



(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)



1-0030137

(51)⁷ C12N 5/10; A61K 9/08; A61K 9/12; (13) B
A61K 9/14; A61K 9/70; A61P 1/02;
A61P 17/02; A61P 19/00; A61P 25/00;
A61P 25/08; A61P 25/16; A61P 25/18;
A61P 25/24; A61P 25/28; A61P 31/00;
A61P 31/14; A61P 9/00; C12N 15/09;
A61K 35/12; A61K 9/06

(21) 1-2014-03255

(22) 28/03/2013

(86) PCT/JP2013/059376 28/03/2013

(87) WO/2013/147082 03/10/2013

(30) 2012-073594 28/03/2012 JP; 2012-187321 28/08/2012 JP; 2012-275169 17/12/2012 JP; 2013-026886 14/02/2013 JP

(45) 25/11/2021 404

(43) 25/03/2015 324A

(73) Quarrymen & Co. Inc. (JP)

14-23, Seijo 6-chome, Setagaya-ku, Tokyo 1570066, Japan.

(72) UEDA, Minoru (JP).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) TẾ BÀO GỐC ĐƯỢC LÀM BẤT TỬ VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA TẾ BÀO GỐC NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến tế bào gốc được làm bất tử, mà sản xuất ra các yếu tố sinh trưởng có khả năng tái sinh các loại mô khác nhau đã bị tổn thương do nhiều nguyên nhân, và phương pháp tạo ra tế bào gốc được làm bất tử. Sáng chế đề cập đến tế bào gốc được làm bất tử thu được bằng cách phân lập tế bào gốc được chọn từ nhóm bao gồm tế bào trung mô của động vật có vú, phôi ở giai đoạn sớm của tế bào phát triển và tế bào soma, đầu tiên nuôi cấy tế bào này để tạo ra tế bào nuôi cấy giai đoạn thứ nhất, chuyển bốn loại gen vào trong tế bào nuôi cấy giai đoạn thứ nhất này để tạo ra tế bào chuyển gen, và chọn lọc tế bào gốc được làm bất tử mong muốn từ các tế bào chuyển gen bằng cách sử dụng mức độ biểu hiện của STRO-1 làm chỉ số.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến tế bào gốc được làm bất tử thu được từ tủy răng, và được phẩm và chế phẩm thuốc chứa chúng làm thành phần hoạt tính. Cụ thể, sáng chế đề cập đến tế bào gốc được làm bất tử được tạo ra bằng cách cải biến tế bào gốc thu được từ răng sữa của người hoặc răng vĩnh cửu của người được nhổ hoặc tự rụng một cách tự nhiên, được phẩm chứa nhiều loại yếu tố sinh trưởng được tạo ra bởi tế bào được làm bất tử này, và chế phẩm thuốc chứa chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Phương pháp phục hồi chức năng cho mô bị tổn thương do nhiều nguyên nhân khác nhau nói chung được chia thành liệu pháp cấy ghép và liệu pháp tái tạo. Liệu pháp cấy ghép được định nghĩa là cơ quan thu được từ đối tượng cho được cấy ghép để thay thế chúng để phục hồi chức năng bị mất của cơ thể sống.

Ngược lại, liệu pháp tái tạo được định nghĩa là tế bào hoặc mô từ một vài cá nhân gồm cả chính bệnh nhân được nuôi cấy để xử lý để tạo thành các cơ quan; và sau đó chúng được thay thế cho các cơ quan bị tổn thương để phục hồi hoặc tái tạo chúng bằng cách sử dụng tế bào gốc.

Hiện nay, ba loại tế bào như tế bào gốc soma của người, tế bào gốc phôi người (tế bào ES), và tế bào gốc đa năng cảm ứng của người (tế bào iPS) được sử dụng hoặc chúng có thể được đưa vào liệu pháp tái tạo này.

Ở đây, tế bào gốc soma của người đã được sử dụng trong nghiên cứu. Tế bào này tồn tại trong các mô trưởng thành và có đặc tính là chúng chỉ có thể biệt hóa thành mô, hoặc cơ quan cụ thể. Lưu ý là “tế bào trung mô” tồn tại trong tủy xương hoặc tế bào mỡ thường không thể được biệt hóa thành các loại mô như xương, sụn, động mạch và tĩnh mạch. Khi tế bào soma này được sử dụng, thì việc sử dụng tế bào tự thân sẽ ngăn ngừa hiện tượng thải loại miễn dịch, và đem lại sự tiếp nhận mảnh ghép tốt. Ngoài ra, chưa có báo cáo rằng việc nuôi cấy tế bào gốc này trong thời gian dài gây hiện tượng ung thư hóa cho chúng.

Nói cách khác, đã biết rằng các tế bào cần biệt hóa được giới hạn đến một số mức

độ, việc thu gom tế bào từ mô của người kéo theo sự xâm lấn, loại mô cần được tạo ra bằng tế bào được biệt hóa được giới hạn đến một số mức độ, và số lần cấy chuyển có thể có được giới hạn từ 40 đến vài lần, cụ thể, 100 đến 200 ngày tính theo số ngày.

Tế bào gốc phôi người (tế bào ES) là tế bào gốc được lấy ra từ “khối nội bào” trong phôi thừa (túi phôi) thu được từ liệu pháp tái tạo và có thể cần được nuôi cấy. Do tế bào này tạo ra u quái như một chỉ số về tính đa năng của nó, người ta cho rằng nó có thể được biệt hóa thành một pha bất kỳ trong các pha ba lá phôi. Đã có báo cáo rằng nó có thể biệt hóa thành cơ tim, dây thần kinh, và võng mạc. Do tế bào gốc phôi (ES) là chủng tế bào được làm bất tử, nên một chủng trong số chúng được nuôi cấy vô hạn. Do đó, trong điều kiện nuôi cấy khắc nghiệt, sản phẩm có các đặc tính đồng đều khi tế bào được sản xuất trên quy mô lớn.

Nói cách khác, nó sử dụng noãn được thụ tinh sao cho cần phải xử lý nghiêm ngặt để không gây ra các vấn đề về đạo đức. Đồng thời, về cơ bản thì chúng là sự cấy ghép khác loài; nên cần phải có phương pháp để ngăn ngừa đáp ứng thải loại bởi đáp ứng miễn dịch. Hơn nữa, cũng biết rằng chúng đòi hỏi tế bào hoặc huyết thanh khác loài khi tế bào được nuôi cấy; và chúng dễ dàng tạo ra u quái (khối u lành) nếu một số lượng rất ít tế bào không được biệt hóa được trộn trong mô tái tạo được cấy ghép.

Tế bào gốc đa năng được cảm ứng (iPS) của người được thiết lập bằng cách đưa một phần của các gen biểu hiện một cách đặc hiệu trong tế bào ES vào trong tế bào trưởng thành của người (hạ bì và tế bào tương tự). Nếu tế bào iPS tự thân được sử dụng, thì vấn đề thải loại miễn dịch không diễn ra; kỹ thuật biệt hóa được sử dụng cho tế bào ES nguyên dạng.

Cuối cùng, tế bào gốc đa năng được cảm ứng (iPS) không sử dụng noãn được thụ tinh dùng trong tế bào ES, nhưng sử dụng mô trưởng thành để có thể sản xuất ra tế bào có chất lượng giống như chất lượng của tế bào gốc phôi. Khi tế bào iPS tự thân được sử dụng, thì không có vấn đề về đáp ứng thải loại bởi đáp ứng miễn dịch.

Nói cách khác, biết rằng các tế bào này dễ dàng trở lại thành tế bào khối u lành hoặc tế bào ung thư (u tế bào phôi) và tỷ lệ các tế bào được thiết lập là tế bào iPS là thấp; do tế bào tương tự về mặt hình thái học với các tế bào ES được chọn từ các tế bào nguyên vẹn mà gen được đưa vào.

Việc sử dụng chính tế bào gốc trong liệu pháp tái tạo gặp phải các vấn đề được

mô tả ở trên. Vì thế, phương pháp sử dụng các yếu tố sinh học được tạo ra bởi các tế bào gốc khác nhau, nhưng không sử dụng chính tế bào gốc đó, ví dụ, nhiều loại yếu tố sinh trưởng khác nhau, được nghiên cứu (WO 2011/118795, dưới đây được gọi là “Tài liệu sáng chế 1”).

Tài liệu sáng chế 1 bộc lộ chế phẩm để điều trị vùng bị tổn thương bao gồm dịch nuôi cấy của tế bào gốc thu được từ như răng sữa của người đã rơi ra khỏi ổ răng và dạng tương tự, cụ thể là dịch nuôi cấy bao gồm các yếu tố sinh trưởng như yếu tố sinh trưởng tế bào biểu mô mạch máu (VEGF), yếu tố sinh trưởng tế bào gan (HGF), yếu tố sinh trưởng giống insulin (IGF), yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu (PDGF), yếu tố sinh trưởng chuyển hóa - β (TGF- β) và yếu tố tương tự.

Danh mục viện dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1 WO 2011/118795

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Tình trạng kỹ thuật là lĩnh vực tuyệt vời xét theo quan điểm là nó đề xuất được phẩm nêu ở trên để điều trị cho vị trí bị tổn thương, có hiệu quả trong việc phục hồi tổn thương ở da lão hóa do ánh nắng, và sự tái tạo xương và ưu điểm tương tự.

Ngược lại, do tế bào gốc thu được từ tủy răng được sử dụng không phải là dòng tế bào được thiết lập, nên không thể thu được dịch nuôi cấy của tế bào gốc đang quan tâm, trừ khi tế bào gốc này được tạo ra ở thời điểm sử dụng, hoặc mẫu được bảo quản lạnh được làm nóng chảy để nuôi tế bào. Vì thế, vấn đề ở đây là rất mất thời gian để thu được dịch nuôi cấy.

Nhìn chung, trong số các tế bào được nuôi cấy, chủng tế bào được thiết lập từ tế bào bình thường không thể phân chia sau từ 50 đến 60 lần cấy chuyển, và tế bào này sẽ chết. Thông thường, tỷ lệ trong chế phẩm của các yếu tố sinh học được tạo ra bởi tế bào được nuôi cấy thay đổi phụ thuộc vào thời gian. Vì thế, vấn đề ở đây là gặp khó khăn trong việc thu được dịch nuôi cấy có tỷ lệ ổn định của chúng, nếu tế bào được tạo dòng có khả năng sinh trưởng không giới hạn.

Nói cách khác, dưới dạng tế bào điển hình có khả năng sinh trưởng không giới hạn, thì tế bào này được đề cập đến là tế bào ung thư. Điều này là do tế bào ung thư mất

kiểm soát nên sinh trưởng không giới hạn, còn sự sinh trưởng và phân chia như vậy ở tế bào bình thường là dưới sự kiểm soát của cơ thể sống. Vì thế, ngay cả khi tế bào này có thể sinh trưởng không giới hạn, thì tế bào chuyển sang ung thư có thể không được sử dụng; do tế bào này có thể tạo ra các yếu tố sinh học có hại cho cơ thể sống.

Như được mô tả ở trên, rất cần thiết lập được tế bào được làm bất tử mà không phải tế bào ung thư, nhưng sinh trưởng không bị giới hạn.

Để sử dụng phần dịch nổi trên bề mặt làm chế phẩm thuốc, thì tế bào gốc bất tử cần có khả năng liên tục tạo ra một số yếu tố sinh học nhất định.

Sáng chế được hoàn thành trong các hoàn cảnh như được đề cập ở trên.

Cụ thể, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất tế bào gốc được làm bất tử, phân lập tế bào gốc được chọn từ nhóm bao gồm tế bào soma của động vật có vú ngoại trừ phôi phát triển sớm và tế bào gốc trung mô của động vật có vú tiến hành nuôi cấy sơ cấp tế bào gốc này; chuyển nhiễm 4 gen vào trong tế bào gốc đã được nuôi cấy sơ cấp để tạo ra gen chuyển nhiễm để lựa chọn tế bào gốc được làm bất tử trong số chúng bằng cách sử dụng mức biểu hiện STRO 1 làm chỉ số. Ở đây, tế bào gốc trung mô tốt hơn là được chọn từ nhóm bao gồm tế bào gốc từ tủy răng, tế bào gốc từ tủy xương, tế bào gốc từ rốn, và tế bào gốc từ mô mỡ. Ngoài ra, tế bào gốc này tốt hơn là được chọn từ nhóm bao gồm răng sữa đã rơi khỏi ổ răng, răng vĩnh viễn đã rơi khỏi ổ răng, răng sữa được nhổ, và răng vĩnh viễn được nhổ.

Phôi được phát triển sớm này tốt hơn là phôi của bì phôi. Đồng thời, động vật có vú này tốt hơn là được chọn từ nhóm bao gồm người, lợn, ngựa và khỉ. Tế bào gốc từ tủy xương tốt hơn là tế bào có khả năng biệt hóa để trở thành hệ trung mô như tế bào nguyên bào xương để tạo ra xương, sụn, tế bào tạo mỡ và tế bào tương tự, và hệ không phải trung mô. Tế bào dây rốn là tế bào gốc tạo huyết và tế bào trung mô có trong máu cuống rốn mà nối phôi và nhau thai. Tốt hơn là, tế bào dây rốn bao gồm nhiều trong số các tế bào này. Tế bào gốc từ tủy xương tốt hơn là tế bào có khả năng biệt hóa để trở thành hệ trung mô như tế bào nguyên bào xương để tạo ra xương, sụn, tế bào tạo mỡ và tế bào tương tự, và hệ không phải trung mô. Tế bào dây rốn tốt hơn là thu được từ thạch Warton. Tế bào tạo mỡ là tế bào gốc tốt hơn là tế bào không được biệt hóa mà có thể biệt hóa tế bào gốc bất kỳ.

4 gen này tốt hơn là được chọn từ nhóm bao gồm gen hTERT, gen bmi-1, gen

E6, gen E7, gen Oct3/4, gen Sox2, gen Klf4, gen c-Myc và gen p16INK4a. Ở đây, chúng tốt hơn là hTERT, bmi-1, E6 và E7 để được đưa vào trong tế bào trung mô. Đồng thời, chúng tốt hơn là 4 gen được chọn từ nhóm bao gồm Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, p16INK4a để được đưa vào trong tế bào soma.

Tế bào gốc được làm bất tử này tốt hơn là có khả năng sửa chữa đoạn cuối nhiễm sắc thể và có khả năng phân chia ít nhất 200 lần. Đồng thời, tốt hơn là ít nhất là 40% quần thể tế bào là tế bào biểu hiện STRO-1 ở số lần nhân đôi quần thể bằng 20, và nó có khả năng sản xuất khối xương mới sinh tương tự với khả năng sản xuất của tế bào được nuôi cấy sơ cấp.

Ngoài ra, tế bào gốc được làm bất tử này tốt hơn là tiết ra ít nhất là IGF-1, VEGF, TGF- β 1 và HGF vào trong dịch nuôi cấy này.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất được phẩm chứa dịch nuôi cấy của tế bào gốc được làm bất tử có các đặc tính như được đề cập ở trên.

Ngoài ra, theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất chế phẩm thuốc để khôi phục mô bị tổn thương chứa được phẩm này. Ở đây, các dạng liều lượng của chế phẩm thuốc để khôi phục mô bị tổn thương là các dạng liều lượng được chọn từ nhóm bao gồm bột, dịch lỏng, gel, dạng xịt và hệ thống dùng qua da. Đồng thời, mô bị tổn thương này tốt hơn là mô bất kỳ trong số các mô được chọn từ nhóm bao gồm mô bị tổn thương do loét hoặc thối loét do nằm liệt giường, mô não bị tổn thương do sự thoái hóa tế bào, mô não bị mất một phần do phẫu thuật, mô não bị tổn thương do bệnh não chấn thương, mô não bị tổn thương với bệnh viêm não, mô xương bị tổn thương, bệnh nha chu bị tổn thương, mô bị tổn thương do bệnh hệ thần kinh trung ương, và mô bị tổn thương do bệnh da khó chữa.

Ở đây, sự thoái hóa tế bào tốt hơn là gây ra bởi bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson, bệnh suy giảm nhận thức, bệnh tâm thần phân liệt, bệnh trầm cảm, bệnh giảm oxy não, bệnh xơ cứng cột bên teo cơ, bệnh nhồi máu não, bệnh thoái hóa tiểu não, bệnh đái tháo đường, và bệnh viêm gan. Đồng thời, bệnh não chấn thương tốt hơn là do tai nạn giao thông hoặc ngã gây ra. Bệnh viêm não cũng tốt hơn là bệnh được chọn từ nhóm bao gồm viêm não, động kinh, bệnh Jakob, và bệnh bại liệt. Ngoài ra, bệnh hệ thần kinh trung ương tốt hơn là được chọn từ nhóm bao gồm tổn thương tủy sống và bệnh tủy sống. Bệnh viêm da khó chữa tốt hơn là viêm da cơ địa.

Hơn nữa, hàm lượng của dịch nuôi cấy trong chế phẩm tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50% đến 500% (khối lượng/thể tích) khi dịch này được tạo ra bởi một tế bào bất kỳ trong số các tế bào gốc được làm bất tử là 100%.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất tế bào gốc được làm bất tử bao gồm các bước: tách tế bào gốc ra khỏi quần thể tế bào được chọn từ nhóm bao gồm tế bào trung mô của động vật có vú, phôi được phát triển sớm và tế bào soma khác với tế bào trung mô nói trên; nuôi cấy tế bào gốc này như nuôi cấy sơ cấp để thu được tế bào được nuôi cấy sơ cấp; chuyển nhiễm 4 gen vào trong tế bào đã được nuôi cấy sơ cấp để tạo ra tế bào được chuyển nhiễm gen; và chọn lọc tế bào bằng cách sử dụng lượng biểu hiện STRO-1 ở số lần nhân đôi tế bào bằng 20 và khả năng tái tạo xương làm các chỉ số.

Ở đây, tế bào trung mô tốt hơn là được chọn từ nhóm bao gồm tế bào tủy răng, tế bào tủy xương, tế bào cuống rốn và tế bào mỡ. Tế bào tủy răng, phôi tạo ra sớm, tế bào gốc tủy xương, và tế bào dây rốn là như được mô tả ở trên. Động vật có vú là như được mô tả ở trên.

Ngoài ra, 4 gen tốt hơn là được chọn từ nhóm bao gồm hTERT, bmi-1, E6, E7, Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, và p16INK4a. Ở đây, chúng tốt hơn là hTERT, bmi-1, E6 và E7 để được đưa vào trong tế bào trung mô. Đồng thời, chúng là 4 gen tốt hơn là được chọn từ nhóm bao gồm Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, và p16INK4a để được đưa vào trong tế bào soma.

hTERT là gen của telomerase đảo ngược transcriptaza của người, và bmi cũng là phức hợp nhóm polycomb mà liên quan đến việc tự sinh sản hoặc kiểm soát sự tăng sinh của tế bào gốc. E6 và E7 là các gen tồn tại trong khung đọc mở mã hóa gen sớm được sử dụng để tự sinh sản bằng virus papilloma người.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất phương pháp hấp thụ dưới da để khôi phục mô bị tổn thương bao gồm các bước: bào chế ra dạng liều lượng dạng tấm bằng cách tái hấp thụ chế phẩm thuốc này để khôi phục mô bị tổn thương trong thành phần giữ ẩm dạng tấm; phủ lên vị trí bị tổn thương này bằng dạng liều lượng dạng tấm này; và cho điện cực được tích điện dương tiếp xúc với vị trí mong muốn.

Tế bào gốc được làm bất tử theo sáng chế chứa ít nhất là 40% tế bào dương tính với STRO-1 sau khi chúng đã phân chia 40 lần. Ngoài ra, do chúng có khả năng sửa

chứa đoạn cuối nhiễm sắc thể, nên chúng có thể phân chia ít nhất 200 lần. Theo một cách khác, chúng có thể tiết ra nhiều loại yếu tố sinh học khác nhau vào trong dịch nuôi cấy trong khoảng thời gian dài.

Ưu điểm của sáng chế

Do đó, theo sáng chế, có thể tạo ra tế bào gốc được làm bất tử mà có thể liên tục tạo ra một số yếu tố sinh học nhất định trong khoảng thời gian dài.

Đồng thời, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm và chế phẩm có khả năng sử dụng để sửa chữa vùng bị tổn thương.

Hơn nữa, sáng chế còn đề xuất phương pháp hấp thụ dưới da ưu việt để tăng cường tốc độ hấp thụ từ vùng bị tổn thương.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện mối quan hệ về thời gian nuôi cấy theo số lần nhân đôi quần thể (số lần nhân đôi quần thể, dưới đây được gọi là “PD”) giữa tế bào gốc được làm bất tử và tế bào gốc không được làm bất tử. Trên Fig.1, SHED-T thể hiện tế bào được làm bất tử, và SHED-C thể hiện tế bào không được làm bất tử.

Fig.2 là đồ thị thể hiện kết quả của sự biểu hiện STRO-1 ở cả SHED-C và SHED-T (xem, Fig.2(A) đến Fig.2(D)). Trong đó, PD20 có nghĩa là số lần nhân đôi là 20, PD30 có nghĩa là số lần nhân đôi là 30, và PD40 có nghĩa là số lần nhân đôi là 40;

Fig.3 là ảnh chụp khi vết loét trên da được điều trị. (A) thể hiện tình trạng vết loét trước khi điều trị, và (B) thể hiện tình trạng của da sau khi điều trị.

