

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391632** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.08.18

(51) Int. Cl. *A61K 35/16* (2015.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A61K 35/14 (2015.01)
A61K 35/28 (2015.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.12.08

(54) СПОСОБЫ И СИСТЕМЫ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ПРОДУЦИРОВАНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

(31) **63/122,831; 63/122,836; 63/180,742**

(71)(72) Заявитель и изобретатель:
ОВОКАЙТИС ТОДД ФРЭНК (US)

(32) **2020.12.08; 2020.12.08; 2021.04.28**

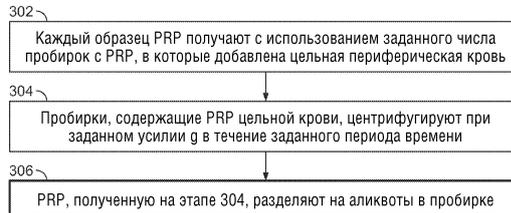
(33) **US**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(86) **PCT/US2021/072801**

(87) **WO 2022/126109 2022.06.16**

(57) Обогащенную тромбоцитами плазму, содержащую человеческие очень маленькие эмбрионоподобные стволовые клетки (hVSEL), обрабатывают амплитудно-модулированными импульсами лазерного излучения с заданной длиной волны в течение заданного периода времени, где заданная длина волны находится в диапазоне от 300 до 1000 нм. Обработка обогащенной тромбоцитами плазмы с применением этого способа приводит к неожиданно высокой степени пролиферации hVSEL в обогащенной тромбоцитами плазме, что в свою очередь приводит к снижению биологического возраста при введении пациенту.



202391632

A1

A1

202391632

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578660EA/032

СПОСОБЫ И СИСТЕМЫ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ПРОДУЦИРОВАНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Перекрестная ссылка

В настоящей заявке испрашивается приоритет следующих предварительных заявок на патенты США, которые в полном объеме включены в настоящее описание по ссылке:

предварительной заявки на патент США № 63/122831, озаглавленной «Способы и системы для увеличения продуцирования стволовых клеток», поданной 8 декабря 2020 года;

предварительной заявки на патент США № 63/122836, озаглавленной «Способы и системы для увеличения продуцирования стволовых клеток», поданной 8 декабря 2020 года; и

предварительной заявки на патент США № 63/180742, озаглавленной «Способы и системы для увеличения продуцирования стволовых клеток», поданной 28 апреля 2021 года.

Кроме того, настоящая заявка относится к патентной публикации США № 20210207121 (заявки на патент США № 17/146849), озаглавленной «Способы и системы для получения, применения и доставки активированных стволовых клеток», поданной 12 января 2021 года, которая является продолжением патента США № 10907144, озаглавленного «Способы и системы для получения, применения и доставки активированных стволовых клеток», выданного 2 февраля 2021 года, который, в свою очередь, является продолжением выданного патента США № 10202598, имеющего такое же название и выданного 12 февраля 2019 года, который, в свою очередь, является частичным продолжением патента США № 9999785, озаглавленного «Способ и система для получения и применения активированных стволовых клеток» и выданного 19 июня 2018 года, в котором, в свою очередь испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США № 62/006034, поданной 30 мая 2014 года. Патент '598 также относится к следующим предварительным заявкам на патенты США, которые в полном объеме включены в настоящее описание по ссылке: предварительной заявке на патент США № 62/321781, озаглавленной «Способ и система для получения и применения активированных стволовых клеток», и поданной 13 апреля 2016 года; и Предварительной заявке на патент США № 62/254220, озаглавленной «Способ и система для получения и применения активированных стволовых клеток», поданной 12 ноября 2015 года.

Вышеупомянутые заявки в полном объеме включены в настоящее описание по ссылке.

Область изобретения

В настоящей заявке раскрываются способы и системы для улучшения продуцирования стволовых клеток, а в частности, использование модулированных лазерных импульсов для увеличения пролиферации стволовых клеток, чтобы обратить

вспять процесс биологического старения и/или уменьшить биологический возраст.

Предпосылки создани изобретения

Стволовые клетки VSEL (очень маленькие, похожие на эмбрионы) были впервые идентифицированы в костном мозге мыши и описаны как небольшие (1-4 мкм) негемопозитические клетки с высоким соотношением ядра и цитоплазмы. Они экспрессируют поверхностные антигены, сходные с антигенами плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток. Стволовые клетки VSEL человека (hVSEL) были впервые идентифицированы в пуповинной крови и, как было показано, представляют собой CXCR4⁺, CD34⁺, CD133⁺, Oct4⁺, SSEA4⁺ и lin⁻, CD45-клетки. Впоследствии было показано, что стволовые клетки hVSEL присутствуют в периферической крови и в костном мозге, а также в образцах для лейкофереза, взятых после введения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF). Впоследствии было указано, что стволовые клетки hVSEL присутствуют в периферической крови в концентрации 800-1300 клеток/мл.

Стволовые клетки hVSEL представляют собой популяцию клеток, полученных из эпибластов и образующихся во время эмбриональной гастрюляции. Стволовые клетки hVSEL могут играть важную роль в длительном продуцировании гемопоэтических стволовых CD34⁺-клеток в костном мозге и могут способствовать восстановлению при экспериментальном инфаркте миокарда (ИМ). Стволовые клетки hVSEL также сохраняются в периферической крови на протяжении всей жизни. Соответственно, может оказаться возможным получить аутологичные стволовые клетки hVSEL от любого пациента в любом возрасте, что позволяет их использовать в регенеративной медицине и тем самым упрощать процедуры, экономить денежные средства и уменьшать побочные реакции, связанные с аллогенными клетками. Стволовые клетки hVSEL также могут быть жизнеспособным материалом для потенциального развития ткани поджелудочной железы и человеческих гамет. При правильном обращении и введении, стволовые клетки hVSEL в будущем могут сыграть решающую роль в трансляционной регенеративной медицине.

Лазерная, а в более общем плане, оптическая технология была применена специалистами в области стволовых клеток. Так, например, было продемонстрировано, что длины волн лазера 420 нм и 540 нм стимулировали остеогенную дифференцировку, в то время как другие длины волн не позволяли этого сделать. Было показано, что широкополосный видимый свет (низкоуровневый видимый свет) увеличивает пролиферацию мезенхимальных клеток костного мозга (MSC) *вне организма*. Также были описаны эффекты фотобиомодуляции лазерным излучением на MSC пульпы зуба, MSC жировой ткани человека и колониеобразующие единицы эпителия.

Проточная цитометрия часто применяется для оценки биологических образцов, обработанных лазером, на наличие клеточной пролиферации. Поверхностные антигены Oct 3/4, SSEA4 и CXCR4 в компартменте, негативном по линии дифференцировки (Lin⁻), оценивают с помощью проточной цитометрии. Известно, что из этих трех маркеров, CXCR4, как показала проточная цитометрии, может блокировать связывание антител

посредством своего антагонистического лиганда, эндогенного пептидного ингибитора EPI-X4. Это блокирование CXCR4 нарушает или затрудняет точную оценку, проводимую с помощью проточной цитометрии.

Кроме того, организмы имеют биологический возраст, который отличается от хронологического возраста организма. Биологический возраст определяется на клеточном уровне и может зависеть от нескольких факторов, которыми являются, среди прочих факторов, образ жизни, окружающая среда и генетика. Люди, которые имеют более молодой биологический возраст по сравнению с их хронологическим возрастом, подвергаются меньшему риску возникновения возрастных заболеваний. Существуют хорошо известные методы оценки биологического возраста. В одном из примеров, длина теломера используется в качестве показателя биологического возраста. В другом примере оценивают метилирование ДНК, что включает в себя проведение теста для определения биологического возраста путем оценки внутреннего эпигенетического возраста, и таким образом, позволяет соотнести статус метилирования с биологическим возрастом. Было определено, что возраст метилирования ДНК близок к нулю для эмбриональных и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

Следовательно, необходимо разработать способ увеличения количества стволовых клеток на объем обогащенной тромбоцитами плазмы (PRP). В частности, необходимо разработать способ применения модулированной лазерной фотобиомодуляции для увеличения пролиферации стволовых клеток hVSEL периферической крови. Также необходимо разработать способ деблокирования CXCR4, что позволит сделать его легко доступным для связывания с антителами для проточной цитометрии. Кроме того, желательно разработать способ замедления или обращения вспять биологических часов так, чтобы биологический возраст был меньше хронологического возраста организма.

Описание сущности изобретения

Нижеследующие варианты осуществления изобретения и их аспекты описаны и проиллюстрированы в сочетании с системами, инструментами и способами, которые приводятся лишь в репрезентативных и иллюстративных целях, и не рассматриваются как ограничение объема изобретения. В настоящей заявке раскрываются многочисленные варианты осуществления изобретения.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение раскрывает способ снижения биологического возраста пациента, включающий: пролиферацию стволовых клеток пациента, причем пролиферация включает приготовление обогащенной тромбоцитами плазмы, содержащей стволовые клетки, и обработку обогащенной тромбоцитами плазмы, содержащей стволовые клетки, модулированными импульсами лазерного излучения, имеющими заданную длину волны в течение заданного периода времени; и введение обработанной обогащенной тромбоцитами плазмы пациенту.

Необязательно, обогащенную тромбоцитами плазму приготавливают путем: добавления крови пациента во множество пробирок; центрифугирования упомянутого множества пробирок при заданном усилии g в течение заданного периода времени для

получения обогащенной тромбоцитами плазмы; и разделения на аликвоты полученной обогащенной тромбоцитами плазмы в стерильную пробирку.

Необязательно, центрифугирование упомянутого множества пробирок дополнительно включает встряхивание упомянутого множества пробирок после центрифугирования.

Необязательно, способ дополнительно включает встряхивание стерильной пробирки после разделения на аликвоты.

Необязательно, количество пробирок варьируется от 3 до 12 пробирок с любым его приращением.

Необязательно, способ дополнительно включает встряхивание обогащенной тромбоцитами плазмы после обработки модулированными импульсами лазерного излучения.

Необязательно, обработку обогащенной тромбоцитами плазмы проводят в условиях минимального фонового белого освещения.

Необязательно, заданная длина волны находится в диапазоне от 300 нм до 1000 нм. Все еще необязательно, заданная длина волны составляет 670 нм.

Необязательно, обогащенную тромбоцитами плазму приготавливают с использованием обычной человеческой крови.

Необязательно, заданный период времени варьируется от 1 минуты до 5 минут.

Необязательно, обработанная обогащенная тромбоцитами плазма содержит количество стволовых клеток в диапазоне от $0,5 \times 10^6$ /мл до $2,0 \times 10^6$ /мл при анализе сразу после заданного периода времени. Необязательно, обработанная обогащенная тромбоцитами плазма содержит количество стволовых клеток в диапазоне от $0,5 \times 10^6$ на мл до $2,0 \times 10^6$ на мл при анализе сразу после заданного периода времени.

Необязательно, у пациента наблюдается снижение биологического возраста в диапазоне от 1 года до 4 лет после первого введения обработанной обогащенной тромбоцитами плазмы. Тем не менее, необязательно, у пациента наблюдается снижение биологического возраста в диапазоне от 4 до 9 лет после второго введения обработанной обогащенной тромбоцитами плазмы. Необязательно, второе введение обработанной обогащенной тромбоцитами плазмы проводят в период времени от 1 недели до 6 месяцев после первого введения.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способу снижения биологического возраста пациента, включающему: пролиферацию стволовых клеток пациента, включающую: добавление нормальной человеческой крови во множество пробирок; центрифугирование упомянутого множества пробирок при заданном усилии g в течение 10 минут для получения обогащенной тромбоцитами плазмы; встряхивание упомянутого множества пробирок; разделение на аликвоты полученной обогащенной тромбоцитами плазмы в стерильную пробирку; встряхивание обогащенной тромбоцитами плазмы в стерильной пробирке; обработку обогащенной тромбоцитами плазмы модулированными импульсами лазерного излучения, имеющими

заданную длину волны, в течение заданного периода времени; встряхивание обработанной обогащенной тромбоцитами плазмы; и введение обработанной обогащенной тромбоцитами плазмы пациенту.

Необязательно, упомянутое множество пробирок варьируется от 3 до 12 пробирок с любым его приращением.

Необязательно, обработку обогащенной тромбоцитами плазмы проводят в условиях минимального фонового белого освещения.

Необязательно, заданная длина волны находится в диапазоне от 300 нм до 1000 нм. Все еще обязательно, заданная длина волны составляет 670 нм.

Необязательно, заданный период времени варьируется от 1 минуты до 5 минут.

Необязательно, обработанная обогащенная тромбоцитами плазма содержит количество стволовых клеток в диапазоне от $0,5 \times 10^6$ /мл до $2,0 \times 10^6$ /мл при анализе сразу после заданного периода времени. Необязательно, обработанная обогащенная тромбоцитами плазма демонстрирует увеличение содержания стволовых клеток в 2,5 раза по сравнению со средним значением первого и второго контрольных образцов, причем первый контрольный образец включает обогащенную тромбоцитами плазму, обработанную светом электрического фонарика в течение заданного периода времени, и причем второй контрольный образец включает обогащенную тромбоцитами плазму без какой-либо обработки светом.

Необязательно, модуляция отменяет центральную полосу длин волн лазерного излучения таким образом, что оставшиеся верхняя и нижняя полосы длин волн создают паттерн частоты биений с разреженными узлами.

Необязательно, у пациента наблюдается снижение биологического возраста в диапазоне от 1 года до 4 лет после первого введения обработанной обогащенной тромбоцитами плазмы. Тем не менее, обязательно, у пациента наблюдается снижение биологического возраста в диапазоне от 4 до 9 лет после второго введения обработанной обогащенной тромбоцитами плазмы. Необязательно, второе введение обработанной обогащенной тромбоцитами плазмы происходит в период времени от 1 недели до 6 месяцев после первого введения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения раскрывается способ получения композиции, которая при введении пациенту уменьшает биологический возраст пациента, причем упомянутый способ включает: пролиферацию стволовых клеток пациента, включающую: приготовление обогащенной тромбоцитами плазмы, содержащей стволовые клетки; и обработку обогащенной тромбоцитами плазмы модулированными импульсами лазерного излучения, имеющими заданную длину волны, в течение заданного периода времени.

Необязательно, обогащенную тромбоцитами плазму приготавливают путем: добавления крови пациента в упомянутое множество пробирок; центрифугирования упомянутого множества пробирок при заданном усилии g в течение заданного периода времени для получения обогащенной тромбоцитами плазмы; и разделения на аликвоты

полученной обогащенной тромбоцитами плазмы в стерильной пробирке.

Необязательно, центрифугирование упомянутого множества пробирок дополнительно включает встряхивание упомянутого множества пробирок после центрифугирования.

Необязательно, способ дополнительно включает встряхивание стерильной пробирки после разделения на аликвоты.

Необязательно, упомянутое множество пробирок варьируется от 3 до 12 пробирок с любым его приращением.

Необязательно, способ дополнительно включает встряхивание обогащенной тромбоцитами плазмы после обработки модулированными импульсами лазерного излучения.

Необязательно, обработку обогащенной тромбоцитами плазмы проводят в условиях минимального фонового белого освещения.

Необязательно, заданная длина волны находится в диапазоне от 300 нм до 1000 нм. Все еще необязательно, заданная длина волны составляет 670 нм.

Необязательно, обогащенную тромбоцитами плазму приготавливают с использованием обычной человеческой крови.

Необязательно, заданный период времени варьируется от 1 минуты до 5 минут.

Необязательно, обработанная обогащенная тромбоцитами плазма содержит количество стволовых клеток в диапазоне от $0,5 \times 10^6$ /мл до $2,0 \times 10^6$ /мл при анализе сразу после заданного периода времени.

