



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0026226

(51)⁷ C12N 5/02; C12N 5/0775; C12N 1/38

(13) B

(21) 1-2014-01770

(22) 03/12/2012

(86) PCT/KR2012/010380 03/12/2012

(87) WO 2013/081436 A1 06/06/2013

(30) 10-2011-0127885 01/12/2011 KR

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/09/2014 318A

(73) K-STEMCELL CO., LTD. (KR)

10, Gukhoe-daero 76-gil, Yeongdeungpo-gu, Seoul, 150-870, Republic of Korea

(72) KANG, Sung Keun (KR); RA, Jeong Chan (KR); PARK, Hyeong Geun (KR); LEE, Hang Young (KR).

(74) Công ty TNHH Quốc tế D & N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

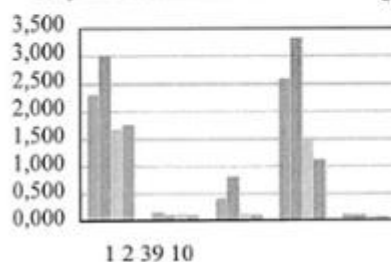
(54) PHƯƠNG PHÁP LÀM TRẺ HÓA TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỪ NGƯỜI GIÀ

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp làm trẻ hóa tế bào gốc, phương pháp này bao gồm việc nuôi cấy tế bào gốc từ người già trong chế phẩm môi trường để biến đổi tế bào gốc từ người già thành tế bào gốc của người trẻ. Trong đó, chế phẩm môi trường này được sử dụng để làm trẻ hóa tế bào gốc từ người già sao cho có các đặc tính tương tự với các đặc tính của tế bào gốc của người trẻ. Theo sáng chế, thậm chí tế bào gốc trung mô được thu nhận từ người bệnh trên 60 tuổi có thể được biến đổi thành tế bào gốc trung mô của người trẻ có khả năng biệt hóa cao, hoạt tính telomerase cao, và khả năng biểu hiện các dấu chuẩn tế bào gốc cao. Do đó, sáng chế có thể làm tăng đáng kể hiệu quả của liệu pháp điều trị bằng tế bào sử dụng tế bào gốc trung mô.

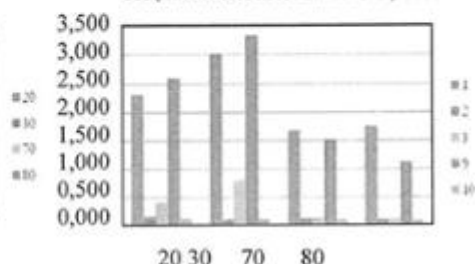
Thử nghiệm hoạt tính telomerase

Độ tuổi	Môi trường				
	1	2	3	9	10
20	2,254	0,158	0,410	2,591	0,112
30	3,016	0,099	0,805	3,329	0,102
70	1,672	0,121	0,124	1,520	0,084
80	2,342	0,099	0,105	1,120	0,070

Hoạt tính telomerase theo môi trường



Hoạt tính telomerase theo độ tuổi



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm môi trường để chuyển hóa tế bào gốc của người già thành tế bào gốc của người trẻ, và cụ thể hơn là đề cập đến chế phẩm môi trường để nuôi cấy tế bào gốc, được sử dụng để làm trẻ hóa tế bào gốc của người già sao cho có được các đặc tính tương tự với các đặc tính của tế bào gốc của người trẻ. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp làm trẻ hóa tế bào gốc, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào gốc của người già trong chế phẩm môi trường.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tế bào gốc trung mô là tế bào gốc đa năng có nguồn gốc từ các tế bào khác nhau của người trưởng thành như tế bào tủy xương, tế bào máu cuống rốn, tế bào nhau thai (tế bào mô nhau thai) hoặc tế bào mỡ (hoặc tế bào mô mỡ). Ví dụ, tế bào gốc trung mô từ tủy xương có tính đa năng để biệt hóa thành mô mỡ, mô xương/xụn và mô cơ, và do đó nhiều nghiên cứu khác nhau về việc phát triển các tác nhân chữa bệnh bằng tế bào có sử dụng tế bào gốc trung mô đã được thực hiện.

Trong những năm gần đây, khi công nghệ trị liệu bằng tế bào có sử dụng tế bào gốc trung mô nhận được nhiều sự chú ý, có nhu cầu về việc phát triển công nghệ hoạt hóa tế bào gốc trung mô từ cơ thể người để phù hợp với các mục đích trị liệu. Cụ thể, người già chiếm một phần đáng kể trong số những bệnh nhân trị liệu bằng tế bào, và tế bào gốc trung mô thu được từ mô của người già có hiệu quả điều trị thấp do chúng có khả năng tăng sinh và biệt hóa thấp. Ngoài ra, cũng có nhu cầu về công nghệ hoạt hóa tế bào gốc trung mô của người già để có các đặc tính tương tự với các đặc tính của tế bào gốc trung mô của người trẻ.

Biết rằng tế bào gốc trung mô phân chia rất chậm do cơ chế lão hóa không liên quan tới sự ngắn đi của telome khi được nuôi cấy *in vitro*, tương tự với tế bào khác của người được nuôi cấy sơ cấp (Shibata, K.R. et al., Stem cells, 25; 2371-2382, 2007). Cơ chế lão hóa này vẫn chưa được biết đến một cách rõ ràng, nhưng biết rằng cơ chế này xảy ra chủ yếu là do ứng suất môi trường tích tụ trong khi nuôi cấy *in vitro* kéo dài do đó protein ức chế Cdk p16(INK4a) được biểu hiện và tích tụ gây ức chế hoạt tính của protein Cdk mà có liên quan tới sự sinh trưởng của tế bào. Biết rằng, khi sự biểu hiện của

gen khối u Bmi-1 trong tế bào gốc trung mô được kích thích để ức chế sự biểu hiện của p16, thì sự lão hóa của tế bào bị ức chế (Zhang, X. et al. Biochemical and biophysical research communications 351; 853-859, 2006). Ngoài ra, đã có thông báo rằng, khi tế bào gốc trung mô được xử lý bằng FGF-2 trong khi nuôi cấy để ức chế sự biểu hiện mRNA của p21(Cip1), p53 và p16(INK4a), thì sự ngừng sinh trưởng tế bào gốc trung mô trong pha G1 bị ức chế (Ito, T. et al., Biochemical and biophysical research communications, 359; 108-114 2007). Hơn nữa, công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn quốc số 10-2009-0108141 bộc lộ phương pháp ức chế sự lão hóa của tế bào gốc trung mô bằng cách chuyển hóa tế bào gốc trung mô bằng một gen mã hóa protein Wip1.

Tuy nhiên, phương pháp làm trẻ hóa tế bào gốc trung mô đã lão hóa thu được từ mô của người già vẫn chưa được bộc lộ.

Do vậy, sáng chế phát hiện ra rằng, khi tế bào gốc trung mô thu được từ mô mỡ được phân lập từ người bệnh tuổi già được nuôi cấy trong môi trường chứa chất chống oxy hóa và yếu tố sinh trưởng, thì có thể tạo ra tế bào gốc trung mô có hoạt tính tương tự với hoạt tính của tế bào gốc trung mô của người trẻ, nhờ đó hoàn thành sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm môi trường làm trẻ hóa tế bào gốc trung mô của người già.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp làm trẻ hóa tế bào gốc trung mô, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào gốc trung mô của người già bằng cách sử dụng chế phẩm môi trường.

Để đạt được các mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất chế phẩm môi trường làm trẻ hóa tế bào gốc trung mô của người già, chế phẩm môi trường này chứa huyết thanh bào thai bò (FBS - fetal bovine serum), chất chống oxy hóa, xytokin, và NAC (N-acetyl-L-cysteine).

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp làm trẻ hóa tế bào gốc trung mô của người già, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào gốc trung mô của người già trong chế phẩm môi trường nêu trên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện các vi ảnh về tế bào gốc mô mỡ từ những người trong độ tuổi 20 và 30, được cấy truyền trong mỗi môi trường qua 4 lần cấy chuyển.

Fig.2 thể hiện các vi ảnh về tế bào gốc mô mỡ từ những người trong độ tuổi 70 và 80, được cấy truyền trong mỗi môi trường của chúng qua 4 lần cấy chuyển.

Fig.3 là đồ thị thể hiện các mức độ nhân đôi quần thể tế bào (các CPDL) của tế bào từ những người trẻ (trong độ tuổi 20 và 30) và những người già (trong độ tuổi 70 và 80), được nuôi cấy trong 10 môi trường khác nhau.

Fig.4 là đồ thị thể hiện các mức độ nhân đôi quần thể tế bào (các CPDL) của tế bào từ những người trẻ (trong độ tuổi 20 và 30) và người già (trong độ tuổi 70 và 80), được nuôi cấy trong các môi trường khác nhau.

Fig.5 là đồ thị thể hiện các hoạt tính telomera của tế bào gốc mô mỡ, được lấy từ những người ở các độ tuổi khác nhau và được nuôi cấy trong năm môi trường khác nhau.

Fig.6 là đồ thị thể hiện các hoạt tính telomera của tế bào gốc mô mỡ của những người trong độ tuổi 20, 30, 70 và 80, được nuôi cấy trong hai môi trường khác nhau (các môi trường số 1 và 9).

Fig.7 là sơ đồ đồ thị thể hiện kết quả đo sự thay đổi về hoạt tính telomera theo số lần cấy chuyển sau khi nuôi cấy tế bào trải qua 4 lần cấy chuyển (P4) và 6 lần cấy chuyển (P6) sử dụng các môi trường số 1 và 9.

