

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392185** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.12.29

(22) Дата подачи заявки
2022.10.19

(51) Int. Cl. *A61K 35/28* (2015.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ ЭКЗОСОМ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
КОСТНОГО МОЗГА В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА**

(31) 202210607894.5

(32) 2022.05.31

(33) CN

(86) PCT/CN2022/126041

(71) Заявитель:
НАНЬТУН УНИВЕРСИТИ (CN)

(72) Изобретатель:

Гу Сяосун, Сунь Чэн, Дин Фэй, Гун
Лэйлэй, Цун Мэн, Ван Сяоминь, Сунь
Хуалинь, Чжан Юй, Чжао Лили, Цянь
Тяньмэй (CN)

(74) Представитель:

Забегалева У.Г., Давыдова Е.Л.,
Мурашев П.М. (RU)

(57) Данное изобретение относится к области биомедицины и связано с применением экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при лечении болезни Паркинсона. Экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга продуцируют мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга, стимулированными питательной средой. После пересева экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга экстрагируют в питательную (культуральную среду). Питательной средой мезенхимальных стволовых клеток костного мозга является питательная среда α -MEM, содержащая FBS и PS. Экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга могут значительно улучшить двигательную функцию мышечной ткани с болезнью Паркинсона и оказать защитное действие на дофаминергические нейроны у мышечной ткани с болезнью Паркинсона. Кроме того, экзосомы могут улучшить обонятельную функцию и ингибировать активацию астроцитов в обонятельной луковице у мышечной ткани с болезнью Паркинсона.

A1

202392185

202392185

A1

Применение экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в процессе лечения болезни Паркинсона

1. Область техники

[0001] Данное изобретение относится к области биомедицины и связано с применением экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при лечении болезни Паркинсона.

2. Уровень техники

[0002] Болезнь Паркинсона (БП), также известная как паралич дрожательный или паралич Паркинсона является распространенным старческим нейродегенеративным заболеванием. Средний возраст начала заболевания составляет около 60 лет. По статистике, болезнью Паркинсона страдает каждый из 800 человек в мире. К 2030 году из-за ускорения процесса старения распространенность болезни Паркинсона удвоится, и, по оценкам, заболевших будет более 9 миллионов. Показатель распространенности среди людей старше 65 лет в Китае составляет около 1,7%. Прямые медицинские расходы пациентов оцениваются более чем в 10 000 долларов США в год. Это ложится тяжелым бременем на семьи и общество. Болезнь Паркинсона активно прогрессирует и в основном проявляется замедлением движений, мышечной ригидностью, тремором покоя, нарушением осанки и походки. Кроме того, болезнь Паркинсона также включает множество немоторных симптомов, таких как депрессия, запор, гипосмия и нарушение сна. Основными патологическими признаками болезни Паркинсона являются дегенерация и отмирание дофаминергических нейронов в черной субстанции, значительное снижение содержания дофамина в стриатуме (полосатом теле) и появление телец Леви в черной субстанции. Клиническое лечение болезни

Паркинсона в основном основано на заместительной терапии дофамином. Однако длительное применение этой терапии может вызвать различные побочные реакции, такие как беспокойство, бессонница, галлюцинации и другие психические симптомы. Более того, современные методы лечения могут только улучшить симптомы болезни, но не могут предотвратить ее прогрессирование, не говоря уже о том, чтобы вылечить болезнь. Таким образом, поиск новых препаратов для лечения болезни Паркинсона обладает огромными экономическими и социальными преимуществами.

Сущность изобретения

[0003] Задачей данного изобретения является применение экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при лечении болезни Паркинсона. Экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга могут значительно улучшить двигательную функцию мышечной с болезнью Паркинсона и оказать защитное действие на дофаминергические нейроны у мышечной с болезнью Паркинсона. Более того, экзосомы также могут улучшить обонятельную функцию мышечной с болезнью Паркинсона и ингибировать активацию астроцитов в обонятельной луковице у мышечной с моделью Паркинсона.

[0004] Техническая схема, обеспечиваемая изобретением, выглядит следующим образом:

[0005] Применение экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в приготовлении препаратов для лечения болезни Паркинсона. В этом процессе экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга получают путем стимуляции мезенхимальных стволовых клеток костного мозга питательной средой. После пересева экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга экстрагировали в питательную среду. Питательной средой мезенхимальных

стволовых клеток костного мозга была питательная среда α -MEM, содержащая FBS и PS.

[0006] Также изобретение включает в себя любое из следующего.

[0007] Применение экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в приготовлении препаратов для улучшения двигательной функции при болезни Паркинсона.

[0008] Применение экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в приготовлении препаратов для защиты дофаминергических нейронов при болезни Паркинсона.

[0009] Применение экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в приготовлении препаратов для улучшения обонятельной функции при болезни Паркинсона.

[0010] Применение экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в приготовлении препаратов для снижения активации астроцитов обонятельной луковицы при болезни Паркинсона.

[0011] Кроме того, питательная среда представляет собой культуральную среду α -MEM, содержащую 10% FBS и 1% PS.

[0012] Кроме того, условия культивирования мезенхимальных стволовых клеток костного мозга: 37°C, 5% CO₂.

[0013] Далее костный мозг сеют в полную среду, предварительно нагретую до 37°C.