В некоторых вариантах осуществления изобретения раскрывается способ получения композиции, которая при ее введении пациенту уменьшает биологический возраст пациента, причем упомянутый способ включает: пролиферацию стволовых клеток пациента, включающую: добавление нормальной человеческой крови во множество пробирок; центрифугирование упомянутого множества пробирок при заданном усилии g в течение 10 минут для получения обогащенной тромбоцитами плазмы; встряхивание упомянутого множества пробирок; разделение на аликвоты полученной обогащенной тромбоцитами плазмы в стерильную пробирку; встряхивание обогащенной тромбоцитами плазмы в стерильной пробирке; обработку обогащенной тромбоцитами плазмы модулированными импульсами лазерного излучения, имеющими заданную длину волны, в течение заданного периода времени; и встряхивание обработанной обогащенной тромбоцитами плазмы.

Необязательно, количество пробирок варьируется от 3 до 12 пробирок с любым его приращением.

Необязательно, обработку обогащенной тромбоцитами плазмы проводят в условиях минимального фонового белого освещения.

Необязательно, заданная длина волны находится в диапазоне от 300 нм до 1000 нм. Необязательно, заданная длина волны составляет 670 нм.

Необязательно, заданный период времени варьируется от 1 минуты до 5 минут.

Необязательно, обработанная обогащенная тромбоцитами плазма содержит количество стволовых клеток в диапазоне от $0,5 \times 10^6$ /мл до $2,0 \times 10^6$ /мл при анализе сразу после заданного периода времени.

Необязательно, обработанная обогащенная тромбоцитами плазма демонстрирует увеличение содержания стволовых клеток в 2,5 раза по сравнению со средним значением первого и второго контрольных образцов, причем первый контрольный образец включает обогащенную тромбоцитами плазму, обработанную белым светом электрического фонарика в течение заданного периода времени, и причем второй контрольный образец включает обогащенную тромбоцитами плазму без какой-либо обработки светом.

Необязательно, модуляция отменяет центральную полосу длин волн лазерного излучения таким образом, что оставшиеся верхняя и нижняя полосы длин волн создают паттерн частоты биений с разреженными узлами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения раскрывается способ снижения биологического возраста пациента, включающий: пролиферацию стволовых клеток пациента, включающую: приготовление обогащенной тромбоцитами плазмы, содержащей стволовые клетки; и обработку обогащенной тромбоцитами плазмы модулированными импульсами лазерного излучения, имеющими заданную длину волны, в течение заданного периода времени.

Необязательно, обогащенную тромбоцитами плазму приготавливают путем: добавления крови пациента в шесть пробирок; центрифугирования шести пробирок при заданном усилии g в течение заданного периода времени для получения обогащенной тромбоцитами плазмы; и разделения на аликвоты полученной обогащенной тромбоцитами плазмы в стерильной пробирке. Необязательно, центрифугирование шести пробирок дополнительно включает встряхивание шести пробирок после центрифугирования. Необязательно, способ дополнительно включает встряхивание стерильной пробирки после разделения на аликвоты.

Необязательно, способ дополнительно включает встряхивание обогащенной тромбоцитами плазмы после обработки модулированными импульсами лазерного излучения.

Необязательно, упомянутую обработку обогащенной тромбоцитами плазмы проводят в условиях минимального фонового белого освещения.

Необязательно, заданная длина волны находится в диапазоне от 300 нм до 1000 нм.

Необязательно, заданная длина волны составляет 670 нм.

Необязательно, обогащенную тромбоцитами плазму приготавливают с использованием нормальной периферической крови человека.

Необязательно, заданный промежуток времени составляет 3 минуты.

Необязательно, упомянутая обработанная обогащенная тромбоцитами плазма содержит $1,256 \times 10^6$ /мл стволовых клеток при анализе сразу после заданного периода времени.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также раскрывает

способ снижения биологического возраста пациента, включающий: пролиферацию стволовых клеток пациента, включающую: добавление нормальной периферической крови человека в шесть пробирок; центрифугирование шести пробирок при заданном усилии g в течение 10 минут для получения обогащенной тромбоцитами плазмы; встряхивание шести пробирок; разделение на аликвоты полученной обогащенной тромбоцитами плазмы в стерильной пробирке; встряхивание обогащенной тромбоцитами плазмы в стерильной пробирке; обработку обогащенной тромбоцитами плазмы модулированными импульсами лазерного излучения, имеющими заданную длину волны, в течение заданного периода времени; и встряхивание обработанной обогащенной тромбоцитами плазмы.

Необязательно, упомянутую обработку обогащенной тромбоцитами плазмы проводят в условиях минимального фонового белого освещения.

Необязательно, заданная длина волны находится в диапазоне от 300 нм до 1000 нм.

Необязательно, заданная длина волны составляет 670 нм.

Необязательно, заданный промежуток времени составляет 3 минуты.

Необязательно, упомянутая обработанная обогащенная тромбоцитами плазма содержит $1,256 \times 10^6$ /мл стволовых клеток при анализе сразу после заданного периода времени.

Необязательно, упомянутая обработанная обогащенная тромбоцитами плазма демонстрирует увеличение содержания стволовых клеток в 2,5 раза по сравнению со средним значением первого и второго контрольных образцов, причем первый контрольный образец включает обогащенную тромбоцитами плазму, обработанную белым светом электрического фонарика в течение заданного периода времени, и причем второй контрольный образец включает обогащенную тромбоцитами плазму без какой-либо обработки светом.

Необязательно, упомянутая модуляция отменяет центральную полосу длин волн лазерного излучения таким образом, что оставшиеся верхняя и нижняя полосы длин волн создают паттерн частоты биений с разреженными узлами.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу пролиферации стволовых клеток, включающему: приготовление обогащенной тромбоцитами плазмы, содержащей стволовые клетки; и обработку обогащенной тромбоцитами плазмы модулированными импульсами лазерного излучения, имеющими заданную длину волны, в течение заданного периода времени.

Необязательно, обогащенную тромбоцитами плазму приготавливают путем добавления нормальной периферической крови пациента-донора в три пробирки; центрифугирования трех пробирок при заданном усилии g в течение заданного периода времени для получения обогащенной тромбоцитами плазмы; и разделения на аликвоты полученной обогащенной тромбоцитами плазмы в одной стерильной пробирке.

Необязательно, упомянутую обработку обогащенной тромбоцитами плазмы проводят в условиях минимального фонового белого освещения.

Необязательно, заданная длина волны находится в диапазоне от 300 нм до 1000 нм.

Необязательно, заданная длина волны составляет 670 нм.

Необязательно, обогащенную тромбоцитами плазму приготавливают с использованием нормальной периферической крови человека-донора.

Необязательно, заданный промежуток времени составляет 3 минуты.

Необязательно, упомянутая обработанная обогащенная тромбоцитами плазма содержит $1,256 \times 10^6$ /мл стволовых клеток при анализе сразу после заданного периода времени.

В некоторых вариантах осуществления изобретения раскрывается способ пролиферации стволовых клеток, включающий: добавление донорской нормальной периферической крови человека в три пробирки; центрифугирование трех пробирок при заданном усилии g в течение 10 минут для получения обогащенной тромбоцитами плазмы; разделение на аликвоты полученной обогащенной тромбоцитами плазмы в одну стерильную пробирку; и обработку обогащенной тромбоцитами плазмы модулированными импульсами лазерного излучения с заданной длиной волны в течение заданного периода времени.

Необязательно, упомянутую обработку обогащенной тромбоцитами плазмы проводят в условиях минимального фонового белого освещения.

Необязательно, заданная длина волны находится в диапазоне от 300 нм до 1000 нм.

Необязательно, заданная длина волны составляет 670 нм.

Необязательно, заданный период времени составляет от 1 до 6 минут.

Необязательно, заданный период времени составляет от 1 до 3 минут. Необязательно, заданный период времени составляет 3 минуты. Необязательно, заданный период времени зависит от объема обогащенной тромбоцитами плазмы.

Необязательно, упомянутая обработанная обогащенная тромбоцитами плазма содержит $1,256 \times 10^6$ /мл стволовых клеток при анализе сразу после заданного периода времени.

Необязательно, упомянутая обработанная обогащенная тромбоцитами плазма демонстрирует увеличение содержания стволовых клеток в 2,5 раза по сравнению со средним значением первого и второго контрольных образцов, причем первый контрольный образец включает обогащенную тромбоцитами плазму, обработанную белым светом электрического фонарика в течение заданного периода времени, и причем второй контрольный образец включает обогащенную тромбоцитами плазму без какой-либо обработки светом.

Необязательно, упомянутая модуляция отменяет центральную полосу длин волн лазерного излучения таким образом, что оставшиеся верхняя и нижняя полосы длин волн создают паттерн частоты биений с разреженными узлами.

Вышеупомянутый и другие варианты осуществления настоящего изобретения более подробно описаны на чертежах и в подробном описании, представленном ниже.

Краткое описание чертежей

Эти и другие особенности и преимущества настоящего изобретения будут более понятными со ссылкой на подробное описание, которое приводится вместе с прилагаемыми чертежами, где:

На фиг. 1 проиллюстрировано устройство генератора узлов Страчана-Овокайтиса (SONG), раскрытое в патенте США № 6811564, который в полном объеме включен в настоящее описание по ссылке;

На фиг. 2 проиллюстрирован разреженный эффект конструктивный интерференции от пластины с подавлением полосы пропускания в 1%, имеющей апертуру 5 мм;

На фиг. 3 представлена блок-схема, иллюстрирующая этапы способа получения PRP, содержащей стволовые клетки hVSEL, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения;

На фиг. 4 представлен график, на котором показаны данные о количестве и распределении стволовых клеток hVSEL в необработанной PRP;

На фиг. 5 показан результат типичного проточного цитометра для PRP без лазерной обработки;

На фиг. 6 показан график, иллюстрирующий данные, относящиеся к PRP, облученной лазером Costa с модуляцией SONG, к соответствующим контролям и к однодневной культуре *вне организма*;

На фиг. 7 показан график, иллюстрирующий данные, относящиеся к изменению времени воздействия лазером Magna Costa и к изменению модуляции SONG на день 0 и день 5;

На фиг. 8 показан график, иллюстрирующий данные, относящиеся к обработке лазером Costa стволовых клеток hVSEL в PRP на день 0, день 1 и день 7;

На фиг. 9 показан график, иллюстрирующий данные, относящиеся к титрованию по времени воздействия лазером Magna Costa и Costa с модуляцией SONG на стволовые клетки hVSEL в PRP;

На фиг. 10A показан собственный эпигенетический возраст (IEA) двух пациентов;

На фиг. 10B проиллюстрирован IEA еще двух пациентов;

На фиг. 10C проиллюстрирован IEA других двух пациентов;

На фиг. 10D проиллюстрирован IEA других двух пациентов; и

На фиг. 11 представлена блок-схема, иллюстрирующая репрезентативный процесс приготовления PRP, содержащей стволовые клетки hVSEL, которые используются для снижения IEA, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящей заявки.

Подробное описание

Настоящее изобретение относится к множеству вариантов его осуществления. Нижеследующее описание приводится для облегчения осуществления изобретения специалистом в данной области. Терминология, используемая в настоящем описании, не должна интерпретироваться как полное исключение какого-либо одного конкретного варианта осуществления изобретения или не должна использоваться для ограничения

формулы изобретения за пределами значения используемых здесь терминов. Общие принципы, определенные в настоящей заявке, могут быть применены и к другим вариантам осуществления изобретения и к другим приложениям, и не должны выходить за рамки существа и объема изобретения. Кроме того, используемая здесь терминология и фразеология предназначены для описания репрезентативных вариантов осуществления изобретения и не должна рассматриваться как ограничение объема изобретения. Таким образом, настоящее изобретение должно соответствовать максимально широкой области применения, охватывающей многочисленные альтернативы, модификации и эквиваленты, согласующиеся с раскрытыми здесь принципами и признаками. Для ясности, детали, относящиеся к техническому материалу, который известен специалистам в области, к которой относится изобретение, не были описаны подробно, чтобы без необходимости не загромождать настоящее изобретение лишней информацией.

В описании и в формуле изобретения слова «содержать», «включать» и «иметь» и их формы не обязательно должны быть ограничены элементами списка, с которыми они могут быть связаны. При этом следует отметить, что любой признак или компонент, описанные в связи с конкретным вариантом осуществления изобретения, могут быть использованы и реализованы вместе с любым другим вариантом осуществления изобретения, если это не оговорено особо.

В некоторых вариантах осуществления изобретения внутренний эпигенетический возраст (IEA) относится к истинному биологическому возрасту на уровне ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения внешний эпигенетический возраст (EEA) относится к статусу иммунной функции организма в дополнение к другим факторам, которые являются более чувствительными к внешним факторам, таким как режим питания, образ жизни и прием добавок.

В некоторых вариантах осуществления изобретения «нормальная человеческая кровь» определяется как кровь в химическом и физическом состоянии при немедленном ее заборе у человека и без какой-либо дальнейшей обработки, будь то механической и/или химической обработки, и такая кровь также называется необработанной человеческой кровью. Используемый здесь термин «периферическая кровь» означает жидкость, которая проходит через сердце, артерии, капилляры и вены. Эта жидкость служит для переноса кислорода и других питательных веществ в клетки и ткани организма, а также для удаления диоксида углерода и других отходов жизнедеятельности из организма. Периферическая кровь также играет важную роль в иммунной системе, в выработке гормонов и в регуляции температуры.

Обогащенная тромбоцитами плазма (PRP) может быть определена в настоящей заявке как плазма, которая имеет повышенное количество тромбоцитов вследствие определенной формы механической и/или химической обработки по сравнению с плазмой, которая не подвергалась такой обработке.

Устройство SONG

В различных вариантах осуществления изобретения для повышения

продуцирования или пролиферации стволовые клетки обрабатывают лазером, который облучает стволовые клетки на заданной длине волны с заданной амплитудной модуляцией, которая проходит через расширитель пучка обычно порядка в 5-10 раз (хотя может использоваться большее или меньшее значение), в комбинации с устройством для оптического сопряжения фаз, таким как генератор узлов Страчана-Овокайтиса или устройство SONG, которое описано в патенте США № 6811564, который включен в настоящее описание посредством ссылки.

На фиг. 1 проиллюстрировано устройство SONG, раскрытое в патенте США № 6811564. Как показано на фиг. 1, устройство SONG содержит лазерный диод 2, который управляется амплитудным модулятором 1. Лазерный диод 2 выбран таким образом, чтобы он имел практически линейную зависимость между током и длиной волны с минимальным перескоком моды. Амплитудный модулятор 1 модулирует ток, подаваемый на лазерный диод 2, что, в свою очередь, приводит к очень малой модуляции длины волны лазера, необходимой для целей, обсуждаемых ниже.

Выходной сигнал лазерного диода 2 коллимируется линзой 3 и передается на оптический элемент 4. Оптический элемент 4 состоит из первой дифракционной решетки, преломляющего элемента и второй дифракционной решетки таким образом, что пучок практически подавляется. Это позволяет осуществлять подавление на небольшом проценте отклонения длины волны лазерного источника, а не на одной критической длине волны. Волны за пределами полосы пропускания компенсирующего оптического устройства 4 выше и ниже центральной частоты проходят без подавления. Это означает, что генерируется комплексная зона Френеля/Фраунгоффера, определяемая частотой биения высоких и низких частот в зависимости от апертуры. Следовательно, между высокочастотными и низкочастотными проходами элемента подавления в выбранных направлениях от апертуры возникают относительно разреженные зоны конструктивной интерференции, как показано на фиг. 2. На фиг. 2 показан разреженный эффект конструктивной интерференции от пластины подавления полосы пропускания в 1% с апертурой 5 мм. Черным цветом обозначены конструктивные узлы.

Как видно на фиг. 1, оптический элемент 4 может регулироваться в угловом направлении между положениями 4А и 4В. Это способствует изменению соотношения конструктивной и деструктивной интерференции. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления изобретения система, показанная на фиг. 1, может включать механизмы для выставления результирующего пучка, выходящего из оптического элемента 4, по прямой линии с коллимированным пучком, выходящим из коллиматора 3.

Фактически, непрерывный пучок преобразуется в последовательность импульсов чрезвычайно короткой длительности, обычно длительностью порядка субфемтосекунд. Модуляция малой длины волны лазерного диода 2 заставляет конструктивные и деструктивные узлы быстро перемещаться по объему зоны Френеля апертуры коллиматорной линзы. Это приводит к стимулированию поведения очень коротких (субпикосекундных) импульсов в любой точке зоны Френеля, через которую проходят

узлы, с частотой повторения импульсов, определяемой частотой амплитудного модулятора.

