

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202191697 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2021.10.25

(51) Int. Cl. *C02F 1/461* (2006.01)  
*A61Q 19/08* (2006.01)  
*C02F 103/02* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2020.01.17

---

(54) ЭЛЕКТРОЛИЗОВАННАЯ ВОДА, СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ  
ТАКОЙ ВОДЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО СТАРЕНИЕМ  
КЛЕТОК

---

(31) 1900482

(72) Изобретатель:

(32) 2019.01.20

Пюпюна Лоран (СН), Гинтер Энтони  
(US)

(33) FR

(86) PCT/EP2020/051200

(74) Представитель:

(87) WO 2020/148453 2020.07.23

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

УОТЕРДИАМ ГРУП ЭлЭлСи (US)

---

(57) Изобретение относится к способу получения электролизованной воды, при этом способ включает следующие стадии, на которых i) добавляют в необработанную воду электропроводную соль в концентрации от 0,5 до 2 г/л, ii) проводят электролиз воды, полученной на стадии i), с использованием электролитического модуля, включающего по меньшей мере один легированный бором алмазный электрод, закрепленный на подложке из кремния, в котором концентрация бора составляет от 200 ( $3 \times 10^{19}$  атомов В/см<sup>3</sup>) до 1500 частей на миллион ( $2 \times 10^{20}$  В атомов В/см<sup>3</sup>), при этом длительность электролиза составляет от 1 до 60 мин. Изобретение также относится к воде, полученной указанным способом, для лечения заболеваний или нарушений, связанных со старением клеток, и к композиции, содержащей такую воду, способу усиления сенолитического характера стареющих клеток и к устройству для лечения патологических состояний кожи, включающему инфузионный резервуар или мешок для хранения жидкостей, содержащий воду, полученную способом настоящего изобретения.

A1

202191697

202191697

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-569620EA/019

### ЭЛЕКТРОЛИЗОВАННАЯ ВОДА, СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТАКОЙ ВОДЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО СТАРЕНИЕМ КЛЕТОК

[0001] Изобретение относится к области лечения болезней или нарушений, связанных со старением клеток, лечению рака или нейродегенеративных заболеваний. Более конкретно, изобретение относится к способу получения электролизованной воды, пригодной для лечения заболеваний или нарушений, связанных со старением клеток.

Изобретение также относится к воде, полученной этим способом, ее использованию для лечения заболеваний или нарушений, связанных со старением клеток, путем употребления непосредственно или в форме смесей и к надлежащему устройству для лечения таких состояний. Изобретение также относится к способу отбора нестаряющихся клеток, пригодных для пересадки.

[0002] Как было описано впервые Леонардом Хейфликом в 1961 г. при изучении первичных фибробластов (WI-38) в культуре, фибробласты пролиферировали некоторое ограниченное число раз удвоения популяции, после чего их рост останавливался на некотором пределе. Это явление он назвал старением клеток. Предел, именуемый пределом Хейфлика или пределом репликативного старения, наблюдается для большинства нормальных клеток (например, фибробластов, эндотелиальных клеток и т.д.).

[0003] Старение клеток в целом понимается как полная остановка клеточного цикла по разным причинам. Механизм остановки клеточного цикла, вызванной старением, сложный и включает взаимодействия между укорачиванием теломеров, воспалением и клеточным стрессом.

[0004] Занимаясь клеточным старением, поскольку оно влияет на возникновение таких заболеваний, как рак и связанные с возрастом нейродегенеративные расстройства, исследователи полагают, что это перспективное направление борьбы с указанными болезнями, тогда как обычный терапевтический арсенал, не лишенный побочных эффектов, еще остается практически неэффективным, если рассматривать, например, болезнь Альцгеймера.

[0005] Сошлемся на US2017198253, который относится к способу селективного уничтожения стареющих клеток с целью лечения болезней и нарушений, связанных со старением, путем применения сенолитического агента. Заболевания и нарушения, связанные со старением, которые поддаются лечению способами, включающими использование сенолитических агентов, описанных в этом документе, включают сердечно-сосудистые заболевания и нарушения, связанные с атеросклерозом или вызванные им, такие как атеросклероз; идиопатический пневмофиброз; хроническое обструктивное заболевание легких; остеоартрит; связанные со старением глазные болезни и связанные со старением дерматологические болезни. Сенолитические агенты включают

MDM2 ингибиторы, такие как производные цис-имидазолина, или ингибиторы белков Bcl-2, Bcl-xL или p-Akt.

