plasma (Humana)” o PPF, es el nombre propio del producto definido como “una solución estéril de proteína compuesta de albúmina y globulina, derivada de plasma humano.” (Código de Regulaciones Federales “CFR” 21 CFR 640.90 que se incorpora en la presente como referencia). El material fuente de PPF es plasma recuperado de sangre entera preparada según lo prescrito en 21 CFR 640.1 - 640.5 (incorporado como referencia en la presente), o plasma fuente preparado según lo prescrito en 21 CFR 640.60 - 640.76 (incorporado como referencia en la presente).

La PPF se analiza para determinar si cumple con los siguientes estándares según 21 CFR 640.92 (incorporado como referencia en la presente):

- (a) El producto final será una solución de proteína de 5.0 +/- 0.30 por ciento; y
- (b) La proteína total en el producto final consistirá en al menos 83 por ciento de albúmina y no más de 17 por ciento de globulinas. No más de 1 por ciento de la proteína total será globulina gamma. La composición de proteínas se determina por un método que se ha aprobado para cada fabricante por el Director, Centro de Evaluación e Investigación Biológica, Administración de Alimentos y Fármacos.

Como se usa en la presente, “Fracción de Proteína de Plasma” o “PPF” se refiere a una solución estéril de proteína compuesta de albúmina y globulina, derivada del plasma humano, con un contenido de albúmina de al menos 83% con no más de 17% de globulinas (incluyendo globulinas $\alpha 1$, $\alpha 2$, β y γ) y otras proteínas de plasma, y no más de 1% de globulina gamma según lo determinado por electroforesis. (Hink, J.H., Jr., et al., Preparation and Properties of a Heat-Treated Human Plasma Protein Fraction, VOX

SANGUINIS 2(174) (1957)). La PPF también se puede referir a una forma sólida, que cuando se suspende en solvente, tiene una composición similar. La fracción de globulina total se puede determinar sustrayendo la albúmina de la proteína total. (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. Albúmina (Humana) (HAS)

De acuerdo con la FDA, "Albúmina (Humana)" (también referida en la presente como "HAS") es el nombre propio del producto definido como "solución estéril de la albúmina derivada de plasma humano". (Código de Regulaciones Federales "CFR" 21 CFR 640.80 que se incorpora en la presente como referencia). El material fuente de Albúmina (Humana) es plasma recuperado de sangre entera preparada según lo prescrito en 21 CFR 640.1-640.5 (incorporado como referencia en la presente), o plasma fuente preparado según lo prescrito en 21 CFR 640.60-640.76 (incorporado como referencia en la presente). Otros requisitos para la albúmina (humana) se enumeran en 21 CFR 640.80 - 640.84 (incorporado en la presente como referencia).

La albúmina (humana) se analiza para determinar si cumple con los siguientes estándares según 21 CFR 640.82:

(a) Concentración de proteínas. El producto final debe cumplir con una de las siguientes concentraciones: 4.0 +/- 0.25 por ciento; 5.0 +/- 0.30 por ciento; 20.0 +/- 1.2 por ciento; y 25.0 +/- 1.5 por ciento de solución de proteína.

(b) Composición de proteínas. Al menos 96 por ciento de la proteína total en el producto final será albúmina, según lo determinado por un método que se ha aprobado para cada fabricante por el Director, Centro de Evaluación e Investigación Biológica, Administración de Alimentos y Fármacos.

Como se usa en la presente, "Albúmina (Humana)" o "HAS" se refiere a una solución estéril de proteína compuesta de albúmina y globulina, derivada de plasma humano, con un contenido de albúmina de al menos 95%, con no más de 5% de globulinas (incluyendo las globulinas $\alpha 1$, $\alpha 2$, β y γ) y otras proteínas de plasma. HAS también se puede referir a una forma sólida, que cuando se suspende en solvente, tiene una composición similar. La fracción de globulina total se puede determinar sustrayendo la albúmina de la proteína total.

Como puede reconocer un experto en la técnica, las fracciones de PPF y HAS también se pueden liofilizar o estar en otra forma sólida. Tales preparaciones, con aditivos apropiados, se pueden usar para hacer tabletas, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo. La forma sólida se puede formular en preparaciones para inyección disolviéndola, suspendiéndola o emulsionándola en un solvente acuoso o no acuoso, tales como aceites vegetales u otros aceites similares, glicéridos de ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos

alifáticos superiores o propilenglicol; y si se desea, con aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizadores y conservadores.

5. Fracciones Reducidas por Factor de Coagulación

Otra modalidad de la invención usa una fracción de plasma de sangre de la cual se remueven sustancialmente todos los factores de coagulación para retener la eficacia de la fracción con un riesgo reducido de trombosis. Convenientemente, el producto de sangre se puede derivar de un donador joven o un grupo de donadores jóvenes y se puede dejar sin IgM para proporcionar un producto de sangre joven que sea compatible con ABO. Actualmente, el plasma que se transfunde se hace coincidir con el tipo de sangre ABO, ya que la presencia de anticuerpos de origen natural contra los antígenos A y B puede resultar en reacciones a la transfusión. La IgM parece ser responsable de las reacciones a la transfusión cuando los pacientes reciben plasma que no coincide con ABO. La remoción de IgM de fracciones o productos de sangre ayuda a eliminar las reacciones a la transfusión en sujetos a los que se administran los productos de sangre y fracciones de plasma de sangre de la invención.

Por consiguiente, en una modalidad, la invención está dirigida a un método para tratar o prevenir una afección relacionada con el envejecimiento, tal como deterioro cognitivo o motor, neuroinflamación o neurodegeneración en un sujeto. El método comprende: administrar al sujeto un producto de sangre o fracción de sangre derivada de sangre entera de un individuo o grupo de individuos, en donde el producto de sangre o fracción de sangre está sustancialmente desprovisto de (a) al menos un factor de coagulación y/o (b) IgM. En algunas modalidades, los individuos de los que se deriva el producto de sangre o fracción de sangre son individuos jóvenes. En algunas modalidades, el producto de sangre está sustancialmente desprovisto de al menos un factor de coagulación e IgM. En ciertas modalidades, el producto de sangre está sustancialmente desprovisto de fibrinógeno (Factor I). En modalidades adicionales, el producto de sangre sustancialmente carece de eritrocitos y/o leucocitos. En modalidades adicionales, el producto de sangre es sustancialmente acelular. En otras modalidades, el producto de sangre se deriva de plasma. Tales modalidades de la invención están respaldadas además por la Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 62/376,529 presentada el 18 de agosto de 2016, que se incorpora como referencia en su totalidad en la presente.

6. Tratamiento de Productos de Proteínas de Plasma Enriquecidos en Proteínas

Las modalidades adicionales de la invención usan fracciones de plasma con concentración de albúmina reducida en comparación con PPF, pero con cantidades

aumentadas de globulinas y otras proteínas de plasma (lo que algunos han referido como “contaminantes”). Las modalidades, como con PPF, HAS, Efluente I y Efluente II/III, están todas efectivamente desprovistas de factores de coagulación. Tales fracciones de plasma son referidas después como “productos de proteínas de plasma enriquecidos en proteínas”. Por ejemplo, una modalidad de la invención puede usar un producto de proteínas de plasma enriquecido en proteínas que comprende 82% de albúmina y 18% de globulinas α , β y γ y otras proteínas de plasma. Otra modalidad de la invención puede usar un producto de proteínas de plasma enriquecido en proteínas que comprende 81% de albúmina y 19% de globulinas α , β y γ y/u otras proteínas de plasma. Otra modalidad de la invención puede usar un producto de proteínas de plasma enriquecido en proteínas que comprende 80% de albúmina y 20% de globulinas α , β y γ y/u otras proteínas de plasma. Las modalidades adicionales de la invención pueden usar productos de proteínas de plasma enriquecidos en proteínas comprendidos de 70-79% de albúmina y un correspondiente 21-30% de globulinas α , β y γ y otras proteínas de plasma. Las modalidades adicionales de la invención pueden usar productos de proteínas de plasma enriquecidos en proteínas comprendidos de 60-69% de albúmina y un correspondiente 31-40% de globulinas α , β y γ y otras proteínas de plasma. Las modalidades adicionales de la invención pueden usar productos de proteínas de plasma enriquecidos en proteínas comprendidos de 50-59% de albúmina y un correspondiente 41-50% de globulinas α , β y γ y otras proteínas de plasma. Las modalidades adicionales de la invención pueden usar productos de proteínas de plasma enriquecidos en proteínas comprendidos de 40-49% de albúmina y un correspondiente 51-60% de globulinas α , β y γ y otras proteínas de plasma. Las modalidades adicionales de la invención pueden usar productos de proteínas de plasma enriquecidos en proteínas comprendidos de 30-39% de albúmina y un correspondiente 61-70% de globulinas α , β y γ y otras proteínas de plasma. Las modalidades adicionales de la invención pueden usar productos de proteínas de plasma enriquecidos en proteínas comprendidos de 20-29% de albúmina y un correspondiente 71-80% de globulinas α , β y γ y otras proteínas de plasma. Las modalidades adicionales de la invención pueden usar productos de proteínas de plasma enriquecidos en proteínas comprendidos de 10-19% de albúmina y un correspondiente 81-90% de globulinas α , β y γ y otras proteínas de plasma. Las modalidades adicionales de la invención pueden usar productos de proteínas de plasma enriquecidos en proteínas comprendidos de 1-9% de albúmina y un correspondiente 91-99% de globulinas α , β y γ y otras proteínas de plasma. Una modalidad adicional de la invención puede usar productos de proteínas de plasma enriquecidos en proteínas comprendidos de 0% de albúmina y 100% de globulinas α , β y γ y otras proteínas de plasma.

Las modalidades de la invención descritas anteriormente también pueden tener concentraciones de globulina gamma totales de 1-5%.

Las concentraciones específicas de proteínas en una fracción de plasma se pueden determinar usando técnicas bien conocidas por una persona experta en la técnica relevante. A modo de ejemplo, y no de limitación, tales técnicas incluyen electroforesis, espectrometría de masas, análisis ELISA y análisis de transferencia Western.

7. Preparación de Fracciones de Plasma

Los métodos para preparar PPF y otras fracciones de plasma son bien conocidos por los expertos en la técnica. Una modalidad de la invención permite que la sangre usada en la preparación de la fracción de proteína de plasma humana se recolecte en matraces con solución de citrato o citrato dextrosa anticoagulante para inhibir la coagulación, con separación adicional de las Fracciones I, II + III, IV y PPF según el método descrito en Hink et al. (Ver Hink, J.H., Jr., et al., Preparation and Properties of a Heat-Treated Human Plasma Protein Fraction, VOX SANGUINIS 2(174) (1957), incorporada en la presente como referencia). De acuerdo con este método, la mezcla se puede recolectar a 2 - 8°C. Posteriormente, el plasma se puede separar por centrifugación a 7°C, remover y almacenar a -20°C. El plasma luego se puede descongelar a 37°C y fraccionarse, preferiblemente dentro de las ocho horas después de la remoción del almacenamiento a -20°C.

El plasma se puede separar de la Fracción I usando etanol al 8% a pH 7.2 y una temperatura de -2 a -2.5°C con una concentración de proteína de 5.1 a 5.6 por ciento. Se puede añadir etanol frío al 53.3 por ciento (176 mL/L de plasma) con amortiguador de acetato (200 ml de acetato de sodio 4 M, 230 ml ácido acético glacial quantum satis a 1 L con H₂O) usando chorros a una velocidad de, por ejemplo, de 450 ml/minuto durante la disminución de la temperatura de plasma a -2°C. La Fracción I se puede separar y remover del efluente (Efluente I) a través de ultracentrifugación. El fibrinógeno se puede obtener de la Fracción I según los métodos conocidos por los expertos en la técnica.

La fracción II + III se puede separar del Efluente I a través del ajuste del efluente a etanol al 21 por ciento a pH 6.8, temperatura a -6°C, con una concentración de proteínas de 4.3 por ciento. Se puede añadir etanol frío al 95 por ciento (176 ml/L de Efluente I) con ácido acético 10 M usado para el ajuste de pH usando chorros a una velocidad, por ejemplo, de 500 ml/minuto durante la disminución de la temperatura del Efluente I a -6°C. El precipitado resultante (Fracción II + III) se puede remover por centrifugación a -6°C. La globulina gamma se puede obtener de la Fracción II + III usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

La Fracción IV-1 se puede separar del Efluente II + III ("Efluente II/III") a través del ajuste del efluente a etanol al 19 por ciento a pH 5.2, temperatura a -6°C y concentración de proteína del 3 por ciento. Se puede añadir H₂O y ácido acético 10 M usado para el ajuste del pH usando chorros mientras se mantiene el Efluente II/III a -6°C durante 6 horas. La

Fracción VI-1 precipitada se puede asentar a -6°C durante 6 horas y posteriormente separarse del efluente por centrifugación a la misma temperatura. La fracción de proteína de plasma estable se puede recuperar del Efluente IV-1 a través del ajuste de la concentración de etanol al 30 por ciento a pH 4.65, temperatura -7°C y concentración de proteína de 2.5 por ciento. Esto se puede realizar ajustando el pH del Efluente IV-1 con ácido-alcohol frío (dos partes de ácido acético 2 M y una parte de etanol al 95 por ciento). Mientras se mantiene una temperatura de -7°C , a cada litro de Efluente IV-1 ajustado se añaden 170 ml de etanol frío (95%). Se puede permitir que las proteínas que se precipitan se asienten durante 36 horas y luego se remuevan por centrifugación a -7°C .

Las proteínas recuperadas (fracción de proteína de plasma estable) se pueden secar (por ejemplo, por liofilización) para remover el alcohol y H_2O . El polvo seco resultante se puede disolver en agua destilada estéril, por ejemplo usando 15 litros de agua/kg de polvo, con la solución ajustada a pH 7.0 con NaOH 1 M. Se puede lograr una concentración final de proteína al 5% añadiendo agua destilada estéril que contiene acetil triptofanato de sodio, caprilato de sodio y NaCl, ajustando las concentraciones finales de triptofanato de acetilo 0.004 M, caprilato 0.004 M y sodio 0.112 M. Finalmente, la solución se puede filtrar a 10°C para obtener una solución clara y posteriormente tratarse térmicamente para la inactivación de patógenos a 60°C durante al menos 10 horas.

Un experto en la técnica reconocerá que cada una de las diferentes fracciones y efluentes descritos anteriormente se podría usar con los métodos de la invención para tratar enfermedades. Por ejemplo, y no a modo de limitación, los Efluentes I o Efluente II/III se pueden usar para tratar enfermedades tales como trastornos cognitivos, motores y neurodegenerativos y son modalidades de la invención.

Los métodos anteriores para preparar fracciones de plasma y fracción de proteínas de plasma (PPF) son solo ejemplares e implican solamente modalidades de la invención. Un experto en la técnica reconocería que estos métodos pueden variar. Por ejemplo, el pH, temperatura y concentración de etanol, entre otras cosas, se pueden ajustar para producir diferentes variaciones de las fracciones de plasma y fracción de proteínas de plasma en las diferentes modalidades y métodos de la invención. En otro ejemplo, las modalidades adicionales de la invención contemplan el uso de nanofiltración para la remoción/inactivación de patógenos de fracciones de plasma y fracción de proteínas de plasma.

Una modalidad adicional de la invención contempla métodos y composición que usan y/o comprenden fracciones de plasma adicionales. Por ejemplo, la invención, entre otras cosas, demuestra que las concentraciones específicas de albúmina no son críticas para mejorar la actividad cognitiva o motora. Por lo tanto, las fracciones con concentración de albúmina reducida, tales como las fracciones que tienen menos de 83% de albúmina, se

contemplan por la invención.

8. Tratamiento

Los aspectos de los métodos de las invenciones descritos en la presente incluyen el tratamiento de un sujeto con un plasma que comprende producto de sangre, tal como una fracción de plasma de sangre, por ejemplo, como se describió anteriormente. Una modalidad incluye el tratamiento de un sujeto humano con un plasma que comprende producto de sangre. Un experto en la técnica reconocería que los métodos de tratamiento de sujetos con productos de sangre que comprenden plasma son reconocidos en la técnica. A modo de ejemplo, y no de limitación, una modalidad de los métodos de las invenciones descritos en la presente está comprendida de la administración de plasma congelado fresco a un sujeto para el tratamiento y/o prevención de deterioro cognitivo o motor, neuroinflamación, neurodegeneración, y/o demencia relacionada con la edad. En una modalidad, el plasma que comprende producto de sangre se administra inmediatamente, por ejemplo, dentro de aproximadamente 12-48 horas de la recolección de un donador, al individuo que padece o está en riesgo de deterioro cognitivo o motor, neuroinflamación, neurodegeneración, y/o demencia relacionada con la edad. En tales casos, el producto se puede almacenar bajo refrigeración, por ejemplo, 0-10°C. En otra modalidad, el plasma congelado fresco es uno que se ha almacenado congelado (crioconservado) a -18°C o más frío. Antes de la administración, el plasma congelado fresco se descongela y, una vez descongelado, se administra a un sujeto 60-75 minutos después que el proceso de descongelación ha comenzado. Cada sujeto recibe preferiblemente una unidad única de plasma congelado fresco (200-250 ml), el plasma congelado fresco se deriva preferiblemente de donadores de un rango de edad predeterminado. En una modalidad de la invención, el plasma congelado fresco es donado (derivado de) individuos jóvenes. En otra modalidad de la invención, el plasma congelado fresco es donado por (derivados de) donadores del mismo género. En otra modalidad de la invención, el plasma congelado fresco es donado por (derivados de) donadores del rango de edad entre 18-22 años de edad.

En una modalidad de la invención, los productos de sangre que comprenden plasma se examina después de la donación por tipo de sangre. En otra modalidad de la invención, el producto de sangre que comprende plasma se examina para detectar agentes de enfermedades infecciosas tales como VIH I y II, VHB, VHC, HTLV I y II, anti-HBc según los requisitos de 21 CFR 640.33 y las recomendaciones contenidas en los documentos guía de la FDA.

En todavía otra modalidad de la invención, el sujeto se trata con una fracción de plasma. En una modalidad de la invención, la fracción de plasma es PPF o HAS. En una modalidad adicional de la invención, la fracción de plasma es una de las preparaciones de

PPF comerciales o las preparaciones de HAS comerciales. En otra modalidad de la invención, la fracción de plasma es una PPF o HAS derivada de un grupo de individuos de un rango de edad específico, tales como individuos jóvenes, o es una fracción de PPF o HAS modificada que se ha sometido a un fraccionamiento o procesamiento adicional (por ejemplo PPF o HAS con una o más proteínas específicas parcial o sustancialmente removidas). En otra modalidad de la invención, la fracción de plasma es una fracción de plasma de IGIV que se ha agotado sustancialmente de inmunoglobulina (IgG). Una fracción de sangre que está “sustancialmente agotada” o que tiene proteínas específicas “sustancialmente removidas”, tal como IgG, se refiere a una fracción de sangre que contiene menos de aproximadamente 50% de la cantidad que se presenta en el producto de referencia o plasma de sangre entera, tal como menos de 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, .25%, .1%, niveles indetectables, o cualquier número entero entre estos valores, medidos usando ensayos estándar bien conocidos en la técnica.

9. Administración

Los aspectos de los métodos de las invenciones descritos en la presente incluyen el tratamiento de un sujeto con un plasma que comprende producto de sangre, tal como un plasma de sangre o fracción de plasma, por ejemplo, como se describió anteriormente. Una modalidad incluye el tratamiento de un sujeto humano con un plasma que comprende producto de sangre. Un experto en la técnica reconocería que los métodos de tratamiento de sujetos con productos de sangre que comprenden plasma son reconocidos en la técnica. A modo de ejemplo, y no de limitación, una modalidad de los métodos de las invenciones descritos en la presente está comprendida de la administración de plasma congelado fresco a un sujeto para el tratamiento y/o prevención de deterioro cognitivo o motor, neuroinflamación, neurodegeneración, y/o demencia relacionada con la edad. En una modalidad, el plasma que comprende producto de sangre se administra inmediatamente, por ejemplo, dentro de aproximadamente 12-48 horas de la recolección de un donador, al individuo que padece o está en riesgo de un deterioro cognitivo o motor, neuroinflamación, neurodegeneración, y/o demencia relacionada con la edad. En tales casos, el producto se puede almacenar bajo refrigeración, por ejemplo, 0-10°C. En otra modalidad, el plasma congelado fresco es uno que se ha almacenado congelado (crioconservado) a -18°C o más frío. Antes de la administración, el plasma congelado fresco se descongela y, una vez descongelado, se administra a un sujeto 60-75 minutos después que el proceso de descongelación ha comenzado. Cada sujeto recibe preferiblemente una unidad única de plasma congelado fresco (200-250 ml), el plasma congelado fresco se deriva preferiblemente de donadores de un rango de edad predeterminado. En una modalidad de la invención, el plasma congelado fresco es donado (derivado de) individuos jóvenes. En otra modalidad de

la invención, el plasma congelado fresco es donado por (derivado de) donadores del mismo género. En otra modalidad de la invención, el plasma congelado fresco es donado por (derivado de) donadores del rango de edad entre 18-22 años de edad.

En una modalidad de la invención, el producto de sangre que comprende plasma se examina después de la donación por tipo de sangre. En otra modalidad de la invención, el producto de sangre que comprende plasma se examina para detectar agentes de enfermedades infecciosas tales como VIH I y II, VHB, VHC, HTLV I y II, anti-HBc según los requisitos de 21 CFR 640.33 y las recomendaciones contenidas en los documentos guía de la FDA.

En todavía otra modalidad de la invención, el sujeto se trata con una fracción de plasma. En una modalidad de la invención, la fracción de plasma es PPF o HAS. En una modalidad adicional de la invención, la fracción de plasma es una de las preparaciones de PPF comerciales o las preparaciones de HAS comerciales. En otra modalidad de la invención, la fracción de plasma es una PPF o HAS derivada de un grupo de individuos de un rango de edad específico, tales como individuos jóvenes, o es una fracción de PPF o HAS modificada que se ha sometido a un fraccionamiento o procesamiento adicional (por ejemplo PPF o HAS con una o más proteínas específicas parcial o sustancialmente removidas). En otra modalidad de la invención, la fracción de plasma es una fracción de plasma de IGIV que se ha agotado sustancialmente de inmunoglobulina (IgG). Una fracción de sangre que está “sustancialmente agotada” o que tiene proteínas específicas “sustancialmente removidas”, tal como IgG, se refiere a una fracción de sangre que contiene menos de aproximadamente 50% de la cantidad que se presenta en el producto de referencia o plasma de sangre entera, tal como menos de 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, .25%, .1%, niveles indetectables, o cualquier número entero entre estos valores, medidos usando ensayos estándar bien conocidos en la técnica.