Длина волны зон подавления и конструктивной интерференции для теоретического единого пути будет равна разнице между двумя частотами. Если полоса пропускания элемента подавления является узкой, то эта разница очень мала, и эффективная длина волны подавленного/неподавленного цикла будет очень длинной, порядка пикосекунд. Следовательно, эта система могла бы вести себя практически аналогично системе без подавления, поскольку для создания полезной зоны Френеля/Фраунгоффера требуется апертура, намного превышающая длину волны основного света. Такая апертура значительно умножила бы доступные пути диаграммы Фейнмана и устраняла бы любой полезный эффект, даже если бы было возможно сгенерировать достаточно когерентный источник такой апертуры.

Если частоту биений можно было бы сделать достаточно высокой, то длина волны от подавленного до неподавленного цикла может составлять долю практически осуществимой апертуры. Это сделает такую длину волны достаточно малой, чтобы ограничить траектории Фейнмана одним или двумя циклами в свободном пространстве, что позволит проявиться эффекту Френеля/Фраунгоффера. Поскольку центральная частота и распространение спектра лазерного диода модулируются регулированием тока и/или температуры перехода, то структура зон Френеля/Фраунгоффера будет существенно изменяться за счет очень малых изменений длины волны одной или обеих частот пропускания. Такая модуляция достигается в устройстве, показанном на фиг. 1, за счет амплитудного модулятора 2.

Обычный когерентный или некогерентный пучок может иметь пути с высокой вероятностью на диаграмме Фейнмана. Эти пути могут перекрываться на очень низких частотах (кГц) и могут быть малоэффективны при стимуляции молекулярного резонанса. Однако, следует отметить, что описанные выше явления используются в качестве средства для умножения частоты модуляции вплоть до того момента, когда пучок будет становиться непрерывным. Таким образом, путем правильного выбора апертуры, области пучка, выбранной для прохождения через среду, и частоты модуляции можно заставить конструктивные узлы проходить через любую заданную точку пучка на частотах, во много раз превышающих частоту модуляции. В идеальных условиях продолжительность воздействия на конструктивный узел в любой точке будет представлять собой период, эквивалентный четверти продолжительности длины волны молекулярной частоты, повторяющейся один раз за один цикл.

Если длина волны лазера выбрана так, чтобы она легко поглощалась атомными структурами, которые должны вызывать резонанс, то пучок будет эффективно доставлять желаемую частоту модуляции к нужным молекулам. Молекулы клеточной адгезии и интегрин человека, такие как альфа-4 и бета-1, идеально подходят для возбуждения химической активности этим методом.

Источники клеток для описанной здесь процедуры могут быть аутологичными или

экзогенными. Аутологичные стволовые клетки относятся к клеткам, полученным от того же человека, которого в дальнейшем будут лечить такими клетками. Эти клетки будут генетически совпадать, что позволит устранить риски отторжения клеток. В современных методах аутологичные стволовые клетки либо получают, либо концентрируют из периферической крови, костного мозга или жировой ткани, однако, источником аутологичных стволовых клеток могут быть и другие ткани, поскольку практически каждая ткань организма имеет свой собственный резервуар стволовых клеток.

Предпочтительным экзогенным источником стволовых клеток является пуповинная кровь. Стволовые клетки из пуповинной крови очень устойчивы, имеют длинные теломеры (генетические часы старения у новорожденных) и обладают высокой способностью к восстановлению тканей. Функционально, синдромы отторжения клеток и реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) не являются проблемой при использовании такого источника клеток в интактной иммунной системе. Правильно подобранный костный мозг также может быть источником клеток, хотя в этом случае потребуется высокая степень подбора, чтобы избежать отторжения и развития РТПХ. На практике, для регенерации, в отличие от медикаментозных методов лечения лейкоза, безопасным является использование стволовых клеток пуповинной крови.

Приготовление обогащенной тромбоцитами плазмы (PRP), содержащей стволовые клетки hVSEL

На фиг. 3 представлена блок-схема, иллюстрирующая способ приготовления PRP, которая содержит стволовые клетки hVSEL, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения. Была получена донорская нормальная периферическая кровь человека с антикоагулянтом (цитратом натрия) (450 мл), которую перед использованием выдерживали при температуре 4°C. Перед обработкой PRP кровь оставляли для нагревания до комнатной температуры.

На этапе 302 каждый образец PRP получают с использованием трех пробирок с PRP, в которые добавляют/разделяют на аликвоты 11 мл цельной периферической крови (нормальной человеческой крови). На этапе 304 пробирки, содержащие PRP цельной крови, центрифугируют при заранее установленном усилии g в течение 10 минут. Следовательно, каждая из трех пробирок с PRP, содержащих 11 мл цельной крови, дает приблизительно 6 мл (в общей сложности приблизительно 18 мл) PRP.

На этапе 306 PRP, полученную на этапе 304, разделяют на аликвоты с применением асептического метода в вытяжном шкафу класса II, в единственную стерильную пробирку для дальнейших манипуляций и анализа. Каждый препарат PRP объемом 18 мл получают в трех экземплярах для каждой манипуляции и способа оценки.

Обработка, модуляция, манипулирование и оценка человеческой PRP, содержащей стволовые клетки hVSEL

В соответствии с аспектами настоящего изобретения PRP, содержащую стволовые клетки hVSEL, изменяют или модифицируют с использованием импульсов лазерного излучения, имеющих длину волны в диапазоне от 300 нм до 1000 нм, а в одном из

вариантов осуществления изобретения приблизительно 670 нм. В некоторых вариантах осуществления изобретения PRP, содержащую стволовые клетки hVSEL, изменяют или модифицируют с помощью следующих двух лазеров:

- Лазер Costa: В одном из вариантов осуществления изобретения используемый лазер Costa представляет собой лазер с длиной волны 670 нм и модуляцией SONG и мощностью 5 мВт. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень оптического фазового сопряжения (ОПС) варьировали в экспериментальных целях. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень оптического фазового сопряжения находится в диапазоне от 1% до 99%. В одном из вариантов осуществления изобретения лазер с модуляцией SONG был настроен на 60% оптическое фазовое сопряжение (ОПС) для результирующей мощности пучка 1 мВт.

- Лазер Magna Costa: В одном из вариантов осуществления изобретения используемый лазер Magna Costa представляет собой лазер на длине волны 670 нм и с модуляцией SONG и мощностью 5,7 мВт. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень оптического фазового сопряжения (ОПС) варьировали в экспериментальных целях. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень оптического фазового сопряжения находится в диапазоне от 1% до 99%. В одном из вариантов осуществления изобретения лазер с модуляцией SONG был установлен на 60% ОПС для результирующей мощности пучка 1,3 мВт. Лазер Magna Costa имеет регулируемые формы волн, позволяющие вводить альтернативные формы волн в качестве элемента управления.

В некоторых вариантах осуществления изобретения лазер с модуляцией SONG подавляет центральную полосу длин волн лазерного выходного сигнала в результате неразрывной деструктивной интерференции. Оставшиеся верхний и нижний диапазоны длин волн создают частотный паттерн биения из разреженных узлов конструктивной интерференции, которая представляет собой оставшийся физически видимый свет. Модуляция этого сложного паттерна волновой формы приводит к быстрому перемещению этих узлов, которое может достигать частоты повторения импульсов каждую фемтосекунду или менее. Деструктивная интерференция и разреженность узлов уменьшает блики на поверхности раздела тканей. Это уменьшает как отражательную способность фотонов, попавших в зону, которая только что подвергалась поглощению фотонов, так и эффект рассеяния. Глубина проникновения разреженных узлов может быть в 10-20 раз больше, чем у обычных фотонов на поверхности раздела, такой как человеческая кожа.

Культивирование и сбор обработанных лазером и контрольных (без обработки лазером или с обработкой белым светом) hVSEL в PRP

В некоторых вариантах осуществления изобретения для оценки биологической стабильности эффекта лазерного воздействия или манипуляции PRP культивируют в равных объемах среды RPMI 1640 с добавлением 200 мМ L-глутамин, пенициллина и стрептомицина и 10% термоинактивированной фетальной телячьей сыворотки.

Все культивирования PRP проводят с использованием вентилируемых колб T25 в увлажненном инкубаторе, установленном при температуре 37°C и 5% CO₂ на воздухе. При необходимости, адгезивные клетки собирают при первоначальной промывке PBS Дульбекко, не содержащим Ca²⁺/Mg²⁺, и обработке трипсином-EDTA в течение 5 минут при температуре 37°C.

Количество и распределение стволовых клеток hVSEL в необработанной PRP

В одном варианте осуществления изобретения для оценки распределения и количества стволовых клеток hVSEL в необработанной PRP, пробирки с PRP разделяют на отдельные пробирки для образцов после центрифугирования (см. блок-схему на фиг. 3) путем взятия 2 мл «верхней» части PRP; 2 мл «средней» части PRP; 2 мл «нижней» части PRP - как можно ближе к границе раздела эритроцитов; 2 мл в верхней части секции эритроцитов; и 2 мл в нижней части секции эритроцитов в общей сложности для пяти пробирок на образец PRP. Каждый образец оценивали на количество стволовых клеток hVSEL в соответствии с протоколом проточной цитометрии, упомянутым ранее в описании настоящей заявки. Оценка каждого образца показала, что жизнеспособность клеток оставалась на уровне >90%.

На фиг. 4 представлен график 400, иллюстрирующий данные о количестве и распределении стволовых клеток hVSEL в необработанной PRP для каждой из частей, полученных способом, описанным на фиг. 3. Было обнаружено, что верхние 2 мл PRP имеют среднее количество стволовых клеток hVSEL $3,1 \times 10^5$ /мл, а среднее количество Lin-клеток составляло $20,0 \times 10^5$ /мл. Было обнаружено, что средние 2 мл PRP имеют среднее количество стволовых клеток hVSEL $4,27 \times 10^5$ /мл, а среднее количество Lin-клеток составляет $18,5 \times 10^5$ /мл. Было обнаружено, что в нижних 2 мл PRP среднее количество стволовых клеток hVSEL составляет $9,29 \times 10^5$ /мл, а среднее количество Lin-клеток составляет $52,2 \times 10^5$ /мл. Общее среднее количество стволовых клеток hVSEL, обнаруженных в PRP, составляет $1,66 \times 10^6$ /мл. Общее среднее количество Lin-клеток, обнаруженных в PRP, составляет $9,01 \times 10^6$ /мл. Общее количество стволовых клеток hVSEL в верхней части эритроцитов составляет $4,0 \times 10^2$ /мл, а среднее количество Lin-клеток составляет $1,65 \times 10^4$ /мл. Общее количество стволовых клеток hVSEL в нижней части эритроцитов составляет $6,0 \times 10^2$ /мл, а среднее количество Lin-клеток составляет $5,1 \times 10^4$ /мл.

В этом варианте осуществления изобретения показано, что в PRP, полученной из донорской крови человека, имеется в среднем $1,6 \times 10^6$ /мл стволовых клеток hVSEL. Можно также провести другую среднюю оценку общего количества стволовых клеток hVSEL/мл в PRP путем взятия средних значений PRP без обработки для всех различных экстракций. В результате, среднее значение составляло $3,92 \times 10^6$ /мл. Диапазон наблюдаемых стволовых клеток hVSEL в PRP нормальной периферической крови (в нормальной человеческой крови) в градиентном исследовании согласно изобретению составляет $0,746-16 \times 10^5$ /мл.

Было обнаружено, что PRP имеет градиент стволовых клеток hVSEL,

увеличивающийся от PRP верхнего мениска вплоть до границы раздела PRP/эритроциты, где было обнаружено наибольшее количество стволовых клеток hVSEL, что указывает на то, что для достижения оптимальных результатов, в некоторых вариантах осуществления изобретения следует использовать весь объем PRP. Соответственно, множественные объемы PRP объединяют для клинических применений. В некоторых вариантах осуществления изобретения для некоторых применений может потребоваться более высокая концентрация hVSEL на объем PRP. Так, например, в некоторых применениях, таких как нанесение на волосы и косметические средства, которые являются локализованными, желательно иметь более высокую концентрацию hVSEL. В этих случаях нижняя третья часть, где присутствует наибольшее количество клеток hVSEL, может быть использована для достижения более концентрированного эффекта. В других применениях, например, при системном введении, которое может проводиться внутривенно, может оказаться желательным объединить весь объем.

В эритроцитарной части PRP-пробирки содержится очень мало (приблизительно 1×10^3 /мл) стволовых клеток hVSEL. Эти данные показали, что выделение стволовых клеток hVSEL на основе PRP происходит очень эффективно при применении систем и способов согласно изобретению. На фиг. 5 показаны результаты 500 типичного проточного цитометра для PRP без лазерной обработки.

Лазерная обработка (с использованием лазера Costa) PRP и результирующая пролиферация стволовых клеток hVSEL на 0-й и 1-й день культивирования

В одном из вариантов осуществления изобретения для оценки влияния лазера Costa с модуляцией SONG на количество стволовых клеток hVSEL в PRP приготавливают PRP, как описано ранее со ссылкой на фиг. 3 в трех экземплярах. Первую партию подвергают воздействию излучения под действием лазера Costa+SONG (настроенного на 60% OPC)) в течение 3 минут, вторую партию подвергают воздействию белого света с помощью фонарика в течение 3 минут, а третью партию вообще не подвергают обработке (контроль). После анализа с помощью проточной цитометрии три образца PRP культивируют, а затем собирают для анализа с помощью проточной цитометрии на 1-й день. Целью этого варианта осуществления изобретения является оценка начального воздействия лазера на пролиферацию стволовых клеток hVSEL и определение того факта, были ли эти изменения стабильными после 24 часов культивирования *вне организма*. Другими авторами была описана активация генов в клетках дермы человека после лазерного воздействия, которое привело к повышению паракринной секреции.

На фиг. 6 представлен график 600, иллюстрирующий данные по PRP облученной лазером Costa с модуляцией SONG, по соответствующим контролям и по культивированию *вне организма* в течение одного дня. Как уже было показано, когда PRP обрабатывают лазерным излучением + SONG в течение 3 минут, а затем сразу анализируют методом проточной цитометрии, количество стволовых клеток hVSEL составляет $1,256 \times 10^6$ /мл. Та же партия PRP, обработанная светом белого фонарика в течение 3 минут (в качестве первого контроля) и немедленно проанализированная,

содержит стволовые клетки hVSEL в количестве $4,15 \times 10^5$ /мл. Та же партия PRP, не подвергавшаяся обработке (в качестве второго контроля), содержит $5,77 \times 10^5$ /мл стволовых клеток hVSEL. Среднее значение для этих двух контрольных образцов составляет $4,96 \times 10^5$ /мл. Таким образом, PRP, подвергнутая воздействию лазерным излучением, показала увеличение количества стволовых клеток hVSEL в 2,5 раза по сравнению со средним значением в двух контрольных группах. Этот быстрый эффект заключается в том, что после воздействия модулированным лазерным излучением, клетки немедленно отбирают для анализа на проточном цитометре. Таким образом, время от воздействия модулированным лазерным излучением до анализа методом проточной цитометрии ни в одном из исследований не превышает 30 минут. Это наблюдение выгодно отличается от клинического применения и клинических испытаний hVSEL в PRP, подвергнутой воздействию модулированным лазерным излучением, которые часто демонстрируют быстрые клинические улучшения после внутривенной инфузии аутологичных стволовых клеток hVSEL в PRP, подвергнутой воздействию лазерным излучением. Это первый случай, когда эти лабораторные наблюдения и клинические данные были сопоставлены.

Следует отметить, что в некоторых вариантах осуществления изобретения PRP может быть обработана лазерным излучением+SONG в течение заданного периода времени в диапазоне от 1 минуты до 5 минут, а предпочтительно 3 минут. В некоторых вариантах осуществления изобретения, обработанная обогащенная тромбоцитами плазма имеет количество стволовых клеток в диапазоне от $0,5 \times 10^6$ /мл до $2,0 \times 10^6$ /мл при анализе сразу после заданного периода времени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, количество стволовых клеток hVSEL после обработки составляет $1,256 \times 10^6$ /мл.

