

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **048272**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.11.14**

(21) Номер заявки  
**202392185**

(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) **СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ЭКЗОСОМ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА**

---

(31) **202210607894.5**

(32) **2022.05.31**

(33) **CN**

(43) **2023.12.29**

(86) **PCT/CN2022/126041**

(87) **WO 2023/179001 2023.09.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**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:  
**Забгаева У.Г., Давыдова Е.Л.,  
Мурашев П.М. (RU)**

(56) **CN-A-115006427  
CN-A-111471647**

Helena Vilaça-Faria. "Mesenchymal Stem Cells-derived Exosomes: A New Possible Therapeutic Strategy for Parkinson's Disease?", Cells., 2019.2.2 (2019-02-02)

(57) 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  $\alpha$ -MEM, содержащая FBS и PS. Экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга могут значительно улучшить двигательную функцию мышей с болезнью Паркинсона и оказать защитное действие на дофаминергические нейроны у мышей с болезнью Паркинсона. Кроме того, экзосомы могут улучшить обонятельную функцию и ингибировать активацию астроцитов в обонятельной луковице у мышей с болезнью Паркинсона.

**048272**  
**B1**

**048272**  
**B1**

### 1. Область техники.

Изобретение относится к области биомедицины и связано с применением экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при лечении болезни Паркинсона.

### 2. Уровень техники.

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 г. из-за ускорения процесса старения распространенность болезни Паркинсона удвоится, и, по оценкам, заболевших будет более 9 млн. Показатель распространенности среди людей старше 65 лет в Китае составляет около 1,7%. Прямые медицинские расходы пациентов оцениваются более чем в 10000 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 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

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 мышей с болезнью Паркинсона и оказать защитное действие на дофаминергические нейроны у мышей с болезнью Паркинсона. Более того, экзосомы также могут улучшить обонятельную функцию мышей с болезнью Паркинсона и ингибировать активацию астроцитов в обонятельной луковице у мышей с моделью Паркинсона.

Техническая схема, обеспечиваемая изобретением, выглядит следующим образом:

Способ приготовления экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для приготовления 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 посева экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга экстрагировали в питательную среду. Питательной средой мезенхимальных стволовых клеток костного мозга была питательная среда  $\alpha$ -MEM, содержащая FBS (фетальную бычью сыворотку) и PS (пенициллин и стрептомицин).

Также изобретение включает в себя любое из следующего.

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

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

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

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

Кроме того, питательная среда представляет собой культуральную среду  $\alpha$ -MEM, содержащую 10% FBS и 1% PS.

Кроме того, условия культивирования мезенхимальных стволовых клеток костного мозга: 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

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

Более того, при культивировании мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, когда плотность клеток достигает 80%, для расщепления используют трипсин. Под микроскопом наблюдают, как клетки становятся круглыми, и когда зазор становится больше, добавляют полную среду для прекращения расщепления. Супернатант отбрасывают с помощью центрифугирования, и коэффициент пассажа определяют как поколение P1 в зависимости от количества клеток. Среду меняют каждые 2 суток, генерацию P2 пропускают через 4-6 суток, а генерацию P3 расщепляют повторно. Поколение P3 используют для выделения экзосом из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга.

Кроме того, способ экстракции экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга содержит следующие этапы: сбор супернатанта мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, добавле-

ние супернатанта мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и так далее. Более того, к супернатанту 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.

Способ сбора супернатанта мезенхимальных стволовых клеток костного мозга включает удаление исходной питательной среды, когда плотность мезенхимальных стволовых клеток костного мозга поколения Р3 достигает 80%. После двукратной промывки PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) заменяют средой  $\alpha$ -MEM, не содержащей сыворотки. Затем продолжают культивирование в течение 48 ч и собирают питательную среду, центрифугируют для удаления остатков разрушенных клеток и далее фильтруют для получения супернатанта.

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

Далее метод центрифугирования 4°C, центрифугирование при 300 g 10 мин, затем центрифугирование при 2000 g 10 мин.