Fig.8 thể hiện kết quả đo các mức độ biểu hiện của các dấu chuẩn đa năng oct4, nanog và Rex1 ở tế bào gốc mô mỡ được nuôi cấy trong các môi trường số 1 và 9 trải qua 3 lần cấy chuyển (P3).

Fig.9 thể hiện kết quả đo các mức độ biểu hiện của các dấu chuẩn đa năng oct4, nanog và Rex1 ở tế bào gốc mô mỡ được nuôi cấy trong các môi trường số 1 và 9 trải qua 3 lần cấy chuyển (P4).

Fig.10 thể hiện các mẫu cho các đối tượng ở độ tuổi 20, 30, 70 và 80, trong đó giọt chất lỏng (đặc trưng của quá trình biệt hóa mô mỡ) cùng với việc nhuộm dầu bằng thuốc nhuộm O được quan sát trong tế bào, do có nguồn gốc từ tất cả các nhóm tuổi và được nuôi cấy trong tất cả các môi trường.

Fig.11 là việc xếp thành bảng và đồ thị thể hiện các kết quả định lượng quá trình biệt hóa mô mỡ đối với các mẫu ở Fig.10.

Fig.12 thể hiện các kết quả về các mức biểu hiện của các dấu chuẩn của quá trình biệt hóa mô mỡ đặc hiệu với tế bào tạo mỡ, đối với các dấu chuẩn PPAR α , LPL và FABP4 được phân tích bằng RT-PCT cho các đối tượng ở độ tuổi 20, 30, 70 và 80.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm môi trường làm trẻ hóa tế bào gốc trung mô của người già, chế phẩm môi trường này chứa FBS (huyết thanh bào thai bò), chất chống oxy hóa, xytokin, và NAC (N-acetyl-L-cysteine).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tế bào gốc” chỉ tế bào không chỉ có khả năng tự sao chép mà còn có khả năng biệt hóa thành ít nhất hai loại tế bào, và “tế bào gốc trưởng thành” chỉ tế bào gốc mà xuất hiện hoặc ở giai đoạn hình thành mối cơ quan của phôi sau quá trình phát triển hoặc ở giai đoạn trưởng thành.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tế bào gốc trung mô” chỉ tế bào gốc chưa được biệt hóa được phân lập từ các mô khác nhau của người hoặc động vật có vú. Cụ thể, tế bào gốc trung mô theo sáng chế có thể là tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ cuống rốn, tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ máu cuống rốn, tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ tủy xương, tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ mô mỡ, tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ cơ, tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ hệ thần kinh, tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ da, tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ màng ối, và tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ nhau thai. Công nghệ phân lập tế bào gốc từ mỗi mô là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tế bào gốc có nguồn gốc từ mô mỡ” chỉ tế bào gốc chưa được biệt hóa được phân lập từ mô mỡ. Ví dụ, tế bào gốc có nguồn gốc từ mô mỡ có thể được phân lập theo phương pháp sau. Cụ thể, tế bào gốc có nguồn gốc từ mô mỡ có thể được phân lập bằng cách tạo hỗn dịch cho mô mỡ, thu được từ việc hút mỡ, trong nước muối sinh lý, nuôi cấy hỗn dịch này, xử lý lớp tế bào mỡ, cho bám dính vào vật chứa nuôi cấy như bình nuôi cấy, bằng trypsin, và thu gom tế bào mỡ đã qua xử lý, hoặc thu gom lượng nhỏ tế bào mỡ, được tạo hỗn dịch trong nước muối sinh lý, sử dụng dao nạo.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “làm trẻ hóa tế bào gốc” có nghĩa là làm cho kiểu hình của tế bào gốc trung mô của người già tương tự với kiểu hình của tế bào gốc của người trẻ. Kiểu hình bao gồm hình thái của tế bào, tốc độ tăng sinh của tế bào, hoạt tính telomeraza, mức độ biểu hiện của các dấu chuẩn tế bào gốc (Oct4, SSEA-1, Tra 1-60, Tra 1-81, Nanog v.v.), và khả năng biệt hóa của tế bào gốc. Theo sáng chế, tốt hơn nếu tế bào gốc trung mô của người già là tế bào được phân lập từ người già trong độ tuổi từ 60 đến 120 tuổi.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “làm cho kiểu hình của tế bào gốc trung mô của người già tương tự với kiểu hình của tế bào gốc của người trẻ” có nghĩa là trạng thái trong đó kiểu hình trở nên tương tự hơn với kiểu hình của tế bào gốc từ mô của người trẻ so với kiểu hình trong lần cấy chuyển thứ nhất trong đó tế bào gốc trung mô của người già được phân lập hoặc trạng thái trong đó kiểu hình trở nên tương tự hơn với kiểu hình của tế bào gốc của người trẻ so với kiểu hình của tế bào gốc trung mô được nuôi cấy trong các môi trường khác với môi trường nuôi cấy theo sáng chế.

Theo sáng chế, chế phẩm môi trường có thể còn chứa insulin hoặc yếu tố tương tự insulin và hydrocortison, và xytokin trong chế phẩm môi trường có thể là EGF (epidermal growth factor - yếu tố sinh trưởng biểu bì) và/hoặc bFGF (basic fibroblast growth factor - yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi cơ bản).

Chất chống oxy hóa được sử dụng trong chế phẩm môi trường theo sáng chế có thể là selen, vitamin E, axit ascorbic, catechin, lycopene, beta-caroten, coenzym Q-10, EPA (axit eicosapentaenoic), DHA (axit docosahexanoic) hoặc hợp chất tương tự. Tốt hơn, chất chống oxy hóa có thể là selen.

Do vậy, theo sáng chế, nhận thấy rằng FBS, bFGF và EGF là các yếu tố cần thiết để nuôi cấy tế bào gốc mô mỡ từ những người thuộc tất cả các nhóm tuổi. Ngoài ra, nhận thấy rằng tính đa năng, tốc độ biệt hóa hoặc hoạt tính telomeraza là cao hơn ở tế bào của những người trẻ so với ở tế bào của những người già và tế bào được nuôi cấy trong môi trường không có FBS, bFGF hoặc EGF thể hiện tốc độ sinh trưởng, tốc độ biệt hóa và hoạt tính telomeraza giảm, cho thấy rằng FBS, bFGF và EGF là các thành phần thiết yếu cho sự sinh trưởng và hoạt động của tế bào.

Hơn nữa, theo sáng chế, nhận thấy rằng tốc độ biệt hóa tế bào của tế bào gốc lấy từ nhóm người trẻ và nhóm người già là tương tự giữa môi trường không có selen và môi

trường đối chứng có selen. Tuy nhiên, các kết quả của phân tích hoạt tính telomeraza giữa hai môi trường này cho thấy rằng hoạt tính telomeraza là thấp hơn ở tế bào của nhóm người già được nuôi cấy trong môi trường không có selen so với ở tế bào của nhóm người trẻ, cho thấy rằng selen cần phải được đưa vào môi trường nuôi cấy cho tế bào của những người già để tạo ra hoạt tính telomeraza cao.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp làm trẻ hóa tế bào gốc trung mô của người già, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào gốc trung mô của người già trong chế phẩm môi trường nêu trên.

Môi trường cơ bản được sử dụng để nuôi cấy tế bào gốc trung mô có thể là môi trường thông thường được biết trong lĩnh vực kỹ thuật phù hợp với việc nuôi cấy tế bào gốc, ví dụ, môi trường DMEM, MEM hoặc K-SFM. Tốt hơn, có thể là môi trường không chứa huyết thanh. Tốt nhất là, có thể là K-SFM (Keratinocyte-serum-free medium; môi trường nuôi cấy tế bào sừng không chứa huyết thanh).

Môi trường được sử dụng để nuôi cấy tế bào gốc trung mô có thể được bổ sung các chất phụ gia được biết trong lĩnh vực kỹ thuật để ức chế sự biệt hóa tế bào gốc trung mô trong khi thúc đẩy sự tăng sinh của các kiểu hình chưa được biệt hóa của nó.

Ngoài ra, môi trường có thể chứa chất đệm trung hòa (ví dụ phosphat và/hoặc bicarbonat nồng độ cao) trong dung dịch đẳng trương và dưỡng chất protein (ví dụ huyết thanh như FBS, chất thay thế huyết thanh, albumin, hoặc các axit amin thiết yếu và không thiết yếu như glutamin). Hơn nữa, môi trường này có thể chứa các lipid (các axit béo, cholesterol, chiết phẩm huyết thanh chứa HDL hoặc LDL) và các thành phần khác được tìm thấy trong hầu hết môi trường gốc thuộc loại này (ví dụ insulin hoặc transferin, các nucleosit hoặc các nucleotit, pyruvat, nguồn đường như glucoza, selen ở dạng ion hóa hoặc muối bất kỳ, glucocorticoid như hydrocortison và/hoặc chất khử như β -mercaptoetanol).

Ngoài ra, nhằm mục đích ngăn không cho tế bào dính vào nhau hoặc dính vào thành mạch, hoặc tạo ra các cụm lớn, có lợi nếu môi trường có thể chứa các chất chống tạo cụm, ví dụ, các chất này được bán bởi hãng Invitrogen (Cat #0010057AE).