На 1-й день культивирования *вне организма* (то есть, после 24-часового культивирования *вне организма*), PRP, обработанная лазером Costa+SONG, содержит $1,086 \times 10^5$ /мл стволовых клеток hVSEL. На 1-й день культивирования *вне организма*, PRP, обработанная светом белого фонарика (первый контроль), содержит $0,448 \times 10^5$ /мл стволовых клеток hVSEL. На 1-й день культивирования *вне организма*, контрольная PRP (без обработки и второй контроль) содержала $0,376 \times 10^5$ /мл стволовых клеток hVSEL. Среднее значение для этих двух контрольных групп составляет $0,432 \times 10^5$ /мл. Воздействие лазера на PRP через 24 часа *вне организма* давало увеличение стволовых клеток hVSEL $2,5 \times$ (в 2,5 раза) по сравнению с контрольными клетками, что указывало на то, что даже при фактическом снижении количества клеток (которое ожидалось после культивирования *вне организма*), соотношение стволовых клеток hVSEL, модулированных лазерным излучением, к контрольным стволовым клеткам hVSEL оставалось неизменным в течение 24 часов. В некоторых вариантах осуществления изобретения введение стволовых клеток осуществляют во временных рамках, варьирующихся от 1 минуты до 24 часов после приготовления/лазерной модуляции. В некоторых вариантах осуществления изобретения введение стволовых клеток

осуществляют в течение периода времени, варьирующегося в пределах от 1 минуты до 2 часов после приготовления/лазерной модуляции. В некоторых вариантах осуществления изобретения введение стволовых клеток предпочтительно осуществляют в течение 30 минут после приготовления/лазерной модуляции.

Эти данные подтвердили, что лазер оказывает пролиферативное действие на стволовые клетки hVSEL при PRP. Этот эффект сохраняется в относительном выражении по меньшей мере в течение 24 часов *вне организма* после лазерного воздействия. В некоторых вариантах осуществления изобретения введение стволовых клеток может происходить в течение периода времени, при котором измеримое воздействие на hVSEL сохраняется после лазерной обработки, при этом указанное время может варьироваться в зависимости от различных условий.

Лазерная обработка (с использованием лазера Magna Costa) стволовых клеток hVSEL в PRP с титрованием по времени лазерного воздействия и \pm модуляцией SONG на день 0 и на день 5

В одном из вариантов осуществления изобретения стволовые клетки hVSEL в PRP обрабатывали лазером Magna Costa для оценки количества hVSEL, присутствующего в PRP, после воздействия лазерным излучением в течение 1-3 минут с модуляцией SONG и без нее, чтобы подтвердить оптимальные параметры для клинического использования. Как было описано ранее в настоящей заявке, лазер Magna Costa является таким же, как и Costa, за исключением регулируемой формы волны. Это позволяет использовать в этих экспериментах возможно улучшенный контроль «плоской» волны.

В этом варианте осуществления изобретения модуляцию SONG устанавливали на уровне 60% OPC, и все клетки анализировали на день 0, а затем культивировали *вне организма* в течение 5 дней для оценки стойкости любых пролиферативных изменений в hVSEL.

Целью этого варианта осуществления изобретения является оценка времени воздействия лазером и модуляцией SONG или отсутствия модуляции SONG на пролиферацию стволовых клеток hVSEL в PRP на день воздействия лазером (D0) и через пять дней *вне организма* (D5). Время воздействия лазером и модуляцией SONG имеют решающее значение для успешной пролиферации стволовых клеток hVSEL.

На фиг. 7 представлен график 700, иллюстрирующий данные, относящиеся к изменению времени воздействия лазером Magna Costa и к изменению модуляции SONG на день 0 и день 5. В некоторых вариантах осуществления изобретения время воздействия лазера составляет от 1 минуты до 6 минут. В некоторых вариантах осуществления изобретения время воздействия лазера составляет от 1 минуты до 3 минут. В некоторых вариантах осуществления изобретения для объема в диапазоне от 20 миллилитров до 30 миллилитров время воздействия лазера составляет 3 минуты. В других вариантах осуществления изобретения время воздействия лазера зависит от объема PRP. В других вариантах осуществления изобретения время воздействия лазера зависит от качества собранной PRP.

Как уже было показано, на день 0 (день, когда PRP была приготовлена и подвергнута лазерному воздействию) общее количество стволовых клеток hVSEL в PRP увеличивалось по мере увеличения времени воздействия лазера (с 1 минуты до 3 минут), а модуляция SONG присутствовала повсюду. 2-минутное и 3-минутное лазерное воздействие давало очень схожее количество стволовых клеток hVSEL. При этом наблюдалось аналогичное, но менее выраженное увеличение количества стволовых клеток hVSEL при воздействии лазером без модуляции SONG. Контрольные группы с плоской волной и без обработки оставались аналогичными, что указывает на то, что время воздействия лазера с плоской волной составляло 3 минуты.

Таким образом, в PRP, подвергнутой воздействию лазера Magna Costa с модуляцией SONG в течение 1 минуты, 2 минут и 3 минут, количество стволовых клеток hVSEL является самым высоким при 2-минутной и 3-минутной обработках. В лазере Magna Costa без модуляции SONG, стволовых клеток hVSEL было меньше, чем в группе с лазерной модуляцией SONG в течение 1, 2 и 3 минут, но при этом, наблюдалось устойчивое увеличение числа обнаруженных стволовых клеток hVSEL в течение всего времени воздействия лазера. Плоская волна Magna Costa с модуляцией SONG и контроль без обработки давали меньшее число клеток (hVSEL), чем эквивалентное облучение лазером с модуляцией SONG при 2-минутном и 3-минутном лазерном воздействии.

На 5-й день культивирования *вне организма* группа с лазерным облучением с модуляцией SONG продемонстрировала увеличение количества стволовых клеток hVSEL по сравнению с 0-м днем, при этом, при 2-минутном и 3-минутном лазерном воздействии присутствовало несколько большее количество стволовых клеток hVSEL. 1-минутное и 3-минутное лазерное воздействие без модуляции SONG давало больше стволовых клеток hVSEL, чем 2-минутное лазерное воздействие, а в случае плоской волны и контроля без обработки также наблюдалось больше стволовых клеток hVSEL в целом, чем на 0-й день.

Таким образом, на 5-й день подсчета стволовых клеток hVSEL после 5-дневного культивирования *вне организма* все образцы показали увеличение количества стволовых клеток hVSEL по сравнению с 0-м днем. Наблюдалось также увеличение числа клеток в контрольных группах, и такое число превышало число в экспериментальных группах. Эта аномалия нуждается в дальнейшем исследовании, поскольку она может быть истинным отражением пролиферации стволовых клеток hVSEL *вне организма*, либо это может быть просто аномалией в данном конкретном варианте осуществления изобретения. В общих чертах, если стволовые клетки hVSEL, обработанные лазером, культивируют *вне организма*, то наблюдается уменьшение количества клеток.

Обработка лазером Costa (\pm модуляция SONG) стволовых клеток hVSEL в PRP на 0-й, 1-й и 7-й день

В одном варианте осуществления изобретения PRP (приготовленную в соответствии со способом, представленным на фиг. 3) подвергают воздействию лазера Costa в течение 3 минут с модуляцией SONG и 3 минут без модуляции SONG. Затем полученную PRP оценивают на пролиферацию hVSEL, после чего помещают в культуру

вне организма на 1 день и 7 дней. Культуры собирают на 1-й и 7-й день, и полученный сбор клеток оценивают на пролиферацию hVSEL с помощью проточной цитометрии. Этот вариант осуществления изобретения также включает оценку количества hVSEL в цельной периферической крови после лизиса эритроцитов.

Этот вариант осуществления изобретения относится к оценке количества стволовых клеток hVSEL в PRP в день лазерной обработки и на 1-й и 7-й день культивирования клеток *вне организма* и к оценке эффекта лазерной обработки с модуляцией SONG и без нее. Затем определяли количество стволовых клеток hVSEL в периферической крови без какой-либо обработки. Для этого проводили лизис эритроцитов с последующей проточной цитометрией.

На фиг. 8 показан график 800, иллюстрирующий данные, относящиеся к обработке лазером Costa стволовых клеток hVSEL в PRP на день 0, день 1 и день 7. Количество стволовых клеток hVSEL в этом образце периферической крови составляет $8,1 \times 10^5$ /мл, что хорошо коррелирует с предыдущими оценками стволовых клеток hVSEL в PRP на уровне 1×10^6 /мл и стволовыми клетками hVSEL в контрольной PRP в этом исследовании на уровне $1,072 \times 10^6$ /мл. Следует ожидать, что PRP будет иметь несколько большее количество стволовых клеток hVSEL, чем в периферической крови, поскольку стволовые клетки hVSEL сконцентрированы в PRP.

Количество стволовых клеток hVSEL в PRP после 3 минут лазерной обработки с модуляцией SONG увеличивается до $2,22 \times 10^6$ /мл, на 1-й день культивирования оно составляет $7,82 \times 10^5$ /мл, а на 7-й день культивирования оно составляет $2,56 \times 10^5$ /мл. Количество стволовых клеток hVSEL в PRP после 3 минут немодулированного лазерного воздействия увеличивается до $1,994 \times 10^6$ /мл, на 1-й день культивирования оно составляет $1,348 \times 10^6$ /мл, а на 7-й день культивирования оно составляет $1,48 \times 10^5$ /мл.

Количество стволовых клеток hVSEL в PRP после 3 минут обработки белым светом увеличивается до $1,504 \times 10^6$ /мл, на 1-й день культивирования оно составляет $2,66 \times 10^5$ /мл, а на 7-й день культивирования оно составляет $2,18 \times 10^5$ /мл. Количество стволовых клеток hVSEL в PRP при отсутствии обработки (контроль) составляет $1,072 \times 10^6$ /мл, на 1-й день культивирования - $4,7 \times 10^5$ /мл, а на 7-й день культивирования - $1,657 \times 10^5$ /мл.

Этот вариант осуществления изобретения подтверждает присутствие стволовых клеток hVSEL в цельной периферической крови после лизиса эритроцитов. Данные показывают увеличение количества стволовых клеток hVSEL в PRP, что подтверждает, что использование PRP является эффективным способом выделения стволовых клеток hVSEL для экспериментального и клинического применения.

Наибольшее количество стволовых клеток hVSEL в PRP обнаружено после обработки лазером Costa с модуляцией SONG при 3-минутном времени воздействия. При том же лазерном воздействии без модуляции SONG было обнаружено меньшее количество стволовых клеток hVSEL, но все еще повышенный уровень по сравнению с контролем, что указывает на некоторые возможные преимущества лазерного воздействия

даже без модуляции SONG. В контрольной группе с белым светом и без обработки было обнаружено меньшее количество стволовых клеток hVSEL, чем при обработке с модуляцией SONG и без модуляции SONG.

Количество стволовых клеток hVSEL, присутствующих на 1 и 7 дни культивирования *вне организма*, уменьшалось, что может указывать на гибель клеток, связанную с культивированием *вне организма*.

Титрование по времени воздействия лазером Magna Costa и Costa с модуляцией SONG на стволовые клетки hVSEL в PRP

В одном варианте осуществления изобретения PRP (приготовленную в соответствии со способом с фиг. 3) подвергают воздействию лазера Magna Costa в течение 3 минут и лазера Costa в течение 3, 6 и 9 минут. Был использован контроль с обработкой белым светом и контроль без обработки. После этого проводили анализ стволовых клеток hVSEL на проточном цитометре в течение всего времени воздействия.

Этот вариант осуществления изобретения относится к определению оптимального времени воздействия лазерным излучением для пролиферации стволовых клеток hVSEL в PRP. На фиг. 9 показан график 900, иллюстрирующий данные, относящиеся к титрованию по времени воздействия лазером Magna Costa и Costa с модуляцией SONG на стволовые клетки hVSEL в PRP. В некоторых вариантах осуществления изобретения время воздействия лазерным излучением составляет от 1 минуты до 6 минут. В некоторых вариантах осуществления изобретения время воздействия лазерным излучением составляет от 1 минуты до 3 минут. В некоторых вариантах осуществления изобретения, для объема в диапазоне от 20 миллилитров до 30 миллилитров, время воздействия лазерным излучением составляет 3 минуты. В других вариантах осуществления изобретения время воздействия лазерным излучением зависит от объема PRP. В других вариантах осуществления изобретения время воздействия лазерным излучением зависит от качества собранной PRP. Как уже было показано, общее количество стволовых клеток hVSEL, обнаруженных в PRP, подвергнутой воздействию лазера Magna Costa и Costa с модуляцией SONG в течение трех минут, было выше, чем количество, наблюдаемое при воздействии лазера Costa с модуляцией SONG в течение 6 или 9 минут. Эти данные подтверждают, что оптимальное время воздействия лазерным излучением для максимальной пролиферации стволовых клеток hVSEL составляет 3 минуты. Контроль с обработкой белым светом (фонариком) и контроль без обработки показали, что количество стволовых клеток hVSEL было меньше, чем при 3-минутном воздействии лазера с модуляцией SONG, что подтверждает оптимизированное время воздействия до 3 минут.

Данные, полученные из различных вариантов осуществления изобретения, подтверждают, что лазерная обработка, воздействие лазерным излучением на стволовые клетки или модуляция стволовых клеток hVSEL в PRP приводит к пролиферации стволовых клеток hVSEL. Это имеет большое значение для проведения рутинной терапии в будущем, а также для лучшего понимания истинной природы стволовых клеток hVSEL.

В некоторых вариантах осуществления изобретения оптимизация препарата PRP для лазерной активации стволовых клеток hVSEL зависит от многих факторов, включая, но не ограничиваясь ими, время центрифугирования, сбор клеток, время между лазерной обработкой и введением пациенту. Кроме того, в этих вариантах осуществления изобретения может быть применен метод тройного встряхивания, который может способствовать а) увеличению выхода клеток, которые концентрируются на границе раздела между плазмой и гелем, что позволяет осуществлять разделение, поскольку меньшее количество клеток теряется из-за прилипания к границе раздела, и б) увеличению содержания цитокинов и факторов роста, которые присутствуют в препарате либо до, либо после лазерной обработки.

Деблокирование CXCR4, которое делает его доступным для связывания

Эндогенный пептидный ингибитор X4 (EPI-X4) является антагонистическим лигандом CXCR4. Этот природный пептид, полученный путем фрагментации альбумина, связывается с антигеном CXCR4 главным образом посредством взаимодействия в малом кармане CXCR4 через его N-концевые остатки, что тем самым приводит к ингибированию передачи сигналов G-белка связанным клеткам. Сообщалось о нескольких производных EPI-X4, и их значения IC50 показали, что N-концевые остатки EPI-X4 имеют решающее значение для связывания с CXCR4.

Впоследствии было показано, что конфигурация NTer-IN (N-конец EPI-X4 в малом кармане CXCR4) играет очень важную роль в связывании CXCR4/EPI-X4. Более того, только семь остатков EPI-X4 играют какую-либо значительную роль в этом связывании, и четыре из них, все положительно заряженные, взаимодействуют через малый карман CXCR4.

Кроме того, отрицательно заряженный остаток EPI-X4 L16 (C-концевой Leu), взаимодействующий с остатком CXCR4 K271 (Lys), дает дестабилизирующий эффект. Однако химическое удаление L16 показало незначительное влияние на связывание EPI-X4 с CXCR4, что указывает на то, что первые три солевых мостика и водородная связь являются основными факторами связывания.

Последние два из семи значимых остатков, V11 и T15 EPI-X4, взаимодействуют с E25 и R30, которые составляют β -цепь CXCR4, что также обеспечивает некоторую небольшую дополнительную стабилизацию связывания. Химическое удаление остатка L1 или K7 в EPI-X4 почти полностью устраняет связывание с рецептором.

