



(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)



1-0028863

(51)⁷ C12N 5/0797

(13) B

(21) 1-2013-02506

(22) 12/01/2012

(86) PCT/IB2012/000030 12/01/2012

(87) WO/2012/095730 19/07/2012

(30) 61/431,944 12/01/2011 US; 61/558,527 11/11/2011 US

(45) 25/07/2021 400

(43) 27/01/2014 310A

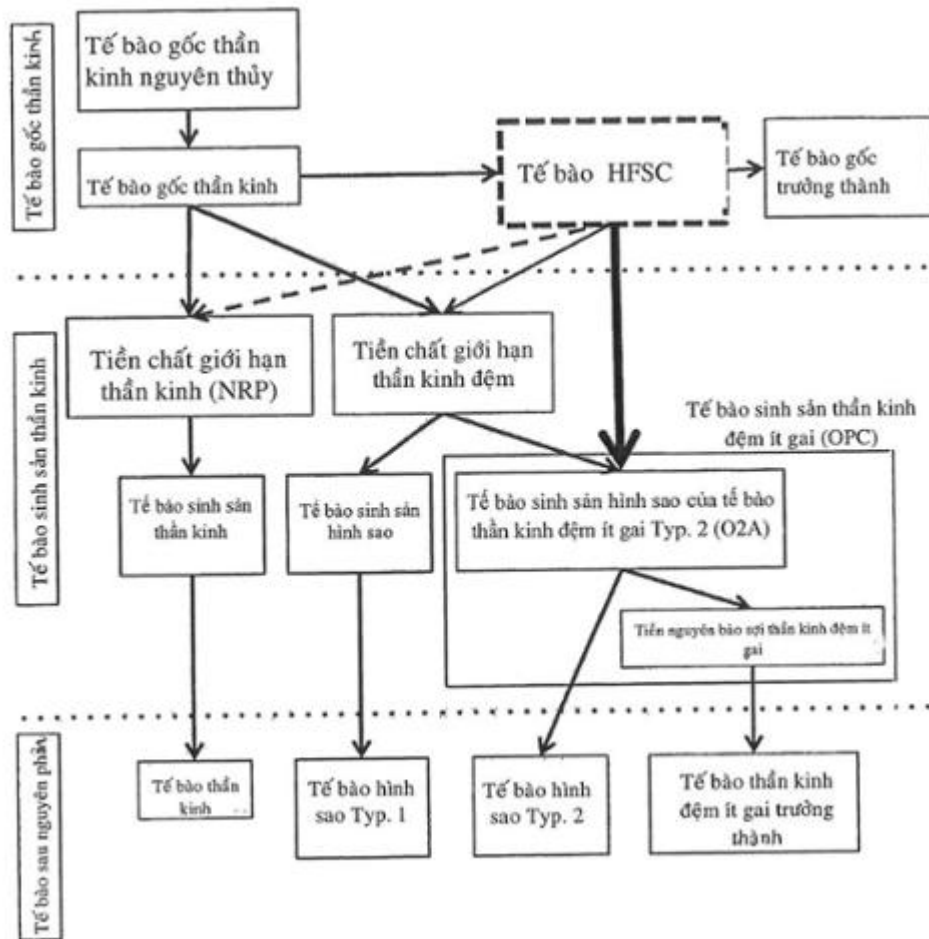
(76) KIDO, Tsuneo (US)

15620 Marathon Circle, Suite 403 Gaithersburg, Maryland 20878-5362 (US)

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) TẾ BÀO THẦN KINH CÓ THỂ NHÂN RỘNG ĐƯỢC PHÂN LẬP Ở NGƯỜI,
DUY TRÌ PHÂN CHỨA TẾ BÀO NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP IN VITRO ĐỂ NUÔI
CẤY TẾ BÀO NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến tế bào thần kinh có thể nhân rộng được phân lập ở người, trong đó tế bào là tế bào sinh sản hoặc tế bào gốc, duy trì khả năng biệt hóa thành tế bào thần kinh, tế bào hình sao và tế bào thần kinh đệm ít gai, duy trì khả năng biệt hóa tế bào dòng tế bào thần kinh đệm ít gai hiệu quả trong các giai đoạn tiếp theo, và tế bào biểu hiện ít nhất là kháng nguyên bề mặt tế bào CD133 và CD140a. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp nuôi cấy tế bào sinh sản hoặc tế bào thần kinh có thể nhân rộng được phân lập từ hệ thần kinh trung ương của động vật có vú, và tự nuôi cấy, trong đó tế bào này duy trì khả năng biệt hóa thành tế bào thần kinh, tế bào hình sao và tế bào thần kinh đệm ít gai và khả năng biệt hóa tế bào dòng tế bào thần kinh đệm ít gai hiệu quả.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến tới lĩnh vực sinh học tế bào của các tế bào gốc thần kinh và các tế bào sinh sản thần kinh. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến một quần thể thuần chủng hoặc được làm giàu của tế bào thần kinh gốc và/hoặc tế bào sinh sản thần kinh, cụ thể là, tế bào thần kinh có thể nhân rộng được phân lập ở người có khả năng biệt hóa thành dòng các tế bào thần kinh đệm ít gai *in vitro*, thích hợp để sử dụng trong nghiên cứu sinh học, sàng lọc thuốc và điều trị bệnh cho con người. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp *in vitro* để nuôi cấy và được phẩm chứa tế bào này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong quá trình phát triển của hệ thống thần kinh trung ương, các tế bào gốc thần kinh đa năng nguyên thủy (NSC) tăng sinh, nhanh chóng phân chia tế bào sinh sản mà cuối cùng biệt hóa thành các dạng tế bào khác nhau để tạo nên não của người trưởng thành. Hệ thần kinh trung ương của người trưởng thành chủ yếu bao gồm các tế bào thần kinh và các tế bào thần kinh đệm, bao gồm tế bào hình sao và tế bào thần kinh đệm ít gai. Các tế bào sinh sản cho tế bào thần kinh, tế bào hình sao và tế bào thần kinh đệm ít gai bắt nguồn lần lượt từ các tế bào gốc thần kinh trong bộ não đang phát triển (xem Fig.1).

Các tế bào sinh sản thần kinh hình thành đầu tiên và biệt hóa thành nhiều loại tế bào thần kinh. Tế bào hình sao phát triển thứ hai và có chức năng hỗ trợ sự tồn tại của tế bào thần kinh. Cuối cùng, các tế bào thần kinh đệm ít gai sinh sản bắt đầu xuất hiện và di trú qua hệ thần kinh trung ương. Sau đó, chúng biệt hóa thành tế bào thần kinh đệm ít gai trưởng thành, sinh ra myelin cần thiết cho chức năng tế bào thần kinh thích hợp.

Do tế bào thần kinh đệm ít gai đóng một vai trò quan trọng trong việc hỗ trợ hệ thần kinh trung ương nên quần thể tế bào thần kinh đệm ít gai thuần chủng hoặc được làm giàu hoặc các tế bào sinh sản của chúng (ví dụ, các tế bào tiền sinh sản của tế bào thần kinh đệm ít gai và/hoặc tế bào sinh sản của tế bào thần kinh đệm ít gai) sẽ có ích

cho các liệu pháp tế bào và y học tái tạo như trong điều trị rối loạn thần kinh bao gồm các bệnh bẩm sinh hủy myelin (ví dụ, bệnh Krabbe hoặc bệnh Pelizaeus-Merzbacher), tổn thương tủy sống và các tình trạng bệnh khác gây ra do các thiếu hụt trong vỏ myelin bảo vệ các tế bào thần kinh. Các tế bào này cũng có thể được sử dụng cho nghiên cứu và xác định các dược chất mới để điều trị nhiều rối loạn thần kinh như bệnh đa xơ cứng và tâm thần phân liệt.

Các tế bào thần kinh ít gai trưởng thành không tăng sinh và không tồn tại tốt trong nuôi cấy, và khả năng để thu được các tế bào thần kinh ít gai trực tiếp từ các mẫu mô với số lượng đủ để sử dụng trong nghiên cứu hoặc điều trị bệnh cho con người là vô cùng khó khăn. Vì vậy, việc sử dụng các tế bào thần kinh đệm ít gai cho các mục đích này bị hạn chế bởi sự thiếu hụt về tính khả dụng của các tế bào này.

Một giải pháp cho vấn đề này bao gồm việc thu các tế bào gốc thần kinh và/hoặc tế bào sinh sản thần kinh từ mô, nhân rộng các tế bào trong nuôi cấy để thu được một số lượng đủ lớn các tế bào mà sau đó có thể biệt hóa thành các tế bào thần kinh đệm ít gai. Quá trình biệt hóa có thể diễn ra hoặc *in vitro* hoặc *in vivo*, như trong trường hợp cấy ghép. Điều này sẽ tạo ra một quần thể tế bào thần kinh đệm ít gai hoặc tế bào sinh sản của chúng hoặc các tế bào trước sinh sản để sử dụng trong nghiên cứu và điều trị bệnh cho con người.

Tuy nhiên, các nhà khoa học đã rất nỗ lực để xác định điều kiện nuôi cấy mà cho phép nuôi cấy lâu dài và nhân rộng số lượng của các tế bào sinh sản thần kinh đệm ít gai và/hoặc trước sinh sản của tế bào - đặc biệt là từ người và động vật linh trưởng không phải con người – trong đó quần thể tế bào được nhân rộng thu được chủ yếu bao gồm các tế bào giữ lại khả năng biệt hóa thành các tế bào thần kinh đệm ít gai.

Một số nhà khoa học cho rằng việc thu được tế bào sinh sản của tế bào thần kinh đệm ít gai từ chuột (Raff và cộng sự, J. Neurosci, 3:1289, 1983; Raff và cộng sự, Nature, 303 :390, 1983; Espinosa de los Monteros và cộng sự, Proc Natl. Acad. Sci. Mỹ, 90 :50, 1993). Các tế bào sinh sản của tế bào thần kinh đệm ít gai tăng sinh này được biết như là tế bào sinh sản O-2A vì chúng có khả năng biệt hóa *in vitro* thành tế bào thần kinh đệm ít gai hoặc tế bào hình sao typ 2. Các nhà khoa học khác đã xác định được tế bào trước sinh sản của thần kinh đệm ít gai của chuột trong nuôi cấy cơ bản (Gallo, Armstrong RC, J. Neurosci, 5 :394, 1995; Grinspan, Franceschini B, J.

Neurosci Res, 41.: 540, 1995; Decker và cộng sự, Mol. Cell. Neurosci., 16 :422, 2000). Các tế bào này được cho là tế bào sinh sản của tế bào thần kinh đệm ít gai và được mong đợi sẽ có lợi hơn trong liệu pháp tế bào vì khả năng di trú vượt trội của chúng so với tế bào sinh sản của tế bào thần kinh đệm ít gai. Không may, các nhà khoa học đã không thể nhân rộng hiệu quả các tế bào này trong thời gian dài trong *in vitro*. Ngược lại, các nhà khoa học cho rằng việc nuôi cấy tế bào sinh sản O2A nuôi từ thần kinh thị giác hoặc tủy sống của chuột bằng môi trường điều kiện B104 hoặc các tổ hợp sinh trưởng như (i) yếu tố sinh trưởng lấy được từ tiểu cầu AA (PDGF-AA) có yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi cơ bản (bFGF hoặc FGF cơ bản) và neurotrophin-3 (NT-3), hoặc (ii) PDGF-AA có yếu tố kích thích thần kinh có mao (CNTF) và NT-3. Tuy nhiên, không ai thành công trong việc nhân rộng loại tế bào này từ mô của động vật linh trưởng sử dụng các yếu tố sinh trưởng này.

Do đó, vẫn còn rất khó khăn để thu được và nhân rộng quần thể thuần chủng hoặc làm giàu của tế bào thần kinh đệm ít gai và /hoặc các tế bào sinh sản của chúng từ động vật có vú ngoài chuột hoặc chuột nhắt và đặc biệt khó khăn để thu được và nhân rộng các tế bào này từ người và động vật linh trưởng không phải con người. Do đó, tồn tại một nhu cầu rất lớn đối các phương pháp tạo ra các quần thể thuần chủng hoặc làm giàu của các tế bào gốc thần kinh của động vật có vú hoặc các tế bào sinh sản có khả năng biệt hóa thành dòng tế bào thần kinh đệm ít gai *in vitro*.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế này đề cập đến tế bào thần kinh có thể nhân rộng được phân lập ở người, trong đó tế bào duy trì khả năng biệt hóa là tế bào sinh sản hoặc tế bào gốc, trong đó tế bào duy trì khả năng biệt hóa thành tế bào thần kinh, tế bào hình sao, và tế bào thần kinh đệm ít gai, trong đó tế bào duy trì khả năng biệt hóa thành dòng tế bào thần kinh đệm ít gai hiệu quả trong quá trình tiếp theo, và trong đó tế bào biểu hiện ít nhất là kháng nguyên của bề mặt tế bào CD133 và CD140a.

Sáng chế này cũng đề cập tới phương pháp *in vitro* để nuôi cấy tế bào có thể nhân rộng, trong đó tế bào này là tế bào sinh sản hoặc tế bào gốc được phân lập từ hệ thần kinh trung ương của động vật có vú, trong đó tế bào này duy trì khả năng biệt hóa thành các tế bào thần kinh, tế bào hình sao và tế bào thần kinh đệm ít gai và khả năng biệt hóa thành dòng tế bào thần kinh đệm ít gai hiệu quả, trong đó phương pháp bao

gồm phân lập và tách ít nhất một tế bào từ mô thần kinh của thai nhi với nhiệt độ 37°C, trong khí gồm 1-20% O₂ và 5% CO₂ và trong môi trường nuôi cấy không có huyết thanh được xác định hóa học, trong đó môi trường bao gồm ít nhất là 5ng/ml PDGF-AA, 0,5ng/ml bFGF, và 10μM 1-thioglycerol; và chuyển tế bào để thu được tế bào thần kinh của người có thể nhân rộng.

Sáng chế này còn đề cập đến nuôi cấy *in vitro* bao gồm ít nhất một tế bào thần kinh được phân lập thu được từ hệ thần kinh trung ương của động vật có vú, trong đó tế bào ngáp trong môi trường nuôi cấy không có huyết thanh được xác định hóa học được xác định hóa học có ít nhất là 5ng/ml PDGF-AA, 5ng/ml bFGF, và 10μM 1-thioglycerol.

Sáng chế này còn đề cập đến được phẩm của tế bào gốc thần kinh bao gồm tế bào thần kinh có thể nhân rộng được phân lập ở người.

Sáng chế này còn đề cập đến nuôi cấy *in vitro* và nhân rộng tế bào gốc thần kinh và/hoặc tế bào sinh sản được phân lập từ hệ thần kinh trung ương của động vật có vú, trong đó tế bào được nuôi cấy và nhân rộng này duy trì khả năng biệt hóa thành dòng tế bào thần kinh đệm ít gai. Nuôi cấy tế bào trong sáng chế này là nuôi cấy bám dính.

Sáng chế này còn đề cập đến quần thể thuần chủng hoặc được làm giàu được phân lập của tế bào gốc thần kinh trung ương của động vật có vú được phân lập và/hoặc tế bào sinh sản thần kinh có khả năng biệt hóa thành dòng tế bào thần kinh đệm ít gai (ví dụ, như các tế bào O4 dương tính với cấu trúc hình mạng nhện như được minh họa trong Fig.7 và Fig.15) *in vitro*.

Sáng chế này còn đề cập đến sự nhân rộng và biệt hóa dòng tế bào thần kinh đệm ít gai của động vật có vú *in vitro* từ tế bào gốc thần kinh và/hoặc tế bào sinh sản thần kinh được phân lập từ hệ thần kinh trung ương của động vật có vú.

Mô tả văn tắt hình vẽ

Fig.1 minh họa sự phát triển của tế bào gốc thần kinh và tế bào sinh sản thần kinh thành ba loại tế bào chính trong não -tế bào thần kinh, tế bào hình sao và tế bào thần kinh đệm ít gai.

Fig.2 thể hiện sự so sánh các biểu hiện của chỉ thị phân tử của các tế bào thân gốc kinh trung ương khác nhau;

Fig.3 minh họa các hình ảnh tương phản của tế bào gốc của thai nhi (dòng #2b) trong hình A đến F;

Fig.4 minh họa tốc độ nhân rộng của tế bào gốc của thai nhi (dòng #2b) khi có sự kết hợp khác nhau của các yếu tố sinh trưởng;

Fig.5 minh họa hiệu quả của liều lượng cao của PDGF-AA (100ng/ml) và 1-thioglycerol với sự tăng sinh của các tế bào gốc của thai nhi (dòng #2b);

Fig.6 minh họa đường cong sinh trưởng của các tế bào gốc của thai nhi (dòng #2b);

Fig.7 mô tả sự biệt hóa tự phát của các tế bào gốc của thai nhi trong môi trường loại bỏ huyết thanh trong các hình A đến F;

Fig.8 là hình ảnh đối pha được chụp bằng kính hiển vi ngược pha thể hiện hình thái của tế bào gốc của thai nhi (dòng #3) ở các giai đoạn khác nhau;

Fig.9 minh họa đường cong sinh trưởng của tế bào gốc của thai nhi (dòng #3);

Fig.10 là hình ảnh đối pha được chụp bằng kính hiển vi ngược pha thể hiện hình thái của tế bào gốc của thai nhi (dòng 4A và 4B) ở các giai đoạn khác nhau trong các hình A đến F;

Fig.11 minh họa đường cong sinh trưởng của tế bào gốc của thai nhi (dòng #4A và #4B);

Fig.12 minh họa kiểu hình miễn dịch của các tế bào gốc của thai nhi không được biệt hóa trong các hình A đến S;

Fig.13, từ hình A đến H, hiển thị dữ liệu đếm tế bào chảy minh họa tỷ lệ của các tế bào không được biệt hóa (dòng # 2b, giai đoạn 13);

Fig.14 minh họa kiểu hình miễn dịch của các tế bào gốc của thai nhi được biệt hóa (dòng # 3, giai đoạn 15); và

Fig.15 minh họa khả năng biệt hóa của tế bào gốc thai nhi (dòng #2b, giai đoạn 15) trong hình A đến E.

Mô tả chi tiết hình vẽ

Fig.1 minh họa sự phát triển của thể bào gốc thần kinh và tế bào sinh sản thần kinh thành ba loại tế bào chính trong não- tế bào thần kinh, tế bào hình sao và tế bào thần kinh đệm ít gai. Đường mũi tên chỉ ra sự phát triển của một loại tế bào này thành một loại tế bào khác. Đường nét đứt từ tế bào gốc của thai nhi đến tiền chất giới hạn thần kinh (NRP) chỉ ra rằng tế bào gốc thần kinh của thai nhi có xu hướng thấp hơn để trở nên chết thần kinh. Đường in đậm từ tế bào gốc của thai nhi đến tế bào 02A chỉ ra rằng tế bào gốc của thai nhi có xu hướng lớn hơn để sản sinh ra dòng tế bào thần kinh đệm ít gai. Sự đa năng của tế bào gốc của thai nhi biệt hóa thành tế bào thần kinh, tế bào hình sao và tế bào thần kinh đệm ít gai được minh họa trong ví dụ 7 (xem, Fig.14). Xu hướng tế bào gốc của thai nhi biệt hóa thành dòng tế bào thần kinh đệm ít gai được minh họa trong ví dụ 2 (xem, Fig.7) và ví dụ 8 (xem, Fig.15).

Fig.2 thể hiện sự so sánh biểu hiện của chỉ thị phân tử của các tế bào gốc thần kinh trung ương khác nhau. Sáng chế này bộc lộ kiểu hình của tế bào gốc của thai nhi trong ví dụ 7 (xem, Fig.12 và Fig.13) và tóm tắt như vậy ở trong hình này. Như được thảo luận sau này, tế bào gốc của thai nhi không giống như loại tế bào bất kì khác và có cả các đặc điểm của tế bào gốc thần kinh và sinh sản của tế bào hình sao typ2 của tế bào thần kinh đệm ít gai (02A).

Fig.3 minh họa hình ảnh tương phản của tế bào gốc của thai nhi (dòng #2b) trong hình A đến F. Fig.3, hình A là hình ảnh đối pha được chụp bằng kính hiển vi ngược pha minh họa tế bào gốc của thai nhi (dòng #2b) được nuôi cấy trong DMEM/F12 chứa glutamin và HEPES và được bổ sung chất bổ sung B27 (Invitrogen™), axit amino không thiết yếu (NEAA) (Invitrogen™), 1,5mM pyruvat (Invitrogen™), 55μM β-merxaptoetanol (Invitrogen™), và 1mM N-axetyl-L-xystein (Sigma), (trong hỗn hợp sau đây được gọi là “môi trường HFSCM1M1”) với 20ng/ml PDGF-AA và 10ng/ml bFGF trong máy ủ duy trì ở 37°C, 5% O₂ và 5% CO₂. Tế bào xuất hiện từ giai đoạn 0, ngày thứ 7. Tế bào tạo thành hình cầu và các hình cầu này được đặt trực tiếp trên đĩa nuôi cấy phủ poly-ornitin mà không phân ly các hình cầu ở giai đoạn 1.

Fig.3, hình B & hình C, là các hình ảnh đối pha được chụp bằng kính hiển vi ngược pha minh họa tế bào gốc của thai nhi (dòng #2b) được nuôi cấy như được mô tả trong hình vẽ của Fig.3, hình A trên đây. Tế bào lần lượt được minh họa từ giai đoạn 1, ngày thứ 1 và giai đoạn 2, ngày thứ 14. Tế bào được đặt trực tiếp trên đĩa nuôi cấy phủ

poly-ornitin được gắn kết và lan rộng từ các hình cầu (Fig.3, hình B). Tế bào được phân đoạn có thể nhân rộng thành công trong điều kiện nuôi cấy trong giai đoạn tiếp theo (Fig.3, hình C).

Fig.3, từ hình D đến F là hình ảnh đối pha được chụp bằng kính hiển vi ngược pha minh họa tế bào gốc của thai nhi (dòng #2b) sau nhiều giai đoạn và được nuôi cấy trong môi trường HFSCM1M1 với 100ng/ml PDGF-AA, 10ng/ml bFGF, 10ng/ml IGF-1 và 50 μ M 1-thioglyxerol trong máy ủ duy trì ở nhiệt độ 37°C, 5% O₂, và 5% CO₂. Hầu hết tế bào gốc của thai nhi là tế bào pha tối hợp lại với các tế bào xung quanh. Các tế bào phân tán tách ra từ cụm có xu hướng biệt hóa tự phát thành tế bào đa phân cực mang quá trình (còn được gọi là hình thái “giống như mạng nhện”) đặc trưng với tiền nguyên bào thần kinh đậm ít gai hoặc tế bào thần kinh đậm ít gai chưa trưởng thành (được chỉ ra bằng đầu mũi tên màu trắng trong Fig.3, hình D & E) nhưng tần suất xuất hiện thường nhỏ hơn 1%. Tế bào được minh họa trong Fig.3, hình D, E, và F lần lượt từ giai đoạn 8, ngày thứ 11 và giai đoạn 11, ngày thứ 11 và giai đoạn 19, ngày thứ 11.

Fig.4 minh họa tốc độ nhân rộng của tế bào gốc của thai nhi (dòng #2b) với sự có mặt của các hỗn hợp khác nhau của các yếu tố sinh trưởng: (1): 20ng/ml PDGF-AA + 10ng/ml bFGF; (2): 20ng/ml PDGF-AA + 10ng/ml bFGF + 5ng/ml NT-3; (3): 20ng/ml PDGF-AA + 10ng/ml bFGF + 10ng/ml IGF-1 ; (4): 20ng/ml PDGF-AA + 10ng/ml bFGF + 5ng/ml NT-3 + 10ng/ml IGF-1. Tế bào được thu hoạch ở ngày thứ 11 của giai đoạn (P3D11) và đếm số lượng của các tế bào sống trong từng điều kiện. Sau đó, chúng được xử lý trong cùng điều kiện được sử dụng ở giai đoạn 3 với cùng mật độ tế bào. Tế bào được thu hoạch ở ngày thứ 8 của giai đoạn (P4D8) và đếm số lượng tế bào sống trong từng điều kiện (các tế bào này được thu hoạch trước khi chúng trở thành hợp dòng phụ bởi vì chúng bắt đầu tạo thành hình cầu). Điều kiện (4) là hiệu quả nhất ở giai đoạn 3 mà không phải ở giai đoạn 4. Điều kiện (3) là hiệu quả ở cả hai giai đoạn.