[0006] Сошлемся на WO2018215795, который относится к агенту, предназначенному для селективного уничтожения одной или нескольких стареющих клеток, при этом, указанный агент выбран из следующих: сердечный гликозид или агликон, ингибитор киназы фокальной адгезии (focal adhesion kinase, FAK), ингибитор HMG-CoA редуктазы, JF D00244, циклоспорин, тирфостин AG879, кантаридин, хлорид дифенилйода, ротлерин, 2,3-диметокси-1,4-нафтохинон, LY-367, 265, ротенон, идарубицин, деквалиний хлорид, винкристин, нитазоксанид, нитрофуразон, темсиролимус, элтромбопаг, адапален, азациклонол, эноксацин и ралтегравир и их фармацевтически приемлемые соли. Другой аспект относится к соединениям, предназначенным для использования с целью лечения или предотвращения заболеваний или нарушений, связанных со старением, и соответствующим способам.

[0007] Также сошлемся на заявку US2018256568, которая относится к способу лечения заболевания или нарушения в целевой ткани пациента, у которого симптомы заболевания или нарушения вызваны, по меньшей мере частично, стареющими клетками, расположенными в целевой ткани или вокруг нее, при этом, целевая ткань не имеет раковых клеток, и, при этом, стареющие клетки определены как клетки, экспрессирующие белок p16.

[0008] Способ включает многократное терапевтическое воздействие на целевую ткань или вокруг нее фармацевтической композицией, содержащей сенолитический агент, вступающий в контакт со стареющими клетками, расположенными в целевой ткани или вокруг нее, и селективно удаляющий стареющие клетки, не затрагивая, если возможно, соседние нестареющие клетки. В заявке описан ряд химических молекул, позволяющих воздействовать на стареющие клетки.

[0009] Этим решениям, хотя и эффективным, свойственен недостаток, заключающийся в том, что химические агенты не лишены токсичности или побочных эффектов. Конечно, они позволяют воздействовать на стареющие клетки, но нельзя исключить, что они также воздействуют на здоровые клетки или ткани. Недостаточная селективность, связанная с использованием химических агентов, которые могут иметь несколько белковых целей, сопряжена с некоторым риском.

[0010] В случае трансплантатов, будь то, например кожа или печень, удаление стареющих клеток позволило бы во время трансплантации или операции пересадки ткани исключить передачу пациенту, помимо здоровых трансплантируемых клеток, также и стареющих клеток, которые в перспективе, в силу своего присутствия, могли бы вызывать заболевания. Это также является серьезной проблемой. Опять-таки, отбор надлежащих клеток или здоровой ткани, не содержащей стареющих клеток, для пересадки или трансплантации ткани с использованием химических агентов не чужд таким проблемам, как побочные эффекты или токсичность в отношении здоровых клеток или ткани.

[0011] Таким образом, имеется реальная потребность в альтернативных способах

или композициях, позволяющих селективно удалять или эффективно лечить стареющие клетки и заболевания, связанные с присутствием этих клеток, и, при этом, в уменьшении побочных эффектов способов лечения, а также в селективном воздействии на стареющие клетки, не затрагивая или затрагивая в малой степени здоровые клетки ткани или органа.

[0012] Следовательно, одной из целей изобретения является устранение указанных выше недостатков и удовлетворение указанных выше потребностей путем обеспечения электролизованной воды для лечения нарушений, связанных со старением клеток.

[0013] Более конкретно, одной из целей изобретения является использование электролизованной воды, соответствующей изобретению, при лечении заболеваний, связанных со старением клеток, в частности, таких как рак или нейродегенеративные расстройства.