Una modalidad de la invención incluye tratar un sujeto diagnosticado con un deterioro cognitivo o motor, neurodegeneración, o neuroinflamación administrando al sujeto una cantidad efectiva de plasma de sangre o fracción de plasma. Otra modalidad de la invención incluye administrar la cantidad efectiva de plasma de sangre o fracción de plasma y posteriormente monitorear al sujeto en busca de la función cognitiva o motora mejorada, o una reducción de la neuroinflamación o aumento de la neurogénesis. Otra modalidad de la invención incluye tratar un sujeto diagnosticado con un deterioro cognitivo o motor, neurodegeneración, o neuroinflamación administrando al sujeto una cantidad efectiva de plasma de sangre o fracción de plasma en donde el plasma de sangre o fracción de plasma se administra de una manera que resulta en la función cognitiva o motora mejorada, neuroinflamación disminuida, o neurogénesis mejorada después que se ha alcanzado la semivida media o mediana de las proteínas de plasma de sangre o proteínas de fracción de

plasma, en relación con la dosis administrada más reciente (referida como “dosificación pulsada” o “dosificado por pulsos” en la presente). Otra modalidad de la invención incluye administrar el plasma de sangre o fracción de plasma a través de un régimen de dosificación al menos dos días secuenciales y monitorear al sujeto en busca de la función cognitiva o motora mejorada, neuroinflamación disminuida o neurogénesis mejorada al menos 3 días después de la última fecha de administración. Una modalidad adicional de la invención incluye administrar el plasma de sangre o fracción de plasma a través de un régimen de dosificación de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días consecutivos y monitorear al sujeto en busca de la función cognitiva o motora mejorada, neuroinflamación disminuida o neurogénesis aumentada al menos 3 días después de la última fecha de administración. Todavía otra modalidad de la invención incluye administrar el plasma de sangre o fracción de plasma a través de un régimen de dosificación de al menos 2 días consecutivos y después de la última fecha de administración, monitorear en busca de la mejora de la función cognitiva o motora, neuroinflamación disminuida o neurogénesis aumentada más allá de cuando se ha alcanzado la semivida promedio de las proteínas en el plasma de sangre o fracción de plasma. Otra modalidad de la invención incluye administrar el plasma de sangre o fracción de plasma a través de un régimen de dosificación de 2 a 14 días no consecutivos en donde cada intervalo entre las dosis puede estar entre 0-3 días cada una.

En algunos casos, la dosificación pulsada de acuerdo con la invención incluye la administración de un primer conjunto de dosis, por ejemplo, como se describe anteriormente, seguido de un periodo de no dosificación, por ejemplo, un “periodo libre de dosificación”, que a su vez es seguido por la administración de otra dosis o conjunto de dosis. La duración de este periodo “libre de dosificación” puede variar, pero en algunas modalidades, es de 7 días o más, tal como 10 días o más, incluyendo 14 días o más, en algunos casos el periodo libre de dosificación varía desde 15 a 365 días, tal como 30 a 90 días e incluyendo 30 a 60 días. Como tal, las modalidades de los métodos incluyen dosificación no crónica (es decir, no continua), por ejemplo, administración no crónica de un producto de plasma de sangre. En algunas modalidades, el patrón de la dosificación pulsada seguido de un periodo sin dosificación se repite varias veces, según se desee, donde en algunos casos este patrón continúa durante 1 año o más, tal como 2 años o más, hasta e incluyendo la vida del sujeto. Otra modalidad de la invención incluye administrar el plasma de sangre o fracción de plasma a través de un régimen de dosificación de 5 días consecutivos, con un periodo libre de dosificación de 2-3 días, seguido de la administración durante 2-14 días consecutivos.

Bioquímicamente, por “cantidad efectiva” o “dosis efectiva” de agente activo se entiende una cantidad de agente activo que inhibirá, antagonizará, disminuirá, reducirá o suprimirá aproximadamente 20% o más, por ejemplo, 30% o más, 40% o más, o 50% o más, en algunos casos 60% o más, 70% o más, 80% o más, o 90% o más, en algunos casos

aproximadamente 100%, es decir, a cantidades insignificantes y, en algunos casos, revertirá la progresión del deterioro cognitivo, neuroinflamación, neurodegeneración o demencia asociada con la edad.

10. Fracción de Proteínas de Plasma

En la práctica de los métodos de la invención, una fracción de plasma se administra al sujeto. En una modalidad, la fracción de plasma es la fracción de proteínas de plasma (PPF). En modalidades adicionales, la PPF se selecciona de las preparaciones de PPF comerciales.

En otra modalidad, la PPF está comprendida de 88% de albúmina humana normal, 12% de globulinas alfa y beta y no más de 1% de globulina gamma según lo determinado por electroforesis. Las modalidades adicionales de esta modalidad usadas en la práctica de los métodos de la invención incluyen, por ejemplo, la modalidad como una solución al 5% de PPF amortiguada con carbonato de sodio y estabilizada con caprilato de sodio 0.004 M y acetiltriptófano 0.004 M. Las formulaciones adicionales, incluyendo las que modifican el porcentaje de PPF (por ejemplo, aproximadamente 1% a aproximadamente 10%, aproximadamente 10% a aproximadamente 20%, aproximadamente 20% a 25%, aproximadamente 25% a 30%) en solución, así como las concentraciones de solventes y estabilizadores se pueden usar en la práctica de los métodos de la invención.

11. Fracciones de Plasma de Edad de Donador Específica

Las modalidades adicionales de la invención incluyen administrar una fracción de proteína de plasma derivada del plasma de individuos de ciertos rangos de edad. Una modalidad incluye administrar PPF o HAS que se ha derivado del plasma de individuos jóvenes. En otra modalidad de la invención, los individuos jóvenes tienen una edad específica única o un rango de edad específico. En todavía otra modalidad, la edad promedio de los donadores es menor que la del sujeto o menor que la edad promedio de los sujetos a tratar.

Ciertas modalidades de la invención incluyen agrupar sangre o plasma de sangre de individuos de rangos de edad específicos y fraccionar el plasma de sangre como se describió anteriormente para obtener un producto de fracción de proteína de plasma tal como PPF o HAS. En una modalidad alternativa de la invención, la fracción de proteína de plasma o fracción de proteína de plasma específica se obtiene de individuos específicos que se ajustan a un rango de edad específico.

12. Indicaciones

Los métodos y fracciones y productos de sangre que comprenden plasma en cuestión se usan en el tratamiento, incluyendo la prevención, de afecciones asociadas con el

envejecimiento, tales como los deterioros en la capacidad cognitiva o motora de los individuos, por ejemplo, trastornos cognitivos, incluyendo (pero no limitados a) demencia asociada con la edad, afecciones inmunológicas, cáncer y disminución física y funcional; y trastornos motores tal como (pero no limitado a) la enfermedad de Parkinson. Los individuos que padecen o están en riesgo de desarrollar un deterioro cognitivo o motor asociado con el envejecimiento, neuroinflamación, y/o neurodegeneración que se beneficiarán de tratamiento con el producto de sangre que comprende plasma en cuestión, por ejemplo, por los métodos descritos en la presente, incluyen los individuos que tienen aproximadamente 50 años de edad o más, por ejemplo, 60 años de edad o más, 70 años de edad o más, 80 años de edad o más, 90 años de edad o más, y 100 años de edad o más, es decir, entre la edad de aproximadamente 50 y 100, por ejemplo, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o aproximadamente 100 años de edad, y padecen de deterioro cognitivo o motor, neuroinflamación y/o neurodegeneración asociada con el proceso natural del envejecimiento, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (M.C.I.); e individuos que tienen aproximadamente 50 años de edad o más, por ejemplo, 60 años de edad o más, 70 años de edad o más, 80 años de edad o más, 90 años de edad o más, y generalmente no más de 100 años de edad, es decir, entre las edades de 50 y 90, por ejemplo, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o aproximadamente 100 años de edad, que aún no han comenzado a mostrar síntomas de deterioro cognitivo o motor, neuroinflamación y/o neurodegeneración. Los ejemplos de deterioros cognitivos y motores, neuroinflamatorios y/o neurodegenerativos que se deben al envejecimiento natural incluyen los siguientes:

a. Deterioro cognitivo leve (M.C.I.). El deterioro cognitivo leve es una interrupción moderada de la cognición que se manifiesta como problemas con la memoria u otras funciones mentales, tales como planificar, seguir instrucciones o tomar decisiones que han empeorado con el tiempo, mientras que la función mental general y las actividades diarias no se ven afectadas. Por lo tanto, aunque normalmente no ocurre una muerte neuronal significativa, las neuronas en el cerebro envejecido son vulnerables a las alteraciones sub-letales relacionadas con la edad en la estructura, la integridad sináptica y el procesamiento molecular en la sinapsis, todo lo cual perjudica la función cognitiva.

Los individuos que padecen o están en riesgo de desarrollar un deterioro cognitivo asociado con el envejecimiento que se beneficiarán del tratamiento con la fracción o producto de sangre que comprende plasma en cuestión, por ejemplo, por los métodos descritos en la presente, también incluyen individuos de cualquier edad que padecen un deterioro cognitivo debido a un trastorno asociado con el envejecimiento; e individuos de cualquier edad que han sido diagnosticados con un trastorno asociado con el envejecimiento que generalmente se acompaña de deterioro cognitivo, donde el individuo aún no ha comenzado a presentar síntomas de deterioro cognitivo. Los ejemplos de tales trastornos asociados con el envejecimiento incluyen los siguientes:

b. Enfermedad de Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer es una pérdida progresiva e inexorable de la función cognitiva asociada con un número excesivo de placas seniles en la corteza cerebral y la materia gris subcortical, que también contiene β -amiloides y marañas neurofibrilares que consisten en proteína tau. La forma común afecta a las personas >60 años de edad, y su incidencia aumenta a medida que avanza la edad. Representa más del 65% de las demencias en los ancianos.

La causa de la enfermedad de Alzheimer no se conoce. La enfermedad se presenta en familias en aproximadamente 15 al 20% de los casos. El resto, casos esporádicos así llamados, tienen algunos determinantes genéticos. La enfermedad tiene un patrón genético autosómico dominante en la mayoría de los casos de inicio temprano y algunos casos de inicio tardío, pero una penetrancia variable en la edad avanzada. Los factores ambientales son el foco de la investigación activa.

En el curso de la enfermedad, se pierden sinapsis y finalmente neuronas dentro de la corteza cerebral, hipocampo y estructuras subcorticales (incluida la pérdida selectiva de células en el núcleo basal de Meynert), locus coeruleus y núcleo raphae dorsalis. El uso de glucosa cerebral y perfusión se reduce en algunas áreas del cerebro (lóbulo parietal y cortezas temporales en la enfermedad en etapa temprana, corteza prefrontal en la enfermedad en etapa tardía). Las placas neuríticas o seniles (compuestas de neuritas, astrocitos y células gliales alrededor de un núcleo amiloide) y ovillos neurofibrilares (compuestos de filamentos helicoidales emparejados) juegan un papel en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Las placas seniles y los ovillos neurofibrilares se producen con el envejecimiento normal, pero son mucho más frecuentes en personas con enfermedad de Alzheimer.

c. Enfermedad de Parkinson. La enfermedad de Parkinson (PD) es un trastorno del CNS idiopático, lentamente progresivo y degenerativo que se caracteriza por un movimiento lento y disminuido (bradicinesia), rigidez muscular, temblor en reposo (disonía), congelación muscular e inestabilidad postural. Originalmente considerada principalmente un trastorno motor, ahora se reconoce que la PD también causa depresión y cambios emocionales. La PD también puede afectar la cognición, el comportamiento, el sueño, la función autónoma y la función sensorial. Los deterioros cognitivos más comunes incluyen un deterioro en la atención y concentración, memoria de trabajo, función ejecutiva, producción de lenguaje y función visoespacial. Una característica de la PD es que los síntomas relacionados con la función motora reducida generalmente preceden a aquellos relacionados con el deterioro cognitivo, lo que ayuda en el diagnóstico de la enfermedad.

En la enfermedad de Parkinson primaria, las neuronas pigmentadas de la sustancia negra, el locus coeruleus y otros grupos de células dopaminérgicas del tronco encefálico se degeneran. La causa no se conoce. La pérdida de neuronas de sustancia negra, que se proyectan hacia el núcleo caudado y el putamen, da como resultado el agotamiento

del neurotransmisor dopamina en estas áreas. El inicio es generalmente después de los 40 años, con una incidencia creciente en los grupos de mayor edad.

La enfermedad de Parkinson se diagnostica recientemente en aproximadamente 60.000 estadounidenses cada año y actualmente afecta a aproximadamente un millón de estadounidenses. Aunque la PD no es fatal en sí misma, sus complicaciones son la decimocuarta causa principal de muerte en los Estados Unidos. En la actualidad, la PD no se puede curar, y el tratamiento generalmente se prescribe para controlar los síntomas, con cirugía prescrita en casos severos más tardíos.

Las opciones de tratamiento para la PD incluyen la administración de productos farmacéuticos para ayudar a controlar los déficits motores. Estas opciones aumentan o sustituyen al neurotransmisor, dopamina, del cual los pacientes con PD tienen bajas concentraciones cerebrales. Tales medicamentos incluyen: carbidopa/levodopa (que crean más dopamina en el cerebro); apomorfina, pramipexolol, ropinirol y rotingotina (agonistas de dopamina); selegilina y rasagilina (inhibidores de la MAO-B que previenen la descomposición de la dopamina); entacapona y tolcapona (inhibidores de la Catecol-O-metiltransferasa [COMT] que hacen que haya más levodopa disponible en el cerebro); benztropina y trihexifenidilo (anticolinérgicos); y amantadina (controla el temblor y la rigidez). El ejercicio/fisioterapia también se prescribe comúnmente para ayudar a mantener la función física y mental.

Las opciones de tratamiento actuales, por más que tratan los síntomas de la PD, no son curativas y no previenen la progresión de la enfermedad. Además, los medicamentos actuales tienden a perder eficacia en la etapa tardía de la PD. El fármaco más recetado, levodopa, comúnmente produce efectos adversos dentro de los 5 a 10 años después de comenzar la medicación. Estos efectos adversos pueden ser graves y pueden dar lugar a fluctuaciones motoras y oscilaciones impredecibles en el control motor entre dosis, así como sacudidas/contracciones (discinesia) que son difíciles de manejar e incluso son tan incapacitantes como los síntomas propios de la PD. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de nuevas terapias con nuevos mecanismos de acción que puedan administrarse junto o en combinación con los medicamentos actuales para la PD.

d. Parkinsonismo. El parkinsonismo secundario (también conocido como enfermedad de Parkinson atípica o Parkinson plus) resulta de la pérdida o interferencia con la acción de la dopamina en los ganglios basales debido a otras enfermedades degenerativas idiopáticas, fármacos o toxinas exógenas. La causa más común de parkinsonismo secundario es la ingestión de fármacos antipsicóticos o reserpina, que producen parkinsonismo al bloquear los receptores de dopamina. Las causas menos comunes incluyen envenenamiento por monóxido de carbono o manganeso, hidrocefalia, lesiones estructurales (tumores, infartos que afectan el mesencéfalo o los ganglios basales), hematoma subdural y trastornos

degenerativos, incluida la degeneración nigrostriatal. Ciertos trastornos como la Parálisis Supranuclear Progresiva (PSP), atrofia de sistemas múltiples (MSA), degeneración corticobasal (CBD) y la demencia con cuerpos de Lewy (DLB) pueden presentar síntomas de parkinsonismo antes de que se puedan hacer los síntomas cardinales necesarios para el diagnóstico específico, y por lo tanto pueden ser etiquetado como “Parkinsonismo”.

e. Demencia frontotemporal. La demencia frontotemporal (FTD) es una afección que resulta de un deterioro progresivo del lóbulo frontal del cerebro. Con el tiempo, la degeneración puede avanzar al lóbulo temporal. Solo superado por la enfermedad de Alzheimer (AD) en la prevalencia, FTD representa el 20% de casos de demencia presenil. Los síntomas se clasifican en tres grupos basado en las funciones de los lóbulos frontales y temporales afectados:

La variante de comportamiento FTD (bvFTD), con síntomas que incluyen letargo y espontaneidad por un lado, y desinhibición por el otro; afasia progresiva no fluida (PNFA), en la cual se observa un colapso en la fluidez del habla debido a la dificultad de articulación, errores fonológicos y/o sintácticos pero se preserva la comprensión de las palabras; y demencia semántica (SD), en la que los pacientes permanecen fluidos con la fonología y sintaxis normales, pero tienen dificultades cada vez mayores para nombrar y comprender las palabras. Otros síntomas cognitivos comunes a todos los pacientes con FTD incluyen un deterioro en la función ejecutiva y la capacidad de concentración. Otras capacidades cognitivas, incluidas la percepción, las capacidades espaciales, la memoria y la praxis, generalmente permanecen intactas. La FTD se puede diagnosticar por la observación de revelar la atrofia del lóbulo frontal y/o del lóbulo temporal anterior en los escaneos de MRI estructurales.

Existen varias formas de FTD, cualquiera de las cuales puede tratarse o prevenirse usando los métodos y composiciones en cuestión. Por ejemplo, una forma de demencia frontotemporal es la demencia semántica (SD). La SD se caracteriza por una pérdida de memoria semántica en los dominios verbales y no verbales. Los pacientes con SD a menudo presentan la enfermedad dificultades para hallar palabras. Los signos clínicos incluyen afasia fluida, anomia, comprensión limitada del significado de las palabras y agnosia visual asociativa (la incapacidad de unir imágenes u objetos semánticamente relacionados). A medida que la enfermedad progresa, los cambios en comportamiento y personalidad frecuentemente son observados similares a aquellos observados en la demencia frontotemporal, aunque se han descrito casos de demencia semántica ‘pura’ con pocos síntomas conductuales tardíos. La formación de imágenes MRI estructurales muestra un patrón característico de atrofia en los lóbulos temporales (predominantemente a la izquierda), con afectación inferior mayor que superior y atrofia del lóbulo temporal anterior mayor que posterior.

Como otro ejemplo, otra forma de demencia frontotemporal es la enfermedad de Pick (PiD, también PcD). Una característica definitoria de la enfermedad es la acumulación de proteínas tau en las neuronas, que se acumulan en tinciones plateadas, agregaciones esféricas conocidas como “cuerpos de Pick”. Los síntomas incluyen pérdida del habla (afasia) y demencia. Los pacientes con disfunción orbitofrontal pueden ser agresivos y socialmente inapropiados. Los mismos pueden robar o demostrar comportamientos estereotipados obsesivos o repetitivos. Los pacientes con disfunción frontal dorsomedial o dorsolateral pueden mostrar falta de preocupación, apatía o disminución de la espontaneidad. Los pacientes pueden demostrar una ausencia de autocontrol, autoconciencia anormal y una incapacidad para apreciar el significado. Los pacientes con pérdida de materia gris en la corteza orbitofrontal posterolateral bilateral y la ínsula anterior derecha pueden mostrar cambios en los comportamientos alimenticios, tal como un diente dulce patológico. Los pacientes con más pérdida focal de materia gris en la corteza orbitofrontal anterolateral pueden desarrollar hiperfagia. Si bien algunos de los síntomas pueden aliviarse inicialmente, la enfermedad progresa y los pacientes a menudo mueren dentro de dos a diez años.

f. Enfermedad de Huntington. La enfermedad de Huntington (HD) es un trastorno neurodegenerativo progresivo hereditario caracterizado por el desarrollo de anomalías emocionales, conductuales y psiquiátricas; pérdida de funcionamiento intelectual o cognitivo; y anomalías en el movimiento (alteraciones motoras). Los signos clásicos de la HD incluyen el desarrollo de corea - movimientos involuntarios, rápidos, irregulares y espasmódicos que pueden afectar la cara, brazos, piernas o tronco - así como la disminución cognitiva, incluida la pérdida gradual del procesamiento del pensamiento y las capacidades intelectuales adquiridas. Puede haber deterioro de la memoria, pensamiento abstracto y juicio; percepciones inadecuadas de tiempo, lugar o identidad (desorientación); aumento de la agitación; y cambios de personalidad (desintegración de la personalidad). Aunque los síntomas generalmente se hacen evidentes durante la cuarta o quinta década de la vida, la edad de inicio es variable y varía desde la primera infancia hasta la edad adulta tardía (por ejemplo, 70 u 80 años).

La HD se transmite dentro de las familias como un rasgo autosómico dominante. El trastorno ocurre como el resultado de secuencias anormalmente largas o “repeticiones” de instrucciones codificadas dentro de un gen en el cromosoma 4 (4p16.3). La pérdida progresiva de la función del sistema nervioso asociada con la HD resulta de la pérdida de neuronas en ciertas áreas del cerebro, incluyendo los ganglios basales y la corteza cerebral.

g. Esclerosis lateral amiotrófica. La esclerosis lateral amiotrófica (ALS) es una enfermedad neurológica rápidamente progresiva e invariablemente mortal que ataca a las neuronas motoras. La debilidad muscular y la atrofia y los signos de disfunción de las células

del asta anterior se notan inicialmente con mayor frecuencia en las manos y con menos frecuencia en los pies. El sitio de inicio es aleatorio y la progresión es asimétrica. Los calambres son comunes y pueden preceder a la debilidad. En raras ocasiones, un paciente sobrevive 30 años; 50% muere dentro de los 3 años posteriores al inicio, 20% vive 5 años y 10% vive 10 años.

Las características de diagnóstico incluyen el inicio durante la vida adulta media o tardía y la participación motora progresiva y generalizada sin anormalidades sensoriales. Las velocidades de conducción nerviosa son normales hasta el final de la enfermedad. Estudios recientes también han documentado la presentación de deterioros cognitivos, particularmente una reducción en la memoria verbal inmediata, la memoria visual, el lenguaje y la función ejecutiva.