Trong số chúng, một hoặc nhiều chất phụ gia bổ sung được chọn từ các chất phụ gia sau có thể được sử dụng một cách có lợi:

- yếu tố tế bào gốc (SCF, Steel factor), các phối tử hoặc các kháng thể khác mà nhĩ trùng hóa c-kit, và các chất hoạt hóa khác của cùng đường truyền tín hiệu;

- các phối tử cho các thụ thể liên quan tới tyrosin kinaza khác, như thụ thể cho yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu (PDGF-platelet-derived growth factor), yếu tố kích thích tạo cụm đại thực bào, phối tử Flt-3 và yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (VEGF-vascular endothelial growth factor);

- các yếu tố làm tăng các mức độ AMP vòng, như forskolin;

- các yếu tố gây cảm ứng cho gp130, như LIF hoặc Oncostatin-M;

- các yếu tố sinh trưởng tạo máu, như thrombopoietin (TPO);

- các yếu tố sinh trưởng chuyển hóa, như TGF β 1;

- các neurotrophin, như CNTF.

Có thể thu được tế bào gốc trung mô để được nuôi cấy theo sáng chế bằng, ví dụ, phương pháp dưới đây.

Mô mỡ của người thu được từ phần bụng bằng cách hút mỡ hoặc tương tự được tách và rửa bằng PBS. Sau đó, mô được cắt nhỏ và phân hủy bởi môi trường DMEM chứa collagenaza, sau đó được rửa bằng PBS và ly tâm ở 1000 vòng trên phút trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi, và rửa các mảnh vụn còn lại bằng PBS và ly tâm với tốc độ 1000 vòng trên phút trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi thông qua bộ lọc có mắt lưới 100 μ m và rửa tế bào còn lại bằng PBS. Sau đó, nuôi cấy tế bào qua đêm trong môi trường DMEM (FBS 10%, 2mM NAC, axit ascorbic 0,2mM), và sau khi nuôi cấy, tế bào không dính vào bình chứa nuôi cấy được rửa bằng PBS và được nuôi cấy trong môi trường tế bào sừng-SFM (chứa NAC, axit ascorbic, canxi, rEGF, BPE, insulin và hydrocortison) trong khi đó thay mới môi trường 2 ngày một lần. Tế bào gốc trung mô được tách ra khỏi môi trường và được cấy truyền, nhờ đó thu được tế bào gốc trung mô. Ngoài ra, tế bào gốc trung mô cũng có thể thu được bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Theo một phương án của sáng chế, tốt hơn là selen được dùng làm chất chống oxy hóa với lượng nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1ng/ml. Nếu hàm lượng selen trong môi trường ít hơn 0,5 μ g/L, môi trường sẽ nhạy với độc tính oxy, và nếu hàm lượng selen nhiều hơn 10 μ g/L, nó sẽ gây ra độc tố tế bào nghiêm trọng.

Theo sáng chế, yếu tố tương tự insulin có thể được sử dụng làm phần tử thay thế cho insulin. Yếu tố này có chức năng làm tăng cường sự chuyển hóa glucoza và chuyển hóa protein để thúc đẩy sự sinh trưởng tế bào. Tốt hơn là, IGF-1 (insulin-like growth factor-1 - Yếu tố sinh trưởng tương tự insulin-1) tái tổ hợp được sử dụng trong sáng chế. Tốt hơn là hàm lượng của yếu tố tương tự insulin trong môi trường nằm trong khoảng từ 10 đến 50ng/ml. Nếu hàm lượng của yếu tố tương tự insulin nhỏ hơn 10ng/ml, thì sẽ xảy ra sự chết tế bào theo chương trình, và nếu hàm lượng yếu tố tương tự insulin nhiều hơn 50µg/L, nó sẽ gây ra độc tính tế bào và làm gia tăng chi phí cho môi trường.

Ngoài ra, theo phương án của sáng chế, yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGF) được sử dụng trong môi trường. EGF có thể gây ra sự tăng sinh các loại tế bào khác nhau *in vivo* và tốt hơn là EGF tái tổ hợp. Tốt hơn, hàm lượng EGF trong môi trường là từ 10 đến 50ng/ml. Nếu hàm lượng EGF trong môi trường nhỏ hơn 10ng/ml, nó sẽ không có tác dụng đặc biệt nào, và nếu hàm lượng EGF nhiều hơn 50ng/ml, thì nó sẽ gây độc cho tế bào.

Ngoài ra, theo sáng chế, yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi cơ bản (bFGF) được sử dụng trong môi trường. Yếu tố này có thể làm tăng sinh các loại tế bào khác nhau *in vivo* và tốt hơn là bFGF tái tổ hợp. Tốt hơn là hàm lượng bFGF trong môi trường nằm trong khoảng từ 1 đến 100ng/ml.

Theo một ví dụ của sáng chế, có thể nhận thấy rằng FBS, bFGF và EGF là các yếu tố thiết yếu cho việc nuôi cấy tế bào gốc mô mỡ từ những người thuộc tất cả các nhóm tuổi. Cụ thể là, sự thiếu hụt bFGF được nhận thấy có ảnh hưởng quan trọng đối với việc nuôi cấy tế bào gốc mô mỡ. Ngoài ra, còn nhận thấy rằng tốc độ sinh trưởng của tế bào gia tăng khi độ tuổi của những người mà từ đó tế bào được phân lập giảm

Theo một ví dụ khác nữa của sáng chế, nhận thấy rằng FBS, bFGF và EGF là các yếu tố quan trọng để xác định hoạt tính telomeraza của tế bào gốc mô mỡ. Ngoài ra, còn có thể thấy rằng hoạt tính telomeraza là cao hơn ở tế bào của những người trong độ tuổi 20 và tế bào được nuôi cấy trong môi trường không chứa selen có hoạt tính telomeraza thấp. Ngoài ra, cũng nhận thấy rằng, nếu tế bào gốc mô mỡ của những người già được nuôi cấy trong môi trường chứa selen, thì chúng có thể có hoạt tính telomeraza tương tự với hoạt tính của tế bào gốc mô mỡ được lấy từ những người trẻ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết hơn với việc viện dẫn đến các ví dụ. Sẽ là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực rằng các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và không được hiểu là để giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Ví dụ 1

Phân lập tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ mô mỡ của người

Mô mỡ được phân lập từ bụng của người bệnh ở độ tuổi 20, 30, 70 và 80 bằng cách hút mỡ bụng và rửa bằng PBS. Mô mỡ đã rửa được cắt nhỏ và phân hủy bằng môi trường DMEM chứa collagen typ 1 (1mg/ml) ở nhiệt độ 37°C trong hai giờ. Mô mỡ được xử lý bằng collagen được rửa bằng PBS, và sau đó được ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi, sau đó rửa các viên tế bào còn lại bằng PBS và ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 phút. Mô đã ly tâm được lọc qua lưới lọc cỡ lỗ 100µm để loại bỏ dịch nổi, và sau đó rửa bằng PBS và nuôi cấy qua đêm trong môi trường DMEM chứa 10% FBS, 2mM NAC (N-acetyl-L-cysteine) và 0,2mM axit ascorbic.

Sau đó, tế bào không bám dính được rửa bằng PBS, và tiếp đó được cấy truyền trong môi trường tế bào sừng-SFM (RKCM) chứa 5% FBS, 2mM NAC, 0,2mM axit ascorbic, 0,09mM canxi, 5ng/ml rEGF, 5µg/ml insulin, 10ng/ml bFGF, 74ng/ml hydrocortison và 1ng/ml selen đồng thời thay mới môi trường này hai ngày một lần. Sau khi tế bào được cấy truyền 3 lần, phân tích hoạt tính của tế bào gốc mô mỡ từ người trong độ tuổi 20, 40, và 70.

Để phân tích hoạt tính của tế bào gốc, hình thái vi mô, dấu chuẩn biệt hóa, hoạt tính của telomerase, chiều dài của điểm cuối nhiễm sắc thể (telomere) và khả năng biệt hóa của tế bào gốc được đánh giá.

Kết quả là, phát hiện ra rằng tế bào gốc mô mỡ được phân lập từ người trong độ tuổi 20, 40, và 70 có hoạt tính tương tự sau khi chúng được cấy truyền 3 lần.

Ví dụ 2

Xác định các thành phần môi trường làm trẻ hóa tế bào gốc

Chuẩn bị môi trường không chứa một trong các hợp chất FBS, NAC, axit ascorbic, canxi, rEGF, 5 μ g/ml insulin, bFGF, hydrocortison và selen, là các thành phần hoạt tính được bổ sung vào môi trường RKCM được sử dụng trong ví dụ 1. Ngoài ra, kiểu hình của tế bào gốc mô mỡ từ người bệnh ở độ tuổi 20, 30, 70 và 80 trong môi trường không chứa mỗi trong số các thành phần hoạt tính được phân tích.

Chuẩn bị các môi trường số 1 đến 10. Môi trường số 1 là môi trường RKCM, và môi trường số 2 đến 10 là các môi trường không chứa mỗi trong số các thành phần hoạt tính trong môi trường RKCM. Các thành phần hoạt tính không có mặt trong môi trường được thể hiện trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

Môi trường số	Các thành phần hoạt tính không có mặt trong môi trường RKCM
1	Không
2	FBS
3	bFGF
4	Insulin
5	Hydrocortison
6	EGF
7	axit ascorbic
8	NAC(N-axetyl-L-xystein)
9	Selen
10	EGF/bFGF

(1) Quan sát hình thái và tốc độ tăng sinh

Tế bào gốc mô mỡ được phân lập từ người bệnh ở độ tuổi 20, 30, 70 và 80 bằng phương pháp nêu trong ví dụ 1 được cấy truyền 4 lần, và hình thái của chúng được quan sát bằng kính hiển vi (Fig.1 và Fig.2). Ngoài ra, số lượng tế bào trong mỗi lần cấy truyền được đo bằng máy đếm tế bào máu để xác định tốc độ tăng sinh của tế bào.