[0014] Электролизованную воду, соответствующую изобретению, получают путем осуществления трехстадийного способа, в начале которого используют проточную или ключевую воду, необязательно, добавляя в нее сульфат, карбонат или другие совместимые соли, известные специалистам в данной области, в количестве от 0,5 до 2 г/л, проводят электролиз указанной воды в электролитическом модуле, включающем, по меньшей мере, один легированный бором алмазный электрод, закрепленный на подложке из кремния, в котором концентрация бора составляет от 200 частей на миллион ( $3 \times 10^{19}$  атомов В/см<sup>3</sup>) до 2000 частей на миллион ( $3,52 \times 10^{20}$  В атомов В/см<sup>3</sup>), в частности, от 200 частей на миллион ( $3 \times 10^{19}$  атомов В/см<sup>3</sup>) до 1500 частей на миллион ( $2 \times 10^{20}$  В атомов В/см<sup>3</sup>), при этом, в указанном модуле в процессе электролиза через воду пропускают ток в количестве менее 500 мАч/л воды, более предпочтительно, от 40 до 250 мАч/л воды, еще более предпочтительно, от 50 до 200 мАч/л воды, при этом, длительность электролиза составляет от 1 минуты до 60 минут.

[0015] Электролиз может быть проведен однократно, непрерывно или циклически, при этом, количество циклов составляет от 2 до 12 циклов за 24 часа, а два последовательных цикла проводят с интервалом, по меньшей мере, 30 мин.

[0016] Изобретение также относится к электролизованной воде, полученной описанным выше способом.

[0017] Изобретение также относится к способу усиления сенолитического характера стареющих биологических клеток, присутствующих в клеточной среде, отличающемуся тем, что он состоит во введении в клеточную среду электролизованной воды, полученной описанным выше способом. В частности, способ состоит в увеличении, по меньшей мере, активности бета-галактозидазы (SA-β-Gal), связанной со старением, путем приведения указанных клеток в контакт с полученной электролизованной водой. Авторами изобретения обнаружено, что электролизованная вода, полученная в соответствии с изобретением, обладает особым свойством значительного повышения активности бета-галактозидазы (SA-β-Gal), когда стареющие клетки, в частности, фибробласты, приводят в контакт с указанной водой.

[0018] Преимущественно, в соответствии с данным способом, процентное

содержание воды в клеточной среде строго больше 0 и, предпочтительно, больше 5%, более предпочтительно, больше 25%.

[0019] Преимущественно, в соответствии со способом усиления сенолитического характера, соответствующим изобретению, стареющие клетки выдерживают в клеточной среде в контакте с водой в течении периода, превышающего 1 мин.

[0020] Главным преимуществом такого усиления сенолитического характера стареющих клеток является возможность индуцированного отбора здоровых клеток в отличие от стареющих клеток путем ускорения естественного процесса старения в клеточной среде или биологической ткани и, таким образом, ускоренного исчезновения указанных клеток в пользу здоровых клеток. Это открывает исключительные возможности использования воды настоящего изобретения в профилактических целях, в качестве вспомогательной терапии или даже в качестве непосредственной терапии.

[0021] Изобретение также относится к композиции, содержащей электролизованную воду, полученную в соответствии с описанным выше способом, предназначенной для использования в качестве лекарственного средства при лечении заболеваний, связанных со старением.

[0022] Предпочтительно, нарушения, на которые направлено соответствующее изобретению использование, включают заболевания, связанные со старением, в частности, некоторые формы рака или нейродегенеративные заболевания.

[0023] Композиция, содержащая электролизованную воду, соответствующую изобретению, содержит от 95 до 100% электролизованной воды и от 0 до 5% вспомогательного вещества и/или эмульгатора.

[0024] Композиция, соответствующая изобретению, может иметь форму крема, геля, раневой повязки или даже куска пластыря.

[0025] Кроме того, когда композиция, соответствующая изобретению, может состоять исключительно из электролизованной воды, последняя может быть помещена во вмещающее ее устройство, такое как инфузионный резервуар или мешок для хранения жидкостей, вмещающий чистую электролизованную воду или электролизованную воду в составе жидкой композиции.

[0026] Электролизованную воду получают при помощи электролитического модуля, позволяющего осуществлять описанный выше способ, при этом, указанный модуль может присутствовать на постоянной или съемной основе в устройстве, таком как резервуар, при этом, указанный резервуар может быть использован для заполнения мешков для хранения жидкостей, например, на производственной линии.