Se ha reportado una disminución en el área del cuerpo celular, el número de sinapsis y la longitud sináptica total, incluso en las neuronas de apariencia normal de los pacientes con ALS. Se ha sugerido que cuando la plasticidad de la zona activa alcanza su límite, una pérdida continua de sinapsis puede conducir a un deterioro funcional. Promover la formación o nuevas sinapsis o prevenir la pérdida de sinapsis puede mantener la función neuronal en estos pacientes.

h. Esclerosis Múltiple. La esclerosis múltiple (MS) se caracteriza por diversos síntomas y signos de disfunción del CNS, con remisiones y exacerbaciones recurrentes. Los síntomas de presentación más comunes son parestesias en una o más extremidades, en el tronco o en un lado de la cara; debilidad o torpeza de una pierna o mano; o trastornos visuales, por ejemplo, ceguera parcial y dolor en un ojo (neuritis óptica retrobulbar), opacidad de la visión o escotomas. Los deterioros cognitivos comunes incluyen deterioros en la memoria (adquisición, retención y recuperación de nueva información), atención y concentración (particularmente atención dividida), procesamiento de información, funciones ejecutivas, funciones visoespaciales y fluidez verbal. Los síntomas tempranos comunes son parálisis ocular que resulta en visión doble (diplopía), debilidad transitoria de una o más extremidades, rigidez leve o fatigabilidad inusual de una extremidad, trastornos menores de la marcha, dificultad para controlar la vejiga, vértigo y trastornos emocionales leves; todos indican una afectación dispersa del CNS y a menudo transcurren meses o años antes de que se reconozca la enfermedad. El exceso de calor puede acentuar los síntomas y signos.

El curso es muy variado, impredecible y, en la mayoría de los pacientes, remitente. Al principio, meses o años de remisión pueden separar episodios, especialmente cuando la enfermedad comienza con neuritis óptica retrobulbar. Sin embargo, algunos pacientes tienen ataques frecuentes y se incapacitan rápidamente; para unos pocos el curso puede ser rápidamente progresivo.

i. Glaucoma. El glaucoma es una enfermedad neurodegenerativa común que

afecta las células ganglionares de la retina (RGC). La evidencia respalda la existencia de programas de degeneración compartimentada en sinapsis y dendritas, incluso en RGC. La evidencia reciente también indica una correlación entre el deterioro cognitivo en adultos mayores y el glaucoma (Yochim BP, et al. Prevalence of cognitive impairment, depression, and anxiety symptoms among older adults with glaucoma. J Glaucoma. 2012;21(4):250-254).

j. Distrofia miotónica. La distrofia miotónica (DM) es un trastorno multisistémico autosómico dominante caracterizado por debilidad muscular distrófica y miotonía. El defecto molecular es una repetición de trinucleótido expandido (CTG) en la región 3' no traducida del gen de la proteína cinasa de miotonina en el cromosoma 19q. Los síntomas pueden ocurrir a cualquier edad, y el rango de gravedad clínica es amplio. La miotonía es prominente en los músculos de la mano, y la ptosis es común incluso en casos leves. En casos graves, se produce una marcada debilidad muscular periférica, a menudo con cataratas, calvicie prematura, facies de hacha, arritmias cardíacas, atrofia testicular y anomalías endocrinas (por ejemplo, diabetes mellitus). El retraso mental es común en las formas congénitas severas, mientras que se observa una disminución relacionada con el envejecimiento de las funciones cognitivas frontales y temporales, particularmente las funciones ejecutivas y del lenguaje, en las formas más leves del trastorno en adultos. Las personas gravemente afectadas mueren a los 50 años.

k. Demencia. La demencia describe una serie de trastornos que tienen síntomas que afectan el pensamiento y las capacidades sociales con la suficiente severidad como para interferir con el funcionamiento diario. Otros casos de demencia, además de la demencia observada en las etapas tardías de los trastornos asociados con el envejecimiento discutidos anteriormente incluyen demencia vascular y demencia con cuerpos de Lewy, descritas a continuación.

En la demencia vascular, o “demencia por infarto múltiple”, el deterioro cognitivo es causado por problemas en el suministro de sangre al cerebro, típicamente por una serie de apoplejías menores, o algunas veces, una apoplejía grande precedida o seguida por otras apoplejías menores. Las lesiones vasculares pueden ser el resultado de una enfermedad cerebrovascular difusa, tal como la enfermedad de los vasos pequeños, o lesiones focales, o ambas. Los pacientes que padecen demencia vascular presentan deterioro cognitivo, de forma aguda o subacuática, después de un evento cerebrovascular agudo, después del cual se observa un deterioro cognitivo progresivo. Los deterioros cognitivos son similares a los observados en la enfermedad de Alzheimer, incluyendo los deterioros en el lenguaje, memoria, procesamiento visual complejo o la función ejecutiva, aunque los cambios relacionados en el cerebro no se deben a la patología de la AD sino a un flujo sanguíneo crónico reducido en el cerebro, eventualmente resultando en demencia. La tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) y la neuroimagen por tomografía por

emisión de positrones (PET) se pueden usar para confirmar un diagnóstico de demencia por infarto múltiple junto con evaluaciones que involucren un examen del estado mental.

La demencia con Cuerpos de Lewy (DLB) también conocida bajo una variedad de otros nombres, incluyendo demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad difusa de cuerpos de Lewy, enfermedad cortical de cuerpos de Lewy y demencia senil de tipo Lewy, es un tipo de demencia caracterizada anatómicamente por la presencia de cuerpos de Lewy (grupos de alfa-sinucleína y proteína ubiquitina) en neuronas, detectables en la histología cerebral post mortem. Su característica principal es la disminución cognitiva, particularmente del funcionamiento ejecutivo. La alerta y la memoria a corto plazo aumentarán y disminuirán.

Las alucinaciones visuales persistentes o recurrentes con imágenes vívidas y detalladas son a menudo un síntoma de diagnóstico temprano. La DLB a menudo se confunde en sus etapas iniciales con la enfermedad de Alzheimer y/o la demencia vascular, aunque, cuando la enfermedad de Alzheimer generalmente comienza de manera bastante gradual, la DLB a menudo tiene un inicio rápido o agudo. Los síntomas de DLB también incluyen síntomas motores similares a los del Parkinson. La DLB se distingue de la demencia que a veces ocurre en la enfermedad de Parkinson por el cuadro de tiempo en que los síntomas de demencia aparecen en relación con los síntomas de Parkinson. La enfermedad de Parkinson con demencia (POD) sería el diagnóstico cuando el inicio de la demencia es más de un año después del inicio de la enfermedad de Parkinson. La DLB se diagnostica cuando los síntomas cognitivos comienzan al mismo tiempo o dentro de un año de los síntomas de Parkinson.

l. Parálisis supranuclear progresiva. La parálisis supranuclear progresiva (PSP) es un trastorno cerebral que causa problemas graves y progresivos con el control de la marcha y el equilibrio, junto con el movimiento complejo del ojo y problemas de pensamiento. Uno de los signos clásicos de la enfermedad es la incapacidad de apuntar los ojos correctamente, lo que ocurre debido a lesiones en el área del cerebro que coordina los movimientos oculares. Algunas personas describen este efecto como un desenfoque. Las personas afectadas a menudo muestran alteraciones del estado de ánimo y el comportamiento, que incluyen depresión y apatía, así como demencia progresiva leve. El nombre largo del trastorno indica que la enfermedad comienza lentamente y continúa empeorando (progresivamente) y causa debilidad (parálisis) al dañar ciertas partes del cerebro por encima de las estructuras del tamaño de un guisante llamadas núcleos que controlan los movimientos oculares (supranuclear). La PSP se describió por primera vez como un trastorno distinto en 1964, cuando tres científicos publicaron un artículo que distinguía la afección de la enfermedad de Parkinson. A veces se le conoce como síndrome de Steele-Richardson-Olszewski, lo que refleja los nombres combinados de los científicos que definieron el trastorno. Aunque la PSP empeora progresivamente, nadie muere de la propia PSP.

m. Ataxia. Las personas con ataxia tienen problemas con la coordinación

porque las partes del sistema nervioso que controlan el movimiento y el equilibrio se ven afectadas. La ataxia puede afectar los dedos, manos, brazos, piernas, cuerpo, habla y movimientos oculares. La palabra ataxia se usa a menudo para describir un síntoma de falta de coordinación que puede asociarse con infecciones, lesiones, otras enfermedades o cambios degenerativos en el sistema nervioso central. La ataxia también se usa para denotar un grupo de enfermedades degenerativas específicas del sistema nervioso llamadas ataxias hereditarias y esporádicas, que son los énfasis principales de la Fundación Nacional de Ataxia.

n. Atrofia multisistémica. La atrofia multisistémica (MSA) es un trastorno neurológico degenerativo. La MSA está asociada con la degeneración de las células nerviosas en áreas específicas del cerebro. Esta degeneración celular causa problemas con el movimiento, equilibrio y otras funciones autónomas del cuerpo, tal como el control de la vejiga o la regulación de la presión arterial.

Se desconoce la causa de la MSA y no se han identificado factores de riesgo específicos. Alrededor del 55% de los casos ocurren en hombres, con una edad típica de inicio entre finales de los 50 y principios de los 60. La MSA a menudo se presenta con algunos de los mismos síntomas que la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, los pacientes con MSA generalmente muestran una respuesta mínima o nula a los medicamentos de dopamina usados para el Parkinson.

o. Fragilidad. El síndrome de fragilidad ("Fragilidad") es un síndrome geriátrico que se caracteriza por una disminución funcional y física que incluye disminución de la movilidad, debilidad muscular, lentitud física, poca resistencia, baja actividad física, desnutrición y pérdida de peso involuntaria. Tal disminución a menudo se acompaña y es consecuencia de enfermedades tal como la disfunción cognitiva y cáncer. Sin embargo, la fragilidad puede ocurrir incluso sin enfermedad. Las personas que padecen de fragilidad tienen un mayor riesgo de pronóstico negativo de fracturas, caídas accidentales, discapacidad, comorbilidad y mortalidad prematura. (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). Además, las personas que padecen de fragilidad tienen una mayor incidencia de mayores gastos de atención médica. (Id.)

Los síntomas comunes de fragilidad se pueden determinar por ciertos tipos de pruebas. Por ejemplo, la pérdida de peso involuntaria implica una pérdida de al menos 10 libras (4.54 kg) o más del 5% del peso corporal en el año anterior; la debilidad muscular se puede determinar por una fuerza de agarre reducida en el 20% más bajo al valor basal del estudio (ajustado por género e BMI); la lentitud física se puede basar en el tiempo necesario para caminar una distancia de 15 pies (457.2 m); la baja resistencia se puede determinar por el autoreporte de agotamiento del individuo; y la baja actividad física se puede medir usando

un cuestionario estandarizado. (Z. Palace et al., The Frailty Syndrome, *Today's Geriatric Medicine* 7(1), at 18 (2014)).

En algunas modalidades, los métodos y composiciones en cuestión encuentran uso en retardar la progresión de la afección o deterioro cognitivo, motor, neuroinflamatorio asociado con el envejecimiento, u otro deterioro relacionado con la edad. En otras palabras, las afecciones o capacidades cognitivas, motoras, neuroinflamatorias u otras en el individuo disminuirán más lentamente después del tratamiento con los métodos descritos que antes o en la ausencia de tratamiento por los métodos descritos. En algunos casos, los métodos de tratamiento en cuestión incluyen medir la progresión de la disminución del síntoma o capacidad cognitiva, motora, neuroinflamatoria u otra relacionada con la edad después del tratamiento, y determinar que la progresión de la disminución se reduce. En algunos de tales casos, la determinación se realiza comparando con una referencia, por ejemplo, la tasa de disminución en el individuo antes del tratamiento, por ejemplo, como se determina midiendo las afecciones o capacidades cognitivas, motoras, neuroinflamatorias u otras relacionadas con la edad antes de dos o más veces puntos de tiempo antes de la administración del producto de sangre en cuestión.

Los métodos y composiciones en cuestión encuentran uso en la estabilización de las afecciones o capacidades cognitivas, motoras, neuroinflamatorias u otras de un individuo, por ejemplo, un individuo que sufre de disminución cognitiva asociada con el envejecimiento o un individuo en riesgo de sufrir de disminución cognitiva asociada con el envejecimiento. Por ejemplo, el individuo puede demostrar algún deterioro cognitivo asociado con el envejecimiento, y la progresión del deterioro cognitivo observado antes del tratamiento con los métodos descritos se detendrá después del tratamiento por los métodos descritos. Como otro ejemplo, el individuo puede estar en riesgo de desarrollar una disminución cognitiva asociada con el envejecimiento (por ejemplo, el individuo puede tener 50 años o más, o puede haber sido diagnosticado con un trastorno asociado con el envejecimiento) y las capacidades cognitivas del individuo no cambian sustancialmente, es decir, no puede detectarse ninguna disminución cognitiva, después del tratamiento por los métodos descritos en comparación con antes del tratamiento con los métodos descritos.

Los métodos y composiciones en cuestión también se usan para reducir el deterioro cognitivo, motor, neuroinflamatorio u otro relacionado con la edad en un individuo que sufre un deterioro asociado con el envejecimiento. En otras palabras, la capacidad afectada se mejora en el individuo después del tratamiento por los métodos en cuestión. Por ejemplo, la capacidad cognitiva o motora en el individuo aumenta, por ejemplo, 2 veces o más, 5 veces o más, 10 veces o más, 15 veces o más, 20 veces o más, 30 veces o más, o 40 veces o más, incluyendo 50 veces o más, 60 veces o más, 70 veces o más, 80 veces o más, 90 veces o más, o 100 veces o más, después del tratamiento por los métodos en cuestión en

relación con la capacidad cognitiva o motora que se observa en el individuo antes del tratamiento por los métodos en cuestión.

En algunos casos, el tratamiento por los métodos y composiciones en cuestión restaura la capacidad cognitiva, motora u otra en el individuo que sufre de disminución cognitiva o motora asociada con el envejecimiento, por ejemplo, a su nivel cuando el individuo tenía aproximadamente 40 años o menos. En otras palabras, el deterioro cognitivo o motor se anula.

13. Métodos de Diagnóstico y Monitoreo para la Mejora

En algunos casos, entre la variedad de métodos para diagnosticar y monitorear la progresión de la enfermedad y la mejora de la enfermedad cognitiva, deterioro motor, enfermedad neurodegenerativa y/o enfermedad neuroinflamatoria, los siguientes tipos de evaluaciones se usan solos o en combinación con sujetos que padecen enfermedades neurodegenerativas, como se desee. Los siguientes tipos de métodos se presentan como ejemplos y no se limitan a los métodos citados. Se puede usar cualquier método conveniente para monitorear la enfermedad en la práctica de la invención, según se desee. Esos métodos también están contemplados por los métodos de la invención.

a. Cognición General

Las modalidades de los métodos de la invención comprenden además métodos para monitorear el efecto de un medicamento o tratamiento en un sujeto para tratar el deterioro cognitivo y/o demencia relacionada con la edad, el método comprende comparar la función cognitiva antes y después del tratamiento. Los expertos en la técnica reconocen que hay métodos bien conocidos de la evaluación de la función cognitiva. Por ejemplo, y no a modo de limitación, el método puede comprender la evaluación de la función cognitiva con base en el historial médico, historial familiar, exámenes físicos y neurológicos por parte de médicos que se especializan en demencia y función cognitiva, pruebas de laboratorio y evaluación neuropsicológica. Las modalidades adicionales que se contemplan en la invención incluyen: la evaluación de la conciencia, tal como el uso de la Escala de Coma de Glasgow (EMV); examen del estado mental, incluyendo la puntuación abreviada de prueba mental (AMTS) o mini examen de estado mental (MMSE) (Folstein et al., J. Psychiatr. Res 1975; 12: 1289-198); evaluación global de funciones superiores; estimación de la presión intracraneal tal como por fundoscopia. En una modalidad, el monitoreo del efecto sobre el deterioro cognitivo y/o demencia relacionada con la edad incluye una mejora de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 puntos usando la Subescala Cognitiva de la Escala de Evaluación de la Enfermedad de Alzheimer (ADAS-COG).

En una modalidad, los exámenes del sistema nervioso periférico se pueden

usar para evaluar la función cognitiva, incluyendo cualquiera de los siguientes: sentido del olfato, campos y agudeza visuales, movimientos oculares y pupilas (simpático y parasimpático), función sensorial de la cara, fuerza de los músculos faciales y de la cintura escapular, audición, sabor, reflejo y movimiento faríngeo, movimientos de la lengua, que se pueden analizar individualmente (por ejemplo, la agudeza visual se puede analizar por una gráfica de Snellen; pruebas de reflejos que usan martillos para reflejos que incluyen tendón del masetero, bíceps y tríceps, tendón de la rodilla, tirón de tobillo y plantar (es decir, signo de Babinski); fuerza muscular a menudo en la escala de MRC de 1 a 5; tono muscular y signos de rigidez.

b. Enfermedad de Parkinson

Las modalidades de los métodos de la invención comprenden además métodos para monitorear el efecto de un medicamento o tratamiento en un sujeto para tratar el deterioro motor, el método comprende comparar la función motora antes y después del tratamiento. Aquellos con experiencia en la técnica reconocen que existen métodos bien conocidos para evaluar la función motora. Por ejemplo, y no a modo de limitación, el método puede comprender una evaluación de la función motora basada en el historial médico, antecedentes familiares, exámenes físicos y neurológicos por parte de médicos que se especializan en neurodegeneración y deterioro motor, pruebas de laboratorio y evaluación neurodegenerativa. Las modalidades adicionales que se contemplan en la invención incluyen el empleo de las escalas de calificación que se analizan a continuación.

Se han usado varias escalas de calificación para evaluar la progresión de la PD. Las escalas más ampliamente usadas incluyen la escala de clasificación de la enfermedad de Parkinson unificada (UPDRS, que se introdujo en 1987) (J. Rehabil. Res. Dev., 2012 49(8): 1269-76), y la escala de Hoehn and Yahr (Neurology, 1967 17(5): 427-42). Las escalas adicionales incluyen la escala UPDRS actualizada de la Sociedad de Trastornos del Movimiento (MDS) (MDS-UPDRS), así como la escala de actividades diarias de Schwab and England (ADL).

La escala UPDRS evalúa 31 puntos que contribuyeron a tres subescalas: (1) mentalización, comportamiento y estado de ánimo; (2) actividades de la vida diaria; y (3) examen motor. La escala de Hoehn and Yahr clasifica la PD en cinco etapas con subetapas discretas: 0 - sin signos de enfermedad; 1 - síntomas en un solo lado; 1.5 - síntomas en un lado pero también involucra el cuello y columna vertebral; 2 - síntomas en ambos lados sin deterioro del equilibrio; 2.5 - síntomas leves en ambos lados, con recuperación cuando se realiza la prueba de 'tracción'; 3 - deterioro del equilibrio con enfermedad leve a moderada; 4 - discapacidad grave, pero capacidad para caminar o pararse sin ayuda; y 5 - necesita una silla de ruedas o en cama sin ayuda. La escala de Schwab and England clasifica la PD en

varios porcentajes (desde 100% - completamente independiente a 10% - dependiente total).

La función motora general se puede evaluar usando las escalas ampliamente usadas incluyendo la escala de función motora general (GMF). Esta prueba tres componentes: dependencia, dolor e inseguridad. (Aberg A.C., *et al.* (2003) *Disabil. Rehabil.* 2003 May 6; 25(9):462-72.). La función motora también se puede evaluar usando monitoreo en casa o sensores portátiles. Por ejemplo: la marcha (velocidad de locomoción, variabilidad, rigidez de la pierna) se puede detectar con un acelerómetro; postura (inclinación del tronco) por un giroscopio; movimiento de piernas por un acelerómetro; movimiento de la mano por un acelerómetro y giroscopio; temblor (amplitud, frecuencia, duración, asimetría) por un acelerómetro; caída por un acelerómetro; congelamiento de marcha por un acelerómetro; discinesia por un acelerómetro, giroscopio y sensores inerciales; bradicinesia (duración y frecuencia) por un acelerómetro más giroscopio y afasia (tono) con un micrófono. (Pastorino M, *et al.*, *Journal of Physics: Conference Series* 450 (2013) 012055).

c. Esclerosis Múltiple

Además de monitorear la mejora de los síntomas asociados con la cognición, la progresión o mejora de la neurodegeneración asociada con la esclerosis múltiple (MS) se puede monitorear usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. A modo de ejemplo, y no de limitación, el monitoreo se puede realizar a través de técnicas tales como: monitoreo del líquido cefalorraquídeo (CSF); imágenes de resonancia magnética (MRI) para detectar lesiones y el desarrollo de placas desmielinizantes; estudios potenciales evocados; y monitoreo de la marcha.

El análisis de CSF se puede realizar, por ejemplo, a través de una punción lumbar para obtener presión, apariencia y contenido de CSF. Los valores normales varían típicamente como sigue: presión (70 - 180 mm de H₂O); la apariencia es clara e incolora; proteína total (15 - 60 mg/100 ml); la IgG es 3-12% de la proteína total; la glucosa es 50 - 80 mg/100 ml; el recuento de células es 0-5 glóbulos blancos y ningún glóbulo rojo; cloruro (110 - 125 mEq/L). Los resultados anormales pueden indicar la presencia o progresión de la MS.

La MRI es otra técnica que se puede realizar para monitorear la progresión y la mejora de la enfermedad. Los criterios típicos para monitorear la MS con MRI incluyen la aparición de áreas irregulares de materia blanca anormal en el hemisferio cerebral y en áreas paraventriculares, lesiones presentes en el cerebelo y/o el tallo cerebral, así como en las regiones cervicales o torácicas de la médula espinal.

Los potenciales evocados se pueden usar para monitorear la progresión y la mejora de la MS en los sujetos. Los potenciales evocados miden la desaceleración de los impulsos eléctricos, tal como en la respuesta visual evocada (VER), respuestas evocadas auditivas del tronco cerebral (BAER) y respuestas evocadas somatosensoriales (SSER). Las

respuestas anormales ayudan a indicar que hay una disminución en la velocidad de conducción en las vías sensoriales centrales.