Fig.4 là đồ thị thể hiện mối quan hệ giữa số lần nhân đôi quần thể (số lần) và khối lượng của xương được tạo mới. Trên hình vẽ này, ** thể hiện $p < 0,05$, *** thể hiện $p < 0,01$. Khối lượng của xương được tạo mới được tính bằng cách sử dụng phương trình sau.

Khối lượng của xương được tạo mới = diện tích xương được tạo mới / diện tích nhìn thấy x 100

Fig.5 thể hiện các hình ảnh nhuộm mô của SHED-C và SHED-T ở mỗi thời điểm theo số lần nhân đôi cá thể được thể hiện trên Fig.4, khi chúng được cấy ghép.

Fig.6 là các ảnh chụp thể hiện sự phục hồi vết loét do tư thế nằm. (A) là tình trạng

da trước khi điều trị, và (B) là tình trạng da sau khi điều trị.

Fig.7 thể hiện hình ảnh quét CT thể hiện tiến trình tạo khuôn sau từ 1 đến 6 tháng từ thời điểm phẫu thuật cấy ghép, khi chế phẩm thuốc được sử dụng. (A) đến (C) là các hình ảnh được chụp theo góc độ từ trước và (D) đến (F) là ảnh chụp theo phương ngang.

Fig.8 là các ảnh chụp thể hiện tình trạng của xương ổ răng của bệnh nhân bị bệnh nha chu. (A) thể hiện tình trạng từ khi bắt đầu phẫu thuật (trước khi phẫu thuật), và (B) thể hiện tình trạng sau 3 tháng từ khi phẫu thuật.

Fig.9 là các ảnh chụp thể hiện kết quả của quá trình tạo xương trong chân răng, khi β -TCP được sử dụng làm giàn nối. (A) thể hiện kết quả sau 3 tháng từ khi nhổ răng, và (B) thể hiện việc cấy ghép được tiến hành sau 6 tháng từ khi nhổ răng.

Fig.10 thể hiện các đối tượng thay thế và các đối tượng khác với β -TCP (β -tri-canxi phosphat, $3\text{CaO-P}_2\text{O}_5$) vào xương, khi β -TCP được sử dụng làm giàn nối. (A) là ảnh chụp thể hiện vật liệu được cắt, và (B) là ảnh chụp thể hiện kết quả hóa mô. (C) và (D) là các hình ảnh được phóng đại từng phần và các hình ảnh được chụp. Trên các hình vẽ này, NB thể hiện xương mới, và TCP thể hiện β -TCP. Ngoài ra, BV thể hiện mạch máu, và SF thể hiện đáy của mô được loại bỏ.

Fig.11 thể hiện vị trí sử dụng, khi dịch nuôi cấy của tế bào gốc được cấp trong mũi qua hành khứu giác.

Fig.12 là ảnh chụp, khi việc cấp qua mũi được thực hiện.

Fig.13 là hình ảnh MRA thể hiện sự tắc mạch máu ở bệnh nhân đột quy.

Fig.14 là hình ảnh quét CT thể hiện vị trí bị tổn thương ở não của bệnh nhân đột quy.

Fig.15 là hình ảnh MRI thể hiện lượng dòng máu ở vị trí bị tổn thương của não ở bệnh nhân đột quy. (A) là hình ảnh ngay sau khi đột quy, và (B) là hình ảnh sau khi điều trị.

Fig.16 là đồ thị thể hiện sự thay đổi điểm số (NIHSS), mà phản ánh tình trạng của bệnh nhân trong khoảng thời gian điều trị.

Fig.17 là ảnh chụp thể hiện tình trạng phục hồi chức năng của bệnh nhân. (A) là ảnh chụp thể hiện tình trạng phục hồi chức năng của tay, và (B) là ảnh chụp thể hiện

tình trạng phục hồi thể lực.

Fig.18 là kết quả của sự thay đổi phụ thuộc vào thời gian sau khi thử nghiệm trạng thái tâm thần tối thiểu (Mini Mental State: MMS) hoặc thử nghiệm kiểu Hasegawa được tiến hành đối với cả nhóm được cấp và nhóm không được cấp. Fig.18(A) thể hiện kết quả của nhóm không được cấp, và Fig.18(B) thể hiện kết quả của nhóm được cấp.

Fig.19 là ảnh chụp thể hiện kết quả điều trị chống lại bệnh da khó chữa. Fig.19(A) thể hiện tình trạng trước khi bắt đầu điều trị, và Fig.19(B) thể hiện tình trạng khi kết thúc điều trị.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế được giải thích chi tiết dưới đây.

Để thu được tế bào gốc được làm bất tử theo sáng chế, đầu tiên, tế bào gốc này được phân lập từ nhóm tế bào bao gồm tế bào trung mô, phôi tạo ra sớm, và tế bào soma trừ tế bào trung mô. Với động vật có vú, ưu tiên chọn từ nhóm bao gồm người, lợn, ngựa, và khỉ, do tế bào thu được từ động vật có vú thường tương tự với tế bào người và không nguy hiểm đối với bệnh truyền nhiễm.

Theo sáng chế, thuật ngữ, “tế bào trung mô”, được định nghĩa là tế bào có khả năng biệt hóa thành tế bào thuộc trung mô như nguyên bào xương, tế bào tạo mỡ, tế bào cơ, tế bào sụn, và tế bào tương tự. Các tế bào trung mô đặc hiệu là tế bào tủy răng, tế bào tủy xương, tế bào cuống rốn và tế bào tạo mỡ của các động vật nêu trên. Đồng thời, thuật ngữ, “phôi tạo ra sớm”, được định nghĩa là phôi ở giai đoạn sớm bởi túi phôi, cụ thể, đó là giai đoạn tiến triển hơn trứng được thụ tinh, và cần để thiết lập tế bào ES. Thuật ngữ, “tế bào soma”, được định nghĩa là thuật ngữ chung nói về tế bào ngoại trừ tế bào mầm trong số các tế bào cấu thành nên cơ thể sống.

Ngoài ra, thuật ngữ “tế bào tủy răng” là một trong các tế bào gốc có trong dây thần kinh của răng, và có khả năng tái tạo. Do nó được bảo vệ bởi vật liệu cứng, là răng, không thấm ánh sáng cực tím hoặc tia phóng xạ, nên gen trong chúng không dễ dàng bị hủy hoại. Thuật ngữ “tế bào tủy xương” được định nghĩa là thuật ngữ chung nói về tế bào thu được từ dịch hút tủy xương, và tế bào tủy xương bao gồm tế bào chuỗi bạch cầu như nguyên tủy bào, tế bào chuỗi hồng cầu, tế bào nhân khổng lồ, và bào tương và tế bào tương tự.

Theo sáng chế, thuật ngữ “tế bào cuống rốn” là tế bào tồn tại trong dây rốn liên kết phôi và nhau thai. Tế bào này có trong dây rốn, và còn có ở cả máu cuống rốn. Dây rốn bao gồm máu cuống rốn mà làm giàu tế bào gốc tạo huyết.

Là gen được đưa vào trong các tế bào gốc như được mô tả ở trên, chúng được đề cập là hTERT, bmi-1, E6, E7, Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, INK4a, và gen tương tự. Gen, hTERT, là gen của enzym sửa chữa đoạn cuối nhiễm sắc thể; bmi-1 là gen của Bmi-1, một trong các protein thuộc phức hợp nhóm polycomb. Ở đây, Bmi-1 cần thiết để duy trì tế bào gốc tạo huyết với tác dụng làm tăng tế bào gốc bằng cách tăng cường hoạt tính.

Cả E6 và E7 là các gen sớm của HPV-16 hoặc HPV-18. Đồng thời, Oct3/4 là gen kết hợp với Sox2 để tăng cường sự phiên mã của gen mục tiêu. Klf4 (yếu tố phiên mã kiểu Kruppel 4) điều hòa gen liên quan đến sự phân chia tế bào và sự phát sinh phôi, và nó liên quan đến ung thư hệ dạ dày ruột dưới dạng chất ức chế khối u.

Sox2 thuộc họ gen hộp HMG liên quan đến SRY, và nó được biết là gen có liên quan đến việc duy trì các chức năng không biệt hóa (tính tổng năng). c-Myc là gen thúc đẩy ung thư, và nó thúc đẩy cả sự sống và chết của tế bào trong khối u được cảm ứng bởi c-Myc. p16INK4a là gen đóng vai trò quan trọng trong việc kiểm soát chu kỳ tế bào của tế bào khối u.

Dưới đây là phần giải thích bằng ví dụ về việc tạo ra tế bào được làm bất tử bằng cách sử dụng tủy răng thu được từ răng sữa của người đã rơi khỏi ổ răng.

Đầu tiên, răng sữa đã rơi khỏi ổ răng được khử trùng bằng cách sử dụng chất khử trùng, ví dụ, clohexidin, Isodin, và chất khử trùng tương tự. Sau đó, thân răng được phân chia theo phương ngang bằng cách sử dụng, ví dụ, dụng cụ khoan răng và dụng cụ tương tự để thu hồi tủy răng.

Mô tủy răng thu được được tạo huyền phù trong môi trường cơ bản, ví dụ, như môi trường eagle được cải biến của Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, dưới đây gọi là “DMEM”) chứa huyết thanh bê (huyết thanh bê, đôi khi dưới đây gọi là “DMEM”) với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 15% (theo thể tích), và chất kháng sinh với lượng nằm trong khoảng từ 50 đến 150 U/mL, và môi trường tương tự. Sau đó, mô này được xử lý bằng cách sử dụng collagenaza với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 5 mg/mL ở nhiệt độ 37°C trong thời gian từ 0,5 đến 2 giờ.

DMEM, môi trường Dulbecco được cải biến Iscove (IMDM; GIBCO, v.v.), môi trường Ham's F12, HamF12; SIGMA, GIBCO, v.v.), môi trường rpmI1640, và môi trường tương tự có thể được sử dụng dưới dạng môi trường cơ bản. Đồng thời, môi trường hỗn hợp chứa ít nhất hai môi trường cũng có thể được sử dụng. Một ví dụ về môi trường hỗn hợp được đề cập là chứa IMDM và HamF12 với lượng bằng nhau (ví dụ, nó được bán trên thị trường dưới tên sản phẩm: IMDM/HamF12 (GIBCO)).

Các thành phần cần được bổ sung vào môi trường được đề cập đến là, ví dụ, huyết thanh (huyết thanh bào thai bò hoặc huyết thanh bào thai bê, chúng được gọi là "FBS" hoặc "FCS"), huyết thanh người, và huyết thanh cừu, chất thay thế huyết thanh Knockout (Knockout serum Knockout-KSR), v.v.), albumin huyết thanh bò (BSA), chất kháng sinh như penixilin, streptomycin và các chất kháng sinh khác, vitamin, chất khoáng, và chất tương tự. Môi trường cơ bản cũng có thể được sử dụng để nuôi cấy và chọn lọc các tế bào như được đề cập dưới đây, và để nuôi cấy tế bào được chọn lọc.

Sau khi xử lý enzym, thao tác ly tâm được thực hiện trong thời gian từ 3 đến 10 phút (3000 đến 7000 vòng/phút) để thu hồi tế bào tùy răng. Tùy thuộc vào mức độ cần thiết, các tế bào này được chọn lọc bằng cách sử dụng màng lọc tế bào. Các tế bào đã được chọn lọc được, ví dụ, tái huyền phù trong từ 3 đến 6 mL môi trường cơ bản để dàn trên đĩa có đường kính từ 4 đến 8cm để nuôi cấy tế bào bám dính.

Sau đó, môi trường, ví dụ, DMEM chứa FCS 10% được bổ sung, sau đó tế bào này được ủ trong tủ áp CO₂ 5% ở nhiệt độ 37°C trong khoảng 2 tuần. Sau khi loại bỏ môi trường, tế bào được rửa từ 1 đến vài lần bằng PBS và hợp chất tương tự. Thay vì loại bỏ môi trường và rửa tế bào, thì tế bào gốc bám dính của răng mà đã tạo ra khuẩn lạc có thể được thu gom. Tế bào gốc bám dính của răng được xử lý bằng cách sử dụng dung dịch chứa cả trypsin 0,025% đến 0,1% và EDTA 0,3 đến 1mM trong vài phút ở nhiệt độ 37°C để được tách ra khỏi đĩa. Tiếp theo, các tế bào đã được tách ra này được thu gom.

Sau khi xử lý enzym, mẫu được ly tâm trong khoảng thời gian từ 3 đến 10 phút (3000 đến 7000 vòng/phút) để thu gom tế bào tùy răng. Tùy vào mức độ cần thiết, các tế bào này được tách ra bằng cách sử dụng màng lọc tế bào. Các tế bào đã được tách ra được tái tạo huyền phù trong từ 3 đến 6 mL môi trường cơ bản chẳng hạn, được dàn vào trong đĩa dùng để nuôi cấy tế bào bám dính có đường kính 4 đến 8 cm.

Tiếp đó, môi trường nuôi cấy, ví dụ, DMEM đã bổ sung FCS 10% được bổ sung vào; sau đó, chúng được ủ trong tủ áp 5% ở nhiệt độ 37°C trong khoảng 2 tuần. Dịch nuôi cấy được loại bỏ, và các tế bào được rửa bằng PBS từ 1 đến vài lần. Thay vì loại bỏ môi trường nuôi cấy và rửa tế bào, các tế bào tùy rằng bám dính tạo khuẩn lạc có thể được thu gom. Các tế bào tùy rằng bám dính được tách ra khỏi đĩa, ví dụ, bằng cách sử dụng trypsin 0,025% đến 0,1% và EDTA 0,3 đến 1mM trong vài phút ở nhiệt độ 37°C, và sau đó chúng được thu gom.

Sau đó, các tế bào bám dính đã được chọn thu được như được đề cập ở trên được nuôi cấy. Ví dụ, các tế bào gốc thu được như được đề cập ở trên được dàn lên trên các đĩa dùng để nuôi cấy tế bào bám dính, sau đó được nuôi cấy trong điều kiện CO₂ 5% và ở nhiệt độ 37°C trong tủ áp. Bằng cách này, có thể thu được các tế bào được nuôi cấy sơ cấp của tế bào gốc lấy từ răng sữa người đã rơi khỏi ổ răng (SHED-P).

Trong quá trình cấy chuyển, các tế bào được thu gom bằng cách sử dụng trypsin và EDTA, khi các tế bào này bắt đầu hợp dòng phụ hoặc hợp dòng theo quan sát vĩ mô như được đề cập ở trên. Sau đó, các tế bào này được dàn lần nữa trên đĩa nuôi cấy chứa môi trường nuôi cấy.

Ở đây, thuật ngữ, “hợp dòng phụ”, có nghĩa là tình trạng mà các tế bào bám dính khoảng 70% diện tích đáy của bình nuôi cấy. Ví dụ, việc cấy chuyển được thực hiện từ 1 đến 8 lần, và các tế bào đã được chọn được nhân giống lên đến số lượng tế bào cần thiết, ví dụ, khoảng 1×10^7 tế bào/mL. Sau khi nuôi cấy như được mô tả ở trên, các tế bào được thu gom để lưu giữ trong nitơ lỏng. Các tế bào đã được thu gom từ nhiều đối tượng cho khác nhau có thể được lưu giữ ở dạng ngân hàng tế bào gốc tùy rằng.

Tiếp theo, 4 gen được đưa vào trong tế bào được nuôi cấy sơ cấp thu được thông qua việc nuôi cấy sơ cấp tế bào gốc để tạo ra tế bào được tải nạp gen. Các gen được tải nạp ở đây tốt hơn là 4 loại được chọn từ nhóm bao gồm hTERT, bmi-1, E6, E7, Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, và p16INK4a. Bằng cách đưa hTERT, bmi-1, E6, và E7 vào, có thể thu được các tế bào được làm bất tử có số lần nhân đôi quần thể cao hơn. Ở đây, hTERT là gen của telomeraza đảo ngược transcriptaza của người; bmi-1 là gen nhóm polycomb liên quan đến sự tự sinh sản của tế bào gốc hoặc sự điều hòa biệt hóa. E6 và E7 là các gen tồn tại trong khung đọc mở mã hóa gen sớm được sử dụng để sao chép chính virut papilloma người.

Các gen này có thể được đưa vào như sau.

Plasmid để chèn gen mục tiêu được chuẩn bị, và sau đó nó được chèn vào trong vectơ con thoi, ví dụ, pShuttle2 để tách dòng gen. *E. coli* được biến nạp bằng cách sử dụng vectơ con thoi này để chọn lọc thể biến nạp kháng kanamycin. ADN plasmid của thể biến nạp kháng kanamycin đã được chọn được tinh chế để nhận biết thể tái tổ hợp bằng cách phân tích các vị trí giới hạn.

Tiếp theo, enzym giới hạn, ví dụ, *PI-Sce I* và *I-Cue I* được sử dụng để cắt cát-xét biểu hiện ra khỏi vectơ con thoi; sau đó nó được nối vào trong vectơ adenovirut, ví dụ, ADN Adeno-X Virut. Sản phẩm nối thu được được phân tách bằng cách sử dụng *Swa I*, và nó được sử dụng để biến nạp *E. coli*.

Trong số các thể biến nạp thu được, thể biến nạp kháng ampicilin được chọn lọc. ADN adenovirut tái tổ hợp mà gen được chèn vào được tinh chế để nhận biết thể biến nạp bằng cách phân tích các vị trí giới hạn.

Tiếp theo, adenovirut được phân hủy bằng cách sử dụng *Pac I* để chuyển nhiễm tế bào HEK 293. Adenovirut tái tổ hợp được nhân giống, và sau đó được thu gom để đo độ chuẩn của nó. Theo phương pháp thông thường để tinh chế virut, nó được sử dụng để lây nhiễm tế bào mục tiêu, SHED-P.

Quần thể tế bào đã lây nhiễm virut đó được nhuộm bằng cách sử dụng FITC theo phương pháp thông thường, và sau đó các tế bào dương tính với STRO-1 được phát hiện ra bằng cách sử dụng máy đếm tế bào theo dòng. Ở đây, STRO-1 được coi là một trong các chỉ thị dùng cho tế bào gốc trung mô có tính toàn năng trong tủy xương, và nó trở thành một chỉ số cho sự bất tử tế bào.

Theo quy trình nêu trên, có thể thu được tế bào gốc được làm bất tử từ tủy răng.

Tiếp theo, tế bào gốc được làm bất tử thu được được nuôi cấy trong môi trường cơ bản, ví dụ, DMEM đã bổ sung FBS 10% trong điều kiện CO₂ 5% ở nhiệt độ 37°C trong thời gian từ 24 đến 48 giờ để thu được dịch nuôi cấy. Để thu gom dịch nuôi cấy, ví dụ, ống pipet loại Komagome và dụng cụ tương tự có thể được sử dụng. Dịch nuôi cấy đã thu gom được có thể được sử dụng nguyên trạng để làm thành phần hoạt tính cho chế phẩm thuốc sáng chế. Đồng thời, nó có thể được sử dụng nguyên trạng sau các quy trình xử lý như ngưng tụ, thay thế dung môi, thẩm tách, làm khô lạnh, pha loãng và quy trình

tương tự.

Như được mô tả dưới đây, dịch nuôi cấy của tế bào gốc được làm bất tử thu được như được đề cập ở trên bao gồm nhiều loại yếu tố sinh trưởng khác nhau, và nó thể hiện nhiều chức năng mà không cần tinh chế ở mức độ cao. Cụ thể, được phẩm theo sáng chế cần được sử dụng cho nhiều bệnh có thể được tạo ra theo quy trình thông thường. Vì thế, có thể tránh được việc làm giảm hoạt tính sinh học của các yếu tố sinh trưởng do quy trình tinh chế ở mức độ cao gây ra.

Lưu ý là “dịch nuôi cấy của tế bào được làm bất tử” được sử dụng trong sáng chế được xác định là dịch nuôi cấy chứa nhiều loại yếu tố sinh học khác nhau thu được bằng cách nuôi cấy tế bào gốc đã được làm bất tử, và nó là dung dịch không chứa tế bào bất kỳ như tế bào gốc được làm bất tử và các tế bào khác. Khi dịch nuôi cấy không chứa huyết thanh được chuẩn bị, thì ưu tiên sử dụng môi trường không có huyết thanh được sử dụng trong toàn bộ quy trình từ nuôi cấy ban đầu đến khi cấy chuyển, được sử dụng trong vài lần cấy chuyển trước khi thu gom tế bào.

Tế bào gốc tủy răng đã được chọn lọc và được nuôi cấy bằng cách sử dụng phương pháp nêu trên là các tế bào thu được từ mô của cơ thể sống và có các đặc tính giống như tế bào được nuôi cấy sơ cấp. Thông thường, tế bào được nuôi cấy sơ cấp có các đặc tính tương tự như các tế bào của cơ quan làm nguồn, và quan trọng là các đặc tính của chúng gần với tế bào bình thường. Tuy nhiên, nó sinh trưởng chậm hơn so với tế bào được tách dòng, và đôi khi nó giải biệt hóa trong khi tiếp tục nuôi cấy. Vì thế, rất khó để duy trì tế bào có các đặc tính này.