[0014] Более того, при культивировании мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, когда плотность клеток достигает 80%, для усвоения используют трипсин. Под микроскопом наблюдают, как клетки становятся круглыми, и когда зазор становится больше, добавляют полную среду для прекращения усвоения. Супернатант отбрасывают с помощью центрифугирования, и соотношение

пассажей определяют как поколение P1 в зависимости от количества клеток. Среду меняют каждые 2 суток, генерацию P2 пропускают через 4-6 суток, а генерацию P3 переваривают повторно. Поколение P3 используют для выделения экзосом из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга.

[0015] Кроме того, способ экстракции экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга содержит следующие этапы: сбор супернатанта мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, добавление супернатанта мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и так далее. Более того, добавляют объем ХВВ, равный объему супернатанта мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, хорошо перемешивают и собирают экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга путем фильтрации с помощью спин-колонки с мембраной.

[0016] Способ сбора супернатанта мезенхимальных стволовых клеток костного мозга включает удаление исходной культуральной (питательной) среды, когда плотность мезенхимальных стволовых клеток костного мозга поколения P3 достигает 80%. После двукратной промывки PBS заменяют средой α -MEM, не содержащей сыворотки. Затем продолжают культивирование в течение 48 часов и собирают питательную среду, центрифугируют для удаления остатков разрушенных клеток и далее фильтруют для получения супернатанта (надосадочной жидкости).

[0017] Кроме того, метод фильтрации представляет собой мембранную фильтрацию 0,22 мкм.

[0018] Далее метод центрифугирования 4°C, центрифугирование при 300 g 10 минут, затем центрифугирование при 2000 g 10 минут.

[0019] Технический результат

[0020] Данное изобретение предлагает применение экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при лечении болезни Паркинсона. Экзосомы

мезенхимальных стволовых клеток костного мозга могут значительно улучшить двигательную функцию и оказать защитное действие на дофаминергические нейроны мышей с болезнью Паркинсона. В то же время изобретение также может улучшить обонятельную функцию и ингибировать активацию астроцитов в обонятельной луковице мышей с болезнью Паркинсона.

Описание прилагаемых чертежей

[0021] На фиг. 1 показан экспериментальный процесс.

[0022] Фиг. 2 представляет собой оценку экзосом из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга: А: мезенхимальные стволовые клетки костного мозга, В: анализ подготовленных экзосом с помощью устройства отслеживания наночастиц, С: наблюдение за приготовленными экзосомами с помощью просвечивающего электронного микроскопа.

[0023] На фиг. 3 показано, что экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга улучшают двигательную функцию мышей с болезнью Паркинсона, 1: контрольная группа, 2: группа МРТР, 3: группа МРТР+экзосомы, * $p < 0,05$, статистический анализ выполнен методом однофакторного дисперсионного анализа.

[0024] На фиг. 4 показано, что экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга увеличивают активность тирозингидроксилаза (tyrosine hydroxylase, TH) в черной субстанции мышей с моделью болезни Паркинсона. Иммунофлуоресцентное окрашивание использовали для обнаружения активности TH в области черной субстанции мышей (зеленый цвет) и DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол; фиолетовый цвет), помеченных ядрами клеток.

[0025] На фиг. 5 показано, что экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга улучшают обонятельную функцию у мышей с болезнью

Паркинсона, 1: контрольная группа, 2: группа МРТР, 3: группа МРТР+экзосомы, * $p < 0,05$, статистический анализ выполнен методом одностороннего дисперсионного анализа однофакторного дисперсионного анализа.

[0026] На фиг. 6 показано, что экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга снижают активность глияльного фибриллярного кислого белка (glial fibrillary acidic protein; GFAP) в обонятельных луковицах мышей с моделью Паркинсона. Иммунофлуоресцентное окрашивание использовали для обнаружения экспрессии GFAP в обонятельной луковице мыши (красный), NeuN (нейрон-специфический нуклеопротеин) использовали для маркировки нейронов (зеленый), DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол; фиолетовый) для обозначения ядер. Merge представляет собой комбинированно изображение.

[0027] На фиг. 7 показано усвоение экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в обонятельных нейронах. Были приготовлены экзосомы меченные РКН-26. Затем проведено совместное культивирование с первичными обонятельными нейронами мыши, а усвоение экзосом проанализировано с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания. Помеченные экзосомы отмечены красным цветом, а обонятельные нейроны отмечены TUJ1 (зеленым цветом).

Конкретные примеры осуществления

[0028] Как показано на фиг. 1, мышам внутрибрюшинно вводили МРТР (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин) с дозировкой 20 мг/кг/ каждые сутки в течение 7 дней подряд для установления модели болезни Паркинсона у мышей. После установления модели болезни проводили двухдневную тренировку поведения, включающую лазание по шесту и тренировка обоняния. Мышам вводили экзосомы путем капельного добавления в носовую полость, и каждой мышам давали 10 мкл экзосом (содержащих 1×10^8 частиц экзосом). Такие

процедуры проводили 1 раз в 2 дня, всего 4 процедуры. После лечения проводили морфологические тесты и тесты поведения (фиг. 1).

[0029] Конкретные шаги заключаются в следующем:

[0030] 1. Культура мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека

[0031] (1) Инокуляция (посев микроорганизмов на питательную среду): 1 мл костного мозга инокулировали в чашку для культивирования диаметром 10 см. В этой чашке содержалось 8 мл полной среды, и она была нагрета до 37°C (культуральная среда α -MEM, содержащая 10% FBS и 1% PS). Затем равномерно перемешали и поместили в инкубатор для клеточных культур при 37°C, 5% CO₂. Костный мозг получали из костного мозга здоровых людей. Полная среда представляла собой среду α -MEM, содержащую 10% фетальной бычьей сыворотки, 1% пенициллина и стрептомицина.