Fig.5 minh họa tác dụng của liều lượng cao PDGF-AA (00ng/ml) và 1-thioglyxerol với sự tăng sinh của tế bào gốc của thai nhi (dòng #2b); được nuôi cấy trong môi trường HFSCM1M1 với sự có mặt của các hỗn hợp các yếu tố sinh trưởng sau: (1): 20ng/ml PDGF-AA + 10ng/ml bFGF + 0ng/ml IGF-1 ; (2): 20ng/ml PDGF-AA + 0ng/ml bFGF + 10ng/ml IGF-1 + 50 μ M 1-thioglyxerol; (3): 100ng/ml PDGF-

AA + 10ng/ml bFGF + 10ng/ml IGF-1 ; (4): 100ng/ml PDGF-AA + 10ng/ml bFGF + 10ng/ml IGF-1 + 50 μ M 1-thioglyxerol; (5): 100ng/ml PDGF-AA + 10ng/ml bFGF + 50 μ M 1-thioglyxerol. Tế bào được thu hoạch ở ngày thứ 7 của giai đoạn 5(các tế bào này được thu hoạch trước khi chúng trở thành hợp dòng phụ trước khi chúng bắt đầu tạo thành hình cầu khi chúng ở giai đoạn 4) và đếm số lượng tế bào sống trong từng điều kiện. Hỗn hợp của 20ng/ml PDGF-AA + 10ng/ml bFGF cũng được thử nghiệm, nhưng số tế bào thu hồi được quá thấp để đánh giá (nhỏ hơn 1×10^4 dưới khoảng đếm được) và dữ liệu của nó được loại bỏ khỏi hình này. Điều kiện (1) có thể nhân rộng tế bào ở giai đoạn 3 nhưng không thể nhân rộng tế bào ở giai đoạn 5. Bổ sung 50 μ 1-thioglyxerol [điều kiện (2)] hoặc tăng nồng độ PDGF-AA đến 100ng/ml [điều kiện (3)] có rất ít hiệu quả tích cực đối với tốc độ nhân rộng. Khi bổ sung 50 μ M 1-thioglyxerol và tăng nồng độ PDGF-AA đến 100ng/ml kết hợp với [điều kiện (4)], tốc độ nhân rộng tế bào được cải thiện nhanh chóng và tế bào có thể nhân rộng thành công. Khi IGF-1 bị loại bỏ khỏi điều kiện này [điều kiện (5)], tốc độ nhân rộng giảm xuống <1 , chỉ ra rằng IGF-1 cũng thúc đẩy sự tăng sinh và/hoặc tồn tại của tế bào gốc của thai nhi.

Fig.6 minh họa đường cong sinh trưởng của tế bào gốc của thai nhi (Dòng #2b) (vòng tròn mở với đường màu đen). Tế bào gốc của thai nhi (Dòng #2b) lúc đầu được nuôi cấy trong 10ng/ml PDGF-AA và 10ng/ml bFGF. 10ng/ml IGF-1 được thêm vào từ giai đoạn 3. Nồng độ PDGF-AA được tăng từ 20ng/ml đến 100ng/ml từ giai đoạn 6. Tuy nhiên, chúng có ít hoặc không có hiệu quả đối với tốc độ nhân rộng của tế bào. 50 μ M 1-thioglyxerol được thêm vào từ giai đoạn 7. Tế bào gốc của thai nhi (Dòng #2b) bắt đầu sinh trưởng nhanh chóng với 100ng/ml PDGF-AA, 10ng/ml bFGF, 10ng/ml IGF-1 và 50 μ 1-thioglyxerol. 10ng/ml NT-3 được thêm vào ở giai đoạn 17. NT-3 làm tăng sự sinh trưởng của tế bào một chút nhưng hiệu quả của nó biến mất sau một giai đoạn. Bảng này còn bao gồm đường cong sinh trưởng của tế bào gốc của thai nhi (Dòng #2b) (P10 ngày 6: vòng tròn mở với đường nét đứt) và ngày thứ 11 của giai đoạn 11 (P11 ngày 11 : vòng tròn mở với đường chấm). Tế bào được đông lạnh có thể nhân rộng ở tốc độ tương tự sau khi rã đông.

Fig.7 minh họa sự biệt hóa tự phát của tế bào gốc của thai nhi trong môi trường huyết thanh trong hình từ A đến F. Hình A và B là các hình ảnh tương phản theo pha được chụp bằng kính hiển vi ngược minh họa sự thay đổi hình thái của tế bào gốc của

thai nhi (dòng #2b) ở giai đoạn 12, ngày thứ 9 (Fig.7, hình A & B) sau khi được nuôi cấy trong môi trường HFSCM1M1 được bổ sung 20ng/ml PDGF-AA, 10ng/ml bFGF, 10ng/ml IGF-1 và 50 μ M 1-thioglycerol (Fig.7, hình A) hoặc không có 1-thioglycerol (Fig.7, hình B). Tế bào gốc của thai nhi biệt hóa tự phát mà không bổ sung bFGF giữa môi trường thay đổi. Thậm chí trong cùng điều kiện, tế bào gốc của thai nhi không biệt hóa nếu bFGF được bổ sung mỗi ngày và dường như sinh trưởng chậm chạp. Ngoài ra, tế bào gốc của thai nhi được phong bế để biệt hóa và tạo thành cụm khi 40ng/ml hoặc cao hơn chất PDGF-AA được sử dụng. Bằng cách giảm nồng độ PDGF-AA từ 100ng/ml xuống 20ng/ml và không bổ sung bFGF, tế bào có thể được biệt hóa tự phát thành tế bào đa phân cực mang quá trình với hình thái giống như mạng nhện, mà biểu hiện kháng nguyên 04 (Fig.7, hình C & D) và/hoặc kháng nguyên GalC (Fig.7, hình E & F), một đặc điểm xác định của dòng tế bào thần kinh đệm ít gai-[ví dụ, tiền nguyên bào thần kinh đệm ít gai (O4-dương tính và GalC-âm tính), tế bào thần kinh đệm ít gai chưa trưởng thành (O4-dương tính và GalC- dương tính)].

Fig.8 là hình ảnh đối pha được chụp bằng kính hiển vi ngược pha minh họa hình thái của tế bào gốc của thai nhi (dòng #3) ở các giai đoạn khác nhau. Tế bào gốc thần kinh thông thường lúc đầu mở rộng với sự có mặt của bFGF và EGF trong 15 ngày (xem Fig.8, hình A ở ngày thứ 15 của giai đoạn 0). Sau đó, tế bào được nuôi cấy trong môi trường HFSCM1M1 với 20ng/ml PDGF-AA và 10ng/ml bFGF trong máy ủ duy trì ở 37°C, 5% O₂, và 5% CO₂. Nồng độ PDGF-AA được tăng đến 100ng/ml và 10ng/ml của IGF-1 được thêm vào từ giai đoạn 4 (xem Fig.9). 50 μ M 1-thioglycerol được thêm vào từ giai đoạn 8 (xem Fig.9). Hình thái của chúng hầu như trở nên giống hệt với dòng #2b sau một vài giai đoạn.

Fig.9 thể hiện đường cong sinh trưởng của tế bào gốc của thai nhi (Dòng #3) (đường tròn mở với nét màu đen). Tế bào gốc của thai nhi (Dòng #3) ban đầu được nuôi cấy với sự có mặt của 10ng/ml EGF và 10ng/ml bFGF để nhân rộng tế bào gốc thần kinh thông thường. Sau đó, hỗn hợp yếu tố sinh trưởng được thay đổi thành 20ng/ml của PDGF-AA và 10ng/ml bFGF từ giai đoạn 1. Thêm 10ng/ml IGF-1 và 10ng/ml NT-3 vào từ giai đoạn 2. Dựa trên các dữ liệu được thể hiện ở Fig.4, NT-3 được loại bỏ từ nuôi cấy này và tăng nồng độ PDGF-AA từ 20ng/ml đến 100ng/ml từ giai đoạn 4. Tuy nhiên, chúng có rất ít hoặc không có hiệu quả đối với tốc độ nhân rộng của tế bào như được thể hiện trong dòng #2b. 50 μ M 1-thioglycerol được thêm

vào từ giai đoạn 5, và sau đó tế bào gốc của thai nhi (Dòng #3) bắt đầu sinh trưởng nhanh chóng với sự có mặt của 100ng/ml PDGF-AA, 10ng/ml bFGF, 10ng/ml IGF-1 và 50 μ M 1-thioglyxerol như tế bào gốc của thai nhi (Dòng #2b). Bảng này cũng bao gồm các đường cong sinh trưởng của tế bào gốc của thai nhi (Dòng #3) được đông lạnh ở ngày thứ 7 của giai đoạn 10 (P10 Ngày 7: đường tròn mở với đường nét đứt). Tế bào được đông lạnh có thể được nhân rộng với tốc độ tương tự sau khi rã đông.

Fig.10 là hình ảnh đối pha được chụp bằng kính hiển vi ngược pha minh họa hình thái của tế bào gốc của thai nhi (dòng 4A và 4B) ở các giai đoạn khác nhau trong các hình từ A đến F. Tế bào được nuôi cấy trong môi trường HFSCM1M1 và 50 μ M 1-thioglyxerol với 20ng/ml PDGF-AA, 20ng/ml bFGF và 20ng/ml của IGF-1 (dòng #4A) hoặc 00ng/ml PDGF-AA, 20ng/ml bFGF và 20ng/ml của IGF-1 (dòng #4B) trong máy ủ duy trì ở nhiệt độ 37°C, 5% O₂, và 5% CO₂. Ban đầu, dòng #4A sinh trưởng chậm hơn dòng #4B nhưng bắt đầu sinh trưởng ở cùng tốc độ như dòng #4B từ giai đoạn 2. Chúng trở nên gần như đồng nhất và hình thái của chúng trở nên gần giống với dòng #2b hoặc #3 sau 3 giai đoạn.

Fig.11 thể hiện đường cong sinh trưởng tế bào gốc của thai nhi (Dòng #4A: hình vuông mở với đường nét đứt và #4B: hình tròn mở với đường màu đen). Tế bào gốc của thai nhi (Dòng #4A) được nuôi cấy với sự có mặt của 20ng/ml của PDGF-AA, 20ng/ml bFGF, 20ng/ml, IGF-1 và 50 μ M 1-thioglyxerol. Tế bào gốc của thai nhi (Dòng #4B) được nuôi cấy với sự có mặt của 100ng/ml của PDGF-AA, 20ng/ml bFGF và 20ng/ml IGF-1 và 50 μ M 1-thioglyxerol. Số lượng tế bào của cả hai dòng lúc đầu giảm xuống nhanh chóng và tốc độ giảm này nổi bật hơn ở dòng #4A. Sau tốc độ giảm của số lượng tế bào ban đầu này, chúng nhanh chóng bắt đầu nhân rộng. Bảng này cũng bao gồm đường cong sinh trưởng của tế bào gốc của thai nhi (Dòng #4B) được đông lạnh ở ngày thứ 6 của giai đoạn (P5 Ngày 6: hình tròn mở với đường nét đứt).

Fig.12 minh họa kiểu hình miễn dịch của tế bào gốc của thai nhi không được biệt hóa trong cách hình từ A đến S; (dòng #2b, giai đoạn 12-16) được nuôi cấy với sự có mặt của 100ng/ml PDGF-AA, 10ng/ml bFGF, 10ng/ml IGF-1, và 50 μ M 1-thioglyxerol, và làm biến màu dương tính cho hoặc CD133, Sox2, Nestin, Olig2, PDGF-Ra, NG2, A2B5, PSA-NCAM, GFAP hoặc Vimentin. DAPI được sử dụng để phản chất nhuộm nhân tế bào. Các hình này chỉ ra ít nhất 90% tế bào là dương tính cho CD133, Sox2, Nestin, Olig2, PDGF-Ra, NG2, A2B5 và vimentin nhưng không có tế

bào GFAP dương tính. Sự biến màu của PSA-NCAM là hơi yếu nhưng vẫn còn hơn 90% tế bào trông dương tính cho PSA-NCAM.

Fig.13, trong hình từ A đến H, thể hiện dữ liệu đếm tế bào chảy minh họa tỷ lệ tế bào gốc của thai nhi không được biệt hóa (dòng #2b, giai đoạn 13). Các biểu đồ đường kẻ đen thể hiện đối chứng isotyp và các biểu đồ màu xám thể hiện từng kháng nguyên được thử nghiệm. Dữ liệu này chỉ ra rằng hầu hết các tế bào gốc của thai nhi là CD133-dương tính (Fig.13, hình A), CD9-dương tính (Fig.13 hình B), CD140a-dương tính (Fig.13, hình C), NG2-dương tính (Fig.13, hình D), A2B5 dương tính (Fig.13, hình E), O4-dương tính (Fig.13, hình F), và PSA-NCAM-dương tính (Fig.13, hình G). Khi được thử nghiệm bằng hóa học miễn dịch tế bào (dữ liệu không được minh họa), CD44 là âm tính (Fig.13, hình H).

Fig.14 minh họa kiểu hình miễn dịch tế bào gốc của thai nhi được biệt hóa (dòng #3, giai đoạn 15) được nuôi cấy trong môi trường chứa huyết thanh trong 31 và được nhuộm với các kháng thể mà nhận ra tế bào thần kinh (β III Tublin, Sợi thần kinh-L, và MAP2), tế bào thần kinh đệm ít gai (O4, MBP) và tế bào hình sao (GFAP), tiếp đó là kháng thể thứ cấp huỳnh quang. DAPI được sử dụng để phản chất nhuộm nhân tế bào. Tế bào gốc của thai nhi có thể biệt hóa thành tế bào dương tính cho mỗi chỉ thị phân tử. Để đánh giá sự đồng định vị của tế bào thần kinh axon và myelin, tế bào được cùng nhuộm màu với chất kháng thể kháng β III Tublin và kháng MBP kháng thể (Fig.14, hình A-C), kháng thể kháng Sợi thần kinh-L và kháng thể kháng MBP (Fig.14, hình D-F), kháng thể kháng MAP2 và kháng thể kháng MBP (Fig.14, hình G-I). Chỉ một vài tế bào thần kinh axon và myelin dường như được đồng định vị. Để đánh giá sự đồng định vị của kháng nguyên và MBP, tế bào được cùng nhuộm màu với kháng thể O4 và kháng thể kháng MBP (Fig.14, hình J-L). Hầu hết các chỉ thị phân tử của MBP được đồng định vị với chỉ thị phân tử của kháng nguyên O4. Tế bào gốc của thai nhi cũng có thể biệt hóa thành tế bào hình sao mà dương tính với kháng nguyên GFAP (Fig.14, hình M-O). Ngoài ra, nhiều tế bào dương tính với vimentin mà được biểu hiện trong nhiều tế bào biểu mô bao gồm tế bào hình sao và tế bào mô giữa. Hơn nữa, tế bào không được biệt hóa cũng dương tính với vimentin (dữ liệu không được minh họa).

Fig.15 minh họa khả năng biệt hóa của tế bào gốc của thai nhi (dòng #2b, giai đoạn 15) trong hình A-E. Tế bào được biệt hóa trong DMEM/F12 chứa glutamin và

HEPES và được bổ sung với chất bổ sung B27, chất bổ sung N2 và 50 μ M 1-thioglycerol với 10ng/ml PDGF-AA, 100ng/ml IGF-1, 10ng/ml BDNF, và 100 μ M pCPT-cAMP. Tế bào được nhuộm màu với kháng thể kháng GD3 kháng thể và kháng thể O4 tiếp theo kháng thể chuyển hóa huỳnh quang sau 4 ngày biệt hóa. Tế bào không được biệt hóa biểu hiện GD3 mạnh hơn tế bào sinh sản tế bào thần kinh đệm ít gai và O4 ngược lại (đầu mũi tên của Fig.15, hình A, B và C minh họa các tế bào không được biệt hóa). Hầu hết các tế bào biệt hóa chỉ ra hình thái đa phân cực với tín hiệu GD3 yếu và O4 khỏe, chỉ ra chúng là tế bào sinh sản của tế bào thần kinh đệm ít gai hay tiền nguyên bào thần kinh đệm ít gai. Các loại tế bào khác (ví dụ tế bào hình sao và tế bào thần kinh) được xác định như một quần thể của tế bào GD3 âm tính và O4 âm tính. Fig.15, hình D minh họa tỷ lệ của mỗi quần thể tế bào từ 10 hình ảnh khác nhau của các tế bào được biệt hóa. Hơn 70% của toàn bộ tế bào được biệt hóa thành tế bào sinh sản tế bào thần kinh đệm ít gai (75,8% $\pm$ 2,09%). Hơn 20% của toàn bộ tế bào là các tế bào không được biệt 23,5% $\pm$ 2,03%). Loại tế bào khác là ít hơn 1% của toàn bộ tế bào (0,7% $\pm$ 0,41 %). Tỷ lệ của tế bào sinh sản tế bào thần kinh đệm ít gai và các loại tế bào khác để biệt hóa tế bào (tế bào sinh sản tế bào thần kinh đệm ít gai sinh sản cộng với các loại tế bào khác) được tính toán và minh họa trong Fig.15, hình E. Tế bào sinh sản của tế bào thần kinh đệm ít gai chiếm 99,1% $\pm$ 0,56% của các tế bào không được biệt hóa trong khi các loại tế bào khác chiếm 0,9% $\pm$ 0,56% của tế bào được biệt hóa.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp nuôi cấy và nhân rộng tế bào gốc thần kinh và tế bào sinh sản thần kinh được phân lập từ hệ thần kinh trung ương của động vật có vú để sản xuất ra quần thể thuần chủng hoặc được làm giàu của tế bào gốc thần kinh hoặc tế bào sinh sản thần kinh có khả năng biệt hóa thành tế bào thần kinh đệm ít gai hoặc tế bào dòng thần kinh đệm ít gai *in vitro*. Cả tế bào gốc thần kinh và tế bào sinh sản thần kinh đều sản sinh ra thế hệ con mà hoặc là tế bào thần kinh (như là sinh sản tế bào thần kinh trưởng thành) hoặc tế bào thần kinh đệm bao gồm tế bào hình sao và tế bào thần kinh đệm ít gai. Trong khi tế bào gốc thần kinh có thể tự phục hồi (ví dụ, có thể tăng sinh vô thời hạn), tế bào sinh sản thần kinh có thể, nhưng không nhất thiết, có khả năng tự phục hồi. Phương pháp nuôi cấy của sáng chế này có thể sinh ra quần thể tế bào được nhân rộng mà có thể biệt hóa thành ít nhất 70%, 80%, 90% hoặc 95% của tế

bào dòng thần kinh đệm ít gai, mà là sinh sản tế bào thần kinh đệm ít gai và tế bào thần kinh đệm ít gai, của tế bào được biệt hóa.

Các chữ viết tắt và định nghĩa sau được sử dụng trong sáng chế này:

Thuật ngữ "tế bào gốc của thai nhi" hoặc tế bào thu được từ tủy sống thai nhi, đề cập đến quần thể thuần chủng hoặc được làm giàu của tế bào gốc thần kinh được nhân rộng của động vật có vú và/hoặc tế bào sinh sản thần kinh được mô tả trong sáng chế này.

Thuật ngữ "môi trường HFSCM1" đề cập đến DEM/F12 chứa glutamin và HEPES và được bổ sung chất bổ sung B27 (Invitrogen™), axit amin không thiết yếu (NEAA) (Invitrogen™), 1,5mM pyruvat (Invitrogen™), 55μM β-merxaptoetanol (Invitrogen™), và 1mM N-acetyl-L-cysteine (Sigma) trong hỗn hợp.

Thuật ngữ "tế bào thần kinh đệm" đề cập đến các tế bào không phải là tế bào thần kinh của hệ thần kinh trung ương và bao gồm tế bào thần kinh đệm ít gai trưởng thành, tế bào hình sao và tế bào sinh sản có liên quan đến một hoặc cả hai loại tế bào này.

Thuật ngữ "tế bào sinh sản đa năng" đề cập đến tế bào sinh sản thần kinh có khả năng tăng nhân tế bào, nhưng giới hạn số lượng, dòng.

"Pluripotency" (có nguồn gốc từ tiếng Latin "plurimus" hoặc "very many" và "potentia" hoặc "powered") đề cập đến tế bào gốc có khả năng biệt hóa thành một trong ba lớp mầm bất kỳ: nội bì (lớp lót bên trong dạ dày, dạ dày ruột và phổi), trung bì (cơ, xương, máu, niệu sinh dục), hoặc ngoại bì (mô biểu bì và hệ thần kinh). Tế bào gốc thần kinh là đa năng và không toàn năng. Tế bào gốc phôi là toàn năng và không đa năng.

"Tế bào sinh sản có liên quan" là tế bào sinh sản mà có liên quan, hoặc được trù định trước, để trở thành loại tế bào trưởng thành đặc hiệu. Điều này trái với tế bào sinh sản toàn năng hoặc đa năng, mà có khả năng trở thành một trong hai hoặc nhiều loại tế bào trưởng thành (như tế bào sinh sản O-2A mà có thể trở thành tế bào thần kinh đệm ít gai hoặc tế bào hình sao typ 2, phụ thuộc vào yếu tố môi trường và thời gian).

"Tế bào thần kinh đệm ít gai" là loại tế bào thần kinh đệm có chức năng chính là cách ly các trục tế bào thần kinh trong hệ thần kinh trung ương của một vài động vật có xương sống.

Thuật ngữ "tế bào dòng thần kinh đệm ít gai" đề cập đến tế bào thần kinh đệm ít gai, tiền nguyên bào thần kinh đệm ít gai và sinh sản tế bào thần kinh đệm ít gai (ví dụ, sinh sản O2A). Thuật ngữ này không bao gồm các tiền chất giới hạn thần kinh đệm ít gai hoặc tế bào gốc thần kinh.

Thuật ngữ "tế bào sinh sản thần kinh đệm ít gai" và "sinh sản tế bào thần kinh đệm ít gai" được sử dụng luân phiên trong sáng chế này và đề cập đến các tế bào liên quan đến việc tạo thành nhiều tế bào sinh sản và/hoặc thế hệ con là tế bào thần kinh đệm ít gai với sự có mặt tế bào thần kinh hoặc mô không thuộc hệ thần kinh. Trừ khi có quy định khác, chúng có thể, nhưng không nhất thiết, có khả năng tạo thành các tế bào thần kinh đệm khác (như tế bào hình sao typ 2). Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ này không bao gồm tiền sinh sản tế bào thần kinh đệm ít gai hoặc tiền chất giới hạn thần kinh đệm (xem Fig.1).

"Tiền sinh sản tế bào thần kinh đệm ít gai" là tế bào tiền thân của sinh sản tế bào thần kinh đệm ít gai.

"Tiền nguyên bào thần kinh đệm ít gai" là tế bào tiền thân đến tế bào thần kinh đệm ít gai sau nguyên phân.

Tế bào đang nhân rộng trong nuôi cấy nghĩa là tăng số lượng tế bào xuất hiện trong môi trường nuôi cấy chứa chất bổ sung kích thích sự tăng sinh tế bào.

"Tốc độ nhân rộng" tế bào đề cập đến số lượng tế bào vào ngày đặc biệt được phân chia do số tế bào ban đầu lúc khởi đầu của nuôi cấy.