Tuy nhiên, tế bào gốc được làm bất tử theo sáng chế có tỷ lệ biểu hiện STRO-1 cao hơn đáng kể, mà trở thành chỉ thị cho mức độ tự ghép, so với tỷ lệ biểu hiện của tế bào gốc tủy răng mà không phải là tế bào được làm bất tử tại các thời điểm khi số lần nhân đôi quần thể bằng 20 hoặc 40. Tốt hơn là tế bào gốc được làm bất tử này có tỷ lệ cao hơn như khoảng từ 1,5 đến 3, do tỷ lệ biểu hiện cao của STRO-1 trở thành chỉ số mà tế bào này thể hiện các đặc tính giống như các đặc tính của tế bào được nuôi cấy sơ cấp.

Ngoài ra, tế bào gốc được làm bất tử tiết ra ít nhất hai yếu tố sinh trưởng được chọn từ nhóm bao gồm yếu tố sinh trưởng giống insulin (IGF), yếu tố sinh trưởng nội mạc (VEGF), yếu tố sinh trưởng biến nạp- β (TGF- β), và yếu tố sinh trưởng tế bào gan

(HGF) vào trong dịch nuôi cấy. Ở đây, thuật ngữ “yếu tố sinh trưởng” là thuật ngữ chung chỉ polypeptit thúc đẩy sự phân chia tế bào, đem đến sự thay đổi hình thái hoặc sự phình trưởng tế bào. Các yếu tố sinh trưởng là khác nhau tùy thuộc vào tế bào sản xuất chúng, và chúng được phân loại khái quát thành yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGF), yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi (FGF), yếu tố sinh trưởng thần kinh (NGF), yếu tố sinh trưởng khối u (TGF) và yếu tố sinh trưởng tương tự.

Ngoài ra, do các thụ thể trên màng tế bào của mỗi tế bào có hoạt tính tyrosin kinaza, nên sự gắn kết của các yếu tố sinh trưởng với chúng gây ra việc phosphoryl hóa các gốc tyrosin của protein và gây ra sự sinh trưởng hoặc tăng sinh tế bào. Biết rằng có một vài ví dụ rằng yếu tố sinh trưởng này trở thành chất cảm ứng trung bì trong quá trình phát triển cá thể. Cũng biết rằng có một vài ví dụ rằng lymphokine, mà điều biến hệ miễn dịch, trở thành chất cảm ứng trung bì trong quá trình phát triển cá thể. Các yếu tố sinh trưởng này có thể được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật ELISA, thử nghiệm vi dây đã biết hoặc thử nghiệm tương tự.

IGF-1 là polypeptit có độ tương tự trình tự cao với insulin, và nó gây ra các phản ứng như nguyên phân và phản ứng tương tự trong các tế bào nuôi cấy tương tự với các phản ứng mà insulin gây ra. Cũng biết rằng IGF ảnh hưởng đến sự sinh trưởng tế bào thần kinh. VEGF là họ glycoprotein tham gia vào quá trình tạo mạch, mà mới tạo ra mạch máu trong vùng mà trong đó mạch máu chưa được tạo ra ở giai đoạn phôi trong hành trình phát sinh phôi, và quá trình hình thành mạch, mà mới tạo ra mạch máu bằng cách phân nhánh và kéo dài từ mạch máu đã có. TGF- β cũng trở thành chất ức chế sinh trưởng có hoạt lực kháng nhiều loại tế bào, và tham gia chặt chẽ vào quá trình biệt hóa, di chuyển và bám dính của tế bào, và nó đóng vai trò quan trọng trong lĩnh vực rộng như sự phát triển cá thể, sự tái cấu trúc mô, sự làm lành vết thương, sự viêm và sự miễn dịch, sự xâm lấn ung thư và sự di căn, và sự việc tương tự. Ngoài ra, HGF có nhiều hoạt tính sinh lý khác nhau tham gia vào quá trình tái tạo và bảo vệ mô và cơ quan như quá trình thúc đẩy sự tăng sinh tế bào và sự chuyển động tế bào, quá trình chống lại sự tự rụng tế bào theo chương trình (sự chết tế bào), quá trình cảm ứng tạo hình thái, quá trình hình thành mạch và các quá trình khác đối với các tế bào khác nhau bao gồm tế bào gan.

Mỗi tế bào gốc được đề cập ở trên được nuôi cấy, ví dụ, trong DMEM đã bổ sung FCS 15% ở nhiệt độ 37°C trong thời gian định trước, nhờ đó dịch nuôi cấy chứa các yếu tố sinh trưởng như được đề cập ở trên có thể thu được. Lưu ý là dịch nuôi cấy của tế bào

gốc bao gồm khoảng 70 loại protein ngoại trừ IGF-1, VEGF, TGF- β , và HGF.

15 mL dịch nuôi cấy từ dịch nuôi cấy thu được được rót vào trong đơn vị lọc siêu ly tâm Amicon 10K (Amicon Ultra Centrifugal Filter Units-10K (Millipore Limited)). Sau đó, nó được ly tâm với x 4000 g trong khoảng 60 phút để đặc lại thành khoảng 200 μ L. Tiếp theo, thể tích tương tự của PBS làm dịch nuôi cấy được rót vào trong ống, và được ly tâm lần nữa x 4000 g trong khoảng 60 phút để thay thế dung môi bởi PBS. 200 μ L dung dịch thu được được thu gom vào trong ống thử nghiệm cỡ micro để thu được dịch nuôi cấy tế bào gốc đã được làm đặc.

Thay vì phương pháp bằng cách sử dụng Amicon như được mô tả ở trên, việc cô này có thể được tiến hành bằng cách sử dụng phương pháp kết tủa etanol. Ví dụ, 45 mL etanol 100 % được bổ sung vào 5 mL dịch nuôi cấy để trộn chúng và sau đó để yên ở nhiệt độ -20°C trong 60 phút. Sau đó, nó được ly tâm với x 15000g trong 15 phút ở nhiệt độ 4°C để loại bỏ phần dịch nổi trên bề mặt. Tiếp theo, ví dụ, 10 mL etanol 90% được bổ sung vào để trộn đều, và sau đó được ly tâm lần nữa với x 15000 g trong 5 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau khi loại bỏ phần dịch nổi trên bề mặt, viên tròn thu được có thể được hòa tan trong, ví dụ, 500 μ L nước vô trùng. Sau khi hòa tan, toàn bộ thể tích này được thu gom trong ống thử nghiệm cỡ micro, và thu được dịch nuôi cấy tế bào gốc đã được làm đặc.

Dịch nuôi cấy thu được như được đề cập ở trên còn có thể được làm khô lạnh theo phương pháp thông thường để có chế phẩm thuốc được pha chế tại thời điểm sử dụng.

Hàm lượng của yếu tố sinh trưởng trong dịch nuôi cấy có trong chế phẩm thuốc tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50% đến 500% khối lượng so với tổng khối lượng khô của chúng. Do, khi hàm lượng này ít hơn 50% khối lượng, nó sẽ không gây ra bất kỳ tác dụng nào; và khi hàm lượng này vượt quá 500% khối lượng, thì việc cải thiện hiệu quả là không được như mong đợi.

Dạng liều lượng của chế phẩm thuốc được đề cập đến là, chẳng hạn như bột, chất lỏng, gel, thuốc xịt, hệ dùng qua da, và dạng tương tự. Ví dụ, chế phẩm thuốc có thể được bào chế bằng cách bổ sung chất độn, tá dược, chất điều chỉnh độ axit và chất tương tự để rót vào trong vật chứa kích thước nhỏ như ống thủy tinh vô trùng, ống huyết thanh và vật chứa tương tự. Khi sử dụng, nó được hòa tan bằng cách sử dụng nước muối hoặc

nước cất vô trùng để tiêm, và sau đó có thể được cấp thông qua mũi. Theo một phương án, nó được cấp bằng cách sử dụng miếng gạc thấm đẫm dung dịch để bám dính vùng được tác động. Khi nó được sử dụng cho quá trình tạo xương của xương ổ răng và các xương khác, thì collagen, β -TCP và các chất khác được sử dụng làm thành phần giàn nối, mà được nhúng chìm trong dung dịch đã được hòa tan cần được nhúng.

Dưới dạng các mô bị hủy hoại để sử dụng chế phẩm thuốc theo sáng chế, được đề cập đến là các mô trên đó vết loét hoặc vết loét do nằm được tạo ra, mô não bị tổn thương do tắc mạch máu, và các mô bị hủy hoại do bệnh xương, bệnh nha chu và bệnh hệ thần kinh trung ương, và các mô tương tự.

Ở đây, “vết loét” được xác định là vị trí thiếu hụt mô được tạo ra trên bề mặt của cơ quan sau là mô bị phân hủy hoặc đóng vảy có hoại tử, và nó được tạo ra trên biểu bì, mô mạch liên kết, niêm mạc và dạng tương tự. Nếu ngón chân thiếu mô không chạm tới mô mạch liên kết, nó được gọi là hiện tượng bào mòn. Cụ thể, vết loét được tạo ra ở vùng tiếp xúc với bề mặt cơ thể như da, niêm mạc khoang mũi và miệng, giác mạc và các vùng khác, hoặc bề mặt khoang của các cơ quan nội tạng rỗng như ống tiêu hóa, đường thở, đường tiết niệu, mạch máu và các cơ quan khác.

Thuật ngữ, “tư thế nằm” được định nghĩa về mặt lâm sàng là mô xung quanh vùng bề mặt cơ thể mà tiếp xúc với bề mặt nâng đỡ (hầu hết, bề mặt đó là giường) có sự tuần hoàn khiếm khuyết cục bộ dẫn đến sự hoại tử, khi chính bệnh nhân đưa họ vào tình trạng mà trong đó họ phải nằm yên tại một vị trí và không thể trở mình.

Thuật ngữ, “sự khiếm khuyết do phẫu thuật gây ra”, được định nghĩa là sự khiếm khuyết do phẫu thuật gây ra như sự loại bỏ khối u não và các khối u khác.

Thuật ngữ, “sự tắc mạch máu” được xác định là tình trạng mà mạch máu bị tắc do một trong các lý do sau đây. Ví dụ, trạng thái mà mạch máu bị thu hẹp bởi chứng xơ cứng động mạch và dòng máu bị chặn lại ở đó; vật tắc mạch (cục máu đông hoặc axit béo) rơi ra từ lớp lót mạch máu nên tắc, và dòng máu không đi đến vị trí xơ cứng động mạch của mạch máu gần với tim; và sự cung cấp máu bị ngừng lại do viêm, chứng chuột rút, hoặc sự thay đổi của thành phần máu hoặc dòng máu.

Thuật ngữ, “não” có các chức năng ghi nhớ, thể hiện cảm xúc, đưa ra quyết định và chức năng tương tự. Não được che phủ bởi dịch lỏng được gọi là dịch não tủy. Dịch não tủy (cerebrospinal fluid-CSF) có vai trò bảo vệ não, và vận chuyển chất dinh dưỡng

và sản phẩm chuyển hóa. Dịch não tủy này có thể thu được bằng cách chọc tủy sống bệnh nhân, nhưng các đặc tính thì phụ thuộc vào bệnh của bệnh nhân và yếu tố tương tự.

Ở đây, thuật ngữ, “tủy sống”, là trục thần kinh của động vật có xương sống. Ngoài ra, thuật ngữ, “hệ thần kinh trung ương” có nghĩa là mô bao gồm tủy sống và não. Hệ thần kinh trung ương có các chức năng để hoạt động như trung tâm phản xạ với các kích thích từ ngoại biên hoặc kết hợp các kích thích đó.

Sự hủy hoại hệ thần kinh trung ương là do tổn thương tủy sống và các tình trạng tương tự gây ra. Ở đây, thuật ngữ, “tổn thương tủy sống” là tình trạng trong đó tủy sống bị hủy hoại do sự kích động từ các yếu tố bên ngoài hoặc bên trong như tủy sống, khối u, chứng thoát vị và các tình trạng tương tự. Tùy vào mức độ nghiêm trọng của tình trạng hủy hoại, nó được phân loại thành loại tuyệt đối trong đó tủy sống được tách ra hoàn toàn, và loại không tuyệt đối trong đó tủy sống bị hủy hoại hoặc bị ép, nhưng chức năng của tủy sống vẫn được duy trì một phần.

“Bệnh tủy sống” được biểu hiện bởi sự phát triển tình trạng thoái hóa cột sống cổ do lão hóa (tình trạng sưng phồng của đĩa liên đốt sống hoặc hình thành các mòm gai).

Chế phẩm thuốc có thể được sử dụng trên vị trí vết thương dưới dạng lỏng, hoặc dạng gel, và nó được sử dụng dưới dạng chế phẩm dạng tấm. Đầu tiên, nó được hấp thụ bởi thành phần giữ ẩm, ví dụ, gạc thấm, tấm giữ ẩm để sử dụng trong y tế và dạng tương tự để tạo ra chế phẩm dạng tấm. Tiếp theo, chế phẩm dạng tấm này được đặt lên vùng bị thương sao cho che phủ được. Điện cực hình que tích điện âm được di chuyển trên tấm che phủ vùng bị thương, xoay que nhẹ nhàng. Điện cực tích điện âm được cho tiếp xúc với phần vùng mong muốn từ vùng bị thương.

Như được mô tả ở trên, thành phần hoạt tính trong chế phẩm thuốc được cấp một cách hữu hiệu bằng cách sử dụng dòng điện giữa điện cực được gắn lên vùng bị thương, và điện cực được tiếp xúc với vùng khác từ vùng bị thương.

Bằng cách sử dụng chế phẩm thuốc theo sáng chế trên mô bị tổn thương, có thể phục hồi mô nhanh hơn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Sản xuất SHED được làm bất tử và phương pháp nuôi cấy

(1) Chất để chiết, plasmit và dạng tương tự

(1-1) Chất phản ứng và các chất khác

Kanamycin (Kan), ampicilin (Amp), môi trường LB lỏng và môi trường thạch LB, glycogen, agarosa, nước vô trùng, amoni axetat, natri axetat, natri đodexyl sulfat và ARNaza A được sử dụng. Cả Kanamycin (Kan) và ampicilin (Amp) 50 mg/mL đều được điều chế để lưu giữ chúng dưới dạng dung dịch gốc ở nhiệt độ -20°C . Glycogen được điều chế ở nồng độ bằng 20 mg/mL. ARNaza A 10 mg/mL được điều chế để được lưu giữ ở nhiệt độ -20°C . Amoni axetat (NH_4OAc) 10M (bão hòa) và natri axetat 3M (NaOAc ; $\text{pH}=5,2$) được điều chế.

(1-2) Enzym giới hạn và dạng tương tự

Tế bào E. coli khả biến (Tế bào khả biến EZ10 Electro siêu nạp, mã sản phẩm 636756), Swa I (mã sản phẩm 1111A, Sma I là sản phẩm tương đương), Xho I (mã sản phẩm 1094A), T4 ADN Ligaza (mã sản phẩm 2011A), NucleoBond Xtra Midi (mã sản phẩm 740410.10/.50/.100), NucleoSpin Plasmid (mã sản phẩm 740588 10/50/250) được mua từ Takara Bio Inc. Pac I được mua từ New England Biolabs.

(1-3) Chất đệm và chất tương tự

1 x Chất đệm TE (Tris-HCl 10mM ($\text{pH} = 8,0$) chứa EDTA 1mM), là hỗn hợp của phenol:cloroform:rượu isoamyllic (25:24:1) bão hòa bằng Tris-HCl 100mM ($\text{pH} = 8,0$), được điều chế. Dưới đây gọi là “Dung dịch PCI”. Etanol được sử dụng với nồng độ là 100% hoặc 70%. Để tinh chế plasmit ADN pAdeno-X được sử dụng trong quá trình tái tổ hợp quy mô nhỏ, các chất đệm 1 đến 4 sau được điều chế.

Chất đệm 1: Tris-HCl 25mM chứa EDTA 10mM và glucoza 50mM ($\text{pH}=8,0$) (sau khi chưng cất, được lưu giữ ở nhiệt độ 4°C)

Chất đệm 2: NaOH 0,2M chứa SDS 1% (được điều chế ngay trước thời điểm sử dụng, được bịt chặt và lưu giữ ở nhiệt độ trong phòng)

Chất đệm 3: KOAc 5M (sau khi chưng cất, được lưu giữ ở nhiệt độ 4°C)

Chất đệm 4: Tris-HCl 10mM ($\text{pH} = 8,0$) chứa EDTA 1mM và ARNaza 20 $\mu\text{g/mL}$ (ngay trước khi sử dụng, ARNaza được bổ sung, được lưu giữ ở nhiệt độ -20°C)

(2) Tinh chế adenovirut và chất phản ứng cho thử nghiệm β -gal

Tế bào HEK293 (ATCC #CRL1573) biến nạp bằng adenovirut typ V của người được sử dụng. Tế bào HEK293 được nuôi cấy trong môi trường hoàn chỉnh. Thành phần của môi trường hoàn chỉnh này là DMEM (Môi trường Eagle được cải biến của Dulbecco, môi trường cơ bản) được bổ sung 100 đơn vị/mL natri penixilin G, 100 μ g/mL streptomycin, glutamin 4mM, và FBS 10%. Dung dịch natri penixilin G được điều chế ở nồng độ bằng 10000 đơn vị/mL, và dung dịch streptomycin sulfat được điều chế ở nồng độ 10000 μ g/mL. Chúng được lưu giữ làm dung dịch gốc.

Trong khi nuôi cấy, đĩa 60mm, đĩa 100mm, đĩa 6 lỗ, các bình thót cổ T75 và T175 được sử dụng.

Trypsin-EDTA (mã sản phẩm CC-5012) được mua từ Takara Bio Inc. Nước muối được đệm phosphat (PBS, không chứa Ca^{2+} và Mg^{2+}) và nước muối được đệm phosphat Dulbecco (DPBS, chứa Ca^{2+} và Mg^{2+}) được điều chế. Ngoài ra, dung dịch nhuộm đỏ trung tính 0,33%, và dung dịch nhuộm xanh da trời trypan 0,4% được sử dụng.

Trong thử nghiệm β -gal, X-Gal (5-brom-4-clo-3-indolyl- β -D-galactopyranosit (25 mg/mL)) trong dung dịch đimetylformamit (DMF) được lưu giữ ở nhiệt độ -20°C trong vật chứa bền sáng. Bộ kit phát hiện β -gal II phát quang (mã sản phẩm 631712, Takara Bio Inc.) được sử dụng.

(3) Thử nghiệm sơ bộ

(3-1) Xây dựng cấu trúc cho adenovirut tái tổ hợp chứa lacZ (pAdeno-X-lacZ)

Sau khi rửa đông tế bào HEK293 và loại bỏ DMSO ra khỏi dung dịch, các tế bào HEK293 này được tái tạo huyền phù trong 10 mL môi trường hoàn chỉnh. Sau đó toàn bộ lượng này được chuyển lên đĩa nuôi cấy có đường kính 100mm. Sau khi các tế bào HEK293 bám dính lên đĩa, thì môi trường nuôi cấy được loại bỏ. Sau đó, các tế bào này được rửa một lần bằng PBS vô trùng. Sau đó, 1 mL trypsin-EDTA được bổ sung vào để xử lý chúng trong khoảng 2 phút.

Tiếp theo, 10 mL môi trường hoàn chỉnh được bổ sung vào để làm dừng phản ứng của trypsin, và sau đó các tế bào này được tạo huyền phù nhẹ. Bằng cách sử dụng số đếm sinh vật sống, 10^5 tế bào được chuyển vào trong đĩa có đường kính 100mm chứa 10 mL môi trường để trải đều.

pShuttle2-lacZ (vector đối chứng dương có trong hệ biểu hiện Adeno-X 1) và AND của virus Adeno-X (PI-Sce I và I-Ceu I được phân hủy) có trong bộ kit được sử dụng. Theo phương pháp chuẩn được gắn trong bộ kit, adenovirus tái tổ hợp chứa lacZ được xây dựng cấu trúc. Nó được lây nhiễm vào tế bào mục tiêu, SHED, và sự biểu hiện của β -galactosidase được thử nghiệm để xác nhận rằng vector này được xây dựng cấu trúc.

(3-2) Xây dựng cấu trúc plasmid pShuttle2 tái tổ hợp

Trước khi xây dựng cấu trúc vector pShuttle2 tái tổ hợp (dưới đây gọi là “vector rpShuttle2”); E. coli DH5 α được biến nạp với vector pShuttle2 và vector pShuttle2-lacZ, có trong bộ kit. Thể biến nạp được lựa chọn trên đĩa thạch LB chứa 50 μ g/mL Kanamycin (dưới đây gọi là “LB/Kan”). Tế bào vi khuẩn thu được từ một khuẩn lạc được vạch trên LB/Kan mới để được ủ ở nhiệt độ 37°C qua đêm.

Tiếp theo, hTERT, bmi-1, E6, và E7 được tách dòng vào trong pShuttle2. Vector pShuttle2 được phân tách bằng cách sử dụng enzyme giới hạn thích hợp cho các gen này.

