

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **035104**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.04.28**

**(21)** Номер заявки  
**201650059**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.05.08**

**(51)** Int. Cl. **C12N 5/078** (2010.01)  
**C12N 5/0789** (2010.01)  
**A61K 41/00** (2006.01)  
**A61K 33/40** (2006.01)

---

**(54) СПОСОБ РАЗМНОЖЕНИЯ ВЗРОСЛЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ**

---

**(31)** **UD2014A000075**

**(32)** **2014.05.09**

**(33)** **IT**

**(43)** **2017.05.31**

**(86)** **PCT/IB2015/053379**

**(87)** **WO 2015/170291 2015.11.12**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ТАНКСТЕМ С.Р.Л. (IT)**

**(72)** Изобретатель:  
**Полеттини Марко (IT)**

**(74)** Представитель:  
**Вашина Г.М. (RU)**

**(56)** **WO-A1-2008034740**

SPAAS J.H., GAMBACURTA A., POLETTINI M., BROECKX S., ET AL.: "Purification and expansion of stem cells from equine peripheral blood, with clinical applications.", 2011, pages 129-135, XP002728029, Retrieved from the Internet:URL:<http://hdl.handle.net/1854/LU-1215157>[retrieved on 2014-07-29] the whole document

**WO-A2-2008036374**

G. E. Garber ET AL: "The use of ozone-treated blood in the therapy of HIV infection and immune disease: a pilot study of safety and efficacy.", AIDS, 1 January 1991 (1991-01-01), pages 981-984, XP055132379, Retrieved from the Internet:URL:<http://graphics.tx.ovid.com/ovftpdfs/FPDDNCFBHADJCPOO/fs047/ovft/li ve/gv039/00002030/00002030-199108000-00009.pdf>[retrieved on 2014-07-30] the whole document

LARINI A. ET AL: "Effects of ozone on isolated peripheral blood mononuclear cells", TOXICOLOGY IN VITRO, ELSEVIER SCIENCE, GB, vol. 19, no. 1, 1 February 2005 (2005-02-01), pages 55-61, XP027831744, ISSN: 0887-2333[retrieved on 2005-02-01] the whole document

**WO-A1-2009115522**

**WO-A2-2009046377**

---

**(57)** Способ размножения взрослых стволовых клеток из крови, включающий выращивание и депрограммирование взрослых стволовых клеток образца крови, который был отобран, с использованием обработки образца крови MCSF in vitro и озонирование образца крови.

---

**B1**

**035104**

**035104**

**B1**

### Область изобретения

Описанные варианты осуществления изобретения относятся к способу размножения взрослых стволовых клеток из цельной крови, особенно, но не только, периферической крови взрослых млекопитающих, и соответствующему применению в области медицины, в частности, в медицине человека или ветеринарной медицине для терапевтического лечения поражений, как внешних, так и внутренних, повреждений сухожилий, связок и хрящей, переломов костей, а также терапевтического и/или профилактического лечения хронических и/или острых воспалительных патологий, неврологических и нейродегенеративных патологий, сердечных патологий, опухолевых патологий, аутоиммунных патологий, глазных патологий и патологий генетического происхождения.

Здесь и далее в описании и как известно из литературы слово "размножение" означает процесс увеличения количества клеток либо путем деления клеток, либо, как в конкретном случае описано и заявлено здесь, путем "дедифференцировки" или "депрограммирования", другими словами, процесс, по которому некоторые клетки, присутствующие в крови, ретрансформируются в стволовые клетки после соответствующей обработки *in vitro*, как будет показано ниже.

### Предпосылки изобретения

В последнее время применение стволовых клеток в терапии приобрело широкое распространение, но полученные терапевтические результаты в дальнейшем не оправдали ожиданий, за исключением стволовых клеток, полученных из крови.

В действительности, оказалось, что многие известные способы получения стволовых клеток являются длительными по времени, трудоемкими и дорогостоящими, с относительными результатами и иногда побочными эффектами.

Существуют эмбриональные стволовые клетки и взрослые стволовые клетки: первые получают из 8-дневных бластоцист, а то время как взрослые стволовые клетки можно получить, главным образом, из костного мозга, жировой или мышечной ткани, из периферической крови, из пуповины и т.д..

Определение стволовых клеток непрерывно развивается. Для всех этих клеток, как эмбриональных (ES), так и взрослых, как гематопоэтических (HSC), так и мезенхимальных (MSC) (Kuwana M. et al., 2003) были идентифицированы различные генетические маркеры, из которых некоторые являются общими для многих типов клеток (Condomines M. et al., 2006; Kang W. J. et al., 2006; Zhao Y. et al., 2003; Rabinovitch M. et al., 1976).

Для идентификации плюрипотентных стволовых клеток (pluripotent stem cells, PSCs), эмбриональных и взрослых, рассматривается экспрессия некоторых внутриклеточных транскрипционных факторов (Sox2, Oct3/4 и Nanog).

Первоначально исследование было направлено на стволовые клетки эмбрионального происхождения, потому что они являются плюрипотентными и также поддаются качественной и количественной оценке, и таким образом, пригодны для экспериментального испытания; однако, этические вопросы и прежде всего противопоказания из-за развития опухолей означают, что они должны были быть отложены в сторону. Поэтому в настоящее время предпочтительны взрослые стволовые клетки. Взрослые стволовые клетки другого индивидуума (аллогенные) очень часто вызывают серьезные проблемы отторжения, поскольку они не признаются как "свои". Это в особенности затрагивает стволовые клетки из пуповины, которые используются почти исключительно как аллогенные стволовые клетки.

Плюрипотентные стволовые клетки, индуцированные с помощью процесса, который переносит через вирусы плюрипотентные факторы от эмбриональных стволовых клеток к взрослым стволовым клеткам, являются клетками, которые не пригодны для лечения из-за противопоказаний, аналогичных тем, которые имели эмбриональные стволовые клетки, и из-за чрезвычайно больших затрат.

У человека на данный момент принято использовать стволовые клетки, полученные из периферической крови, способом, называемым "аферезом" или "лейкаферезом". Стволовые клетки извлекают (экстрагируют) из крови, собирают и затем инокулируют в пациентов, страдающих некоторыми лейкозными патологиями, сразу же после химиотерапии или лучевой терапии. Стволовые клетки являются гемопоэтическими, и поэтому они воздействуют исключительно на патологии, связанные с заболеваниями крови.

При аферезе, который длится от 6 до 8 ч, кровь берется из вены руки, шеи или груди и пропускается через аппарат, который удаляет стволовые клетки.

Очищенная таким образом кровь возвращается пациенту, в то время как собранные клетки сохраняются при охлаждении в жидком азоте (Condomines M. et al., 2006; Kang W.J. et al. 2006). Этот прием является не только болезненным, но также крайне напряженным (стрессогенным) для пациента. Он обеспечивает инокуляцию факторов роста *in vivo* для стимулирования высвобождения стволовых клеток из костного мозга в кровь и не допускает реального отделения и/или очистки стволовых клеток в кровотоке.

В соответствии с законодательством в настоящее время эти клетки разрешены в терапии для лечения исключительно патологий крови.

Стволовые клетки, которые сейчас представлены на рынке для лечения различных патологий, представляют собой взрослые стволовые клетки, главным образом мезенхимальные, полученные из костного

мозга и жировой клетчатки. Однако они имеют определенные ограничения:

они требуют инвазивных методов для их сбора, просверливания кости для стволовых клеток костного мозга или хирургии для стволовых клеток из жировой клетчатки;

они способны взаимодействовать только с некоторыми тканями из-за их мезенхимальной деривации;

когда их культивируют для получения достаточного количества для терапии, они начинают дифференцироваться в другие типы клеток, показывающие всегда различные мембранные рецепторы, и поэтому они не могут поддаваться качественным и количественным оценкам, которые являются незаменимыми характеристиками при проведении исследования на людях.