Tế bào sinh sản "được nhân rộng" hoặc tế bào gốc thần kinh được sử dụng ở đây đề cập đến tế bào sinh sản thần kinh hoặc tế bào gốc thần kinh thu được từ tế bào sinh sản thần kinh được phân lập hoặc tế bào gốc thần kinh được tăng sinh *in vitro*, sinh ra quần thể tế bào được nhân rộng.

Tế bào "đang phân đoạn" (còn được biết là tế bào "đang nuôi cấy cấp hai" hoặc tế bào "đang phân tách") đề cập đến kỹ thuật duy trì khả năng ống và sinh trưởng trong điều kiện nuôi cấy trong phòng thí nghiệm trong khoảng thời gian kéo dài bằng

cách phân tách tế bào từ một tế bào khác (với enzym như là tryxin hoặc collagenaza và sau đó chuyển một lượng nhỏ tế bào vào bình nuôi cấy mới. Tế bào có thể được nuôi cấy trong thời gian lâu hơn nếu chúng được phân tách tại các khoảng cách đều đặn, bởi vì nó tránh sự lão hóa sớm kết hợp với mật độ tế bào cao kéo dài.

“Môi trường sinh trưởng” là môi trường trong đó các tế bào được quan tâm sẽ tăng sinh, biệt hóa và/hoặc trưởng thành *in vitro*. Các đặc điểm của môi trường bao gồm môi trường nuôi cấy tế bào, bất kỳ yếu tố sinh trưởng hoặc biệt hóa bao gồm các yếu tố có thể có mặt và hỗ trợ sự tạo thành (như là cơ chất trên bề mặt rắn) nếu có mặt.

Kỹ thuật chung

Phương pháp chung trong sinh học tế bào, hóa học protein và kỹ thuật kháng thể có thể được tìm thấy trong Current Protocols in Protein Science (J.E. Colligan et al., eds., Wiley & Sons); Current Protocols in Cell Biology (J.S. Bonifacino et al., Wiley & Sons) và Current Protocols in Immunology (J.E. Colligan et al. eds., Wiley & Sons). Phương pháp nuôi cấy tế bào được mô tả chung trong ấn bản hiện hành Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (R.I. Freshney etl, Wily & Sons); General Techniques of Cell Culture (M.A. Harrison & I.F. Rae, Cambridge Univ. Press). Nguồn cung cấp nuôi cấy mô và các chất phản có sẵn từ các nhà cung cấp thương mại như Chemicon®, Milipore®, R&D Systems®, Invitrogen™, Nalgene-Nunc™ International, Sigma-Aldrich™, và ScienCell.

Các sách tham khảo chuyên ngành liên quan tới sáng chế này bao gồm Principles of Neuroscience, 4th edition, Kandel et al. eds., McGraw-Hill 2000; CNS Regeneration: Basic Science và Clinical Advances, M. H. Tuszynski & J.H Khordower, eds., Academic Press, 1999; The Neuron: Cell and Molecular Biology, 3 rd edition, I. B. Levitan và L.K. Kaczmarek, Oxford U. Press, 2001 ; Glial Cells: Their Role in Behavior, P.R. Laming et al. eds., Cambridge U. Press 1998; The Functional Roles of Glial Cells in Health và Disease, Matsas & Tsacopoulos eds., Plenum Pub. Corp, 1999; Glial Cell Development, Jessen & Richardson eds., Oxford U. Press, 2001; và Man of Steel, Adrian Hill, 1996.

Trong văn cảnh của sự phát sinh cá thể tế bào, tính từ “được biệt hóa” là một thuật ngữ liên quan. Tế bào được biệt hóa là tế bào tiến triển dọc theo quá trình phát triển xa hơn tế bào đang được so sánh. Do đó, tế bào gốc thần kinh có thể biệt hóa

thành sinh sản giới hạn dòng. Các tế bào này lần lượt có thể biệt hóa thành tế bào xa hơn dọc theo quá trình hoặc để kết thúc giai đoạn tế bào được biệt hóa, như là tế bào thần kinh trưởng thành hoặc tế bào thần kinh đệm ít gai.

Tế bào được biệt hóa của sáng chế này có thể được mô tả đặc điểm theo liệu chúng biểu hiện các chỉ thị phân tử kiểu hình đặc trưng của tế bào thần kinh đệm ít gai. Các chỉ thị phân tử hóa học miễn dịch cơ bản của các tế bào này có thể xuất hiện tùy thuộc vào sự trưởng thành của quần thể tế bào sau đây:

Sox2: chỉ thị phân tử của tế bào gốc toàn năng và tế bào gốc thần kinh.

Nestin: chỉ thị phân tử của tế bào gốc thần kinh.

CD133: chỉ thị phân tử bề mặt tế bào của tế bào gốc thần kinh.

- Thụ quan PDGF an pha (PDGF-R α): chuỗi α của yếu tố sinh trưởng thu được từ tiểu cầu. Chỉ thị phân tử của tế bào thần kinh đệm ít gai và sinh sản của chúng.

CD140a: giống như PDGF-R α . Kháng thể CD140a nhận diện miền ngoại bào của PDGF-R α . Chỉ thị phân tử bề mặt tế bào của tế bào thần kinh đệm ít gai và sinh sản của chúng.

CD9: glucoprotein bề mặt tế bào được dùng để pha trộn integrin và các protein liên họ ngoại màng 4 khác. Chỉ thị phân tử bề mặt tế bào của tế bào gốc mầm, tế bào gốc thần kinh, tế bào thần kinh đệm ít gai, và tế bào gốc mô giữa.

PSA-NCAM: phân tử bám dính tế bào thần kinh đượ polysialyl hóa. Chỉ thị phân tử của bề mặt tế bào cho tiền chất giới hạn thần kinh (NRP), sinh sản tế bào thần kinh, nguyên bào thần kinh, và tiền sinh sản tế bào thần kinh đệm ít gai. Chỉ thị phân tử này là âm tính trong tiền chất giới hạn thần kinh đệm (GRP).

A2B5: chỉ thị phân tử của bề mặt tế bào của tiền chất giới hạn thần kinh đệm (GRP), tế bào sinh sản thần kinh đệm và tế bào thủy tế bào thần kinh đệm ít gai (OPC) và tế bào hình sao typ 2. Chỉ thị phân tử của bề mặt tế bào này là âm tính trong tiền chất giới hạn thần kinh (NRP).

NG2: chondroitin sulfat proteoglycan. Chỉ thị phân tử của bề mặt tế bào cho đại thực bào và tế bào sinh sản thần kinh đệm ít gai.

GD3: Gangliosit GD3. Chỉ thị phân tử của tiền sinh sản và sinh sản tế bào thần kinh đệm ít gai.

O4: chỉ thị phân tử của tế bào thần kinh đệm ít gai và sinh sản của chúng.

Galactocerebrosit C (GalC): chỉ thị phân tử cho tế bào thần kinh đệm ít gai chưa trưởng thành.

Myelin basic protein (MBP): chỉ thị phân tử cho tế bào thần kinh đệm ít gai trưởng thành.

CD44: glycoprotein bề mặt tế bào liên quan đến sự tương tác giữa các tế bào, sự bám dính tế bào và sự di trú và thụ quan của axit hyaluronic. Chỉ thị phân tử của bề mặt tế bào cho một vài tế bào biểu mô và tế bào dòng tế bào hình sao.

Glial fibrillary acidic protein (GFAP): chỉ thị phân tử cho tế bào hình sao.

β III Tubulin: chỉ thị phân tử cho sinh sản tế bào thần kinh và tế bào thần kinh.

Sợi thần kinh-L: chỉ thị phân tử cho tế bào thần kinh trưởng thành.

Microtubule-associated protein 2 (MAP2): chỉ thị phân tử cho tế bào thần kinh trưởng thành.

Các chỉ thị phân tử đặc hiệu có thể được phát hiện sử dụng bất kỳ kỹ thuật miễn dịch học thích hợp nào, như là hóa học tế bào miễn dịch chạy cho các chỉ thị phân tử của bề mặt tế bào, hoặc hóa mô miễn dịch (ví dụ, của các tế bào cố định hoặc các phần mô) cho các chỉ thị phân tử của bề mặt tế bào hoặc nội bào). Phương pháp cụ thể để phân tích đếm tế bào chảy được đề cập đến trong tài liệu Gallacher et al, Blood., 96:1740, 2000. Sự biểu hiện của kháng nguyên bề mặt tế bào được xác định là dương tính nếu lượng đáng kể kháng thể có thể được phát hiện sẽ bám vào kháng nguyên trong hóa học tế bào miễn dịch tiêu chuẩn hoặc thí nghiệm đếm tế bào chảy, không bắt buộc sau khi định hình tế bào, và không bắt buộc sử dụng kháng thể thứ cấp được đánh dấu hoặc tiếp hợp khác để đẩy mạnh việc đánh dấu. Để tạo điều kiện thuận lợi sử dụng trong nghiên cứu hoặc điều trị, thường cần thiết để tăng tối đa tỷ lệ tế bào trong quần thể có các đặc điểm của tế bào thần kinh đệm ít gai hoặc sinh sản của chúng. Có khả năng thu được quần thể tế bào có ít nhất 50%, 60%, 70%, 90% hoặc 95% tế bào dòng đặc hiệu, được xác định dương tính cho một hoặc hơn các đặc trưng của chỉ thị phân tử kiểu hình của các tế bào này.

Đối với các ứng dụng điều trị liên quan đến sự khôi phục chức năng tế bào thần kinh, nó là cần thiết để giảm thiểu khả năng của quần thể tế bào tạo ra các loại tế bào khác, đặc biệt là các tế bào gốc không được biệt hóa, và tế bào dòng không ngoại bì. Tùy vào ứng dụng, có thể là thuận lợi để giảm thiểu tỷ lệ tế bào dòng thần kinh và các sinh sản liên quan của chúng của dòng tế bào hình sao và sinh sản liên quan của chúng. Sự nhiễm bẩn của quần thể theo sáng chế này có nhỏ hơn 30%, 20%, 10% hoặc 5% nhiễm bẩn với các loại tế bào khác này.

Phương pháp của sáng chế này không thể tạo ra sự phát triển của toàn bộ sinh vật là người.

Phương pháp của sáng chế này đề cập đến việc nuôi cấy tế bào gốc thần kinh được phân lập và/hoặc tế bào sinh sản thần kinh từ hệ thần kinh trung ương của động vật có vú trong môi trường xác định mà cho phép nhân rộng tế bào qua nhiều giai đoạn. Tế bào được nuôi cấy sử dụng phương pháp của sáng chế này duy trì khả năng của chúng, thông qua việc nhân rộng, để biệt hóa tế bào dòng tế bào thần kinh đệm ít gai. Tế bào được nuôi cấy sử dụng phương pháp của sáng chế này có thể được phân đoạn thành hơn 6 lần và được nhân rộng hơn 1000 lần trong khi duy trì khả năng của chúng để lần lượt biệt hóa thành tế bào dòng tế bào thần kinh đệm ít gai. Trong một vài phương án, quần thể tế bào được nhân rộng thu được từ phương pháp nuôi cấy của sáng chế này bao gồm hoặc biệt hóa thành quần thể tế bào có ít nhất 30%, 50%, 70% hoặc 80% tế bào dòng thần kinh đệm ít gai của tế bào được biệt hóa trong điều kiện nuôi cấy loại bỏ huyết thanh. Trong phương án được ưu tiên, quần thể nuôi cấy tế bào được nhân rộng thu được từ phương pháp nuôi cấy của sáng chế này bao gồm ít nhất 90% tế bào dòng thần kinh đệm ít gai của tế bào được biệt hóa. Trong các phương án được ưu tiên, tế bào được nhân rộng là đa năng. Trong một vài phương án, phần lớn các tế bào được nhân rộng có khả năng biệt hóa thành tế bào dòng thần kinh đệm ít gai dựa trên nuôi cấy trong môi trường PDGF-AA giảm (Ví dụ, 20ng/ml PDGF-AA, ưu tiên với 10ng/ml bFGF có hoặc không 50 μ M 1-thioglycerol và không bắt buộc với ít nhất là 10ng/ml IGF-1) mà không bổ sung bFGF giữa môi trường thay đổi. Trong một vài phương án, phần lớn các tế bào được nhân rộng có khả năng biệt hóa thành tế bào dòng thần kinh đệm ít gai bằng cách nuôi cấy 10ng/ml của PDGF-AA, 100ng/ml IGF-1, 100 μ M pCPT-cAMP và 10ng/ml BDNF trong DMEM/F12 chứa glutamin và HEPES được bổ sung chất bổ sung B27, chất bổ sung N2 và 50 μ M 1-thioglycerol.

Tế bào gốc thần kinh được phân lập của động vật có vú và/hoặc tế bào sinh sản thần kinh của động vật có vú sử dụng trong sáng chế này được thu từ hệ thần kinh trung ương của động vật có vú, tốt hơn là động vật linh trưởng, nhưng không chỉ giới hạn ở người. Sinh sản tế bào thần kinh đậm ít gai và tiền sinh sản được biết tồn tại trong chất trắng của hệ thần kinh trung ương. Như vậy, các nguồn thích hợp để phân lập tế bào sử dụng trong sáng chế này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn thần kinh thị giác, thể chai, và tủy sống. Ngoài ra, tế bào gốc thần kinh được phân lập có thể thu được từ thai của động vật có vú, tốt hơn là thai động vật linh trưởng, như là nhưng không chỉ giới hạn đến thai nhi, bằng cách sử dụng phương pháp được biết đến trong lĩnh vực này. Trong một vài phương án, tế bào gốc được phân lập thu được từ mô tủy sống của thai nhi thu được từ cột sống của thai nhi. Trong phương án được ưu tiên, tế bào được phân lập sử dụng trong sáng chế này thu được từ tủy sống của thai nhi từ 8 đến 24 tuần tuổi, tốt hơn là từ 12 đến 18 tuần tuổi thai nhi. Cột sống thai nhi có thể được thu từ, ví dụ, mang tính chất thương mại qua các công ty như là Advanced Bioscience Resources, Inc. (Alameda, CA, USA) với giấy phép IRB và được bác sĩ đồng ý. Mô tủy sống có thể được lấy từ cột sống, với màng não và dây thần kinh ngoại vi được loại bỏ. Mô sau đó có thể được phân tách, rửa và đặt trong bình nuôi cấy chứa môi trường sinh trưởng cho phép tăng sinh tế bào.

Các bình nuôi cấy thích hợp có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bình nuôi cấy với bề mặt nuôi cấy có một hoặc một hỗn hợp axit poly-amin (ví dụ, poly-lysin và/hoặc poly-ornitin), bề mặt và chất dẻo nuôi cấy mô được xử lý với laminin, vitronectin hoặc fibronectin. Thông thường, tế bào có thể được đặt với mật độ nằm trong khoảng từ 10^4 đến 10^5 tế bào/cm², tốt hơn là với mật độ khoảng 3×10^4 đến 5×10^4 tế bào/cm². Poly-ornitin hoặc poly-lyxin có thể được sử dụng để phủ bình nuôi cấy như đã được báo cáo trước đây (Raff et al, J. Neurosci., 3:1289, 1983; Raff et al, Nature., 303:390, 1983; Protocols for Neural Cell Culture, 3rd edition, Humana Press, Inc.). Bình nuôi cấy có thể được phủ từ 1 đến 40 pg/ml poly-ornitin, tốt hơn là 2 đến 20 pg/ml, tốt hơn nữa là 5 đến 15 pg/ml. Độ mạnh của sự gắn kết tế bào có thể phụ thuộc vào nhà cung cấp, biến đổi bề mặt, định dạng và nhiều bình nuôi cấy cụ thể. Nồng độ tối ưu của vật liệu phủ có thể được xác định cho mỗi nguồn gốc của bình nuôi cấy sử dụng phương pháp được biết đến trong lĩnh vực này. Trong một vài phương án, tiến hành ủ hai giờ với 10 pg/ml poly-ornitin hoặc poly-lysin phủ bình, ví

dụ, từ BD Falcon (Sparks, MD, USA). Trong một vài phương án, tiến hành ủ 30 phút với 5pg/ml poly-ornitin hoặc poly-lysin để phủ bình, ví dụ, từ Nalgen Nunc International (Rochester, NY, USA).

Tế bào thần kinh được phân lập và/hoặc tế bào sinh sản thần kinh thu được từ hệ thần kinh trung ương của động vật có vú được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy không có huyết thanh được xác định hóa học xác định hóa học mà cho phép nhân rộng tế bào mà không thúc đẩy sự biệt hóa tế bào (ví dụ, thành tế bào thần kinh, tế bào hình sao hoặc tế bào thần kinh đệm ít gai). Môi trường nuôi cấy bao gồm môi trường cơ sở như, nhưng không chỉ giới hạn ở, Môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium): hỗn hợp dinh dưỡng F-12, 1:1 (DMEM/F12) (Invitrogen®) (ví dụ, Iscove's Modified Dulbecco's Medium, RPMI-1640 và Neurobasal). Môi trường cơ sở có thể được bổ sung các thành phần khác nhau để hỗ trợ sức khỏe và sự tồn tại của tế bào. Các thành phần này có thể bao gồm, nhưng chỉ giới hạn ở, ít nhất 0,25% axit amin không thiết yếu [NEAA (Invitrogen®)- dung dịch 1% chứa 100µM L-Alanin, L-Asparagin H₂O, axit L-Aspartic, axit L-Glutamic, Glyxin, L-Prolin, và L-Serin], ít nhất là 1,0mM glutamin, 0,5mM pyruvat, chất bổ sung B27 1% (Invitrogen®), ít nhất là 0,1mM N-acetyl-cystein và/hoặc là 10µM β-merxaptoetanol. Trong một vài phương án, môi trường cơ sở có thể bao gồm NS21 (như được bộc lộ trong Y. Chen et al., J. Neurosci. Methods., 171 :239, 2008) thay cho chất bổ sung B27. Chất bổ sung B27 chứa albumin huyết thanh bò, transferin, insulin, progesteron, corticosteron, triiodo-l-thyronin, retinol axetat, DL tocopherol, DL tocopherol axetat, Biotin, axit Linoleic, axit Linolenic, etanolamin, Na Selenit, L-carnitin, glutathione bị khử, catalaza, superoxit dismutaza, D-galactozavà putresxin. Invitrogen đã bộc lộ thành phần của nó nhưng không bộc lộ nồng độ của chúng. Tuy nhiên, nồng độ của mỗi thành phần này có công thức nguyên gốc của chúng, chất bổ sung B18, được bộc lộ. NS21 được phát triển dựa trên thông tin này và nồng độ của mỗi gradient được bộc lộ. Nó có hiệu quả trong nuôi cấy thần kinh tốt như chất bổ sung B27. Ngoài ra, NS21 có thể được sử dụng để nuôi cấy tế bào gốc thần kinh và sinh sản tế bào thần kinh đệm ít gai thu được từ tế bào gốc của phôi của người. Do đó, chất bổ sung này được cho là một ứng viên tốt thay thế cho chất bổ sung B27. Trong phương án được ưu tiên, môi trường nuôi cấy bao gồm chất bổ sung DMEM/F12 được bổ sung 1-4mM, tốt hơn nữa là 2,5mM glutamin; 10-25mM, 15mM HEPES; 0,5-2,0mM, 1mM pyruvat; 1 đến 4%, tốt hơn là

chất bổ sung B27 2%; 0,25-3%, tốt hơn là NEAA1%; 1-200 pM, tốt hơn là 50 μ M 1-thioglycerol; 0,1-3mM, tốt hơn là 1mM N-acetyl-cysteine; và/hoặc 10-100 μ M, tốt hơn là 55 pM β -mercaptoethanol.

Ngoài ra, oxy có thể thúc đẩy sự biệt hóa của các tế bào sinh sản thần kinh. Do đó, để làm giảm sự biệt hóa tế bào, các tế bào này có thể được nuôi cấy trong môi trường sinh trưởng 1-20% O₂. Trong phương án được ưu tiên, các tế bào được nuôi cấy trong bình nuôi cấy trong máy ủ ở 37°C, môi trường sinh trưởng 1-10%, tốt hơn là 5% O₂, 5% CO₂. Sau khi tạo tế bào gốc của thai nhi, hiệu quả của nồng độ oxy được đánh giá nhưng không có sự tăng tế bào được biệt hóa trong điều kiện 20% O₂ so với điều kiện 5% CO₂ trong điều kiện nuôi cấy để nhân rộng tế bào gốc của thai nhi. Sự sinh trưởng của tế bào gốc của thai nhi trong điều kiện 5% O₂ nhanh hơn một chút so với trong điều kiện 20% O₂. Oxy là nguyên nhân của cơ chế oxy hóa và đã biết để kích thích đột biến p53 trong các tế bào của động vật gặm nhấm. Để làm giảm nguy cơ đột biến, sáng chế duy trì nuôi cấy tế bào gốc của thai nhi trong điều kiện 5% O₂.

Tế bào gốc thần kinh và/hoặc tế bào sinh sản thần kinh được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy còn chứa các yếu tố sinh trưởng để kích thích sự tăng sinh để phân lập tế bào. Môi trường nuôi cấy có thể chứa ít nhất là 5, 10, 20 hoặc 40ng/ml yếu tố sinh trưởng thu được từ tiểu cầu-AA (PDGF-AA), ít nhất là 2,5, 5 hoặc 10ng/ml FGF cơ bản (bFGF), và/hoặc ít nhất là 10, 25 hoặc 50 μ M 1-thioglycerol để phân lập tế bào. Trong một số phương án, môi trường nuôi cấy còn bao gồm ít nhất 1, 5 hoặc 10ng/ml yếu tố sinh trưởng giống như insulin (IGF-1). Trong một số phương án, PDGF-AA có thể được thay thế bằng PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, hoặc PDGF-DD. Trong một số phương án, bFGF có thể được thay thế bằng thành phần khác của yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi (ví dụ, FGF-4 hoặc FGF-9). Trong một số phương án, IGF-1 có thể được thay thế bằng IGF-2. Trong phương án được ưu tiên, môi trường nuôi cấy chứa 40-60 μ M 1-thioglycerol, 40-200ng/ml PDGF-AA, 5-100ng/ml bFGF, và 5-100ng/ml IGF-1 để phân lập tế bào.

Tế bào gốc thần kinh và/hoặc tế bào sinh sản thần kinh được phân lập được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy còn chứa các yếu tố sinh trưởng để kích thích sự tăng sinh sau khi phân lập tế bào. Môi trường nuôi cấy có thể chứa ít nhất là 1, 2, hoặc 5ng/ml yếu tố sinh trưởng thu được từ tiểu cầu-AA (PDGF-AA), ít nhất là 0,5, 1 hoặc 5ng/ml FGF cơ sở (bFGF), và/hoặc ít nhất là 10, 25 hoặc 50 μ M 1-thioglycerol để nhân

rộng tế bào. Trong một số phương án, môi trường nuôi cấy còn bao gồm ít nhất 1, 2 hoặc 5ng/ml yếu tố sinh trưởng giống như insulin-1 (IGF-1). Trong phương án được ưu tiên, môi trường nuôi cấy chứa 40-60 μ M 1-thioglycerol, 5-100ng/ml PDGF-AA, 1-50ng/ml bFGF, và 5-100ng/ml IGF-1 để nhân rộng tế bào sau khi phân lập tế bào gốc của thai nhi.