[0027] Он также может находиться в обычной водораспределительной сети, предпочтительно, у выхода распределительной сети, такого как кран, если предусматривается приготовление из электролизованной воды напитков, которые могут потребляться перорально с целью лечения нарушений, связанных со старением клеток.

[0028] Изобретение также относится к способу отбора нестареющих клеток в клеточном экстракте или биологической ткани, включающей множество клеток, путем

приведения их в контакт с электролизованной водой, полученной путем осуществления способа, соответствующего изобретению, на период от 1 до 30 мин.

[0029] Так, получение клеточного экстракта или здоровой ткани, не содержащей, в целом или в значительной степени, стареющих клеток, путем осуществления способа отбора, описанного выше, может представлять интерес при обработке трансплантатов, в частности, кожи или печени.

[0030] Изобретение проиллюстрировано на прилагаемых чертежах:

[0031] На фиг. 1 показана эффективность соответствующей изобретению электролизованной воды, названной WDW, на линии опухолевых клеток типа хондросаркомы по сравнению с ультрачистой неэлектролизованной водой MQW.

[0032] На фиг. 2 показано преимущество электролизованной воды, полученной соответствующим изобретению способом, в отношении модификации активности SA- $\beta$ -Gal, увеличение которой свидетельствует о наличии стареющих клеток.

[0033] Далее изобретение описано более подробно на одном или нескольких примерах, которые ни коим образом не ограничивают изобретение.

[0034] С биологической точки зрения старение представляет собой сложный процесс, ведущий к медленному ухудшению функционирования клетки, которое лежит в основе старения организмов. Это сложный биологический механизм, включающий разрушение многих генов, в частности, в стареющих клетках. Обычно затрагивается теломерный участок хромосомы.

[0035] Теломер представляет собой многократно повторяющийся участок ДНК на конце хромосомы. Каждый раз, когда во время митоза, также называемого делением клетки, реплицируется стержневая хромосома эукариота, ферментативный комплекс ДНК полимеразы не может копировать последние нуклеотиды. С возрастом теломеры укорачиваются, предположительно, в результате воспаления и/или повторяющегося стресса, которому подвергаются организмы. В результате появляются болезни, такие как возрастной рак или нейродегенеративные заболевания в организме с большим количеством стареющих клеток.

[0036] Одной из основных характеристик стареющих клеток является то, что они перестают делиться, в отличие от нормальных клеток организма, но тот факт, что эти клетки уже не делятся, также означает, что режим их функционирования отличается от здоровых или нормальных клеток.

[0037] Они также активно модифицируют окружающую их среду, выделяя цитокины, факторы роста, а также протеазы внеклеточного матрикса.

Это явление играет важную роль в воспалительной реакции, перестройке формирования внеклеточного матрикса и сохранении стареющего состояния, которое с течением времени закончится дегенерацией ткани.

[0038] В некоторых случаях отсутствие роста компетентных клеток может лежать в основе патологии, как предполагают в случае глаукомы, катаракты, сахарного диабета или остеоартрита.

[0039] В других случаях причиной появления заболеваний может являться воспаление, вызванное SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype); стареющие клетки с большим воспалительным потенциалом постепенно проникают в тканевую окружающую среду, где они, в некотором смысле, «заражают» близлежащие здоровые клетки, которые, в свою очередь, становятся стареющими, как предполагают в случае таких заболеваний, как атеросклероз, сердечно-сосудистые заболевания, а также формы возрастного рака.

[0040] Точно также и в случае пересадки или трансплантации ткани, такой как кожа или печень, или даже органа, присутствие стареющих клеток со значительной воспалительной способностью может ограничивать эффективность пересадки у пациента, которому требуется, по возможности, наиболее «здоровый» трансплантат (содержащий как можно меньше стареющих клеток).

[0041] Настоящее изобретение, направленное на особую электролизованную воду, полученную способом, включающим использование особых легированных бором алмазных электродов, закрепленных на кремнии, позволяет разрешить, по меньшей мере частично, указанные выше проблемы или преодолеть указанные недостатки.

[0042] Электролитический модуль, позволяющий осуществлять способ получения электролизованной воды, соответствующей изобретению, включает, по меньшей мере, один, предпочтительно, по меньшей мере, два легированных бором алмазных электрода, которые закреплены на подложке из кремния.