[0032] (2) Замена среды: наполовину заменяли среду на четвертый день после инокуляции и полностью заменяли среду на седьмой день.

[0033] (3) Пассаж (пересев): Когда плотность клеток достигла 80% и выше, для усваивания использовали 1 мл 0,25% трипсина. Под микроскопом наблюдали, что клетки становятся круглыми, а когда зазор стал больше, добавили 3 мл полной среды для усвоения. Затем центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин, отбрасывали супернатант и определяли соотношение пассажа в зависимости от количества клеток. После первого пассажа поколения P1, среду меняли каждые 2 дня. Через 4-6 дней оно преобразовалось в поколение P2. После того как P2 выросло до определенного количества, его снова переварили и преобразовали в поколение P3. Поколение P3 использовали для последующих экспериментов.

[0034] 2. Извлечение экзосом

[0035] (1) Сбор супернатанта мезенхимальных стволовых клеток костного мозга: когда плотность мезенхимальных стволовых клеток человека поколения P3

выросла до 80%, исходную среду отбросили. После двукратной промывки PBS заменили средой α -MEM, не содержащей сыворотки, продолжали культивирование в течение 48 часов и собрали среду. Остатки разрушенных клеток удалили центрифугированием при 300 g в течение 10 мин и при 2000 g в течение 10 мин при 4°C. После фильтрации через фильтрующую мембрану 0,22 мкм среду хранили в холодильнике при -80°C до использования.

[0036] (2) Экстракция экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга: метод экстракции описан в руководстве по эксплуатации комплекта exoEasy kit (QIAGEN). Алгоритм действий:

[0037] 1) Добавили равный объем ХВВ в супернатант мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и хорошо перемешали.

[0038] 2) Добавили вышеуказанную смесь в колонку exoEasy и центрифугировали при 500 g в течение 1 мин при комнатной температуре. Слили жидкость из пробирки для сбора и повторили этот шаг до тех пор, пока смесь не была отфильтрована.

[0039] 3) Добавили 10 мл ХВВ, центрифугировали при 5000 g в течение 5 минут и убрали пробирку для сбора.

[0040] 4) Заменяли колонку exoEasy на новую пробирку для сбора, добавили 1 мл ВРЕ на поверхность мембраны и центрифугировали при 500 g в течение 5 мин. Жидкость перенесли обратно на поверхность мембраны, центрифугировали при 5000 g в течение 5 мин и собрали образцы экзосом в центрифужной пробирке для последующих экспериментов.

[0041] 3. Анализ экзосом с помощью устройства для слежения за наночастицами

[0042] Экстрагированные экзосомы разбавили в 1000 раз, а концентрацию и распределение экзосом по диаметру определили с помощью анализа отслеживания

наночастиц (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA).

[0043] 4. Наблюдение за морфологией экзосом с помощью просвечивающего электронного микроскопа

[0044] 1) Взяли пипеткой 20 мкл маточного раствора экзосомы и капнули на красный воск.

[0045] 2) Медную сетку, предварительно покрытую полиметилвинилацетатом/углеродным покрытием, установили в жидкости и оставили при комнатной температуре на 20 мин.

[0046] 3) Фиксировали 2% параформальдегидом при комнатной температуре в течение 2 мин.

[0047] 4) Докрашивали 2% фосфорно-вольфрамовой кислотой (РТА) при комнатной температуре в течение 1 мин.

[0048] 5) Сушка в инфракрасной лампе.

[0049] 6) Наблюдение и фотографирование.

[0050] 5. Культура нейронов обонятельной луковицы

[0051] Взрослых мышей C57BL/6J умерщвили путем цервикальной дислокации, дезинфицировали этанолом, отсекали голову от центра и сразу же поместили кровь в PBS, содержащую 1% PS, для промывания крови. Обонятельную луковицу асептически вскрывали под микроскопом, мозговые оболочки отделили, поместили в предварительно подогретый 0,25% трипсин, разрезали на мелкие кусочки по 0,5 мм³ и обрабатывали при 37°C в течение 30 мин. Затем остановили реакцию усвоения трипсина со средой DMEM/F12, содержащей 10% фетальной бычьей (телячьей) сыворотки, и аккуратно брали пипеткой (всасывали) несколько раз. Приготовленную суспензию клеток центрифугировали при 1200 об/мин в течение 5 мин, отбросили надосадочную жидкость (супернатант). Добавили среду Neurobasal, содержащую 1% глутамина и 2% B27, пропустили

через сито 400 меш и засеяли на круглые покровные стекла, покрытые L-полилизинном. Затем поместили в инкубатор при 37°C с 5% углекислым газом и меняли среду каждые 2 дня. После роста нейронов до 6-7 дней проводили контрольные эксперименты.

[0052] 6. Усвоение экзосом нейронами обонятельных луковиц.

[0053] Конкретный процесс выглядит следующим образом и использует РКН226 для маркировки экзосом:

[0054] (1) Приготовили раствор (100 мкл), содержащий 1×10^{10} частиц экзосом.

[0055] (2) Добавили экзосомы в 500 мкл Diluent C и осторожно перемешали.

[0056] (3) Взяли новую пробирку EP и добавили 4 мкл РКН26 к 500 мкл Diluent C.

[0057] (4) Добавили (2) в (3) и хорошо перемешали.

[0058] (5) Оставили при комнатной температуре на 4 минуты, брали пипеткой (всасывали) 10 раз каждую 1 минуту.