Tế bào gốc thần kinh được phân lập và/hoặc tế bào sinh sản thần kinh sinh trưởng trong điều kiện của sáng chế này bộc lộ thời gian nhân đôi từ 15 đến 20 giờ. Trong phương án được ưu tiên, thời gian nhân đôi nằm trong khoảng 60 đến 100 giờ. Tế bào có thể tiếp tục tốc độ tăng sinh qua ít nhất các giai đoạn 8, 11, 14 hoặc 17. Tế bào có thể được nhân rộng ít nhất 100, 250, hoặc tốt hơn là ít nhất 500 lần trên tháng. Trong phương án được ưu tiên, tế bào được nuôi cấy sử dụng phương pháp của sáng chế này bộc lộ tốc độ nhân rộng >1 trong hơn 18 giai đoạn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 - Nhân rộng và nuôi cấy tế bào gốc của thai nhi; xác định yếu tố sinh trưởng và môi trường cơ sở

Một vài chất bổ sung và môi trường được thử nghiệm trong thí nghiệm sơ bộ sử dụng tế bào gốc của thai nhi thu được từ tủy sống thai nhi 12 tuần tuổi, mà thu được từ Advanced Bioscience Resources, Inc. (Alameda, CA, USA) với sự đồng ý của người cho. Lúc đầu, tế bào được nuôi cấy trong DMEM: F-12 (1 :1) (DMEM/F12) (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) được bổ sung với 2mM glutamin (Invitrogen™), 1mM pyruvat (Invitrogen™) và chất bổ sung B27 2% (Invitrogen™). Các yếu tố sinh trưởng khác nhau được kiểm tra liệu chúng có kích thích sự sinh trưởng của tế bào gốc của thai nhi. Các yếu tố hiệu quả nhất là hỗn hợp của PDGF-AA và bFGF. Tế bào có thể sinh trưởng với sự có mặt của PDGF-AA và bFGF nhưng thể hiện không bào và trông không khỏe mạnh. Một vài chất bổ sung được thử nghiệm và nó được quan sát thấy rằng DMEM/F12 được bổ sung với NEAA 1% thêm vào 2mM glutamin, 1mM pyruvat và chất bổ sung B27 2% có thể giảm không bào và tăng nhẹ số lượng tế bào. Các chất bổ sung khác bao gồm 1mM N-acetyl-cysteine (Sigma-Aldrich™, St. Louis, MO, USA) và 55 μ M β -mercaptoethanol (Invitrogen™) dường như cải thiện trạng thái của tế bào nhưng không tiêu biểu với NEAA (dữ liệu không được hiển thị). Do vậy, DMEM/F12 được bổ sung với 2mM glutamin, 1mM pyruvat, chất bổ sung B27 2%,

NEAA 1%, 1mM N-acetyl-cystein và 55 μ M β -mercaptoethanol được xác định như môi trường cơ sở tối ưu được sử dụng sau đó để nuôi cấy tế bào gốc của thai nhi.

Tủy sống của thai nhi 15 tuần tuổi được lấy từ cột sống, với dây thần kinh ngoại vi và màng não được loại bỏ. Sau đó mô được phân tách bằng Accutaza và được rửa và tế bào thu được từ tủy sống thai nhi được đặt trong bình nuôi cấy chứa môi trường sinh trưởng sau đây: DMEM/F12 chứa 2,5mM glutamin và 15mM HEPES, chất bổ sung B27 2%(Invitrogen™), NEAA 1%, 1,5mM pyruvat (Invitrogen™), 55 μ M β -mercaptoethanol (Invitrogen™), 1mM N-acetyl-L-cystein (Sigma- Aldrich™™), 20ng/ml PDGF-AA (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) và 10ng/ml bFGF (R&D Systems). Tế bào sau đó được đặt trong máy ủ duy trì ở 37°C, 5% O₂, và 5% CO₂. bFGF (10ng/ml) được thêm vào môi trường nuôi cấy hàng ngày. Môi trường được thay đổi mỗi 2 đến 3 ngày trong suốt giai đoạn. Dựa vào các thí nghiệm sơ bộ, các tế bào đang sinh trưởng không quá nhiều với sự có mặt của PDGF-AA và bFGF và nhiều tế bào dừng tăng sinh hoặc chết trong vòng một vài tuần. Kết quả này có vẻ hợp lý bởi vì PDGF- α biểu hiện tế bào thường nhỏ hơn 5% của tế bào. Để loại bỏ tế bào không dễ phản ứng với PDGF-AA và bFGF, tế bào được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy bám dính siêu thấp (Corning Inc., Corning, NY, USA). Tế bào dễ phản ứng với PDGF-AA và bFGF tạo ra hình cầu (xem, Fig.3, hình A) trong khi các tế bào không dễ phản ứng với chúng không tạo ra hình cầu. Các hình cầu được tập hợp ở tốc độ ly tâm chậm hơn (300 vòng/phút để thu các hình cầu và 1.000 vòng/phút để thu các tế bào đơn) để thay đổi môi trường và phân đoạn. Sau 9 ngày, tế bào được thu hoạch và được phân đoạn trên bình nuôi cấy phủ poly-ornithin. Sau giai đoạn này, tế bào được phân đoạn mỗi 7 đến 14 ngày. Tế bào bộc lộ kiểu hình không đồng nhất ở giai đoạn đầu này (xem, Fig.3, các hình B và C) và nhiều tế bào dừng tăng sinh trong vòng 1 tháng. Tốc độ tăng sinh trở nên chậm hơn theo thời gian và thậm chí tế bào không nhân rộng. Ngoài ra, tế bào bắt đầu xuất hiện không khỏe mạnh, tạo nên không bào trong tế bào chất của chúng.

Ví dụ 2 - Xác định điều kiện sinh trưởng tối ưu để nhân rộng tế bào gốc thai nhi

Như được đề cập trong ví dụ 1, sự bao gồm của PDGF-AA và bFGF trong môi trường nuôi cấy lúc đầu được hỗ trợ sự sinh trưởng đầy đủ của tế bào gốc của thai nhi, nhưng tốc độ tăng sinh chậm lại sau 2 giai đoạn. NT-3 (Các hệ thống R&D) và IGF-1 (Sigma-Aldrich) được thử nghiệm để xác định liệu chúng có thể cải thiện sự tăng sinh

của tế bào gốc của thai nhi. Với sự có mặt của 20ng/ml PDGF-AA với 10ng/ml bFGF là không đủ để kích thích tốc độ tăng sinh của tế bào (tốc độ nhân rộng <1) (xem, Fig.4). Thêm vào tiếp 5ng/ml NT-3 và/hoặc 10ng/ml IGF-1 đạt kết quả cải thiện tốc độ tăng sinh (tốc độ nhân rộng trở nên >1). Hỗn hợp của NT-3 và IGF-1 là hiệu quả nhất ở giai đoạn 3. Tế bào thu được từ mỗi điều kiện còn được phân đoạn để xác nhận hiệu quả của chúng. Tế bào được thu hoạch sớm hơn bởi vì tế bào bắt đầu tạo thành hình cầu. Ở giai đoạn 4, tốc độ tăng sinh phục hồi do hỗn hợp của NT-3 và IGF-1 được giảm xuống và việc thêm vào đơn lẻ của IGF-1 trở nên hiệu quả nhất ở giai đoạn 3. Hỗn hợp của NT-3 và IGF-1 có thể gây ra biệt hóa tế bào hoặc tạo thành nhiều hình cầu hơn và bị mất đi trong khi môi trường thay đổi. Do vậy, việc thêm vào của IGF-1 được xác định là yếu tố sinh tồn hiệu quả nhất và được sử dụng sau đó để nuôi cấy tế bào gốc của thai nhi. Tuy nhiên, tốc độ tăng sinh của tế bào gốc của thai nhi bắt đầu chậm lại ở cuối của giai đoạn 4 và số lượng tế bào giảm xống so với số lượng tế bào được gieo giống. Thế nên, một chất bổ sung khác, 1-thioglycerol, được kiểm tra xem liệu nó có thể cải thiện sự tăng sinh của tế bào gốc của thai nhi ở giai đoạn 5.

Fig.5 thể hiện hiệu quả của 1-thioglycerol đối với sự tăng sinh của tế bào gốc của thai nhi. Hỗn hợp yếu tố sinh trưởng ban đầu (20ng/ml PDGF-AA + 10ng/ml bFGF) không thể nhân rộng tế bào hoàn toàn (dữ liệu không được thể hiện trong hình này bởi vì chúng nằm trong khoảng có thể đếm được). Hỗn hợp yếu tố sinh trưởng được sử dụng từ giai đoạn 3 (20ng/ml PDGF-AA + 10ng/ml bFGF + 10ng/ml IGF-1) là hiệu quả hơn hỗn hợp này (20ng/ml PDGF-AA + 10ng/ml bFGF) nhưng không thể kích thích tốt sự tăng sinh của tế bào gốc của thai nhi sau giai đoạn 4 (Fig.4). Nhiều đồng yếu tố liên quan đến sự sinh tổng hợp và sự biến chất của axit béo và liên quan đến các thiol đặc trưng hydrocarbon chuỗi dài. Tiếp theo 1-thioglycerol được thử nghiệm trên tế bào gốc của thai nhi bởi vì nó là một trong các chất chống ô xy hóa dựa trên thiol và đã được báo cáo có khả năng kích thích sự tăng sinh của một vài tế bào (ví dụ, phôi tế bào thần kinh hải mã và vỏ phôi của chuột, tế bào cột tủy xương của chuột, và dòng tế bào B của người) trong nuôi cấy. Ngoài ra, liều lượng cao của DGF-AA (100ng/ml) cũng được thử nghiệm xem liệu nó có thể bù lại sự giảm sút khả năng phản ứng đối với yếu tố sinh trưởng.

Bổ sung 50 μ M 1-thioglycerol với sự có mặt của 20ng/ml PDGF-AA, 10ng/ml bFGF và 10ng/ml IGF-1 kích thích nhẹ sự tăng sinh nhưng số lượng tế bào vẫn còn

giảm xuống (tốc độ nhân rộng <1). Kết quả này tương tự với cái mà thu được khi vắng mặt 1-thioglycerol khi nồng độ PDGF-AA tăng lên đến 100ng/ml với sự có mặt của 10ng/ml bFGF + 10ng/ml IGF-1. Tuy nhiên, khi cả 50 μ M 1-thioglycerol và PDGF-AA được tăng lên (100ng/ml) được bổ sung trong môi trường nuôi cấy (với 10ng/ml bFGF và 10ng/ml IGF-1), hai thành phần này xuất hiện và hiệp đồng làm việc, gia tăng đáng kể số lượng tế bào (tốc độ nhân rộng >1). Khi IGF-1 được loại khỏi dung dịch hỗn hợp thuốc bổ sung này (ví dụ, toàn bộ chất bổ sung là 100ng/ml PDGF-AA + 10ng/ml bFGF + 50 μ M 1-thioglycerol), tốc độ nhân rộng giảm xuống <1, chỉ ra rằng IGF-1 cũng thúc đẩy sự tăng sinh và/hoặc tồn tại của tế bào gốc của thai nhi. Tuy nhiên, tế bào gốc của thai nhi được nuôi cấy trong điều kiện này lâu hơn, tế bào gốc của thai nhi thậm chí có thể nhân rộng trong điều kiện này. Dữ liệu này chỉ ra rằng bổ sung 50 μ M 1-thioglycerol và tăng nồng độ PDGF-AA đến 100ng/ml cộng với 10ng/ml bFGF + 10ng/ml IGF-1 là quan trọng để nhân rộng tế bào. Hơn nữa, việc bổ sung IGF-1 có thể không bắt buộc nhưng vẫn còn hiệu quả thậm chí với sự có mặt của 50 μ M 1-thioglycerol và 100ng/ml PDGF-AA để tăng tốc độ nhân rộng. Hỗn hợp của 50 μ M 1-thioglycerol và 100ng/ml PDGF-AA cộng với 10ng/ml bFGF + 10ng/ml IGF-1 được sử dụng sau đó để nuôi cấy tế bào gốc của thai nhi.

Tế bào gốc của thai nhi còn được nhân rộng với sự có mặt của 100ng/ml PDGF-AA, 10ng/ml bFGF, 10ng/ml IGF-1 và 50 μ M 1-thioglycerol sau giai đoạn 6. Tế bào bắt đầu tăng sinh nhanh chóng hơn dưới các điều kiện này sau khi phân đoạn và được nhân rộng gấp 3 đến 4 lần trong vòng 1 tuần. Thời gian nhân đôi là khoảng 60 đến 100 giờ trong điều kiện này. Tế bào gốc của thai nhi có thể duy trì trạng thái tăng sinh này sau giai đoạn 8 (xem, Fig.3, hình D), giai đoạn 1 (xem, Fig.3, hình E) và giai đoạn 19 (xem, Fig.3, hình F). Do vậy, môi trường xác định bao gồm 100ng/ml PDGF-AA, 10ng/ml bFGF, 10ng/ml IGF-1 và 50 μ M 1-thioglycerol được xác định như là điều kiện nuôi cấy tối ưu để nhân rộng tế bào gốc thần kinh và/hoặc tế bào sinh sản thần kinh trong khoảng thời gian dài.

Ví dụ 3 - Kỹ thuật biệt hóa tự phát của tế bào gốc thai nhi

Trong khi thử nghiệm các điều kiện nuôi cấy khác nhau, quan sát thấy rằng khi tế bào gốc của thai nhi được nuôi cấy bằng cách loại bỏ bFGF khỏi môi trường, nhiều tế bào dường như biệt hóa thành tế bào lưỡng cực hoặc đa phân cực (chỉ thị của tế bào

thần kinh đệm ít gai) và chết sớm. Để tránh sự chết tế bào này, kỹ thuật biệt hóa tự phát được phát triển.

Môi trường nuôi cấy thường xuyên được thay đổi mỗi 2 ngày để nhân rộng tế bào gốc của thai nhi và nó được coi là rất quan trọng để duy trì tế bào gốc của thai nhi trong trạng thái tăng sinh. Để cải thiện sự biệt hóa tế bào, môi trường được thay đổi mỗi 3 hoặc 4 ngày trong thí nghiệm này. FGF cơ bản và nồng độ cao của PDGF-AA được cho là có thể phong bế sự biệt hóa của tế bào gốc của thai nhi nhưng chúng vẫn còn rất quan trọng cho tế bào gốc của thai nhi tồn tại. Do đó, nồng độ PDGF-AA được giảm từ 100 xuống còn 20ng/ml với sự có mặt của của 10ng/ml bFGF, 10ng/ml IGF-1 với 50 μ M 1-thioglycerol hoặc không có 1-thioglycerol. Tế bào gốc của thai nhi không thể tồn tại tốt nếu bFGF bị loại bỏ. Thường thường, bFGF được bổ sung mỗi ngày để duy trì tế bào gốc của thai nhi trong trạng thái tăng sinh. Khi việc bổ sung bFGF dừng lại, nhiều tế bào gốc của thai nhi phân tách từ cụm của chúng và tạo thành các quá trình giống như mạng nhện phức tạp (chỉ thị của tiền nguyên bào thần kinh đệm ít gai và/hoặc tế bào thần kinh đệm ít gai chưa trưởng thành) và tồn tại tốt như được thể hiện trong Fig.7, các hình A và B.

Các tế bào mang quá trình này với kiểu hình giống như mạng nhện là dương tính với kháng nguyên O4 và/hoặc kháng nguyên GalC như được thể hiện trong Fig.7, các hình từ C đến F, thế nên, chúng được coi là tiền nguyên bào thần kinh đệm ít gai (O4-dương tính và GalC-âm tính) tế bào thần kinh đệm ít gai chưa trưởng thành (O4-dương tính và GalC- dương tính). Thậm chí với sự có mặt của của 1-thioglycerol, tế bào gốc của thai nhi có thể được biệt hóa nhưng độ phức tạp của quá trình có vẻ đơn giản hơn khi 1-thioglycerol có mặt trong môi trường nuôi cấy như được thể hiện trong Fig.7, các hình A & B. Ngoài ra, các loại tế bào khác (ví dụ, tế bào hình sao và tế bào thần kinh) hiếm khi được quan sát thấy và tế bào gốc của thai nhi được cho là có khả năng biệt hóa thành dòng tế bào thần kinh đệm ít gai duy nhất. Kỹ thuật này có thể quan sát dòng tế bào thần kinh đệm ít gai được biệt hóa trong trạng thái khỏe mạnh.

Dữ liệu này còn chỉ ra rằng điều kiện nuôi cấy của sáng chế này là đặc biệt hữu ích để nhân rộng tế bào gốc thần kinh và/hoặc tế bào sinh sản thần kinh được phân lập mà có khả năng biệt hóa thành tế bào thần kinh đệm ít gai, bởi vì hầu hết các tế bào được biệt hóa bộc lộ các đặc tính của tế bào thần kinh đệm ít gai và giống tế bào thần kinh đệm ít gai hoặc tiền tế bào thần kinh đệm ít gai.

Ví dụ 4- Sự cảm ứng của tế bào gốc của thai nhi từ tế bào gốc thần kinh thông thường

Như được thể hiện trong Fig.1, tế bào gốc thần kinh thông thường được cho là tiền thân của tế bào gốc của thai nhi. Để xác nhận mối quan hệ này, nó được kiểm tra xem liệu tế bào gốc của thai nhi có thể được tạo ra từ tế bào gốc thông thường mà được báo cáo trước đây. Ban đầu tế bào từ mẫu mô thứ hai của tủy sống thai nhi (11 tuần tuổi thai) được nuôi cấy với sự có mặt của của 10ng/ml EGF và 10ng/ml bFGF trong DMEM/F12 chứa 2.5mM glutamin, 15mM HEPES, chất bổ sung B27 2%, NEAA1%, 1,5mM pyruvat, 55 μ M β -merxaptoetanol, và 1mM N-acetyl-L-xystein trong 15 ngày để nhân rộng tế bào gốc thần kinh thông thường. Ban đầu, nhiều loại tế bào khác nhau xuất hiện nhưng một vài quần thể tế bào có thể nhân rộng thu được ở đoạn cuối của nuôi cấy sơ cấp. Các kết quả này được minh họa trong Fig.8, hình A ở ngày thứ 15 của giai đoạn 0. Sau giai đoạn đầu tiên, các tế bào được nuôi cấy trong cùng điều kiện như dòng #2b (ví dụ, môi trường với 10ng/ml bFGF, 10ng/ml IGF-1, 100ng/ml PDGF-AA và 50 μ M 1-thioglyxerol) qua 15 giai đoạn.

Hình thái của tế bào từ quần thể tế bào có thể nhân rộng thu được ở cuối nuôi cấy sơ cấp trở nên đồng nhất ở xung quanh giai đoạn 5 và tế bào có xu hướng tạo thành cụm và hình cầu, tương tự với cái mà được tạo thành với dòng #2b (xem, Fig.8, các hình từ B đến F). Ngoài ra, dòng này có thể biệt hóa tự phát thành dòng tế bào thần kinh đệm ít gai (dữ liệu không được thể hiện), thể hiện cùng kiểu hình miễn dịch như dòng #2b (dữ liệu không được thể hiện) và cùng mẫu hình biểu hiện của chỉ thị phân tử bằng cách đếm tế bào chảy như được mô tả trong Ví dụ 7. Tế bào từ dòng này được làm đông lạnh xuống để thử nghiệm trong tương lai (ví dụ, Fig.12). Dữ liệu này gợi ý rằng tế bào gốc của thai nhi có thể được tạo ra từ tế bào gốc thần kinh thông thường và rằng tế bào gốc thần kinh thông thường được cho là tiền thân của tế bào gốc của thai nhi.

PDGF-AA được cho là có hiệu quả trong cơ quan thụ cảm α PDGF. Cơ quan thụ cảm được biết để được kích thích bởi toàn bộ các chi họ PDGF (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC và PDGF-DD). PDGF-BB được sử dụng để kiểm tra xem liệu PDGF-BB có thể thay thế PDGF-AA sử dụng tế bào gốc của thai nhi dòng #2b và dòng #3. PDGF-BB có thể nhân rộng trong cùng điều kiện ngoại trừ PDGF-AA và chứng minh rằng PDGF-AA có thể được thay thế thành công với các chi họ PDGF khác

Ví dụ 5- Sự xác nhận các thành phần nuôi cấy tế bào tối ưu

Trong khi tác giả đã thử nghiệm các điều kiện nuôi cấy khác nhau sau khi tế bào gốc của thai nhi (dòng #2b) được thiết lập, tác giả chú ý thấy rằng phản ứng theo liều lượng cho mỗi yếu tố sinh trưởng đã được thay đổi. Để phân lập tế bào gốc của thai nhi (dòng #2b), nồng độ cao hơn của PDGF-AA (100ng/ml) là cần thiết thêm vào 50 μ M 1- thioglycerol. Sau khi dòng này trở nên tăng sinh thường xuyên, nồng độ cao hơn của PDGF-AA (100ng/ml) là không còn cần thiết để nhân rộng dòng này. Tốc độ nhân rộng được bão hòa xung quanh nằm trong khoảng 10 đến 20ng/ml of PDGF-AA và nồng độ cao hơn của PDGF-AA (100ng/ml) không có hiệu quả nữa đối với sự sinh trưởng của chúng. Điều này có thể do nuôi cấy lâu hoặc sử dụng liên tục của 1 - thioglycerol. Để tạo thành dòng #2b và dòng #3 của tế bào gốc của thai nhi, 1- thioglycerol được sử dụng sau một vài giai đoạn. Để kiểm tra hiệu quả của nồng độ cao hơn của PDGF-AA, các dòng mới được tạo ra với sự có mặt của 1- thioglycerol từ nuôi cấy ban đầu. Ngoài ra, phản ứng với bFGF và IGF-1 dường như được bão hòa lần lượt ở 20ng/ml và 40ng/ml. Khi nồng độ cao hơn của IGF-1 (50-500ng/ml) được sử dụng, nhiều hơn các tế bào được biệt hóa có thể được nhìn thấy (nó trông như khoảng 1%). Do đó, 20ng/ml IGF-1 được xem xét tốt hơn để nhân rộng tế bào gốc của thai nhi. Việc sử dụng của 20ng/ml bFGF và 20ng/ml IGF-1 cải thiện tốc độ nhân rộng 5 đến 10% so với sử dụng 10ng/ml bFGF và 10ng/ml IGF-1. Do đó, 20ng/ml bFGF và 20ng/ml IGF- 1 được sử dụng trong thí nghiệm này.

Tế bào gốc của thai nhi từ mẫu thứ ba (12 tuần tuổi thai) được nuôi cấy để xem liệu nồng độ cao hơn của PDGF-AA là cần thiết trong các thành phần của môi trường nuôi cấy tối ưu được xác định và liệu chúng có thể cung cấp các đặc tính sinh trưởng tương tự trong hỗn hợp khác của tế bào. Tế bào được nuôi cấy trong cùng môi trường nuôi cấy như dòng #2b và #3 (ví dụ, môi trường HFSCM1 và 50 μ M 1- thioglycerol) với 20ng/ml (dòng #4A) hoặc 100ng/ml (dòng #4B) PDGF-AA thêm vào 20ng/ml bFGF và 20ng/ml IGF-1. Ở cuối của giai đoạn đầu tiên, số tế bào của dòng #4A là nhỏ hơn một phần ba của dòng #4B (xem, Fig.1, hình A và hình B). Tuy nhiên, dòng #4A bắt đầu tăng sinh ở tốc độ tương tự như dòng #4B sau giai đoạn 1 thậm chí với nồng độ PDGF-AA thấp hơn dòng #4B. Hình thái của tế bào trở nên đồng nhất ở giai đoạn 3 và tế bào có xu hướng tạo thành cụm và hình cầu, tương tự với cái mà được tạo thành với dòng dòng #2b hoặc #3 (xem, Fig.10, cách hình từ C đến F). Ngoài ra, các tế bào

này có thể biệt hóa tự phát thành dòng tế bào thần kinh đệm ít gai như dòng #2b và #3 đã làm. Kết quả này gợi ý rằng nồng độ cao hơn của PDGF-AA không bắt buộc nhưng tốt hơn để phân lập tế bào gốc của thai nhi và nồng độ cao hơn của PDGF-AA là không cần thiết một khi tế bào gốc của thai nhi được tạo ra. Hơn nữa, phương pháp nuôi cấy này có thể cung cấp các đặc tính sinh trưởng tương tự trong một hỗn hợp tế bào khác và nó xác nhận rằng quá trình này có thể được lặp lại. Tế bào từ dòng này được đông lạnh xuống để thử nghiệm trong tương lai.