Tiếp theo, dựa trên tờ thông tin về vector pShuttle2 (PT3416-5) được gắn kèm bộ kit, ADN khớp với nhiều vị trí tách dòng cần được chèn vào được quyết định. Plasmid đã được xử lý với enzyme giới hạn được xử lý bằng cách sử dụng phosphatase kiềm để được tinh chế.

Theo phương pháp thông thường, các mảnh ADN mục tiêu được tạo ra để được tinh chế. Vector được phân hủy bằng enzyme giới hạn và các mảnh gen được nối. Bằng cách sử dụng sản phẩm nối, các tế bào DH5 α (tế bào khả biến) được biến nạp. Một phần của tế bào khả biến được chọn để biến nạp bằng cách sử dụng vector đối chứng, vector pShuttle2-lacZ có trong bộ kit để sử dụng làm đối chứng dương.

Hỗn hợp chứa E. coli đã được biến nạp được dàn trên đĩa thạch LB/Kan để chọn lọc thể biến nạp kháng kanamycin (Kan^r) (khuẩn lạc). 5 đến 10 dòng vô tính kháng Kan được chọn lọc, và chúng được dàn trên đĩa với một lượng nhỏ môi trường lỏng cần được khuếch đại. Sau khi xác nhận rằng các dòng vô tính này có vector pShuttle2, chúng được ủ qua đêm. Sau đó, bằng cách sử dụng cột hấp thụ silicagel có bán trên thị trường, ADN plasmid đã xây dựng cấu trúc được tinh chế theo phương pháp thông thường.

ADN plasmid được xử lý bằng enzyme giới hạn đã trải qua quá trình điện di trên

gel agarosa 1%; nhờ đó plasmit tái tổ hợp mục tiêu được nhận biết. Bằng cách giải trình tự, hướng của mảnh được chèn và vị trí được chèn được xác nhận là nhận biết dòng vô tính dương. ADN plasmit pShuttle2 tái tổ hợp (dưới đây gọi là “ADN plasmit rpShuttle2”) được chuyển nhiễm trực tiếp vào trong tế bào mục tiêu, và sau đó nó được tiến hành tách chiết để kiểm tra sự biểu hiện sơ bộ của protein mục tiêu.

(3-3) Phân hủy kép ADN plasmit rpShuttle2 bằng PI-Sce I/I-Ceu I

Từ ADN plasmit rpShuttle2 tạo ra như được đề cập ở trên, cắt-xét biểu hiện của gen được chèn được lấy ra bằng cách sử dụng PI-Sce I và I-Ceu I. Theo phương pháp nội *in vitro* được viết trong phương pháp chuẩn gắn kèm bộ kit, cắt-xét biểu hiện mà đã được lấy ra được kết hợp vào trong ADN virus Adeno-X. Dung dịch phân hủy kép PI-Sce I/I-Ceu I đối với ADN plasmit rpShuttle2 được điều chế với lượng 30 μ L. Nó được trộn với chất phản ứng được thể hiện trong bảng 1 dưới đây và được cho vào ống vi ly tâm đã được tiệt trùng dung tích 1,5 mL.

Bảng 1

Chất phản ứng và các chất khác	Đo chất lỏng (μ L)	
	Ống 1	Ống 2 (lacZ đối chứng)
Nước vô trùng	19,5	19,5
10 x Dung dịch phân hủy kép	3,0	3,0
ADN plasmit rpShuttle2 (500 ng/ μ L)	2,0	—
Plasmit pShuttle2-lac Z (500 ng/ μ L)	—	2,0
PI-Sce I (1 đơn vị/ μ L)	2,0	2,0
I-Ceu I (5 đơn vị/ μ L)	0,5	0,5
10 x BSA	3,0	3,0
Tổng	30,0	30,0

Tiếp theo, sau khi trộn hoàn toàn, ống vi ly tâm được ly tâm nhẹ, và sau đó được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Hỗn hợp phản ứng được phân hủy kép (5 μ L) được tiến hành điện di trên gel 1% agarosa/EtBr cùng với thang 1 kb (chỉ thị kích thước ADN).

(3-4) Chiết bằng phenol:cloroform:rượu isoamyllic

Phần còn lại của dung dịch phân hủy kép (25 μ L), 70 μ L 1 x chất đệm TE (pH=8,0) và 100 μ L hỗn hợp PCI được bổ sung vào ống ly tâm, ống này được trộn bằng cách sử dụng luồng xoáy. Sau đó, ống này được ly tâm bằng cách sử dụng kỹ thuật vi ly

tâm ở nhiệt độ 4°C với tốc độ 14000 vòng/phút trong 5 phút. Sau đó, lớp nước được chuyển sang ống ly tâm sạch dung tích 1,5 mL. Ở đó, 400 μ L etanol 95%, 25 μ L amoni axetat 10M, và glycogen 1 μ L (20 mg/mL) được bổ sung vào, và sau đó được trộn bằng cách sử dụng luồng xoáy.

Tiếp theo, nó được ly tâm ở nhiệt độ 4°C với tốc độ 14000 vòng/phút trong 5 phút. Sau đó, phần dịch nổi trên bề mặt được rút cạn bằng cách hút để thu được viên tròn. 300 μ L etanol 70% được bổ sung trên viên tròn, nó được ly tâm trong 2 phút với tốc độ 14000 vòng/phút. Phần dịch nổi trên bề mặt được hút cẩn thận để loại bỏ, viên tròn được làm khô trong không khí trong khoảng 15 phút.

Sau khi viên tròn được làm khô, nó được hòa tan trong 10 μ L 1 x chất đệm TE đã được tiệt trùng (pH=8,0), và dung dịch này được lưu giữ ở nhiệt độ -20°C.

(4) Xây dựng cấu trúc ADN plasmit Adeno-X tái tổ hợp

(4-1) Tách dòng phụ cát-xét biểu hiện vào trong bộ gen Adeno-X virut

Các chất phản ứng được thể hiện trong bảng 2 dưới đây được bổ sung tuần tự vào trong ống vi ly tâm dung tích 1,5 mL đã được tiệt trùng. Sau đó, nó được trộn nhẹ và được ly tâm nhẹ. Sau đó, nó được ủ ở nhiệt độ 16°C qua đêm.

Bảng 2

Chất phản ứng và các chất khác	Đo chất lỏng (μ L)
ADN plasmit pShuttle2 được phân hủy bởi PI-Sce I/I-Ceu I	2,0
ADN plasmit pShuttle2-lac Z được phân hủy bởi PI-Sce I/I-Ceu I	—
Nước vô trùng	3,0
10 x Chất đệm nối ADN	1,0
ADN virut Adeno-X (250 ng/ μ L)	3,0
Ligaza ADN (1 đơn vị/ μ L)	1,0
Tổng	10,0

90 μ L 1 x chất đệm TE (pH = 8,0) và 100 μ L hỗn hợp PCI được bổ sung vào mỗi mẫu, và sau đó nó được trộn nhẹ bằng cách sử dụng luồng xoáy. Nó được ly tâm ở nhiệt độ 4°C với tốc độ 14000 vòng/phút trong 5 phút, và lớp nước được chuyển sang ống sạch cỡ micro dung tích 1,5 mL. Sau đó, 400 μ L etanol 95%, 25 μ L dung dịch amoni axetat 10M, và 1 μ L glycogen (20 mg/mL) được bổ sung vào ống, và sau đó nó được trộn nhẹ bằng cách sử dụng luồng xoáy.

Tiến hành ly tâm ở nhiệt độ 4°C trong 5 phút với tốc độ 14000 vòng/phút, và phần dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ bằng cách hút để thu được viên tròn. Các thao tác kết tủa etanol sau đó là giống như thao tác trong mục (3-4).

Sau khi làm khô thì viên tròn được hòa tan trong 15 μ L nước được khử ion vô trùng.

(4-2) Phân hủy Swa I của ADN plasmit Adeno-X tái tổ hợp

Dung dịch phân hủy như được thể hiện trong bảng 3 sau đây được điều chế, được bổ sung vào mỗi mẫu trong ống ly tâm. Sau đó, chúng được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ 25°C.

Bảng 3

Chất phản ứng và các chất khác	Đo chất lỏng (μ L)
Sản phẩm nổi	15
10 x Chất đệm phân hủy Swa I	2,0
10 x BSA	2,0
Swa I (10 đơn vị/ μ L)	1,0
Tổng	20,0

80 μ L 1x chất đệm TE (pH=8,0) và 100 μ L hỗn hợp PCI được bổ sung vào mỗi mẫu, và sau đó nó được trộn nhẹ bằng cách sử dụng luồng xoáy. Các thao tác kết tủa etanol sau đó là giống như thao tác trong mục (3-4), và dung dịch đã được hòa tan của viên tròn được lưu giữ ở nhiệt độ -20°C cho đến khi sử dụng.

(4-3) Xác nhận thể biến nạp E. coli bằng ADN plasmit Adeno-X tái tổ hợp

Tế bào khả biến điện di (E. coli) được biến nạp với sản phẩm đã phân hủy Swa I thu được trong mục (4-2) bằng cách sử dụng tế bào khả biến điện di siêu nạp EZ10 (mã sản phẩm 636756).

Hỗn hợp thể biến nạp được dàn mỏng trên đĩa thạch, là hỗn hợp của môi trường LB và ampicilin (nồng độ cuối cùng 100 μ g/mL) (dưới đây gọi là “đĩa thạch LB/Amp”), và sau đó chúng được ủ ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Khoảng 10⁶ khuẩn lạc thu được dưới dạng thể biến nạp kháng ampicilin (Amp^r). Khuẩn lạc thu được được kiểm tra bằng cách sử dụng bộ trình tự mỗi sàng lọc PCR hệ thống Adeno-X (Adeno-X System PCR Screening Primer Set) được gắn vào sản phẩm.

Các tế bào vi khuẩn từ một khuẩn lạc được dàn mỏng trong 5 mL môi trường

lông LB/Amp sạch, và được ủ qua đêm. Ngày tiếp theo, theo phương pháp quy mô nhỏ như được đề cập dưới đây, ADN plasmit Adeno-X được tinh chế.

(4-4) Tổng hợp ADN plasmit Adeno-X tái tổ hợp trên quy mô nhỏ

5 mL môi trường nuôi cấy pha log được ly tâm với tốc độ 14000 vòng/phút trong 30 giây để loại bỏ phần dịch nổi trên bề mặt. Viên tròn được ly tâm ở tốc độ 10000 vòng/phút trong 1 phút nữa, và sau đó phần dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ bằng cách sử dụng ống pipet vi thể.

150 μ L chất đệm 1 được bổ sung vào và được hút nhẹ bằng ống pipet để tái tạo huyền phù. 150 μ L chất đệm 2 được bổ sung vào thể huyền phù tế bào. Sau đó thể huyền phù tế bào này được đảo ngược nhẹ để trộn và để yên trong 5 phút trên nước đá. 150 μ L chất đệm 3 được bổ sung vào thể huyền phù tế bào đã được làm lạnh đó, và sau đó nó được đảo ngược để trộn lần nữa và để yên trong 5 phút trên băng.

Thể huyền phù tế bào được ly tâm ở nhiệt độ 4°C với tốc độ 14000 vòng/phút trong 5 phút, và phần dịch nổi trong trên bề mặt được chuyển vào trong ống ly tâm sạch dung tích 1,5 mL. 450 μ L hỗn hợp PCI được bổ sung vào phần dịch nổi trên bề mặt, và sau đó được đảo ngược để trộn. Sau đó, nó được ly tâm ở nhiệt độ 4°C với tốc độ 14000 vòng/phút trong 5 phút, và lớp nước được chuyển sang ống vi ly tâm sạch dung tích 1,5 mL.

Các thao tác kết tủa etanol sau đó là giống như các thao tác trong mục (4-1), và dung dịch đã được hòa tan của viên tròn được lưu giữ ở nhiệt độ -20°C cho đến khi sử dụng. rADN đang quan tâm được nhận biết bằng cách sử dụng phép phân tích với các enzym giới hạn và PCR như được mô tả dưới đây.

(5) Phân tích vị trí giới hạn ADN plasmit rAdeno-X thu được

Việc phân tích được thực hiện bằng cách sử dụng PI-Sce I và I-Ceu I. Các chất phản ứng thể hiện trong bảng 4 sau đây được cho vào ống vi ly tâm dung tích 1,5 mL. Sau đó, 30 μ L dung dịch phân hủy kép PI-Sce I/I-Ceu I được bổ sung vào đó, và sau đó trộn hoàn toàn và sau đó nó được quay nhẹ để thu gom các thành phần.

Bảng 4

Chất phản ứng và các chất khác	Đo chất lỏng (μL)
Nước vô trùng	19,5
10 x dung dịch phân hủy kép	3,0
ADN rpAdeno-X (500ng/ μL)(500 ng/ μL)	2,0
Plasmit pShuttle2-lac Z (500ng/ μL)	—
PI-Sce I (1 đơn vị/ μL)	2,0
I-Ceu I (5 đơn vị/ μL)	0,5
10 x BSA	3,0
Tổng	30,0

Nó được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 3 giờ để thực hiện việc xử lý giới hạn. Hỗn hợp phản ứng sau khi xử lý được tiến hành điện di trên gel agarosa 1%/EtBr.

(6) Sản xuất adenovirut tái tổ hợp

(6-1) Tạo ra ADN plasmit rAdeno-X để chuyển nhiễm tế bào HEK293

Các chất phản ứng được thể hiện trong bảng 5 sau được cho vào ống ly tâm dung tích 1,5 mL đã được tiệt trùng để được trộn, và sau đó nó được ly tâm nhẹ bằng cách sử dụng máy ly tâm nhỏ. Sau đó, nó được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 2 giờ để xử lý ADN plasmit rAdeno-X với enzym giới hạn Pac I.

Bảng 5

Chất phản ứng và các chất khác	Đo chất lỏng (μL)
Nước vô trùng	20
ADN plasmit pAdeno-X (500 ng/ μL)	10
10 x Chất đệm phân hủy Pac I	4
10 x BSA	4
Pac I (10 đơn vị/ μL)	2
Tổng	40

60 μL 1 x chất đệm TE (pH=8,0) và 100 μL hỗn hợp PCI được bổ sung vào, và sau đó chúng được trộn nhẹ bằng cách sử dụng luồng xoáy. Sau đó, nó được ly tâm bằng cách sử dụng máy ly tâm nhỏ ở nhiệt độ 4°C trong 5 phút với tốc độ 14000 vòng/phút. Lốp nước được chuyển một cách cẩn thận sang ống ly tâm sạch đã được tiệt trùng dung tích 1,5 mL. Các thao tác kết tủa ethanol sau đó là giống như các thao tác trong mục (3-4), dung dịch đã được hòa tan từ viên tròn được lưu giữ ở nhiệt độ -20°C cho đến khi sử dụng.

(6-2) Chuyển nhiễm ADN plasmit Adeno-X được phân hủy bởi Pac I vào tế bào HEK293

24 giờ trước khi chuyển nhiễm ADN plasmit, các tế bào HEK 293 được dàn mỏng trên đĩa nuôi cấy 60mm sao cho số lượng tế bào bằng khoảng từ 1 đến 2×10^6 (khoảng 100 tế bào/mm²). Sau đó, chúng được ủ ở nhiệt độ 37°C dưới sự có mặt của CO₂ 5%.

10 µL ADN plasmit Adeno-X được phân hủy Pac I được chuyển nhiễm vào mỗi đĩa nuôi cấy để đưa ADN Adeno-X vào tế bào HEK293, theo phương pháp chuyển nhiễm chuẩn (bộ kit chuyển nhiễm động vật có vú CalPhos, mã sản phẩm 631312, Takara Bio Inc.). Sự xuất hiện của CPE (hiệu ứng bệnh lý tế bào) được xác nhận từ ngày tiếp theo của quá trình chuyển nhiễm.

Một tuần sau, các tế bào đã bám dính trên đáy hoặc thành bên của đĩa nuôi cấy được giải phóng bằng cách trộn nhẹ. Thể huyền phù tế bào thu được được chuyển vào trong ống ly tâm dung tích 15 mL đã được tiệt trùng có đáy hình nón, và được ly tâm ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút với tốc độ 1.500 x g.

Chất kết tủa thu được được tạo huyền phù trong 500 µL PBS tiệt trùng. Dung dịch được tiến hành đông lạnh-rã đông 3 lần, được đông lạnh trong băng khô/etanol và được rã đông trong tủ áp với nhiệt độ 37°C, để thu được chất phân giải trong đó tế bào được rã đông hoàn toàn. Tiếp theo, nó được ly tâm nhẹ để loại bỏ vật chất được tạo huyền phù, và sau đó phần dịch nổi trên bề mặt được chuyển vào một ống đã được tiệt trùng khác để dùng ngay. Chất phân giải không được dùng ngay được lưu giữ ở nhiệt độ -20°C.

250 µL chất phân giải được bổ sung lên trên các tế bào được nuôi cấy trong đĩa có đường kính 60mm, và được tiếp tục nuôi cấy. Lưu ý là bằng cách sử dụng kháng thể kháng Hexon có trong bộ kit chuẩn độ nhanh Adeno-X (mã sản phẩm 631028, Takara Bio Inc.), adenovirus được chuẩn độ theo sổ tay hướng dẫn (PT3651-1) của bộ kit.

(6-3) Khuếch đại virus để tạo virus có độ chuẩn cao

24 giờ trước khi bắt đầu chuẩn độ, các tế bào HEK293 được dàn mỏng trên bình thót cổ T75, và chúng được ủ ở nhiệt độ 37°C với sự có mặt của CO₂ 5% qua đêm để xác nhận rằng chúng bắt đầu hợp dòng từ 50% đến 70%.

Trong ngày tiếp theo, môi trường được trao đổi sang môi trường chứa virus để nhiễm với virus ở MOI = 10. Sau khi ủ ở nhiệt độ 37°C với sự có mặt của CO₂ 5% trong 90 phút, bình thót cổ được lấy ra và 10 mL môi trường được bổ sung vào bình thót cổ.

Chúng được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong thời gian từ 3 đến 4 giờ với sự có

mặt của CO₂ 5%, và CPE được xác nhận. Sau khi giải phóng 50% tế bào, thể huyền phù tế bào đã được giải phóng được điều chế như được mô tả ở trên; nó được chuyển sang ống ly tâm dung tích 15 mL đã được tiệt trùng với đáy hình nón. Thao tác đông lạnh và rã đông như được mô tả ở trên được thực hiện, và các tế bào này được rã đông. Bằng cách sử dụng bộ kit chuẩn độ nhanh Adeno-X (mã sản phẩm 631028), thu được độ chuẩn, 10⁷ PFU/mL.

Thí nghiệm thẩm tách tây được thực hiện, và xác nhận được việc liệu bộ gen adenovirut đã đóng gói có các bản sao của đơn vị phiên mã đặc hiệu dựa trên gen mục tiêu là dạng chức năng hay không.

(7) Lây nhiễm adenovirut vào tế bào mục tiêu

(7-1) Lây nhiễm vào tế bào mục tiêu

24 giờ trước khi lây nhiễm, 1 x 10⁶ tế bào SHED được dàn mỏng trên đĩa 6 lỗ. Trong ngày dàn mỏng tiếp theo, môi trường được loại bỏ, và 1,0 mL môi trường chứa virut được bổ sung vào tâm của mỗi lỗ trong đĩa. Dung dịch này được dàn trải trên lớp đơn tạo ra bằng SHED.

Dung dịch này được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 4 giờ dưới sự có mặt của CO₂ 5%, và virut được lây nhiễm vào SHED. Tiếp theo, môi trường mới được bổ sung vào, và sau đó nó được ủ ở nhiệt độ 37°C với sự có mặt của CO₂ 5%. Từ 24 đến 48 giờ sau khi lây nhiễm, sự biểu hiện của gen đã được đưa vào được phân tích theo hướng phụ thuộc vào thời gian.

(7-2) Phân tích sự biểu hiện β-galactosidaza của tế bào đã được lây nhiễm

Sự biểu hiện β-galactosidaza trong tế bào bám dính đã lây nhiễm Adeno-X-lacZ được thử nghiệm bằng cách sử dụng bộ kit phát hiện β-gal phát quang II (mã sản phẩm 631712, Clontec Laboratories Inc.).

Ví dụ 2

(1) Sản xuất SHED

Răng sữa đã rơi khỏi ổ răng của bé trai khỏe mạnh 10 tuổi được sử dụng. Sau khi răng sữa đã rơi khỏi ổ răng này được khử trùng bằng dung dịch Isodin, thì thân răng được cắt theo phương ngang bằng cách sử dụng mũi khoan kim cương nha khoa, và sau đó mô tủy răng được thu gom bằng cách sử dụng dụng cụ khoan răng. Mô tủy răng đã

thu được được phân hủy trong dung dịch chứa collagenaza typ I 3 mg/mL và thể phân tán 4 mg/mL ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ. Tiếp theo, dung dịch này được lọc bằng cách sử dụng màng lọc tế bào 70mm (Falcon).

Các tế bào đã được lọc được tái tạo huyền phù trong 4 mL môi trường để dàn mỏng vào trong đĩa nuôi cấy có đường kính 6cm. DMEM (Môi trường Eagle được cải biến của Dulbecco) chứa FCS 10% được bổ sung vào đĩa và được nuôi cấy trong khoảng 2 tuần trong tủ áp đã được chuẩn bị trong điều kiện CO₂ 5%, ở nhiệt độ 37°C. Các tế bào bám dính tạo khuẩn lạc (tế bào gốc tủy răng) được xử lý bằng cách sử dụng trypsin 0,05%-EDTA 0,2mM trong 5 phút ở nhiệt độ 37°C, và sau đó các tế bào đã được giải phóng từ đĩa được thu gom.