[0059] (6) Добавили равный объем FBS без экзосом, чтобы остановить окрашивание.

[0060] (7) Использовали пробирку для сверхтонкой фильтрации для концентрирования последующего использования.

[0061] (8) Добавили к нейронам обонятельных луковиц, совместно культивировывали в течение 12 часов, выполнили иммунофлуоресцентного окрашивание Anti-TUJ1 (1:1000), наблюдали и фотографировали под флуоресцентным микроскопом.

[0062] 7. Подготовка мышей с болезнью Паркинсона и обработка экзосом

[0063] 12-недельных самцов мышей C57BL/6J случайным образом разделили на контрольную группу и экспериментальную группу. Мышей в

экспериментальной группе индуцировали с мышами модели PD путем внутрибрюшинной инъекции нейротоксина МРТР (N-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин). Доза МРТР составляла 20 мг/кг/день, а способ введения – внутрибрюшинная инъекция в течение 7 дней подряд. Экзосомы обрабатывали назальным введением, доза составляла 1×10^8 частиц экзосом, а объем составлял 10 мкл. Обрабатывали 1 раз в 2 дня, всего 4 процедуры.

[0064] 8. Эксперимент по лазанию по шесту

[0065] Помещали животное на вершину грубого вертикально закрепленного шеста (диаметр 15 мм, длина 50 см) и рассчитывали время, за которое мышь коснется нижней части стержня от вершины до момента, когда две передние конечности коснутся нижней части стержня. Интервал между каждым детектированием составлял 5 мин, и проверка выполнялась 5 раз. Наибольшее значение и наименьшее значение удалялись, и бралось среднее значение.

[0066] 9. Эксперимент с обонянием

[0067] Мышей не кормили в течение 20 часов и готовили чистую клетку (длина 42 см, ширина 24 см, высота 15 см), сыр закрепляли посередине, вверху слева, внизу справа, вверху справа и внизу слева чистой подстилки по очереди, при этом сыр должен быть на 0,5 см ниже подстилки. Затем помещали животное и засекали время, пока мышь найдет сыр. Если сыр не был найден в течение 300 секунд, то результат был записан как 300 секунд. Статистический анализ выполняли после удаления минимального и максимального значений.

[0068] 10. Иммунофлуоресценция тканей

[0069] (1) Собранную ткань головного мозга мыши помещали в 4% параформальдгидрид и помещали в холодильник при 4°C на 24 часа.

[0070] (2) 20% и 30% сахарозы были приготовлены в 1X PB и

дегидратированы в течение 24 часов последовательно.

[0071] (3) Замороженные срезы обезвоженной мозговой ткани, доведение толщины до 12 мкм, хранение при 37°C в сушильном шкафе в течение ночи и хранение при -20°C.

[0072] (4) Высушивали срезы при 60°C в течение 30 минут перед окрашиванием.

[0073] (5) Промывали PBS 3 раза, каждый раз по 5 мин.

[0074] (6) Блокирование блокирующим раствором, 37°C, 1 ч.

[0075] (7) Промывали PBS 3 раза по 10 минут каждый раз и инкубировали с антителами TH/GFAP/NeuN в соответствующем соотношении в течение ночи при 4°C.

[0076] (8) Промывали 3 раза PBS и инкубировали с гомологичным вторичным антителом в течение 1 часа при комнатной температуре.

[0077] (9) После 3 разового промывания PBS закрывали предметные стекла флуоресцентным жидким уплотнением, наблюдали и делали снимки с помощью микроскопа.

[0078] Как показано на фиг. 2, подготовленные экзосомы были проанализированы с помощью устройства слежения за наночастицами, и было обнаружено, что средний диаметр экзосом составляет 131,8 нм, а концентрация — $7,4 \times 10^{10}$ частиц/мл (фиг. 2B). Трансмиссионная электронная микроскопия показала, что приготовленные экзосомы обладали чашеобразной структурой с двухслойной мембраной (фиг. 2C). Результаты экспериментов по лазанию по шестам показали, что лечение экзосомами может сократить время, необходимое мышам с болезнью Паркинсона для лазания по шестам (фиг. 3). Кроме того, была обнаружена активность тирозингидроксилазы (TH) в черной субстанции, и было обнаружено, что обработка экзосомами может повышать активность TH в черной субстанции

мышей с болезнью Паркинсона (фиг. 4). Эксперименты с обонянием показали, что обработка экзосомами может сократить время, необходимое мышам с болезнью Паркинсона, чтобы найти спрятанную пищу (фиг. 5). Активность глиального фибриллярного кислого белка (glial fibrillary acidic protein; GFAP) в области обонятельных луковиц мышей была обнаружена с помощью иммунофлуоресценции. Более того, было обнаружено, что обработка экзосомами может значительно снизить активность GFAP в области обонятельных луковиц у мышей с болезнью Паркинсона. Это указывало на сопротивление активации астроцитов в области обонятельной луковицы (фиг. 6). Эксперименты по усвоению показали, что подготовленные экзосомы могут поглощаться обонятельными нейронами (фиг. 7).

Формула изобретения

1. Применение экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при приготовлении лекарственных средств для лечения болезни Паркинсона характеризующееся тем, что экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга продуцируют питательной средой (культуральной средой) для стимуляции мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, при этом после пересева экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга экстрагируют в питательную (культуральную среду), питательной средой мезенхимальных стволовых клеток костного мозга является питательная среда α -MEM, содержащая FBS и PS.