Ví dụ 6- Khả năng để nhân rộng tế bào gốc của thai nhi để phục hồi và phát triển sau chu kỳ rã đông

Tế bào của dòng #2b được bảo quản cryo với sự có mặt của DMSO 8% ở giai đoạn 10, 11 và 12. Tế bào gốc của thai nhi (dòng #2b) được làm đông lạnh giai đoạn 11 đã được nộp lưu ở ATCC (số truy nhập PTA-12291). Tế bào của dòng #3 cũng được bảo quản cryo với sự có mặt của của 8% DMSO ở giai đoạn 9 và 10. Tế bào của dòng #4A và #4B phát triển nhanh hơn dòng #2b hoặc #3, thế nên chúng được bảo quản cryo với sự có mặt của 8% DMSO ở giai đoạn 4 và 5 (dòng #4A) hoặc giai đoạn 3, 4 và 5 (dòng #4B) trong cùng điều kiện. Cùng môi trường để nuôi cấy tế bào gốc của thai nhi (môi trường HFSCM1 và 50 μ M 1-thioglycerol) được sử dụng để làm đông lạnh tế bào gốc của thai nhi. Tế bào sau đó được rã đông và được nuôi cấy trong môi trường HFSCM1 loại bỏ huyết thanh được mô tả ở trên và 50 μ M 1-thioglycerol với 10ng/ml bFGF, 10ng/ml IGF-1, 100ng/ml PDGF-AA hoặc 20ng/ml bFGF, 20ng/ml IGF-1, 20ng/ml PDGF-AA. Các tế bào này được quan sát tăng sinh ở tốc độ tương tự như trước khi rã đông (xem, Fig.6, Fig.9 và Fig.11). Các tế bào được đông lạnh được sử dụng trong các thí nghiệm sau đó được thể hiện trong các hình từ 12 đến 15.

Ví dụ 7 –Đặc trưng hóa của tế bào gốc của thai nhi không được biệt hóa

Khi tế bào gốc của thai nhi của ví dụ 2 được nuôi cấy với sự có mặt của 100ng/ml PDGF-AA, 10ng/ml bFGF, 10ng/ml IGF-1 và 50 μ M 1- thioglycerol, chúng phát triển thành cụm và/hoặc hình cầu như được thể hiện trong Fig.3, các hình từ D đến F. Các tế bào được phân tán phân tách từ cụm có xu hướng biệt hóa thành tế bào thần kinh đệm ít gai như được thể hiện trong Fig.3, các hình D và E. Thậm chí khi tế bào được phân đoạn thành trạng thái tế bào đơn, chúng thậm chí bắt đầu tập hợp và lại tạo thành cụm. Hình dáng của chúng ở trong trạng thái tăng sinh này giống tế bào tiền

sinh sản tế bào thần kinh đệm ít gai (xem, Ben-Hur et al, J. Neurosci., 18:5777, 1998; Gago et al, Mol. Cell. Neurosci., 22:162, 2003), nhưng không như sinh sản O-2A mà phát triển trong hình thái lưỡng cực mà không tạo ra bất cứ cụm nào. Thậm chí tiền sinh sản của tế bào thần kinh đệm ít gai của chuột nhắt được báo cáo trong một thời gian dài trước đây, bản sao của người không được báo cáo. Tuy nhiên, không cần thiết xác định giai đoạn cụ thể của tế bào tiền thân của tế bào thần kinh đệm ít gai trong nuôi cấy được nhân rộng bởi vì bất chấp chúng duy trì khả năng biệt hóa thành tế bào thần kinh đệm ít gai (như được thể hiện dưới đây).

Để mô tả đặc điểm kiểu hình miễn dịch của tế bào gốc của thai nhi không được biệt hóa, tế bào ở giai đoạn 11 đến 15 được phân tách thành trạng thái tế bào đơn với Accutaza (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA, USA) và được sinh trưởng trong đĩa nuôi cấy 24 phủ poly-ornithin và được nuôi cấy trong 3 đến 7 ngày với sự có mặt của 100ng/ml PDGF-AA, 10ng/ml bFGF, 10ng/ml IGF-1 và 50 μ M 1-thioglycerol. Tế bào sau đó được cố định bằng hợp chất paraformaldehyt 4% và sau đó được rửa với PBS. Để nhuộm các kháng nguyên bề mặt như CD133, PDGF-Ra, NG2, A2B5, O4, O1, GalC và PSA-NCAM, tế bào được phong bế với PBS chứa 3% huyết thanh bệnh gút thường (NGS) và được nhuộm với các kháng thể. Để nhuộm các kháng nguyên nội bào như Sox2, nestin, Olig2, protein myelin cơ bản (MBP), Vimentin, GFAP, β III Tublin, Sợi thần kinh-L và MAP2, tế bào được thấm thấu với Triton X-100 0.1% trong PBS đông lạnh trong khoảng 10 phút trước khi phong bế. Kháng thể đơn dòng IgG1 của chuột CD133/1 (Dòng AC133, Miltenyi Biotec), kháng thể đa dòng kháng PDGF-Ra của thỏ, kháng thể đa dòng kháng NG2 của thỏ (Millipore), kháng PSA- kháng thể đơn dòng IgM của chuột NCAM (Millipore), kháng thể đơn dòng IgM của chuột A2B5 (Millipore), kháng thể đơn dòng IgM của chuột O4 (các hệ R&D S), kháng thể đơn dòng IgM của chuột O1 (Millipore), kháng thể đa dòng kháng Sox2 của thỏ (Millipore), kháng thể đa dòng kháng Nestin của chuột, kháng thể đa dòng IgG1 của chuột (Milipore), kháng thể IgG2a đa dòng của chuột kháng Olig2, kháng thể IgG3 đơn dòng kháng GalC (Milipore), kháng thể IgG2a đơn dòng của chuột nhắt kháng MBP (Milipore), kháng thể đơn dòng IgG1 của chuột kháng Vimentin (Santa Cruz), kháng thể đa dòng của thỏ kháng GFAP (Milipore), kháng thể IgG1 đơn dòng của chuột kháng β III Tublin (Milipore), kháng thể IgG1 đơn dòng của chuột kháng Sợi thần kinh-L (Cell Signaling), kháng thể đa dòng của thỏ kháng MAP2 (Milipore) và

kháng thể đơn dòng IgG1 của chuột kháng MAP2 (Milipore) được sử dụng ở 1:300 (CD133/1), 1:300 (PDGF-Ra), 1:600 (NG2), 1:1000 (PSA-NCAM), 1:1000 (A2B5), 1:1000 (O4), 1:1000 (O1), 1:1000 (Sox2), 1:200 (Nestin), 1:200 (Olig2), 1:100 (GalC), 1:50 (MBP), 1:500 (Vimentin), 1:1000 (GFAP), 1:100 (β III Tublin), 1:200 (Sợi thần kinh-L), 1:1000 (MAP2, đa dòng) hoặc 1:200 (MAP2, đơn dòng) trong PBS chứa NGS3%. Sau khi ủ qua đêm ở 4°C, các tế bào được rửa với 3 thay đổi của PBS chứa NGS3%. Trong một vài trường hợp, một tế bào sống nhuộm trong một vài kháng nguyên bề mặt tế bào (NG2, A2B5, O4, O1 và GD3) được sử dụng để giảm các tín hiệu không rõ ràng. Trong trường hợp như vậy, tế bào được nhuộm với mỗi kháng thể sơ cấp trước khi cố định mà không phong bế. Kháng thể đa dòng của thỏ, kháng thể đơn dòng IgM của chuột A2B5, kháng thể đơn dòng IgM của chuột O4, kháng thể đơn dòng IgM của chuột O1, và kháng thể IgG3 đơn dòng của chuột kháng Disialogangliosid GD3 (Milipore) được sử dụng ở 1:150 (NG2), 1:100 (A2B5), 1:200 (O4), 1:100 (O1) và 1:200 (GD3) trong PBS chứa BSA0.5%. Sau khi ủ 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, tế bào được rửa với 3 thay đổi của PBS chứa BSA0.5%. Kháng thể thứ cấp, kháng IgG của thỏ của dê AffiniPure được tiếp hợp DyLight 488 (mảnh Fc γ đặc hiệu), kháng IgG của chuột của dê AffiniPure được tiếp hợp DyLight 488 (mảnh Fc γ đặc hiệu), Kháng IgG của thỏ của dê AffiniPure được tiếp hợp DyLight 488 (H+L), kháng IgG của chuột của dê AffiniPure được tiếp hợp DyLight 488 (H+L), kháng IgG của chuột của dê AffiniPure được tiếp hợp DyLight 594 (H+L), và/hoặc kháng IgM của chuột của dê AffiniPure được tiếp hợp DyLight 594 (chuỗi μ đặc hiệu) (tất cả các kháng thể thứ cấp được đặt mua từ Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.) được sử dụng ở tỷ lệ pha loãng 1 :500 trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Tế bào sau đó được rửa với 2 thay đổi của PBS. DAPI được sử dụng để phản chất nhuộm nhân tế bào. Tế bào sau đó được quan sát sử dụng Olympus 1X81 được trang bị trên huỳnh quang.

Hầu hết tế bào gốc của thai nhi là tế bào CD133-dương tính (xem, Fig.12, hình A & B), Sox2-dương tính (xem, Fig.12, các hình C & D) và nestin-dương tính (xem, Fig.12, hình E & F), chỉ thị của tế bào gốc thần kinh. Hầu hết tế bào gốc của thai nhi là tế bào Olig2-dương tính (thường chỉ thị của tế bào sinh sản cho tế bào thần kinh và tế bào thần kinh đệm ít gai vận động) (xem, Fig.12, các hình G & H), PDGF-Ra-dương tính (chỉ thị thường xuyên của dòng tế bào thần kinh đệm ít gai) (xem, Fig.12, các hình I & J), A2B5-dương tính (A2B5 thường vắng mặt từ tế bào gốc thần kinh và được tìm

thấy trên tế bào sinh sản của tế bào thần kinh đệm, tế bào sinh sản của tế bào thần kinh đệm ít gai và tế bào hình sao typ-2) (xem, Fig.12, các hình M & N), chỉ thị của tế bào sinh sản của tế bào thần kinh đệm ít gai. Hầu hết tế bào gốc của thai nhi là PSA-NCAM-dương tính (xem, Fig.12, các hình O & P) nhưng có sự đa dạng trong mức độ biểu hiện của chúng (PSA-NCAM thường vắng mặt từ tế bào gốc thần kinh và được tìm thấy trên tế bào sinh sản của tế bào thần kinh và tế bào tiền sinh sản của tế bào thần kinh đệm ít gai). Tế bào No GFAP-dương tính có thể được nhìn thấy trong khi phần lớn chúng là vimentin-dương tính (xem, Fig.12, hình Q-S). Ít nhất 90% tế bào gốc của thai nhi có vẻ dương tính cho các chỉ thị phân tử ở trên ngoại trừ GFAP nhưng việc đếm chi tiết rất khó bởi vì tế bào gốc của thai nhi có xu hướng dễ tạo thành cụm và được tách ra từ bình nuôi cấy rất dễ dàng trong quá trình cố định và nhuộm. Để định lượng độ sạch của chúng, tiến hành phân tích đếm tế bào chảy được thực hiện và thể hiện trong Fig.13.

Ngoài ra, tế bào gốc của thai nhi không được biệt hóa được nhuộm với kháng thể O4 mà là chỉ thị phân tử của tiền nguyên bào thần kinh đệm ít gai (O4-dương tính, GalC-âm tính) và tế bào thần kinh đệm ít gai chưa trưởng thành (O4-dương tính, GalC-dương tính) bằng hóa mô miễn dịch nhưng rất khó để phân biệt với nhuộm yếu và nhuộm không cụ thể. Một vài tiền nguyên bào thần kinh đệm ít gai thể hiện tế bào O4-dương tính mạnh với kiểu hình đa phân cực có thể được nhìn thấy trong nuôi cấy này nhưng tần suất xuất hiện của chúng là nhỏ hơn 1% của toàn bộ tế bào

Ngoài ra, tế bào gốc của thai nhi không được biệt hóa được nhuộm với kháng thể kháng MAP2 nhưng kiểu hình của chúng không giống tế bào thần kinh. Khi kháng thể được sử dụng với tế bào được biệt hóa với sự có mặt của huyết thanh, tế bào thần kinh được xác định với tín hiệu mạnh và kiểu hình thần kinh (xem, Fig.14, hình H). Tín hiệu của MAP2 mạnh như vậy với kiểu hình thần kinh không được xác định trong tế bào gốc của thai nhi không được biệt hóa. Tín hiệu yếu này không xuất hiện khi được biệt hóa, để mà nhuộm dường như là cụ thể và tế bào gốc của thai nhi không được biệt hóa có thể không nhuộm không cụ thể.

Tóm lại, tế bào gốc của thai nhi biểu hiện các chỉ thị phân tử cụ thể cho tế bào thần kinh (CD133, Sox2, và Nestin) và chỉ thị phân tử cụ thể cho dòng tế bào thần kinh đệm ít gai (Olig2, NG2, A2B5, và O4). Các dữ liệu này gợi ý rằng tế bào gốc của thai nhi có thể là tế bào trung gian giữa tế bào thần kinh và sinh sản tế bào thần kinh

đệm ít gai. Hơn nữa, tế bào gốc của thai nhi biểu hiện PSA-NCAM thêm vào các kháng nguyên ở trên, chỉ thị để là phân chất nhuộm của người của tế bào tiền sinh sản của tế bào thần kinh đệm ít gai của chuột nhất.

Axit Polysialic (PSA) của PSA-NCAM được tích điện âm tính lâu, glycan bề mặt tế bào với khối lượng lớn được hydrat hóa lớn mà phục vụ để điều biến khoảng cách giữa các tế bào. PSA tham gia trong một số phản ứng liên quan đến chất dẻo trong tế bào gốc thần kinh trung ương của người trưởng thành, bao gồm các thay đổi xuất hiện một lần một ngày và trong mẫu sinh sản. Sự thích nghi với vết thương và căng thẳng, và so sánh các khía cạnh của việc học và bộ nhớ (Rutishauser A/af. Rev. Neurosci., 9:26, 2008). Một trong các vai trò của PSA trong hệ thần kinh sơ sinh trong sự di trú của sinh sản tế bào thần kinh đệm ít gai. Khi PSA được loại bỏ từ sự di trú sinh sản O2A, sự di trú của sinh sản O2A bị ngăn cản trong mô hình vết thương (Barral-Moran et al, J. Neurosci. Res., 72:679, 2003). Một vai trò khác là kiểm soát sự định giờ biệt hóa của tế bào. PSA được biểu hiện trong cả axon đang phát triển và tiền chất tế bào thần kinh đệm ít gai, và sự điều chỉnh xuống của nó trên các tế bào này tương quan với sự xâm lấn của myelin hóa. PSA cũng tham gia các phản ứng liên quan đến chất dẻo của tế bào gốc thần kinh trung ương của người trưởng thành. Khả năng được đưa ra của PSA để điều chỉnh tính tạo hình trưởng thành và phát triển, nó tiếp theo rằng tế bào đang biểu hiện PSA có thể có giá trị trị liệu trong trạng thái mà các mô bị phá hủy bởi vết thương hay bệnh tật. Tái sinh trường sợi trục thần kinh trong vùng biểu hiện PSA (biểu hiện PSA được thiết kế trong vết sẹo hoặc tế bào Schwann được ghép mô) được quan sát qua vết sẹo trong mẫu vết thương. Tế bào gốc của thai nhi là tế bào đang biểu hiện PSA nội sinh và sẽ có cùng hiệu quả trong điều trị vết thương như tổn thương não hoặc tổn thương tủy sống.

Để mô tả đặc điểm kĩ hơn tế bào gốc của thai nhi (dòng #2b), tế bào được đông lạnh ở giai đoạn 11 được rửa đông, được nuôi cấy trong điều kiện sinh trưởng được mô tả ở trên và được phân đoạn mỗi 7 đến 9 ngày. Tế bào được nuôi cấy trong 9 ngày ở giai đoạn 13 sau đó được đưa ra để đếm tế bào chạy sử dụng các kháng thể sau đây: kháng thể đơn dòng IgG1 của chuột PE-tiếp hợp kháng -CD133/1 (Dòng AC133, Miltenyi Biotec); IgG2a kháng thể đơn dòng của chuột CD140a được tiếp hợp PE (Dòng aR1, BD Pharmingen); kháng thể đơn dòng IgG1 của chuột PE-tiếp hợp CD9 (Dòng M-L13, BD Pharmingen); kháng thể đơn dòng IgG2b của chuột PE-tiếp

hợp CD44 (DòngG44-26, BD Pharmingen); kháng thể đơn dòng IgM của chuột PE-tiếp hợp kháng-PSA-NCAM (2-2B, Miltenyi Biotec); kháng thể đơn dòng của chuột IgM PE-tiếp hợpA2B5(Dòng105HB29, Miltenyi Biotec); kháng thể đơn dòng IgM của chuột PE-tiếp hợp O4 (DòngO4, Miltenyi Biotec); và kháng thể đơn dòng IgG1của chuột PE-tiếp hợp kháng-NG2 (R&D Systems). Tóm lại, sau khi phân tách với Accutaza, các tế bào được rửa và tái hòa tan trong PBS đông lạnh với 2mM EDTA và BSA 0,5% và duy trì đông băng. Sau khi đếm số lượng và số lượng tế bào được điều chỉnh đến 1×10^7 tế bào/ml bằng cách sử dụng PBS đông lạnh với 2mM EDTA và BSA0,5%. 25 μ L của huyền phù tế bào (250. 000 tế bào) được chuyển thành mỗi ống 1,5-ml. Các kháng thể cơ bản sau đó được thêm vào mỗi ống theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Lớp kháng thể PE-tiếp hợp kiểm soát cho mỗi kháng thể được sử dụng để tạo thành các cổng thích hợp. Sau khi ủ 20 phút trên băng, các tế bào được rửa với PBS băng lạnh với 2mM EDTA và BSA 0,5% và được tái hòa tan trong chất đệm cố định. Huỳnh quang của tế bào được đo sử dụng FACS Canto II (BD Bioscience) và mỗi dữ liệu được phân tích sử dụng phần mềm Gatellogic (Inivai Technologies Pty Ltd.).

Như thể hiện trong Fig.13, tất cả hoặc hầu hết tế bào gốc của thai nhi (dòng #2b) là CD133-dương tính (100% của tế bào), CD9-dương tính (100% của tế bào), CD140a- dương tính (98,8% của tế bào), NG2-dương tính (89,8%), A2B5-dương tính (99,9%), O4-dương tính (94,6%), PSA-NCAM-dương tính (68,9%), và CD44-âm tính (0,4% dương tính). Bằng hóa mô miễn dịch, tín hiệu O4 có thể khó được phân biệt từ việc nhuộm không đặc hiệu và yếu hơn nhiều tín hiệu O4 tiền nguyên bào thần kinh đệm ít gai hoặc tế bào thần kinh đệm ít gai. Từ kết quả của đếm tế bào chảy, tín hiệu O4 tế bào gốc của thai nhi (dòng #2b) có thể được chia tách từ sự kiểm soát của lớp kháng thể vậttế bào gốc của thai nhi (dòng #2b) xuất hiện yếu dương tính cho kháng nguyên O4 a. Tế bào gốc của thai nhi (dòng #3) thể hiện hầu như cùng kiểu hình do đếm tế bào chảy. Chúng là CD133-dương tính (98,4%), CD9-dương tính (99,4%), CD140a-dương tính (91,5%), NG2-dương tính (63,4%), A2B5-dương tính (99,8%), O4-dương tính (71,6%), PSA-NCAM-dương tính (74,7%), và CD44-âm tính (0,3% là dương tính).

Ví dụ 8 – Khả năng biệt hóa của tế bào gốc của thai nhi có thể nhân rộng trong môi trường chứa huyết thanh

Để thử nghiệm khả năng biệt hóa của tế bào có thể nhân rộng, tế bào gốc của thai nhi (dòng #3) được phân đoạn thành giai đoạn tế bào riêng lẻ/đơn và được nuôi cấy trong môi trường chứa huyết thanh [môi trường biệt hóa tế bào của tiền chất tế bào thần kinh đệm ít gai (OPCDM)] (Phòng nghiên cứu thí nghiệm ScienCell™) để kích thích sự biệt hóa. Tế bào sau đó được nhuộm với kháng thể mà chấp nhận tế bào thần kinh (kháng thể kháng- β III Tublin, kháng thể kháng Sợi thần kinh-L và kháng thể kháng MAP2), sinh sản tế bào thần kinh đệm ít gai và tế bào thần kinh đệm ít gai [kháng thể 04, kháng thể 01, kháng thể kháng GalC và kháng thể protein cơ sở kháng myelin (MBP)], và tế bào hình sao (kháng thể kháng GFAP) tiếp theo bởi kháng thể thứ cấp nhuộm tiếp hợp huỳnh quang (DyLight 488 hoặc DyLight 594, nghiên cứu miễn dịch Jackson). DAPI được sử dụng để phản chất nhuộm nhân tế bào.

Tất cả ba hệ thần kinh trung ương chính (tế bào gốc thần kinh trung ương) các kiểu hình được quan sát theo các cách xử lý để biệt hóa tế bào gốc của thai nhi. Khi tế bào gốc của thai nhi được nuôi cấy trong môi trường chứa huyết thanh, tế bào Bill Tublin-dương tính, tế bào Sợi thần kinh-L-dương tính, và tế bào MAP-2-dương tính được phát hiện ra (chỉ thị của tế bào thần kinh). Có nhiều tế bào β III Tublin-dương tính (Fig.14, hình B) trong khi một lượng nhỏ là dương tính với Sợi thần kinh-L (Fig.14, hình E) hoặc MAP2 (Fig.14, hình H). Kết quả này chỉ ra rằng phần lớn chúng là tế bào thần kinh chưa trưởng thành. Tế bào gốc của thai nhi cũng có thể biệt hóa thành tế bào MBP-dương tính. MBP thành phần chính của myelin và chỉ được biểu hiện trong tế bào thần kinh đệm ít gai trưởng thành. Dữ liệu này chỉ ra rằng tế bào gốc của thai nhi có khả năng biệt hóa thành tế bào thần kinh đệm ít gai trưởng thành. Sự đồng hình thành tập đoàn của chỉ thị phân tử thần kinh được đánh giá nhưng chỉ một vài đồng hình thành tập đoàn có thể được nhìn thấy (Fig.14, các hình C, F, I). Điều này có thể do phần lớn các tế bào thần kinh bởi vì myelin sẽ không được bọc trên trục của tế bào thần kinh chưa trưởng thành. Sự đồng hình thành tập đoàn của MBP và kháng nguyên O4 cũng được đánh giá (Fig.14, các hình J đến L). Hầu hết tín hiệu của MBP được đồng hình thành tập đoàn với tín hiệu của kháng nguyên O4 nhưng chỉ một nửa tín hiệu của kháng nguyên O4 đồng hình thành tập đoàn với tín hiệu của MBP. Kết quả này là hợp lý bởi vì kháng nguyên O4 được biểu hiện trong sinh sản của tế bào thần kinh đệm ít gai, tế bào thần kinh đệm ít gai chưa trưởng thành và tế bào thần kinh đệm ít gai trưởng thành trong khi MBP được chỉ biểu hiện trong tế bào thần kinh

đệm ít gai trưởng thành. Các tế bào này cũng dương tính đối với kháng nguyên GalC mà là chỉ thị phân tử chotế bào thần kinh đệm ít gai chưa trưởng thành (dữ liệu không được thể hiện). Tế bào GFAP-dương tính (tế bào hình sao) và tế bào vimentin-dương tính cũng được phát hiện như được thể hiện trong Fig.14, các hình từ M đến O. Các dữ liệu này chỉ ra rằng tế bào gốc của thai nhi có thể nhân rộng là đa năng và rằng, thế nên, chúng có khả năng là tế bào gốc thần kinh, bởi vì chúng có khả năng tăng tới 3 kiểu hình tế bào của hệ thần kinh trung ương chính phụ thuộc vào môi trường. Tế bào gốc của thai nhi (dòng #2b) cũng được thử nghiệm trong cùng điều kiện và thể hiện cùng sự đa năng như tế bào gốc của thai nhi thể hiện (dòng #3).