El monitoreo de la marcha también se puede usar para monitorear la progresión y mejora de la enfermedad en sujetos con MS. La MS a menudo se acompaña de un deterioro en la movilidad y una marcha anormal debido en parte a la fatiga. El monitoreo se puede realizar, por ejemplo, con el uso de dispositivos móviles de monitoreo usados por los sujetos. (Moon, Y., *et al.*, *Monitoring gait in multiple sclerosis with novel wearable motion sensors*, PLOS One, 12(2):e0171346 (2017)).

d. Huntington

Además de monitorear la mejora de los síntomas asociados con la cognición, la progresión o la mejora de la neurodegeneración asociada con la enfermedad de Huntington (HD) se puede monitorear usando técnicas bien conocidas por aquellos que tienen experiencia ordinaria en la técnica. A modo de ejemplo, y no de limitación, el monitoreo se puede realizar a través de técnicas tales como: función motora; comportamiento; evaluación funcional; e imágenes.

Los ejemplos de la función motora que se pueden monitorear como una indicación de la progresión o mejora de la enfermedad incluyen corea y distonía, rigidez, bradicinesia, disfunción oculomotora y cambios en la marcha/equilibrio. Las técnicas para realizar el monitoreo de estas métricas son bien conocidas por aquellos que tienen experiencia ordinaria en la técnica. (Ver Tang C, *et al.*, *Monitoring Huntington's disease progression through preclinical and early stages*, Neurodegener Dis Manag 2(4):421-35 (2012)).

Los efectos psiquiátricos de la HD presentan oportunidades para monitorear la progresión y la mejora de la enfermedad. Por ejemplo, se pueden realizar diagnósticos psiquiátricos para determinar si el sujeto sufre de depresión, irritabilidad, agitación, ansiedad, apatía y psicosis con paranoia. (*Id.*)

La evaluación funcional también se puede emplear para monitorear la progresión o la mejora de la enfermedad. Se han reportado técnicas de puntuación funcional total (*Id.*), y a menudo disminuye en un punto por año en algunos grupos de HD.

La MRI o PET también se pueden emplear para monitorear la progresión o la mejora de la enfermedad. Por ejemplo, hay una pérdida de neuronas de proyección estriatal en HD, y el cambio en el número de estas neuronas se puede monitorear en los sujetos. Las técnicas para determinar el cambio neuronal en sujetos con HD incluyen imágenes de unión del receptor de dopamina D₂. (*Id.*)

e. ALS

Además de monitorear la mejora de los síntomas asociados con la cognición, la progresión o mejora de la neurodegeneración asociada con la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) se puede monitorear usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. A modo de ejemplo, y no de limitación, el monitoreo se puede realizar a través de técnicas tales como: evaluación funcional; determinación de la fuerza muscular; medición de la función respiratoria; medición de la pérdida de la neurona motora inferior (LMN); y medición de la disfunción de la neurona motora superior (UMN).

La evaluación funcional se puede realizar usando una escala funcional bien conocida por aquellos que tienen experiencia ordinaria en la técnica, tal como la escala de clasificación funcional de ALS (ALSFRS-R), que evalúa los síntomas relacionados con la función bulbar, de extremidades y respiratoria. La tasa de cambio es útil para predecir la supervivencia, así como la progresión o mejora de la enfermedad. Otra medida incluye la evaluación combinada de la función y la supervivencia (CAFS), que clasifica los resultados clínicos de los sujetos combinando el tiempo de supervivencia con el cambio de ALSFRS-R. (Simon NG, *et al.*, *Quantifying Disease Progression in Amyotrophic Lateral Sclerosis*, Ann Neurol 76:643-57 (2014)).

La fuerza muscular se puede analizar y cuantificar mediante el uso de una puntuación compuesta de pruebas musculares manuales (MMT). Esto implica promediar las medidas adquiridas de varios grupos musculares usando la escala de calificación de fuerza muscular del Consejo de Investigación Médico (MRC). (*Id.*) La dinamometría manual (HHD) también se puede usar, entre otras técnicas. (*Id.*)

La función respiratoria se puede realizar usando unidades de espirometría portátiles, usadas para obtener la capacidad vital forzada (FVC) en valor basal para predecir la progresión o la mejora de la enfermedad. Además, la presión inspiratoria máxima, presión inspiratoria nasal de olfato (SNIP) y FVC de comer se pueden determinar y usar para monitorear la progresión/mejora de la enfermedad. (*Id.*)

La pérdida en las neuronas motoras inferiores es otra medida que se puede usar para monitorear la progresión de la enfermedad o la mejora de la ALS. El índice neurofisiológico se puede determinar midiendo potenciales de acción muscular compuesta (CMAP) en estudios de conducción nerviosa motora, cuyos parámetros incluyen la amplitud de CMAP y la frecuencia de onda F. (*Id.* y de Carvalho M, *et al.*, *Nerve conduction studies in amyotrophic lateral sclerosis*. Muscle Nerve 23:344–352, (2000)). También se pueden estimar números inferiores de unidades de neuronas motoras (MUNE). En MUNE, se estima el número de axones motores residuales que suministran un músculo a través de la estimación de la contribución de las unidades motoras individuales a la respuesta máxima de CMAP, y se usa para determinar la progresión o mejora de la enfermedad. (Simon NG, *et al.*, *supra*). Las técnicas adicionales para determinar la pérdida de LMN incluyen pruebas de excitabilidad

nerviosa, miografía de impedancia eléctrica y uso de ultrasonido muscular para detectar cambios en el espesor de los músculos. (*Id.*)

La disfunción de las neuronas motoras superiores es otra medida que se puede usar para monitorear la progresión o mejora de la enfermedad en ALS. Las técnicas para determinar la disfunción incluyen realizar escaneos de MRI o PET en el cerebro y médula espinal, estimulación magnética transcraneal; y determinar los niveles de biomarcadores en el líquido cefalorraquídeo (CSF).

f. Glaucoma

Además de monitorear la mejora de los síntomas asociados con la cognición, la progresión o mejora de la neurodegeneración asociada con el glaucoma se puede monitorear usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. A modo de ejemplo, y no de limitación, el monitoreo se puede realizar a través de técnicas tales como: determinación de la presión intraocular; evaluación del daño del disco óptico o de la cabeza del nervio óptico; pruebas de campo visual para la pérdida de visión periférica; e imágenes del disco óptico y retina para el análisis topográfico.

g. Parálisis Supranuclear Progresiva (PSP)

Además de monitorear la mejora de los síntomas asociados con la cognición, la progresión o mejora de la neurodegeneración asociada con la parálisis supranuclear progresiva (PSP) se puede monitorear usando técnicas bien conocidas por aquellos que tienen experiencia ordinaria en la técnica. A modo de ejemplo, y no de limitación, el monitoreo se puede realizar a través de técnicas tales como: evaluación funcional (actividades de la vida diaria, o ADL); evaluación motora; determinación de síntomas psiquiátricos; e imágenes de resonancia magnética (MRI) volumétrica y funcional.

El nivel de función de un sujeto en términos de independencia, dependencia parcial de otros o dependencia completa puede ser útil para determinar la progresión o mejora de la enfermedad. (Ver Duff, K, *et al.*, *Functional impairment in progressive supranuclear palsy*, *Neurology* 80:380-84, (2013)). La escala de clasificación de parálisis supranuclear progresiva (PSPRS) es una escala de clasificación que comprende veintiocho métricas en seis categorías: actividades diarias (por historial); comportamiento; bulbar, motor ocular, motor de extremidades y marcha/línea media. El resultado es una puntuación que varía desde 0 - 100. Seis puntos se califican de 0 - 2 y veintidós puntos se califican de 0 - 4 para un posible total de 100. Las puntuaciones de PSPRS son medidas prácticas y predictores sólidos de la supervivencia del paciente. También son sensibles a la progresión de la enfermedad y útiles para monitorear la progresión o mejora de la enfermedad. (Golbe LI, *et al.*, *A clinical rating scale for progressive supranuclear palsy*, *Brain* 130:1552-65, (2007)).

La sección de ADL de la UPDRS (Escala de clasificación de la enfermedad de Parkinson unificada) también se puede usar para cuantificar la actividad funcional en sujetos con PSP. (Duff K, *et al.*, *supra*). Del mismo modo, la puntuación de vida diaria de las actividades de Schwab & England (SE-ADL) se puede usar para evaluar la independencia. (*Id.*) Además, las secciones de función motora de la UPDRS son útiles como una medida confiable para evaluar la progresión de la enfermedad en pacientes con PSP. La sección motora puede contener, por ejemplo, 27 medidas diferentes para cuantificar la función motora en pacientes con PSP. Los ejemplos de estos incluyen temblor en reposo, rigidez, golpes de dedos, postura y marcha). La progresión o mejora de la enfermedad del sujeto también se puede evaluar realizando una evaluación neuropsicológica basal completada por personal médico capacitado, la evaluación usando el inventario neuropsiquiátrico (NPI) para determinar la frecuencia y gravedad de las anomalías de comportamiento (por ejemplo, delirios, alucinaciones, agitación, depresión, ansiedad, euforia, apatía, desinhibición, irritabilidad y comportamiento motor aberrante). (*Id.*)

La MRI funcional (fMRI) se puede emplear para monitorear la progresión y mejora de la enfermedad también. La fMRI es una técnica que usa MRI para medir los cambios en la actividad cerebral en ciertas regiones del cerebro, generalmente basada en el flujo sanguíneo a esas regiones. Se considera que el flujo sanguíneo se correlaciona con la activación de la región cerebral. Los pacientes con trastornos neurodegenerativos como PSP se pueden someter a pruebas físicas o mentales antes o durante el escaneo en un escáner de MRI. A modo de ejemplo, y no de limitación, las pruebas pueden ser un paradigma de control de fuerza bien establecido donde los pacientes, cuando se les pide que produzcan fuerza con la mano más afectada por la PSP, y contracción voluntaria máxima (MVC) se mide por fMRI inmediatamente después de que se realiza la prueba. Burciu, RG, *et al.*, *Distinct patterns of brain activity in progressive supranuclear palsy and Parkinson's disease*, *Mov. Disord.* 30(9):1248-58 (2015)).

La MRI volumétrica es una técnica donde los escáneres de MRI determinan las diferencias de volumen en el volumen cerebral regional. Esto se puede realizar, por ejemplo, contrastando diferentes trastornos, o determinando diferencias en el volumen de una región cerebral en un paciente con el tiempo. La MRI volumétrica se puede emplear para determinar la progresión o mejora de la enfermedad en trastornos neurodegenerativos como la PSP. La técnica es bien conocida por aquellos que tienen experiencia ordinaria en la técnica. (Messina D, *et al.*, *Patterns of brain atrophy in Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy*, *Parkinsonism and Related Disorders*, 17(3):172-76 (2011)). Los ejemplos de regiones cerebrales que se pueden medir incluyen, pero no se limitan a, volumen intracraneal, corteza cerebral, corteza cerebelosa, tálamo, caudado, putamen, pálido, hipocampo, amígdala, ventrículos laterales, tercer ventrículo, cuarto ventrículo y tallo cerebral.

h. Neurogénesis

La invención también contempla tratar o mejorar la neurogénesis en un sujeto con neurogénesis disminuida o deteriorada, que se puede manifestar, por ejemplo, a través de una función cognitiva o motora reducida, o por asociación con neuroinflamación. Una modalidad de la invención incluye administrar, a modo de ejemplo y no de limitación, un plasma de sangre, una fracción de plasma o una PPF al sujeto con neurogénesis reducida o deteriorada usando un régimen de tratamiento de dosificación pulsada.

Una modalidad de la invención también contempla determinar el nivel de neurogénesis antes, durante y/o después de la administración del plasma de sangre, fracción de plasma o PPF. Se han reportado técnicas no invasivas para evaluar la neurogénesis. (Tamura Y. et al., J. Neurosci. (2016) 36 (31): 8123-31). La tomografía por emisión de positrones (PET) usada con el trazador, [18F]FLT, en combinación con el inhibidor del transportador BBB probenecid, permite la acumulación del trazador en regiones neurogénicas del cerebro. Tal captura de imágenes permite una evaluación de la neurogénesis en pacientes que son tratados para la enfermedad neurodegenerativa.

i. Neuroinflamación

La invención también contempla tratar o mejorar la neuroinflamación en un sujeto con neuroinflamación aumentada, que se puede manifestar, por ejemplo, a través de una función cognitiva o motora reducida, o por asociación con neurogénesis o neurodegeneración reducida. Una modalidad de la invención incluye administrar, a modo de ejemplo y no de limitación, un plasma de sangre, una fracción de plasma o una PPF al sujeto con neuroinflamación usando un régimen de tratamiento de dosificación pulsada.

Una modalidad de la invención también contempla determinar el nivel de neuroinflamación antes, durante y/o después de la administración de plasma de sangre, fracción de plasma o PPF. Se han reportado técnicas no invasivas para evaluar la neuroinflamación, tal como tomografía por emisión de positrones TSPO (PET TSPO) usando ¹¹C-PK11195 y otros trazadores similares. (Ver Vivash L, et al., J. Nucl. Med. 2016, 57:165-68; y Janssen B, et al., Biochim. et Biophys. Acta, 2016, 425-41, incorporado en la presente como referencia). Las técnicas invasivas para evaluar la neuroinflamación incluyen la extracción de líquido cefalorraquídeo y la detección, por ejemplo, de niveles de expresión de marcadores neuroinflamatorios o factores tales como (pero no limitados a) prostaglandina E2, ciclooxigenasa-2, TNF-alfa, IL-6, IFN-gamma, IL-10, eotaxina, microglobulina beta-2, VEGF, factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales, quiotriosidasa-1, MMP-9, quimiocina 13 con motivo CXC, complejo del complemento terminal, proteína 1 tipo quitinasa-3 y osteopontina. (Ver Vinther-Jensen T, et al., Neruol Neurimmunol Neuroinflamm, 2016, 3(6):

e287; y Mishra *et al.*, J. Neuroinflamm., 2017, 14:251 incorporado en la presente como referencia).

14. Terapia de Combinación de Células Madre y Dosificación Pulsada

Una modalidad de la invención incluye el tratamiento de un sujeto diagnosticado con un deterioro cognitivo, función motora deteriorada, neuroinflamación o una disminución de la neurogénesis administrando al sujeto una cantidad efectiva de plasma de sangre o fracción de plasma en un sujeto que está siendo sometido, se someterá, o ha recibido terapia con células madre. Otra modalidad de la invención incluye administrar a un sujeto una cantidad efectiva de plasma de sangre o fracción de plasma donde el sujeto está siendo sometido, se someterá o ha recibido terapia con células madre, y en donde las células madre usadas en la terapia pueden ser células madre embrionarias, células madre no embrionarias, células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), células madre de sangre del cordón umbilical, células madre de líquido amniótico y similares.

La terapia con células madre y las técnicas para realizar tal terapia son conocidas por los expertos en la técnica. (Andres RH, *et al.*, Brain 2011, 134; 1777-89; Daadi MM, *et al.*, Cell Transplant 2013, 22(5):881-92; Horie N, *et al.*, Stem Cells 2011 29(2):doi: 10.1002/stem.584; Thomsen GM, *et al.*, Stem Cells 2018, doi: 10.1002/stem.2825; Solicitudes de Patente de Estados Unidos Nos. 09/973,198; 12/258,210; 12/596,884; y 13/290,439, que se incorporan todos en la presente como referencia). Otra modalidad de la invención incluye tratar un sujeto diagnosticado con lesión traumática de la médula espinal, apoplejía, enfermedad retinal, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, pérdida de audición, enfermedad cardíaca, artritis reumatoide, quemaduras graves o necesita un trasplante de médula ósea y que está siendo sometido, se someterá o ha recibido terapia con células madre, con una cantidad efectiva de plasma de sangre o fracción de plasma.

15. Métodos de Selección de Composiciones

También se proporcionan métodos para seleccionar composiciones para la actividad en el tratamiento del deterioro cognitivo o motor, reducción de la neuroinflamación o aumento de la neurogénesis. Tales métodos están contemplados por la invención y incluyen aquellos métodos descritos en los ejemplos experimentales a continuación. Las composiciones que se pueden seleccionar por modalidades de la invención incluyen: composiciones biológicas (por ejemplo, proteínas, combinaciones de proteínas, anticuerpos, antagonistas de moléculas pequeñas); fracciones de plasma u otras composiciones de sangre. Los resultados de los métodos de selección de composiciones incluyen, pero no se limitan a: resultados de inflamación/marcadores inflamatorios en el hipocampo (por ejemplo,

giro dentado) u otras regiones del SNC; resultados de la proliferación celular en el hipocampo u otras regiones del SNC; supervivencia celular en el hipocampo u otras regiones del SNC; el destino celular (por ejemplo, astrocitos, nuevas neuronas) de las células neuroprogenitoras proliferantes (NPC) en el hipocampo u otras regiones del SNC; y neurogénesis en el hipocampo u otras regiones del SNC.

Las modalidades adicionales de los métodos de selección de composiciones para la actividad en el tratamiento del deterioro cognitivo o motor, reducción de la neuroinflamación o aumento de la neurogénesis incluyen determinar los efectos agudos de las composiciones en la inflamación y proliferación del hipocampo, que comprende: 5-7 dosis diarias consecutivas de BrdU con 5-7 administraciones diarias consecutivas concurrentes de la composición que se selecciona o de control (dosificada por pulsos) en roedores u otro modelo animal. Hasta 10 días (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días) después de la conclusión de la dosificación pulsada de la composición que se selecciona, el número de células en el giro dentado se determina por tinción con BrdU y se determina el porcentaje de área que muestra la tinción con CD-68 (un indicador de la inflamación).

Otra modalidad de los métodos para seleccionar composiciones para la actividad en el tratamiento del deterioro cognitivo o motor, reducción de la neuroinflamación o aumento de la neurogénesis incluye administrar BrdU durante 5 días consecutivos (una vez al día) antes de comenzar un régimen de dosificación pulsada de 5-7 días de la composición que se selecciona o de control en roedores u otro modelo animal. Cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce semanas posteriores, la supervivencia de las células del hipocampo se determina como el número de células en el giro dentado que se tiñe con BrdU, la neurogénesis se determina como el número de células en el giro dentado teñido con doublecortin (DCX) y el destino celular de las células neuroprogenitoras que se convierten ya sea en astrocitos (asociados con el envejecimiento) o neuronas (no asociadas con el envejecimiento) se determina por la colocación de BrdU con marcadores GFAP o NeuN, respectivamente.

Otra modalidad de los métodos para seleccionar composiciones para la actividad en el tratamiento del deterioro cognitivo o motor, reducción de la neuroinflamación o aumento de la neurogénesis incluye administrar BrdU y la composición que se selecciona o de control concurrentemente (y diariamente) durante 5-7 días, y posteriormente determinar el grado de neurogénesis por tinción con DCX en el hipocampo o el destino celular de NPC proliferantes como se describió anteriormente.

Otra modalidad de los métodos para seleccionar composiciones para la actividad en el tratamiento del deterioro cognitivo o motor, reducción de la neuroinflamación o aumento de la neurogénesis incluye administrar un régimen de dosis pulsada de la composición que se selecciona o de control, y determinar la mejora de la función cognitiva o

motora en roedores u otro animal modelo como se describe en los ejemplos a continuación.

16. Reactivos, Dispositivos y Kits

También se proporcionan reactivos, dispositivos y kits de los mismos para practicar uno o más de los métodos descritos anteriormente. Los reactivos, dispositivos y kits de los mismos, en cuestión, pueden variar mucho.

Los reactivos y dispositivos de interés incluyen los mencionados anteriormente con respecto a los métodos de preparación de productos de sangre que comprenden plasma para transfusión a un sujeto que lo necesite, por ejemplo, anticoagulantes, crioconservadores, amortiguadores, soluciones isotónicas, etc.

Los kits también pueden comprender bolsas de recolección de sangre, tubos, agujas, tubos de centrifugación y similares. En todavía otras modalidades, los kits como se describen en la presente incluyen dos o más recipientes de producto de plasma de sangre tal como fracción de proteína de plasma, tales como tres o más, cuatro o más, cinco o más, incluyendo seis o más recipientes de producto de plasma de sangre. En algunos casos, el número de recipientes distintos de producto de plasma de sangre en el kit puede ser 9 o más, 12 o más, 15 o más, 18 o más, 21 o más, 24 o más 30 o más, incluidos 36 o más, por ejemplo, 48 o más. Cada recipiente puede tener asociada información de identificación que incluye varios datos sobre el producto de plasma de sangre contenido en este, tal información de identificación puede incluir una o más de la edad del donador del producto de plasma de sangre, detalles de procesamiento con respecto al producto de plasma de sangre, por ejemplo, si el producto de plasma se procesó para remover proteínas por encima de un peso molecular promedio (tal como se describe anteriormente), detalles del tipo de sangre, etc. En algunos casos, cada recipiente en el kit incluye información de identificación sobre el plasma de sangre contenido en este, y la información de identificación incluye información sobre la edad del donador del producto de plasma de sangre, por ejemplo, la información de identificación proporciona datos confirmados relacionados con la edad del donador del producto de plasma de sangre (donde tal información de identificación puede ser la edad del donador en el momento de la recolección). En algunos casos, cada recipiente del kit contiene un producto de plasma de sangre de un donador de sustancialmente la misma edad, es decir, todos los recipientes incluyen productos de donadores que tienen sustancialmente la misma, si no la misma, edad. Por sustancialmente la misma edad se entiende que los diversos donadores de los que se obtienen los productos de plasma de sangre de los kits difieren en cada uno, en algunos casos, en 5 años o menos, tal como 4 años o menos, por ejemplo, 3 años o menos, incluyendo 2 años o menos, tal como 1 año o menos, por ejemplo, 9 meses o menos, 6 meses o menos, 3 meses o menos, incluyendo 1 mes o menos. La información de identificación puede estar presente en cualquier componente conveniente del recipiente, tal

como una etiqueta, un chip RFID, etc. La información de identificación puede ser legible por humanos, legible por computadora, etc., según se desee. Los recipientes pueden tener cualquier configuración conveniente. Si bien el volumen de los recipientes puede variar, en algunos casos los volúmenes varían desde 10 ml a 5000 ml, tal como 25 ml a 2500 ml, por ejemplo, 50 ml a 1000 ml, incluyendo 100 ml a 500 ml. Los recipientes pueden ser rígidos o flexibles, y pueden fabricarse de cualquier material conveniente, por ejemplo, materiales poliméricos, incluyendo materiales plásticos de grado médico. En algunos casos, los recipientes tienen una configuración de bolsa o saco. Además de los recipientes, tales kits pueden incluir además dispositivos de administración, por ejemplo, como se describe anteriormente. Los componentes de tales kits se pueden proporcionar en cualquier envasado adecuado, por ejemplo, una caja o estructura análoga, configurada para contener los recipientes y otros componentes del kit.