2. Применение по пункту 1, при этом применение включает любое из следующего:

применение в составе препаратов для улучшения двигательной функции при наличии болезни Паркинсона;

применение при приготовлении препаратов для защиты дофаминергических нейронов при наличии болезни Паркинсона;

применение при приготовлении препаратов для улучшения обонятельной функции при наличии болезни Паркинсона;

применение при приготовлении препаратов для снижения активации астроцитов обонятельной луковицы при болезни Паркинсона.

3. Применение по пункту 1, отличающееся тем, что описываемый питательный раствор представляет собой питательный раствор α -MEM, содержащий 10% FBS и 1% PS.

4. Применение по пункту 1, отличающееся тем, что условия культивирования мезенхимальных стволовых клеток костного мозга составляют 37°C, 5% CO₂.

5. Применение по пункту 1, отличающееся тем, что костный мозг

инокулируют (сеют) в полную среду, предварительно нагретую до 37°C.

6. Применение по пункту 1, отличающееся тем, что при культивировании мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, когда плотность клеток достигает 80%, для усвоения используют трипсин И под микроскопом наблюдают, как клетки становились круглыми, и когда зазор становится больше, добавляют полную среду для прекращения усвоения, супернатант отбрасывают с помощью центрифугирования, и соотношение пассажей определяют как поколение P1 в зависимости от количества клеток, среду (жидкость) меняют каждые 2 дня, поколение P2 распространяют через каждые 4-6 дней, а P3 снова переваривают (усваивают), при этом поколение P3 используют для экстракции экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга.

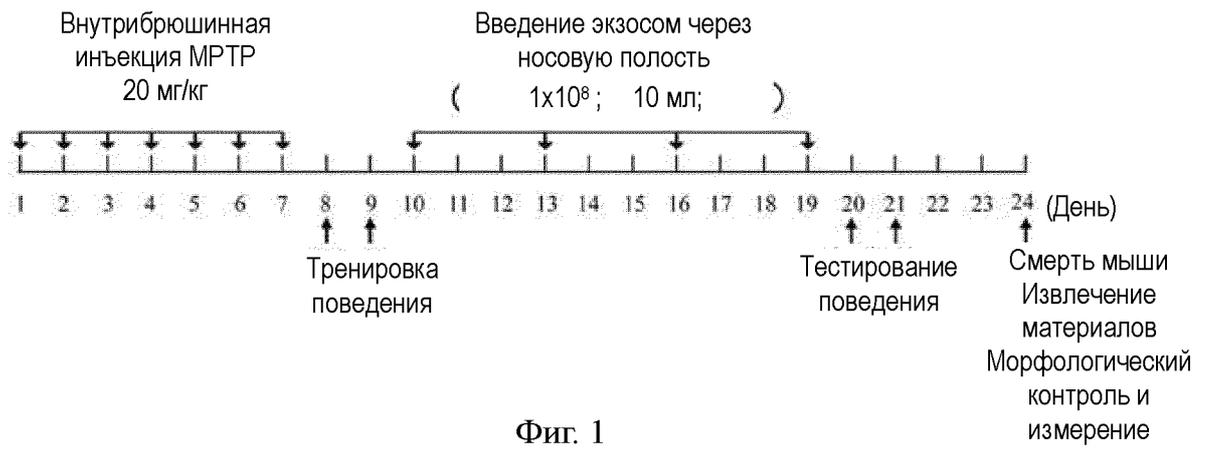
7. Применение по пункту 1, отличающееся тем, что способ выделения экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга включает: сбор супернатанта мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, добавление супернатанта мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, затем объем ХВВ хорошо перемешивают и собирают экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга путем фильтрации с помощью спин-колонки с мембраной.

8. Применение по пункту 1, отличающееся тем, что способ сбора супернатанта мезенхимальных стволовых клеток костного мозга включает: удаление исходной культуральной (питательной) среды, когда плотность мезенхимальных стволовых клеток костного мозга поколения P3 достигает 80%, причем после двукратной промывки PBS заменяют средой α -MEM, не содержащей сыворотки, затем продолжают культивирование в течение 48 часов и собирают питательную среду, центрифугируют для удаления остатков разрушенных клеток и далее фильтруют для получения супернатанта (надосадочной жидкости).

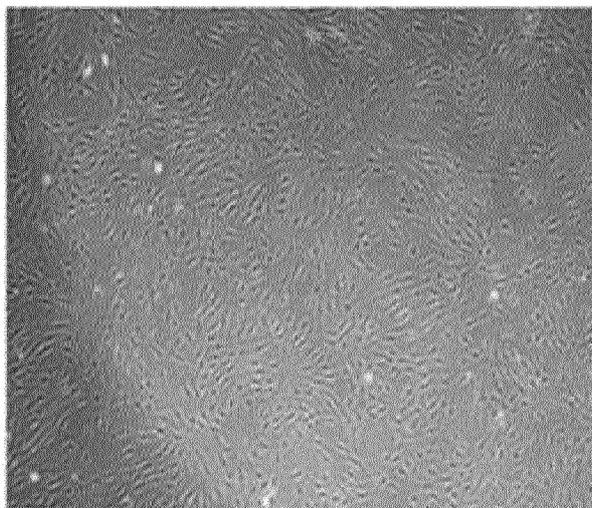
9. Применение по пункту 8, отличающееся тем, что описанный способ

фльтрации представляет собой фильтрацию через мембрану фильтра 0,22 мкм.