Ví dụ 9 - Khả năng biệt hóa của tế bào gốc của thai nhi có thể nhân rộng trong môi trường loại bỏ huyết thanh

Tế bào gốc của thai nhi thể hiện khả năng biệt hóa tốt thành tế bào thần kinh đệm ít gai bằng cách giảm nồng độ PDGF-AA mà không bổ sung bFGF như được thể hiện trong Fig.5. Tuy nhiên, tế bào được biệt hóa là ít hơn một nửa tổng số tế bào. Nếu tế bào gốc của thai nhi được gieo giống ở mật độ rất thấp ($< 0,5 \times 10^4$ tế bào/cm²) mà không có bFGF với 10ng/ml PDGF-AA và 100ng/ml IGF-1, hầu hết các tế bào có vẻ biệt hóa nhưng chúng biến mất trong một ngày. Để kiểm tra khả năng của chúng để biệt hóa thành tế bào thần kinh đệm ít gai nữa, sự cảm ứng của sự biệt hóa và sự tồn tại lâu của tế bào được cho là rất quan trọng. AMP tuần hoàn (cAMP) được biết có thể kích thích sự biệt hóa thành nhiều loại tế bào. pCPT-cAMP mà là chất đồng đẳng thẩm tế bào của cAMP được thử nghiệm xem liệu nó có thể kích thích sự biệt hóa trong tế bào gốc của thai nhi. 100μM pCPT-cAMP có thể kích thích sự biệt hóa của tế bào gốc của thai nhi ở mật độ cao (3×10^4 tế bào/cm²) tế bào không thể tồn tại tốt thậm chí với sự có mặt của 100ng/ml IGF-1. BDNF được báo cáo có thể cải thiện sự biệt hóa của sinh sản tế bào thần kinh đệm ít gai và hỗ trợ sự tồn tại của tế bào được biệt hóa. Khi tế bào gốc của thai nhi được biệt hóa với sự có mặt của PDGF-AA 10ng/ml, 100ng/ml IGF-1, 100μM pCPT-cAMP và 10ng/ml BDNF trong môi trường chứa glutamin DMEM/F12 và HEPES và được bổ sung với chất bổ sung B27, chất bổ sung N2 và 50μM 1-thioglycerol, ít nhất hơn một nửa tế bào gốc của thai nhi được biệt hóa thành tế bào mang quá trình. Bởi vì tế bào gốc của thai nhi biểu hiện một vài chỉ thị phân tử của tế bào thần kinh đệm ít gai như O4 hoặc NG2, đòi hỏi phương pháp mới để phân biệt tế bào gốc của thai nhi và dòng tế bào thần kinh đệm. Dựa trên một vài

thử nghiệm, tác giả chú ý thấy rằng tế bào không được biệt hóa biểu hiện GD3 mạnh hơn sinh sản tế bào thần kinh đệm ít gai và O4 ngược lại (đầu mũi tên của Fig.1, hình A, hình B và hình C). Khi tế bào được nhuộm với GD3 và O4, tế bào thần kinh đệm ít gai có thể được phân biệt sử dụng mẫu nhuộm và hình thái của chúng. Ngoài ra, loại tế bào khác như tế bào thần kinh hoặc tế bào hình sao cũng có thể được xác định bởi vì chúng không biểu hiện kháng nguyên GD3 hoặc O4. Fig.15, hình D thể hiện tỷ lệ của mỗi loại tế bào. Tế bào không được biệt hóa chiếm $23,5\% \pm 2,0\%$ của tổng số tế bào. Sinh sản tế bào thần kinh đệm ít gai chiếm $75,8\% \pm 2,1\%$ của tổng số tế bào. Các tế bào loại khác chỉ chiếm $0,9\% \pm 0,6\%$. Như được đề cập ở trên, tỷ lệ của sinh sản tế bào thần kinh đệm ít gai so với tế bào được biệt hóa (sinh sản tế bào thần kinh đệm ít gai cộng với các loại tế bào khác) là $99,1\% \pm 0,56\%$ của tế bào được biệt hóa trong khi các loại tế bào khác là $0,9\% \pm 0,56\%$ của tế bào được biệt hóa. Dữ liệu này chỉ ra rằng tế bào gốc của thai nhi có khả năng cao để biệt hòa thành dòng tế bào thần kinh đệm ít gai.

Ví dụ 10- Tế bào gốc của thai nhi được làm giàu hoặc được chọn lọc bằng tế bào hoạt hóa huỳnh quang hoặc phương pháp phân loại tế bào (FACS) hoặc phương pháp hoặc phương pháp phân loại có từ tính

Sáng chế này bộc lộ kiểu hình của tế bào gốc của thai nhi mà là CD133-dương tính, CD140a-dương tính, CD9-dương tính, CD44-âm tính, PSA-NCAM- dương tính, A2B5-dương tính, O4-dương tính, và NG2-dương tính. Thông tin này có khả năng để lựa chọn hoặc làm giàu tế bào gốc của thai nhi mà không nuôi cấy. CD133 chỉ thị phân tử cho tế bào gốc thần kinh và không được biểu hiện trong các tế bào tiền chất hoặc sinh sản. CD9 cũng được sử dụng như là chỉ thị phân tử cho tế bào gốc thần kinh nhưng một vài tế bào thần kinh đệm ít gai được biết để biểu hiện CD9. PSA-NCAM và A2B5 được sử dụng để phát hiện tiền chất giwois hạn thần kinh hoặc tiền chất giới hạn thần kinh đệm. Hầu hết tiêng chất và sinh sản thần kinh được cho là biểu hiện PSA-NCAM và A2B5 hoặc PSA-NCAM hoặc A2B5, tác dụng của chúng không thể làm giàu tế bào gốc của thai nhi quá tốt, đặc biệt trong kì 3 tháng đầu tiên và thứ hai. CD140a, NG2, A2B5 và O4 được sử dụng như chỉ thị phân tử cho tế bào tiền chất của tế bào thần kinh đệm ít gai, tiền tế bào thần kinh đệm ít gai và tế bào thần kinh đệm ít gai. Mức độ biểu hiện của CD140a và NG2 trong tế bào gốc của thai nhi cao hơn trong tế bào tiền chất của tế bào thần kinh đệm ít gai, tiền tế bào thần kinh đệm ít gai hoặc tế

bào thần kinh đệm ít gai, trong khi mức độ biểu hiện của A2B5 và O4 trong tế bào gốc của thai nhi thấp hơn trong tế bào tiền chất của tế bào thần kinh đệm ít gai, tiền tế bào thần kinh đệm ít gai, hoặc tế bào thần kinh đệm ít gai. Tác dụng của CD140a và NG2 được cho là thích hợp để làm giàu tế bào gốc của thai nhi. Dựa trên thông tin ở trên và dữ liệu được mô tả trong sáng chế này, hiệu quả của mỗi chỉ thị phân tử để làm giàu tế bào gốc của thai nhi sẽ là $CD140a > NG2 > CD9 > CD133 > A2B5 > O4$, PSA-NCAM nhưng thứ tự này sẽ khác nhau tùy thuộc vào tuần tuổi thai của chúng.

Tuy nhiên, chỉ thị phân tử đơn sẽ không đủ để chọn tế bào gốc của thai nhi và hỗn hợp của 2 chỉ thị phân tử có thể chọn đặc hiệu hơn. Hỗn hợp của một trong các chỉ thị phân tử của tế bào gốc thần kinh (CD133 hoặc CD9) và một trong các chỉ thị phân tử của dòng tế bào thần kinh đệm ít gai (CD 140a, NG2) sẽ hiệu quả để chọn. Dựa trên kiến thức trên, hỗn hợp hiệu quả nhất để chọn tế bào gốc của thai nhi sẽ là CD33 và CD140a trong số hỗn hợp này nhưng hỗn hợp khác cũng nên chọn hiệu quả hơn với một chỉ thị phân tử đơn.

Tần suất xuất hiện của CD133 hoặc CD140a thường thấp (nhỏ hơn 5%) và sự xuất hiện của CD 140a (biểu hiện bắt đầu từ khoảng tuần 8 và tối đa ở khoảng tuần thứ 18 của tuổi thai) muộn hơn của CD133. Do đó, tế bào biểu hiện cả CD133 và CD140a sẽ rất thấp (nhỏ hơn 1% của tổng số) tùy thuộc vào tuần tuổi thai của chúng. Hầu hết tế bào CD133-dương tính có thể không biểu hiện CD140a nếu tế bào thu được từ mô thai nhi ở tuần thai thứ 15 hoặc sớm hơn. Bởi vì tế bào CD133-dương tính và CD140a-âm tính sẽ biểu hiện CD140a muộn hơn, tế bào gốc của thai nhi có thể thu được khi tế bào được nuôi cấy trong cùng điều kiện cho tế bào gốc của thai nhi sau sự làm giàu ban đầu của tế bào CD133-dương tính.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Tế bào thần kinh có thể nhân rộng được phân lập ở người, trong đó tế bào là tế bào sinh sản hoặc tế bào gốc,

trong đó tế bào thu được từ thai của động vật có vú không phải từ phôi của người và được nuôi cấy dưới điều kiện hiệu quả để làm giàu tế bào thần kinh có thể nhân rộng, các điều kiện này bao gồm, môi trường nuôi cấy chứa lượng có hiệu quả của chất bổ sung sinh trưởng, để phân lập tế bào thần kinh thai nhi,

trong đó tế bào duy trì khả năng của nó để biệt hóa thành tế bào thần kinh đệm, tế bào hình sao, và tế bào thần kinh đệm ít gai, trong đó tế bào duy trì năng lực của nó để biệt hóa thành dòng tế bào thần kinh đệm ít gai hiệu quả trong suốt các giai đoạn tiếp theo, và trong đó tế bào biểu hiện ít nhất các kháng nguyên bề mặt tế bào CD133, CD140a, A2B5 và PSA-NCAM.
2. Tế bào thần kinh có thể nhân rộng được phân lập ở người theo điểm 1, trong đó tế bào này được nộp lưu với số truy nhập ATCC là PTA-12291.
3. Tế bào thần kinh có thể nhân rộng được phân lập ở người theo điểm 1, trong đó tế bào thu được từ mô thần kinh thai nhi được chọn từ nhóm bao gồm tủy sống, vỏ não, vùng hải mã, thể vân, phần nền não trước, trung não phần bụng, nhân lục, vùng dưới đồi, tiểu não, thể chai và thần kinh thị giác.
4. Tế bào thần kinh có thể nhân rộng được phân lập ở người theo điểm 1, trong đó mô thần kinh được phân lập từ tủy sống của thai nhi có tuổi thai từ 12-24 tuần.
5. Tế bào thần kinh có thể nhân rộng được phân lập ở người theo điểm 1, trong đó lượng có hiệu quả của chất bổ sung sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy ít nhất là 10 μ M 1-thioglycerol, tốt hơn là 10-100 μ M 1-thioglycerol, và tốt hơn nữa là 50 μ M 1-thioglycerol.
6. Tế bào thần kinh có thể nhân rộng được phân lập ở người theo điểm 1, trong đó điều kiện nuôi cấy còn bao gồm, hai yếu tố sinh trưởng, và một yếu tố sinh tồn;

trong đó tốt hơn là hai yếu tố sinh trưởng là yếu tố sinh trưởng thu được từ tiểu cầu (platelet derived growth factor - PDGF) và yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi cơ bản

(basic fibroblast growth factor - bFGF) và xuất hiện ở nồng độ ít nhất là 5ng/ml PDGF và ít nhất là 2,5ng/ml bFGF để phân lập tế bào thần kinh ở người;

hoặc tốt hơn là trong đó hai yếu tố sinh trưởng là PDGF và bFGF và xuất hiện ở nồng độ 40ng/ml đến 200ng/ml PDGF và 5ng/ml đến 40ng/ml bFGF để phân lập tế bào thần kinh ở người;

hoặc tốt hơn là trong đó hai yếu tố sinh trưởng là PDGF và bFGF và xuất hiện ở nồng độ ít nhất là 1ng/ml PDGF và ít nhất là 0,5ng/ml bFGF để nhân rộng tế bào HFSC sau khi tạo ra dòng tế bào và để duy trì tế bào;

hoặc tốt hơn là trong đó hai yếu tố sinh trưởng là PDGF và bFGF và xuất hiện ở nồng độ 5ng/ml đến 100ng/ml PDGF và 1ng/ml đến khoảng 50ng/ml bFGF để nhân rộng tế bào thần kinh ở người sau khi được tạo ra;

và tốt hơn là trong đó một yếu tố sinh tồn là yếu tố sinh trưởng giống như insulin (Insulin-like growth factor - IGF) xuất hiện ở nồng độ ít nhất là 1ng/ml IGF, hoặc tốt hơn là ở nồng độ 5ng/ml đến 100ng/ml IGF.

7. Tế bào thần kinh có thể nhân rộng được phân lập ở người theo điểm 6, trong đó trong phân lập tế bào, lượng có hiệu quả của chất bổ sung sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy ít nhất là 10 μ M 1-thioglycerol, tốt hơn là 10-100 μ M 1-thioglycerol, và tốt hơn nữa là 50 μ M 1-thioglycerol.

8. Dược phẩm tế bào thần kinh gốc chứa tế bào thần kinh có thể nhân rộng được phân lập ở người theo điểm 1.

9. Quần thể được làm giàu tế bào thần kinh được nhân rộng ở người, trong đó các tế bào là tế bào sinh sản hoặc tế bào gốc,

trong đó các tế bào được nuôi cấy dưới các điều kiện hiệu quả để làm giàu các tế bào thần kinh được nhân rộng, các điều kiện này bao gồm, môi trường nuôi cấy chứa lượng có hiệu quả của chất bổ sung sinh trưởng,

trong đó các tế bào duy trì khả năng của chúng để biệt hóa thành tế bào thần kinh đệm, tế bào hình sao, và tế bào thần kinh đệm ít gai,

trong đó các tế bào duy trì khả năng của chúng để biệt hóa thành dòng tế bào thần kinh đệm ít gai hiệu quả trong suốt các giai đoạn tiếp theo, và trong đó quần thể của các tế

bào biểu hiện ít nhất các kháng nguyên bề mặt tế bào CD133, CD140a, A2B5 và PSA-NCAM, và trong đó các tế bào không thu được từ phôi của người.

10. Quần thể được làm giàu theo điểm 9, trong đó chất bổ sung sinh trưởng là 1-thioglyxerol và lượng có hiệu quả của chất bổ sung sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy ít nhất là 10 μ M 1-thioglyxerol, tốt hơn là 10-100 μ M 1-thioglyxerol, và tốt hơn nữa là 50 μ M 1-thioglyxerol để phân lập các tế bào thần kinh thai nhi.

11. Phương pháp *in vitro* để nuôi cấy tế bào thần kinh có thể nhân rộng, trong đó tế bào là tế bào sinh sản hoặc tế bào gốc được phân lập từ hệ thần kinh trung ương của động vật có vú, trong đó tế bào này duy trì khả năng của nó để biệt hóa thành tế bào thần kinh đệm, tế bào hình sao, và tế bào thần kinh đệm ít gai và khả năng của nó để biệt hóa thành dòng tế bào thần kinh đệm ít gai hiệu quả, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) phân lập và tách ít nhất một tế bào từ mô thần kinh thai nhi,

b) nuôi cấy tế bào ở nhiệt độ 37°C, trong khí quyển chứa 1-20% O₂, và 5% CO₂, và trong môi trường nuôi cấy không có huyết thanh được xác định hóa học, trong đó môi trường chứa:

- ít nhất là 5ng/ml PDGF-AA

- ít nhất là 2,5ng/ml bFGF, và

- ít nhất là 10 μ M 1-thioglyxerol,

c) chuyển tế bào từ b) để thu được tế bào thần kinh có thể nhân rộng ở người và, tốt hơn là trong đó môi trường nuôi cấy còn chứa ít nhất là 1,0ng/ml IGF-1;

và tốt hơn là trong đó ở bước a) mô thần kinh được chọn từ nhóm bao gồm tủy sống, vỏ não, vùng hải mã, thể vân, phần nền não trước, trung não phần bụng, nhân lục, vùng dưới đồi, tiểu não, thể chai và thần kinh thị giác;

và tốt hơn là trong đó trong bước a), mô thần kinh là từ tủy sống thai nhi, tốt hơn là tủy sống thai nhi có tuổi thai 12 - 24 tuần, và tốt hơn là trong đó trong bước a), việc phân lập được thực hiện bằng phương pháp phân lập, phương pháp này được chọn từ phương pháp mà được dùng ít nhất một trong các phương pháp phân loại tế bào kích hoạt huỳnh quang (fluorescence activated cell sorting - FACS) hoặc phân tích miễn dịch.

12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó trong bước b), môi trường nuôi cấy chứa:

- 40-200ng/ml PDGF-AA,
- 5-100ng/ml bFGF,
- 10-100 μ M 1-thioglycerol, và
- 5-100ng/ml IGF-1,

và tốt hơn là môi trường nuôi cấy không có huyết thanh được xác định hóa học chứa DMEM/F12 được bổ sung các axit amin không thiết yếu, glutamin, pyruvat, B27, N-acetyl-cysteine và β -mercaptoethanol.

13. Được phẩm tế bào thần kinh gốc bao gồm tế bào thần kinh có thể nhân rộng mà được nuôi cấy *in vitro* bằng phương pháp theo điểm 11, trong đó tế bào thần kinh có thể nhân rộng biểu hiện ít nhất kháng nguyên bề mặt tế bào CD133, CD140a, A2B5 và PSA-NCAM.

14. Phương pháp phân lập tế bào thần kinh có thể nhân rộng ở người, trong đó tế bào là tế bào sinh sản hoặc tế bào gốc được phân lập từ hệ thần kinh trung ương của động vật có vú, trong đó tế bào này duy trì khả năng của nó để biệt hóa thành tế bào thần kinh đệm, tế bào hình sao, và tế bào thần kinh đệm ít gai và khả năng của nó để biệt hóa thành dòng tế bào dòng tế bào thần kinh đệm ít gai hiệu quả, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- xác định và tách ít nhất một tế bào từ mô thần kinh không phải phôi ở người;
- nuôi cấy tế bào đã được tách trong môi trường nuôi cấy để phân lập các tế bào thần kinh thai nhi, ở nhiệt độ 37°C, trong khí quyển chứa 1-20% O₂, và 5% CO₂, và trong môi trường nuôi cấy không có huyết thanh được xác định hóa học, trong đó môi trường nuôi cấy chứa ít nhất là 5ng/ml PDGF-AA, ít nhất là 2,5ng/ml bFGF, và ít nhất là 10 μ M 1-thioglycerol;
- chuyển tế bào được nuôi cấy để thu được các tế bào thần kinh có thể nhân rộng ở người.

15. Phương pháp theo điểm 14, trong đó môi trường nuôi cấy còn chứa ít nhất là 1,0ng/ml IGF-1.

16. Nuôi cấy *in vitro* bao gồm ít nhất một tế bào thần kinh được phân lập thu được từ hệ thần kinh trung ương của động vật có vú, trong đó tế bào được phân lập được ngáp trong môi trường nuôi cấy không có huyết thanh được xác định hóa học chứa:

- ít nhất là 5ng/ml PDGF-AA,

- ít nhất là 1ng/ml bFGF; và

- ít nhất là 10 μ M 1-thioglycerol;

và tốt hơn là còn chứa ít nhất là 1,0ng/ml IGF-1;

và tốt hơn là trong đó môi trường nuôi cấy không có huyết thanh được xác định hóa học còn chứa DMEM/F12 được bổ sung các axit amin không thiết yếu, glutamin, pyruvat, B27, N-acetyl-cysteine và β -mercaptoethanol;

và tốt hơn là trong đó tế bào thần kinh là CD133-dương tính, A2B5, PSA-NCAM và CD140a-dương tính.

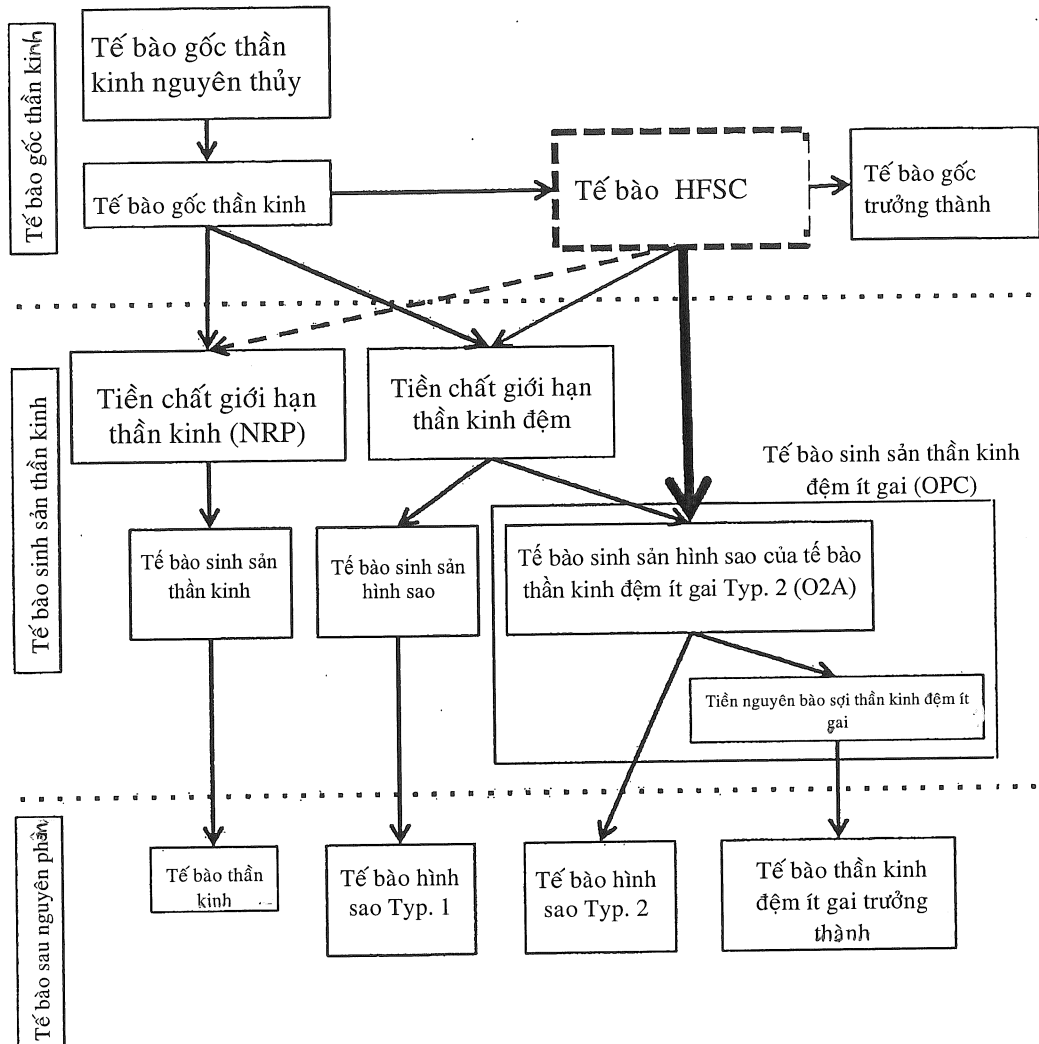


Fig. 1

Loại tế bào	Các chỉ thị phân tử dương tính	Các chỉ thị phân tử âm tính
Tế bào HFSC	CD133, Sox2, Nestin, CD9, NG2, CD140a (PDGF-R α), A2B5 (yếu) O4 (yếu), Olig2, PSA-NCAM	CD44, GFAP, Sợi thần kinh
Tế bào gốc thần kinh	CD133, Nestin, Sox2, Integrin β 1/CD29, SSEA-1/LEX/CD15, CXCR4/CD184	CD34, CD45, CD44
Thần kinh đệm xuyên tâm	GLAST, Vimentin, RC2, BLBP	
Tiền chất giới hạn thần kinh (NRP)	PSA-NCAM, CD56	A2B5
Tiền chất giới hạn thần kinh đệm	A2B5	PSA-NCAM
Tế bào sinh sản thần kinh	PSA-NCAM, Beta III tubulin, Nestin	A2B5
Tế bào thần kinh chưa trưởng thành	" III tubulin, cortin đôi	
Tế bào thần kinh trưởng thành	MAP2, Sợi thần kinh, Tau	
Tế bào sinh sản hình sao	S100 β , CD44	GFAP
Tế bào hình sao Typ. 1	GFAP	A2B5
Tế bào hình sao Typ. 2	GFAP, A2B5	
Tế bào sinh sản hình sao của tế bào thần kinh đệm ít gai Typ. 2 (O2A)	CD140a (PDGF-R α), Olig2, NG2, A2B5, GD3, O4 (yếu),	CD133
Tiền nguyên bào sợi	NG2, A2B5, GD3 (yếu), O4, Sox10	CD133, Sox2, GalC, CNPaza, MBP, PLP
Tế bào thần kinh đệm ít gai chưa trưởng thành	A2B5, O4 (mạnh), GalC, CNPaza (2',3'-xyclic-nucleotit 3'-phosphodiesteraza)	MBP
Tế bào thần kinh đệm ít gai trưởng thành	MBP, CNPaza, PLP	NG2, GalC