Солевые мостики представляют собой электростатические молекулы, взаимодействующие в сочетании с водородными связями и находящиеся между противоположно заряженными остатками. В то время как водородные связи могут объединяться, например, в воде, создавая большую силу, отдельные связи являются слабыми и легко разрываются. Расстояние между остатками, участвующими в образовании солевого мостика, имеет важное значение и обычно составляет порядка <400 пикометров (пм). Аминокислоты, находящиеся на расстоянии, превышающем их обычное расстояние друг от друга, не могут образовывать солевой мостик, а солевые мостики

претерпевают тепловые колебания, которые непрерывно разрушают и восстанавливают водородные связи.

EPI-X4, происходящий от альбумина, фрагментированного в кислотных условиях эмбриональной гаструляции, связывается с CXCR4 и нарушает регуляцию CXCR4, экспрессируемого стволовыми клетками hVSEL, что способствует защите солевых мостиков и водородных связей в малом кармане CXCR4 от тепловых колебаний, и тем самым поддерживает состояние покоя стволовых клеток hVSEL.

CXCR4 деблокируется лазерным излучением с модуляцией SONG, что делает его легко доступным для связывания с антителами как было подтверждено с помощью проточной цитометрии. Лазерное излучение в красном диапазоне спектра с модуляцией SONG проникает в малый карман CXCR4 и, таким образом, разрушает водородные связи и солевые мостики, связывающие CXCR4 с EPI-X4. Было установлено, что трехминутное воздействие лазера с модуляцией SONG является наиболее эффективным для деблокирования CXCR4. В данный момент лазерная тепловая турбулентность в малом кармане CXCR4 максимизирует пролиферацию стволовых клеток hVSEL *вне организма*. Через три минуты, связывание EPI-X4 с CXCR4 нарушается, и лазерное излучение становится неэффективным, поскольку тепловая энергия малого кармана сравнима с тепловой энергией лазера, излучающего в красном диапазоне спектра.

После трехминутного непрерывного лазерного воздействия устанавливается новая термостабильность по мере ослабления турбулентности и образования новых водородных связей, если не солевых мостиков, в более горячих, но теперь уже стабилизирующихся условиях. Если лазер воздействует в течение шести и девяти минут, то количество hVSEL уменьшается, поскольку более горячие стабилизирующие условия в малом кармане CXCR4 допускают появление некоторых новых водородных связей, которые явно демонстрируют некоторый эффект повторного связывания в комплексе CXCR4/EPI-X4.

Явная быстрая пролиферация стволовых клеток hVSEL в PRP *вне организма* демонстрирует, что лазерное излучение в красном диапазоне спектра с модуляцией SONG в течение трех минут проникает в малый карман CXCR4 и разрушает солевые мостики и водородные связи, что таким образом приводит к нарушению связывания CXCR4/EPI-X4 и к взаимодействию CXCR4 с мечеными антителами как было определено в последующем анализе методом проточной цитометрии.

Снижение внутреннего возраста

Внутренний эпигенетический возраст (IEA) является истинным показателем биологического возраста на уровне ДНК. В одном варианте осуществления изобретения при использовании описанных здесь процедур обработки и введения, а именно, в одном варианте осуществления изобретения однократная обработка, описанная в настоящей заявке, может приводить к снижению IEA индивидуума на 2-4 года, вторая обработка может приводить к дополнительному снижению IEA индивидуума на 2-4 года, третья обработка может приводить к дополнительному снижению IEA индивидуума на 2-4 года, и четвертая обработка может приводить к дополнительному снижению IEA индивидуума

на 2-4 года. Соответственно, для каждой обработки, IEA может сократиться на 2-4 года, так что четыре обработки, распределенные на период от 1 месяца до 24 месяцев, могут приводить к снижению IEA индивидуума на 8-16 лет. В качестве другого примера, при проведении описанных здесь процедур обработки и введения IEA индивидуума может быть снижен в диапазоне от 1 года до 4 лет. Более конкретно, в одном варианте осуществления изобретения однократная обработка, как описано в настоящей заявке, может приводить к снижению IEA индивидуума на 1-4 года, вторая обработка может приводить к дополнительному снижению IEA индивидуума на 1-5 лет, третья обработка может приводить к дополнительному снижению IEA индивидуума на 1-5 лет, и четвертая обработка может приводить к дополнительному снижению IEA индивидуума на 1-5 лет. Соответственно, для каждой обработки IEA может сократиться на 1-5 лет, так что четыре обработки, распределенные на период от 1 месяца до 24 месяцев, могут приводить к снижению IEA индивидуума на 4-20 лет. В некоторых вариантах осуществления изобретения обработку проводят с периодичностью от каждой недели до каждого года и с любым ее приращением. В некоторых вариантах осуществления изобретения обработку проводят с периодичностью от каждой недели до каждых шести месяцев и любым ее приращением. Необязательно, обработка может проводиться с любой частотой до тех пор, пока не будут достигнуты цели настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения у пациента наблюдается снижение биологического возраста в диапазоне от 1 года до 4 лет после первого введения обработанной обогащенной тромбоцитами плазмы. В некоторых вариантах осуществления изобретения у пациента наблюдается снижение биологического возраста в диапазоне от 4 лет до 9 лет после второго введения обработанной обогащенной тромбоцитами плазмы. В некоторых вариантах осуществления изобретения второе введение обработанной обогащенной тромбоцитами плазмы осуществляют за период времени от 1 недели до 6 месяцев после первого введения.

Как показано на фиг. 10A-10D, приводятся примеры внутренних эпигенетических возрастов, определенных для восьми разных людей, именуемых как пациенты А - Н. На фиг. 10А показан IEA пациента А 1010 в возрасте 50,44 года, когда хронологический возраст пациента А составляет 57 лет. На этой фигуре также показан IEA пациента В 1020 в возрасте 50,34 года, когда хронологический возраст пациента В составляет 62 года. На фиг. 10В показан IEA пациента С 1030 в возрасте 51,87 лет, когда хронологический возраст пациента С составляет 50 лет. На этой фигуре также показан IEA пациента D 1040 в возрасте 42,98 лет, когда хронологический возраст пациента D составляет 42 года. На фиг. 10С показан IEA пациента Е 1050 в возрасте 37,10 лет, когда хронологический возраст пациента Е составляет 36 лет. На этой фигуре также показан IEA пациента F 1060 в возрасте 47,03 лет, когда хронологический возраст пациента F составляет 53 года. На фиг. 10D показан IEA пациента G 1070 в возрасте 63,41 лет, когда хронологический возраст пациента G составляет 66 лет. На этой фигуре также показан IEA пациента H 1080 в возрасте 50,62 лет, когда хронологический возраст пациента H составляет 50 лет.

Следовательно, хронологический возраст может сильно отличаться от биологического возраста, который в дальнейшем может отличаться для IEA и EEA.

При этом желательно снизить скорость, ингибировать или даже обратить вспять эпигенетическое старение в целом, а в частности, IE-возраст. Для этого, каждому пациенту назначалось введение, как показано на фиг. 11. На фиг. 11 представлена блок-схема, иллюстрирующая репрезентативный способ получения PRP, которая содержит стволовые клетки hVSEL, используемые для снижения IEA, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения. IEA снижается за счет увеличения количества регенеративных факторов роста, возникающего в результате пролиферации стволовых клеток hVSEL. На этапе 1102 кровь пациента получают во множество пробирок по 10 см³ каждая. В некоторых вариантах осуществления изобретения, число пробирок варьируется от 3 до 12. В предпочтительном варианте осуществления изобретения кровь пациента получают в шесть пробирок по 10 см³ каждая. На этапе 1104 каждую пробирку центрифугируют с центробежной силой G, равной приблизительно 270G, в течение приблизительно 10 минут. В процессе отжима эритроциты/лейкоциты превращаются в гель на дне каждой пробирки. Тромбоциты, стволовые клетки hVSEL и плазма остаются отделенными над гелем в форме PRP. Исходя из базового распределения плотности, верхняя треть PRP имеет самую низкую концентрацию стволовых клеток hVSEL, в то время как нижняя треть PRP, вблизи границы раздела геля, имеет самую высокую концентрацию стволовых клеток hVSEL. На этапе 1106 пробирки встряхивают в первый раз. Встряхивание включает легкое покачивание пробирки взад-вперед в течение приблизительно 10 секунд. Такое движение выбивает свободные стволовые клетки hVSEL из PRP вблизи границы геля, что тем самым улучшает выход hVSEL по меньшей мере на 1% по сравнению с идентичной процедурой, где такое встряхивание не проводилось. На этапе 1108 собирают приблизительно 6-7 см³ PRP на пробирку. Собранные количества помещают в отдельную стерильную пробирку. На этапе 1110 пробирку, содержащую PRP, собранную на этапе 1108 встряхивают (второе встряхивание). В некоторых вариантах осуществления изобретения встряхивание осуществляют энергично в течение приблизительно 20 секунд для высвобождения регенеративных факторов. На этапе 1112 применяется лазерная стимуляция. Лазерная стимуляция была применена как описано выше. В некоторых вариантах осуществления изобретения лазерная стимуляция с модуляцией SONG проводится в течение трех минут. На этапе 1114 пробирку встряхивают в третий раз, чтобы пробудить «спящие» стволовые клетки hVSEL и выделить цитокины и факторы роста из стволовых клеток hVSEL.

На фиг. 11 представлен примерный процесс обработки PRP, полученной из проб крови пациента. Изменения в процессе без отклонения от объема настоящего изобретения также возможны для уменьшения IEA. Снижение биологического возраста может увеличиваться после каждого введения. Введение, описанное на фиг. 11, повторяют для дополнительного уменьшения биологического возраста. Следовательно, в одном из примеров одно введение может уменьшить биологический возраст на один год, в то время

как дополнительное введение может уменьшить его еще на один год. Величина снижения ИЕА, достигаемая с использованием вариантов осуществления изобретения, выше, чем при любом другом известном способе.

Соответственно, возвращаясь к примерам случаев, приведенным на фиг. 10А - 10D, если пациенту А назначено одно лечение, то хронологический возраст уменьшается с 50,44 лет приблизительно до 48-46 лет. Если пациенту В назначают два вида лечения, разделенных периодом времени от 1 недели до 6 месяцев, то хронологический возраст уменьшается с 50,34 лет приблизительно до 46-42 года. Если пациенту С назначают три курса лечения, каждый из которых разделен периодом времени от 1 недели до 6 месяцев, то хронологический возраст сокращается с 51,87 лет приблизительно до 46-40 лет. Если пациенту D назначают четыре курса лечения, каждый из которых разделен периодом времени от 1 недели до 6 месяцев, то хронологический возраст сокращается с 52,98 лет приблизительно до 45-37 лет. Если пациенту Е назначают пять курсов лечения, каждый из которых разделен периодом времени от 1 недели до 6 месяцев, то хронологический возраст сокращается с 37,10 лет приблизительно до 27-17 лет. Если пациенту F назначают шесть курсов лечения, каждый из которых разделен периодом времени от 1 недели до 6 месяцев, то хронологический возраст сокращается с 47,03 года приблизительно до 35-23 года. И наконец, если пациенту G назначают семь курсов лечения, каждый из которых разделен периодом времени от 1 недели до 6 месяцев, то хронологический возраст сокращается с 63,41 года приблизительно до 49-35 лет.

Приведенные выше примеры являются просто иллюстрацией многих применений системы согласно изобретению. Хотя в настоящей заявке описано только несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, однако, следует отметить, что настоящее изобретение может быть осуществлено с применением многих других конкретных форм, не выходящих за рамки существа или объема изобретения. Следовательно, примеры и варианты согласно изобретению следует рассматривать как иллюстративные, а не ограничительные, и настоящее изобретение может быть изменено в рамках прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения композиции, которая при введении пациенту уменьшает биологический возраст пациента, включающий:

пролиферацию стволовых клеток пациента, включающую:

приготовление обогащенной тромбоцитами плазмы, содержащей стволовые клетки; и

обработку обогащенной тромбоцитами плазмы модулированными импульсами лазерного излучения с заданной длиной волны в течение заданного периода времени.

2. Способ по п. 1, причем приготовление обогащенной тромбоцитами плазмы включает:

добавление крови пациента во множество пробирок;

центрифугирование упомянутого множества пробирок при заданном усилии g в течение заданного периода времени для получения обогащенной тромбоцитами плазмы; и

разделение на аликвоты полученной обогащенной тромбоцитами плазмы в стерильную пробирку.

3. Способ по п. 2, причем центрифугирование упомянутого множества пробирок дополнительно включает встряхивание упомянутого множества пробирок после центрифугирования.

4. Способ по п. 2, дополнительно включающий встряхивание стерильной пробирки после разделения на аликвоты.

5. Способ по п. 2, причем упомянутое множество пробирок варьируется от 3 до 12 пробирок с любым его приращением.

6. Способ по п. 1, дополнительно включающий встряхивание обогащенной тромбоцитами плазмы после обработки модулированными импульсами лазерного излучения.

7. Способ по п. 1, причем упомянутую обработку обогащенной тромбоцитами плазмы проводят в условиях минимального фонового белого освещения.

8. Способ по п. 1, причем заданная длина волны находится в диапазоне от 300 нм до 1000 нм.

9. Способ по п. 1, причем заданная длина волны составляет 670 нм.

10. Способ по п. 1, причем обогащенную тромбоцитами плазму приготавливают с использованием нормальной человеческой крови.

11. Способ по п. 1, причем заданный период времени составляет от 1 минуты до 5 минут.

12. Способ по п. 1, причем упомянутая обработанная обогащенная тромбоцитами плазма имеет количество стволовых клеток в диапазоне от $0,5 \times 10^6$ /мл до $2,0 \times 10^6$ /мл при анализе сразу после заданного периода времени.

13. Способ получения композиции, которая при введении пациенту уменьшает биологический возраст пациента, включающий:

пролиферацию стволовых клеток пациента, включающую:

- добавление нормальной человеческой крови во множество пробирок;
- центрифугирование упомянутого множества пробирок при заданном усилии g в течение 10 минут для получения обогащенной тромбоцитами плазмы;
- встряхивание упомянутого множества пробирок;
- разделение на аликвоты полученной обогащенной тромбоцитами плазмы в стерильную пробирку;
- встряхивание обогащенной тромбоцитами плазмы в стерильной пробирке;
- обработку обогащенной тромбоцитами плазмы модулированными импульсами лазерного излучения с заданной длиной волны в течение заданного периода времени; и
- встряхивание обработанной обогащенной тромбоцитами плазмы.

14. Способ по п. 13, причем упомянутое множество пробирок варьируется от 3 до 12 пробирок с любым его приращением.

15. Способ по п. 13, причем упомянутую обработку обогащенной тромбоцитами плазмы проводят в условиях минимального фонового белого освещения.

16. Способ по п. 13, причем заданная длина волны находится в диапазоне от 300 нм до 1000 нм.

17. Способ по п. 13, причем заданная длина волны составляет 670 нм.

18. Способ по п. 13, причем заданный период времени составляет от 1 минуты до 5 минут.