Además de los componentes anteriores, los kits en cuestión incluirán además instrucciones para practicar los métodos en cuestión. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits en cuestión en una variedad de formas, una o más de las cuales pueden estar presentes en el kit. Una forma en la que estas instrucciones pueden estar presentes es como información impresa en un medio o sustrato adecuado, por ejemplo, un trozo o trozos de papel en los que se imprime la información, en el envasado del kit, en un prospecto, etc. Todavía otro medio sería un medio legible por computadora, por ejemplo, disquete, CD, unidad flash portátil, etc., en la que se haya grabado la información. Otro medio que puede estar presente es una dirección de sitio web que se puede usar a través de Internet para acceder a la información en un sitio removido. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

17. Ejercicio

El ejercicio puede ser caracterizado por la actividad aeróbica o anaeróbica, y puede involucrar una alta actividad de quema de calorías y moderada actividad de quema de calorías. El ejercicio puede incluir entrenamiento de fuerza (por ejemplo, entrenamiento con pesas o ejercicio isométrico). El ejercicio también puede incluir, por ejemplo, correr, andar en bicicleta, caminar, bailar, marchar, nadar, yoga, Tai Chi, ejercicios de equilibrio, flexiones de piernas, saltar la cuerda, surfear, remar, rotar o flexionar los brazos o las piernas, jardinería, limpieza, juegos activos tales como bolos, aeróbicos, pilates y artes marciales.

Un régimen de ejercicio puede incluir realizar un solo ejercicio a una frecuencia determinada, o una combinación de ejercicios a una frecuencia determinada. La frecuencia puede ser una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete veces por semana. La frecuencia puede variar de una semana a otra. El régimen de ejercicio puede tener el mismo nivel de intensidad y/o frecuencia que el sujeto practicó antes de la administración de las composiciones de la

invención. El régimen de ejercicio también puede estar a un nivel más alto de intensidad y/o frecuencia en comparación con los niveles que el sujeto practicó antes de la administración de las composiciones de la invención. El régimen de ejercicio puede haber sido sugerido o prescrito por un profesional de la salud o del estado físico, o el régimen de ejercicio puede haber sido iniciado por el sujeto mismo.

18. Ejemplos Experimentales

a. Ejemplo 1

Se administró plasma humano joven clarificado (plasma joven) o una PPF comercialmente disponible ("PPF1") a ratones inmunocomprometidos de edad avanzada (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm 1 Wj1/SzJ, cepa "NSG"). PPF1 es una PPF con aproximadamente 88% de albúmina humana normal (en relación con la proteína total), 12% de globulinas alfa y beta, y no más de 1% de globulina gamma según lo determinado por electroforesis. Excepto donde se indique, PPF1 se administró en los ejemplos en la presente *in vivo* usando una solución al 5% (p/v, 50 g/L). Todos los ratones se homogeneizaron a través de los grupos de tratamiento de acuerdo con 4 criterios diferentes: puntuación nestlet de jaula doméstica, peso corporal inicial, distancia de campo abierto recorrida, y % de tiempo al centro en campo abierto. Después de la determinación del grupo, los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal (IP) con BrdU(5-bromo-2'-desoxiuridina) formulada en PBS (solución salina amortiguada con fosfato) a una concentración final de 10 mg/ml dosificado a 150 mg/kg durante 5 días. Después de esto, los ratones se inyectaron por vía intravenosa (IV) 3 veces a la semana con 150 µl de PPF1 durante 4 semanas. Las pruebas de comportamiento ocurrieron en las semanas 5 y 6, donde los ratones recibieron 2 inyecciones por semana para evitar inyecciones durante los días de pruebas concurrentes. Los ratones se sacrificaron 24 horas después de la inyección IV final, para un total de 16 inyecciones durante un periodo de 6 semanas. Dos cohortes adicionales de ratones se inyectaron por vía intravenosa (IV) durante siete días consecutivos con 150 µl ya sea de PPF1 o solución salina (dosificado por pulsos). Las pruebas de comportamiento ocurrieron en las semanas 5 y 6 al mismo tiempo que el grupo de 3 veces por semana.

Los ensayos de comportamiento se analizaron usando el software CleverSys (Reston, VA). CleverSys TopScan V3.0 se utilizó para rastrear el comportamiento del ratón en el laberinto cero, laberinto de Barnes, campo abierto y laberinto en Y. Los laberintos de Barnes se construyeron por CleverSys. El medidor de fuerza de agarre se diseñó y produjo por Columbus Instruments (Columbus, OH). Las cámaras de laberinto en Y y campo abierto se construyeron de acuerdo con las especificaciones de San Diego Instruments (San Diego, CA). Se realizó un análisis histológico de secciones de hipocampo en el microscopio de imagen Leica (Buffalo Grove, IL) modelo DM5500B con cámara de microscopio de campo

claro/fluorescente DCF7000T.

Pruebas de Comportamiento: La Figura 1A muestra que los grupos que fueron dosificados por pulsos con PPF1 mostraron una tendencia hacia una mayor distancia recorrida en la prueba de campo abierto en comparación tanto con el grupo de control de solución salina como el grupo tratado tres veces a la semana con PPF1. Este resultado indica una tendencia hacia una mayor motilidad en el grupo dosificado por pulsos. La Figura 1B muestra que los grupos que se dosificaron por pulsos con PPF1 tendieron a aumentar el porcentaje de tiempo pasado en el centro del campo abierto en comparación tanto con el grupo de control de solución salina y el grupo tratado tres veces a la semana con PPF1. Este resultado indica una tendencia hacia una disminución de la ansiedad en el grupo dosificado por pulsos.

Peso Corporal: La Figura 2 muestra el efecto de PPF1 sobre el peso corporal. Ambos grupos tratados con PPF1 (vía dosificación pulsada o tres veces a la semana) no mostraron efectos perjudiciales de la inyección.

Histología: La Figura 3 reporta el número de células marcadas positivamente con DCX dentro de la capa de gránulos del dentado. Hubo un aumento significativo en la neurogénesis entre el grupo tratado con PPF1 por dosis pulsada en comparación con el grupo tratado tres a la semana y el grupo de solución salina. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m. $**P < 0.01$ ANOVA unidireccional con análisis post-hoc de comparación múltiple de Dunnett (n: solución salina = 8, PPF1 dosificado por pulsos = 10, PPF1 3x/semana = 10). La Figura 4 reporta el número de células marcadas positivamente con BrdU dentro de la capa de gránulos del giro dentado de tres grupos de ratones tratados por separado. Hubo un aumento significativo en la supervivencia celular entre el grupo tratado con PPF1 por dosis pulsada en comparación con el grupo tratado tres a la semana y el grupo de solución salina. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m. $****P < 0.0001$, $*P < 0.05$ ANOVA unidireccional con análisis post-hoc de comparación múltiple de Dunnett (n: solución salina = 8, PPF1 dosificado por pulsos = 10, PPF1 3x/semana = 10).

El análisis de las secciones del hipocampo se realizó en el microscopio de imagen Leica (Buffalo Grove, IL) modelo DM5500B con cámara de microscopio de campo claro/fluorescente DCF7000T. La tinción con Ki67 Abcam (ab15580) a 1:500 y el secundario es anti-conejo de cabra (Alex Fluor 555) (ab150090) a 1:300.

b. Ejemplo 2

Se administró plasma humano joven clarificado (YP), plasma humano viejo (OP) o una PPF comercialmente disponible ("PPF1") a ratones inmunocomprometidos de edad avanzada (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm 1 Wj1/SzJ, cepa "NSG"). Todos los ratones se homogeneizaron a través de los grupos de tratamiento de acuerdo con 4 criterios diferentes: puntuación nestlet de jaula doméstica, peso corporal inicial, distancia de campo abierto

recorrida, y % de tiempo al centro en campo abierto. Después de la determinación del grupo, los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal (IP) con BrdU formulado en PBS (solución salina amortiguada con fosfato) a una concentración final de 10 mg/ml dosificado a 150 mg/kg durante 5 días. Después de esto, los ratones se inyectaron por vía intravenosa (IV): 1) tres veces por semana durante 6 semanas ("3x/semana"); 2) Tres veces en una semana solamente ("3x"); 3) 7 días en una semana con 150 μ L ya sea de plasma humano joven clarificado o PPF1. A un grupo adicional de ratones se les administró solución salina pulsada durante 7 días IV. El grupo final de ratones recibió plasma humano envejecido ya sea 3 veces en una semana o 7 días en una semana. Todos los ratones se sacrificaron 6 semanas después del inicio del plasma joven o viejo, PPF1 o dosificación de vehículo.

Histología: La Figura 5 reporta el número de células marcadas positivamente con DCX dentro de la capa de gránulos del giro dentado de nueve grupos tratados por separado de ratones tratados ya sea con plasma humano joven (YP), plasma humano viejo (PO), PPF1, o solución salina. Los ratones tratados con PPF1, ya sea dosificados por pulsos o tratados tres a la semana, ambos mostraron aumento de la neurogénesis en comparación con los otros grupos. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m.; *P < 0.05, ANOVA con análisis post-hoc de Dunnett, tratamiento con PPF1 (pulsado o 3x/semana) y tratamiento con solución salina (n: solución salina = 4, PPF1 pulsada = 5, PPF1 3x/semana = 5, PPF1 3x = 4, YP pulsado = 6, YP 3x/semana = 6, YP 3x = 4, AP pulsado = 6, AP 3x = 6).

La Figura 6 reporta el número de células marcadas positivamente con BrdU dentro de la capa de gránulos del giro dentado de nueve grupos de ratones tratados por separado tratados ya sea con plasma humano joven (YP), plasma humano viejo (OP), PPF1 o solución salina. Los ratones tratados con PPF1 mostraron un aumento significativo en la supervivencia celular en comparación con los otros grupos, con los ratones tratados con PPF1 dosificada por pulsos mostrando una diferencia significativa mayor que los ratones tratados con PPF1 dosificada tres veces a la semana. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m.; **P < 0.01, *P < 0.05, ANOVA con análisis post-hoc de Dunnett, tratamiento con PPF1 (pulsado o 3x/semana) y tratamiento con solución salina (n: solución salina = 4, PPF1 pulsada = 5, PPF1 3x/semana = 5, PPF1 3x = 4, YP pulsado = 6, YP 3x/semana = 6, YP 3x = 4, AP pulsado = 6, AP 3x = 6).

c. Ejemplo 3

Se administró plasma humano joven clarificado (YP), plasma humano viejo (OP) o una PPF comercialmente disponible ("PPF1") a ratones inmunocomprometidos de edad avanzada (NOD.Cg-Prkdcid Il2rgtm 1 WJ1/SZJ, "NSG" cepa). Los ratones se trataron con 7 dosis intravenosas (IV) diarias en un régimen de 1 semana.

Todos los ratones se homogeneizaron a través de los grupos de tratamiento de

acuerdo con 4 criterios diferentes: puntuación nestlet de jaula doméstica, peso corporal inicial, distancia de campo abierto recorrida, y % de tiempo al centro en campo abierto. Después de la determinación del grupo, los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal (IP) con BrdU formulado en PBS (solución salina amortiguada con fosfato) a una concentración final de 10 mg/ml dosificado a 150 mg/kg durante 5 días. Todos los ratones se inyectaron por vía intravenosa (IV) durante siete días consecutivos (referida como dosificación pulsada) con 150 μ l de plasma humano joven o viejo, PPF1 o solución salina. Tres semanas después que se completara la dosificación pulsada, los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal (IP) con EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina) formulada en PBS (solución salina amortiguada con fosfato) a una concentración final de 10 mg/ml, dosificado a 30 mg/kg durante 5 días. El laberinto de Barnes se realizó durante la semana 8 (6 semanas después del final de la dosificación por pulsos).

Los ensayos de comportamiento se analizaron usando el software CleverSys (Reston, VA). CleverSys TopScan V3.0 se utilizó para rastrear el comportamiento del ratón en el laberinto de Barnes. El laberinto de Barnes se construyó por CleverSys. El análisis de las secciones del hipocampo se realizó en el microscopio de imagen Leica (Buffalo Grove, IL) modelo DM5500B con cámara de microscopio de campo claro/fluorescente DCF7000T.

Pruebas de Comportamiento: La Figura 7 reporta la latencia para encontrar el agujero objetivo por ensayo por día para cada grupo de tratamiento según lo probado por el laberinto de Barnes. Los ratones tratados con dosificación pulsada de PPF1 mostraron una disminución significativa en la latencia de prueba para varias sesiones de prueba individuales, lo que indica una capacidad cognitiva mejorada. * $P < 0.05$ media $\pm$ s.e.m.; prueba t no apareada (n: solución salina = 13, PPF1 = 13, AP = 14, YP = 14).

Histología: La Figura 8 reporta el número de células marcadas positivamente con DCX dentro de la capa de gránulos del giro dentado de cuatro grupos de ratones tratados por separado tratados ya sea con plasma humano joven (YP), plasma humano viejo (OP), PPF1 o solución salina. No hubo aumentos significativos en la neurogénesis en PPF1 dosificada por pulsos y plasma humano joven dosificado por pulsos en comparación con el tratamiento con solución salina. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m.; **** $P < 0.0001$, ** $P < 0.01$, ANOVA unidireccional con análisis post-hoc de comparación múltiple de Dunnett. (n: solución salina = 14, PPF1 = 14, AP = 14, YP = 15). Cuando este experimento fue realizado más largo y se realizó histología 12 semanas antes del régimen de dosificación pulsada inicial, la separación entre PPF1 y YP fue más pronunciada, con PPF1 que reporta un número mayor de células etiquetadas positivamente DCX.

La Figura 9 reporta el número de células marcadas con BrdU dentro de la capa de gránulos del giro dentado de ratones tratados con plasma humano joven (YP), plasma humano viejo (OP), PPF1 o solución salina. Hubo aumentos significativos en la supervivencia

celular en PPF1 dosificada por pulsos e YP dosificado por pulsos en comparación con el tratamiento con solución salina. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m.; ****P < 0.0001; media $\pm$ s.e.m.; ANOVA unidireccional con análisis post-hoc de comparación múltiple de Dunnett. (n: solución salina = 14, PPF1 = 14, AP = 14, YP = 15).

d. Ejemplo 4

Se administró una PPF comercialmente disponible ("PPF1") a ratones inmunocomprometidos de edad avanzada (NOD.Cg-Prkdcid II2rgtm 1 WJ1/SZJ, "NSG" cepa). Los ratones de doce meses de edad se trataron con una dosis intravenosa (IV) en la vena de la cola de 7 días en régimen de 1 semana. Después del tratamiento, se permitió que los ratones permanecieran en su entorno de jaula casera durante 4.5 semanas antes de las pruebas de comportamiento. Todas las inyecciones y pruebas de comportamiento tuvieron lugar durante el transcurso de 7 semanas para cada cohorte y se realizaron durante un periodo total de 9 semanas. Todos los ratones recibieron BrdU IP durante 5 días antes de la primera dosis. Los ratones se sacrificaron un día después de la conclusión de la última prueba de comportamiento.

Los ensayos de comportamiento se analizaron usando el software CleverSys (Reston, VA). CleverSys TopScan V3.0 se utilizó para rastrear el comportamiento del ratón en el laberinto en Y.

Pruebas de Comportamiento: La Figura 10 reporta el porcentaje del número total de entradas realizadas ya sea en el brazo familiar o nuevo de entradas totales realizadas en cada brazo por grupo de tratamiento en la prueba de laberinto en Y. Los ratones de doce meses de edad se trataron con dosis por pulsos con solución salina, PPF1 o PPF1 5x concentrada. Los ratones tratados con dosis por pulsos con PPF1 y PPF1 (5x) mostraron un aumento significativo en la entrada en el brazo nuevo en comparación con la cantidad de entradas en el brazo nuevo por los ratones tratados con solución salina, lo que indica una mejora en la cognición. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m. *P < 0.05, prueba t pareada.

La Figura 11 reporta la relación de episodios en el brazo nuevo versus familiar del laberinto en Y para cada grupo de tratamiento. Los ratones de doce meses de edad se trataron con dosis por pulsos con solución salina, PPF1 o PPF1 5x concentrada. Los ratones tratados con PPF1 y PPF1 (5x) con dosis por pulsos mostraron una tendencia al aumento de entradas en el brazo nuevo en comparación con los ratones tratados con solución salina. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m.

Histología: La Figura 12 reporta el número de células marcadas positivamente con BrdU dentro de todas las secciones del hipocampo. Los ratones dosificados por pulsos con PPF1 mostraron una tendencia a un aumento de supervivencia celular en comparación

con los ratones tratados con solución salina y PPF1 (5x). Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m.

La Figura 13 reporta el número de células marcadas positivamente con DCX dentro de todas las secciones del hipocampo. Los ratones dosificados por pulsos con PPF1 y PPF1 (5x) mostraron una tendencia a un aumento de neurogénesis en comparación con los ratones tratados con solución salina. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m.

e. Ejemplo 5

Se administró PPF comercialmente disponible ("PPF1") a ratones inmunocomprometidos de edad avanzada (10.5 meses de edad) (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1 Wj1/SzJ, cepa "NSG"). Todos los ratones se homogeneizaron a través de los grupos de tratamiento de acuerdo con cuatro criterios diferentes: puntuación nestlet de jaula doméstica, peso corporal inicial, distancia de campo abierto recorrida, y porcentaje de tiempo al centro en campo abierto. Después de la determinación del grupo, los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal (IP) con BrdU formulado en PBS (solución salina amortiguada con fosfato) a una concentración final de 10 mg/ml dosificado a 150 mg/kg durante 5 días. Después de esto, los ratones se inyectaron con PPF1 por vía intravenosa (IV) durante : 1) 5 días secuenciales [PPF1-5d] 2) 7 días secuenciales [PPF1-7d] 3) 5 días secuenciales con 5 días secuenciales adicionales de dosificación de refuerzo (B) que ocurre 6 semanas después de la terminación de la dosificación inicial [PPF1-5d-B] 4) 7 días secuenciales con 7 días secuenciales adicionales de dosificación de refuerzo (B) que ocurre 6 semanas después de la terminación de la dosificación inicial [PPF1-7d- SI]. Un grupo adicional se inyectó con solución salina durante 7 días secuenciales con 7 días secuenciales adicionales de dosificación que ocurre 6 semanas después de la terminación de la dosificación inicial [SAL-7d-B]. Cinco semanas después de la dosificación pulsada, los ratones se inyectaron IP con EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina) formulada en PBS a una concentración final de 10 mg/ml dosificado a 30 mg/kg durante 5 días. Todos los ratones se sacrificaron 12 semanas después de la terminación de la dosificación por pulsos de PPF1 o vehículo.

El análisis de las secciones del hipocampo se realizó en el microscopio de imagen Leica (Buffalo Grove, IL) modelo DM5500B con cámara de microscopio de campo claro/fluorescente DCF7000T. La Figura 14 reporta el número de células marcadas positivamente con DCX dentro de la capa de gránulos del giro dentado en PPF1 y animales tratados con solución salina. Estos resultados muestran que hay una mejora significativa en el grupo tratado durante 5 días secuenciales seguido de un refuerzo, que es comparable con el grupo tratado durante 7 días secuenciales. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m.; PPF1-7d, PPF1-5d-B vs. solución salina *P < 0.05, ANOVA con análisis post-hoc de Dunnett (n: solución salina = 5, PPF1-5d = 8, PPF1-7d = 7, PPF1-5d-B = 8, PPF1-7d-B = 7).

La Figura 15 reporta el número de células marcadas positivamente con BrdU dentro de la capa de gránulos del giro dentado en PPF1 y animales tratados con solución salina. Estos resultados muestran que, en términos de células proliferantes, el aumento de la inducción formal en el grupo tratado 5 días seguidos secuencialmente por un refuerzo, en comparación con los grupos tratados con 5 o 7 días secuenciales sin refuerzo. Además, el tratamiento con refuerzo aumenta significativamente la supervivencia celular general. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m. PPF1-5d-B, PPF1-7d-B vs. solución salina ***, $P < 0.001$, * $P < 0.05$, ANOVA con análisis post-hoc de Dunnett. PPF1-5d vs. PPF1-5d-B + $P < 0.05$, prueba T no apareada. (n: solución salina = 7, PPF1-5d = 8, PPF1-7d = 7, PPF1-5d-B = 8, PPF1-7d-B = 7).

La Figura 16 reporta el número de células marcadas positivamente con EdU dentro de la capa de gránulos del giro dentado en animales tratados con plasma joven, PPF1 y solución salina. Estos resultados muestran que los efectos observados con la dosis de refuerzo no se deben a un aumento en el número total de células proliferantes presentes, sino a un mecanismo de supervivencia mejorado provocado por la administración de refuerzo. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m.; (n: solución salina = 4, PPF1-5d = 7, PPF1-7d = 6, PPF1-5d-B = 7, PPF1-7d-B = 6).

f. Ejemplo 6

Se administró PPF comercialmente disponible ("PPF1") a ratones inmunocomprometidos adultos (3 y 6 meses) (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm 1 Wj1/SzJ, cepa "NSG"). Todos los ratones se homogeneizaron a través de los grupos de tratamiento de acuerdo con cuatro criterios diferentes: puntuación nestlet de jaula doméstica, peso corporal inicial, distancia de campo abierto recorrida, y % de tiempo al centro en campo abierto. Después de la determinación del grupo, los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal (IP) con BrdU formulado en PBS (solución salina amortiguada con fosfato) a una concentración final de 10 mg/ml dosificado a 150 mg/kg durante 5 días. Después de esto, los ratones se inyectaron con solución salina o PPF1 por vía intravenosa (IV) durante 7 días secuenciales (dosificación por pulsos). A un subconjunto de ratones de ambos tratamientos con solución salina y PPF1 se les proporcionaron ruedas para correr en su jaula doméstica. Los ratones se sacrificaron 3 días, 10 días o 42 días después de la terminación de la dosificación por pulsos.