### Технический результат

Данное изобретение предлагает способ приготовления 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

На фиг. 1 показан экспериментальный процесс.

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 подготовленными экзосомами с помощью просвечивающего электронного микроскопа.

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.

На фиг. 4 показано, что экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга увеличивают активность тирозингидроксилазы (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-фенилиндо; фиолетовый цвет), помеченных ядрами клеток.

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.

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-фенилиндо; фиолетовый) для обозначения ядер. Merge представляет собой комбинированно изображение.

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

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 мышши давали 10 мкл экзосом (содержащих  $1 \times 10^8$  частиц экзосом). Такие процедуры проводили 1 раз в 2 дня, всего 4 процедуры. После лечения проводили морфологические тесты и тесты поведения (фиг. 1).

Конкретные шаги заключаются в следующем.

1. Культура мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека.

(1) 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 (питательная среда  $\alpha$ -MEM, содержащая 10% FBS и 1% PS). Затем равномерно перемешали и поместили в инкубатор для клеточных культур при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Костный мозг получали из костного мозга здоровых людей. Полная среда представляла собой среду  $\alpha$ -MEM, содержащую 10% фетальной бычьей сыворотки, 1% пенициллина и стрептомицина.

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

(3) Пассаж: когда плотность клеток достигла 80% и выше, для расщепления использовали 1 мл 0,25% трипсина. Под микроскопом наблюдали, что клетки становятся круглыми, а когда промежутки стали больше, добавили 3 мл полной среды для прекращения расщепления. Затем центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин, отбрасывали супернатант и определяли коэффициент 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 расщепляли и преобразовали в поколение P3. Поколение P3 использовали для последующих экспериментов.

## 2. Извлечение экзосом.

(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  $\alpha$ -MEM, не содержащей сыворотки, продолжали культивирование в течение 48 ч 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.

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

1) Добавили равный супернатанту объем XBB в супернатант мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и хорошо перемешали.

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.

3) Добавили 10 мл XWB, центрифугировали при 5000 g в течение 5 мин и убрали пробирку для сбора.

4) Заменили 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.

## 3. Анализ экзосом с помощью устройства для слежения за наночастицами.

Экстрагированные экзосомы разбавили в 1000 раз, а концентрацию и распределение экзосом по диаметру определили с помощью анализа отслеживания наночастиц (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA).

## 4. Наблюдение за морфологией экзосом с помощью просвечивающего электронного микроскопа.

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

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

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

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

5) Сушка в инфракрасной лампе.

6) Наблюдение и фотографирование.

## 5. Культура нейронов обонятельной луковицы.

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 мм<sup>3</sup> и обрабатывали при 37°C в течение 30 мин. Затем остановили реакцию расщепления трипсином со средой DMEM/F12, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, и аккуратно брали пипеткой (всасывали) несколько раз. Приготовленную суспензию клеток центрифугировали при 1200 об/мин в течение 5 мин, отбросили супернатант. Добавили среду Neurobasal, содержащую 1% глутамин и 2% B27, пропустили через сито 400 меш и засеяли на круглые покровные стекла, покрытые L-полилизин. 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.

## 6. Усвоение экзосом нейронами обонятельных луковиц.

Конкретный процесс выглядит следующим образом и использует РКН226 для маркировки экзосом.

(1) Приготовили раствор (100 мкл), содержащий  $1 \times 10^{10}$  частиц экзосом.

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

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

(4) Добавили (2) в (3) и хорошо перемешали.

(5) Оставили при комнатной температуре на 4 мин, брали пипеткой 10 раз каждую 1 мин.

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

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

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

## 7. Подготовка мышей с болезнью Паркинсона и обработка экзосом.

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 внутривентрикулярной инъекции нейротоксина MPTP (N-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин). Доза MPTP составляла 20 мг/кг/день, а способ введения - внутривентрикулярная инъекция в течение 7 дней подряд. Экзосомы обрабатывали назальным введением, доза составляла  $1 \times 10^8$  частиц экзосом, а объем составлял 10 мкл. Обрабатывали 1 раз в 2 дня, всего 4 процедуры.