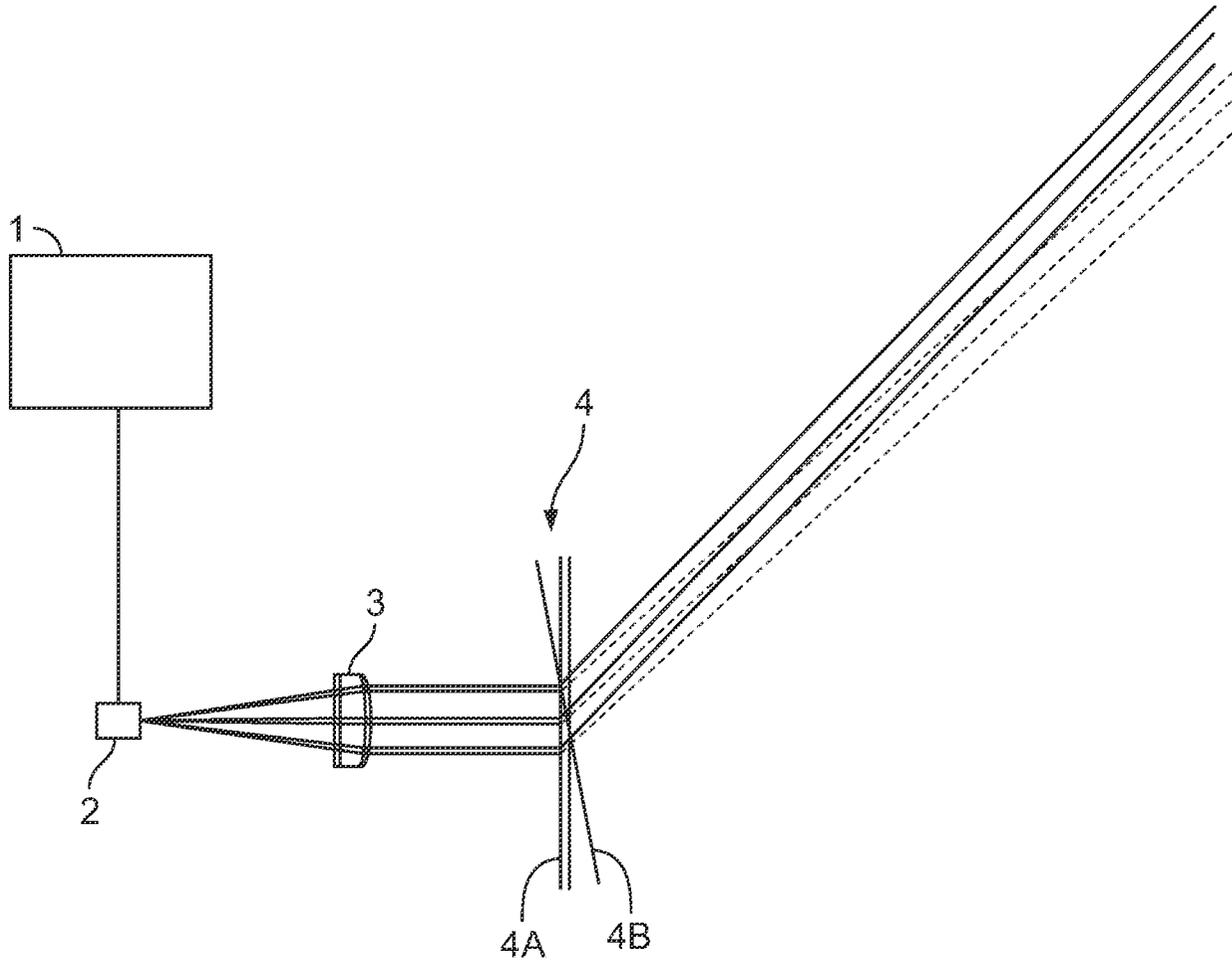
19. Способ по п. 13, причем упомянутая обработанная обогащенная тромбоцитами плазма имеет количество стволовых клеток в диапазоне от $0,5 \times 10^6$ /мл до $2,0 \times 10^6$ /мл при анализе сразу после заданного периода времени.

20. Способ по п. 13, причем упомянутая обработанная обогащенная тромбоцитами плазма демонстрирует увеличение содержания стволовых клеток в 2,5 раза по сравнению со средним значением для первого и второго контрольных образцов, причем первый контрольный образец включает обогащенную тромбоцитами плазму, обработанную светом белого фонарика, в течение заданного периода времени, и причем второй контрольный образец включает обогащенную тромбоцитами плазму без какой-либо обработки светом.

21. Способ по п. 13, причем упомянутая модуляция отменяет центральную полосу длин волн лазерного излучения таким образом, что оставшиеся верхняя и нижняя полосы длин волн создают паттерн частоты биений с разреженными узлами.

По доверенности

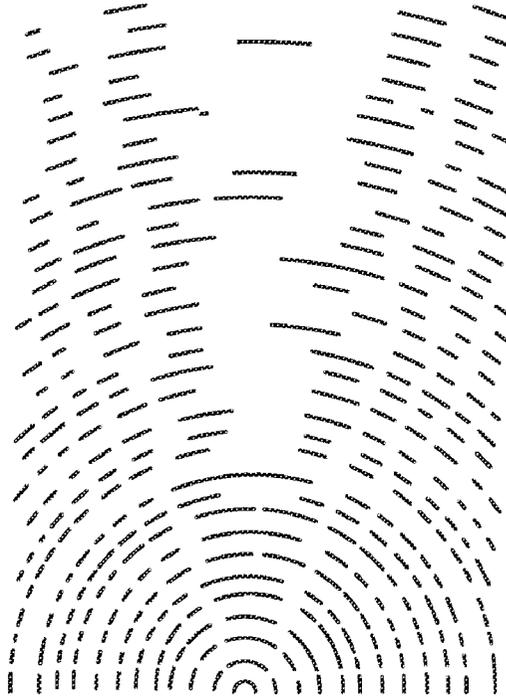
ФИГ.1



(Уровень техники)
(Патент США № 6811564)

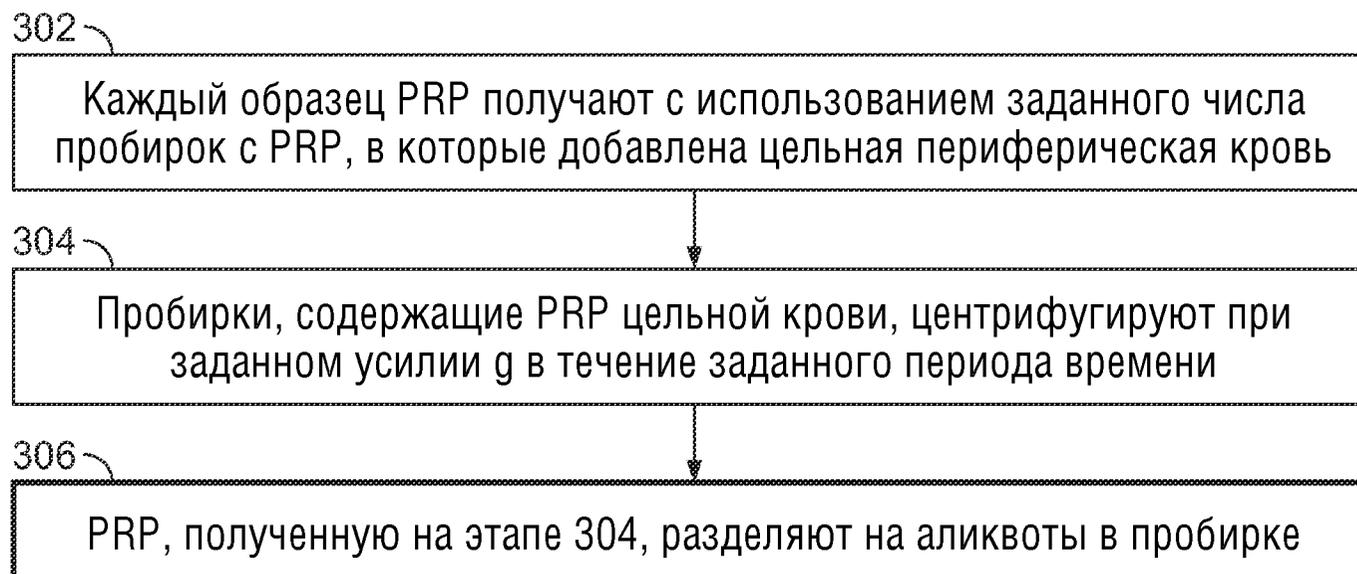
ФИГ.2

200



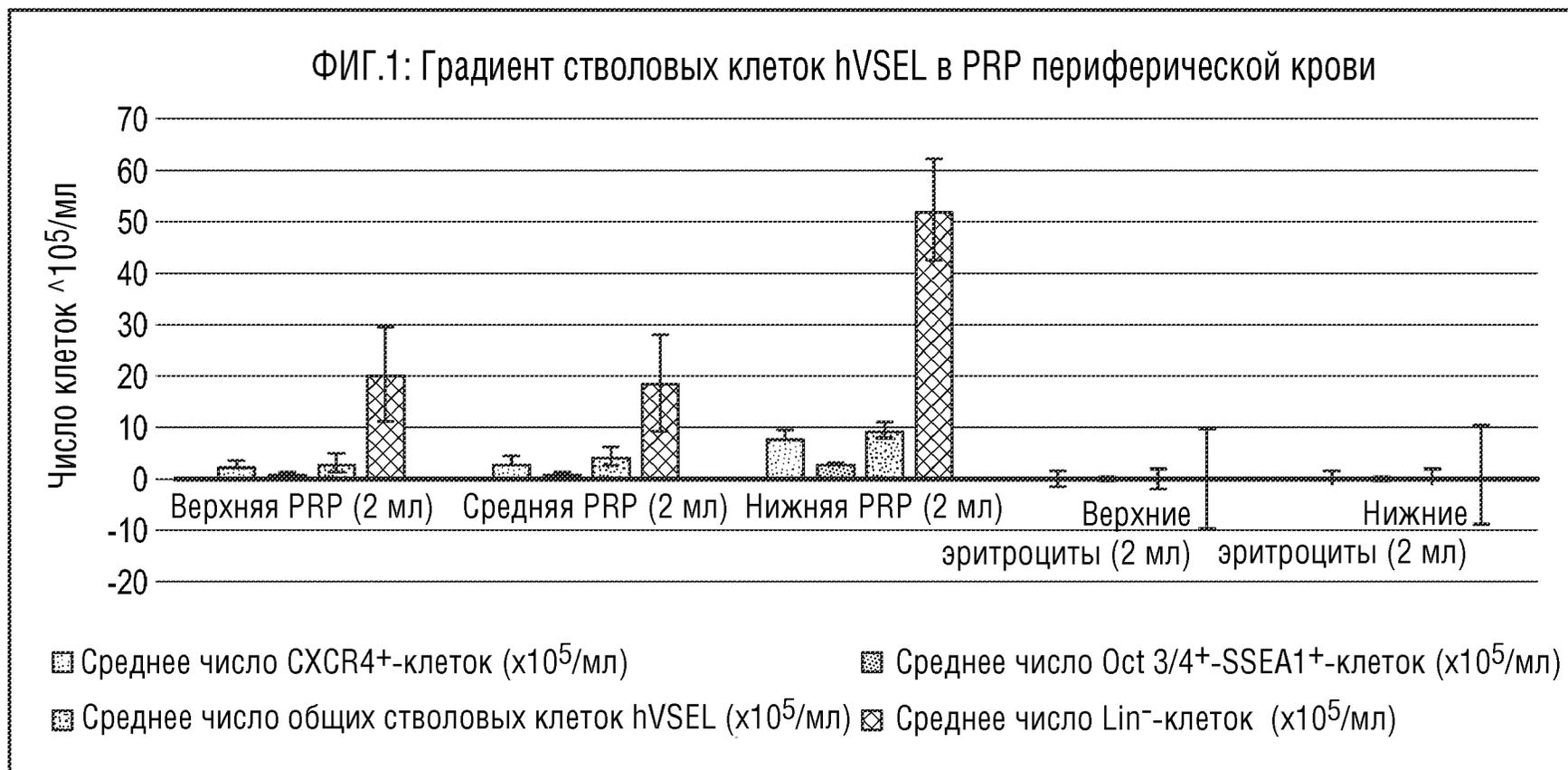
(Уровень техники)
(Патент США № 6811564)

ФИГ.3



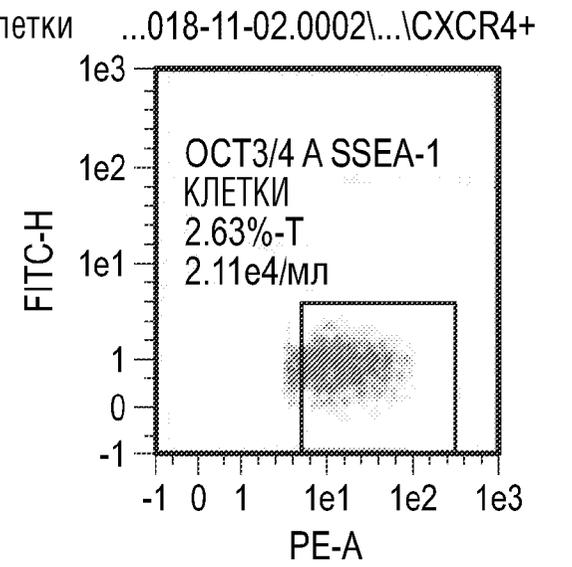
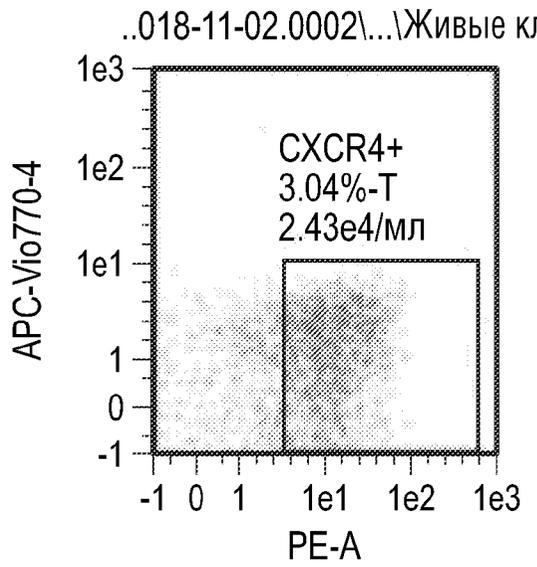
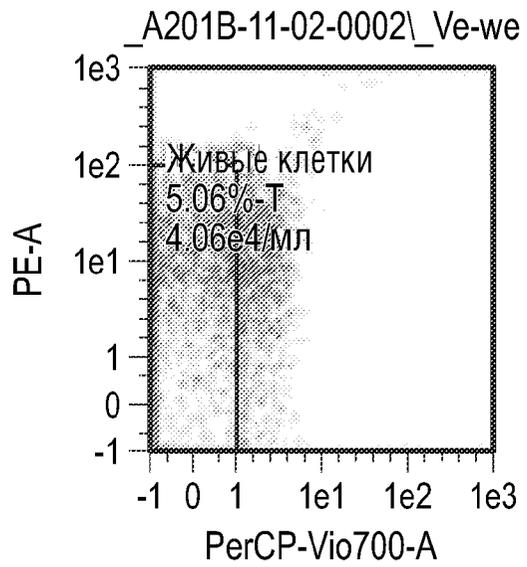
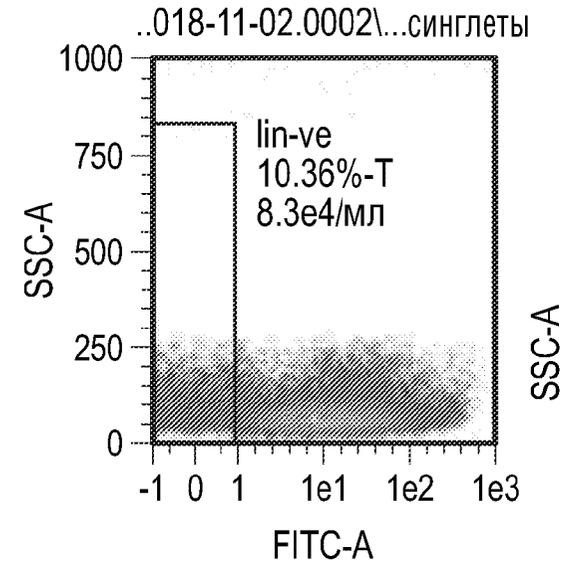
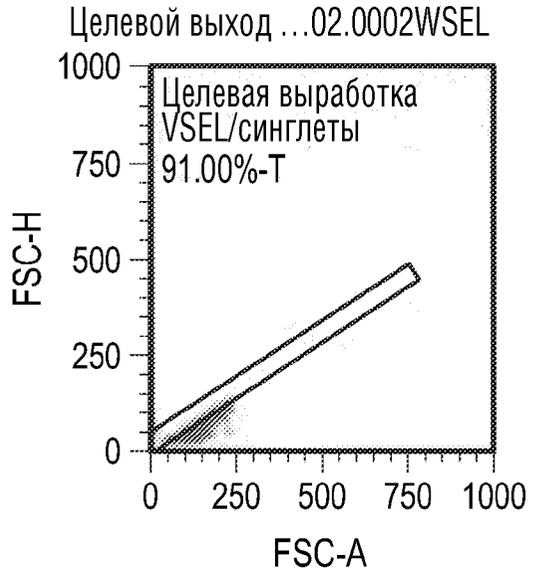
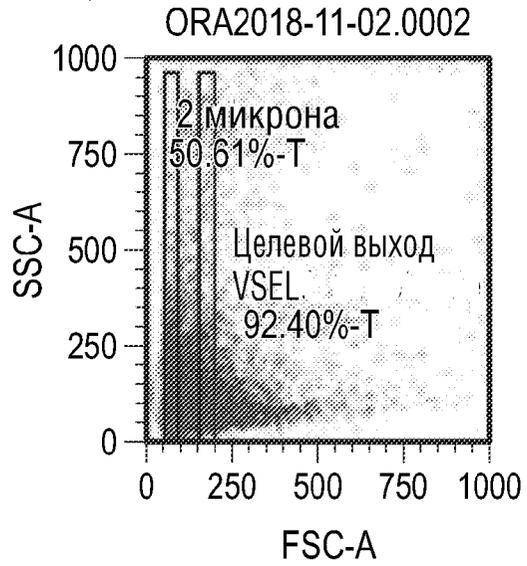
ФИГ.4