La Figura 17 reporta el número de células marcadas positivamente con DCX dentro de la capa de gránulos del giro dentado en animales NSG de 3 meses de edad tratados con PPF1 o con tratamiento con solución salina con o sin ruedas para correr. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m.; rueda para correr + PPF1 42d post, rueda para correr 42d post vs. solución salina 42d post **** $P < 0.0001$, * $P < 0.05$, ANOVA con análisis post-hoc de Dunnett. Rueda para correr vs. PPF1 42d post +++ $P < 0.001$, prueba t no apareada. (n:

solución salina 3d post = 8, PPF1 3d post = 8, PPF1 10d post = 7, vehículo 42d post = 8, PPF1 42d post = 8, rueda para correr 42d post = 8, rueda para correr + PPF1 42d post = 8). La Figura 17 también reporta el número de células marcadas positivamente con DCX dentro de la capa de gránulos del giro dentado en animales NSG de 6 meses de edad tratados con PPF1 o con tratamiento con solución salina con o sin ruedas para correr. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m.; rueda para correr + PPF1 42d post, rueda para correr 42d post vs. solución salina 42d ****P < 0.0001, **P < 0.01, ANOVA con análisis post-hoc de Dunnett. Rueda para correr vs. PPF1 42d post +++ P < 0.001, prueba *t* no apareada. PPF1 42d post vs. solución salina 42d post + P < 0.05, prueba *t* no apareada. (n: solución salina 3d post = 7, PPF1 3d post = 8, PPF1 10d post = 6, solución salina 42d post = 8, PPF1 42d post = 6, rueda para correr 42d post = 8, rueda para correr + PPF1 42d post = 9).

La Figura 18 reporta el número de células marcadas positivamente con Ki67 dentro de la capa de gránulos del giro dentado en animales NSG de 3 meses de edad tratados con PPF1 o con tratamiento con solución salina con o sin ruedas para correr. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m.; rueda para correr + PPF1 42d vs. solución salina 42d post ***P < 0.001, ANOVA con análisis post-hoc de Dunnett. (n: solución salina 3d post = 6, PPF1 3d post = 6, PPF1 10d post = 7, solución salina 42d post = 8, PPF1 42d post = 8, rueda para correr 42d post = 8, rueda para correr + PPF1 42d post = 8).

La Figura 18 también reporta el número de células marcadas positivamente con Ki67 dentro de la capa de gránulos del giro dentado en animales NSG de 6 meses de edad tratados con PPF1 o con tratamiento con solución salina con o sin ruedas para correr. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m.; rueda para correr + PPF1 42d post, rueda para correr 42d post vs. solución salina 42d ***P < 0.001, *P < 0.05, ANOVA con análisis post-hoc de Dunnett (n: solución salina 3d post = 7, PPF1 3d post = 7, PPF1 10d post = 8, solución salina 42d post = 8, PPF1 42d post = 7, rueda para correr 42d post = 7, rueda para correr + PPF1 42d post = 9).

La Figura 19 reporta el número de células marcadas positivamente con BrdU dentro de la capa de gránulos del giro dentado en animales NSG de 3 y 6 meses de edad tratados con PPF1 o con tratamiento con solución salina con o sin ruedas para correr. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m.; rueda para correr + PPF1 42d vs. vehículo 42d post ***P < 0.001, ANOVA con análisis post-hoc de Dunnett. (****P < 0.0001; ***P < 0.001; **P < 0.01; *P < 0.05, ANOVA con análisis post-hoc de Dunnett).

Estos resultados muestran que hay una mejora significativa en la neurogénesis con PPF1 y rueda para correr en comparación con el vehículo 6 semanas después de la dosificación en ratones NSG de 3 meses de edad. Además, hay una mejora significativa en la neurogénesis con PPF1 y la rueda para correr en comparación con la rueda para correr sola, 6 semanas después de la dosificación en ratones NSG de 3 meses. También hay una mejora

significativa en la neurogénesis con PPF1 y rueda para correr en comparación con el vehículo, 6 semanas después de la administración en ratones NSG de 6 meses de edad. Los resultados también muestran una mejora significativa en la neurogénesis con PPF1 y la rueda para correr en comparación con la rueda para correr sola, 6 semanas después de la dosificación en ratones GSN de 6 meses de edad. Además, hay una mejora significativa en la proliferación de células progenitoras con PPF1 y rueda para correr en comparación con el vehículo, 6 semanas después de la dosificación en ratones NSG de 3 meses de edad y 6 meses de edad.

Estos hallazgos en ratones NSG adultos a los 6 meses de edad indican posibles efectos sinérgicos con el ejercicio y la administración de PPF1, lo que resulta en una mejora significativa de la neurogénesis en comparación con el ejercicio o tratamientos con PPF1 por separado. Esto respalda la posible utilidad del tratamiento con PPF1 junto con un régimen de ejercicio en entornos clínicos. Además, estos datos demuestran que existe una capacidad significativa de neurogénesis en el cerebro a la que se puede acceder a través de múltiples mecanismos independientes o superpuestos.

g. Ejemplo 7

Se administraron PPF1 o solución salina de control a dos grupos de tratamiento de ratones inmunocomprometidos de 11 meses de edad (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1 Wj1/SzJ, cepa "NSG"). Todos los ratones recibieron inyecciones IV de 150 μ L de PPF1 o solución salina por dosis durante siete días consecutivos. Se colocó una rueda para correr (MedAssociates) en las jaulas de los ratones designados como corredores ($n = 8$, $n = 8$ para PPF1 y solución salina) a partir de la semana 7 del estudio. El número de revoluciones de la rueda se registró durante 5 días consecutivos, día y noche.

La Figura 20 reporta el número de revoluciones de las ruedas durante periodos de tiempo determinados, con áreas sombreadas que indican un ciclo oscuro. Se utilizó una prueba t no apareada para evaluar la significancia estadística de la carrera total para los grupos tratados y no tratados en los ciclos de luz y oscuridad. Los perfiles de expresión rítmica se extrajeron y caracterizaron usando análisis de dominio de tiempo y frecuencia para una serie de puntos de 13 tiempos, por separado para cada ratón de los grupos tratados y no tratados con cinco series de puntos de 13 tiempos por ratón. Periodo, fase y amplitud fueron los parámetros definidos para cada ritmo y se compararon entre los dos grupos por la prueba t bilateral no apareada. Los ratones tratados con PPF1 corrieron significativamente más que los animales no tratados, un indicador de actividad motora mejorada. Los ratones fueron sometidos a una prueba de placa caliente para controlar la sensación de dolor normal en sus patas. La pérdida de sensibilidad podría haber afectado las lecturas conductuales anteriores. Las pruebas de placa caliente condujeron a un ligero aumento en la actividad después de regresar al entorno de la jaula de la rueda para correr, como lo demuestra el aumento en las

revoluciones de la rueda indicado en el segmento de cuadros de la Figura 20.

h. Ejemplo 8

Se administró albúmina humana recombinante ("rhAlbúmina", Albumedix, Ltd, Nottingham, Reino Unido), plasma humano joven clarificado ("YP") o solución salina de control a ratones inmunocomprometidos de 10.5 meses de edad (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm 1 Wj1/SzJ, cepa "NSG"). Todos los animales recibieron 50 mg/kg de BrdU IP en la semana 1 antes de la dosificación por pulsos de 7 días. rhAlbúmina se diluyó a 50 mg/ml en agua para preparaciones inyectables (WFI, solución salina al 0.9%). Todos los ratones recibieron inyecciones IV de 150 μ L de rhAlbúmina, YP o solución salina por dosis durante 7 días consecutivos. Los ratones se sacrificaron 6 semanas después del último día de tratamiento.

La Figura 21A muestra la cantidad de supervivencia celular en todos los 3 grupos de tratamiento según lo determinado por el número de células marcadas con BrdU en el giro dentado ("DG"). El plasma joven aumentó significativamente la supervivencia celular en comparación con la solución salina y rhAlbúmina, mientras que la rhAlbúmina no tuvo un efecto significativo sobre la supervivencia celular. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m. (**P < 0.001 por prueba *t* no apareada).

La Figura 21B muestra la cantidad de tinción de DCX en todos los 3 grupos de tratamiento según lo determinado por el número de células positivas para DCX en el giro dentado ("DG"). El plasma joven aumentó significativamente la neurogénesis en comparación con la solución salina y rhAlbúmina, mientras que la rhAlbúmina se asoció con una disminución de la neurogénesis en comparación con la solución salina de control. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m. (**P < 0.01; ***P < 0.001 por prueba *t* no apareada).

i. Ejemplo 9

Las células neuronales mixtas disociadas derivadas de la corteza embrionaria de ratón se colocaron en placas y se cultivaron en una placa de matriz de electrodos múltiples de 48 cavidades (Axion Biosystems). Cada cavidad contiene 16 electrodos que están en contacto físico con las células neuronales enchapadas y miden cambios sutiles en las propiedades de la membrana celular. Esta configuración permite evaluar una variedad de parámetros diferentes para obtener información sobre la actividad de disparo neuronal y el comportamiento de disparo a nivel de electrodo único, así como información sobre el alcance de la conectividad neuronal al evaluar la sincronía de las propiedades de disparo neuronal a través de múltiples electrodos dentro de una cavidad.

Los cultivos neuronales se mantuvieron en la presencia de las condiciones de tratamiento desde el día 1 en adelante. Las condiciones de tratamiento comprendieron medio neurobasal complementado con B27 y factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) que

contenían 10% (v/v): albúmina humana recombinante (“rhAlbúmina”, Albumedix, Ltd, Nottingham, Reino Unido); PPF1; o HAS1. El vehículo constituyó el control. La actividad neuronal se midió en el día 7, día 12, día 16 y día 21.

Las Figuras 22A a 22C muestran que aunque el tratamiento con ambos, PPF1 y HAS1, promueve la actividad de picos neuronales (Figura 22A, dos trenes de pico MEA, y Figura 22B, cuantificación de actividad de pico neuronal) cuando se compara con el control o tratamiento con rhAlbumina, únicamente el tratamiento con PPF1 aumenta el número de ráfagas de redes neuronales durante la maduración de los cultivos neuronales (Figura 22C). HAS1 es una HAS comercialmente disponible con más de 95% de albúmina humana (en relación con la proteína total) en una solución al 5% (p/v, 50 g/L), preparada por un método de fraccionamiento de alcohol frío y derivado de plasma humano combinado de los donadores. Tanto PPF1 como HAS1 vienen en una solución al 5% (p/v, 50 g/l) y se diluyeron 1:10 en medio neurobasal más suplementos de B27. Este efecto del PPF1 en actividad de la red neuronal persiste a través de 21 días en cultivo. Esto indica que PPF1 está asociado con la promoción de la maduración de la red neuronal. Los datos mostrados son la media de n=25-45 placas de 3 experimentos independientes $\pm$ SEM, prueba *t* de estudiante no apareada * $p < 0.05$, # $p < 0.01$.

j. Ejemplo 10

Se administró plasma humano viejo clarificado (OP) o solución salina estéril a ratones inmunocomprometidos de 8 semanas de edad (jóvenes) (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1 Wjl/SzJ, cepa “NSG”). En cada experimento, los ratones se homogeneizaron en grupos de tratamiento por peso. Todos los ratones se inyectaron IP en 5 días consecutivos con 150 mg/kg de BrdU en PBS estéril. La inyección de BrdU fue seguida por la administración IV de plasma viejo en diferentes paradigmas de tratamiento a 150 μ L por dosis. Todos los paradigmas se resumen en la Figura 23.

El *Paradigma 1* involucra dos inyecciones semanales para un total de 10 inyecciones durante 5 semanas. El análisis histológico se realizó 48 h después de la última dosis de plasma. El *Paradigma 2* involucra inyecciones tres veces a la semana para un total de 10 inyecciones durante 4 semanas, con análisis histológico de 48 horas después de la última dosis. En el *Paradigma 3* se inyectaron ratones diariamente durante 7 días consecutivos y se analizaron histológicamente 48 h después de la última dosis. En el *Paradigma 4*, los ratones se inyectaron diariamente durante 7 días consecutivos y se analizaron 21 días después de la última dosis. Se analizaron los cerebros de ratones tratados con plasma viejo para detectar un marcador de inflamación endotelial, VCAM-1 en el hipocampo, y para el número de neuronas recién nacidas marcadas por las células positivas para doublecortin (DCX) en el giro dentado. VCAM-1 fue fotografiado en un Hamamatsu NanoZoomer HT

(Hamamatsu) después de la inmunohistoquímica en secciones flotantes libres de 30 μm y se analizó usando el software Image Pro (Media Cybernetics). Las células positivas para DCX en el giro dentado se contaron en vivo en un microscopio de campo amplio Leica (Leica).

El análisis del porcentaje de área positiva para VCAM-1 en el hipocampo (Figuras 24A a 24D) muestra que la inflamación endotelial aumenta significativamente 48 horas después de la última administración de plasma, con una tendencia a dosificación dos veces a la semana (Figura 24A) y aumentos significativos después de tres veces a la semana (Figura 24B) y dosificación pulsada (Figura 24C). Los niveles de VCAM-1 ya no fueron significativamente mejorados 21 días después que se administró la última dosis de plasma (Figura 24D).

Los efectos sobre la doublecortin solo se pudieron observar después de un periodo de tiempo de 3 a 4 semanas, por lo que se analizó el número de células positivas para DCX en el giro dentado en los paradigmas 1, 2 y 4. El análisis reveló que no había ningún efecto del plasma viejo en la neurogénesis con paradigmas de dosificación dos veces a la semana (Figura 25A) o tres veces a la semana (Figura 25B), sin embargo, la dosificación pulsada durante 7 días consecutivos (Figura 25C) dio como resultado una disminución significativa en el número de células positivas para DCX. Estos datos sugieren que sólo la dosificación por pulsos de plasma humano viejo tuvo efectos significativos sobre la neurogénesis.

k. Ejemplo 11

Se analizaron ratones NSG de ocho semanas de edad tratados durante 7 días consecutivos con plasma humano viejo (origen de 65-68 años de edad) usando el laberinto modificado de Barnes 4 semanas después de la última inyección de plasma viejo. La Figura 26 muestra el transcurso de tiempo de latencia de escape del laberinto de Barnes y reporta el tiempo para alcanzar y entrar en el agujero de escape para ratones NSG tratados con plasma viejo y solución salina. No hubo diferencias significativas en la latencia de escape entre los grupos, pero en el día 4 los ratones tratados con plasma viejo se desempeñaron menos bien que los controles con solución salina. Estos datos indican aprendizaje y memoria reducidos en una tarea de memoria espacial asociada con la función del hipocampo. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m. ANOVA bidireccional, prueba post hoc de Sidak).

La Figura 27 representa la latencia de escape promedio en los últimos tres ensayos de laberinto de Barnes en el día 4. Los ratones tratados con plasma viejo mostraron una tendencia hacia una mayor latencia de escape indicativa de la función de memoria deteriorada. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m. (prueba *t* no apareada).

La Figura 28 representa la diferencia en la latencia de escape entre las pruebas 1 y 3 de laberinto de Barnes y muestra que estas pruebas se pueden usar como una medida

de aprendizaje en un solo día. Los ratones tratados con plasma viejo tienen una diferencia significativamente menor en la latencia de escape entre estos ensayos que revelan una capacidad de aprendizaje disminuida. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m. (*P < 0.05 por prueba *t* no apareada).

La Figura 29 reporta los resultados de qPCR que se utilizó para cuantificar los niveles de ARNm de diferentes marcadores asociados con la neurogénesis y la función sináptica. Los niveles de expresión relativa de doublecortin (DCX), un marcador para las neuronas recién nacidas, disminuyeron de acuerdo con el análisis histológico del mismo marcador. Además, hubo tendencias hacia niveles disminuidos de vglut1 (transportador de glutamato vesicular 1), un marcador de sinapsis glutamatérgica, marcador sináptico syn1 (sinapsina 1), tuj1 (tubulina beta III) y bdnf (factor neurotrófico derivado del cerebro). Estas disminuciones indican una sináptica alterada en general y de la red neuronal en el cerebro de ratones inyectados con plasma viejo. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m. (*P < 0.05 por prueba *t* no apareada).

I. Ejemplo 12

Ratones inmunocomprometidos jóvenes (de 8 semanas de edad) (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm 1 Wjl/SzJ, cepa “NSG”) se homogeneizaron en todos los grupos de tratamiento por peso. Los animales se inyectaron por vía subcutánea (*sc*) con 35 mg/kg de ácido kaínico (Sigma) en solución salina estéril o solución salina de control. La administración periférica de ácido kaínico dio como resultado una actividad convulsiva aguda, inflamación en el hipocampo y en un subconjunto de ratones también en la pérdida neuronal en la región CA1 del hipocampo. Dos horas después de la inyección de ácido kaínico, los ratones se dosificaron por vía intravenosa con 150 μ l de PPF1 o solución salina. La administración de PPF1 o solución salina se continuó diariamente durante un total de 5 días (Figura 30). El tejido se recolectó para el análisis el día 6. Los cambios inflamatorios en la región CA1 del hipocampo se analizaron después de la tinción inmunofluorescente para la activación microglial (CD68) y la activación de astrocitos (GFAP). Las secciones se fotografiaron en un Hamamatsu NanoZoomer HT (Hamamatsu) después de la inmunohistoquímica en secciones flotantes libres de 30 μ m y se analizaron con el software Image Pro (Media Cybernetics).

El análisis del porcentaje de área positiva para CD68 en la región CA1 del hipocampo muestra que la administración de ácido kaínico produce un aumento de la inmunorreactividad de CD68, lo que sugiere una mayor activación microglial (Figura 31A). Cinco días de administración de PPF1 dieron como resultado una disminución significativa del porcentaje de área positiva para CD68 y, por lo tanto, una reducción en la activación microglial. Del mismo modo, el análisis del porcentaje de área positiva para GFAP (Figura 31B) muestra un aumento significativo después de la administración de ácido kaínico, que se reduce

significativamente después de la dosificación de PPF1. Los datos sugieren que PPF1 tiene un efecto antiinflamatorio agudo en los cerebros de ratones a los que se les ha administrado ácido kaínico. * $P < 0.05$ ANOVA unidireccional con análisis post-hoc de comparación múltiple de Dunnett.

m. Ejemplo 13

Ratones GSN a los 6 meses de edad se inyectaron diariamente durante una semana (7 días), IV, ya sea con PPF1 o solución salina de control a una dosis de 150 μ l (10 mg/ml). Todos los ratones se trataron con BrdU 50 mg/kg de BrdU IP una vez al día en los mismos días que recibieron PPF1 o solución salina de control. Los ratones luego se dividieron en dos cohortes. La primera cohorte se sacrificó un día inmediatamente después de los 7 días de tratamiento concurrente con BrdU y PPF1. La segunda cohorte se sacrificó 7 días después y recibió 7 días adicionales de administración diaria de BrdU.

La Figura 32 muestra el número de células teñidas en el giro dentado de las cohortes 1 y 2 (izquierda a derecha). Ambas cohortes exhibieron un aumento de proliferación celular en el giro dentado en comparación con la solución salina de control. (** $P < 0.001$ prueba t no apareada).

n. Ejemplo 14

Ratones NSG a los 3 o 6 meses de edad se inyectaron diariamente durante una semana (7 días), IV, ya sea con PPF1 o vehículo salino. Los ratones se sacrificaron posteriormente 3, 10 o 42 días después de que se administraron las 7 dosis diarias. Los cerebros se tiñeron con Ki67, un marcador nuclear solo presente en las células proliferantes que marca las células madre neurales y las células progenitoras en la lámina del giro dentado. La Figura 33 muestra que los ratones de 6 meses de edad mostraron un aumento en las células progenitoras totales (positivas para Ki67 o "Ki67+") en el giro dentado a los 10 días después de la terminación del régimen de dosificación por pulsos de 7 días consecutivos usando PPF1. La Figura 34 muestra la tinción (áreas brillantes) de Ki67 en el giro dentado a los 10 días en ratones NSG después de la terminación del régimen de dosificación por pulsos de 7 días consecutivos usando PPF1. Esto muestra que un posible mecanismo de acción para PPF1 en el aumento de la supervivencia celular total y la neurogénesis a los 42 días después del cese de la dosificación podría ser debido a un aumento en el total de células progenitoras (células madre neurales).

o. Ejemplo 15

Se administró PPF comercialmente disponible ("PPF1") o solución salina de control a dos poblaciones diferentes de ratones inmunocomprometidos de 6 y 12 meses de

edad (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm 1 Wj1/SzJ, cepa “NSG”). Todos los animales recibieron 50 mg/kg de BrdU en la semana 1 antes de la dosificación por pulsos de 7 días del agente de prueba. Todos los ratones recibieron inyecciones IV de 150 μ L de PPF1 o solución salina por dosis durante 7 días consecutivos. Se utilizó una cohorte de cada grupo de tratamiento para investigar la proliferación y se sacrificaron 6 semanas después de la última dosis administrada.

La Figura 35A reporta que la cohorte de ratones de 6 meses de edad tratados con PPF1 exhibió un aumento significativo en el número de células progenitoras diferenciadas en neuronas (NeuN+) en comparación con la solución salina de control, y una reducción en el número de células progenitoras diferenciadas en astrocitos (GFAP+) en comparación con el control. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m. (**P < 0.01 por prueba *t* no apareada).

La Figura 35B reporta que la cohorte de ratones de 12 meses de edad tratados con PPF1 exhibió un aumento significativo en el número de células progenitoras diferenciadas en neuronas (NeuN+) en comparación con la solución salina de control, y una diferencia estadísticamente insignificante en el número de células progenitoras diferenciadas en astrocitos en comparación con el control. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m. (**P < 0.01 por prueba *t* no apareada).

p. Ejemplo 16

Se administró plasma humano viejo clarificado (plasma viejo) o solución salina estéril a ratones de 3 meses de edad (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm 1 Wj1/SzJ, cepa “NSG”). En cada experimento, los ratones se homogeneizaron en grupos de tratamiento en peso. Todos los ratones se inyectaron IP en 5 días consecutivos con 150 mg/kg de BrdU en solución salina estéril. La inyección de BrdU fue seguida por la administración IV de plasma viejo o solución salina estéril a 150 μ L por dosis diaria durante 7 días consecutivos y se analizó histológicamente 4 semanas después de la última dosis.