## 8. Эксперимент по лазанию по шесту.

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.

## 9. Эксперимент с обонянием.

Мышей не кормили в течение 20 ч и готовили чистую клетку (длина 42 см, ширина 24 см, высота 15 см), сыр закрепляли посередине, сверху слева, внизу справа, сверху 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 с, то результат был записан как 300 с. Статистический анализ выполняли после удаления минимального и максимального значений.

## 10. Иммунофлуоресценция тканей.

(1) Собранную ткань головного мозга мыши помещали в 4% параформальдегид и помещали в холодильник при 4°C на 24 ч.

(2) 20% и 30% сахарозы были приготовлены в 1X PB и дегидратированы в течение 24 ч последовательно.

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

(4) Высушивали срезы при 60°C в течение 30 мин перед окрашиванием.

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

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

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

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

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

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 подготовленные 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 обработ-

ка 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. Способ приготовления экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для приготовления лекарственных средств для лечения болезни Паркинсона, характеризующийся тем, что экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга продуцируются в питательной среде, стимулирующей мезенхимальные стволовые клетки костного мозга, являющейся средой  $\alpha$ -MEM, содержащей FBS (фетальную бычью сыворотку) и PS (пенициллин и стрептомицин), после пересева экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга экстрагируют в питательную среду, центрифугирование для удаления остатков разрушенных клеток выполняют при 4°C, при 300 g в течение 10 мин, затем при 2000 g в течение 10 мин и фильтруют через фильтрующую мембрану 0,22 мкм, затем центрифугируют при 500 g в течение 1 мин, при 5000 g в течение 5 мин, при 500 g в течение 5 мин и при 5000 g в течение 5 мин с получением экстрагированных экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга.

2. Способ по п.1, при этом лекарственные средства для лечения болезни Паркинсона улучшают двигательную функцию, защищают дофаминергические нейроны, улучшают обонятельную функцию, снижают активацию астроцитов обонятельной луковицы.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что стимулирующая питательная среда представляет собой питательную среду  $\alpha$ -MEM, содержащую 10% FBS и 1% PS.

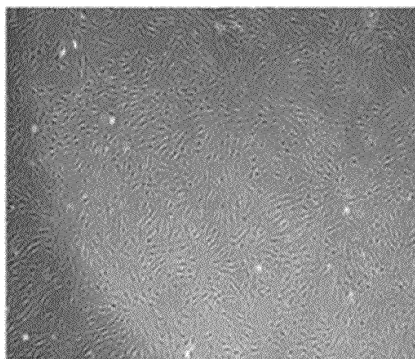
4. Способ по п.1, отличающийся тем, что условия культивирования мезенхимальных стволовых клеток костного мозга составляют 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что костный мозг инокулируют в полную среду, предварительно нагретую до 37°C.

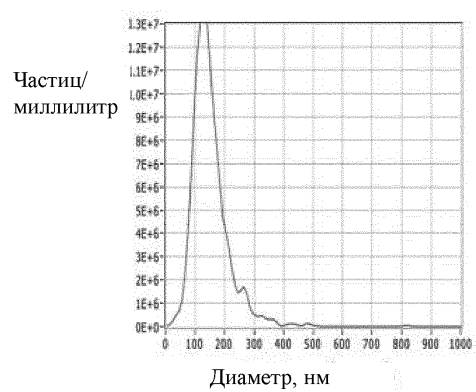


Фиг. 1

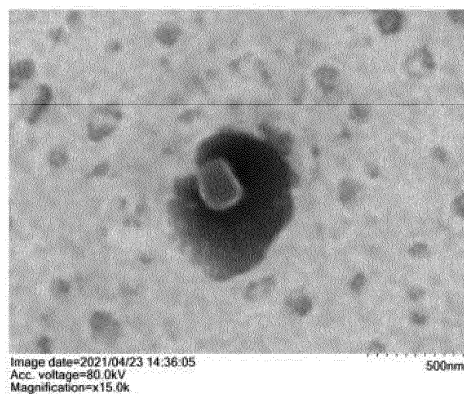
048272



(A)