400 ↘



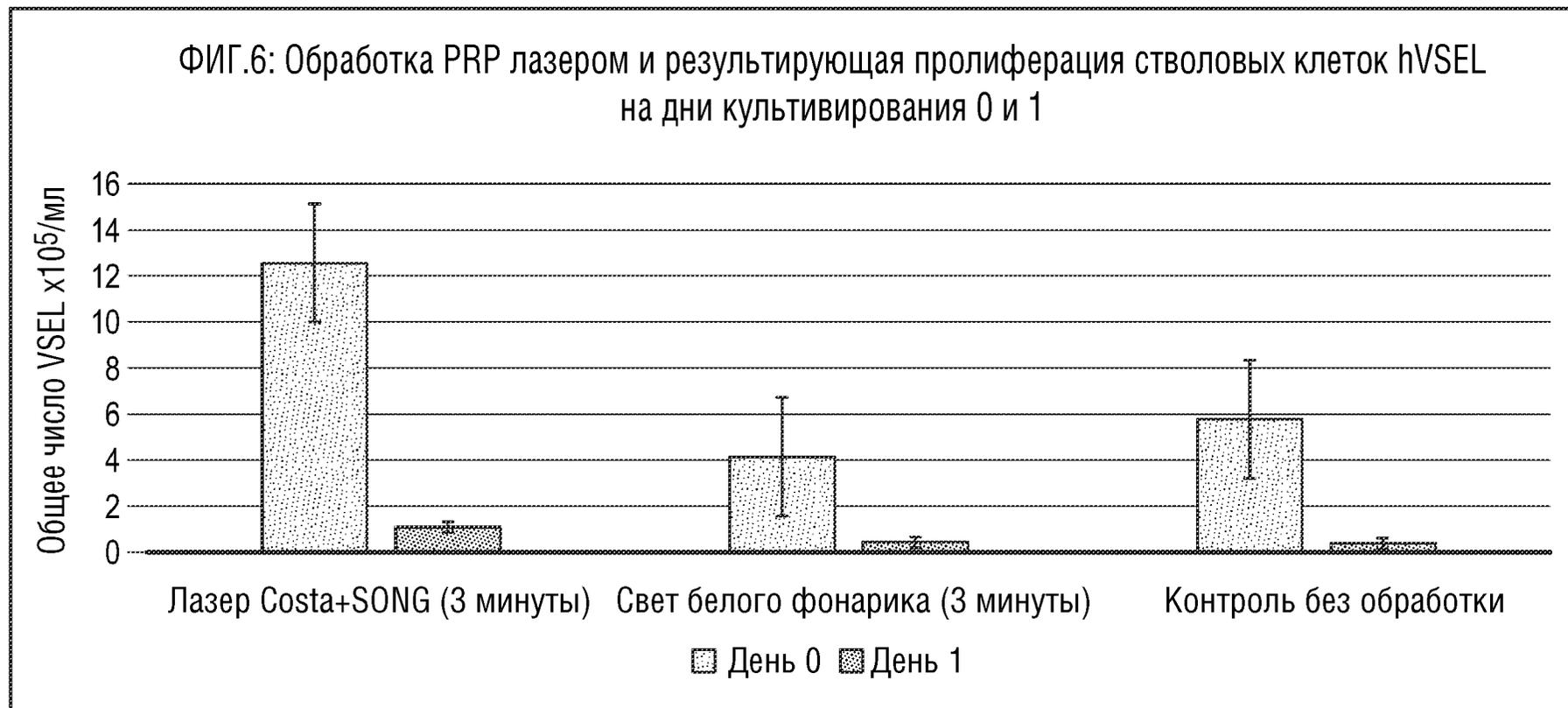
ФИГ.5

500



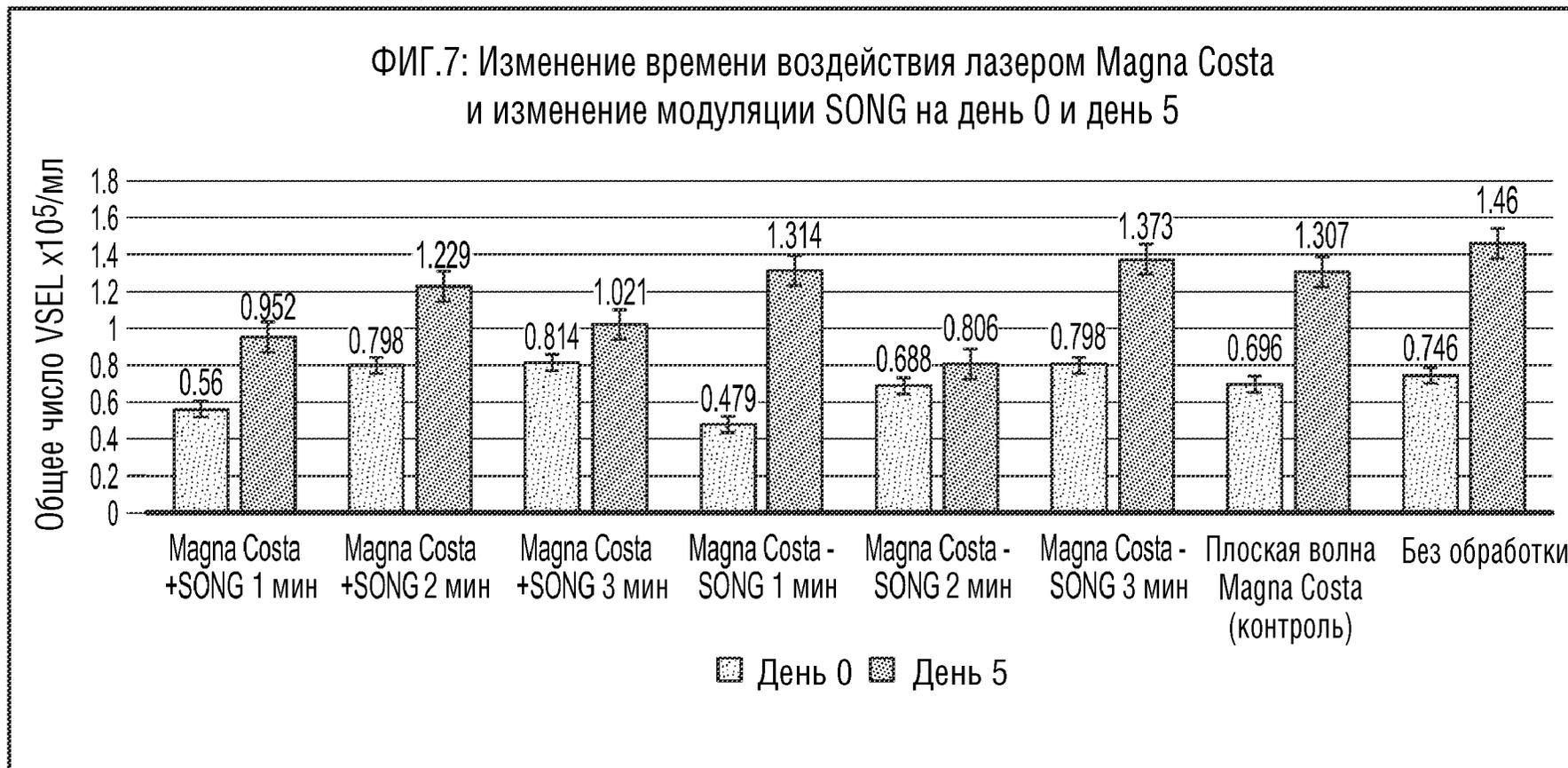
ФИГ.6

600 ↗



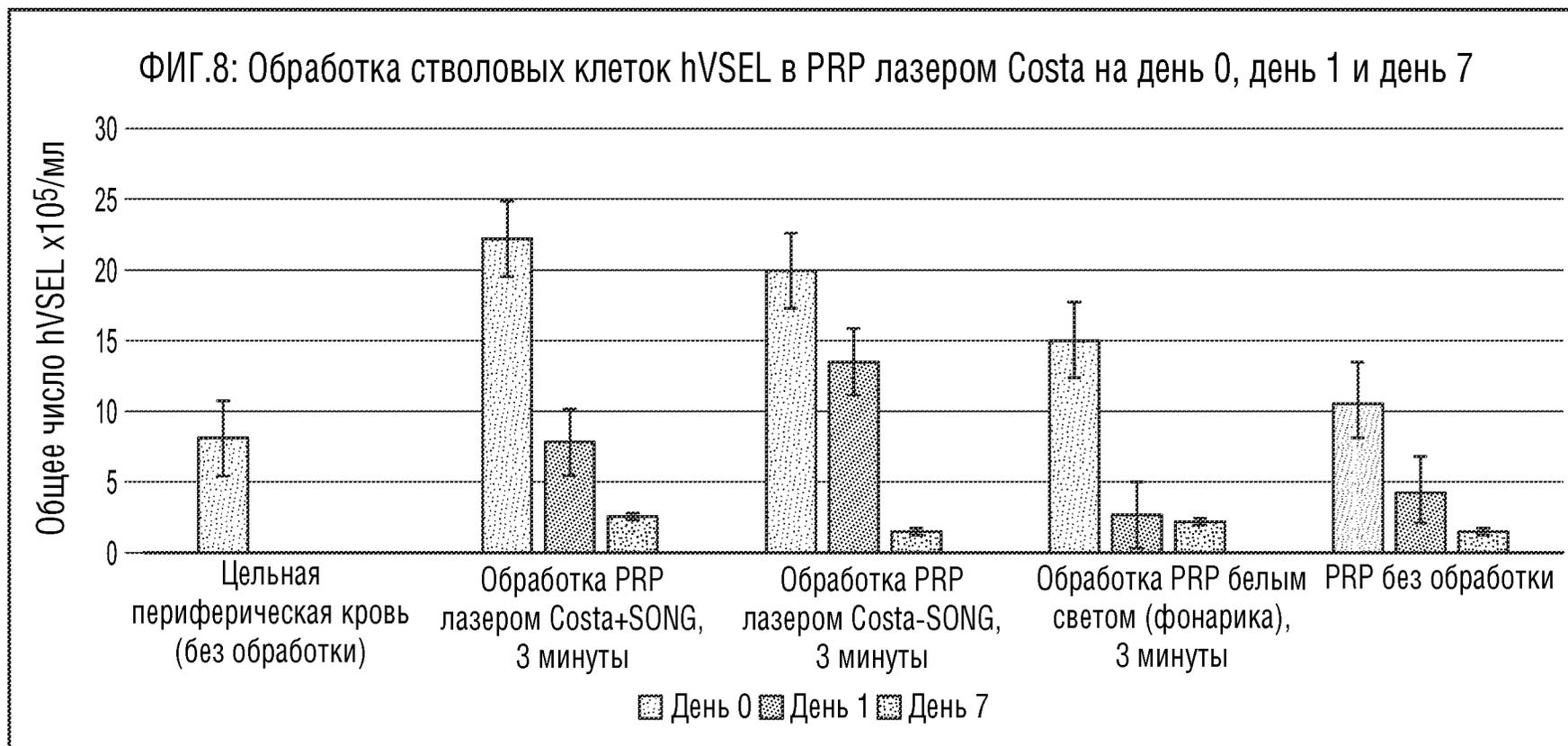
ФИГ.7

700 ↗



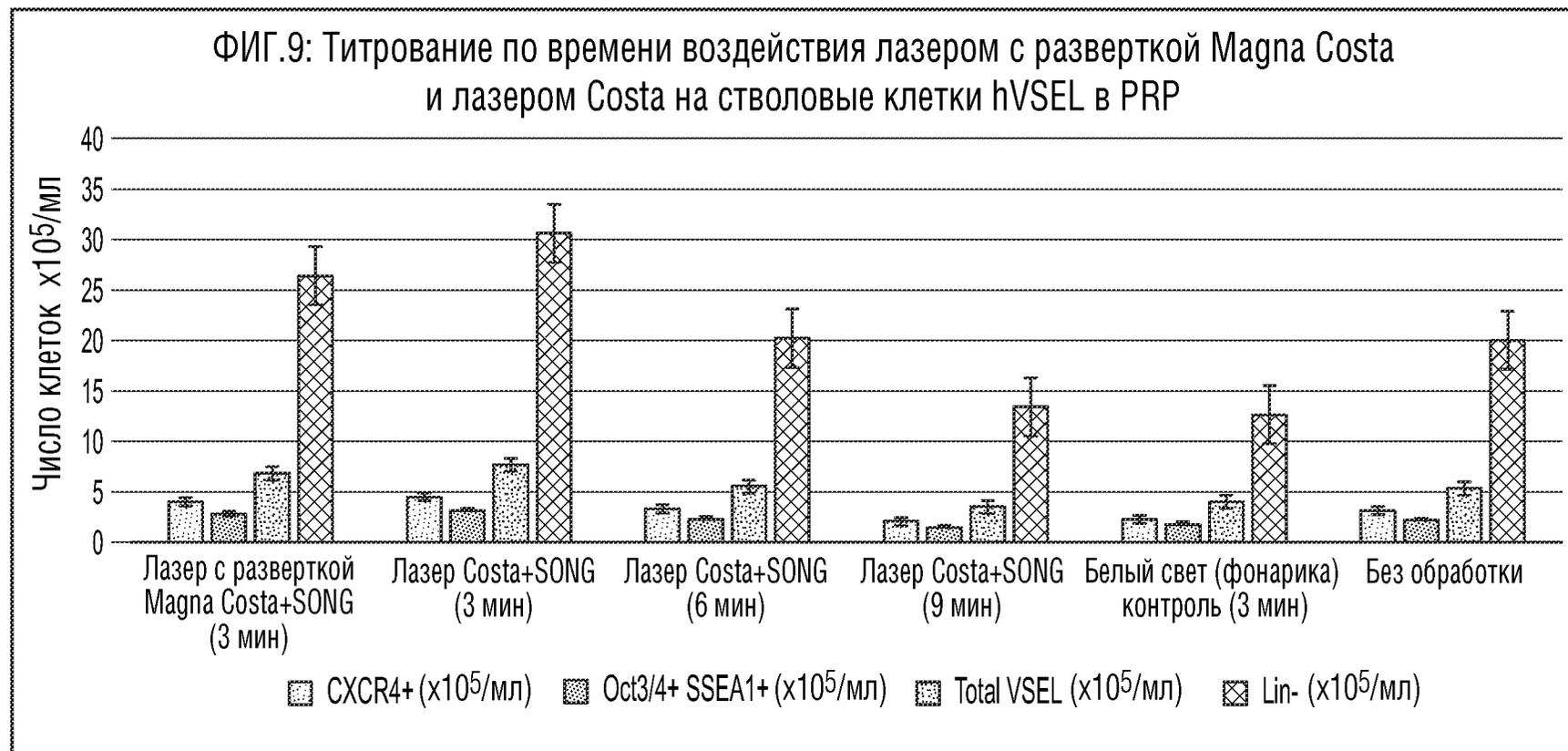
ФИГ.8

800 ↘

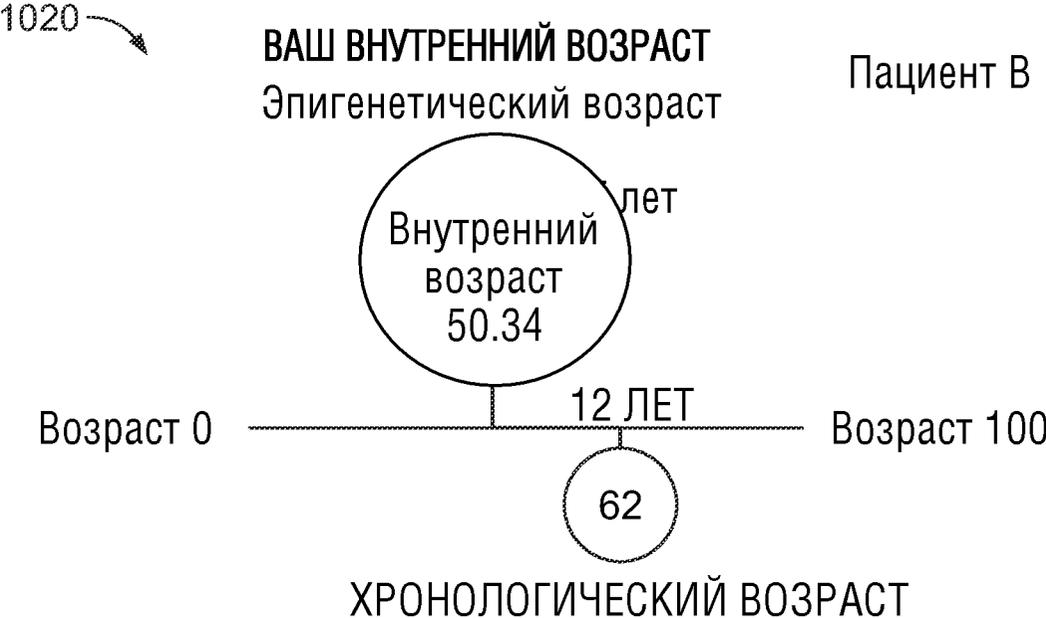