Fig.3 và Fig.4 thể hiện các mức độ nhân đôi của quần thể tế bào (cell population doubling levels - CPDLs) của tế bào từ người trẻ tuổi (trong độ tuổi 20 và 30) và từ người già (trong độ tuổi 70 và 80), được nuôi cấy trong 10 môi trường khác nhau, và thể hiện

CPDL lần lượt theo độ tuổi và môi trường. Như có thể thấy trên các hình vẽ này, CPDL của tế bào gốc trung mô của mô mỡ từ người trẻ tuổi (trong độ tuổi 20 và 30) và từ người già (trong độ tuổi 70 và 80), được nuôi cấy trong 10 môi trường khác nhau, mỗi môi trường chứa 10 thành phần hoạt tính, cao hơn theo thứ tự về độ tuổi 20, 30, 70 và 80, ngoại trừ các môi trường số 2 và 10. Tốc độ sinh trưởng của tế bào khác nhau một chút giữa các môi trường và cao nhất trong môi trường số 1, 6 hoặc 7 và thấp nhất trong môi trường số 2.

Hình thái hoặc tốc độ tăng trưởng của tế bào gốc mô mỡ được nuôi cấy trong 10 môi trường khác nhau được quan sát, và kết quả là, có thể nhận thấy rằng các thành phần không có mặt trong các môi trường số 2, 3 và 10 là các yếu tố cần thiết để nuôi cấy tế bào gốc trung mô của mô mỡ từ người ở tất cả các nhóm tuổi và thành phần không có mặt trong môi trường số 3 có ảnh hưởng quan trọng hơn đến quá trình nuôi cấy tế bào gốc trung mô của mô mỡ so với các thành phần không có mặt trong môi trường số 2 và 10. Ngoài ra, nhận thấy rằng tốc độ tăng trưởng của tế bào tăng khi độ tuổi của người bị lấy tế bào giảm.

(2) Phân tích hoạt tính của telomeraza

Tế bào gốc mô mỡ được phân lập từ người bệnh ở độ tuổi 20, 30, 70 và 80 bằng phương pháp nêu trong ví dụ 1 được cấy truyền trong 5 môi trường khác nhau (số 1, 2, 3, 9 và 10) trải qua 3 lần cấy chuyển, và sau đó phân tích hoạt tính telomeraza của tế bào.

Tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ mô mỡ được nuôi cấy trong môi trường được rửa bằng PBS, và sau đó được phân cắt bằng môi trường DMEM chứa collagenaza ở nhiệt độ 37°C trong hai giờ. Sau đó, tế bào được rửa bằng PBS, và tiếp đó được ly tâm ở tốc độ 3000 Xg trong thời gian 10 phút. Loại bỏ dịch nổi, và tế bào còn lại được ly giải bằng đệm ly giải trong kit Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA (Roche) và được để tĩnh trên nước đá trong thời gian 30 phút. Dịch ly giải tế bào được ly tâm ở tốc độ 16.000 xg trong thời gian 20 phút, và một phần dịch nổi được trộn với hỗn hợp phản ứng có trong kit và đưa vào phản ứng PCR trong các điều kiện sau: kéo dài chuỗi ở 25°C trong 10 phút, bắt hoạt ở 94°C trong 5 phút, biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 50°C trong 30 giây, và polyme hóa ở 72°C trong 90 giây. 5µl mẫu được khuếch đại bằng PCR được cho phản ứng với 25µl chất phản ứng biến tính, có trong kit, ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 10 phút, và sau đó được trộn với 225µl dung dịch lai hóa. 100µl hỗn hợp

được phân phối vào vi đĩa được bọc và được cho phản ứng ở nhiệt độ 37°C trong hai giờ ở tốc độ 300vòng/phút, và sau đó loại bỏ dung dịch lai hóa. Rửa hỗn hợp thu được vài lần bằng đệm rửa, và sau đó bổ sung 100μl dung dịch kháng DIG-POD vào và để cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng ở tốc độ 300 vòng/phút trong 30 phút. Tiếp theo, loại bỏ dung dịch, và rửa hỗn hợp thu được vài lần bằng đệm rửa. Bổ sung 100μl dung dịch cơ chất TMB vào và để cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng ở tốc độ 300 vòng/phút trong 30 phút. Sau đó, bổ sung 100μl dung dịch dừng phản ứng vào và quan sát sự thay đổi màu của hỗn hợp. Khi ngừng bổ sung dung dịch, thì màu của hỗn hợp chuyển từ xanh sang vàng, và trong vòng 30 phút, đo độ hấp thụ ở bước sóng 450nm bằng thiết bị vi đĩa (ELISA).

Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.5, hoạt tính telomeraza của tế bào gốc mô mỡ được nuôi cấy trong năm môi trường khác nhau đạt cao nhất trong môi trường số 9 trong trường hợp tế bào từ người ở độ tuổi 20 hoặc 30, và tế bào trong các môi trường số 2, 3 và 10 có ít hoặc không có hoạt tính telomeraza. Trong trường hợp tế bào từ người già, tế bào được nuôi cấy trong môi trường số 1 thể hiện hoạt tính cao hơn một chút so với tế bào được nuôi cấy trong môi trường số 9. Ngoài ra, trong trường hợp tế bào từ người già, hoạt tính telomeraza của tế bào được nuôi cấy trong các môi trường số 2, 3 và 10 là thấp.

Fig.6 thể hiện hoạt tính telomeraza của tế bào từ người ở độ tuổi 20, 30, 70 và 80, được nuôi cấy trong hai môi trường khác nhau (môi trường số 1 và 9).

Kết quả là, hoạt tính telomeraza của tế bào gốc mô mỡ được nuôi cấy trong các môi trường 1 và 9 là cao nhất trong tế bào từ người trong độ tuổi 20 và cao hơn trong tế bào được nuôi cấy trong môi trường số 1 so với trong tế bào được nuôi cấy trong môi trường số 9, ngoại trừ tế bào từ người trong độ tuổi 30.

Ngoài ra, khi tế bào được nuôi cấy trong các môi trường 1 và 9 trải qua 4 lần cấy chuyển, tính đa năng của tế bào được nuôi cấy là cao nhất ở tế bào từ người trong độ tuổi 80, trái lại hoạt tính telomeraza là cao nhất ở tế bào từ người trong độ tuổi 20. Chỉ dựa vào các kết quả phân tích hoạt tính telomeraza, có thể nhận thấy rằng thành phần không có mặt trong môi trường số 9 làm giảm hoạt tính của tế bào gốc nhiều hơn so với thành phần không có mặt trong môi trường số 1, mặc dù sự khác biệt này là không đáng kể. Ngoài ra, phát hiện ra rằng khi tế bào từ người già được nuôi cấy trong môi trường chứa

thành phần không có mặt trong môi trường số 9, thì tế bào có thể có hoạt tính tương tự với hoạt tính của tế bào từ người trẻ tuổi, chứng tỏ rằng thành phần này là một thành phần quan trọng.

Ngoài ra, tế bào được nuôi cấy trong các môi trường 1 và 9 trải qua 4 lần cấy chuyển và trải qua 6 lần cấy chuyển, và sau đó đánh giá sự thay đổi về hoạt tính telomera theo số lần cấy chuyển.

Kết quả là, như có thể nhìn thấy trên Fig.7, hoạt tính telomera trong cấy chuyển 4 lần cao hơn trong cấy chuyển 6 lần ở tất cả các nhóm tuổi và hai môi trường.

(3) Phân tích sự biểu hiện của dấu chuẩn tế bào gốc

Tế bào gốc mô mỡ được phân lập từ người ở độ tuổi 20, 30, 70 và 80 bằng phương pháp nêu trong ví dụ 1 được cấy truyền trong các môi trường 1 và 9 trải qua 3 lần cấy chuyển, và sau đó được sinh trưởng đến mức hợp lưu 90%. Sau khi loại bỏ môi trường, tế bào gốc mô mỡ đã sinh trưởng được rửa một hoặc nhiều lần bằng PBS, và sau đó được ly giải bằng đệm ly giải (Intron Biotechnology, Sungnam, Korea) để tách ARN, và ARN tách được từ tế bào bằng cách sử dụng kit tách tổng số (Intron Biotechnology). ARN tách được chuyển thành cADN (kit tổng hợp cADN của Intron Biotechnology), sau đó cADN được đưa vào chạy PCR sử dụng các đoạn mồi được thiết kế đối với các dấu chuẩn đa năng oct-4, Nanog và Rex1. Sản phẩm PCR được chạy điện di và định lượng bằng máy phân tích hình ảnh.

Kết quả là, như có thể thấy trên Fig.8, tế bào gốc mô mỡ được nuôi cấy trong các môi trường 1 và 9 đều thể hiện các dấu chuẩn đa năng oct4, nanog và Rex1, mặc dù sự khác biệt về sự biểu hiện các dấu chuẩn đa năng giữa tế bào gốc là đáng kể. Mức độ biểu hiện của các dấu chuẩn cao hơn ở tế bào từ người trong độ tuổi 80 so với tế bào từ người ở các nhóm tuổi khác. Ngoài ra, mức độ biểu hiện cao hơn trong môi trường số 9 so với môi trường số 1 trong trường hợp chỉ tế bào từ người trong độ tuổi 30, và các nhóm tuổi khác thể hiện các mức độ biểu hiện dấu chuẩn tương tự.