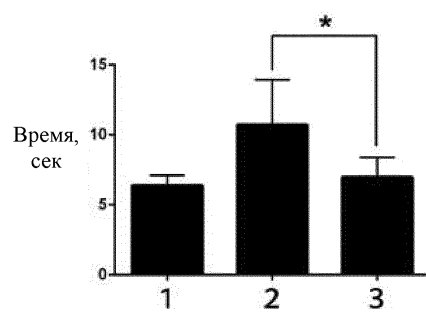
(B)



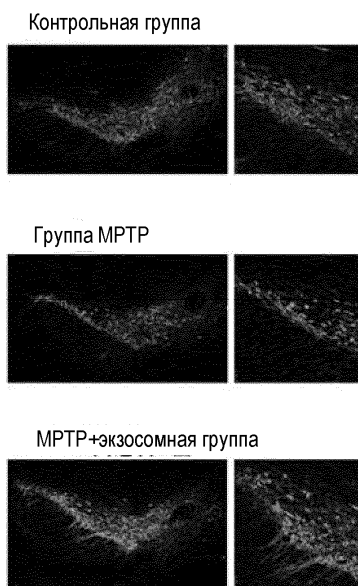
(C)

Фиг. 2

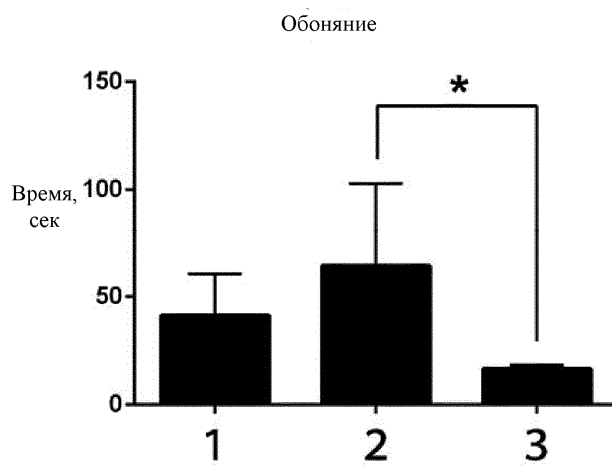
лазание по шесту



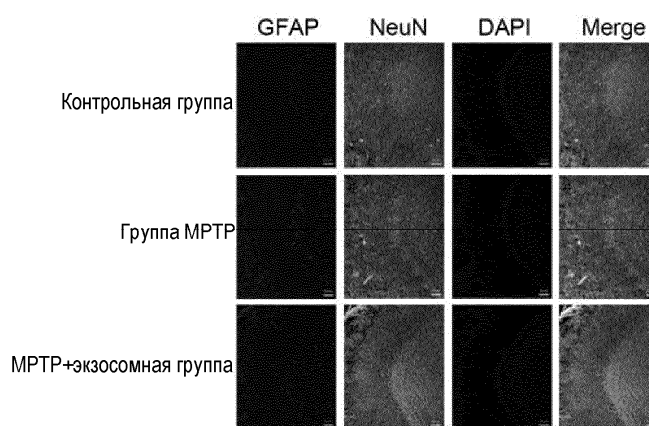
Фиг. 3



Фиг. 4



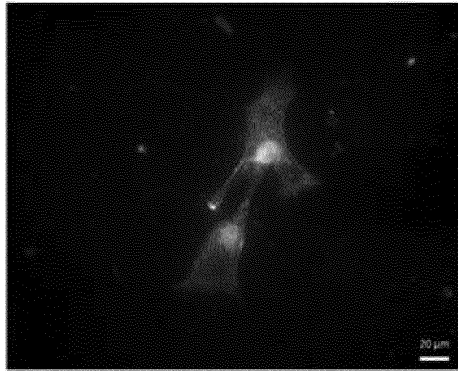
Фиг. 5



Фиг. 6



048272



Фиг. 7