Las Figuras 36A y 36B representan el destino celular de las células progenitoras neurales proliferativas marcadas con BrdU 4 semanas después de la última dosis. En ratones inyectados con plasma viejo, las células marcadas con BrdU sobrevivientes se diferencian significativamente menos en neuronas que en astrocitos. Esto indica que el plasma humano viejo cambia el destino celular de las células progenitoras neurales en ratones jóvenes hacia el linaje de astrocitos (Figura 36B) y afecta negativamente el número de neuronas recién nacidas en el giro dentado (Figura 36A) (n = 12 por grupo). Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m. (***P < 0.001; ****P < 0.0001 por prueba *t* no apareada).

q. Ejemplo 17

Activación cortical. Los ratones C57BL/6 envejecidos (18 meses de edad) recibieron inyecciones intravenosas (IV) diarias de 150 μ L de PPF1 o solución salina estéril al

0.9% durante 7 días. Dos horas y media (2.5) después de la última administración del agente de prueba, los ratones se sacrificaron por perfusión transcardial con solución salina al 0.9% seguido de formaldehído al 4% bajo anestesia profunda con ketamina y xilazina. Los cerebros se diseccionaron, se fijaron posteriormente y luego se procesaron con el procedimiento iDisco para visualizar células positivas para cFos a través de Microscopia Fluorescente mediante Hojas de Luz (LSFM) a una resolución de voxel de 2 x 2 x 3 micrómetros. Los cerebros fotografiados se alinearon como volúmenes 3D y se detectaron computacionalmente células positivas para cFos activadas. La comparación estadística entre grupos se realizó por regresión binomial negativa corregida para comparaciones múltiples por tasa de descubrimiento falso. (* indica un valor q menor de 0.05).

El análisis de los cerebros de ratón mostró un aumento global en el número de células positivas para cFos en el volumen de cerebro completo, así como en la corteza e isocorteza en ratones de 18 meses de edad tratados con PPF1 (Figuras 37A a 37C). Usando la regresión binomial corregida para la comparación múltiple, las diferencias de estos aumentos en los números positivos totales de cFos no alcanzaron significación. Sin embargo, el análisis de áreas corticales más definidas, tal como la corteza frontal, orbital, infralímbica y preliminar, mostró una elevación significativa en el número de células positivas para cFos (Figuras 38A a 38D) indicativo de una mayor actividad neuronal. La actividad mejorada en el área de la corteza prefrontal se correlaciona con el rendimiento cognitivo mejorado, lo que sugiere que el tratamiento con PPF1 produce mejoras cognitivas en ratones C57BL/6 de edad avanzada. También se encontraron aumentos significativos similares en los números de células positivas para cFos en el núcleo olfativo auxiliar y el tubérculo olfativo (Figuras 39A y 39B). Estas áreas están asociadas con el procesamiento de la información olfativa y la mejora en la actividad sugiere una mayor función olfatoria. La visualización basada en estadísticas de Voxel de la activación de cFos en rojo mostró el aumento de la señal de cFos en la corteza de los ratones tratados con PPF1 (Figura 40).

r. Ejemplo 18

Se administró PPF comercialmente disponible ("PPF1") o solución salina de control a ratones tipo salvaje (WT) de 22 meses de edad (C57BL/6J, "WT", Código de cepa 0664, Jackson Labs, Bar Harbor, ME). Todos los animales recibieron 50 mg/kg de BrdU en la semana 1 antes de la dosificación por pulsos de 7 días. Posteriormente, todos los ratones recibieron inyecciones IV de 150 µL de PPF1 o solución salina por dosis durante siete días consecutivos. Los ratones se sacrificaron 10 días después de la última inyección de PPF1 o solución salina y los cerebros se procesaron por histología.

La Figura 41A reporta el porcentaje de área inmunorreactiva a CD68 en el hipocampo (n = 10, 10) 10 días después de la dosificación. La Figura 41B reporta el porcentaje

de área inmunorreactiva de Iba-1 en el hipocampo ($n = 10, 10$) 10 días después de la dosificación. La Figura 41C reporta el porcentaje de área inmunorreactiva de GFAP en el hipocampo ($n = 10, 10$) 10 días después de la dosificación. La Figura 41D reporta el porcentaje de área inmunorreactiva en CD68 en el hipocampo ($n=11, 12$) 4 semanas después de la dosificación. La Figura 41E reporta el área inmunorreactiva Iba-1 en el hipocampo ($n=11, 12$) 4 semanas después de la dosificación. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m. (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ por prueba t no apareada). Estos resultados muestran una disminución significativa en los marcadores microgliales, CD68 e Iba-1 en el hipocampo de ratones viejos 10 días y 4 semanas después del tratamiento con PPF1.

s. Ejemplo 19

Se administró PPF comercialmente disponible ("PPF1") o solución salina de control a un tipo salvaje de 23 meses de edad (C57BL/6J, "WT", Código de cepa 0664, Jackson Labs, Bar Harbor, ME). Todos los animales recibieron 50 mg/kg de BrdU en la semana 1 antes de la dosificación por pulsos de siete días consecutivos. Posteriormente, todos los ratones recibieron inyecciones IV de 150 μ L de PPF1 o solución salina por dosis durante siete días consecutivos. Se utilizó una cohorte de cada grupo de tratamiento para investigar los marcadores histológicos de neuroinflamación y se sacrificaron 6 semanas después de la última dosis administrada.

La Figura 42A reporta el porcentaje de cambio en la expresión de BrdU en comparación con la solución salina de control a las 6, 9 y 12 semanas después de la dosificación, que es un indicador de la supervivencia celular en el hipocampo. Los animales se trataron con un régimen de dosificación pulsada de 7 días consecutivos.

La Figura 42B reporta el porcentaje de cambio en la expresión de doublecortin (DCX) en comparación con la solución salina de control a las 6, 9 y 12 semanas después de la dosificación, que es un indicador de neurogénesis en el hipocampo. Los animales se trataron con un régimen de dosificación pulsada de 7 días consecutivos.

t. Ejemplo 20

Treinta (30) ratones transgénicos machos con alfa-sinucleína (Line 61, C57BL/6J de antecedente tipo salvaje), de 4 a 4.5 meses de edad, se dividieron en dos grupos de 15 y se trataron con PPF1 o vehículo durante siete (7) días consecutivos. El tratamiento con PPF1 se administró IV a 5 μ L por gramo de peso corporal. Los ratones con alfa-sinucleína sirven como modelo transgénico para la enfermedad de Parkinson y sobreexpresan la proteína alfa-sinucleína. Este modelo transgénico no está inmunocomprometido, a diferencia de los ratones NSG.

Un día después del último tratamiento de PPF1 o vehículo, todos los ratones fueron sometidos a pruebas de comportamiento y función motora tales como la construcción

del nido, roer pasta, suspensión en cable, rota-rod y caminata en viga. El roer pasta, suspensión en cable y caminata en viga se ejecutaron por segunda vez al final del estudio. La prueba se realizó en un orden aleatorio.

Los animales se pesaron una vez por semana. Las Figuras 43A y 43B muestran que no hubo diferencias significativas entre los ratones transgénicos ("Tg") con alfa-sinucleína tratados con PPF1 y vehículo.

La Figura 44 reporta los resultados de la construcción de nidos. Los ratones se alojaron individualmente en jaulas que contenían ropa de cama con astillas de madera y un cuadro de algodón prensado ("nido"). Ningún otro material de anidación (por ejemplo, lana de madera) estaba presente. El nido se introdujo el día anterior a la evaluación del estado del nido en aproximadamente 2 a 3 horas antes de que se iniciara la fase oscura y el comportamiento del edificio de nido se evaluó al día siguiente del experimento dentro de aproximadamente 2 a 3 horas después que iniciara la fase de luz. El lapso de tiempo entre la introducción del cuadro de algodón y la evaluación del siguiente estado fue el mismo para todos los exámenes. La manipulación del nido y la constitución del nido construido se evaluaron, de acuerdo con una escala de cinco puntos (Deacon, RM 2006, Assessing nest building in mice. Nat Protoc 1:1117-19). Como se muestra en la Figura 44, allí hubo una tendencia creciente en el comportamiento de anidación en ratones tratados con PPF1 en comparación con los ratones tratados con vehículo.

Las Figuras 45A y 45B muestran que hubo un aumento significativo al roer pasta en el grupo tratado con PPF1 en comparación con el grupo tratado con vehículo 3 semanas después del último tratamiento, lo que indica una mejora motora (Figura 45B). La prueba se desarrolló para estudiar los déficits motores en pequeños roedores. Los animales se llevaron a la sala experimental al menos 2 horas antes de la prueba. Se retiraron la parte superior de la jaula, la botella de agua y los gránulos de comida y se colocó un pequeño trozo de espagueti seco (aproximadamente 5 mm) en la jaula. Se colocó un micrófono sobre las piezas de fideos. La grabación se inició tan pronto como un animal comenzó a comer. Se evaluó el número de mordidas por episodio de roer y la frecuencia de mordedura, y se analizó el patrón de roer usando el software Avisoft SASLab Pro. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m. (*P < 0.05 por prueba *t* no apareada).

La Figura 46 muestra los resultados de una prueba de suspensión en cable, que evalúa anomalías neuromusculares de la fuerza motora. Hubo un aumento significativo en el tiempo de caída en el grupo tratado con PPF1 en comparación con el grupo tratado con vehículo 3 semanas después del último tratamiento. Para realizar la prueba, la tapa de la jaula de cable se utilizó y se colocó cinta adhesiva alrededor del perímetro para impedir que el ratón caminará en la repisa. El animal se colocó en la parte superior de la tapa de la jaula. La tapa se sacudió ligeramente tres veces para obligar al ratón a agarrar los cables

y luego la tapa se puso boca abajo. La tapa se mantuvo a una altura de aproximadamente 50-60 cm por encima de una capa subyacente suave, lo suficientemente alta como para prevenir que el ratón saltara hacia abajo, pero no lo suficientemente alta como para causar daños en caso de una caída. La latencia para la caída se cuantificó y se utilizó un tiempo de corte de 300 segundos. Normalmente, un ratón tipo salvaje puede colgarse boca abajo durante varios minutos.

Las Figuras 47A, 47B y 47C representan los resultados de una prueba de caminata en viga. La Figura 47A muestra las diferentes formas y tamaños de vigas (barras cuadradas o cilíndricas) usadas en cinco diferentes ensayos de dificultad creciente. La Figura 47B muestra los resultados de los cinco ensayos 72 horas después del último tratamiento. La Figura 47C muestra los resultados de los cinco ensayos 3 semanas después del último tratamiento. Los ratones tratados con PPF1 mostraron un éxito significativamente mayor al atravesar la viga durante el Ensayo 5 de la Prueba 1 (72 horas después del tratamiento) y durante el Ensayo 4 de la Prueba 2 (3 semanas después del tratamiento). Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m. (**P < 0.01 por prueba binomial).

Las Figuras 48A a 48F muestran resultados histológicos de la tinción de cuerpo estriado y de hipocampo. La Figura 48A reporta la tinción de cuerpo estriado con CD68. La Figura 48B reporta la tinción de hipocampo con CD68. La Figura 48C reporta la tinción de cuerpo estriado con Iba-1. La Figura 48D reporta la tinción de hipocampo con Iba-1.

La Figura 48E reporta la tinción de cuerpo estriado con NeuN. La Figura 48F reporta la tinción de hipocampo con NeuN. Estas figuras muestran que los ratones tratados con PPF1 demostraron disminución de la microgliosis (neuroinflamación) por Iba-1 y CD68 tanto en el cuerpo estriado como en el hipocampo y una mayor supervivencia neuronal por tinción con NeuN de cuerpo estriado e hipocampo. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m. (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 por prueba *t* no apareada).

u. Ejemplo 21

Se administraron PPF1, HAS1 o solución salina de control a ratones de 12 meses (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1 Wj1/SzJ, cepa "NSG"). HAS1 es una HAS comercialmente disponible con más de 95% de albúmina humana (en relación con la proteína total) en una solución al 5% (p/v, 50 g/L), preparada por un método de fraccionamiento de alcohol frío y derivado de plasma humano combinado de los donadores. Excepto donde se indique, HAS1 se administró en los ejemplos en la presente *in vivo* usando el 5%. Los ratones se inyectaron por administración IV de PPF1, HAS1 o solución salina estéril a 150 μ L por dosis diaria durante 7 días consecutivos y se analizaron conductualmente 4 semanas después de la última dosis.

La Figura 49 reporta la latencia de escape del laberinto de Barnes de un ratón para entrar al agujero de escape para ratones tratados con PPF1, HAS1 y vehículo. Los

animales tratados con PPF1 encontraron el agujero de escape significativamente más rápido que los animales tratados con vehículo. Estos datos muestran que PPF1 mejora de manera eficiente la cognición en animales NSG de edad avanzada, mientras que el tratamiento con HAS1 no tiene ningún efecto sobre la memoria dependiente del hipocampo. Todos los datos mostrados son media $\pm$ s.e.m. (* $P < 0.05$ por prueba t no apareada).

v. Ejemplo 22

Paradigmas clínicos usando PPF.

(1) *AD Leve a Moderada.* Hombres y mujeres de 60 años o más con AD leve a moderada se asignaron aleatoriamente para recibir 100 ml o 250 ml una vez al día de PPF1 durante 5 días (“dosificación pulsada”) durante las semanas 1 y 13 del estudio con una duración total de 6 meses. Durante los dos periodos de dosificación de 5 días, los sujetos residen en unidades de observación para pacientes hospitalizados para facilitar la evaluación de seguridad, y todos los sujetos se someten a una visita de detección, visita de referencia, visitas de tratamiento, visitas de seguimiento y una visita de terminación del estudio/terminación temprana. Las evaluaciones de seguridad y tolerabilidad ocurren en cada visita. Las evaluaciones neurocognitivas y motoras se realizan al inicio del estudio y en visitas periódicas provisionales después de la dosificación.

Los criterios de valoración finales primarios son la seguridad, tolerabilidad y viabilidad de cada régimen de dosificación. La seguridad se mide por la incidencia de eventos adversos surgidos durante el tratamiento. La tolerabilidad se mide por el número de sujetos que completaron 8 semanas después de recibir al menos 5 infusiones y el sujeto que completó 24 semanas después de recibir al menos 10 infusiones. La viabilidad del estudio se mide por el número de sujetos que completan 5 y 10 infusiones. Los criterios de valoración secundarios evalúan los posibles efectos en la cognición usando diversas medidas cognitivas establecidas, incluyendo la Subescala Cognitiva de la Evaluación de la Enfermedad de Alzheimer. Los criterios de valoración exploratorios incluyen la evaluación de los cambios en la composición y distribución de biomarcadores de sangre, así como los cambios en la resonancia magnética.

(2) *AD Leve a Moderada.* Dos grupos de sujetos diagnosticados con Alzheimer de leve a moderada se aleatorizaron en el tratamiento activo de una manera doble ciego. Todos los sujetos reciben una infusión por día a la dosis aleatorizada durante 5 días secuenciales durante las semanas 1 y 13 con una duración de estudio de 6 meses. Los sujetos se aleatorizan a uno de los siguientes dos niveles de dosis: 100 ml y 250 ml de PPF1. Los grupos de dosificación también se estratifican por género. La duración de la administración es 2 a 2.5 horas, y las velocidades de flujo se ajustan de acuerdo con las directrices específicas de dosis para que se administre la dosis completa.

Los sujetos participan en la investigación opcional de biomarcador de CSF.

Tales sujetos se someten a dos punciones lumbares para la recolección de CSF, la primera antes de la dosificación inicial y la segunda después de la dosificación final. Las evaluaciones neurocognitivas y motoras se realizan en el valor basal y las evaluaciones intermedias periódicas se realizan después de la dosificación.

Se determinan la seguridad, tolerabilidad y viabilidad de cada régimen de dosificación. Las puntuaciones cognitivas se determinan y resumen a lo largo del estudio, incluyendo: Mini-Examen de Estado Mental (MMSE); Subescala Cognitiva de la Escala de Evaluación de la Enfermedad de Alzheimer de 11 puntos (ADAS-Cog/11); Prueba de Tablero Estriado; Prueba de Fluidez de Categoría (CFT); Escala de Calificación de Demencia Clínica - Suma de Cuadros (CDR-SOB); Estudio Cooperativo de la Enfermedad de Alzheimer - Actividades de la Vida Diaria (ADCS-ADL); Estudio Cooperativo de la Enfermedad de Alzheimer - Impresión Clínica Global de Cambio (ADCS-CGIC); Cuestionario de Inventario Neuropsiquiátrico (NPI-Q); y Evaluaciones Neurocognitivas de Savonix y Digit Span.

(3) *Enfermedad de Parkinson.* Los sujetos con enfermedad de Parkinson y deterioro cognitivo se asignan aleatoriamente a dos grupos: 2 periodos de tratamiento activo y placebo. Los sujetos reciben una infusión por día de tratamiento con activo o placebo durante 5 días secuenciales (“dosificación pulsada”) durante la primera semana del estudio. Durante la semana 13, ambos grupos reciben tratamiento con activo durante 5 días secuenciales, y la duración del estudio es aproximadamente 7 meses. La duración de la administración es 2 a 2.5 horas, y las velocidades de flujo se ajustan de acuerdo con las directrices específicas de dosis para que se administre la dosis completa.

Se determinan la seguridad, tolerabilidad y viabilidad de cada régimen de dosificación. La función cognitiva y motora se resumen a lo largo del estudio, incluyendo: MoCA; Continuidad y Poder de Atención, Memoria de Trabajo y Memoria Episódica en el CDR-CCB; MDS-UPDRS3; MDS-UPDRS2; SE-ADL y CISI-PD.

w. Ejemplo 23 – Dosificación de Pulso Aumenta el Número de Sinapsis y Conectividad Sináptica

Se realizó recolección de tejido e histología de la siguiente forma. Ratones C57BL/6 fueron anestesiados profundamente con Avertin (250 mg/kg IP). Los ratones que se sometieron a dosificación con PPF1 o de control fueron anestesiados 10 días después de completar la dosificación. Se recolectaron los cerebros siguiendo perfusión salina y corte medio sagital separado con una mitad fija en 4% de PFA recién preparado. El PFA se cambió a 30% de sacarosa de 24 a 48 horas después. Un segundo cambio a 30% de sacarosa ocurrió 24 horas después. La segunda mitad se disecó en el hipocampo y la corteza y luego se congeló en hielo seco. El tejido de cerebro fijo se analizó por secciones para marcadores

sinápticos SYNAPSIN1 y PSD-95 y se fotografió usando un Zeiss LSM800 con Airyscan. Pílas Z fueron analizadas usando un contador de sinapsis macro en ImageJ que cuantificó el número y tamaño de punta pre y post sinapsis. El número total de sinapsis se cuantificó al contar el número de puntos pre y post sinápticos colocalizados o yuxtapuestos. El tejido de cerebro congelado se analizó para marcadores sinápticos por qRT-PCR.

Los ratones viejos presentaron una pérdida sustancial de sinapsis en comparación con los ratones jóvenes (ver Morrison JH y otros, *The Ageing Cortical Synapse: Hallmarks and Implications for Cognitive Decline*, Nature Reviews Neuroscience. 7 Mar 2012; anyd Shi Q y otros, *Complement C3-Deficient Mice Fail to Display Age-Related Hippocampal Decline*, Diario de Neurociencia, 23 Sept 2015). Las Figuras 50 y 51 muestran que los ratones de 24 meses de edad (24M) tienen una disminución en el marcador postsináptico PSD-95 con relación a ratones jóvenes de 3 meses de edad (3M) en regiones de cerebro que contienen una cantidad sustancial de sinapsis (hipocampo (HP), estriado (ST), sustancia negra (SN)), pero no en regiones del cerebro que son libres de sinapsis (cuerpo calloso (CC)).

Las Figuras 52A y 52B reportan que los ratones dosificados en pulso con PPF1 tuvieron niveles significativamente mayores del marcador postsináptico PSD-95 (Figura 52A) y niveles mayores (tendencia estadística $p=0.07$) del marcador presináptico SYNAPSIN1 (Figura 52B) cuantificado al medir la densidad óptica integrada (IOD) en el hipocampo CA1. Pruebas t sin emparejar $*p<0.05$. La Figura 53 es una representación histológica de secciones de hipocampo CA1 cuantificadas en la Figura 52.

Las Figuras 54A y 54B ilustran una micrografía confocal de alta resolución (Figura 54A) e incrustación ampliada (Figura 54B), en las cuales se identifican sinapsis con cabezas de flecha amarilla y marcadores pre (SYNAPSIN1, rojo) y postsinápticos (PSD-95, blanco) yuxtapuestos. La imagen se obtuvo del mismo tejido cuantificado en las Figuras 52A y 52B.

Las Figuras 55A a 55D reportan que los ratones dosificados en pulso con PPF1 tuvieron un número significativamente mayor de puntos presinápticos que los ratones tratados con control mientras que el número de puntos postsinápticos (PSD-95) no se cambió. La Figura 55A es un conjunto de micrografías representativas de alta resolución de ratones tratados con solución salina y PPF1 con marcadores pre (SYNAPSIN1, rojo) y postsinápticos (PSD-95, blanco) yuxtapuestos. La Figura 55B reporta la cuantificación de los marcadores pre y postsinápticos yuxtapuestos mientras que la Figura 55C reporta la cuantificación del número de puntos SYNAPSIN1. El número de puntos postsinápticos no se cambia entre los grupos de tratamiento (Figura 55D). pruebas t sin emparejar $*p<0.05$. Estos resultados muestran que el PPF1 administrado en una forma dosificada en pulso aumenta el número de sinapsis y la conectividad sináptica entre neuronas, lo cual está relacionado con aumento de la cognición.

x. Ejemplo 24

Cortezas o hipocampos de cerebros disecados de ratón E16 fueron disociados y cultivados separadamente en placas de fondo de vidrio de 96 agujeros recubierto con PDL a una densidad de 20K células por agujero. Los cultivos neuronales se mantuvieron en la presencia de las condiciones de tratamiento por 14 días. Las condiciones de tratamiento comprenden medio Neurobasal suplementado con B27 y BDNF que contiene 10% (v/v): Albumina humana recombinante ("rhAlbumina", Albumedix Ltd, Nottingham, UK); PPF1; o HAS1, y se realizaron cambios de medio dos veces a la semana. Las células se fijaron después de 14 días en cultivo y se realizó inmunocitoquímica con los siguientes marcadores: Se utilizó Hoechst para teñir todos los núcleos, anticuerpo anti-Map2 para identificar neuronas, anticuerpo anti-Gfap para identificar astrocitos, y anticuerpo anti-Nestina para identificar células progenitoras. Las imágenes fueron adquiridas usando un analizador INCell 2000 (GE Healthcare).