[0043] Активная или контактная поверхность каждого электрода, преимущественно, составляет от 10 до 100 см<sup>2</sup>, предпочтительно, от 60 до 80, более предпочтительно, около 70 см<sup>2</sup>.

[0044] Легирование бором алмазного электрода также влияет на свойства получаемой воды; концентрация бора составляет от 200 частей на миллион ( $3 \times 10^{19}$  атомов В/см<sup>3</sup>) до 1500 частей на миллион ( $2 \times 10^{20}$  В атомов В/см<sup>3</sup>),

[0045] Такая концентрация бора, а также природа электродов на основе кремния и алмаза, придает им свойства, позволяющие функционировать при напряжении от -1 В до -2 В катодной поляризации и от +2 В до +4 В анодной поляризации относительно водородного эталонного электрода.

[0046] Электролитический модуль соединен с силовым модулем и открыт для потока воды, проходящего через него. Для надлежащего функционирования без нарушения корректных рабочих условий, силовым модулем на электроды подается постоянный ток; при этом, силовой модуль соединен с электролитическим модулем и подает на электрод или электроды постоянный ток.

Вообще, ток питания составляет от 1,5 А до 7 А. Если требуется изменение полярности, эта операция может быть выполнена автоматически силовым модулем.

[0047] Вода может поступать из различных источников, но должна проходить через электролитический модуль, так как модуль не может работать без воды. Вода может проходить через электролитический модуль на постоянной основе, в зависимости от

устройства, в котором она находится. Имеется внутренняя измерительная система, включающая гидравлический расходомер и соединенная с силовым модулем, которая осуществляет постановку модуля на консервацию, выключение или включение в зависимости от наличия воды и, таким образом, запуск электролиза.

[0048] Модуль электролиза воды, соответствующий настоящему изобретению, преимущественно, может эксплуатироваться в автоматическом режиме или может быть включен или выключен по необходимости, вручную или при помощи системы дистанционного управления.

[0049] Дополнительное преимущество настоящего изобретения состоит в том, что модуль электролиза воды не обязательно должен работать на постоянной основе, напротив, практичным образом может запускаться циклически, т.е., с удобными интервалами, предпочтительно, но не обязательно, с регулярными интервалами. Было обнаружено, что при электролизе воды с регулярными интервалами вода остается терапевтически активной в течении длительного периода времени.

В частности, циклы электролиза могут осуществляться с частотой от 2 до 12 циклов за 24 часа с двумя последовательными циклами, проводимыми с интервалом, по меньшей мере, 30 мин, что позволяет получать воду, обладающую терапевтическим потенциалом.

[0050] Способ получения электролизованной воды, соответствующей изобретению, с использованием описанного выше модуля, включает следующие стадии, на которых:

а. обеспечивают проточную или ключевую воду, необязательно, добавляя в нее электропроводную соль в концентрации от 0,5 до 2 г/л,

б. проводят электролиз воды, обеспечиваемый электролитическим модулем, включающим, по меньшей мере, один легированный бором алмазный электрод, закрепленный на подложке из кремния, в котором концентрация бора составляет от 200 частей на миллион ( $3 \times 10^{19}$  атомов В/см<sup>3</sup>) до 1500 частей на миллион ( $2 \times 10^{20}$  В атомов В/см<sup>3</sup>).

[0051] Преимущественно, в процессе электролиза подают ток в количестве от 15 до 500 мАч/л воды, более предпочтительно, от 40 до 250 мАч/л воды, еще более предпочтительно, от 50 до 200 мАч/л воды, при этом, длительность электролиза составляет от 1 минуты до 60 минут.

[0052] Способ настоящего изобретения позволяет получить воду, пригодную для использования при лечении заболеваний или нарушений, связанных со стареющими клетками.

[0053] Как указано выше, лечение заболеваний или нарушений, связанных со стареющими клетками, может, помимо прочего, включать лечение возрастных заболеваний, таких как нейродегенеративные заболевания, патологические состояния кожи, но также глаукомы, катаракты, сахарного диабета, остеоартроза, атеросклероза, сердечно-сосудистых заболеваний или возрастных форм рака. Вода, полученная соответствующим изобретению способом, также может оказаться полезной в случае

пересадки или трансплантации ткани, такой как печень или орган или кожный трансплантат.