Ngoài ra, tế bào gốc trung mô của mô mỡ được nuôi cấy trong các môi trường 1 và 9 biểu hiện dấu chuẩn đa năng oct4, nanog và Rex1, mặc dù mức độ biểu hiện của các dấu chuẩn là đáng kể giữa tế bào gốc (Fig.9). Mức độ biểu hiện của dấu chuẩn là cao hơn

ở tế bào từ người trong độ tuổi 80 so với ở tế bào từ người ở các nhóm tuổi khác và cao hơn trong môi trường số 9 so với trong môi trường số 1 trong tất cả các nhóm tuổi.

(4) Phân tích khả năng biệt hóa

Tế bào gốc mô mỡ được phân lập từ người ở độ tuổi 20, 30, 70 và 80 bằng phương pháp nêu trong ví dụ 1 được cấy truyền trong 5 môi trường khác nhau (Số 1, 2, 3, 9 và 10), và sau đó được nuôi cấy trong môi trường NH Adipodiff (môi trường biệt hóa tế bào mỡ) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) trong các điều kiện 37°C và 5% CO₂ trong thời gian 21 ngày trong khi môi trường biệt hóa tế bào mỡ được thay mới 2 ngày một lần. 21 ngày sau khi bắt đầu nuôi cấy tế bào mỡ trong môi trường biệt hóa tế bào mỡ, khả năng của tế bào gốc mô mỡ biệt hóa thành tế bào mỡ được phân tích bằng nhuộm dầu res O.

Kết quả là, như thể hiện trên Fig.10, quan sát được giọt mỡ (đặc điểm đặc trưng cho sự biệt hóa tế bào mô mỡ) cùng với việc nhuộm dầu res O trong tế bào, có nguồn gốc từ tất cả các nhóm tuổi và được nuôi cấy trong tất cả môi trường. Fig.11 thể hiện kết quả định lượng sự biệt hóa tế bào mô mỡ. Như có thể được thấy trên hình vẽ này, tốc độ biệt hóa cao hơn theo thứ tự trong các môi trường số 9, 1 và 3 và tương tự giữa môi trường số 2 và 10. Ngoài ra, tốc độ biệt hóa cao hơn theo thứ tự về độ tuổi từ 30, 20, 70 và 80 tuổi.

Mức độ biểu hiện của các dấu chuẩn biệt hóa tế bào mô mỡ PPAR α , LPL và FABP4d được phân tích bằng RT-PCR ở mức độ phân tử. Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.12, mức độ biểu hiện cao hơn một chút ở nhóm người trẻ tuổi so với nhóm người già, mặc dù sự khác biệt về mức độ biểu hiện giữa các cá thể là đáng kể. Ngoài ra, mức độ biểu hiện là tương tự giữa các môi trường hoặc cao hơn một chút trong các môi trường số 2 và 9.

Từ các kết quả được mô tả trên đây, nhận thấy rằng các thành phần hoạt tính không có mặt trong môi trường số 2, 3 và 10 là các yếu tố cần thiết để nuôi cấy tế bào gốc trung mô của mô mỡ từ người ở tất cả các nhóm tuổi. Ngoài ra, cũng nhận thấy rằng tính đa năng, tốc độ biệt hóa hoặc hoạt tính telomeraza là cao hơn ở tế bào từ người trẻ tuổi so với ở tế bào từ người già và tế bào được nuôi cấy trong các môi trường 2, 3 và 10 thể hiện tốc độ sinh trưởng, tốc độ biệt hóa và hoạt tính telomeraza giảm, chứng tỏ rằng các thành phần hoạt tính không có mặt trong các môi trường này là các yếu tố cần thiết cho sự sinh trưởng và hoạt tính của tế bào.

Hơn nữa, nhận thấy rằng tốc độ biệt hóa tế bào trong môi trường số 9 không chứa selen là tương tự giữa nhóm người trẻ tuổi và nhóm người già, nhưng các kết quả về phân tích hoạt tính telomeraza giữa hai môi trường này chỉ ra rằng hoạt tính telomeraza là thấp hơn trong tế bào của nhóm người già được nuôi cấy trong môi trường số 9 không chứa selen so với tế bào của nhóm người trẻ tuổi, chứng tỏ rằng selen không có mặt trong môi trường số 9 cần phải có trong môi trường nuôi cấy tế bào từ người già để tạo ra hoạt tính telomeraza tương tự với hoạt tính của tế bào được nuôi cấy trong môi trường số 1.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Theo sáng chế, ngay cả khi tế bào gốc trung mô thu được từ người bệnh trên 60 tuổi có thể được chuyển thành tế bào gốc trung mô trẻ có khả năng biệt hóa cao, có hoạt tính telomeraza cao, và khả năng biểu hiện các dấu chuẩn tế bào gốc cao. Do đó, sáng chế có thể làm tăng đáng kể hiệu quả của liệu pháp điều trị bằng tế bào có sử dụng tế bào gốc trung mô.

Mặc dù sáng chế được mô tả chi tiết bằng cách viện dẫn đến các dấu hiệu cụ thể, nhưng sẽ là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực rằng bản mô tả này chỉ đề cập đến các phương án được ưu tiên và không làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế. Do đó, phạm vi bảo hộ quan trọng của sáng chế sẽ được xác định bằng các điểm yêu cầu bảo hộ đi kèm và các dạng tương đương của chúng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp làm trẻ hóa tế bào gốc trung mô từ người già, phương pháp này bao gồm các bước:

nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ người già trong chế phẩm môi trường chứa huyết thanh bào thai bò - FBS(fetal bovine serum), 0,5 đến 1ng/ml selen, NAC (N-axetyl-L-xystein), 10 đến 50ng/ml yếu tố sinh trưởng biểu bì- EGF (epidermal growth factor), 1 đến 100ng/ml yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi cơ bản- bFGF (basis fibroblast growth factor), insulin hoặc yếu tố tương tự insulin và hydrocortison, trong đó người già là người trong độ tuổi từ 60 đến 120 tuổi,

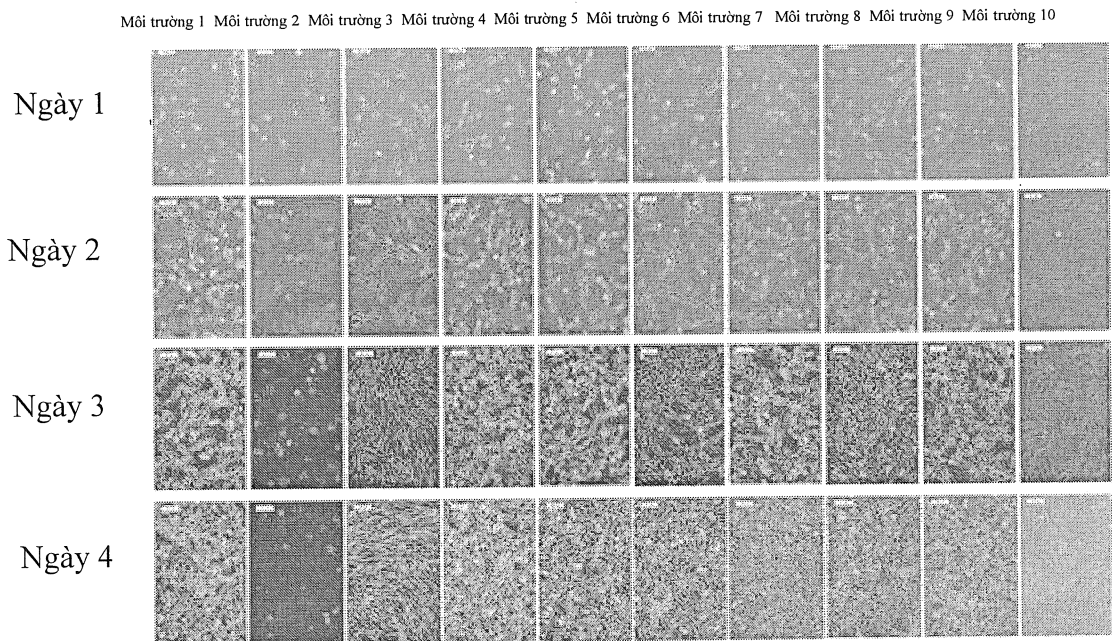
trong đó việc làm trẻ hóa nói trên là một hoặc nhiều trong số các đặc tính sau:

- (i) thúc đẩy tốc độ tăng sinh;
- (ii) gia tăng hoạt tính của telomeraza;
- (iii) gia tăng mức độ biểu hiện của dấu chuẩn đa năng; và
- (iv) gia tăng khả năng biệt hóa.