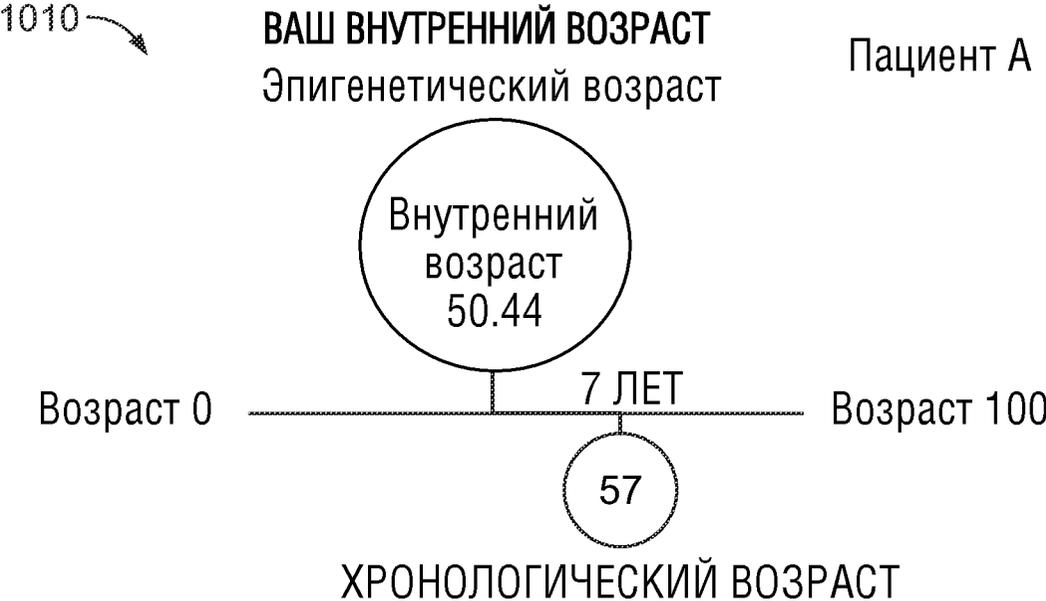


ФИГ.9

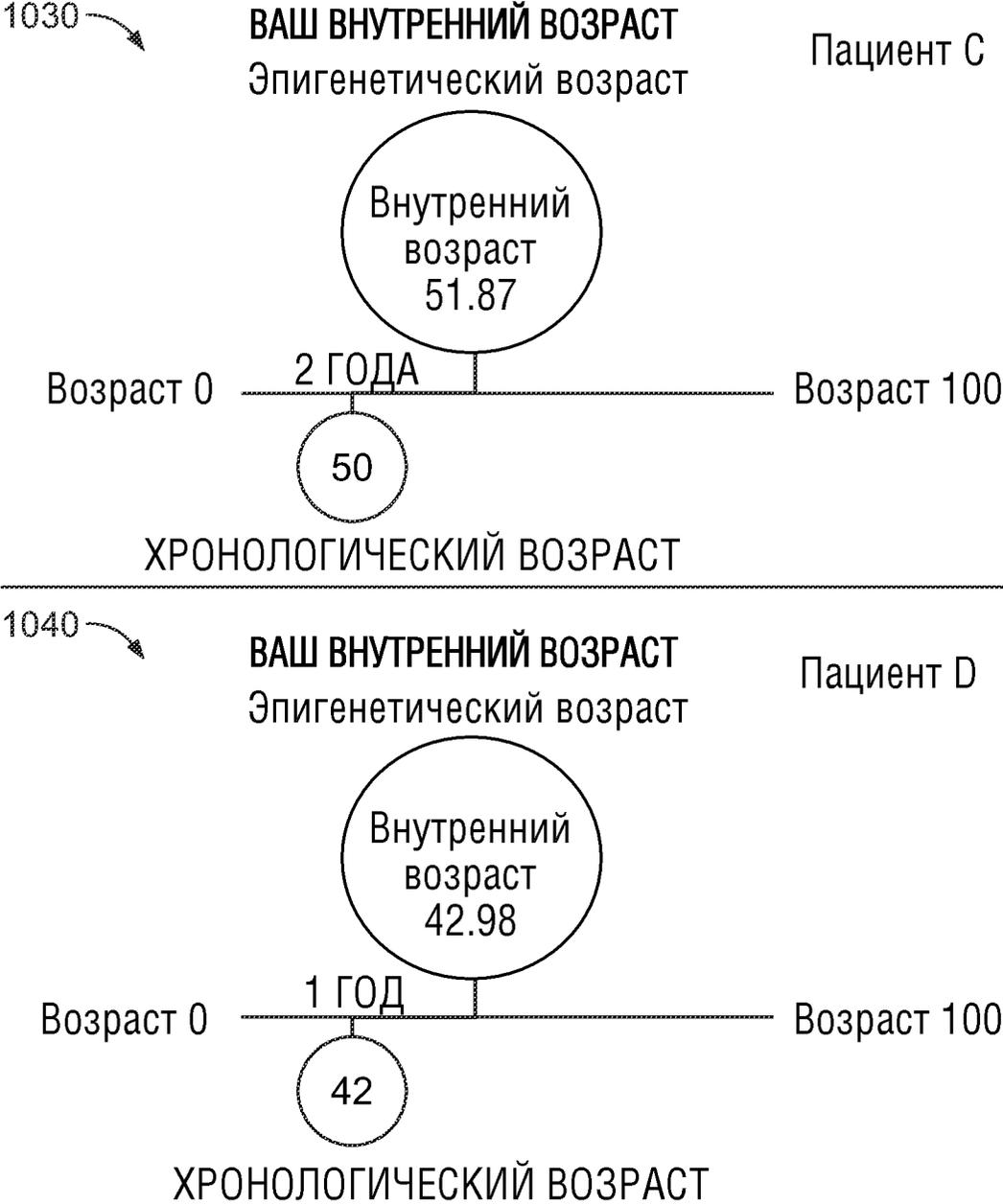
900



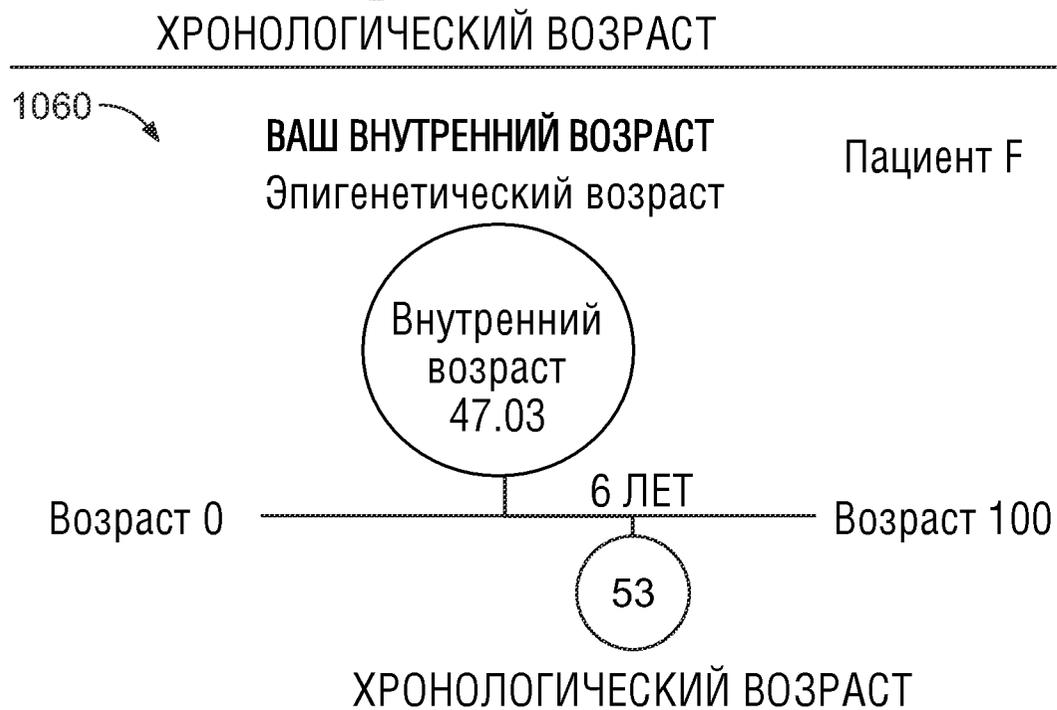
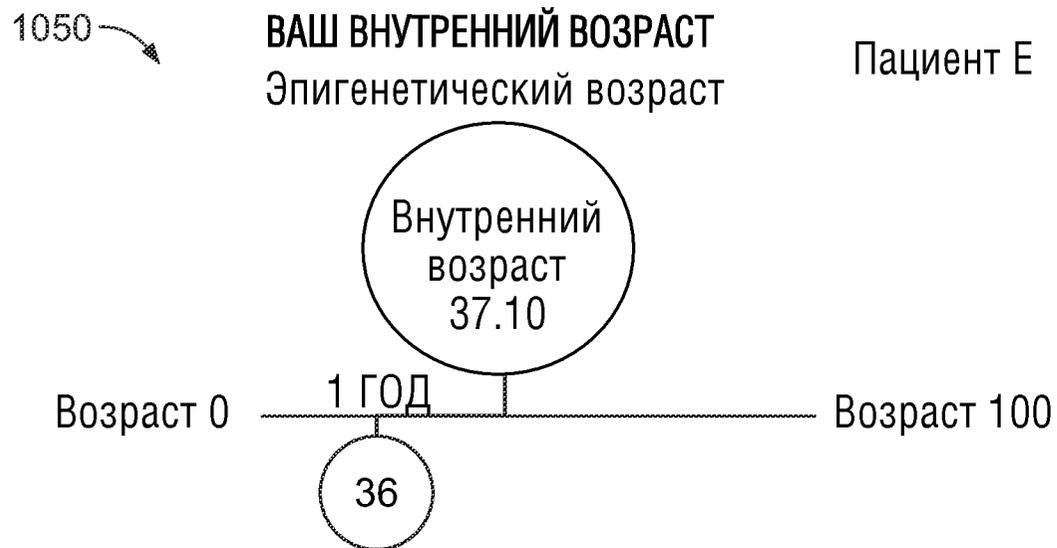
ФИГ.10А



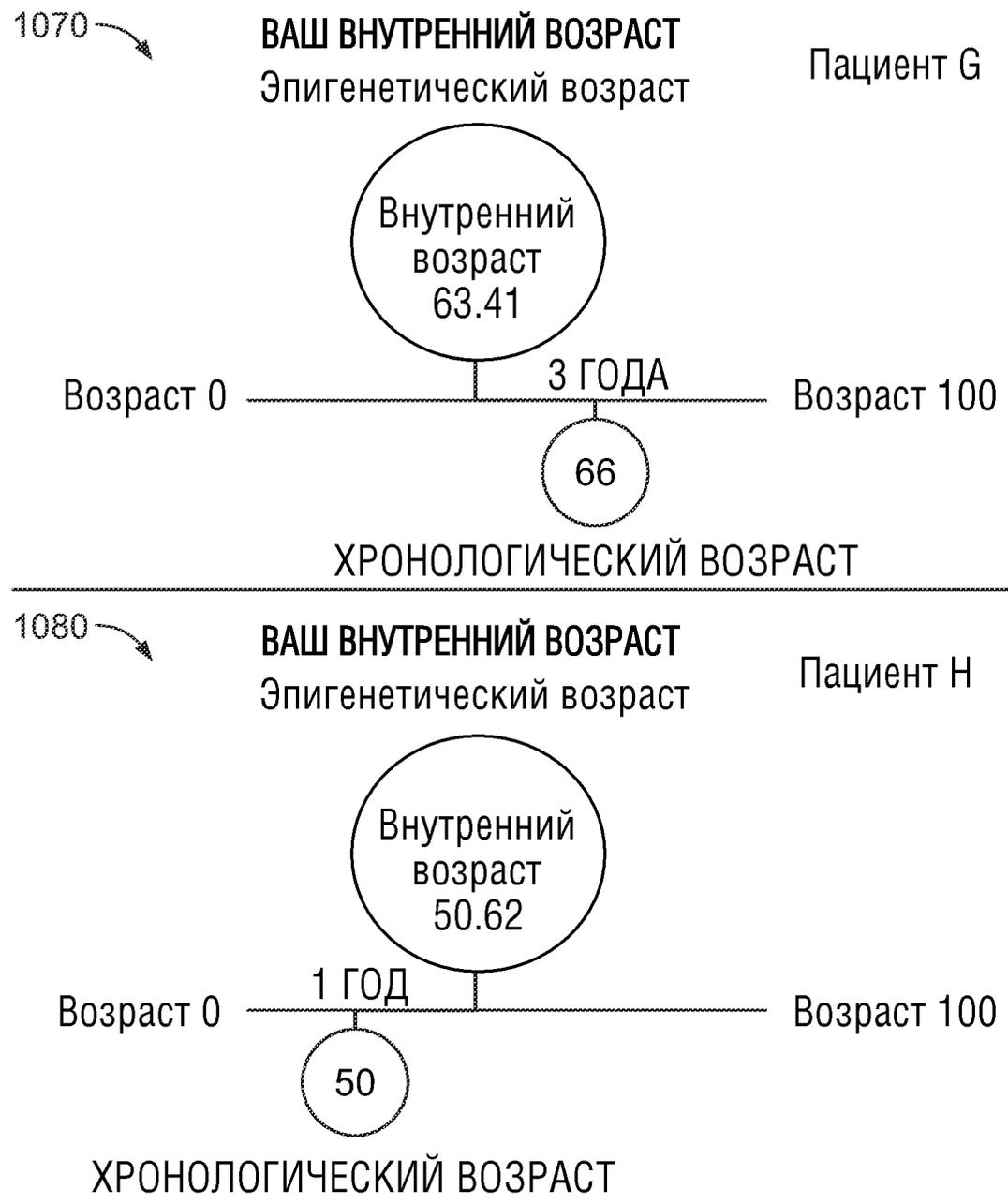
ФИГ.10В



ФИГ.10С



ФИГ.10D



ФИГ.11