Tiếp theo, các tế bào bám dính được chọn như được đề cập ở trên được dàn mỏng trên đĩa nuôi cấy dùng cho tế bào bám dính (đĩa bọc collagen), và chúng được ủ trong tủ áp đã được chuẩn bị dưới điều kiện CO₂ 5% ở nhiệt độ 37°C làm môi trường nuôi cấy sơ cấp để thu được tế bào được nuôi cấy sơ cấp. Khi các tế bào này bắt đầu hợp dòng phụ về mặt vĩ mô (khoảng 70% bề mặt của vật chứa nuôi cấy được phủ bằng tế bào), hoặc hợp dòng, thì các tế bào này được xử lý bằng cách sử dụng trypsin 0,05%- EDTA 0,2mM ở nhiệt độ 37°C trong 5 phút để được giải phóng từ vật chứa, và sau đó được thu gom.

Các tế bào thu được từ đó được dàn mỏng một lần nữa trên đĩa chứa môi trường, và thực hiện cấy chuyển một vài lần để được sinh trưởng nhằm đạt đến số lượng tế bào, bằng khoảng 1×10^7 tế bào/mL. Các tế bào thu được được lưu giữ trong nitơ lỏng.

Sau đó, bằng cách sử dụng các tế bào đã được nuôi cấy sơ cấp, việc cấy chuyển được thực hiện ở nồng độ tế bào bằng 1×10^4 tế bào/cm². Trong thử nghiệm này, các tế bào được chuyển qua từ 1 đến 3 được sử dụng. BMMSC người (tế bào gốc trung mô tủy xương) được mua từ Lonza Group Ltd. và được nuôi cấy theo sổ tay hướng dẫn được cung cấp từ nhà sản xuất.

Như được mô tả ở trên, thu được tế bào gốc tủy răng ở răng sữa người đã rơi khỏi ổ răng (SHED). Trong số SHED thu được, khoảng 1×10^6 tế bào trong số các tế bào biểu hiện STRO-1 được phân loại từ mỗi mẫu bằng cách sử dụng FACSTARPLUS (Becton, Dickinson and Company).

Theo sổ tay hướng dẫn của nhà sản xuất của bộ kit nhuộm bromdeoxyuridin BrdU (Invitrogen), BrdU được kết hợp vào các tế bào trong vòng 12 giờ để đánh giá tốc độ sinh trưởng của SHED ($n = 3$ trong mỗi nhóm). Các thử nghiệm được lặp lại 5 lần. Sau khi phân tích một chiều biến số, kiểm định Tukey-Kramer được thực hiện để đánh giá sự chênh lệch có ý nghĩa thống kê.

Để phát hiện ra STRO-1 bằng miễn dịch huỳnh quang, SHED được cố định bằng cách sử dụng paraformaldehyt 3%, và được rửa hai lần bằng PBS và sau đó được xử lý bằng cách sử dụng glyxin 100mM trong 20 phút. Tiếp theo, các tế bào này được thấm với Triton-X 0,2% (Sigma-Aldrich) trong 30 phút. Sau đó, chúng được ủ trong hỗn hợp của huyết thanh lừa 5% và albumin huyết thanh bò 5% trong 20 phút.

Tiếp theo, các tế bào được ủ với kháng thể sơ cấp, kháng thể chuột kháng STRO-1 người (1:100, R&D Inc.) trong 1 giờ, sau đó được ủ với kháng thể thứ cấp, kháng thể dê kháng M-FITC globulin miễn dịch chuột (1:500, Southern Biotech Corp.) trong 30 phút, và sau đó được thiết lập bằng cách sử dụng Vector Shield DAPI (Vector Laboratories Inc.).

Sau đó, α -MEM bổ sung FBS 15% được bổ sung vào đĩa 6 lỗ, và sau đó các tế bào đã phân loại được dàn mỏng trong mỗi lỗ để chuẩn bị tách dòng. Khoảng 300 khuẩn lạc trong số các tế bào đã tăng sinh được gộp chung để thử nghiệm.

(2) Sự chuyển gen

Như được mô tả ở trên, 4 gen, bmi-1, E6, E7 và hTERT được kết hợp vào vector adenovirus để sản xuất ra vector virus để biểu hiện sản phẩm gen. Để làm tham chiếu, vector đối chứng mà các gen này không được kết hợp được sản xuất.

SHED được dàn mỏng trên đĩa phủ collagen có đường kính 100mm ở nồng độ bằng 1×10^6 tế bào, và sau đó DMEM bổ sung FBS 10% được bổ sung vào. Chúng được nuôi cấy đến khi hợp dòng phụ. Môi trường được loại bỏ bằng cách hút, và 500 μ L dung dịch virus đã được pha loãng với môi trường được bổ sung vào ($\text{MOI} = 10$), và sau đó nó được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ trong tủ áp CO_2 5% để lây nhiễm vector virus. Sau 48 giờ tính từ thời điểm lây nhiễm, môi trường được trao đổi với môi trường được đề cập ở trên. Các tế bào đã lây nhiễm được ủ trong 10 ngày trong môi trường bổ sung puromycin (1pg/mL) để chọn lọc dòng vô tính kháng thuốc, và từ 500 đến 600 dòng vô tính kháng thuốc được gộp chung. Trong mỗi 3 đến 4 ngày, khoảng $0,5 \times 10^5$ tế bào

SHED được dàn mỏng trên đĩa nuôi cấy có đường kính 100mmφ để tiến hành cấy chuyển. SHED mà gen được chuyển được đặt tên là SHED-T, và SHED mà gen không được chuyển được đặt tên là SHED-C.

Ví dụ 3

(1) Đo tốc độ sinh trưởng của SHED-C và SHED-T

Trạng thái của số lần nhân đôi quần thể của SHED-T (SHED được chuyển gen) được thể hiện trên Fig.1. Trên hình vẽ này, trục tung thể hiện số lần nhân đôi quần thể (số lần phân chia tế bào, lần), và trục hoành thể hiện khoảng thời gian (ngày nuôi cấy). Tiêu chuẩn đánh giá về sự lão hóa là trạng thái trong đó SHED trong môi trường nuôi cấy không phân chia trong 1 tháng.

Sự sinh trưởng của SHED-C được ngừng lại khoảng 30 lần để đi vào pha lão hóa hoặc kết thúc tăng sinh. Ngược lại, SHED-T đã được chuyển qua và được tăng sinh sau 800 ngày đã được chuyển qua.

(2) Phân tích đếm tế bào theo dòng

Để thu được thể huyền phù tế bào đơn, các tế bào một lớp bám dính được phân hủy bằng trypsin/EDTA. Kháng thể đơn dòng kháng STRO-1 (1:100) được bổ sung đến 2×10^5 tế bào và được để yên để phân tích bằng cách sử dụng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng FACS Calibur (Becton, Dickinson và công ty). Khi mức độ phát huỳnh quang của chúng là lớn hơn 99% về tỷ lệ so với kháng thể đối chứng tương ứng với cùng một isotyp, thì sự biểu hiện là dương. Trong cả SHED-T và SHED-C, các tế bào cấy chuyển đầu tiên và sau đó đều được cố định, và được nhuộm bằng kháng thể STRO-1 gắn kết FITC. Sau đó, nó được phân tích bằng cách sử dụng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng. Thử nghiệm này được lặp lại hai lần. Trong SHED-C, tỷ lệ của tế bào dương tính với STRO-1 là 27% ở PD20, và giảm 15% ở PD30 (Fig.2(A) và Fig.2(B)). Tỷ lệ của tế bào dương tính với STRO-1 trong SHED-T bằng 46% ở PD20 và 41% ở PD40, một cách tương ứng (Fig.2(C) và Fig.2(D)).

(3) Nghiên cứu khả năng biệt hóa

Khả năng biệt hóa của SHED-C hoặc SHED-T ở PD0, PD10 và PD20 được nghiên cứu bằng cách sử dụng khả năng hình thành khối xương mới và nhuộm mô của mô.

Đầu tiên, $2,0 \times 10^6$ tế bào SHED-C hoặc SHED-T được trộn với 40mg bột gồm của hydroxyapatit/tricanxi phosphat (HA/TCP) (Olympus Corporation), và sau đó hỗn hợp này được chủng ngừa dưới da dưới bề mặt lưng của chuột bị suy giảm miễn dịch khi 10 tuần tuổi (NIH-bgnu-xid, cái, Harlan Sprague Dawley Inc.).

Tám tuần sau khi chủng ngừa, chất chủng ngừa được thu hồi, và được cố định bằng cách sử dụng formalin 4% để loại bỏ canxi. Sau đó, nó được đệm bằng cách sử dụng dung dịch PBS chứa EDTA 10% để nhúng vào parafin. Một phần của chủng được lưu giữ trong etanol 70% để nhúng vào nhựa.

Lát cắt parafin được khử parafin, và được hydrat hóa. Sau đó, lát cắt này được nhuộm bằng hematoxylin và eosin (dưới đây gọi là “H&E”). Fig.5(A) đến Fig.5(C) thể hiện hình ảnh được nhuộm của SHED-T (tế bào gốc được làm bất tử) ở PD0 đến PD20, và Fig.5(D) đến Fig.5 (F) thể hiện hình ảnh được nhuộm của SHED-C (tế bào bình thường) ở PD0 đến PD20. Để xác định sự hình thành mới sinh *in vivo*, các vị trí cụ thể được chọn, và diện tích mới sinh và diện tích quan sát được tính để thu được khối lượng mới sinh từ các giá trị này cho chất chủng ngừa tạo ra sau khi chủng ngừa SHED-T hoặc chủng ngừa SHED-C.

Khối lượng mới sinh = diện tích mới sinh ra/diện tích quan sát x 100

Fig.4 thể hiện sự thay đổi ở khối lượng mới sinh của SHED-T và SHED-C tại mỗi số lần nhân đôi quần thể (số lần nhân đôi). Trên hình vẽ này, ** thể hiện $p < 0,05$, *** thể hiện $p < 0,01$. Lưu ý là khối lượng mới sinh thu được bằng cách sử dụng phương trình sau.

Như được thể hiện trên Fig.4, khối lượng xương mới được giảm đi phụ thuộc vào sự gia tăng số lần nhân đôi quần thể trong SHED-C, và nó được giảm xuống khoảng 1/5 ở PD20 so với khối lượng xương mới ở PD0. Ngược lại, khối lượng xương không bị thay đổi bởi PD20 trong SHED-T, và khối lượng xương trong SHED-T thể hiện cao hơn gấp 5 lần so với khối lượng xương của SHED-C ở PD20.

(4) Đánh giá hoạt tính ung thư hóa

1×10^6 tế bào SHED-C hoặc tế bào SHED-T được chủng ngừa vào mô dưới da của chuột bị suy giảm miễn dịch. Sau khi chủng ngừa, tiến hành quan sát trong hơn 30 ngày. Tuy nhiên, khối u không được hình thành trong thời gian quan sát ở chuột bất kỳ

mà các tế bào được cấy ghép. Ngoài ra, tất cả các dòng vô tính từ các tế bào được nuôi cấy đã không thể hiện sự thay đổi hình thái bất kỳ trong khoảng từ 40 đến 200PD trong tế bào SHED-T.

Bằng cách này, đã chứng tỏ được rằng SHED-T không có hoạt tính ung thư hóa.

(5) Đánh giá

Đã chứng tỏ được rằng SHED-T có khả năng tăng sinh, giữ lại khả năng biệt hóa ngay cả sau 260PD. Tuy nhiên, SHED-C có khả năng biệt hóa, nhưng lão hóa không vượt quá 30PD.

Như được mô tả ở trên, đã chứng tỏ rằng SHED-T trở thành tế bào gốc được làm bất tử, và thích hợp để sản xuất phân dịch nổi trên bề mặt SHED có hoạt tính cao hơn trên quy mô lớn.

Ví dụ 4

(1) Hiệu quả chữa bệnh đối với vết loét do chiếu xạ ở vùng cổ

Bệnh nhân ung thư lưỡi 64 tuổi (nam) ở lưỡi bên phải (T3N0M0) có phẫu thuật cắt bỏ một bên lưỡi. Sau 6 tháng, do phát hiện ra di căn trong hạch bạch huyết ở cổ bên phải, nên phải chiếu xạ 60 GY và tiến hành giải phẫu toàn bộ cổ. Sau 3 tuần giải phẫu, sự lành vết thương không hoàn toàn diễn ra từ dưới hàm dưới đến cổ, và vết loét được hình thành (Fig.3(A)). Vì thế, nó được chẩn đoán là vết loét cổ do chiếu xạ.

Để thúc đẩy sự làm lành vết thương, 10 mL dịch nuôi cấy SHED-T thu được như được đề cập ở trên được nhúng chìm trong tấm gạc thấm với kích thước che phủ được vùng được tác động. Sau đó, nó được gắn lên vùng được tác động. Hai ngày một lần, gạc thấm dịch nuôi cấy được thay 14 lần. Sau 1 tháng, vết loét đã khép miệng (Fig.3(B)). Từ kết quả trên, đã chứng tỏ rằng dịch nuôi cấy có hiệu quả chữa được vết loét.

(2) Hiệu quả cứu chữa đối với vết loét do nằm liệt giường

Vết loét do nằm liệt giường hình thành trên hông của người đàn ông 60 tuổi được điều trị bằng dịch nuôi cấy chứa SHED-T. Người đàn ông bị đột quỵ vào 2 năm trước, và bắt đầu liệt nửa người. Để điều trị vết loét do nằm liệt giường, ông ta đã đến bệnh viện.

Mô hạt có lây nhiễm (Fig.6(A)) được loại bỏ hoàn toàn; 10 mL dịch nuôi cấy

SHED-T được nhúng tẩm mà không pha loãng để phủ lên vùng được tác động. Gạc thấm được thay mỗi ngày. Sau 2 tuần, biểu bì mới được hình thành từ mép da sao cho phủ lên được vùng được tác động (Fig.6(B)).

Từ kết quả trên, đã chứng tỏ rằng dịch nuôi cấy có hiệu quả chữa được vết loét và loét do nằm liệt giường.

Ví dụ 5

(1) Hiệu quả chữa bệnh của dịch nuôi cấy SHED-T trong lĩnh vực nha khoa

Hiệu quả chữa bệnh của dịch nuôi cấy SHED-T trong lĩnh vực nha khoa được nghiên cứu ở 28 vị trí trong tổng cộng 16 bệnh nhân (độ tuổi từ 35 đến 70) gồm 11 đàn ông và 5 phụ nữ.

Chi tiết về các trường hợp là 14 bệnh nhân (18 vị trí) liên quan đến cấy ghép, và 7 bệnh nhân (10 vị trí) liên quan đến bệnh nha chu. Chi tiết về bệnh nhân liên quan đến cấy ghép gồm 11 bệnh nhân liên quan đến tình trạng tái tạo xương được định hướng (GBR)- bảo quản chân răng (15 vị trí), và 3 bệnh nhân liên quan đến nâng xoang (3 vị trí).

Ở đây, tiến trình GBR (sự tái tạo xương được định hướng) là phương pháp điều trị để thúc đẩy sự tái tạo mô xương như xương ổ răng bị khiếm khuyết, xương hàm và dạng tương tự. Nó được sử dụng khi không có đủ lượng xương để đóng vật cấy ghép. Ngoài ra, sự bảo quản chân răng là phương pháp tái tạo xương bằng cách chèn xương nhân tạo và dạng tương tự vào trong “lỗ” tại thời điểm nhổ răng để ngăn ngừa sự hủy xương.

Việc nâng xoang (nâng sàn xoang) được thực hiện khi xoang hàm trên nằm bên trong xương hàm trên được mở rộng, và độ dày của một phần nhất định trong xương ổ răng này trở nên không đủ để phẫu thuật cấy ghép. Đây là kỹ thuật để đẩy phần đáy của xoang hàm trên bằng cách chèn mảnh ghép xương hoặc vật liệu giả xương, gần đây một phần của thể cấy ghép được sử dụng, vào trong vị trí của xoang hàm trên có độ dày không đủ.

Việc đánh giá các trường hợp thử nghiệm được tiến hành ở 26 vị trí cho đến tháng 9 năm 2011 bằng cách sử dụng tia X (bao gồm CT) tại thời điểm 3 tháng hoặc 6 tháng từ khi phẫu thuật. Chúng được đánh giá trong 5 nhóm sau. Kết quả được thể hiện trong Bảng 6, Fig.7(A) đến Fig.7(F), Fig.8(A) đến Fig.8(B), và Fig.9(A) đến Fig.9(B).

Trên Fig.7(A), quan sát thấy rằng β -TCP dạng bột được gói gọn trong phần được thể hiện bằng mũi tên màu trắng. Ngược lại, trên Fig.7(C), cấu trúc của phần tương tự thể hiện bằng mũi tên lại được thay đổi để trở thành phi cấu trúc giống như xương nằm ở phía dưới. Đã chứng tỏ được rằng thúc đẩy sự hình thành xương.

Ngoài ra, quan sát thấy rằng mô hạt được hình thành trên phần được thể hiện bằng mũi tên màu trắng, nhưng không phải xương, và xương chưa trưởng thành được hình thành trong phần được thể hiện bằng mũi tên màu đen trên Fig.7(D). Ngược lại, đã xác nhận rằng phần được thể hiện bằng mũi tên màu đen trở thành xương trưởng thành, và thúc đẩy sự tạo xương trên Fig.7(F).

Từ phần mô tả ở trên, việc thúc đẩy sự tạo xương trong nha khoa được xác nhận.

5 (xuất sắc): sự tạo xương được phát hiện là nhiều hơn 30% ở phần khiếm khuyết

4 (hiệu quả): sự tái sinh xương được phát hiện ở phần khiếm khuyết (ít hơn khoảng 30%)

3 (không thay đổi): sự tái sinh xương không rõ ràng nhưng không có sự hủy xương

2 (hủy xương): sự hủy xương được phát hiện ra

1 (kém): sự hủy xương mạnh đã diễn ra hoặc có sự kiện bất lợi

Bảng 6

* sự tái tạo nha chu

Trong số 28 trường hợp, trường hợp số 27 và 28 không đánh giá được do các trường hợp này không là thời điểm để đánh giá. Tất cả các trường hợp được đánh giá (26 trường hợp), xuất sắc (5) là 10 trường hợp (38,5%), hiệu quả (4) là 7 trường hợp (26,9%), không thay đổi (3) là 8 trường hợp (30,8%), hủy xương (2) là 1 trường hợp (3,8%), và tác động bất lợi (1) là 0 trường hợp. Tổng số các trường hợp xuất sắc và hiệu quả là 17 (65,4%), và tỷ lệ đáp ứng là cao.

Cụ thể đối với từng bệnh, xuất sắc (5) là 9 (52,9%), hiệu quả (4) là 4 (23,5%), không thay đổi (3) là 3 (17,7%), hủy xương (2) là 1 (5,9%) và sự kiện bất lợi (1) là 0 trong các trường hợp liên quan đến cấy ghép. Vì thế, trong các trường hợp cấy ghép, tổng số các trường hợp xuất sắc và hiệu quả là 13 (79,4%), và tỷ lệ đáp ứng là rất cao.

Trong 9 trường hợp liên quan đến bệnh nha chu, xuất sắc là 1 (11,1%), hiệu quả

là 3 (33,3%), không thay đổi là 5 (55,6%), và hủy xương và sự kiện bất lợi là 0. Trong các trường hợp liên quan đến bệnh nha chu này, tổng số các trường hợp xuất sắc và hiệu quả là 4 (44,4%), và tỷ lệ đáp ứng là tốt.

Ngoài ra, tùy thuộc vào giàn nối, trong 8 trường hợp có giàn nối β -TCP, xuất sắc là 4 (50,0%), hiệu quả là 3 (37,5%), không thay đổi và tác động bất lợi là 0, và hủy xương là 1 (12,5%). Khi β -TCP được sử dụng làm giàn nối, tổng số các trường hợp xuất sắc và hiệu quả là 7 (87,5%), và tỷ lệ đáp ứng là cực kỳ cao.

Trong 18 trường hợp, Terudermis hoặc Teruplug (Col) được sử dụng làm giàn nối, và xuất sắc là 6 (33,3%), hiệu quả là 4 (22,2%), không thay đổi là 8 (44,5%), hủy xương là 1 (0,1%), và sự kiện bất lợi là 0. Khi Terudermis hoặc Teruplug (Col) được sử dụng làm giàn nối, tổng số các trường hợp xuất sắc và hiệu quả là 10 (55,5%), và tỷ lệ đáp ứng là cao.

Trong các trường hợp cấy ghép này, như được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig 7 đến Fig.9, tất cả các trường hợp đều thể hiện sự tái tạo xương.