Fig.1

A)

Độ tuổi 20 (P4)



B) Độ tuổi 30 (P4)

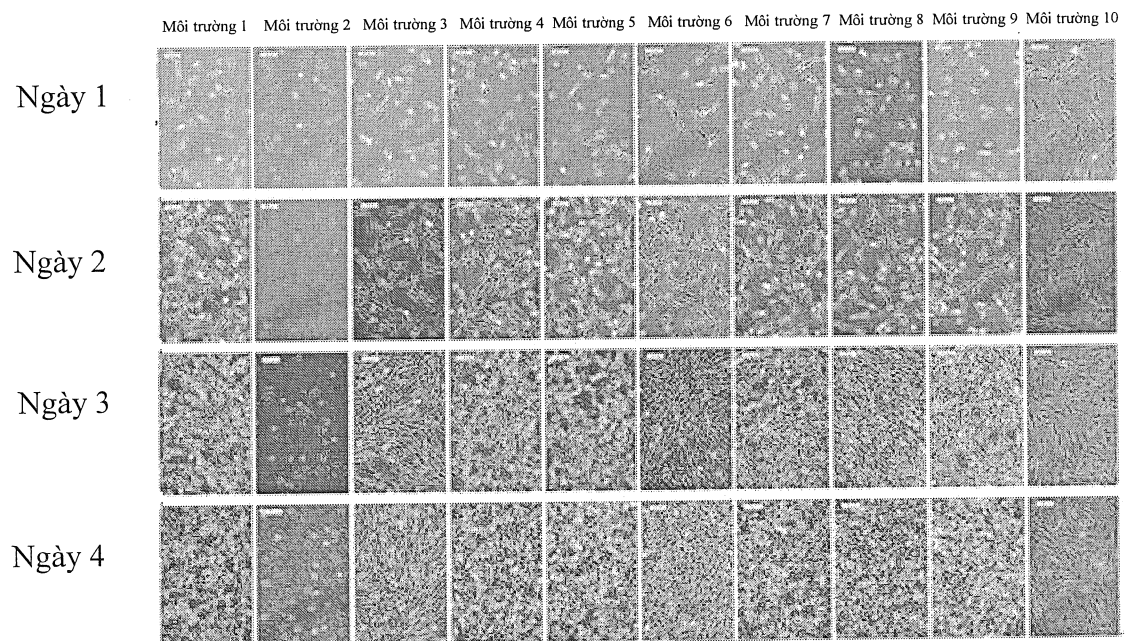
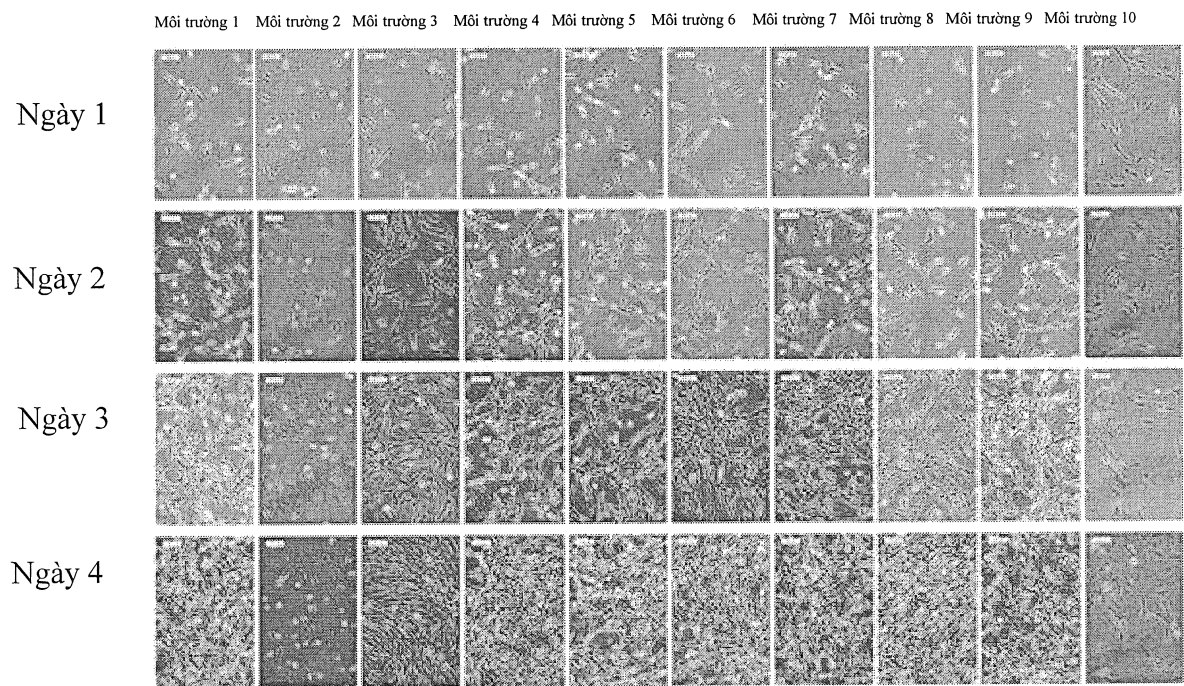


Fig.2

A)
Độ tuổi 70 (P4)



B)
Độ tuổi 80 (P4)