Другой известный метод описывается Zhao Y. et al., в статье "A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells (Субпопуляция моноцитарного происхождения периферической крови человека действует в качестве плюрипотентных стволовых клеток" и в WO-A-2004/043990. Это способ получения стволовых клеток из моноцитов, который включает стадии выделения моноцитов из периферической крови, приведение их во взаимодействие с митогенным компонентом и впоследствии культивирование моноцитов из периферической крови в условиях, подходящих для выращивания (размножения) клеток.

Данный способ, при котором изначально требуется осуществить стадию выделения моноцита и затем стадию размножения в культуральной среде, является очень продолжительным, около 15-20 дней для получения значительного количества стволовых клеток, и не позволяет получить плюрипотентные стволовые клетки.

К тому же в рамках получения стволовых клеток из моноцитов известны документы WO-A-2005/046570, WO-A-2007/131200 и WO-A-03/083092. Однако, поскольку необходимо выполнить предварительную очистку крови для того, чтобы выделить только одну клеточную фракцию, то есть моноциты, и последующее размножение для получения требуемых стволовых клеток, способы, описанные в этих документах, также требуют очень длительного времени, также порядка 15-40 дней для получения приемлемого количества стволовых клеток.

Также известен документ WO-A-2008/034370 на имя заявителя по настоящей заявке, который включен здесь во всей полноте в качестве ссылки и относится к способу размножения взрослых стволовых клеток из крови при помощи макрофагального колониестимулирующего фактора (Macrophage Colony Stimulating Factor, MCSF). Этот известный способ позволяет выращивать взрослые стволовые клетки из крови после того, как кровь была взята при обработке MCSF *in vitro* при концентрации от 8 нМ до 15 нМ и последующей очистки, предпочтительно путем фракционирования в градиенте фиколла. Способ может также обеспечить рост стволовых клеток из периферической крови, очищенной обработкой *in vitro* с помощью MCSF при концентрации от 35 нМ до 55 нМ.

Эффективность способа подтверждается наличием и распознаванием маркеров стволовых клеток CD90, CD34 и CD117 CD90/34 и тем, что стволовые клетки не теряют факторов распознавания "своих" после деления или размножения. Стволовые клетки не приводят к возникновению побочных эффектов, таких как отторжение, заражение или развитие тератом, когда они были введены пациенту, и способны дифференцироваться "in vivo" и вести себя как плюрипотентные стволовые клетки.

Авторы обнаружили, что клетки, выращенные таким образом путем деления или размножения, при введении в виде инъекции локально или внутривенно приобретают "in vivo" (а не "in vitro" как в известных способах в существующем уровне техники с помощью соответствующих факторов роста и/или химического стимула (Gulati R. et al., 2003; Katz R. L. et al., 2002; Okazaki T. et al., 2005)) все морфологические и химические характеристики клеток макрофагов, лимфоцитов, эпителия, эндотелия, нейронов и гепатоцитов в зависимости от потребностей и патологий живых организмов, которые подвергают лечению. Способ является менее инвазивным, чем другие способы, используемые перед сбором стволовых клеток, он безболезнен (в отличие от афереза) и экономичен.

И наконец, возможность с легкостью получить эти клетки, а затем суметь сохранить их в течение длительного времени, например, замороженными в жидком азоте, делает клетки, полученные этим известным способом, пригодными для аутологичных трансплантаций, а также при лечении многих патологий (повреждения различных типов, метаболические заболевания, неврологические патологии, острые и хронические воспалительные патологии).

Также известен документ WO-A-2009/115522 на имя заявителя по настоящей заявке, который включен здесь во всей полноте в качестве ссылки и относится к комплексу для сбора крови, предпочтительно периферической крови, для получения плюрипотентных стволовых клеток, включающий контейнер, способный вместить взятую кровь, которая содержит антикоагулянт и вещество MCSF. Комплект может использоваться в рамках способа, описанного в WO-A-2008/034370.

Однако заявитель обнаружил, что различные стадии подготовки и обработки, которым подвергаются стволовые клетки при реализации способа, описанного в WO-A-2008/034370, такие как удаление красных кровяных телец (эритроцитов), очистка стволовых клеток от других компонентов крови, получение большего количества плюрипотентных: стволовых клеток по сравнению с гемопоэтическими и мезенхимальными стволовыми клетками, культивирование, дифференцировка в другие типы клеток, мо-

гут вызывать стресс у полученных таким образом взрослых стволовых клеток, оставляя их живыми, но делая менее эффективными и с уменьшенной потенциальной возможностью для активной деятельности и информации.

В области ветеринарии существуют различные методики и устройства для получения стволовых клеток, в частности, для концентрирования стволовых клеток из жировой клетчатки и костного мозга и для получения факторов роста.

Однако для стволовых клеток первым препятствием является то, что их трудно собрать: как мы уже упоминали, чтобы получить их из костного мозга, кость необходимо просверлить или проникнуть в позвоночный столб, и чтобы получить их из жировой клетчатки, необходима соответствующая хирургическая операция с наложением швов.

Существует также логистическая сложность: отправка образца и получение стволовых клеток, сохранение их всех живыми и стабильными.

Другими препятствиями могут быть: необходимость проведения многочисленных ручных операций, время приготовления и затраты для всех взрослых стволовых клеток, используемых в настоящее время.

Эти трудности вместе с неудовлетворительными клиническими результатами являлись причиной того, что стволовые клетки почти полностью исчезли из ветеринарной клинической практики, и лишь несколько ветеринаров по-прежнему продолжают использовать их, главным образом для экспериментальных целей.

Приготовление клеток, описанное в WO-A-2008/034370, и о котором сообщалось в различных научных публикациях, позволяет оценить качество и определить количество полученных стволовых клеток, подтверждающих их плюрипотентные характеристики. Это также намного проще, чем методики, используемые до настоящего времени, и потому, что отбор пробы простой -несколько миллилитров крови, и также потому, что клетки не нужно выращивать.

Однако, чтобы применить стволовые клетки в клинической практике человека, преодолеть препятствия, связанные с отправкой образца в лабораторию, данная система действительно может быть улучшена последующим депрограммированием с MCSF и возвращением к структурам, где выполняется терапевтическое лечение. Другим ограничением может быть полная очистка стволовых клеток, полученных из крови, способом, описанным в WO-A-2008/034370, который предусматривает большую безопасность для возможной аллогенной инокуляции (безопасность которой все еще требуется доказать). К тому же, очистки и процессы, применяемые для удаления красных кровяных телец и пропускания клеток в сортере (контрольное испытание), создают значительный стресс для полученных стволовых клеток, приводя их к потере части терапевтических возможностей. Таким образом, существует острая необходимость в уменьшении до минимума обработки крови для получения эффективных стволовых клеток и, таким образом, получения лучших результатов.

Другое ограничение всех способов лечения стволовыми клетками, полученными известными способами, включая WO-A-2008/034370, заключается в том, что требуются специализированные лаборатории.

Также известен документ WO-A-2008/036374, который описывает способы и композиции для трансплантации стволовых клеток пациентам, у которых ранее не был подавлен иммунитет.

Также известны следующие научные публикации:

Spaas J. H., Gambacurta A., Poletini M, Broeckx S. et al., "Purification and expansion of stem cells from equine peripheral blood, with clinical applications", vol. 80, no. 2, pages 129-135 ("Очистка и размножение стволовых клеток из периферической крови лошади с применением в медицинской практике", т.80, №2, стр.129-135, по данным интернета: URL:<http://hdl.handle.net/1854/LU-1215157>;

G. E. Garber et al., "The use of ozone-treated blood in the therapy of HIV infection and immune disease: a pilot study of safety and efficacy" AIDS, 1 January 1991, pages 981-984 ("Применение обработанной озоном крови при лечении ВИЧ-инфекции и иммунной болезни: экспериментальное исследование безопасности и эффективности" AIDS, 1 января 1991 года, стр.981-984) по данным интернета: URL:[http://graphics.tx.ovid.com/ovftpdfs/FPDDNCFBHADJCP00/fs047/ovft/live/gv03\\_9/00002030/00002030-199108000-00009.pdf](http://graphics.tx.ovid.com/ovftpdfs/FPDDNCFBHADJCP00/fs047/ovft/live/gv03_9/00002030/00002030-199108000-00009.pdf);

Larini et al., "Effects of ozone on isolated peripheral blood mononuclear cells", Toxicology in vitro, Elsevier Science, GB, vol. 19, no. 1, 1 February 2005, pages 55-61 ("Влияние озона на изолированные мононуклеарные клетки периферической крови", Toxicology in vitro, Elsevier Science, GB, т. 19, № 1, 1 февраля 2005, стр 55-61).