Fig. 2

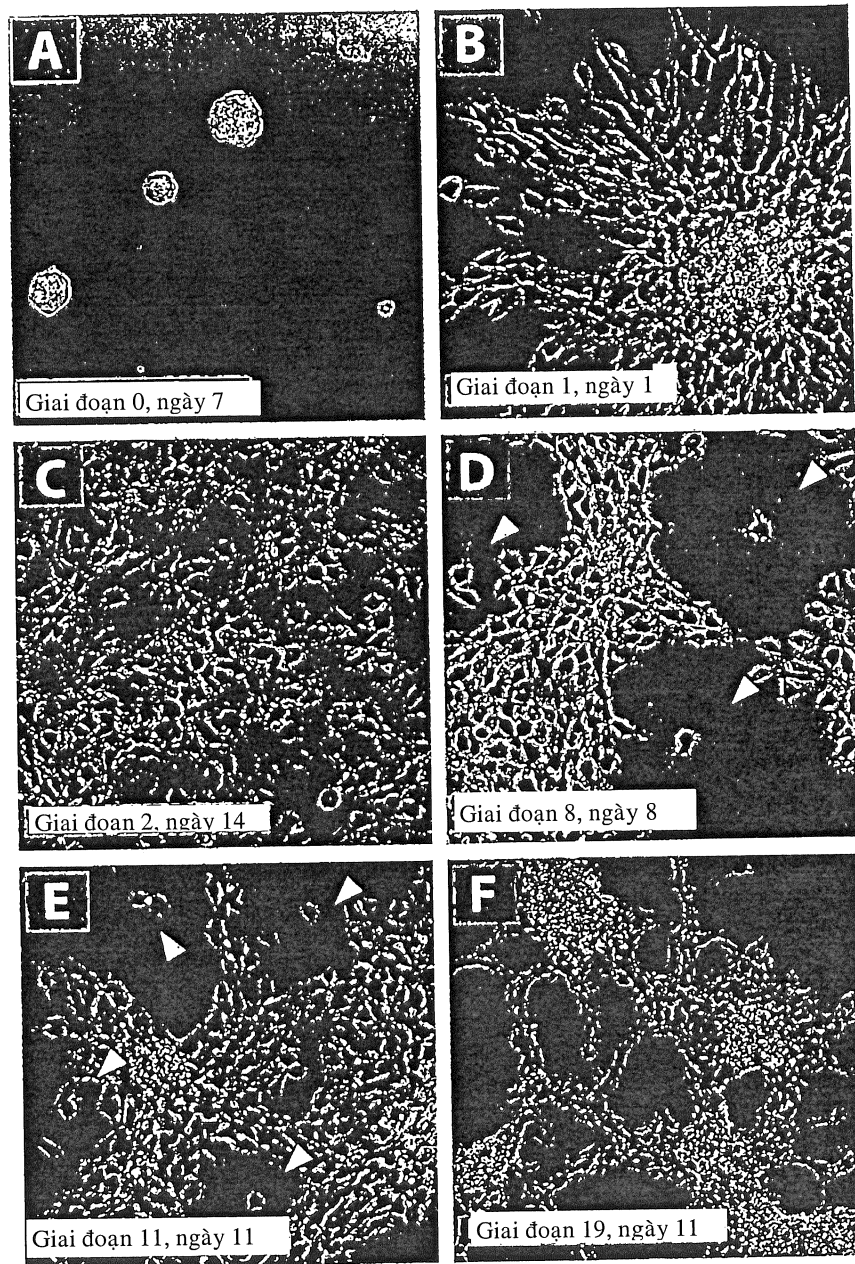


Fig. 3

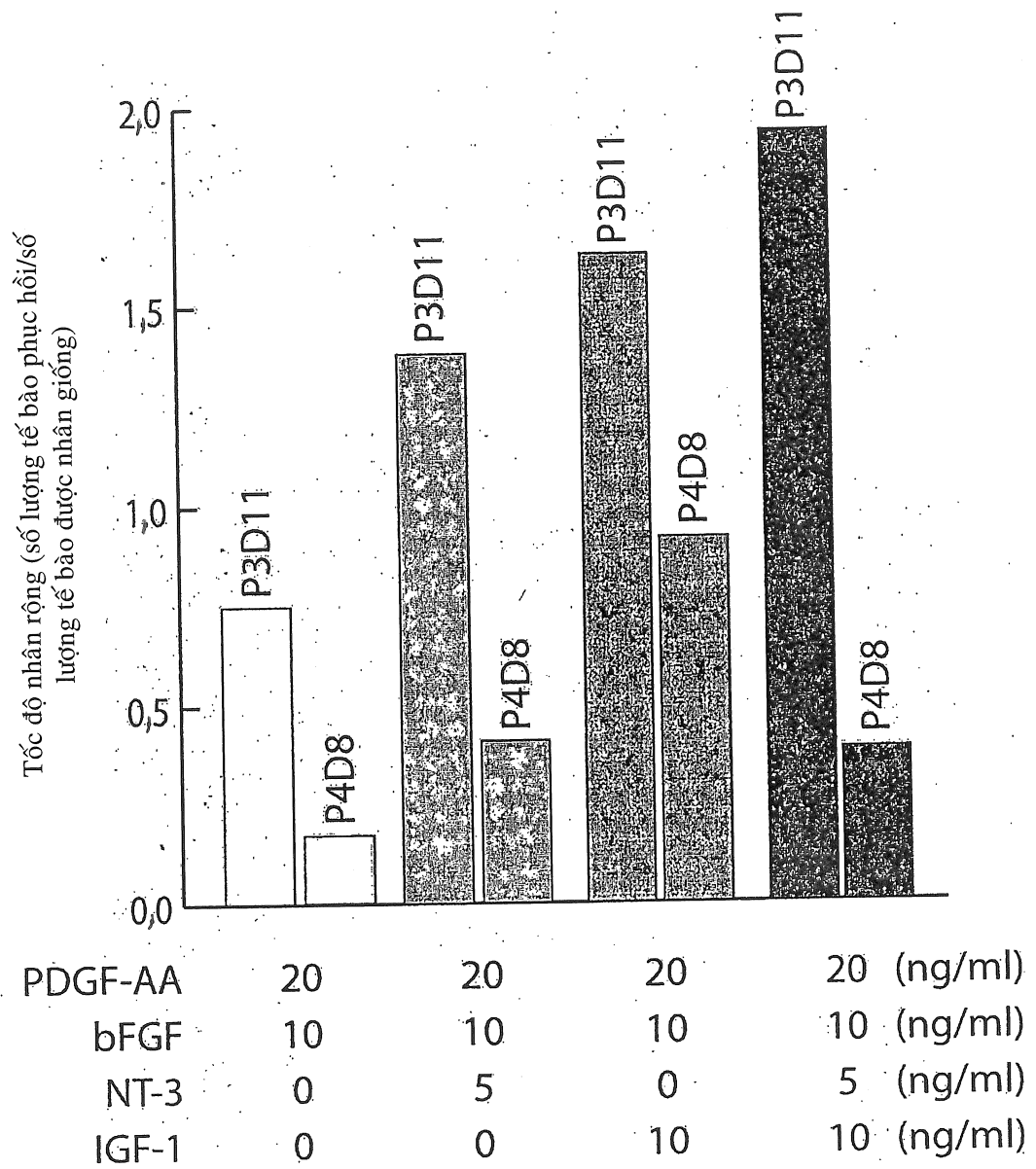


Fig. 4

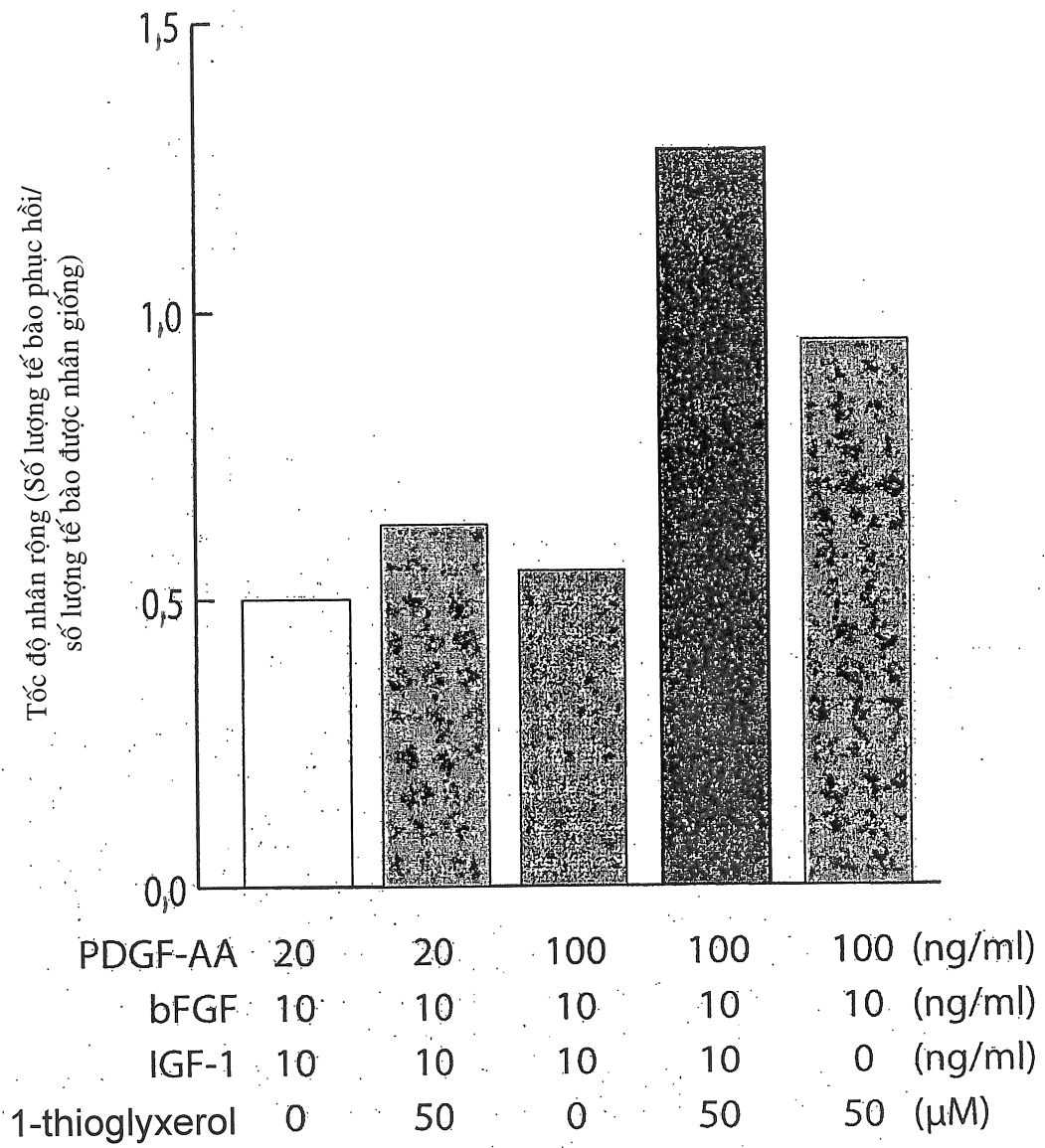


Fig. 5

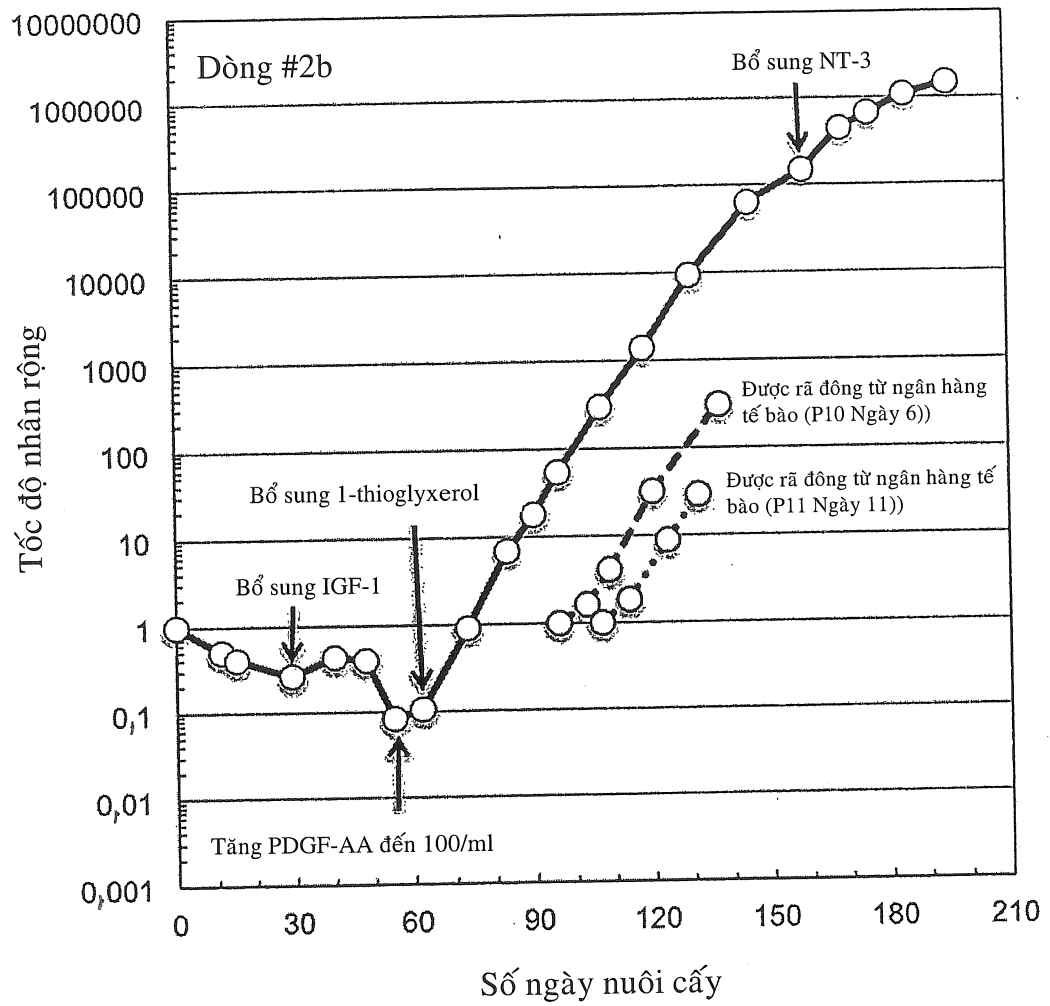


Fig. 6

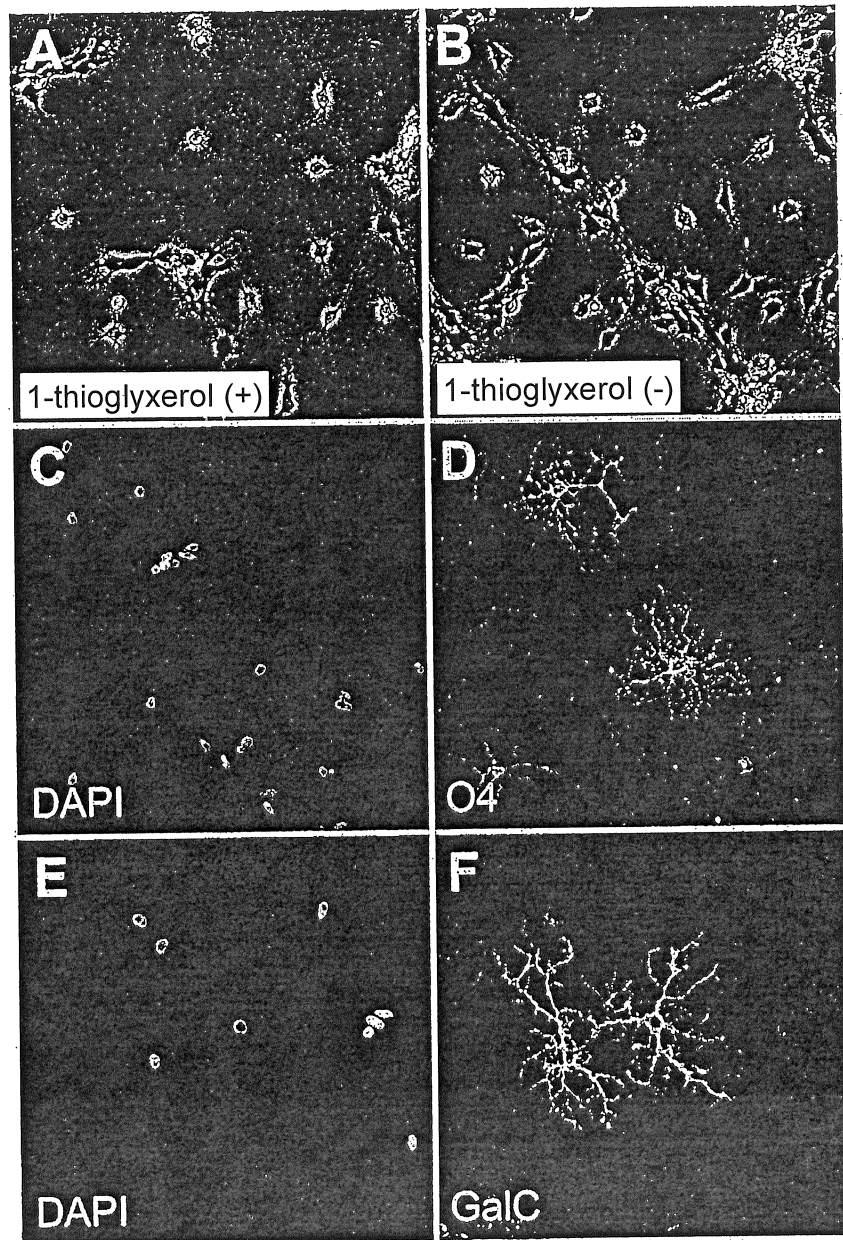


Fig. 7

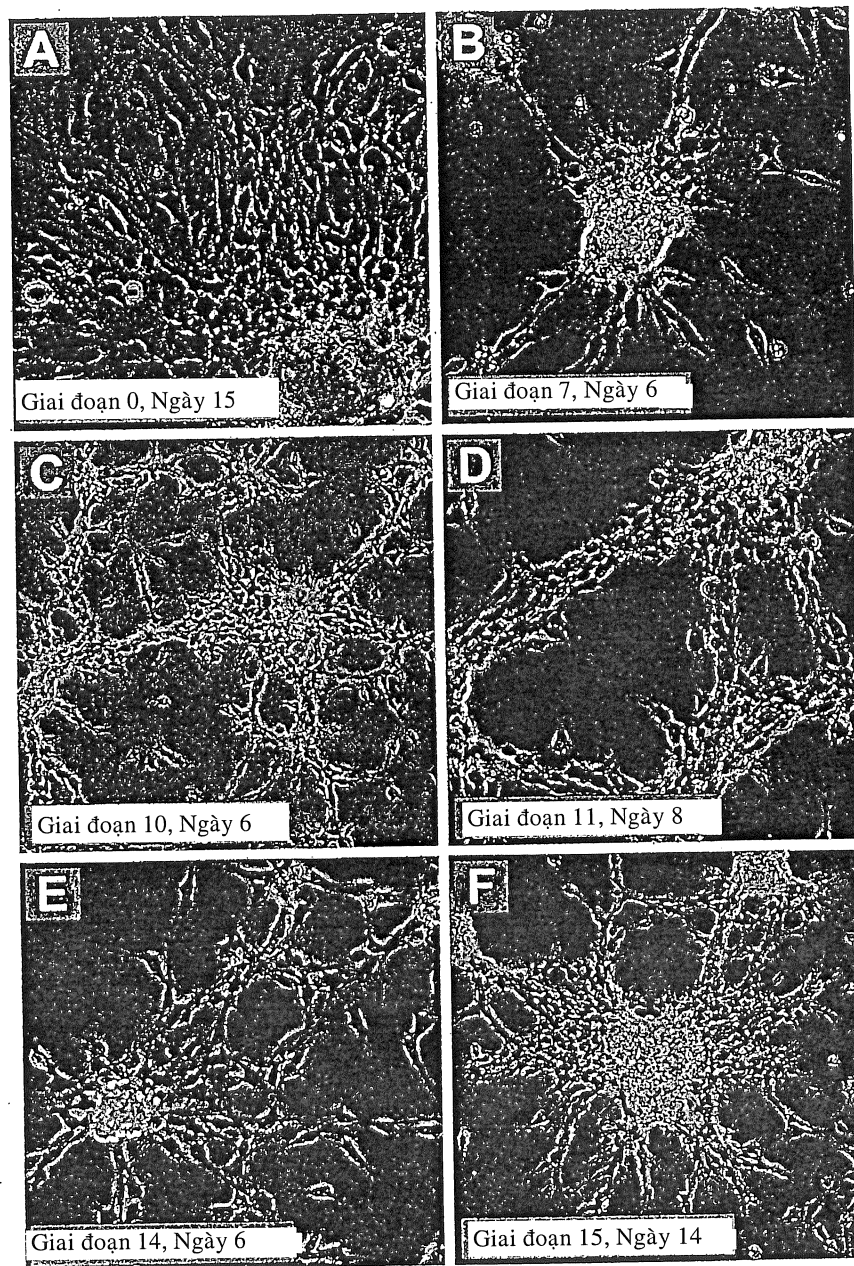


Fig. 8

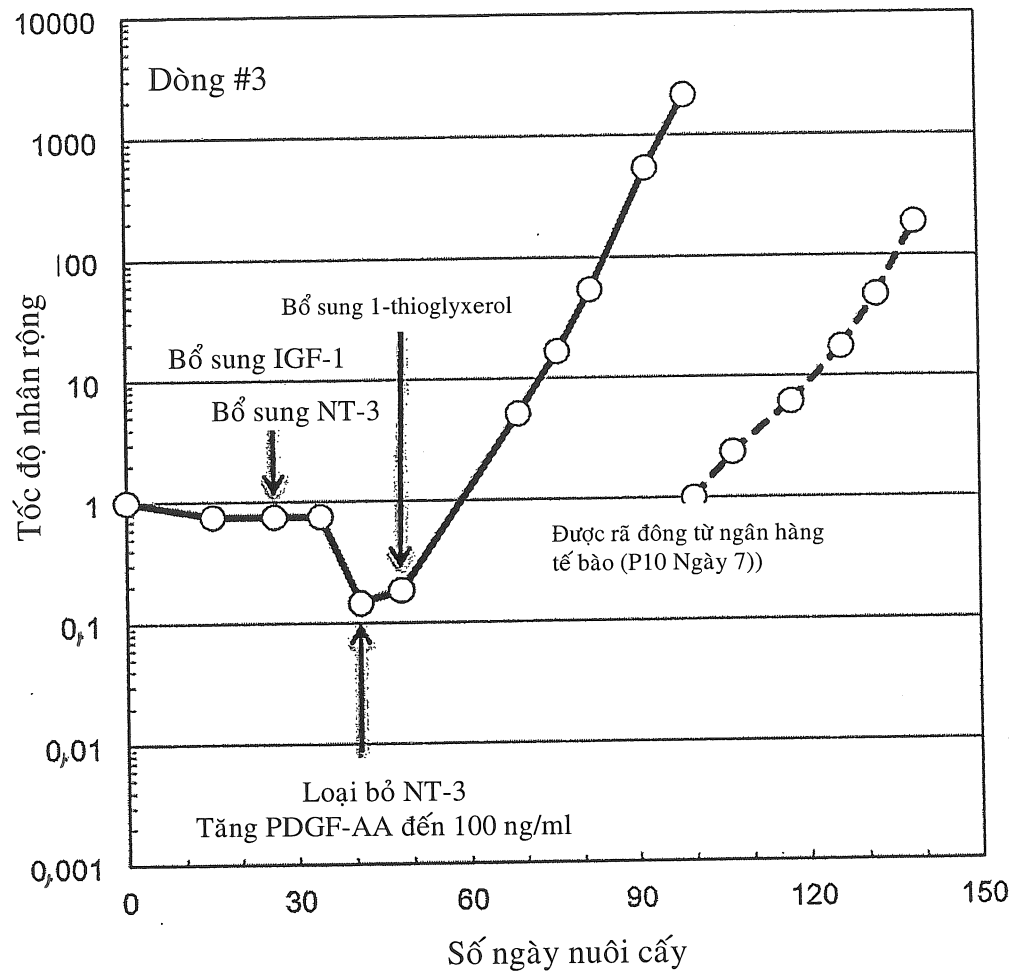