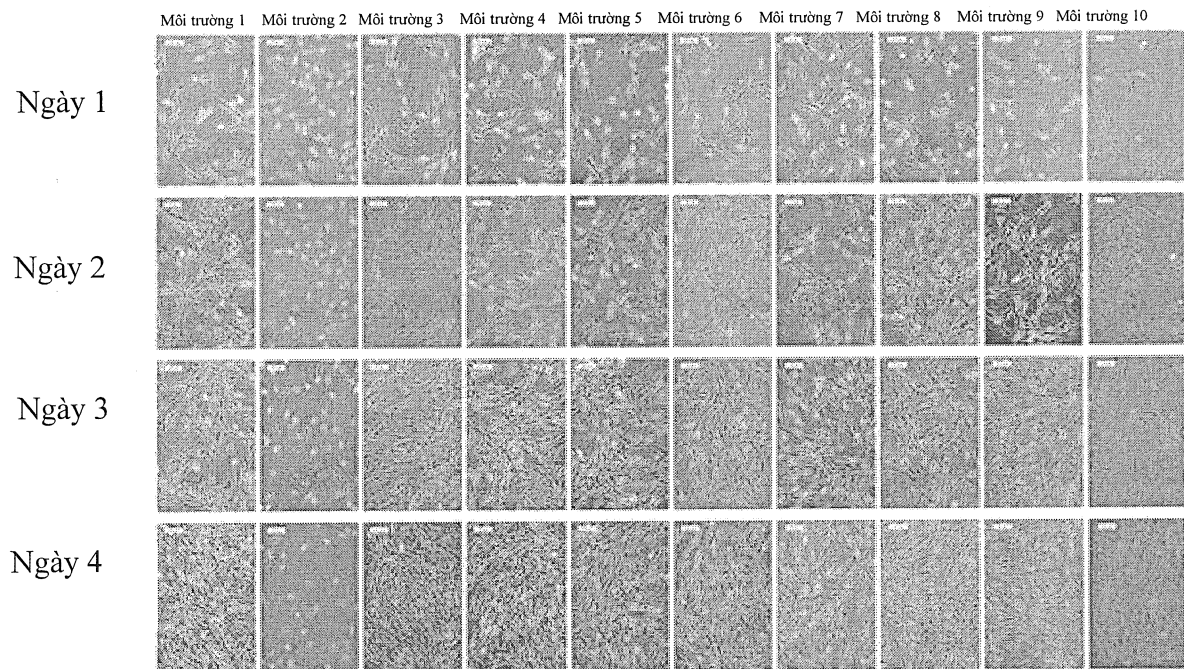


Fig.3

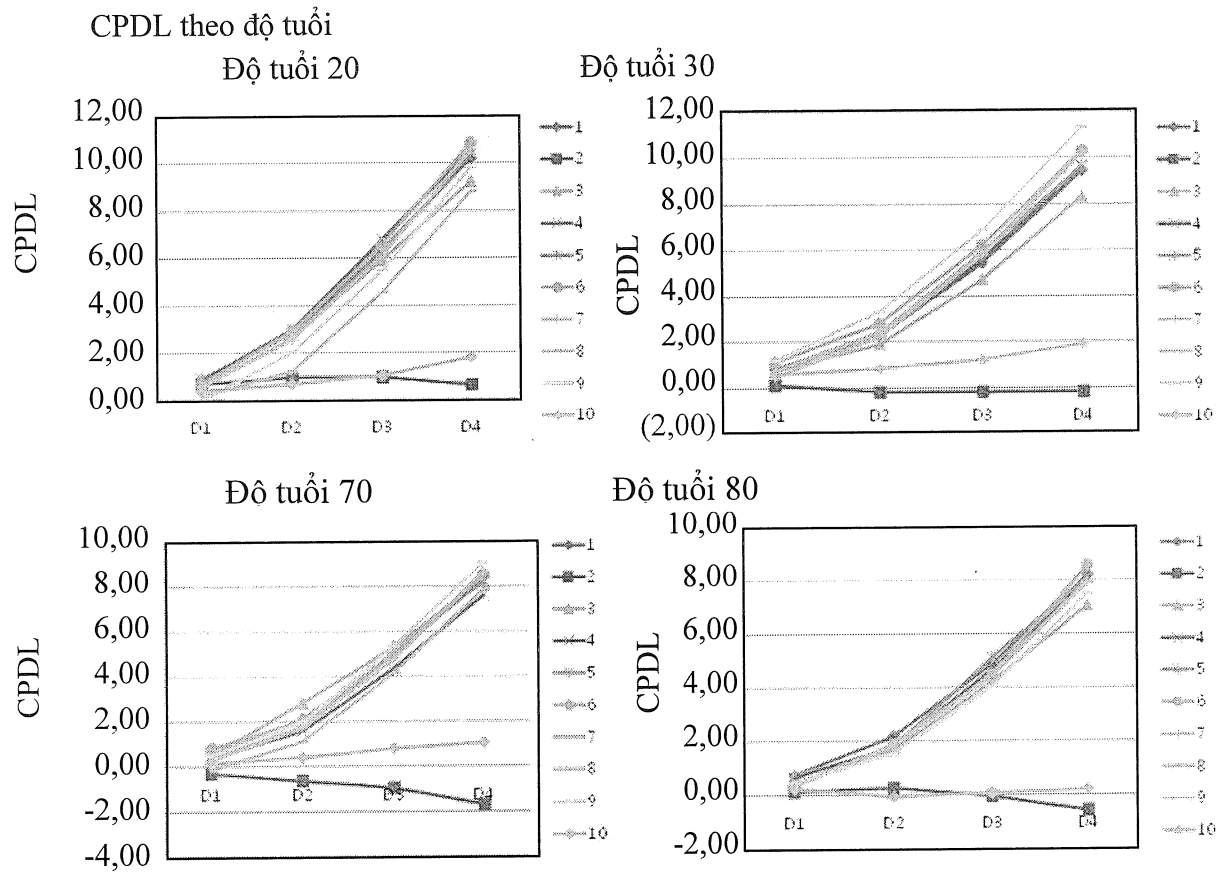


Fig.4

CPDL theo môi trường

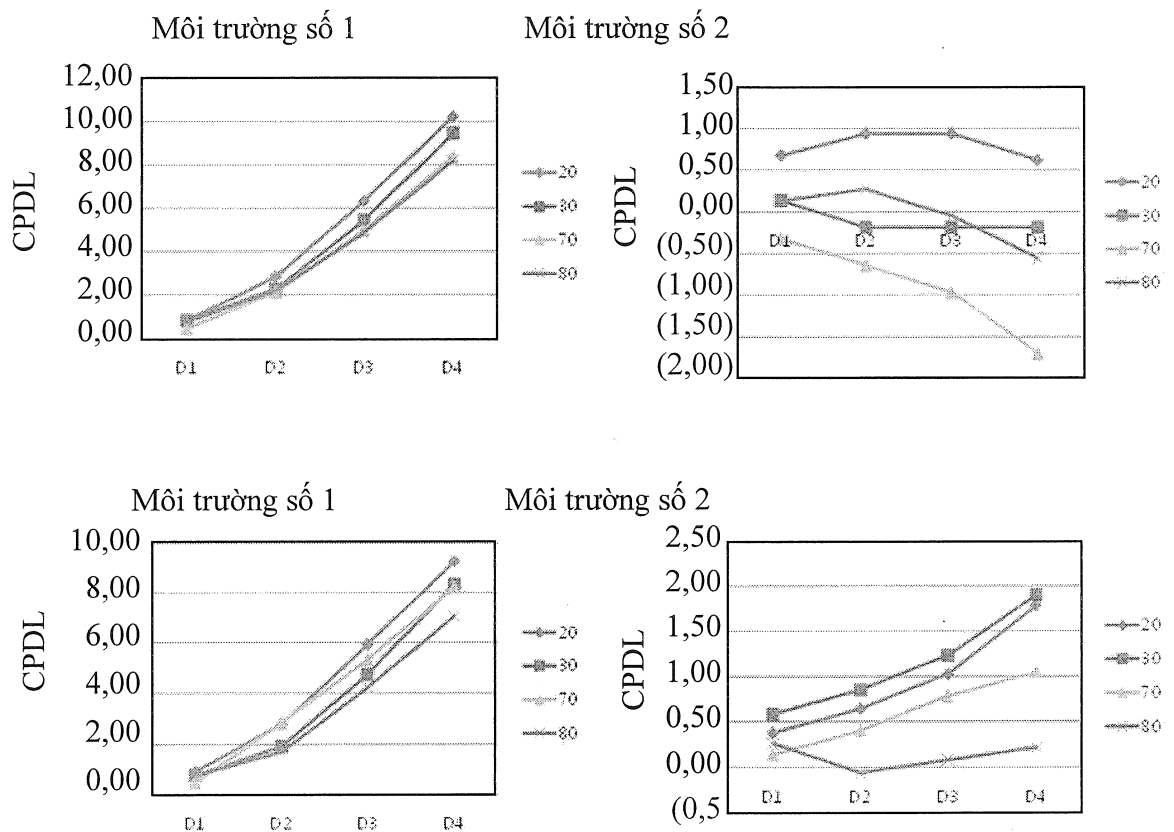
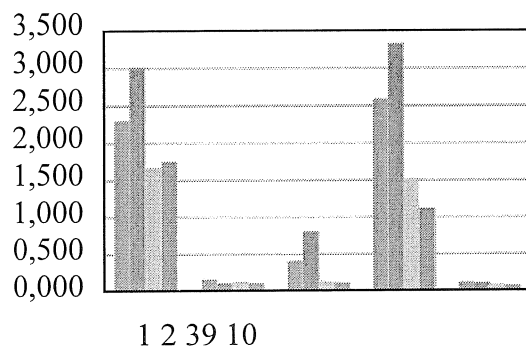


Fig.5

Thử nghiệm hoạt tính telomeraza

Độ tuổi	Môi trường				
	1	2	3	9	10
20	2,254	0,158	0,410	2,591	0,112
30	3,016	0,099	0,805	3,329	0,102
70	1,672	0,121	0,124	1,520	0,084
80	2,342	0,099	0,105	1,120	0,070

Hoạt tính telomeraza theo môi trường



Hoạt tính telomeraza theo độ tuổi

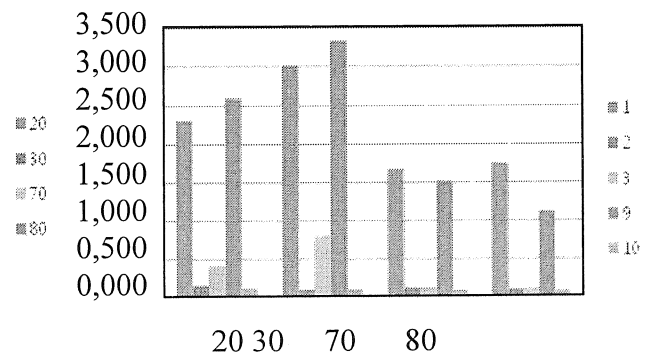
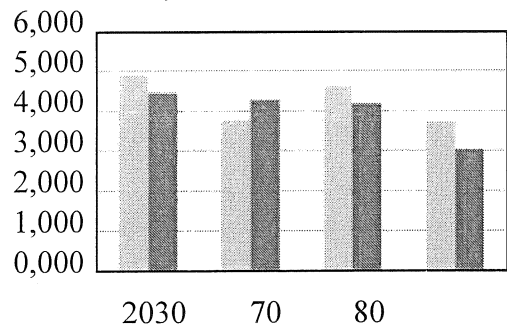


Fig.6

Thử nghiệm nghiệm hoạt tính telomeraza

Độ tuổi	Môi trường	
	1	9
20	4,910	4,464
30	3,767	4,272
70	4,609	4,181
80	3,742	3,022

Hoạt tính telomeraza theo độ tuổi



Hoạt tính telomeraza theo môi trường

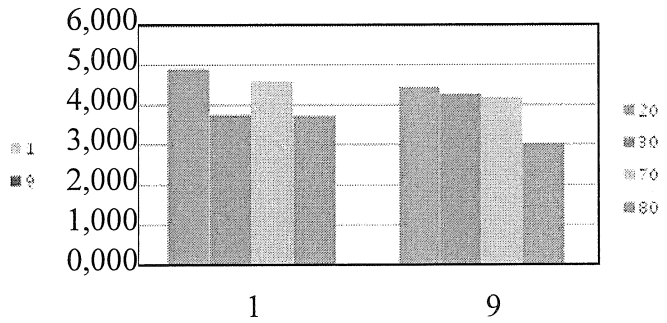


Fig.7

Hoạt tính telomera: hoạt tính telomera theo cây truyền

Độ tuổi	Môi trường			
	P4 M1	P6 M1	P4 M9	P6 M9
20	4,910	2,307	0,464	2,591
30	3,767	3,016	4,272	3,329
70	4,609	1,672	4,181	1,520
80	3,742	1,750	3,022	1,120