Поэтому существует необходимость улучшить способ размножения взрослых стволовых клеток из цельной крови, который может преодолеть по меньшей мере один из недостатков, известных из уровня техники.

Заявитель разработал, проверил и осуществил настоящее изобретение для того, чтобы преодолеть недостатки способов, известных из уровня техники, и достичь эти и другие цели и преимущества.

Если не указано особо, все технические и научные термины, используемые в данном изобретении, и далее имеют те же значения, как это обычно понимается специалистом с обычным опытом в данной области, к которой относится настоящее изобретение. Хотя и способы, и вещества, аналогичные или экви-

валентные тем, которые описаны здесь, могут применяться на практике и в исследованиях настоящего изобретения, эти способы и вещества описаны ниже лишь в качестве примера. В случае возникновения разночтений настоящая заявка будет иметь преимущественную силу, включая ее определения. Вещества, способы и примеры имеют исключительно иллюстративный характер и не должны восприниматься ограничительно.

### Сущность изобретения

Настоящее изобретение изложено и охарактеризовано в независимом пункте формулы изобретения, в то время как зависимые пункты описывают другие характеристики изобретения или варианты основной идеи изобретения.

В соответствии с вышеприведенными целями, способ размножения взрослых стволовых клеток из крови, который преодолевает ограничения, известные из предшествующего уровня техники, и устраняет его недостатки, включает:

выращивание и депрограммирование взрослых стволовых клеток образца крови, который был отобран, используя обработку образца крови макрофагальным колониестимулирующим фактором (Macrophage Colony Stimulating Factor, MCSF) *in vitro*;

озонирования образца крови.

Таким образом, настоящее изобретение позволяет получить плюрипотентные взрослые стволовые клетки из образца крови.

В соответствии с возможными вариантами осуществления изобретения, способ предусматривает, что озонирование образца крови проводят до обработки MCSF. В частности, обработка MCSF может проводиться уже на озонированном образце крови.

В соответствии с другими возможными вариантами осуществления изобретения способ предусматривает, что озонирование образца крови проводят во время обработки MCSF. В частности, обработка MCSF может проводиться на образце крови во время озонирования.

В соответствии с другими возможными вариантами осуществления изобретения способ предусматривает, что озонирование образца крови проводят после обработки MCSF. В частности, обработка MCSF может проводиться на образце крови перед его озонированием.

В соответствии с возможными вариантами осуществления изобретения, которые могут комбинироваться со всеми вариантами осуществления изобретения, описанными здесь, способ предусматривает, что озонирование обеспечивает подачу к образцу крови смеси  $O_2-O_3$ .

В соответствии с возможными вариантами осуществления изобретения, которые могут комбинироваться со всеми вариантами осуществления изобретения, описанными здесь, способ предусматривает стехиометрическое соотношение крови к смеси  $O_2-O_3$ , равное 1:1.

В соответствии с возможными вариантами осуществления изобретения, которые могут комбинироваться со всеми вариантами осуществления изобретения, описанными здесь, способ предусматривает количество смеси  $O_2-O_3$  в образце крови большее или равное приблизительно 1 мкг/л.

В соответствии с возможными вариантами осуществления изобретения, которые могут комбинироваться со всеми вариантами осуществления изобретения, описанными здесь, способ предусматривает, что количество смеси  $O_2-O_3$  в образце крови может выбираться в интервале от приблизительно 1 мкг/л до приблизительно 42 мкг/л.

В соответствии с возможными вариантами осуществления изобретения, которые могут комбинироваться со всеми вариантами осуществления изобретения, описанными здесь, способ предусматривает прибавление антикоагулянта к образцу крови.

В соответствии с возможными вариантами осуществления изобретения, которые могут комбинироваться со всеми вариантами осуществления изобретения, описанными здесь, способ предусматривает применение комплекта для сбора крови, который включает по меньшей мере контейнер, способный вмещать по меньшей мере отобранную кровь, содержащую по меньшей мере вещество MCSF.

В соответствии с возможными вариантами осуществления изобретения, которые могут комбинироваться со всеми вариантами осуществления изобретения, описанными здесь, способ предусматривает, что количество отобранного и обработанного образца крови составляет от 0,2 до 100 мл, в частности от 0,5 до 50 мл, конкретнее от 1 до 25 мл, еще конкретнее от 2 до 10 мл, конкретнее от 2 до 8 мл, конкретнее от 3 до 8 мл, конкретнее от 3 до 5 мл.

В соответствии с возможными вариантами осуществления изобретения, которые могут комбинироваться со всеми вариантами осуществления изобретения, описанными здесь, способ предусматривает, что концентрация MCSF находится в интервале от приблизительно 1 нМ до приблизительно 55 нМ.

В соответствии с возможными вариантами осуществления изобретения, которые могут комбинироваться со всеми вариантами осуществления изобретения, описанными здесь, способ предусматривает время выращивания и депрограммирования при помощи обработки MCSF *in vitro*, включающее от 4 часов до 96 ч.

Кроме того, другие варианты осуществления изобретения, описанные здесь, относятся к способу размножения взрослых стволовых клеток из крови, который состоит исключительно из выращивания и депрограммирования взрослых стволовых клеток образца крови, который был отобран с использованием

обработки образца крови MCSF in vitro.

Варианты осуществления изобретения, описанные здесь, также относятся к образцу крови, содержащему взрослые стволовые клетки, получаемые способом согласно настоящему описанию.

В соответствии с возможными вариантами осуществления изобретения, этот образец крови предлагается для применения при терапевтическом лечении и/или профилактике патологий.

В соответствии с возможными вариантами осуществления изобретения, образец крови предлагается для применения при терапевтическом лечении, в том числе при лечении патологических изменений, как наружных, так и внутренних, повреждений сухожилий, связок и хрящей, переломов костей, для лечения и/или профилактики хронических и/или острых воспалительных патологий, неврологических и нейродегенеративных патологий, сердечных патологий, опухолевых патологий, аутоиммунных патологий, офтальмологических патологий и генетических патологий.

В соответствии с возможными вариантами осуществления изобретения, образец крови предлагается для применения при лечении, которое предусматривает внутривенное, внутриартериальное или локальное введение (например, подкожное, внутримышечное или внутритканевое) образца крови, обработанного MCSF и озонированного.

В соответствии с другими возможными вариантами осуществления изобретения, образец крови предлагается для применения при лечении, которое предусматривает внутривенное, или внутриартериальное, или локальное введение (например, подкожное, внутримышечное или внутритканевое) образца крови, обработанного MCSF и системного озонирования пациента.

Варианты осуществления изобретения, описанные здесь, также относятся к комплекту, включающему по меньшей мере контейнер, содержащий образец крови с взрослыми стволовыми клетками, получаемыми способом согласно настоящему описанию.

Эти и другие аспекты, характеристики и преимущества Настоящего изобретения будут лучше поняты со ссылкой на следующее описание, чертежи и прилагаемую формулу изобретения. Чертежи, которые включены в описание и составляют часть настоящего описания, показывают некоторые варианты осуществления настоящего изобретения и вместе с описанием предназначены для описания принципов раскрытия.

Различные аспекты и характеристики, описанные в настоящем описании, могут применяться отдельно там, где это возможно. Эти отдельные аспекты, например аспекты и характеристики, описанные в приложенных зависимых пунктах формулы изобретения, могут быть объектом выделенных заявок.

Понятно, что любой аспект или характеристика, которая обнаружена в процессе патентования, являясь уже известной, не должна быть заявлена и должна являться предметом отказа от прав.