Ngoài ra, khi β -TCP được sử dụng làm giàn nối, bằng cách sử dụng kỹ thuật nhuộm hematoxylin và eosin cho mô, xác nhận được việc thay thế β -TCP cho xương và sự việc tương tự sẽ diễn ra như thế nào. Kết quả được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.10(A) đến Fig.10(D). Trên các hình vẽ này, sự hình thành xương mới thể hiện là NB được quan sát thấy một cách rõ ràng, và cả mạch máu được thể hiện là BV cũng được phát hiện ra.

Từ kết quả nêu trên, đã xác nhận được rằng dịch nuôi cấy của SHED-T có khả năng tạo xương.

Ví dụ 6

(1) Cấp cho bệnh nhân đột quỵ xytokin thu được từ tế bào gốc tủy răng dùng trong mũi

Dịch nuôi cấy SHED-T được cấp cho 8 bệnh nhân mắc kèm một triệu chứng bất kỳ trong số chứng thiếu máu cục bộ trong chất xám, chứng thiếu máu cục bộ trong chất trắng, hoặc chứng thiếu máu cục bộ ở vùng kết hợp (6 đàn ông, 2 phụ nữ) để nghiên cứu hiệu quả điều trị. Tất cả 8 bệnh nhân đều được tiếp nhận việc điều trị chuẩn trước khi tham gia vào thử nghiệm lâm sàng. Họ được chẩn đoán bằng MRI, và có thử nghiệm thần kinh và được đánh giá bằng cách sử dụng điểm số NIHSS. Đối với các bệnh nhân

được thể hiện trong bảng 1, họ đã trải qua thời gian từ 20 đến 133 ngày sau khi phát triển triệu chứng của đột quy. Profin của các bệnh nhân được thể hiện trong Bảng 7 sau.

SHED-CM (dịch nuôi cấy SHED-T) được điều chế trong ví dụ 1 được đưa vào bằng cách cấp trong mũi từ vị trí mà là điểm thần kinh khứu giác trong khoang mũi được tập hợp (Fig.11 và Fig.12). Khoảng thời gian cấp được tính từ lúc bắt đầu cấp.

Bảng 7

Số	Bệnh nhân	Giới tính	Tuổi	Triệu chứng	Ngày xuất hiện	Ngày bắt đầu	Ngày trước khi bắt đầu (ngày)	Giai đoạn	Kết quả
1	DM	M	31	liệt nửa người	24/3/2010	9/4/2011	381	mạn tính	không thay đổi
2	TK	M	58	liệt nửa người	22/3/2011	9/4/2011	20	cấp tính	xuất sắc
3	NO	M	72	liệt nửa người	1/6/2007	11/4/2011	1410	mạn tính	không thay đổi
4	YS	F	70	liệt nửa người	1/9/2010	9/5/2011	250	mạn tính	không thay đổi
5	IM	M	58	liệt nửa người	27/9/2010	6/9/2011	344	mạn tính	không thay đổi
6	AU	F	72	liệt nửa người	25/3/2010	19/9/2011	543	mạn tính	không thay đổi
7	MK	M	55	liệt nửa người	6/11/2010	8/10/2011	336	mạn tính	không thay đổi
8	KT	M	60	liệt nửa người	10/12/2010	10/1/2011	31	cấp tính	xuất sắc

Tình trạng phục hồi được nhà giải phẫu thần kinh hoặc nhà thần kinh học đánh giá tại thời điểm 1 ngày, 2 ngày, 4 ngày, 7 ngày, 14 ngày, 1 tháng, 3 tháng, 6 tháng và 1 năm từ khi bắt đầu cấp. Thử nghiệm mùi không được tiến hành. Đối với tất cả bệnh nhân, MRI và MRA của não được tiến hành. MRA được đề cập đến là kỹ thuật chụp mạch máu cộng hưởng từ, và nó là thử nghiệm để thể hiện tình trạng của mạch máu dưới dạng hình ảnh lập thể. Hình ảnh MRA và hình ảnh MRI của một bệnh nhân được thể hiện trên Fig.13 hoặc Fig.14, một cách tương ứng.

Mức độ oxy hóa huyết, thân nhiệt, huyết áp, nhịp tim, tần số hô hấp và yếu tố tương tự trước và sau khi cấp dịch nuôi cấy SHED-T được theo dõi một cách cẩn thận bằng cách sử dụng điện tâm đồ. Việc chụp ảnh tia X lồng ngực cũng được tiến hành trước và sau khi cấp.

Trước khi cấp SHED-CM trong mũi và 1 năm sau, việc chụp mạch máu cộng

hướng từ được thực hiện đối với tất cả các bệnh nhân để xác định cụ thể thương tổn mạch máu, và các hình ảnh quan sát được được chụp ảnh bằng cách sử dụng kỹ thuật chụp ảnh cộng hưởng từ hạt nhân có màu (MRI). Trạng thái thần kinh được ghi điểm trên cơ sở thang điểm đột quỵ của Viện sức khỏe quốc gia (NIHSS).

Ở 2 bệnh nhân (đều trong pha cấp tính) trong số 8 bệnh nhân, phát hiện thấy sự phục hồi xuất sắc theo tiêu chuẩn NIH và các hình ảnh MRI (Fig.15(A) và Fig.15(B), và Fig.16). Bệnh nhân số 2 đã phục hồi để dịch chuyển được cốc bằng cách sử dụng bàn tay và cánh tay phải đã bị tê liệt như được thể hiện trên Fig.17(A), và bắt đầu đi lại được như được thể hiện trên Fig.17(B).

Ở bệnh nhân bất kỳ đã tiếp nhận SHED-CM, không quan sát thấy có khối u, sự sinh trưởng tế bào bất thường trong hệ thần kinh trung ương, và sự thoái hóa thần kinh. Ngoài ra, ở bệnh nhân bất kỳ, không có vấn đề gì ở mũi, u ác tính toàn thân, và bệnh truyền nhiễm toàn thân.

Từ kết quả trên, đã chứng tỏ rằng có thể thu được dịch nuôi cấy không giới hạn bằng cách sử dụng tế bào gốc được làm bất tử. Cũng chứng tỏ được rằng điều này thúc đẩy sự sản xuất các yếu tố sinh trưởng với lượng lớn, khi chế phẩm thuốc được sản xuất bằng cách sử dụng dịch nuôi cấy này. Bằng cách này, đây là ưu điểm mà cho phép giảm chi phí sản xuất của chế phẩm thuốc.

Như được đề cập ở trên, có thể duy trì hàm lượng và các loại yếu tố sinh trưởng trong phần dịch chứa tế bào gần như không đổi, do tế bào gốc được làm bất tử cụ thể được sử dụng làm nguồn tế bào, và tế bào gốc này tiếp tục để tạo ra các yếu tố sinh trưởng cụ thể một cách bền vững. Bằng cách này, đây là ưu điểm mà các thành phần có trong dịch nuôi cấy dễ dàng được chuẩn hóa, khi phần dịch nổi trên bề mặt được sản xuất ở quy mô lớn.

Ví dụ 7

(1) Cấp cho bệnh nhân Alzheimer xytokin thu được từ tế bào gốc tùy răng dùng trong mũi

SHED-T được cấp trong mũi cho bệnh nhân Alzheimer để nghiên cứu hiệu quả điều trị. Độ tuổi trung bình của bệnh nhân, 3 phụ nữ, là $79,5 \pm 3$.

Dịch nuôi cấy SHED-T được cấp qua mũi một lần mỗi ngày trong tổng cộng 28

lần. Kết quả cấp được đánh giá bằng cách sử dụng trắc nghiệm đánh giá trạng thái tâm thần tối thiểu và thang điểm đánh giá chứng sa sút trí tuệ Hasegawa được thể hiện trong bảng 8 và bảng 9.

Như được thể hiện trên Fig.18(A), trong nhóm không được cấp, không có sự cải thiện lớn ngay cả khi MMS hoặc Hasegawa được sử dụng để đánh giá.

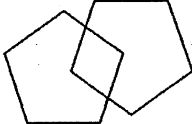
Ngược lại, trong nhóm được cấp dịch nuôi cấy SHED-T, giá trị chỉ số bắt đầu tăng lên sau 3 tháng. Sau 7 tháng, tốc độ tăng trở nên lớn hơn ở cả MMS và Hasegawa để đạt được sự giảm nhẹ triệu chứng của bệnh Alzheimer.

Trong nhóm bệnh nhân này, một bệnh nhân Alzheimer 78 tuổi đã thể hiện sự cải thiện đáng kể. Bệnh nhân này có bệnh nhồi máu não vào ngày 11 tháng 5, năm Heisei 22, và đã biểu hiện chứng mất trí nhớ nghiêm trọng (Chỉ số y tế Cornell: CMI=27). Vì thế, bà ấy được đưa vào khoa chăm sóc vào ngày 20 tháng 12, năm Heisei 22.

Từ 9/2, năm Heisei 23, dịch nuôi cấy SHED-T được cấp qua mũi một lần mỗi ngày với tổng cộng 28 lần. Sau đó, kết quả cấp được đánh giá bằng cách sử dụng trắc nghiệm đánh giá trạng thái tâm thần tối thiểu và thang điểm đánh giá chứng sa sút trí tuệ Hasegawa được thể hiện trong các bảng 8 và 9 sau đây. Phát hiện thấy sự cải thiện chức năng não cao hơn tuyệt vời. Do bệnh nhân này đã phục hồi đủ để tự nấu ăn và tự đi lại, bà được cho rời khoa chăm sóc và được về nhà vào ngày 16 tháng 4, năm Heisei 23.

Bảng 8

Các câu hỏi đánh giá trạng thái tâm thần tối thiểu (Trạng thái tâm thần tối thiểu: MMS)	
Câu hỏi	Câu hỏi
1. Ngày & giờ (5 điểm) - Năm nay là năm bao nhiêu? - Mùa này là mùa gì? - Hôm nay là thứ mấy? - Hôm nay là ngày bao nhiêu?	7. Đọc các ký tự (1 điểm) - Lặp lại câu sau “Mọi người cùng nhau vẽ một đường”
2. Vị trí (5 điểm) - Quận bạn đang ở? - Thành phố bạn đang ở? - Bệnh viện bạn đang điều trị? - Huyện bạn đang ở?	8. Hiểu được câu lệnh (3 điểm) - 3 câu lệnh sau đây được đọc bằng lời, và thực hiện sau khi nghe “Cầm giấy bằng tay phải của bạn” “Gấp đôi tờ giấy” “Đặt nó lên bàn”
3. Trí nhớ - Tên của ba đồ vật không liên quan gì	9. Đọc hiểu (3 điểm) - Sau khi đọc một câu, thực hiện nội

đến nhau được cung cấp cho bệnh nhân và yêu cầu họ nhắc lại y hệt 1 điểm cho 1 câu trả lời. Nếu không có câu trả lời đúng, lặp lại 6 lần	dung đã được viết ra “Gấp quần áo”
4. 7 chuỗi - Liên tục trừ đi 7 bắt đầu từ 100 5 điểm cho 5 lần hoàn thành Dừng lại khi có lỗi	10. Viết câu (1 điểm) - Vui lòng viết một câu
5. Ghi nhớ (3 điểm) - Lặp lại tên của các đồ vật được nêu lại 3 lần	11. Nhận thức về các hình vẽ - Vẽ theo các hình vẽ sau
6. Tên (2 điểm) - Đồng hồ và bút chì lần lượt được đưa cho bệnh nhân, và yêu cầu họ trả lời	

Bảng 9

Từ kết quả trên, dịch nuôi cấy SHED-T có tác dụng có lợi đối với bệnh Alzheimer.

Ví dụ 8

(1) Hiệu quả điều trị của dịch nuôi cấy SHED-T đối với bệnh viêm gan

Phương pháp điều trị tận gốc cho bệnh gan nghiêm trọng như bệnh xơ gan mất bù và bệnh tương tự là cấy ghép gan. Tuy nhiên, chỉ có liệu pháp điều trị triệu chứng được thực hiện, vì các lý do như thiếu đối tượng cho và lý do tương tự. Để khắc phục vấn đề này, liệu pháp tái tạo gan được thực hiện bằng cách cấp các yếu tố sinh trưởng thu được từ tế bào gốc răng sữa được làm bất tử (SHED-T).

Các đối tượng là 3 bệnh nhân nam không có ung thư gan giai đoạn hoạt tính (58 đến 70 tuổi), nhưng Child-Pugh không ít hơn 7, tổng bilirubin không nhiều hơn 3,0mg/dL, và số lượng tiểu cầu không ít hơn $5,0 \times 10^{10}$ như được thể hiện trong Bảng 10. Lưu ý là bệnh nhân đang ở pha mạn tính bệnh nhồi máu não, và họ đang điều trị bệnh Parkinson (ít nhất là qua 1 năm kể từ khi biểu hiện triệu chứng).

Trong phác đồ, các yếu tố sinh trưởng thu được từ tế bào gốc răng sữa được làm bất tử (2 μ g) được hòa tan trong 5 mL nước muối và được cấp qua đường mũi mỗi ngày. 1 phác đồ được cấp 28 lần và 2 phác đồ được tiến hành.

Chi tiết về bệnh và kết quả được thể hiện trong Bảng 11.

Bảng 10

	1 điểm	2 điểm	3 điểm
Bệnh não gan	Không	Nhẹ	Thường hôn mê
Cổ trướng	Không	Ít	Trung bình
Bilirubin huyết thanh (g/dl)	Không quá 2,0	2,0 đến 3,0	Vượt quá 3,0
Albumin huyết thanh (g/dl)	Vượt quá 3,5	2,8 đến 3,5	Không quá 2,8
Thời gian prothrombin (%)	Vượt quá 70	40 đến 70	Không quá 40

Phân loại Child-Pugh	A 5 – 6 điểm
	B 7 9 điểm
	C10 - 15 điểm

Bảng 11

Số	Bệnh nhân	Tuổi	Tên bệnh	Trước phẫu thuật			12 tháng sau đó		
				(mg/dl)			(mg/dl)		
				CP*1	TP*2	Alb*3	CP*1	TP*2	Alb*3
1	A	70	Viêm gan do rượu	7	7,5	2,8	5	8,5	3,4
2	B	58	Viêm gan B	7	6,5	2,9	5	8,0	3,5
3	C	65	Không biết	7	5,0	2,4	5	6,5	3,8

*1: giá trị Child-Pugh

*2: tổng protein

*3: albumin

(2) Kết quả

Ở bệnh nhân bất kỳ, cả tổng hàm lượng protein và nồng độ albumin huyết thanh được tăng lên, và sự thay đổi CP từ nhóm B sang nhóm A. Vì thế, được coi là gan được tái sinh.

Ví dụ 9

Hiệu quả điều trị bởi dịch nuôi cấy SHED-T đối với bệnh đái tháo đường typ II

Hiệu quả điều trị bằng SHED-T đối với bệnh đái tháo đường typ II được nghiên cứu. Trong phác đồ này, yếu tố sinh trưởng thu được từ tế bào gốc răng sữa được làm bất tử (2 μ g) được hòa tan trong 5 mL nước muối và được cấp qua đường mũi mỗi ngày. 1 phác đồ được cấp 28 lần và 2 phác đồ được tiến hành.

Kết quả được đánh giá bằng cách sử dụng thay đổi HbA_{1c} (Hemoglobin được glycat hóa) làm chỉ số trước khi điều trị và 12 tuần sau khi bắt đầu. Lưu ý là sự kiện bất lợi bất kỳ như đau đầu, đau mũi, biến đổi glucoza huyết và sự kiện tương tự không được phát hiện ra ở bệnh nhân. Ngoài ra, tất cả bệnh nhân này đều được cấp metformin làm

thuốc bên trong và tiến hành vận động. Tuy nhiên, không quan sát thấy bất kỳ hiệu quả nào.

Bảng 12

Số	Bệnh nhân	Tuổi	Lịch sử lâm sàng	BMI	Trước khi điều trị	Sau 12 tuần
			(Tuổi)	(kg/m ²)	HbA1c (%)	HbA1c (%)
1	F	51	5	32,2	8,6	6,9
2	M	52	6	32,3	8,23	7,0
3	M	60	4	31,0	8,5	6,5

Ở tất cả bệnh nhân, HbA1c (%) đều giảm xuống so với chỉ số lúc bắt đầu điều trị, và bệnh đái tháo đường được cải thiện. Từ kết quả này, đã chứng tỏ rằng SHED-T cũng có hiệu quả đối với bệnh đái tháo đường.

Ví dụ 10

(Hiệu quả điều trị của dịch nuôi cấy SHED-T đối với bệnh da khó chữa)

SHED-T (2 μ g) được hòa tan trong 5 mL nước muối và bôi lên vùng bị tác động của chó (chó tha môi Labrador, 8 tuổi, cái) có bệnh da khó chữa (viêm da cơ địa) một lần mỗi ngày. 1 phác đồ được cấp 14 lần.

Trước khi sử dụng SHED-T, chế phẩm interferon- γ dùng cho chó được cấp trong 2 tháng, nhưng không đạt được hiệu quả điều trị. Vì thế, chế phẩm này được thay thế bằng SHED-T.

Trước khi bắt đầu điều trị bằng SHED-T, như được thể hiện trên Fig.19A, vùng được tác động có màu trắng do lông bị rụng. Sau khi điều trị, lông mọc và vùng bị tác động được chữa trị hoàn toàn không còn nhận ra được vị trí này đã từng bị viêm da trước đó.

Từ kết quả trên, đã chứng tỏ rằng SHED-T có hiệu quả tích cực đến bệnh da khó chữa.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Sáng chế rất hữu dụng để tạo ra chế phẩm thuốc được sử dụng trong lĩnh vực y tế và nha khoa.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Tế bào gốc được làm bất tử được tạo ra bằng cách phân lập tế bào gốc tủy răng từ tế bào gốc của động vật có vú; tiến hành nuôi cấy sơ cấp tế bào gốc này để thu được tế bào gốc đã được nuôi cấy sơ cấp; chuyển nhiễm 4 gen bao gồm gen hTERT, gen bmi-1, gen HPV-E6 và gen HPV-E7 vào trong tế bào gốc đã được nuôi cấy sơ cấp này để tạo ra tế bào được tải nạp gen; và chọn tế bào gốc được làm bất tử có khả năng sửa chữa đoạn cuối nhiễm sắc thể và phân chia tế bào ít nhất 200 lần trong số các tế bào được tải nạp gen này bằng cách sử dụng lượng biểu hiện STRO-1 và khả năng tái tạo xương với số lần nhân đôi tế bào bằng 20 làm chỉ số.
2. Tế bào gốc được làm bất tử theo điểm 1, trong đó tế bào gốc này là tế bào của răng bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm răng sữa đã rơi khỏi ổ răng, răng vĩnh viễn rơi khỏi ổ răng, răng sữa được nhổ và răng vĩnh viễn được nhổ.
3. Tế bào gốc được làm bất tử theo điểm 1 hoặc 2, trong đó động vật có vú được chọn từ nhóm bao gồm người, lợn, ngựa và khỉ.
4. Tế bào gốc được làm bất tử theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó ít nhất 40% số lượng tế bào là tế bào biểu hiện STRO-1 và chúng có khả năng tạo ra lượng xương mới sinh bằng với khả năng của tế bào đã được nuôi cấy sơ cấp với số lần nhân đôi quần thể bằng 20.
5. Tế bào gốc được làm bất tử theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó tế bào gốc được làm bất tử này tiết ra ít nhất IGF-1, VEGF, TGF- β 1 và HGF vào trong dịch nuôi cấy.
6. Phương pháp tạo ra tế bào gốc được làm bất tử bao gồm các bước:
 - phân lập tế bào gốc tủy răng từ tế bào của động vật có vú;
 - nuôi cấy sơ cấp tế bào gốc này để thu được tế bào được nuôi cấy sơ cấp;
 - chuyển nhiễm 4 gen bao gồm gen hTERT, gen bmi-1, gen HPV-E6 và gen HPV-E7 vào trong tế bào được nuôi cấy sơ cấp này để tạo ra tế bào được tải nạp gen; và
 - chọn tế bào gốc tủy răng có khả năng sửa chữa đoạn cuối nhiễm sắc thể và phân chia tế bào ít nhất 200 lần trong số các tế bào được tải nạp gen này bằng cách sử dụng lượng biểu hiện STRO-1 và khả năng tái tạo xương với số lần nhân đôi tế bào bằng 20 làm chỉ số.

7. Phương pháp tạo ra tế bào gốc được làm bất tử theo điểm 6, trong đó tế bào tùy răng là tế bào của răng bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm răng sữa đã rơi khỏi ổ răng, răng vĩnh viễn rơi khỏi ổ răng, răng sữa được nhổ và răng vĩnh viễn được nhổ.

8. Phương pháp tạo ra tế bào gốc được làm bất tử theo điểm 6, trong đó động vật có vú là động vật được chọn từ nhóm bao gồm người, lợn, ngựa và khỉ.