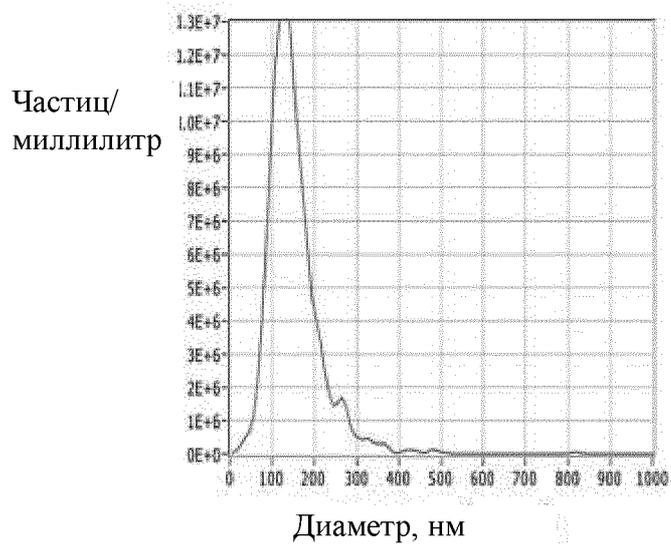
10. Применение по пункту 8, отличающееся тем, что центрифугирование выполняют при 4°C, 300 g в течение 10 мин, а затем при 2000 g в течение 10 мин.



Фиг. 1



(A)



(B)

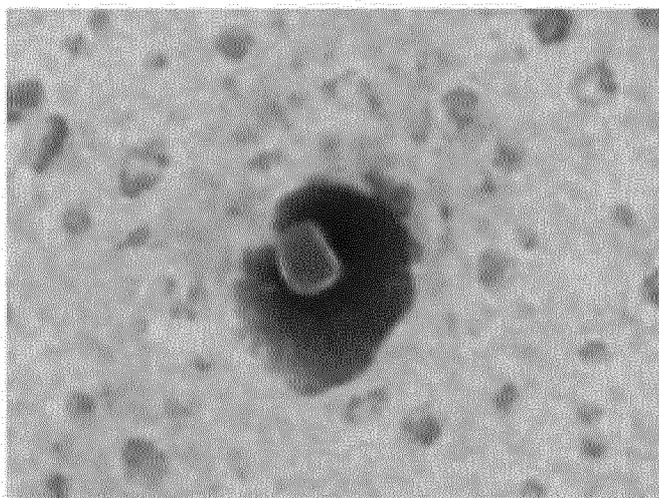
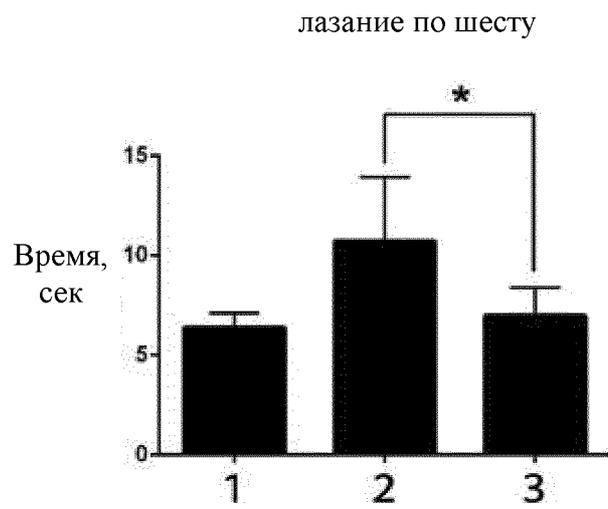


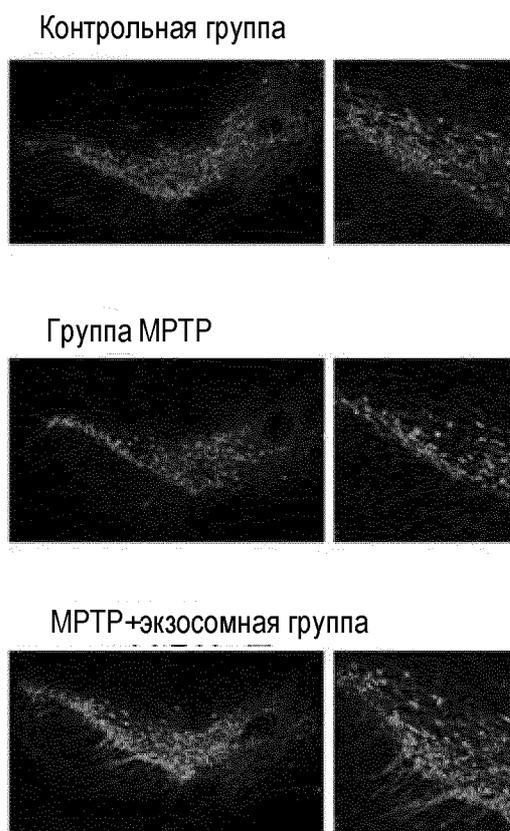
Image date=2021/04/23 14:36:05
Acc. voltage=80.0kV
Magnification=x15.0k