#### **Подробное описание некоторых вариантов осуществления изобретения**

Далее будем подробно ссылаться на различные варианты осуществления настоящего изобретения. Каждый пример приводится с целью иллюстрации изобретения и не должен истолковываться как его ограничение. Например, показанные или описанные характеристики, поскольку они являются частью одного варианта осуществления изобретения, могут приниматься или совместно с другими вариантами осуществления изобретения представлять другие варианты осуществления изобретения. Понятно, что настоящее изобретение должно включать все такие изменения и варианты.

Прежде чем описывать эти варианты осуществления изобретения, мы должны также уточнить, что настоящее описание не ограничивается его применением к деталям конструкции и расположению компонентов, как описано в последующем описании с помощью приложенных чертежей. Данное описание может представлять другие варианты осуществления изобретения и могут получаться или выполняться различными другими путями. Мы должны также уточнить, что фразеология и терминология, используемая в данном изобретении, предназначена только применительно к описанию и не может рассматриваться как ограничительная.

Термины, такие как "приблизительно", "обычно", "по существу" и прочие следует истолковывать по их функции модифицирования значения или величины, которая не является абсолютной, но о которой не сообщается в предшествующем уровне техники. Такие термины будут определяться особыми обстоятельствами и условиями, которые они собираются изменить в соответствии с общей акцептацией таких терминов в конкретной области. Они должны принять во внимание по меньшей мере степень ожидаемой экспериментальной ошибки, технической ошибки и инструментальной погрешности для данной методики, предназначенной для измерения величины. Если не указано особо, в данном описании форму единственного числа следует понимать как включающую формы множественного числа, если только в контексте не говорится об обратном.

Все интервалы, о которых сообщалось, следует понимать как включающие крайние значения, в том числе те, которые описывают интервал "между" двумя значениями, если не указано особо.

Настоящее описание также включает интервалы, которые получаются от объединения или перекрытия двух или нескольких описанных интервалов, если не указано особо.

Настоящее описание также включает интервалы, которые могут получаться при объединении двух или нескольких значений, взятых в различных точках, если не указано особо.

Если не определено особо, все технические и научные термины, используемые в данном изобрете-

нии, и далее имеют те же значения, как это обычно понятно специалисту с обычным опытом в области, к которой относится настоящее изобретение.

Хотя и способы, и материалы (вещества), аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в данном изобретении, могут применяться на практике и в исследованиях настоящего изобретения, способы и материалы (вещества) описаны ниже в качестве примера. В случае возникновения разночтений данная заявка будет иметь преимущественную силу, включая ее определения. Материалы (вещества), способы и примеры имеют исключительно иллюстративную цель и не должны восприниматься ограничительно.

Описанные варианты осуществления изобретения относятся к способу размножения взрослых стволовых клеток из крови, который предусматривает:

выращивание и депрограммирование взрослых стволовых клеток образца крови, который был отобран у пациента, используя обработку образца крови MCSF *in vitro*;  
озонирование образца крови.

В частности, кровь может быть цельной кровью, конкретнее, цельной периферической кровью.

Таким образом, настоящее изобретение позволяет получить плюрипотентные взрослые стволовые клетки из взятого образца крови.

В действительности, как описано в WO-A-2008/034370 и WO-A-2009/115522, полученные стволовые клетки имеют маркеры CD90, CD90/34, CD34 и CD117, они также экспрессируют некоторые внутриклеточные факторы транскрипции, которые тесно связаны с плюрипотентными характеристиками (Sox2, Oct3/4 и Nanog) и не теряют своих факторов распознавания "своих" после деления или размножения. При введении пациенту стволовые клетки не вызывают побочных эффектов, таких как отторжение, инфекция, развитие тератом, они способны дифференцировать сами себя "in vivo" и, следовательно, вести себя как плюрипотентные стволовые клетки.

Выражение "выращивание и депрограммирование взрослых стволовых клеток образца крови, который был взят у пациента, используя обработку образца крови MCSF *in vitro*" означает, что образец крови, который был взят у пациента и который содержит определенное количество взрослых стволовых клеток, обрабатывают *in vitro* с MCSF для получения роста взрослых стволовых клеток, изначально присутствующих в образце крови, путем депрограммирования клеток белой линии крови.

Кроме того, мы подчеркиваем, что выражение "озонирование" здесь означает обработку образца крови озоном, то есть, прибавление, доставка, введение или смешивание озона или смеси кислорода и озона в образце крови.

Озон (формула O<sub>3</sub>) является аллотропной формой кислорода, трехатомной молекулой с молекулярной массой 48. При нормальных условиях озон представляет собой газ голубого цвета с едким запахом и характеризуется сильной окислительной способностью. Озон может выступать в качестве дезинфицирующего средства, дезодоранта, бактерицидного вещества, стерилизующего средства или окислителя в многочисленных органических синтезах.

В соответствии с возможными вариантами осуществления изобретения озонирование образца крови можно проводить перед обработкой MCSF.

В соответствии с возможными вариантами осуществления изобретения озонирование образца крови можно проводить одновременно с обработкой MCSF.

В соответствии с возможными вариантами осуществления изобретения озонирование образца крови можно проводить после обработки MCSF.

В соответствии с возможными вариантами осуществления изобретения предлагается к образцу крови прибавить антикоагулянт. Примерами возможных антикоагулянтов являются гепарин, EDTA или цитрат натрия.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ согласно настоящему описанию может предусматривать применение комплекта для сбора крови для получения плюрипотентных стволовых клеток в соответствии с описанным выше способом, включающего по меньшей мере контейнер, наподобие пробирки, способной вместить взятый образец крови, содержащий вещество MCSF и, возможно, если предусмотрено, указанный антикоагулянт.

С комплектом этого типа возможно собрать цельную кровь, предпочтительно периферическую кровь, для того чтобы быстро запустить рост и получение стволовых клеток описанным выше способом согласно настоящему описанию и, следовательно, получить их гораздо быстрее.

Описанные здесь варианты осуществления изобретения могут обеспечить количество образца крови, отобранного и обработанного описанным способом, который заключается в выращивании и депрограммировании с помощью MCSF и озонировании образца крови, составляет лишь несколько миллилитров, например, составляет от 0,2 до 100 мл, в частности от 0,5 до 50 мл, конкретнее от 1 до 25 мл, еще конкретнее от 2 до 10 мл, конкретнее от 2 до 8 мл, конкретнее от 3 до 8 мл, еще конкретнее от 3 до 5 мл.

Другие варианты могут обеспечить количество образца крови, отобранного и подвергнутого росту и депрограммированию с помощью MCSF, составляет несколько сотен миллилитров, например от 100 до 1000 мл, в частности от 200 до 600 мл, конкретнее от 400 до 600 мл, например 500 мл. Образец крови может вводиться в виде инъекции в кровотоки пациента (внутривенно или внутриаартериально), который

впоследствии может подвергаться системной терапии озоном.

Некоторые варианты осуществления изобретения, которые могут объединяться со всеми описанными здесь вариантами осуществления изобретения, могут обеспечить способ, как описано выше, при котором можно использовать любой тип контейнера, в который может вводиться цельная кровь и озон с любым типом возможного антикоагулянта и при любой концентрации MCSF, например в интервале от примерно 1 нМ до примерно 55 нМ. Примеры подинтервалов могут составлять от 2 до 50 нМ или от 5 до 45 нМ. Другие примеры подинтервалов могут составлять от 2 до 20 нМ, или от 8 до 15 нМ, или от 8 до 10 нМ, или от 10 до 12 нМ, или от 12 до 35 нМ, или от 15 до 30 нМ, или от 20 до 25 нМ, или от 35 до 55 нМ, или от 40 до 50 нМ, или комбинации всех этих интервалов или подинтервалов, также включая все целые количества или фракции, присутствующие в интервалах или подинтервалах, упомянутых и явно не указанных в данном изобретении.

Некоторые варианты осуществления изобретения, которые могут объединяться со всеми описанными здесь вариантами осуществления изобретения, могут предусматривать, чтобы при озонировании в образец крови подавалась смесь  $O_2-O_3$ .