[0054] Получаемая вода также может быть использована в разных формах или композициях или в различных устройствах.

[0055] Используемое устройство может быть выбрано из инфузионного резервуара или мешка для хранения жидкостей, вмещающего электролизованную воду, как описано выше. Тогда используемый электролитический модуль с целью получения электролизованной воды встраивают в существующую водораспределительную сеть; также возможно предусмотреть вариант, в котором электролитический модуль соединен с резервуаром или погружен в него.

[0056] В способе получения электролизованной воды, соответствующем изобретению, может быть использована любая вода, будь то природная, ключевая вода или вода для коммунальных нужд.

Благодаря преимуществу электролитического модуля, соответствующего изобретению, и его гибкости, из такого избыточного источника, как вода, может быть получено менее дорогостоящее лечебное средство, так как для этого не требуется обычных при лечении заболеваний или нарушений, связанных со старением, химикатов, и в то же время, исключаются побочные эффекты указанных химикатов.

[0057] Электролизованная вода, полученная соответствующим изобретению способом, также может присутствовать в более традиционных композициях, имеющих в продаже в аптеках или аптечных пунктах или даже в супермаркетах, при этом, такая композиция содержит от 95% до 100% электролизованной воды и от 0 до 5% вспомогательного вещества и/или эмульгатора.

[0058] Указанная композиция предназначена для использования в качестве лекарственного средства для лечения заболеваний или нарушений, связанных со старением клеток, в частности, возрастных форм рака или нейродегенеративных заболеваний.

[0059] Она может иметь форму крема, геля, раневой повязки, куска пластыря, когда речь идет, например, об удалении стареющих клеток с кожи и сохранении, по возможности, самого здорового состояния кожи, когда она включает максимум здоровых, или нестареющих, клеток.

[0060] Другой случай, который можно рассмотреть более конкретно, это трансплантаты клеток кожи, ткани или даже органа, такого как печень, и использование электролизованной воды, соответствующей изобретению, в составе культуральной среды клетки, ткани или органа *in vitro*.

[0061] Культуральная среда обычно, помимо электролизованной воды, соответствующей изобретению, содержит все питательные вещества, необходимые для поддержания активности, такие как факторы роста, питательные вещества, такие как аминокислоты, соли, добавки, возможно, животная сыворотка и другие соединения, такие как сахара или антибиотики для исключения заражения культуральной среды, а также

другие хорошо известные специалистам в данной области компоненты, используемые в культуральных средах.

[0062] Другая лекарственная форма композиции, соответствующей изобретению, может представлять собой водный гель, также называемый гидрогель. Гидрогель - это гель, в котором агентом набухания является электролизованная вода, полученная способом настоящего изобретения. Матрица гидрогеля обычно образована полимерной сетью, при этом, полимеры нерастворимы в воде, но могут значительно разбухать в присутствии большого количества воды или водного раствора.

[0063] Было проведено два примера биологических испытаний, направленных на оценку потенциала воздействия электролизованной воды на стареющие клетки в присутствии здоровых клеток.

[0064] Как показано на фиг. 1 и 2, испытания осуществляли с целью оценки потенциала электролизованной воды, соответствующей изобретению.

[0065] На фиг. 1 представлены результаты, полученные в ходе сравнительных испытаний воды WDW, соответствующей изобретению, полученной путем осуществления способа, соответствующего изобретению, при токе 62,5 мАч/л, и ультрачистой воды MQW, полученной с использованием фильтров компании Millipore, в присутствии различных концентраций  $H_2O_2$ , при этом, эти два типа воды применяли в отношении культур клеток хондросаркомы клеточной линии JJ012. Культуральная среда относилась к типу EMEM, была получена путем смешивания порошков (Thermo Fisher, GIBCO #41500-034, Penicilin Steptomycin (PenStrep) #15140122 и 10% Fetal Bovine Serum (FBS) #26140079) с последующей стерилизацией и фильтрацией (фильтр 0,2 мкм) и содержала указанные клетки.