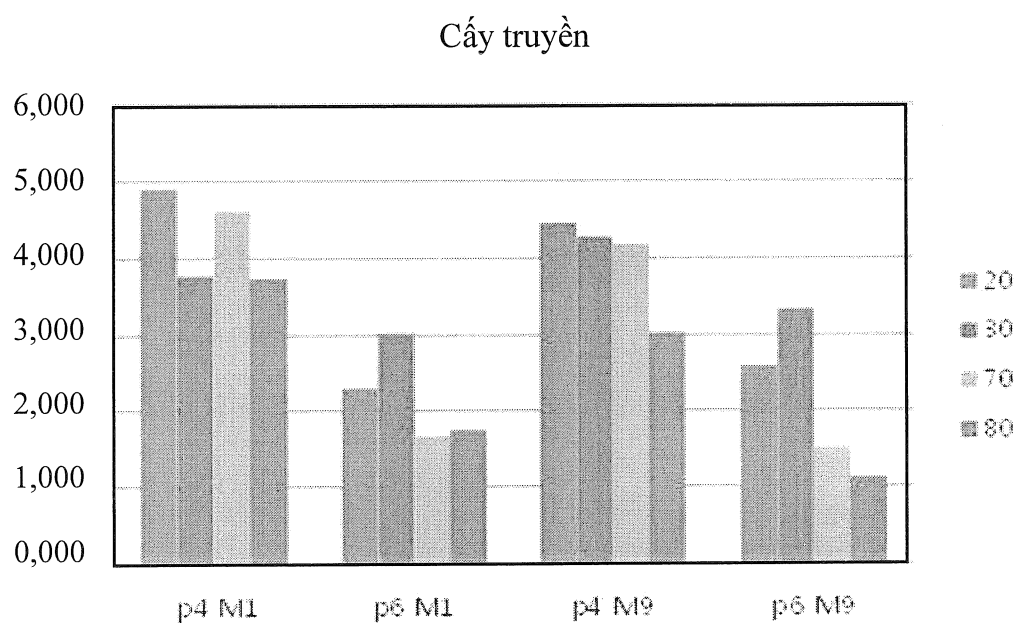


Fig.8

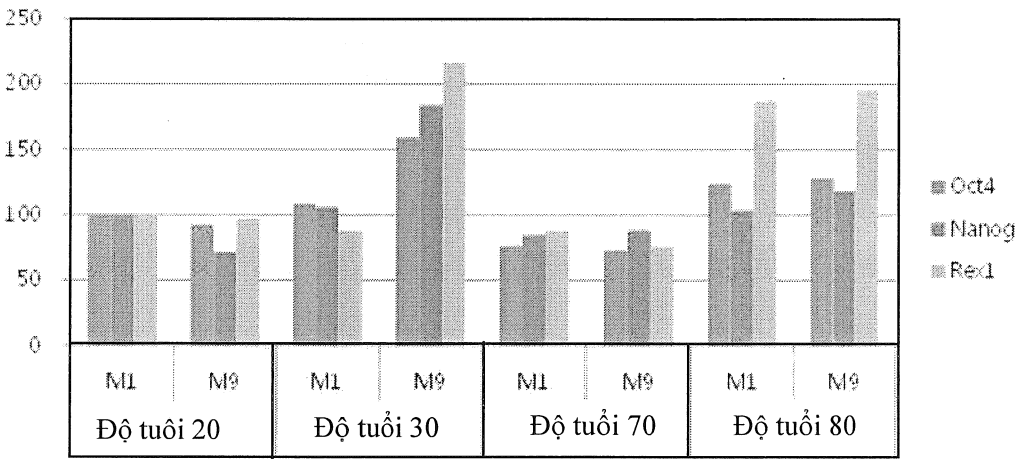
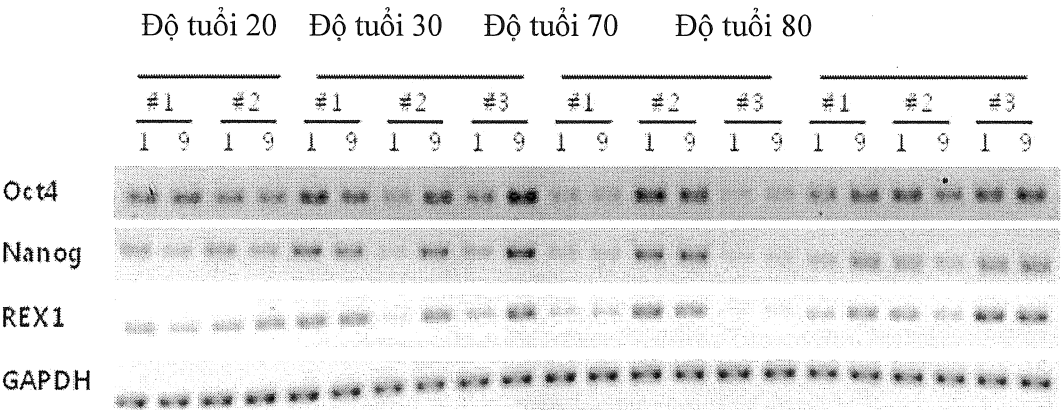


Fig.9

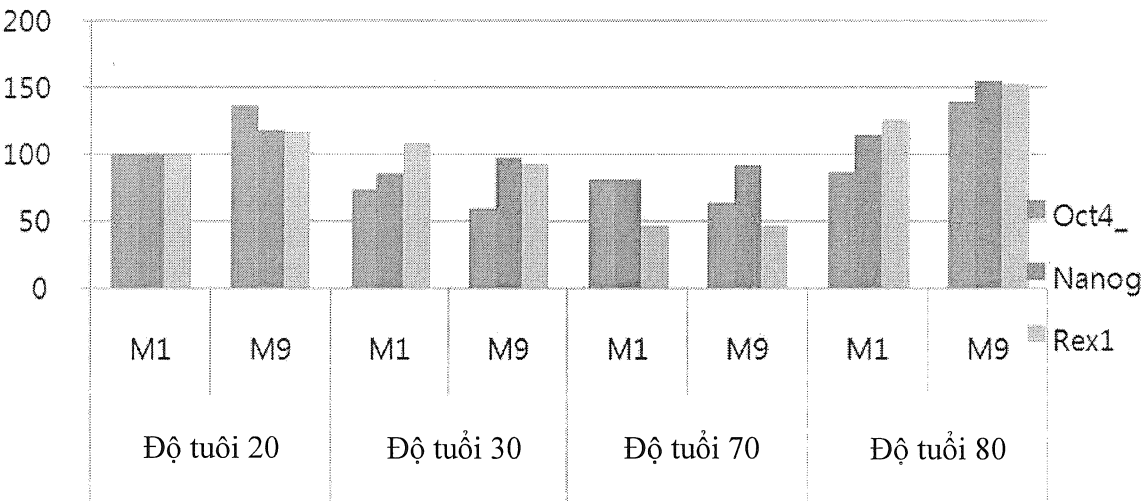


Fig.10

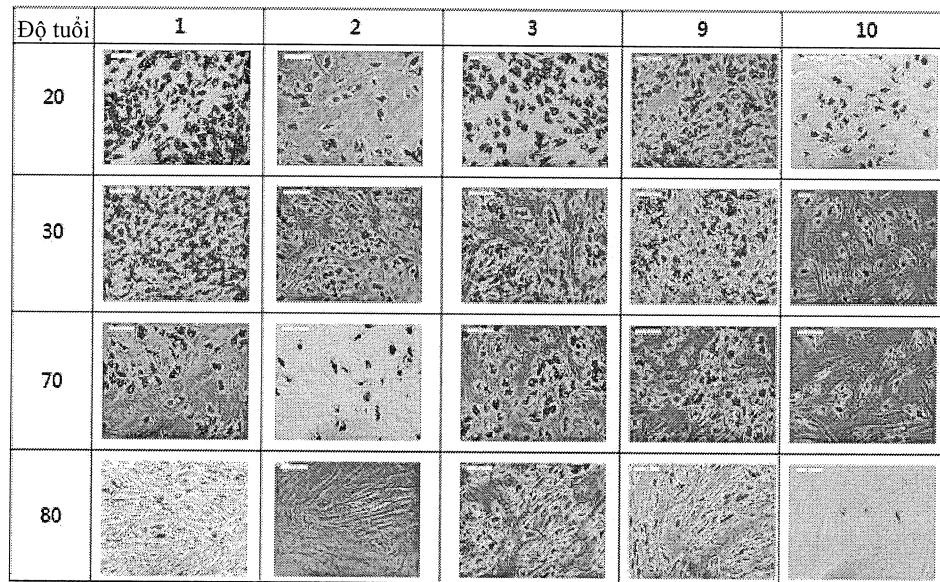


Fig.11

Khối lượng

Độ tuổi	Môi trường				
	1	2	3	9	10
20	0,3340	0,0985	0,2755	0,3338	0,1067
30	0,4857	0,1185	0,3677	0,4533	0,1090
70	0,2440	0,0962	0,2057	0,2405	0,1312
80	0,1658	0,0372	0,1690	0,1732	0,0490

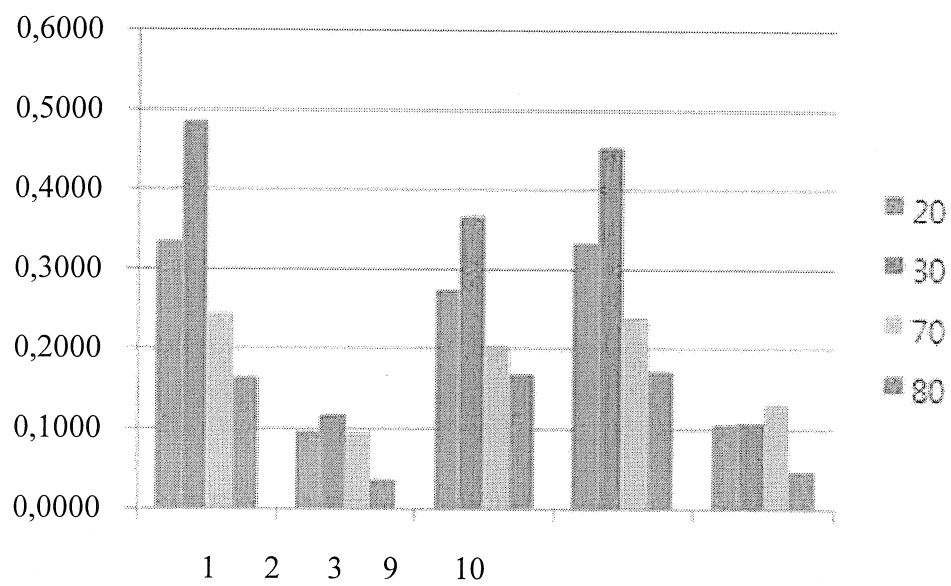


Fig.12