В возможных практических реализациях заявитель обнаружил, что отношение крови к смеси  $O_2-O_3$  предпочтительно может быть стехиометрическим соотношением 1:1.

В возможных практических реализациях количество смеси  $O_2-O_3$  в образце крови может быть больше или равно приблизительно 1 мкг/л, в частности выбрано в интервале от приблизительно 1 мкг/мл до приблизительно 42 мкг/мл, конкретнее от приблизительно 5 мкг/мл до приблизительно 30 мкг/мл, еще конкретнее от приблизительно 10 мкг/мл до приблизительно 20 мкг/мл.

Некоторые описанные здесь варианты осуществления изобретения предусматривают, что, оставив кровь при этих условиях, предпочтительно при комнатной температуре, после определенного времени, предпочтительно от 4 до 96 ч, в частности от 4 до 72 ч, конкретнее от 4 до 48 ч, полученная таким образом цельная кровь с компонентом стволовых клеток, полученных из депрограммирования, может быть полностью повторно инокулирована системно (внутривенно или внутриартериально) или локально в пораженную ткань или вблизи ее.

В возможных практических реализациях время роста и депрограммирования с использованием обработки MCSF *in vitro* может составлять от 12 до 96 ч, в частности от 12 до 72 ч, конкретнее от 12 до 36 ч.

В возможных практических реализациях время роста и депрограммирования с использованием обработки MCSF *in vitro* может составлять от 24 до 96 ч, в частности от 24 до 72 ч, конкретнее от 24 до 36 ч.

В возможных практических реализациях время роста и депрограммирования с использованием обработки MCSF *in vitro* может составлять от 48 до 96 ч, в частности от 48 до 72 ч, конкретнее от 48 до 60 ч.

Заявитель выдвинул гипотезу, что озонирование образца крови, подвергнутого росту и депрограммированию с использованием обработки MCSF *in vitro*, стимулирует процесс размножения и депрограммирования взрослых стволовых клеток, так что через несколько часов появляется значительное количество полезных взрослых стволовых клеток.

Заявитель обнаружил, что продолжительность обработки MCSF *in vitro*, включающее от приблизительно 4 до 96 ч, может привести к стабилизации роста стволовых клеток, с идентификацией стволовых маркеров CD90, CD90/34, CD34 и CD117. Полагают, что это является оптимальным условием.

Заявитель также обнаружил, что при концентрациях MCSF от приблизительно 1 нМ до приблизительно 55 нМ клетки поддерживают фенотип плюрипотентных взрослых стволовых клеток. Было отмечено, что используя MCSF при концентрациях более чем 55 нМ (например 70 нМ), уже через 24 ч клетки больше не поддерживают фенотип плюрипотентных взрослых стволовых клеток.

Варианты реализации способа, описанные в данном изобретении, могут использовать не только упомянутый контейнер, в котором находится MCSF и где происходит размножение взрослых стволовых клеток, но также возможность использования второго контейнера для хранения стволовых клеток, полученных как описано выше, например, в случае использования внутривенно или внутриартериально и, возможно, третьего контейнера другого объема для локального применения. Полученные и сохраненные стволовые клетки в указанных контейнерах можно использовать сразу же или можно сохранить, например в жидком азоте, для последующего использования, по мере надобности.

Озонирование согласно настоящему описанию можно проводить на образцах крови, содержащих стволовые клетки, перед, во время или после размножения и депрограммирования с MCSF, содержащимся в каждой из упомянутых контейнеров.

В соответствии с возможными вариантами осуществления изобретения кровь, только что взятая у пациента, может быть непосредственно помещена в пробирку с антикоагулянтом и MCSF. Антикоагулянт может остановить процесс коагуляции, в то время как одновременное присутствие MCSF позволяет быстро начать процесс размножения и гарантировать сведение до минимума времени начала лечения пациента. Кроме того, образец подвергается озонированию согласно настоящему описанию.

В соответствии с другими возможными вариантами осуществления изобретения антикоагулянт мо-

жет прибавляться к крови, взятой у пациента для того, чтобы остановить коагулирование крови, которая подвергается процессу консервации, который не изменяет ее способность производить стволовые клетки. При необходимости, кровь берется из места, где ее сохраняют и подвергают процедуре размножения стволовых клеток, как описано выше, иными словами, прибавление вещества MCSF к ней, быстро получая необходимое количество стволовых клеток. Кроме того, в этом случае тоже образец подвергается озонированию согласно настоящему описанию.

Способ согласно настоящему описанию позволяет преодолеть недостатки существующего уровня техники и влечет за собой многочисленные преимущества.

Например, настоящее изобретение позволяет подготовить и обработать цельную кровь, чрезвычайно упрощая лечение, устраняя необходимость того, чтобы для любого типа клеток обработку проводили в лаборатории. Действительно, настоящее изобретение исключает необходимость или возможность проведения лечения, например с устранением красных кровяных телец или очисткой стволовых клеток в отношении всех других компонентов крови, получением большого количества плюрипотентных стволовых клеток по сравнению с другими двумя компонентами стволовых клеток, гемопоэтических и мезенхимальных, или культивированием или дифференцировкой их в другие типы клеток. Эти дополнительные обработки обычно могут вызвать стресс у полученных стволовых клеток, оставляя их живыми, но с уменьшенной информацией и энергетическим потенциалом. Напротив, настоящее изобретение устраняет необходимость во всей дальнейшей подготовке и обработке образца крови, в результате чего взрослые стволовые клетки, присутствующие в цельной крови, сохраняют свои характеристики лучше, потому что они не подвергаются стрессу, и потому, что в крови они могут извлечь пользу от наличия других элементов, которые содействуют регенеративному процессу.

Заявитель обнаружил, что неизлечимые патологии, такие как дистрофия миокарда, излечиваются с хорошими результатами стволовыми клетками, полученными из крови посредством депрограммирования, как описано в WO-A-2008/034370, имеется решительно более позитивная динамика с депрограммированными стволовыми клетками цельной крови, без дополнительных технологических операций и обработки, как описано выше, таким образом, используя способ, который может также состоять исключительно из роста и депрограммирования с MCSF, без дополнительных подготовительных стадий, включая очистку, последующее размножение, или который может включать рост и депрограммирование с MCSF и озонирование.

Получение стволовых клеток способом, описанным здесь, устраняет необходимость в сложном лабораторном приготовлении, давая возможность любой больнице, клинике или врачу приготовить стволовые клетки с помощью простой пробирки с предпочтительно минимальным количеством MCSF. Другими словами, с помощью единственной пробирки, в которую помещено несколько миллилитров образца крови с MCSF, возможно лечить и улучшить состояние даже при серьезных патологиях, таких как, например, последствия инфаркта миокарда или болезнь Паркинсона. Таким образом, данные результаты подтверждают тот факт, что в соответствии с возможными вариантами осуществления изобретения, способ размножения взрослых стволовых клеток из крови также может состоять исключительно из выращивания и депрограммирования взрослых стволовых клеток образца крови, используя обработку *in vitro* образца крови с помощью MCSF.

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления изобретения, прибавление или введение озона в образец крови при озонировании образца крови, может иметь катализирующее влияние на депрограммирование взрослых стволовых клеток и на качество полученных стволовых клеток, их информацию и энергосодержание, так что оно положительно влияет на регенерацию клеток поврежденных тканей, а также дает дополнительные гарантии, что продукт является стерильным. Действительно, как мы уже говорили, озон может действовать в качестве дезинфицирующего средства или бактерицидного вещества.

#### **Экспериментальные данные**

Заявитель предложил идею обработки с помощью MCSF и озонирования, то есть прибавления озона или смеси кислорода и озона для размножения и "депрограммирования" с MCSF, после некоторых экспериментов *in vivo*, которые доказывают катализирующее действие озона в проведенной терапии с депрограммированными стволовыми клетками, полученными на стадии роста согласно настоящему описанию.

Системное озонирование.