500nm

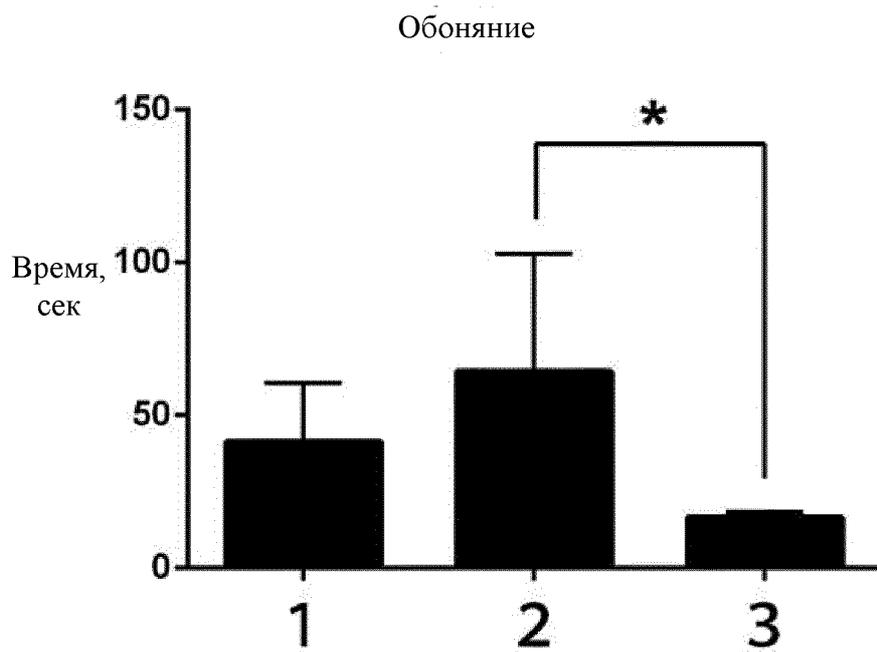
(C)



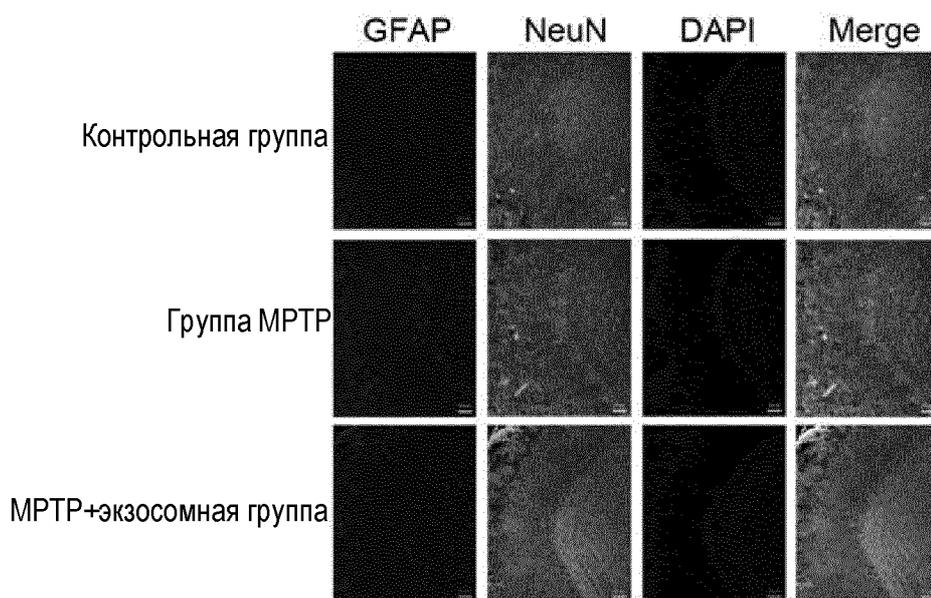
Фиг. 3



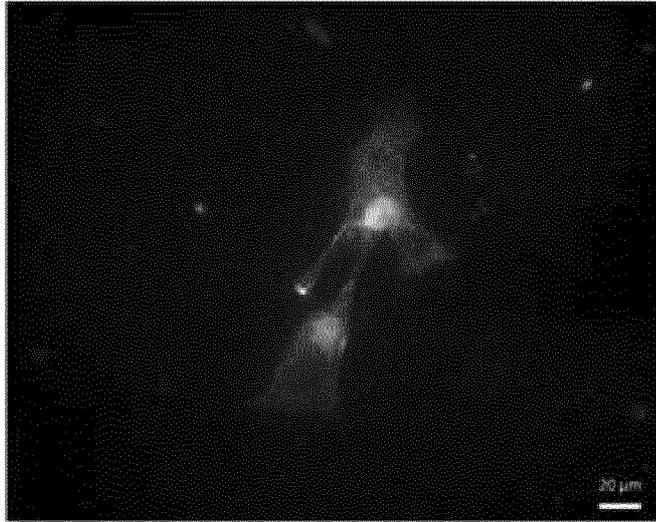
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7

专利合作条约

PCT

国际检索报告

(PCT第18条和细则43和44)

申请人或代理人的档案号 PCT22101801		关于后续行为 见PCT/ISA/220表和适用时，见下面第5项	
国际申请号 PCT/CN2022/126041	国际申请日 (年/月/日) 2022年10月19日	(最早的)优先权日 (年/月/日) 2022年5月31日	
申请人 南通大学			

按照条约第18条，本国际检索报告由本国际检索单位做出并送交申请人。报告副本送交国际局。

本国际检索报告总计 4 页。

它还附有本报告所引用的各现有技术文件的副本。

1. 报告的基础

a. 关于语言，进行国际检索基于：

- 国际申请提交时使用的语言。
- 该国际申请的____语言译文，为了国际检索的目的提供该种语言的译文(细则12.3(a)和23.1(b))。

b. 本国际检索报告考虑了本单位许可或被通知的根据细则91所做出的**明显错误更正**(细则43.6之二(a))。

c. 关于国际申请中公开的任何**核苷酸和/或氨基酸序列**，见第I栏。

2. 某些权利要求被认为是不能检索的(见第II栏)。

3. 缺乏发明的单一性(见第III栏)。

4. 关于**发明名称**，

- 同意申请人提出的发明名称。
- 发明名称由本单位确定如下：

5. 关于**摘要**，

- 同意申请人提出的摘要。
- 根据细则38.2(b)，摘要由本单位制定，如第IV栏中所示。自本国际检索报告发文日起一个月内，申请人可以向本单位提出意见。

6. 关于**附图**，

- a. 随摘要一起公布的附图是：1
 - 按照申请人建议的。
 - 由本单位选择的，因为申请人没有建议一幅图。
 - 由本单位选择的，因为该图能更好地表示发明的特征。
- b. 没有与摘要一起公布的附图