Las Figuras 56A y 56B ilustran neuronas primarias corticales (Figura 56A) y de hipocampo (Figura 56B) de ratón, las cuales fueron cultivadas en la presencia de Albumina humana recombinante (rhAlbumina), PPF1, o HAS1 por 14 días, y se evaluó la composición celular y la morfología por inmunotinción para Map2 (neuronas), Gfap (Astrocitos), y Nestina (células progenitoras).

Temprano en el desarrollo, así como durante la neurogénesis, el progenitor neural proliferante o las células gliales radiales se comprometen con el linaje neuronal y generan neuronas postmitóticas, o maduran en astrocitos (Berg AD y otros, *Radial glial cells in the adult dentate gyrus: what are they and where do they come from?*, F1000Research 2018). Estas células gliales radiales son positivas para las proteínas marcadoras Nestina y Gfap y pueden además dividirse y expandirse antes que se diferencien en astrocitos más maduros que expresan Gfap únicamente y muestren una morfología más compleja. Los astrocitos juegan un papel importante en mantener la salud general del cerebro y mediar las funciones tales como amortiguación de ion intra y extracelular y metabolitos, transporte e intercambio de metabolitos, conectarse a la vasculatura, regular glutamato, GABA y otro consumo de neurotransmisor, o mediar las funciones antioxidantes (ver Kimelberg HK y otros, *Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets*, Neuroterapéuticos, 7(4):338-53, 2010). Sin embargo, los últimos 20 años revelaron que los astrocitos juegan un papel más activo que sólo ser una célula de soporte en el cerebro. Los astrocitos han sido descritos para secretar factores solubles que promueven la formación de sinapsis, maduración y plasticidad y, por lo tanto, están involucrados activamente en la sinaptogénesis y mantener la integridad de la red neuronal (Baldwin KT y otros, *Molecular mechanisms of astrocyte-induced synaptogenesis*, Curr. Opin. Neurobiol., 45:113-20 2017; y Clarke LE y otros, *Emerging roles of astrocytes in neural circuit development*, Nat. Rev. Neurosci. 14:311-21 2013).

Las Figuras 56A y 56B muestran que 14 días de tratamiento con PPF1 llevan a un aumento en la cantidad de Nestina y células positivas de GFAP en el cultivo cortical cuando se compara con cultivos sin tratar o tratados con rhAlbumina. Se puede observar una tendencia en aumento por HAS1. De forma similar, para cultivos de hipocampo, las Figuras 57A y 57B muestran que el tratamiento con PPF1 lleva a un aumento en células de expresión de Nestina y GFAP en cultivos de hipocampo cuando se compara con condiciones sin tratar o tratadas con rhAlbumina. Adicionalmente, las células positivas dobles de Nestina y GFAP así como células de expresión únicamente de GFAP muestran una morfología más compleja cuando se compara con células tratadas con control, lo que sugiere que estas células gliales son más maduras en las condiciones tratadas con PPF1 cuando se compara con las condiciones de control. una tendencia similar se puede observar para el tratamiento con HAS1.

La Figura 57A muestra un aumento en expresión de proteína Gfap dentro de los cultivos neuronales corticales tratados por 14 días con PPF1 o HAS1 por análisis Western blot. Se utilizó beta actina como control de carga. De forma similar, contando la proporción de células positivas Sox2 sobre las células totales dentro del cultivo neuronal cortical revela un aumento significativo en la población de células positivas Sox2 con el tratamiento con PPF1 durante 14 días (Figura 57B). Una tendencia similar se observa con el tratamiento con HAS1. Sox2 es un marcador nuclear usado para identificar células progenitoras gliales, así como astrocitos maduros.

La observación que los cultivos neuronales tratados con PPF1 muestran un aumento en actividad neuronal combinado con la observación que el tratamiento con PPF1 parece aumentar la población de células progenitoras gliales y astrocitos positivos de GFAP maduros, sugiere que el tratamiento tiende hacia el mejoramiento de la generación de reserva de astrocitos saludables lo que a su vez promueve la conectividad neuronal *in vitro*.

y. Ejemplo 25

Se administró PPF1 o control de solución salina a ratones inmunocomprometidos de 10.5 meses de edad (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wj1/SzJ, cepa "NSG"). Los ratones recibieron inyecciones IV de 150 μ l de PPF1 (n=10) o solución salina (n=15) por 7 días consecutivos y se ejecutó prueba para comportamiento cognitivo en la prueba de nado de 2 opciones 6 semanas después de la dosificación cuando los ratones tenían 12 meses de edad. La prueba de nado de dos opciones mide la memoria dependiente del hipocampo al cuantificar la latencia a la plataforma de escape y la memoria ejecutiva dependiente de la corteza al registrar si la primera selección direccional hecha cuando se sale del brazo de inicio del laberinto es correcta o falsa. El ensayo consistió de un laberinto con forma de T que estaba inmerso en agua opaca con una plataforma de escape al final de uno

de los brazos de la T. En el día uno, los ratones fueron entrenados con una plataforma visible, estos fueron ubicados gentilmente en el fondo de la forma de T y se dejaron nadar hacia la plataforma por 4 pruebas. En el día dos, los ratones de nuevo fueron ubicados en el fondo del brazo de la T con la plataforma de escape sumergida justo debajo de la superficie del agua. Los resultados del ensayo fueron registrados como selección correcta o falsa cuando salen al brazo del fondo y hay latencia a la plataforma de escape. La Figura 58A muestra que los ratones tratados con PPF1 tienen una tendencia fuerte hacia latencia de escape aumentada en el día 2, lo que indica una cognición dependiente del hipocampo mejorada. La Figura 58B reporta memoria mejorada dependiente de la corteza, donde los animales tratados con PPF1 muestran éxito mejorado en tomar la selección correcta hacia la plataforma en comparación con los ratones tratados con solución salina. Estos datos son significativos con un valor p de 0.041 por prueba Chi-Cuadrado. En general, los datos muestran que el tratamiento con PPF1 puede mejorar la memoria dependiente de hipocampo y corteza lo que sugiere efectos beneficiosos en más de una región del cerebro del ratón viejo.

z. Ejemplo 26

Se administró PPF1, plasma joven (YP), control con solución salina o plasma antigua (OP) a ratones inmunocomprometidos de 10.5 meses de edad (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1 Wj1/SzJ, cepa "NSG"). Los ratones recibieron 150 mg/kg de BrdU IP diariamente por 5 días seguido por inyecciones IV de 150 μ l de solución salina (n=13), plasma joven (YP, n=13), PPF1 (n=15) o plasma viejo (OP, 14) por 7 días consecutivos y fueron sacrificados cuando los ratones tenían 12 meses de edad. Las inyecciones de BrdU etiquetan todas las células proliferantes y en la circunvolución dentada etiquetará predominantemente el tallo neural y células progenitoras. Cuando el número de células positivas de BrdU se evalúa 6 semanas después de la administración del tratamiento y 7 semanas después de la inyección de BrdU, las medidas pueden ser usadas para evaluar la supervivencia celular. Adicionalmente, el tallo neural y los progenitores etiquetados al momento se habrán diferenciado en neuronas positivas de NeuN o astrocitos positivos de GFAP. Por tinción conjunta de BrdU, NeuN y GFAP se puede hacer una determinación sobre si hay más neuronas nuevas en los cerebros de animales tratados y si hay un cambio en el destino celular con el tratamiento. Las neuronas recién nacidas en la circunvolución dentada pueden integrarse y fortalecer la red de hipocampo. La Figura 59 muestra una imagen representativa de BrdU, NeuN y GFAP que tiñe en la circunvolución dentada de un ratón NSG de 12 meses de edad. La Figura 60A muestra el número total cuantificado de células etiquetadas BrdU/NeuN y BrdU/GFAP en ratones tratados con control con solución salina, plasma joven (YP), PPF1, o plasma viejo (OP). Hay significativamente más células positivas dobles BrdU/NeuN en los ratones tratados con PPF1 que en ratones tratados con solución salina u

OP. También hay una tendencia hacia un aumento en células positivas dobles BrdU/NeuN cuando se comparan ratones tratados con YP contra PPF1, sugiriendo que hay más neuronas nuevas después del tratamiento con PPF1 en comparación con el tratamiento con YP, solución salina u OP. No hubo cambio en el número de células positivas dobles BrdU/GFAP. La Figura 60B muestra los mismos datos que la Figura 60A pero cuantificados como % de células positivas dobles BrdU/NeuN y BrdU/GFAP de todas las células etiquetadas con BrdU. Esta cuantificación permite la medición sobre si el tratamiento cambia el destino del tallo neural o células progenitoras. Acá se observa una tendencia hacia % aumentado de células positivas dobles BrdU/NeuN con YP y PPF1, lo cual es ligeramente más fuerte en animales tratados con PPF1. También hay una tendencia hacia la formación aumentada de astrocitos después de tratamiento con OP a costa de la formación de neuronas, sugiriendo que el OP tiene un efecto inverso de YP o PPF1. Tomados juntos, los datos muestran que el PPF1 aumenta la formación de nuevas neuronas más fuertemente que YP y que esto lleva a un cambio ligero en destino de células madre y progenitoras hacia el linaje neuronal. Estas nuevas neuronas se integran en la red de hipocampo y pueden mejorar la función de memoria.

aa. Ejemplo 27

Se administró PPF1, plasma joven (YP), o control con solución salina a ratones inmunocomprometidos de 10.5 meses de edad (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1 Wj1/SzJ, cepa "NSG"). Los ratones recibieron inyecciones IV de 150 μ l de solución salina (n=13), plasma joven (YP, n=14) o PPF1 (n=13) por 7 días consecutivos y se ejecutó pruebas para comportamiento cognitivo en el Laberinto de Barnes 6 semanas después de la dosificación cuando los ratones tenían 12 meses de edad. El Laberinto de Barnes mide la memoria dependiente del hipocampo al medir que tanto le toma a los ratones navegar hacia el agujero de escape usando pistas visuales ubicadas a lo largo del laberinto. En breve, en este ensayo específico a los ratones se da 5 pruebas por día para encontrar el agujero de escape por 3 días consecutivos y el agujero de escape se deja en la misma ubicación por todos los tres días. La Figura 61A muestra que los ratones tratados con PPF1 son significativamente más rápidos en encontrar el agujero de escape que los ratones tratados con solución salina o YP lo que demuestra una función cognitiva mejorada. La Figura 61B muestra la latencia de escape promedio para las pruebas 14 y 15 como una medición adicional para el resultado de Laberinto de Barnes y acá los animales PPF1 también muestran una tendencia fuerte hacia memoria mejorada sobre los ratones tratados con YP o con control con solución salina.

bb. Ejemplo 28

Se administró PPF1 o control con solución salina a ratones inmunocomprometidos de 3 meses de edad, 6 meses de edad y 10.5 meses de edad

(NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm 1 Wj1/SzJ, cepa “NSG”). Los ratones recibieron inyecciones IV de 150 μ l de control con solución salina o PPF1 por 7 días consecutivos y fueron sacrificados 6 semanas después para análisis de neurogénesis por inmunohistoquímica de doble cortina a 4.5, 7.5 y 12 meses de edad. La doble cortina etiqueta las neuronas nuevas y nos permite cuantificar el número de neuronas nuevas en la circunvolución dentada. La Figura 62A muestra que hay una disminución dependiente de la edad en el número de neuronas nuevas positivas por doble cortina (DCX) y que el tratamiento con PPF1 aumenta significativamente el número de células positivas DCX en animales de 7.5 meses de edad y 12 meses de edad (4.5 meses, salina n=8, PPF1 n=8; 7.5 meses, salina n=8, PPF1 n=6; 12 meses, salina n=15, PPF1 n=14). Adicionalmente, hubo una tendencia hacia números mayores de células positivas DCX en los ratones de 4.5 meses de edad. La Figura 62B captura los mismos datos en una forma diferente, comparando los niveles de neurogénesis al momento de la dosificación con el nivel de neurogénesis al momento del sacrificio. Este gráfico muestra que el tratamiento con PPF1 rescata la disminución en neurogénesis dependiente de la edad en los ratones de 7.5 meses de edad y 12 meses de edad y lo restaura o lo mantiene al mismo nivel que en los ratones al momento de la dosificación, a 6 y 10.5 meses de edad, respectivamente.

cc. Ejemplo 29

Se administró PPF1 o control con solución salina a ratones inmunocomprometidos de 6 meses de edad (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm 1 Wj1/SzJ, cepa “NSG”). Los ratones recibieron inyecciones IV de 150 μ l de PPF1 (n=10) o solución salina (n=15) por 7 días consecutivos y fueron sacrificados para análisis 24 horas después de la última dosis. Los cambios inflamatorios en el hipocampo fueron cuantificados usando inmunohistoquímica CD68 que etiqueta microglía activada. La Figura 63 muestra la cuantificación del área positiva en CD68 en el hipocampo de ratones tratados con solución salina (n=10) y PPF1 (n=19). Hay una reducción significativa en los niveles de CD68 lo que sugiere una disminución en inflamación en los cerebros de estos ratones.

dd. Ejemplo 30

Se administró PPF1 o control con solución salina a ratones tipo salvaje de 24 meses de edad (C57BL/6, “WT”). Los ratones recibieron inyecciones IV de 150 μ l de PPF1 (n=10) o solución salina (n=10) por 7 días consecutivos y fueron sacrificados para análisis 10 días después de la última dosis. Se realizó análisis histológico para los marcadores microgliales CD68 e IBA-1 usando imágenes de inmunofluorescencia capturadas por un escáner de diapositivas Hamamatsu. Las Figuras 64A y 64B muestran imágenes representativas de ratones tratados con solución salina o PPF1 para CD68 (Figura 64A) e Iba-

1 (Figura 64B). Ambos marcadores se reducen en cerebros de ratones tratados con PPF1, sugiriendo una disminución en activación de microglía dependiente de la edad y, por lo tanto, una reducción en inflamación.

ee. Ejemplo 31

Se administraron dos regímenes de dosificación de pulso de refuerzo en ratones NSG, empezando bien sea a los 6 meses de edad (Figura 65A) o a los 3 meses de edad (Figura 65B). La cohorte de ratón inicialmente tratado intravenosamente a 6 meses de edad recibió 2 dosis de refuerzo de siete días consecutivos espaciadas por 8 semanas. La cohorte de ratón inicialmente tratada intravenosamente a 3 meses de edad recibió 3 dosis de refuerzo de siete días consecutivos espaciadas 8, 8, y 7 semanas aparte. Para ambos grupos, se realizó prueba de comportamiento 6 semanas después del último régimen de dosis pulsada, al cual todos los ratones tenían 12 meses de edad.

La Figura 66 muestra el número total de células positivas DCX (indicando neurogénesis) en el hipocampo contado de cinco secciones medias del hipocampo de ratones NSG de 12 meses de edad tratados a los 3 meses de edad con: vehículo, sin ejercicio; dosis pulsada con PPF1 por 7 días; dosis pulsada con PPF1 por 7 días luego dos regímenes de refuerzo posteriores espaciados por 8 semanas; y vehículo más ejercicio para el resto del estudio. Todos los datos son la media $\pm$ SEM, **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ANOVA con Post hoc de Dunnett.

Esto resultó en un aumento significativo en neurogénesis en comparación con dosificación de pulso simple de PPF1 (sin refuerzo) y tratamiento con vehículo. Esta observación indica que la administración repetida de PPF no resulta en el agote de reserva de célula neuroprogenitora (NPC) dado que la formación de NPC en neuronas inmaduras ocurrió independiente de la dosificación pulsada con refuerzo repetida cada dos meses.

Una tendencia similar se observó en los ratones tratados primero a los 3 meses de edad. La Figura 67 muestra el número total de células positivas DCX (indicando neurogénesis) en el hipocampo contado de cinco secciones medias del hipocampo de ratones NSG de 12 meses de edad tratados a los 3 meses de edad con: vehículo, sin ejercicio; dosis pulsada con PPF1 por 7 días; dosis pulsada con PPF1 por 7 días luego tres regímenes de refuerzo posteriores espaciados por 8, 8, y 7 semanas, respectivamente; y vehículo más ejercicio para el resto del estudio.

La Figura 68 muestra el desempeño de comportamiento de laberinto Y en ratones NSG de 12 meses de edad de ratones de la cohorte inicial de 6 meses de edad (ver Figuras 65A y 66). El porcentaje de entradas totales en el nuevo brazo del laberinto Y para ratones tratados con PPF1 y PPF1 más refuerzos, aumentó significativamente la memoria de aprendizaje espacial en comparación con el control.

ff. Ejemplo 32

Neuronas corticales primarias de ratón (Figura 69A) y neuronas de hipocampo (Figura 69B) fueron mantenidas en la presencia de un tratamiento de control, rhAlbumina, PPF1 (dos lotes diferentes) y HAS1. La longitud de neurita se evaluó después de 96 horas en cultivo. El tratamiento de ambos tipos de célula neuronal con PPF1 o HAS1 resultó en la promoción significativa de crecimiento de neurita en comparación con el tratamiento de control. el tratamiento con PPF1 o HAS1 también resultó en una promoción aumentada de crecimiento de neurita en comparación con rhAlbumina. El crecimiento de neurita es un proceso fisiológico relevante para que ocurra una neurona nueva antes de conectarse e integrarse en una red neuronal. N=11-16 experimentos independientes $\pm$ SEM, ANOVA de una vía * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Las neuronas corticales primarias de ratón no fueron tratadas o se mantuvieron en la presencia de tratamiento con control, rhAlbumina, PPF1 (dos lotes diferentes) y HAS1 por 14 días. La Figura 70A muestra expresión aumentada de mRNA de marcadores sinápticos (SYN1 y PSD-95) en células tratadas con PPF1 y HAS1 en comparación con el control, con menos expresión observada con el tratamiento con HAS1 en el marcador postsináptico, PSD-95, en comparación con el tratamiento con PPF1. La Figura 70B muestra niveles aumentados de proteína del marcador presináptico, SYN1, para cultivos neuronales tratados con PPF1 y HAS1 cuando se compara con neuronas tratadas con control, sin tratar, y con rhAlbumina. Tuj1, un marcador neuronal general, es usado para normalización.

gg. Ejemplo 33

Se realizó una prueba clínica de Fase 2 en pacientes con enfermedad de Alzheimer usando PPF1. Los principales criterios de inclusión fueron: Edad 60-90; probable AD de acuerdo con el criterio del Instituto Nacional sobre Envejecimiento y Asociación de Alzheimer (NIA-AA) (Jack CR, y otros, *Alzheimers Dement.*, 14(4): 535-62 (2018) incorporada acá por referencia); puntaje de Mini Examen de Estado Mental (MMSE) 12-24. Los principales criterios de exclusión fueron: Cualquier desorden neurológico diferente a AD; < 2 accidentes cerebrovasculares lacunares en Imagen de Resonancia Magnética (MRI); cambio en la dosis de inhibidor de colinesterasa o memantina en los últimos 3 meses. Cada sujeto tuvo una visita de línea base, dos periodos de dosificación de 5 días (IV) cada uno seguido por un periodo libre de tratamiento de 3 meses, para una duración de estudio total de 6 meses. Los sujetos aleatorizados en una relación de 1:1 para recibir 100 mL o 250 mL de PPF1, y la ubicación de la dosis fue cegada para los sujetos, cuidadores, calificadores, e investigadores. No hubo placebo en el brazo de control. El punto final principal fue la seguridad y la tolerabilidad, mientras que los puntos finales secundarios incluían la Escala de Evaluación de AD-Subescala

Cognitiva (ADAS-Cog), la Escala de Clasificación de Demencia Clínica (CDR), las Actividades de Estudio Cooperativas AD de la Vida Diaria (ADCS-ADL), el MMSE, y la batería cognitiva Savonix. Los puntos finales exploratorios incluían biomarcadores de fluido sanguíneo y cerebroespinal, y MRI estructural y funcional. El estudio se realizó en nueve (9) sitios de EE.UU. entre marzo de 2018 y mayo de 2019.

Se evaluaron ochenta y nueve (8) sujetos, cincuenta y dos sujetos (52) fueron aleatorizados, cincuenta y un (51) sujetos recibieron por lo menos 1 dosis, cuarenta y tres (43) sujetos completaron el primer periodo de dosificación de 5 días, y cuarenta (40) sujetos completaron ambos periodos de dosificación. La demografía de referencia y el nivel de deterioro cognitivo y funcional para todos los sujetos que recibieron por lo menos una dosis (n=51) se resumen en la Figura 71.

La Figura 71 muestra que en el curso del periodo de estudio de 6 meses, no hubo disminución cognitiva o funcional significativa medido por el ADAS-Cog, el ADCS-ADL, y el CDR-SB. La disminución esperada por un periodo de 6 meses en sujetos AD de severidad de referencia similar que recibieron placebo en otras pruebas es un empeoramiento de 2 a 3 puntos en el ADAS-Cog y un empeoramiento de 3 a 4 puntos en el ADCS-ADL (Ito y otros, *Alzheimers Dement.*, 6:39-53 (2010); Ito K y otros, *Alzheimers Dement.*, 7:151-60 (2011); Doody RS y otros, *N Engl J Med.* 70:311-21 (2014); Relkin NR y otros, *Neurology*, 88:1768-75 (2017) todos incorporados acá por referencia).

Los resultados de esta prueba clínica de Fase 2 en pacientes con Enfermedad de Alzheimer demuestra que la dosificación diaria con PPF1 por cinco (5) días consecutivos es segura y bien tolerada en esta población. Esto también muestra que el progreso de la enfermedad en los sujetos fue más lento de lo esperado.