[0066] Очевидно, что исчезновение стареющих клеток значительно в присутствии воды WDW, следовательно, она является эффективным средством отбора нестареющих клеток в присутствии стареющих клеток в клеточной культуральной среде, содержащей и нестареющие, и стареющие клетки.

[0067] Что касается фиг. 2, предполагается, что нормальные клетки могут навсегда терять способность размножаться, если подверглись стрессу, и этот процесс называется старением клеток. Связанная со старением активность бета-галактозидазы (SA- $\beta$ -Gal), обнаружимой при pH 6,0, позволяет идентифицировать стареющие клетки в культивируемых тканях млекопитающих. Эту активность измеряли при помощи комплекта BioVision (по каталогу №K821-100). Бета-галактозидаза ( $\beta$ -Gal, EC: 3.2.1.23) представляет собой белок, который гидролизует  $\beta$ -галактозиды до моносахаридов. Связанная со старением  $\beta$ -Gal (SA- $\beta$ -Gal) является изоформой  $\beta$ -Gal, которая проявляет оптимальную активность при pH 6,0 и используется, главным образом, в качестве биомаркера стареющих клеток (K802). Обнаружение основано на гидролизе бета-галактозидазы нефлуоресцирующего субстрата с образованием продукта с сильной флуоресценцией. Количество образовавшегося флуоресцеина (3', 6'-дигидроксиспиро[изобензофуран-1 (3H), 9'-[9H]ксантеин]-3-он) затем может быть

измерено (субстрат- флуоресценция → галактоза+флуоресцин (Ex/Em=480/530 нм). Испытание проводили 36 часов после введения  $H_2O_2$ , проводя измерения на 530 нм.

[0068] Следовательно, в присутствии воды различных типов с повышенным содержанием  $H_2O_2$ :

- электролизованной воды, полученной путем осуществления способа, соответствующего изобретению (WDW),
- ультрачистой воды, полученной при помощи фильтров компании Millipore (MQW),
- электролизованной воды, полученной на ниобиевом электроде (NBW),
- электролизованной воды, полученной с одним электродом (REW),
- проточной воды (TAPW) и
- промышленной воды от компании ASEA, именуемой «окислительно-восстановительная сигнальная вода» или ASEA@ REDOX.

[0069] Используя активность SA- $\beta$ -Gal в качестве показателя/биомаркера старения клеток, эксперимент, описанный на фиг. 2, подтвердил, что:

1) Электролизованная вода, полученная путем осуществления способа, соответствующего изобретению (WDW), является наиболее эффективной с точки зрения усиления старения клеток среди других типов электролизованной или промышленной воды, при этом, концентрация  $H_2O_2$ , равная 0 мкМ, соответствует контрольному опыту.

2) Электролизованная вода WDW более эффективна, чем другие использованные типы воды при всех испытанных концентрациях  $H_2O_2$ .

3) Также доказано, что использованные типы воды, хотя и состоят, главным образом, из молекул воды  $H_2O$ , не обладают одинаковыми свойствами, поскольку для одного и того же типа клеток, выращенных в одинаковых условиях, их влияние на активность SA- $\beta$ -Gal разное. Так, WDW действительно является особой водой, которую можно рассматривать как продукт, полученный путем осуществления способа ее производства.

[0070] Представленные в соответствии с изобретением примеры изображений и устройств, а также различные упомянутые варианты осуществления, ни коим образом не ограничивают заявленный объем изобретения; они приведены для пояснения, направленного на лучшее понимание изобретения.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения электролизованной воды, состоящий в проведении электролиза проточной или ключевой воды, необязательно, содержащей электропроводную соль, например, NaCl в концентрации от 0,5 до 2 г/л, при помощи электролитического модуля, включающего, по меньшей мере, один легированный бором алмазный электрод, закрепленный на подложке из кремния, в котором концентрация бора составляет от  $200 (3 \times 10^{19} \text{ атомов В/см}^3)$  до 2000 частей на миллион ( $3,52 \times 10^{20} \text{ В атомов В/см}^3$ ), в частности, от 200 частей на миллион ( $3 \times 10^{19} \text{ атомов В/см}^3$ ) до 1500 частей на миллион ( $2 \times 10^{20} \text{ В атомов В/см}^3$ ), при этом, в указанном модуле в воду в процессе электролиза подают ток в количестве от 15 до 500 мАч/л воды, более предпочтительно, от 40 до 250 мАч/л воды, еще более предпочтительно, от 50 до 200 мАч/л воды, при этом, длительность электролиза составляет от 1 минуты до 60 минут.