Fig.1

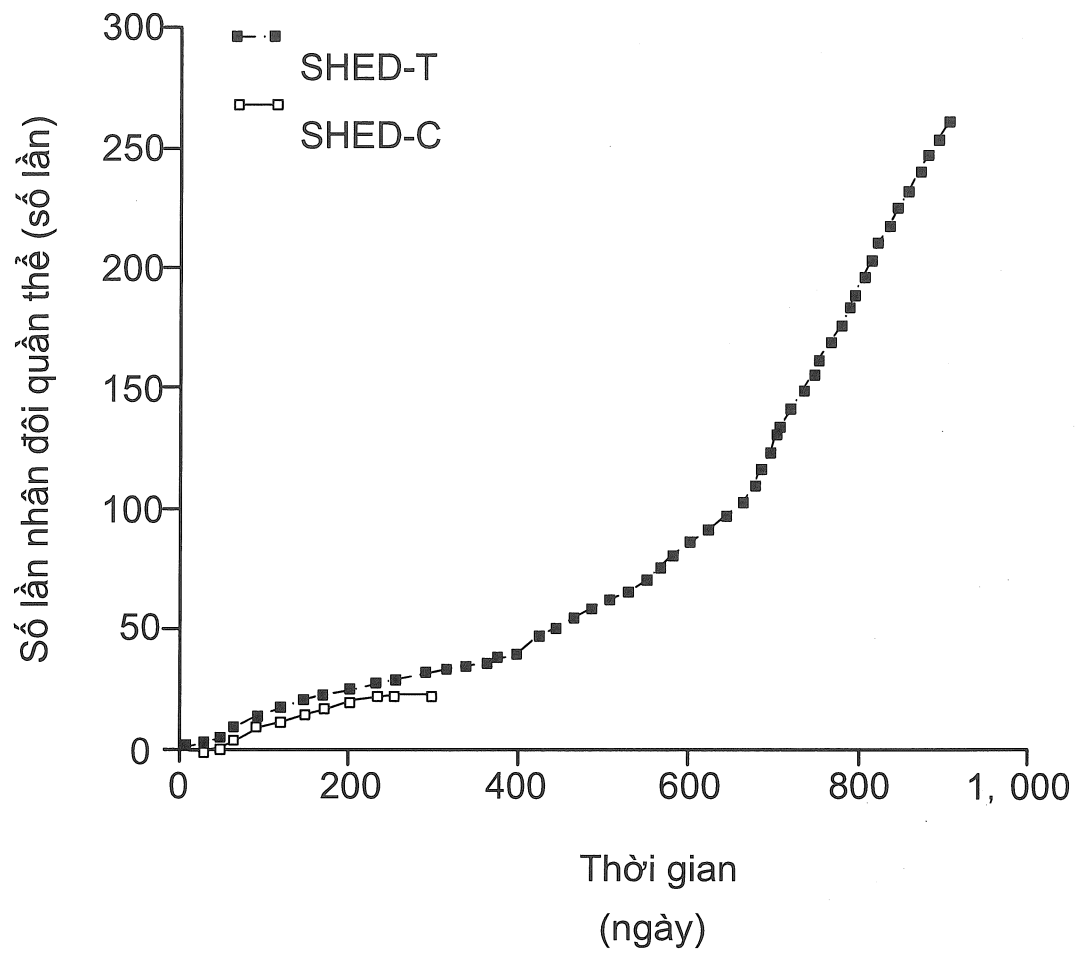
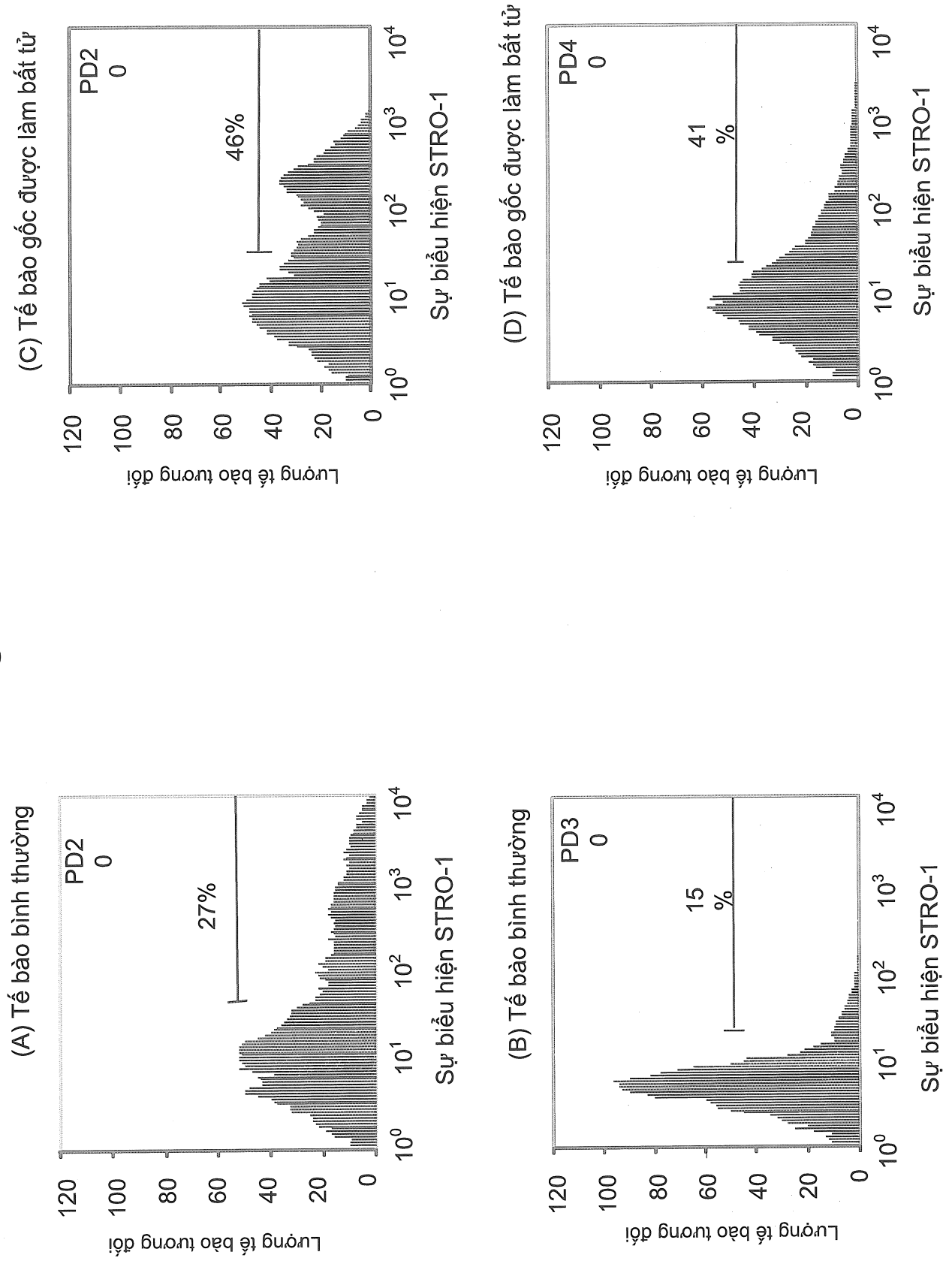


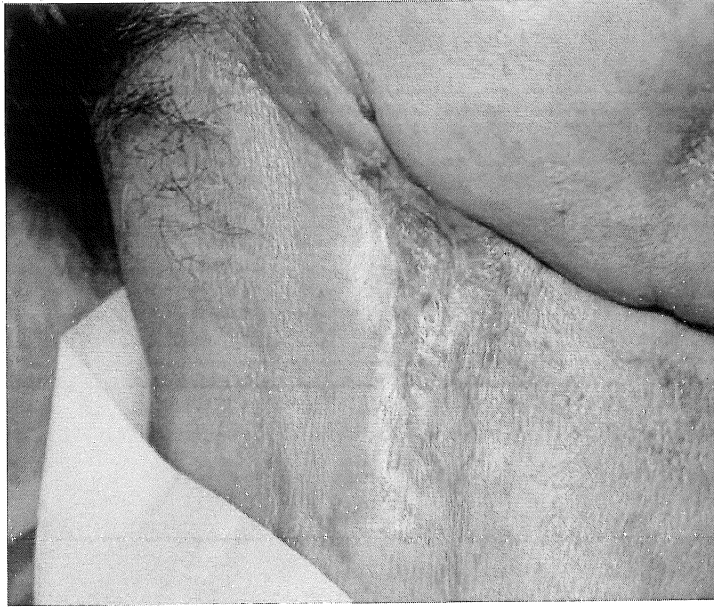
Fig. 2



30137

Fig. 3

(A)



(B)



Fig. 4

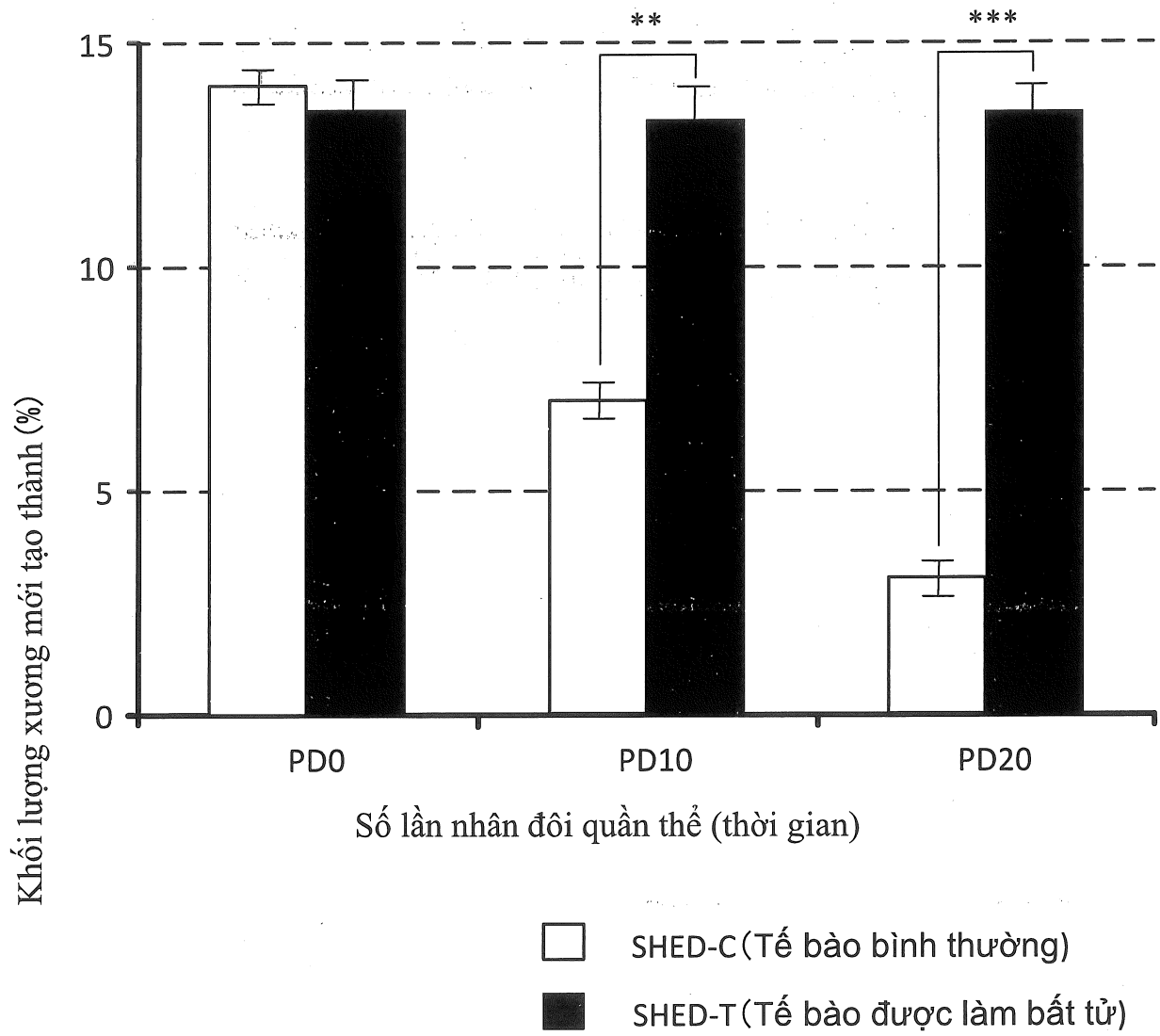


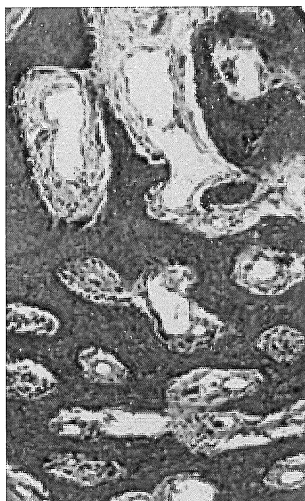
Fig. 5

(A)PD0



Tế bào gốc
được làm bất tử

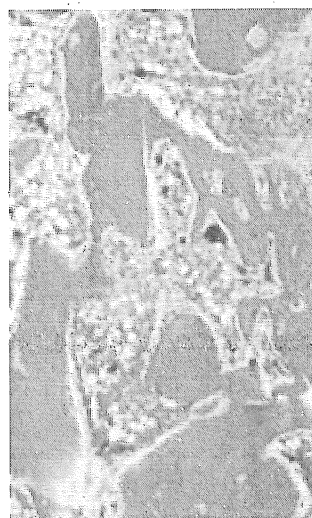
(B)PD10



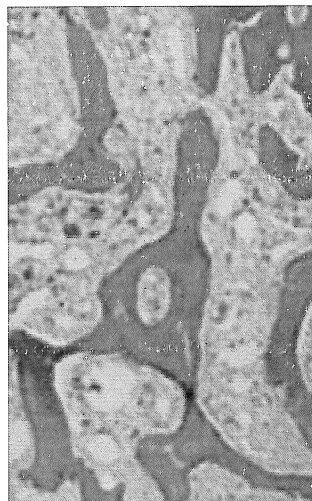
(C)PD20



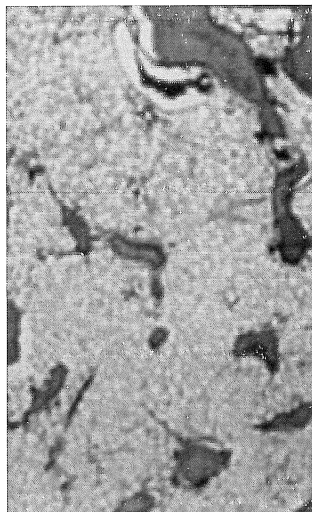
(D)PD0



(E)PD10



(F)PD20

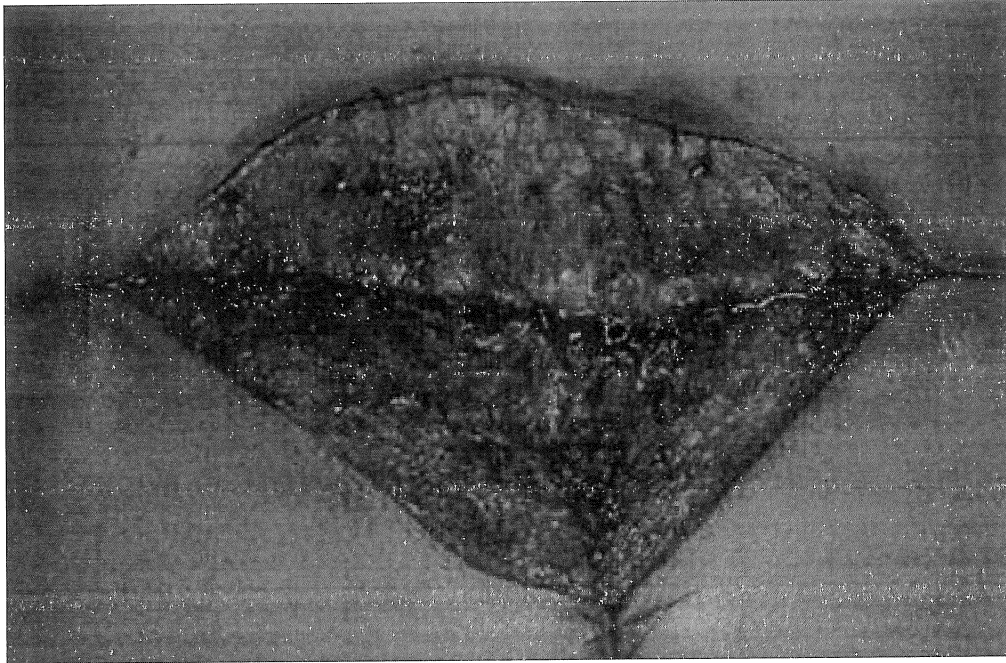


Tế bào bình thường

(Nhuộm HE x200)

Fig. 6

(A)



(B)

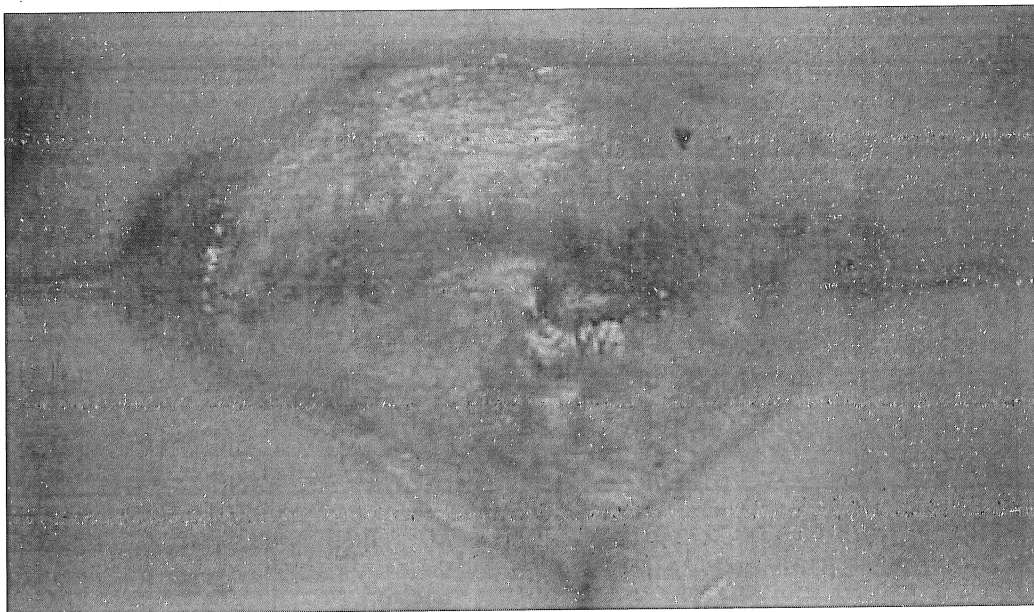


Fig. 7

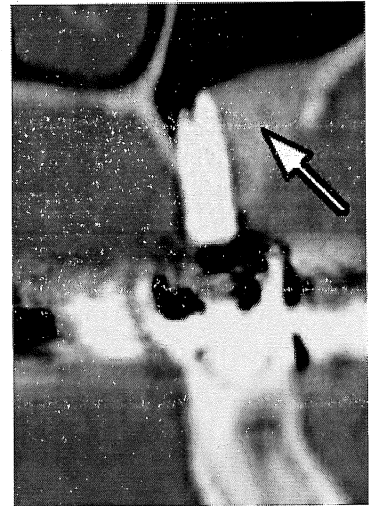
(A)



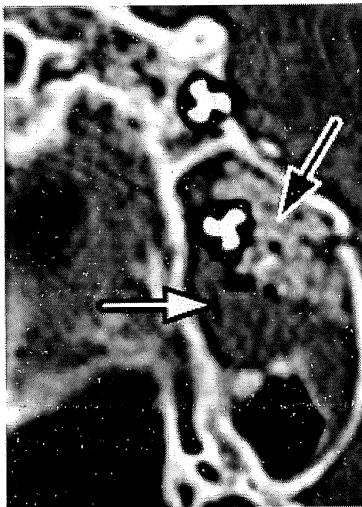
(B)



(C)



(D)



(E)



(F)