Fig. 9

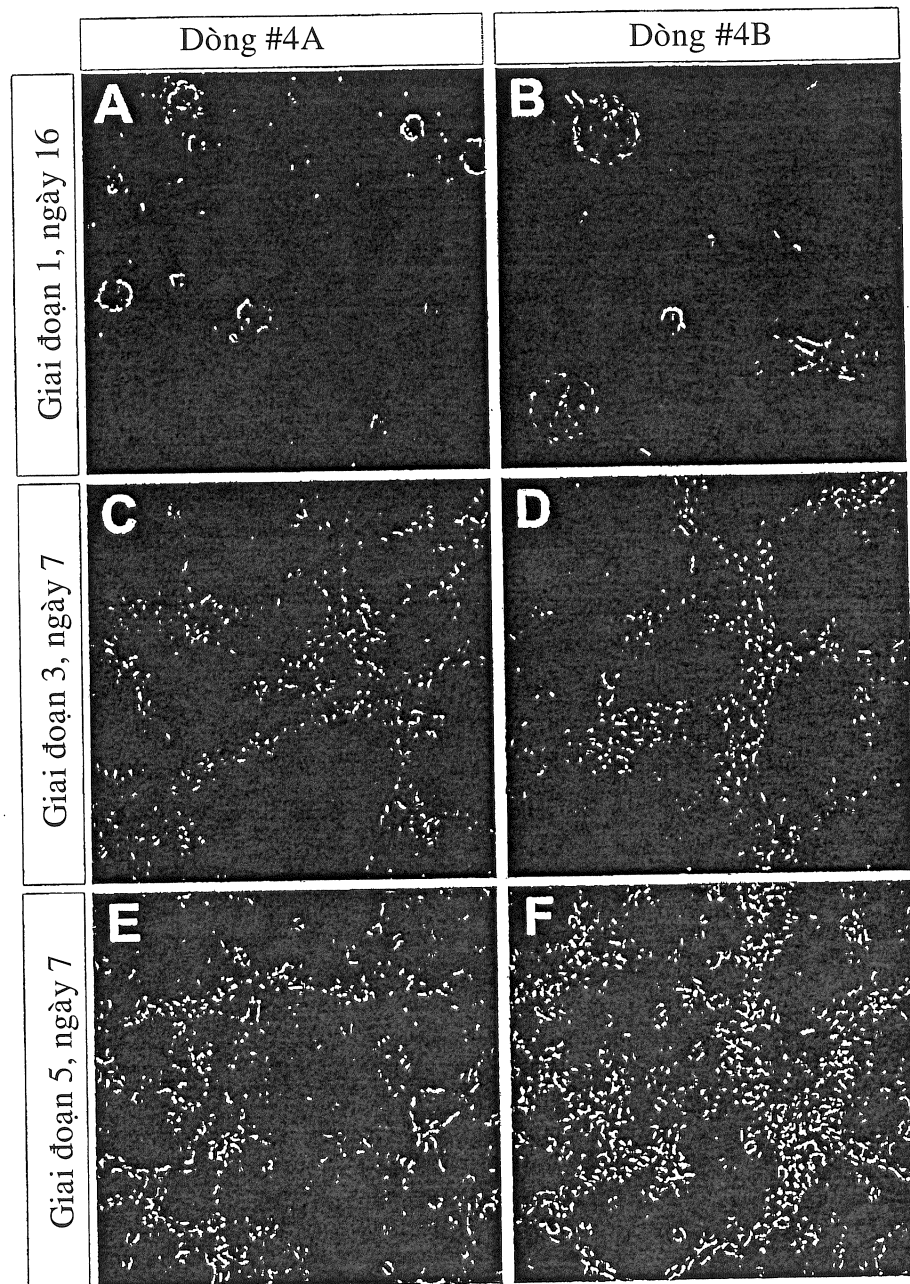


Fig. 10

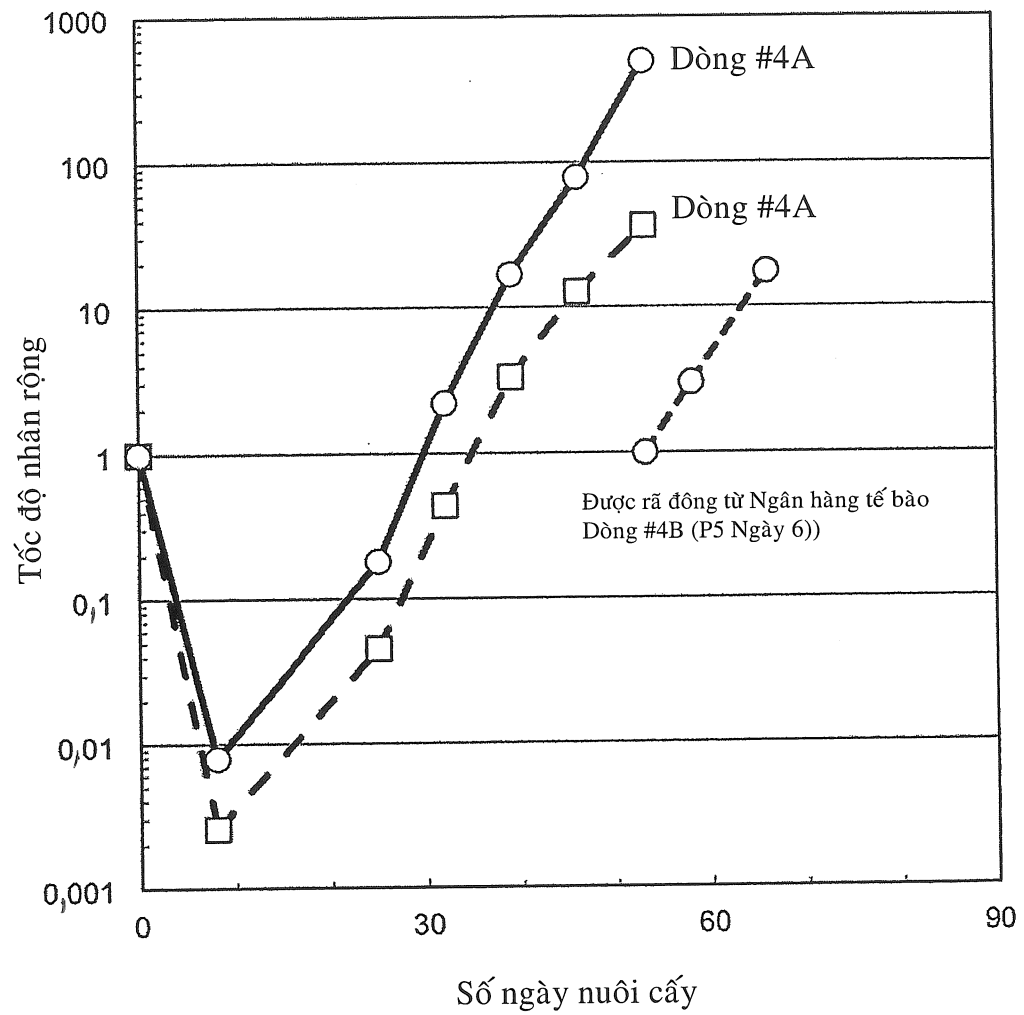


Fig. 11

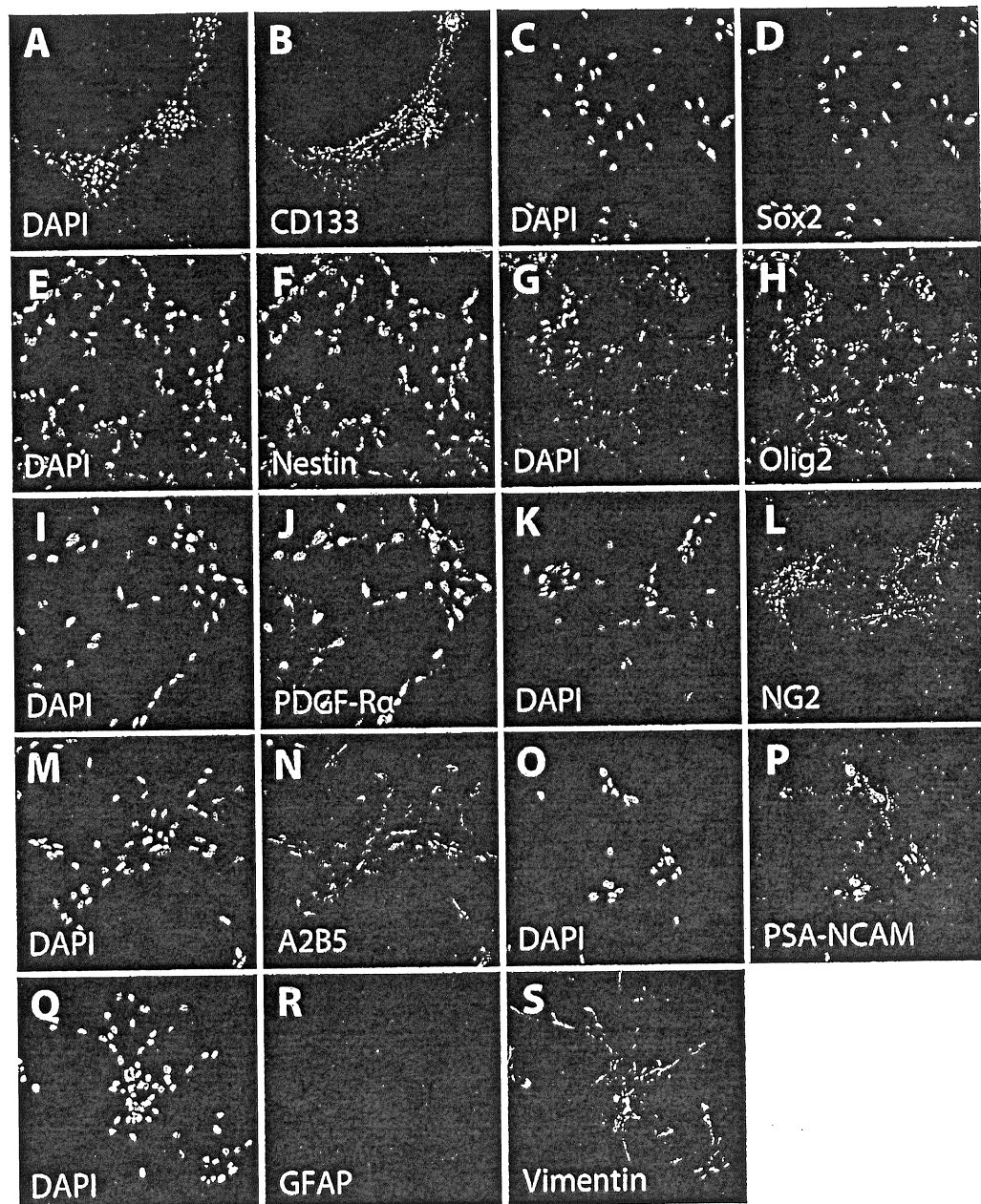


Fig. 12

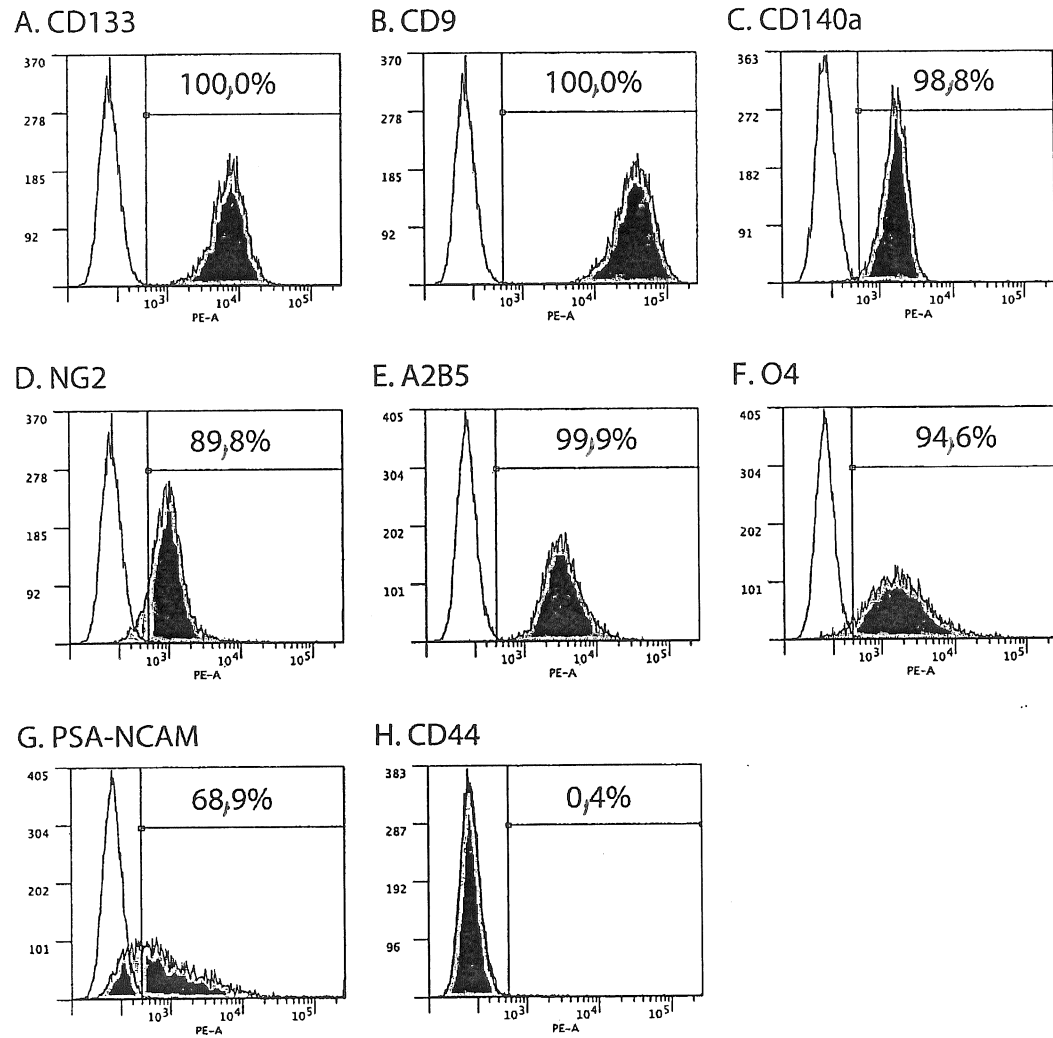


Fig. 13

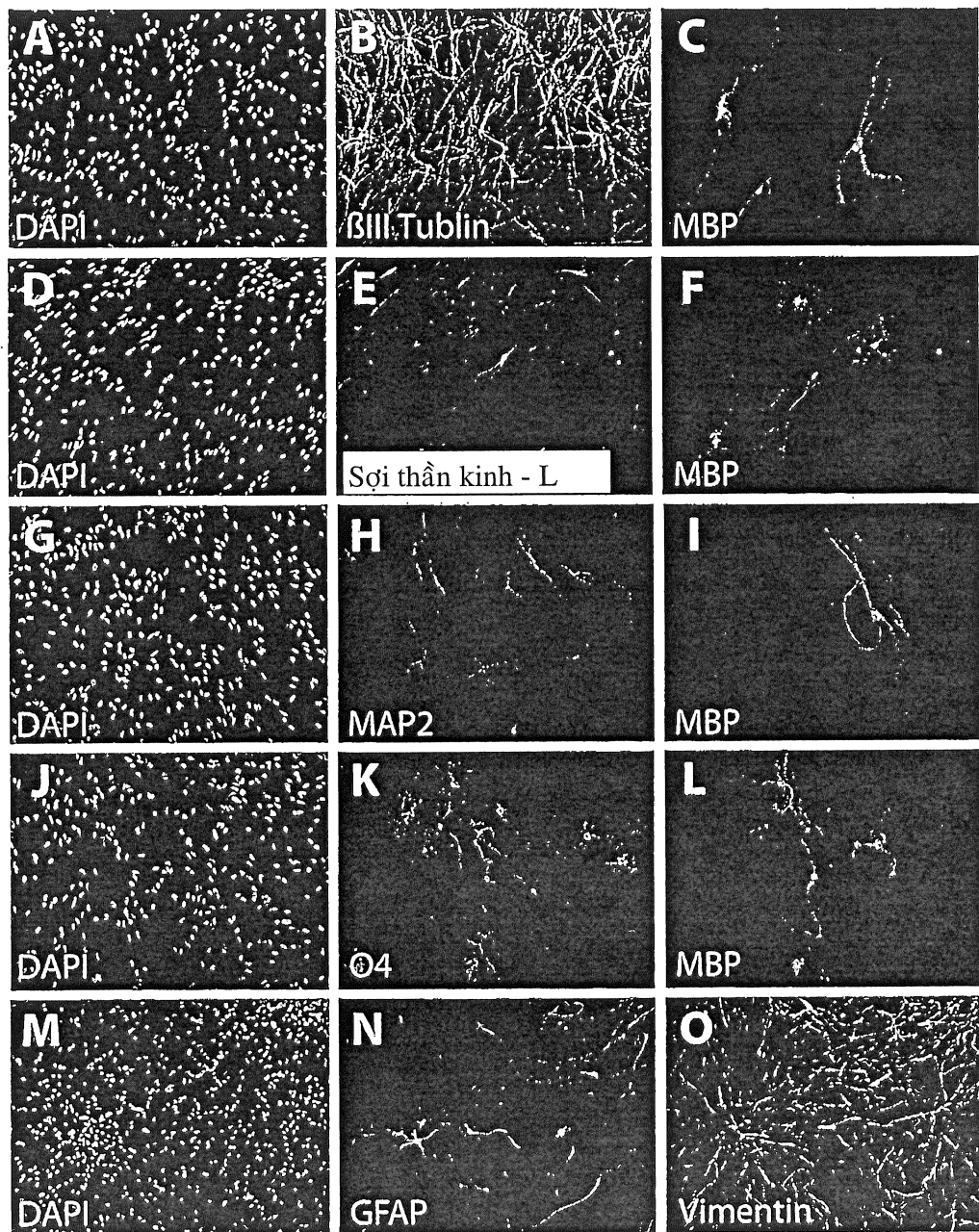


Fig. 14

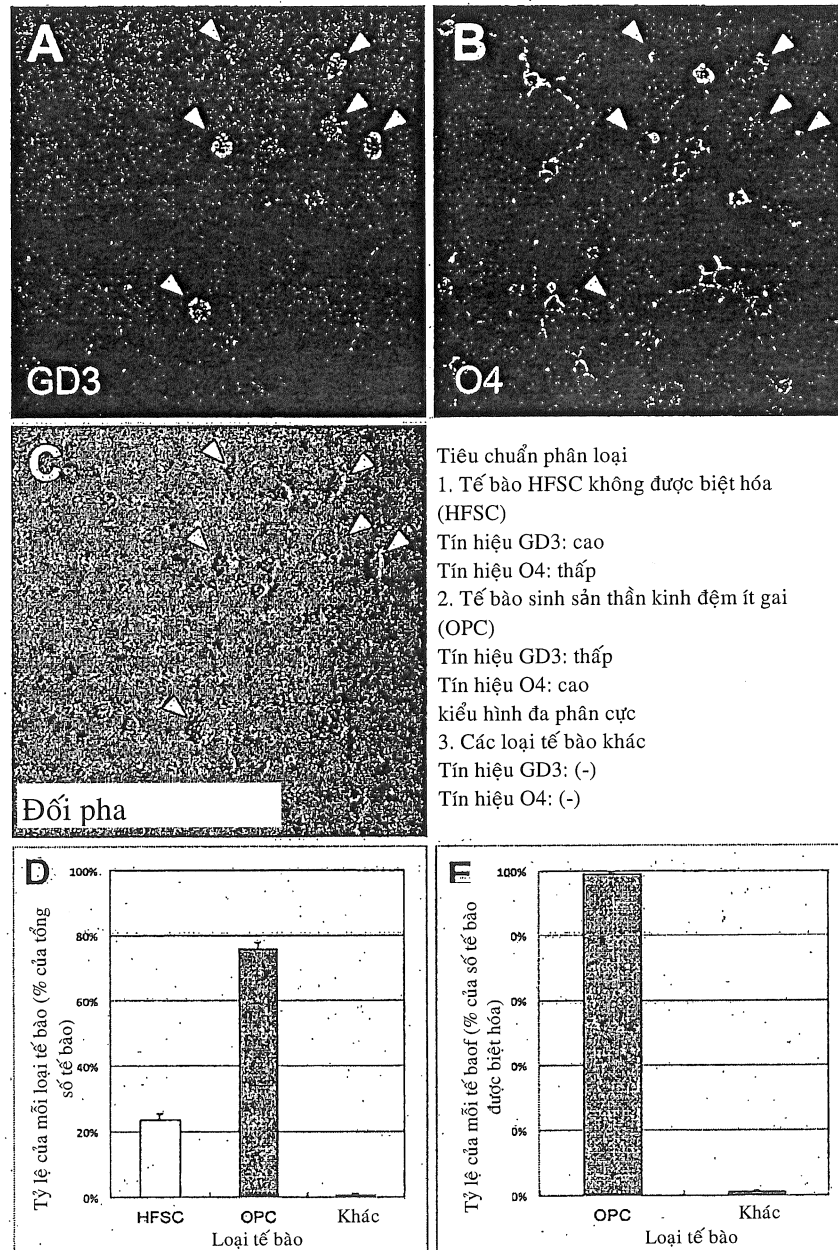


Fig. 15