2. Способ по п. 1, в котором электролиз проводят непрерывно или циклически, при этом, количество циклов составляет от 2 до 12 циклов за 24 часа, и каждый цикл электролиза проводят с интервалом от предшествующего или последующего цикла, по меньшей мере, 30 мин.

3. Вода, полученная способом по одному из пп. 1 или 2.

4. Способ усиления сенолитического характера стареющих биологических клеток, присутствующих в клеточной среде, отличающийся тем, что он состоит во введении в клеточную среду электролизованной воды по п. 3.

5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что процентное содержание воды в клеточной среде строго больше 0 и, предпочтительно, больше 5%, более предпочтительно, больше 25%.

6. Способ по п. 4 или 5, отличающийся тем, что стареющие клетки выдерживают в клеточной среде в контакте с водой в течении периода, превышающего 1 мин.

7. Использование воды по п. 3 для лечения заболеваний, связанных со старением клеток, в частности, лечения рака или нейродегенеративных заболеваний.

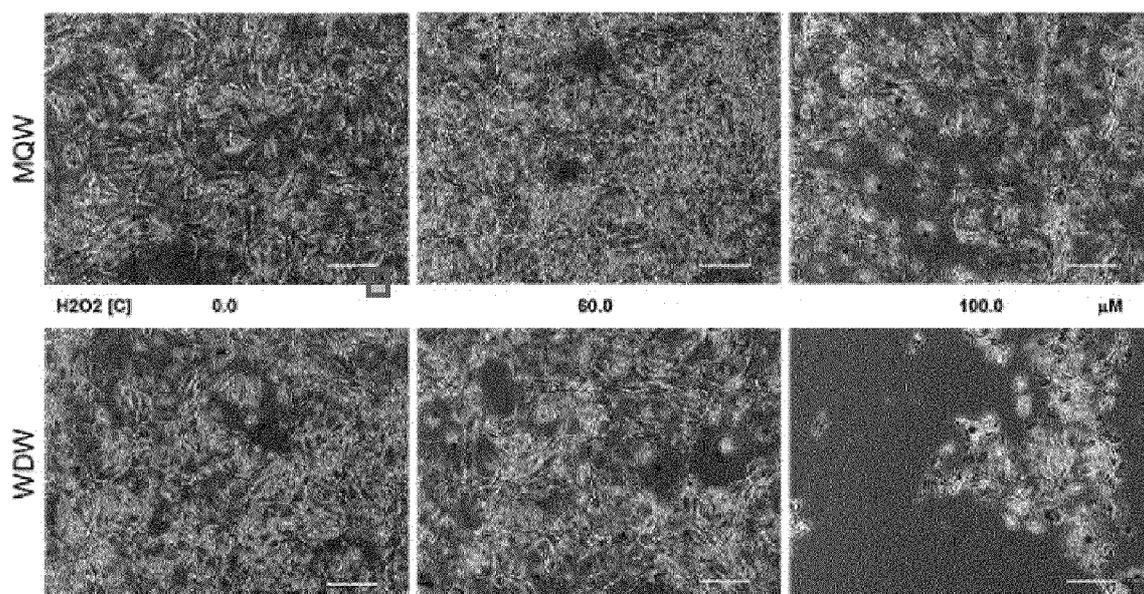
8. Композиция, содержащая электролизованную воду по п. 3, для использования в качестве лекарственного средства для лечения нарушений, связанных со старением клеток, в частности, лечения рака или нейродегенеративных заболеваний.

9. Композиция по п. 8, содержащая от 95 до 100% электролизованной воды и от 0 до 5% вспомогательного вещества и/или эмульгатора.

10. Устройство для лечения заболеваний или нарушений, связанных со старением клеток, включающее инфузионный мешок, содержащий воду по п. 3 или композицию по п. 8 или 9.

По доверенности

ФИГ. 1



ФИГ. 2