Лошадь 15-летнего возраста была снята с состязаний из-за хронического проксимального поражения в передней правой поверхности сгибателя сухожилия, что являлось причиной ее прихрамывания в течение 18 месяцев (см. фиг. 1). Она предварительно проходила лечение "прижиганием" в течение 6 месяцев, что много лет назад было обычной практикой (см. фиг. 2); это не дало какого-либо положительного терапевтического эффекта и, более того, вызвало рубцовый склероз. Лошадь имела плохое общее состояние, и прижигание вызвало проксимальное поражение (см. фиг. 3) в чувствительной области, которое трудно поддается лечению у лошадей постарше. Прижигание привело к шраму, так что даже местные инъекции размноженных стволовых клеток, полученных путем депрограммирования с помощью MCSF, каждые 6 недель по три раза не дали какого-либо улучшения, иными словами, даже минимального улучшения не было получено ни при ультразвукографическом обследовании, ни в уменьшении хромо-

ты. После 5 месяцев таких инъекций размноженными стволовыми клетками лошадь могла работать, но патологическое изменение начало ухудшаться (см. фиг. 4 и 5).

Таким образом, в данном случае склерозу сухожилия из-за прижигания локальная и системная инокуляция депрограммированных стволовых клеток из крови, полученных с помощью размножения с MCSF, не дала никакой пользы после трех инокуляций, сделанных с указанной периодичностью.

Через пятнадцать дней после третьей инокуляции, провели системное лечение озоном посредством аутогемотрансфузии с пол-литра крови, обогащенной  $120 \text{ см}^3 \text{ O}_2\text{-O}_3$ , 10 мкг/мл.

Неожиданно в экспериментах заявитель обнаружил, что при введении озона системно, то есть через переливание крови с аутологичной кровью, обогащенной озоном для оксигенирования крови пациента, только на десятый/пятнадцатый день было возможно оценить каталитическое действие озона, поскольку ультрасонография показала, что повреждение было устранено, и лошадь больше не хромала (см. фиг. 6). Патологическая ткань, о которой ранее сообщалось, при инокуляции стволовых клеток, полученных из крови с размножением с помощью MCSF, активируя стволовые клетки элемента поврежденной поверхности сгибателя сухожилия, была излечена при катализирующем влиянии озона на регенеративный процесс.

По истечении трех месяцев после озонотерапии эхокардиографический анализ ясно показал, что повреждение было вылечено (см. фиг. 7 и 8).

Как доказательство фактического выздоровления с позитивными и долгосрочными последствиями, лошадь заставили работать в течение 15 дней и пустили участвовать в соревнованиях. Улучшение, показанное с помощью ультрасонографии, являлось реальным, поскольку лошадь продолжала регулярно участвовать в среднем в шести соревнованиях в месяц, ее спортивная карьера с прыжками до 1,60 м продолжалась до 18-летнего возраста. Действительно, лошадь продолжала участвовать в соревнованиях в течение более трех лет без каких-либо рецидивов, участвуя в соревнованиях по прыжкам в 16- (см. фиг. 9), в 17- (см. фиг. 10) и в 18-летнем возрасте (см. фиг. 11).

Катализирующий эффект озона на стволовые клетки, полученные из крови взрослого организма путем размножения и депрограммирования с MCSF, обнаружен *in vivo* в ходе эксперимента, описанного выше.

После этого случая озонотерапию вводили в качестве каталитического средства многим пациентам, получавшим лечение стволовыми клетками, полученными из крови, размноженными и депрограммированными с помощью MCSF.

Влияние *in vivo* на стволовые клетки, полученные из крови, позволяет предположить тот же каталитический эффект также *in vitro*, то есть, в крови в пробирке, до, после или во время обработки с помощью MCSF.

Озонирование *in vitro*.

После полученных результатов у заявителя затем также зародилась новая и новаторская идея введения озона непосредственно в контейнер, содержащий кровь и MCSF, с тем чтобы катализировать процесс депрограммирования и придать больший энерго-информационный потенциал стволовым клеткам, полученным путем роста и депрограммирования с MCSF.

Влияние озона на кровь исследовалось заявителем как *in vitro*, так и *in vivo* (см. выше).

При барботировании его в кровь смесь  $\text{O}_2\text{-O}_3$  реагирует в течение нескольких секунд с жирными кислотами фосфолипидного слоя клеточной мембраны.

В результате этой реакции озона  $\text{O}_3$  с двойной связью ненасыщенных жирных кислот, фосфолипидные цепи разрываются и проникают внутрь эритроцитов в виде пероксидов, влияющих на реакции внутри эритроцитов, но не выходя за пределы клеточной мембраны. Но вследствие высокой цитотоксической мощности пероксидов эритроцит реагирует немедленно, активируя механизм детоксикации через глутатионовую систему. Таким образом, потребляемый глутатион восстанавливается через перезапуск гликолиза, то есть, пентозофосфатным путем.

Следовательно, гемоглобин (Hb) защищен от окисления в мета-гемоглобин, сохраняя функционирование  $\text{HbO}_2$ , обеспечивающего передачу кислорода  $\text{O}_2$ .

Необходимо также рассмотреть особую роль 2,3-дифосфоглицерата (2,3-disphosphoglycerate, 2,3-DPG) в отношении функции эритроцита. 2,3-DPG присутствует в эритроцитах, и его функция заключается в том, чтобы регулировать сродство гемоглобина к кислороду. С помощью озона, в частности, эффект выделения кислорода создается эритроцитом в периферических участках.

Другим вызывающим интерес действием является иммуностимулирующий эффект озона, вызванный индукцией интерферона. Среди иммунокомпетентных клеток ключевую роль играют Т4 лимфоциты или хелперные клетки, поскольку, активированные макрофагами, они производят специфические вещества, интерлейкины, факторы роста и т.д., которые действуют как межклеточные мессенджеры и облегчают коммуникацию между клетками.

После активации интерлейкинами, макрофаги продуцируют фактор некроза опухоли (Tumor Necrosis Factor, TNF), который служит в качестве стандарта для измерения активности иммунокомпетентных клеток.

Таким образом, озон действует непосредственно на клетки белой линии и косвенно через реакцию,

осуществляемую на эритроцитах, выполняя роль катализатора, на функцию клеточных линий крови и, следовательно, также на процесс депрограммирования, активируемый MCSF на клетках белой линии.

Что касается соотношения крови к смеси  $O_2-O_3$ , заявитель обнаружил, что эта величина предпочтительно является стехиометрическим соотношением 1:1.

Кроме того, заявитель обнаружил, что количество смеси  $O_2-O_3$  в образце крови может быть больше или равно приблизительно 1 мкг/л, в частности выбрано в интервале от 1 мкг/мл до приблизительно 42 мкг/мл, конкретнее от приблизительно 5 мкг/мл до приблизительно 30 мкг/мл, еще конкретнее от приблизительно 10 мкг/мл до около 20 мкг/мл. Один пример может обеспечить количество смеси  $O_2-O_3$  приблизительно 12 мкг/мл. Другой пример может обеспечить количество смеси  $O_2-O_3$  приблизительно 15 мкг/мл. Еще один пример может обеспечить количество смеси  $O_2-O_3$  приблизительно 18 мкг/мл.

#### **Пример терапевтического лечения дегенеративной патологии миокарда**

Заявитель провел эксперимент, чтобы показать эффективность в клинической практике стволовых клеток, полученных от депрограммирования озонированной цельной крови, вводимой при дегенеративных патологиях миокарда.

На фиг. 12 и 13 представлены две таблицы, содержащие важные параметры сократительной функции, для сравнения результатов лечения патологий с сердечной недостаточности у 11 собак с использованием стволовых клеток, полученных, как описано в WO-A-2008/034370, и у 3 собак с использованием стволовых клеток, полученных способом согласно настоящему описанию, то есть с выращиванием и депрограммированием с помощью MCSF и озонированием (озонированная цельная кровь). Путем сравнения параметров можно отчетливо заметить улучшение при повышении сократительной способности при использовании способа, описанного здесь, в отличие от WO-A-2008/034370, и, в частности, тот факт, что это улучшение происходит уже в короткий срок (контроль 45 дней).