第IV栏

摘要正文(续第1页第5项)

提供了一种骨髓间充质干细胞外泌体在制备治疗帕金森病的药物中的应用。所述骨髓间充质干细胞外泌体由培养液刺激骨髓间充质干细胞经传代后于培养液中提取获得,所述培养液为含FBS和PS的 α -MEM培养液。所述骨髓间充质干细胞外泌体改善帕金森模型小鼠运动功能,对帕金森模型小鼠多巴胺能神经元具有保护作用,能改善帕金森模型小鼠的嗅觉功能,还可以抑制帕金森模型小鼠嗅球星形胶质细胞活化。

<p>A. 主题的分类</p> <p>A61K35/28(2015.01) i; C12N5/0775(2010.01) i; A61P25/16(2006.01) i; A61P25/00(2006.01) i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K, C12N, A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>数据库: CNABS, CNKI, DWPI, WPABS, VEN, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, ISI Web of Knowledge, PubMed, 百度学术; 关键词: 间充质干细胞, 外泌体, 外排体, 骨髓, 成体干细胞, 帕金森, 神经元, 嗅觉, mesenchymal stem cell, exosome, Parkinson's Disease, Bone marrow, Adult stem cell, Neuron, Olfaction</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 115006427 A (尧舜泽生物医药(南京)有限公司) 2022年9月6日 (2022 - 09 - 06) 参见说明书摘要和权利要求1-10</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 111471647 A (尧舜泽生物医药(南京)有限公司) 2020年7月31日 (2020 - 07 - 31) 参见说明书摘要, 实施例1-2和权利要求1-7</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>蒋长青等. "大鼠骨髓间充质干细胞来源外泌体对退变髓核细胞的影响" 中国脊柱脊髓杂志, 2019年2月28日 (2019 - 02 - 28), 参见第2页左栏</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Helena Vilaça-Faria 等. "Mesenchymal Stem Cells-derived Exosomes: A New Possible Therapeutic Strategy for Parkinson's Disease?" Cells., 2019年2月2日 (2019 - 02 - 02), 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>陈晨等. "间充质干细胞源性外泌体治疗神经退行性疾病:应用中的问题及未来前景" 中国组织工程研究, 2019年3月28日 (2019 - 03 - 28), 第1443页 2.2.1部分、第1445页</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 115006427 A (尧舜泽生物医药(南京)有限公司) 2022年9月6日 (2022 - 09 - 06) 参见说明书摘要和权利要求1-10	1-10	X	CN 111471647 A (尧舜泽生物医药(南京)有限公司) 2020年7月31日 (2020 - 07 - 31) 参见说明书摘要, 实施例1-2和权利要求1-7	1-10	Y	蒋长青等. "大鼠骨髓间充质干细胞来源外泌体对退变髓核细胞的影响" 中国脊柱脊髓杂志, 2019年2月28日 (2019 - 02 - 28), 参见第2页左栏	1-10	A	Helena Vilaça-Faria 等. "Mesenchymal Stem Cells-derived Exosomes: A New Possible Therapeutic Strategy for Parkinson's Disease?" Cells., 2019年2月2日 (2019 - 02 - 02), 参见全文	1-10	Y	陈晨等. "间充质干细胞源性外泌体治疗神经退行性疾病:应用中的问题及未来前景" 中国组织工程研究, 2019年3月28日 (2019 - 03 - 28), 第1443页 2.2.1部分、第1445页	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
PX	CN 115006427 A (尧舜泽生物医药(南京)有限公司) 2022年9月6日 (2022 - 09 - 06) 参见说明书摘要和权利要求1-10	1-10																		
X	CN 111471647 A (尧舜泽生物医药(南京)有限公司) 2020年7月31日 (2020 - 07 - 31) 参见说明书摘要, 实施例1-2和权利要求1-7	1-10																		
Y	蒋长青等. "大鼠骨髓间充质干细胞来源外泌体对退变髓核细胞的影响" 中国脊柱脊髓杂志, 2019年2月28日 (2019 - 02 - 28), 参见第2页左栏	1-10																		
A	Helena Vilaça-Faria 等. "Mesenchymal Stem Cells-derived Exosomes: A New Possible Therapeutic Strategy for Parkinson's Disease?" Cells., 2019年2月2日 (2019 - 02 - 02), 参见全文	1-10																		
Y	陈晨等. "间充质干细胞源性外泌体治疗神经退行性疾病:应用中的问题及未来前景" 中国组织工程研究, 2019年3月28日 (2019 - 03 - 28), 第1443页 2.2.1部分、第1445页	1-10																		
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"D" 申请人在国际申请中引证的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2023年2月16日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2023年2月27日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>罗霄</p> <p>电话号码 (+86) 010-62089158</p>																		

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/126041

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 115006427 A	2022年9月6日	无	
CN 111471647 A	2020年7月31日	无	