В частности, заявитель лечил 3 собак (1 самец Great Dane (Великий датчанин), 1 самец Newfoundland (Ньюфаундленд), 1 самка Dobermann (Доберман)) одинакового возраста (6-7), пораженных первичной дилатационной миокардиопатией на ее запущенных стадиях (патология, которая вызывает прогрессирующую потерю сократительной функции, сейчас нет возможности регрессии с использованием любого вида терапии) с тяжелой депрессией сократительной функции (FS 15-20%). Собак лечили размноженными стволовыми клетками, депрограммированными с MCSF от озонированной цельной крови, и введенной без какой-либо очистки внутривенно и подкожно в сердечную зону. Изображения эхокардиографического исследования на фиг. 14 и 16 показывают состояние двух разных пациентов (самка Dobermann Chanel (Доберман Шанель) и самец Newfoundland Leonardo (Ньюфаундленд Леонардо) на основании таблицы на фиг. 13) до начала лечения, где можно увидеть параметры сократительной функции: крайне отрицательные значения DsVSx (систолический диаметр левого желудочка), FS % и FE %.

Напротив, как видно из эхокардиографических изображений на фиг. 15 и 17 для тех же двух пациентов, после лечения заявитель обнаружил повышение сократительной способности, измеренной с помощью линейной и объемной оценки (метод Тейхольца и Симпсона, Teicholz & Simpson method) параметров сократительной функции DsVSx (систолический диаметр левого желудочка), FS % и FE %. Этот эффект гораздо более резко проявился уже в ближайшее время (контроль на 45 день в отношении результатов, полученных в тот же период времени у пациентов, ранее получивших лечение типичным представителем очищенных стволовых клеток, полученных из крови, как описано в WO-A-2008/034370).

Также в отношении проявлений, вызванных дегенеративной патологией миокарда, на общее состояние и клиническую оценку по ISACHS классу тяжести сердечной недостаточности, улучшение, найденное заявителем, было гораздо более быстрым, с восстановлением аппетита, значительным увеличением веса и значительным улучшением физической работоспособности и устойчивости к стрессу уже через 1 месяц.

Поэтому заявитель пришел к выводу, что способ размножения взрослых стволовых клеток из крови, включая выращивание с помощью MCSF и озонирование согласно настоящему изобретению, позволяет восстановить сократимость миокарда, которая стала недостаточной из-за его дегенерации: в настоящее время нет возможности восстановления с помощью современной терапии. Действительно, в ветеринарии были предприняты другие попытки разрешений через регенеративную медицину, но даже инокулирование мезенхимальных стволовых клеток различного происхождения (костный мозг, жировая клетчатка) в миокард, собственно не дал существенных терапевтических результатов.

За счет использования стволовых клеток, полученных из крови, которые имеют плюрипотентный компонент, вследствие способности их взаимодействовать с мышцей и ее иннервацией, были получены положительные результаты с постепенным улучшением в течение продолжительного периода. Однако наиболее неожиданный эффект был установлен при введении взрослых стволовых клеток из цельной крови, которые озонированы и не очищены, внутривенно и подкожно в сердечную зону, что улучшило терапевтический результат по сравнению с очищенными клетками и дало хороший результат в гораздо более короткое время.

Эхокардиографические изображения на фиг. 14, 15, 16 и 17 доказывают, какие исключительные улучшения получены.

Очевидно, что могут быть частично внесены модификации и/или дополнения в способ размножения

взрослых стволовых клеток из цельной крови, как описано выше, без выхода за пределы существа и объема данного изобретения.

Также понятно, что хотя настоящее изобретение было изложено со ссылкой на некоторые конкретные примеры, специалист в данной области непременно сможет достичь многие другие эквивалентные варианты способа размножения взрослых стволовых клеток из цельной крови с характеристиками, как это предусмотрено в формуле изобретения, и следовательно, все они подпадают под область защиты, определенной таким образом.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

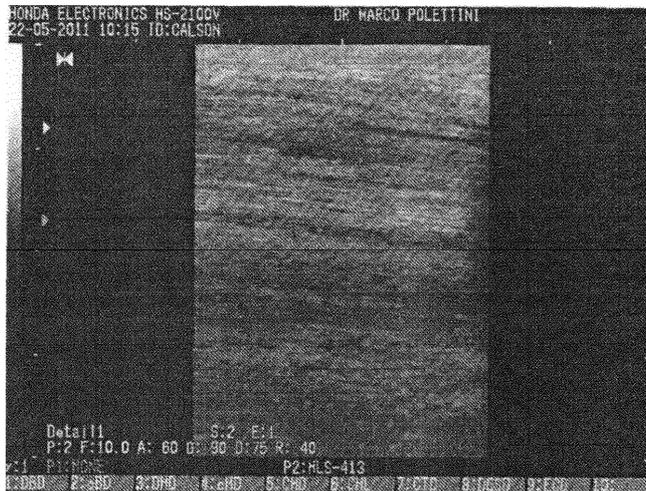
1. Способ размножения взрослых стволовых клеток из крови, включающий выращивание и депрограммирование взрослых стволовых клеток образца крови, который был отобран, с использованием обработки образца крови с помощью макрофагального колониестимулирующего фактора MCSF *in vitro*, озонирование образца крови, при этом обеспечивают стехиометрическое соотношение крови к смеси  $O_2-O_3$ , равное 1:1, количество смеси  $O_2-O_3$  в образце крови выбирают в интервале от приблизительно 1 мкг/мл до приблизительно 42 мкг/мл, при этом концентрация MCSF находится в интервале от приблизительно 1 нМ до приблизительно 55 нМ, и время выращивания и депрограммирования при помощи обработки MCSF *in vitro* составляет от 4 до 96 ч, при этом к образцу крови прибавляют антикоагулянт.
2. Способ по п.1, при котором озонирование образца крови проводят до обработки MCSF.
3. Способ по п.1, при котором озонирование образца крови проводят во время обработки MCSF.
4. Способ по п.1, при котором озонирование образца крови проводят после обработки MCSF.
5. Способ по п.1 или 4, при котором количество смеси  $O_2-O_3$  в образце крови больше или равно приблизительно 1 мкг/л.
6. Способ по любому из пп.1-5, в котором количество образца крови, собранной и подвергнутой росту и депрограммированию с помощью MCSF и озонированию, составляет от 0,2 до 100 мл.
7. Способ по п.6, в котором количество образца крови, собранной и подвергнутой росту и депрограммированию с помощью MCSF и озонированию, составляет от 2 до 10 мл.
8. Способ по п.6, в котором количество образца крови, собранной и подвергнутой росту и депрограммированию с помощью MCSF и озонированию, составляет от 3 до 5 мл.



Фиг. 1



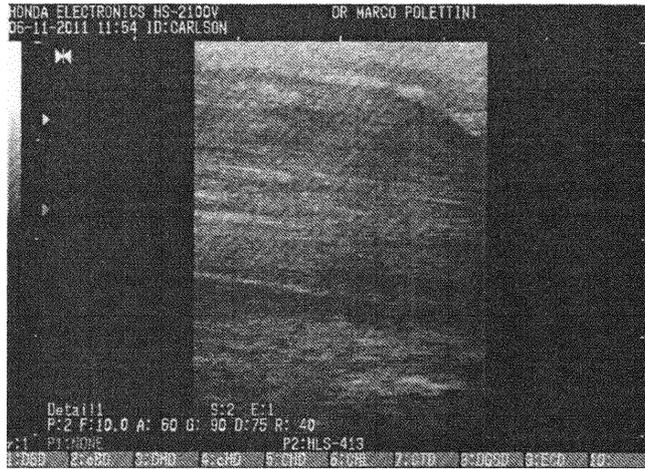
Фиг. 2



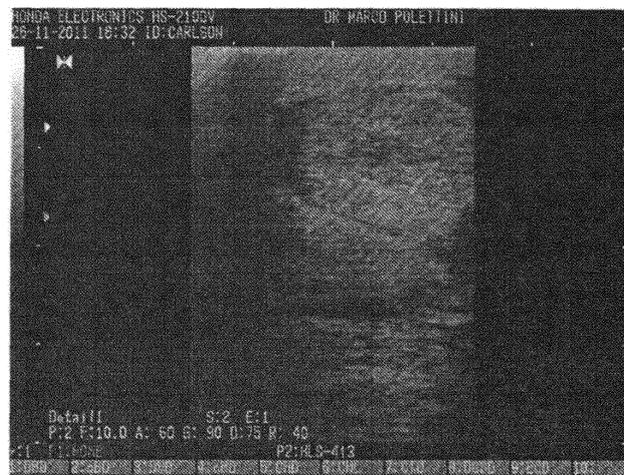
Фиг. 3



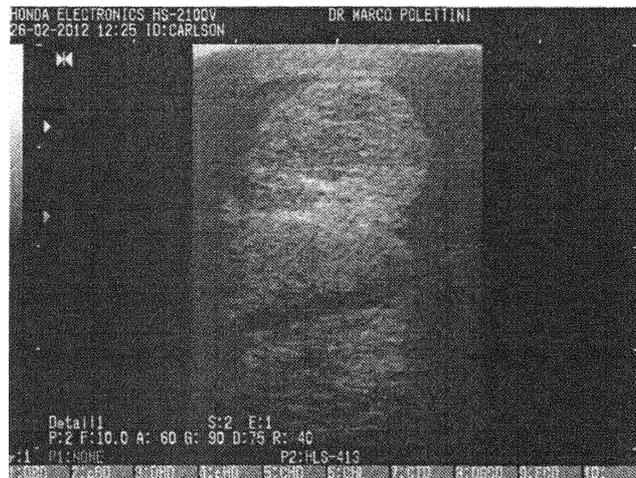
Фиг. 4



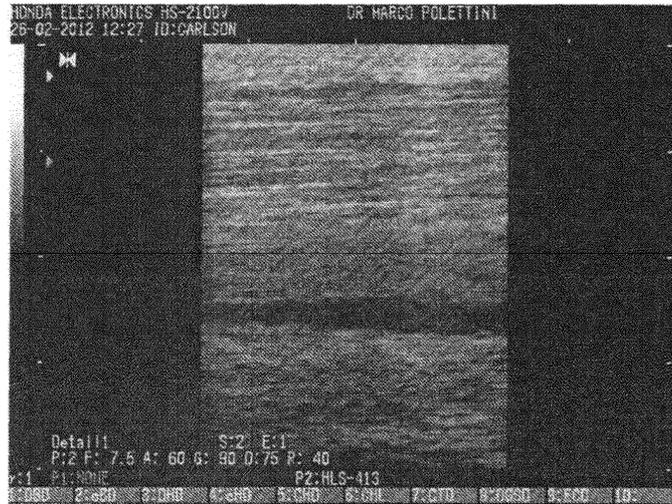
Фиг. 5



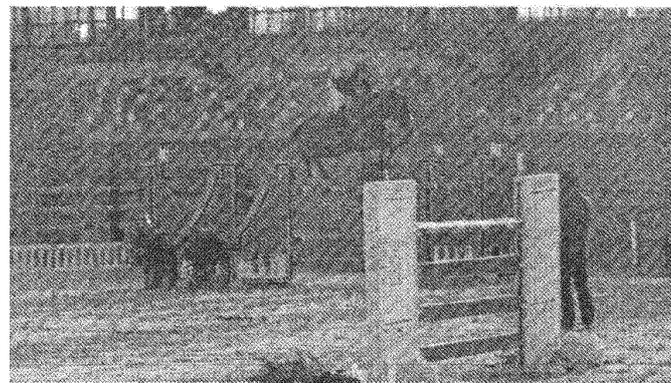
Фиг. 6



Фиг. 7



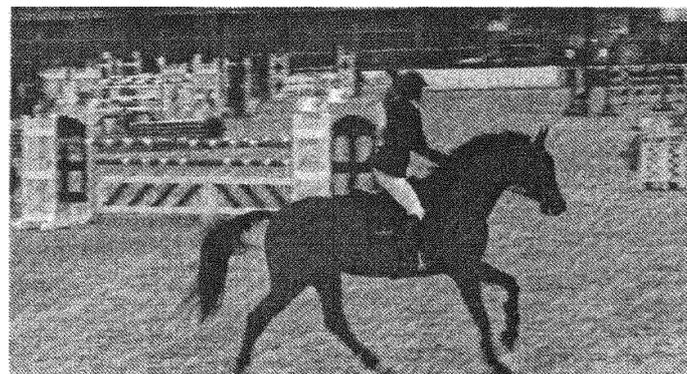
Фиг. 8



Фиг. 9

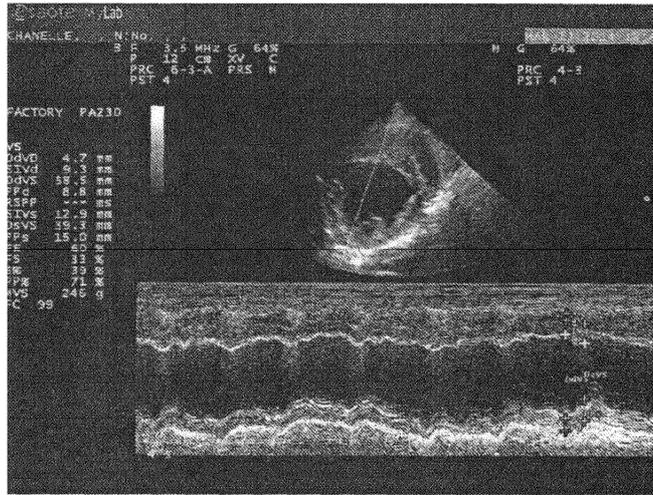


Фиг. 10

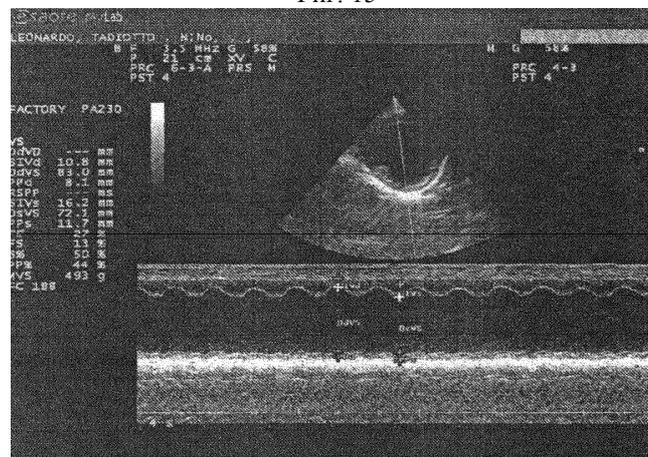


Фиг. 11

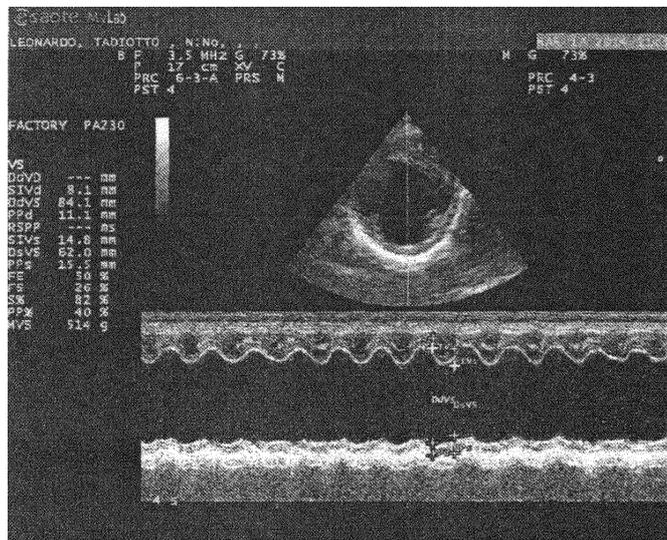




Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