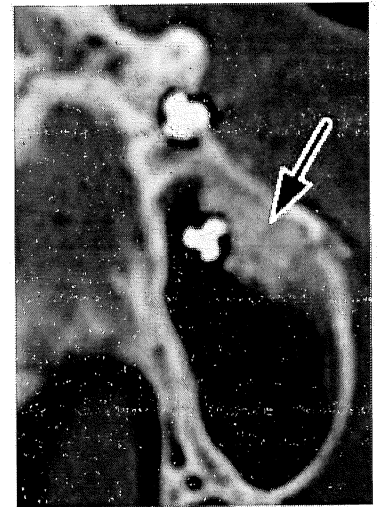


Fig. 8

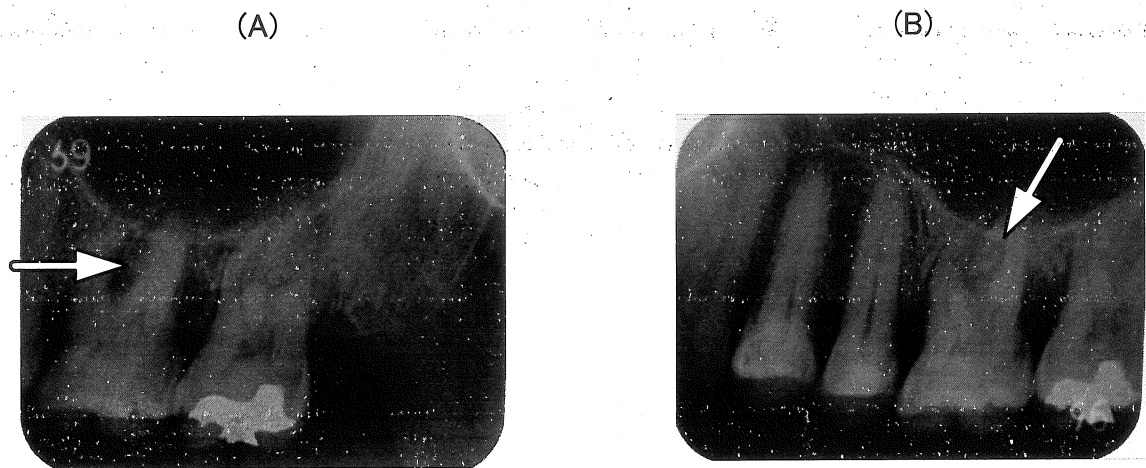


Fig. 9

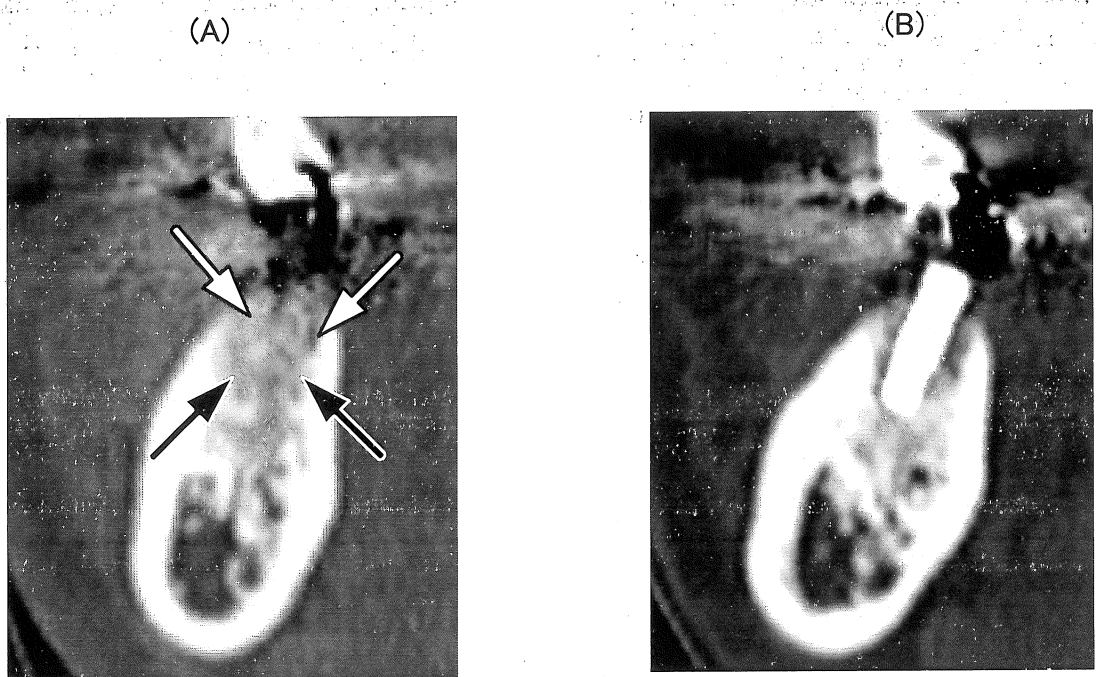


Fig. 10

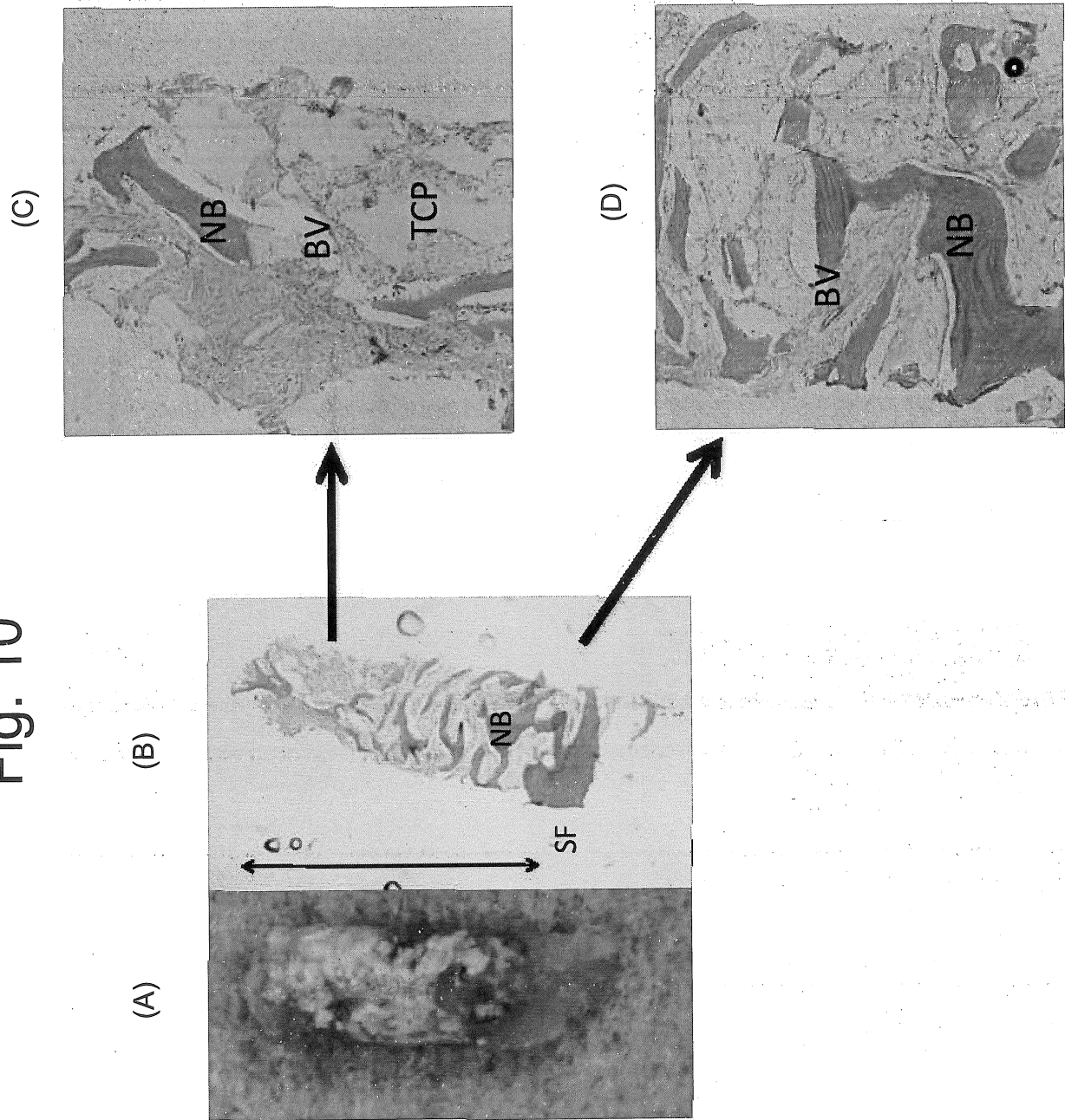


Fig. 11

Cấp tế bào gốc trong mũi dựa trên yếu tố sinh trưởng qua khứu giác

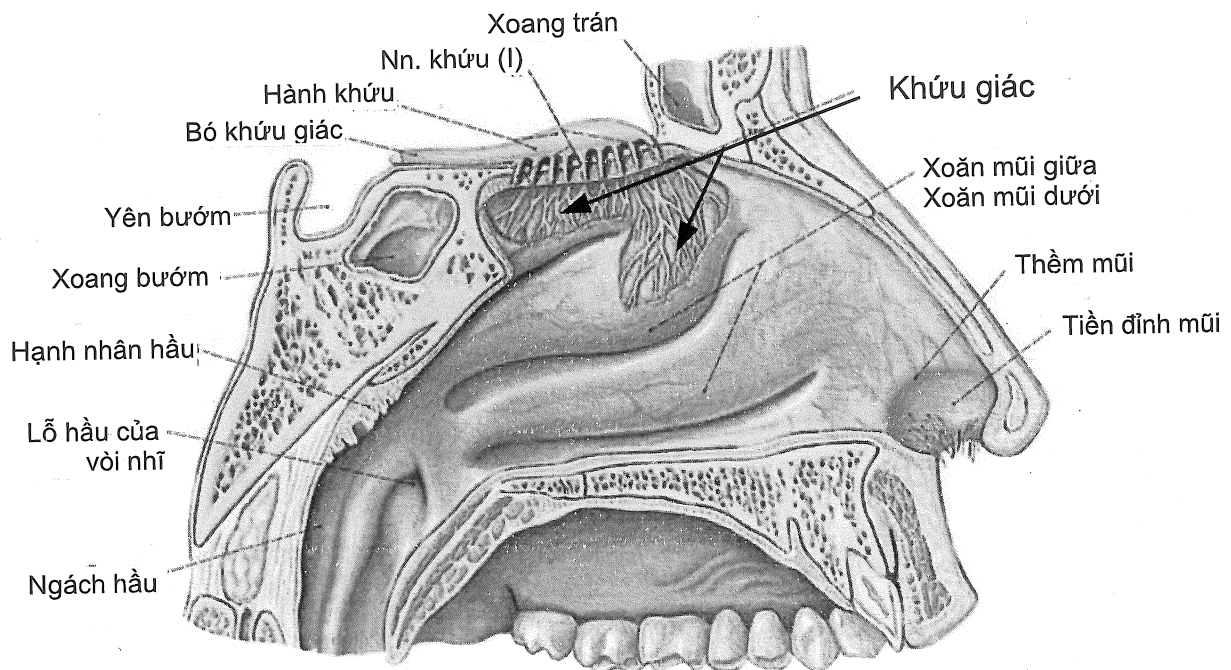


Fig. 12

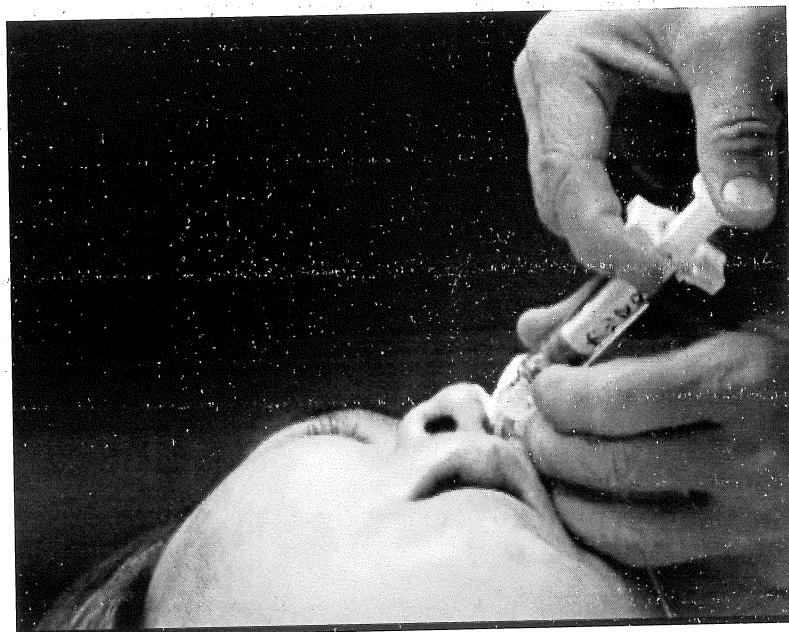


Fig. 13

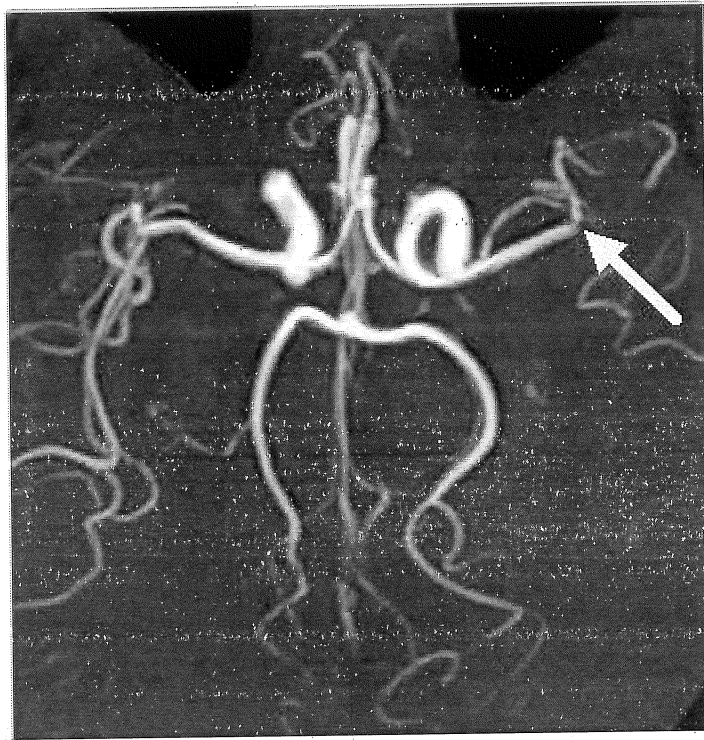


Fig. 14

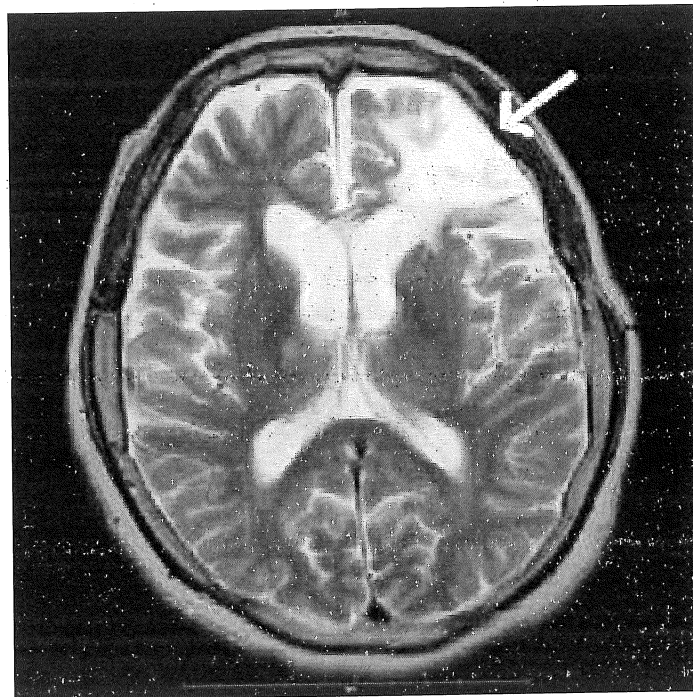
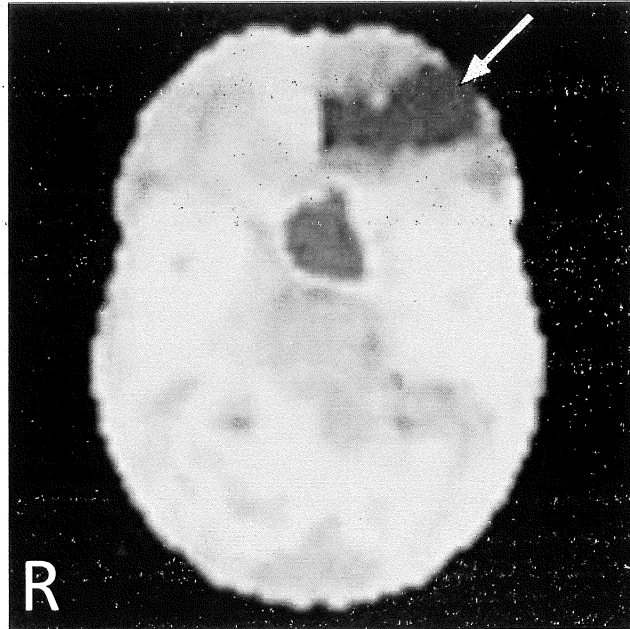


Fig. 15

(A)



(B)

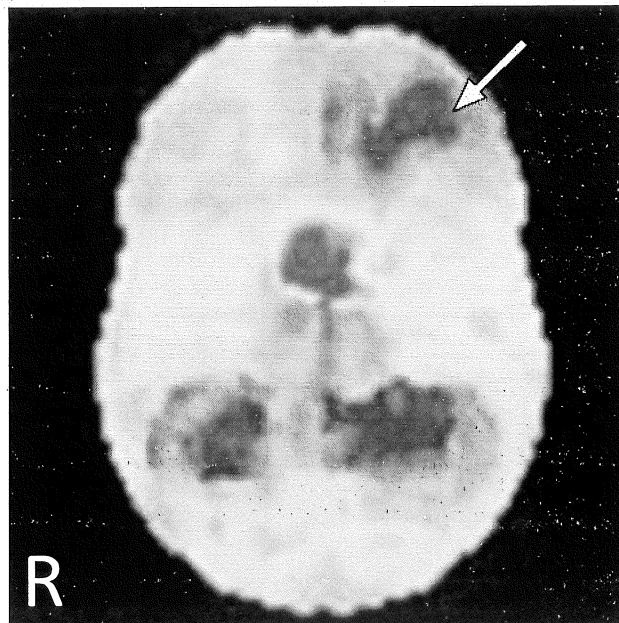
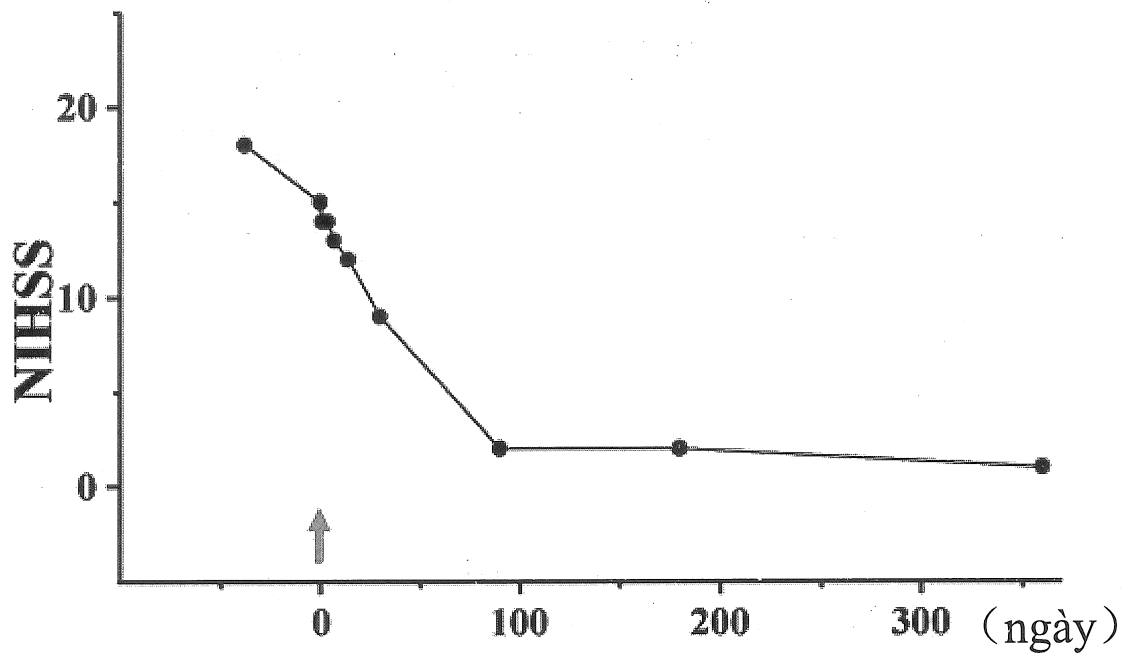


Fig. 16



Số ngày sau điều trị

Fig. 17

(A)



(B)

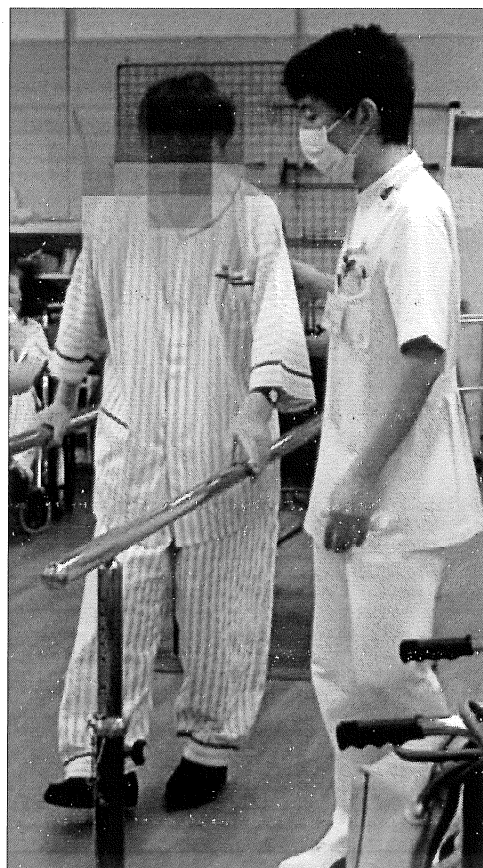


Fig. 18

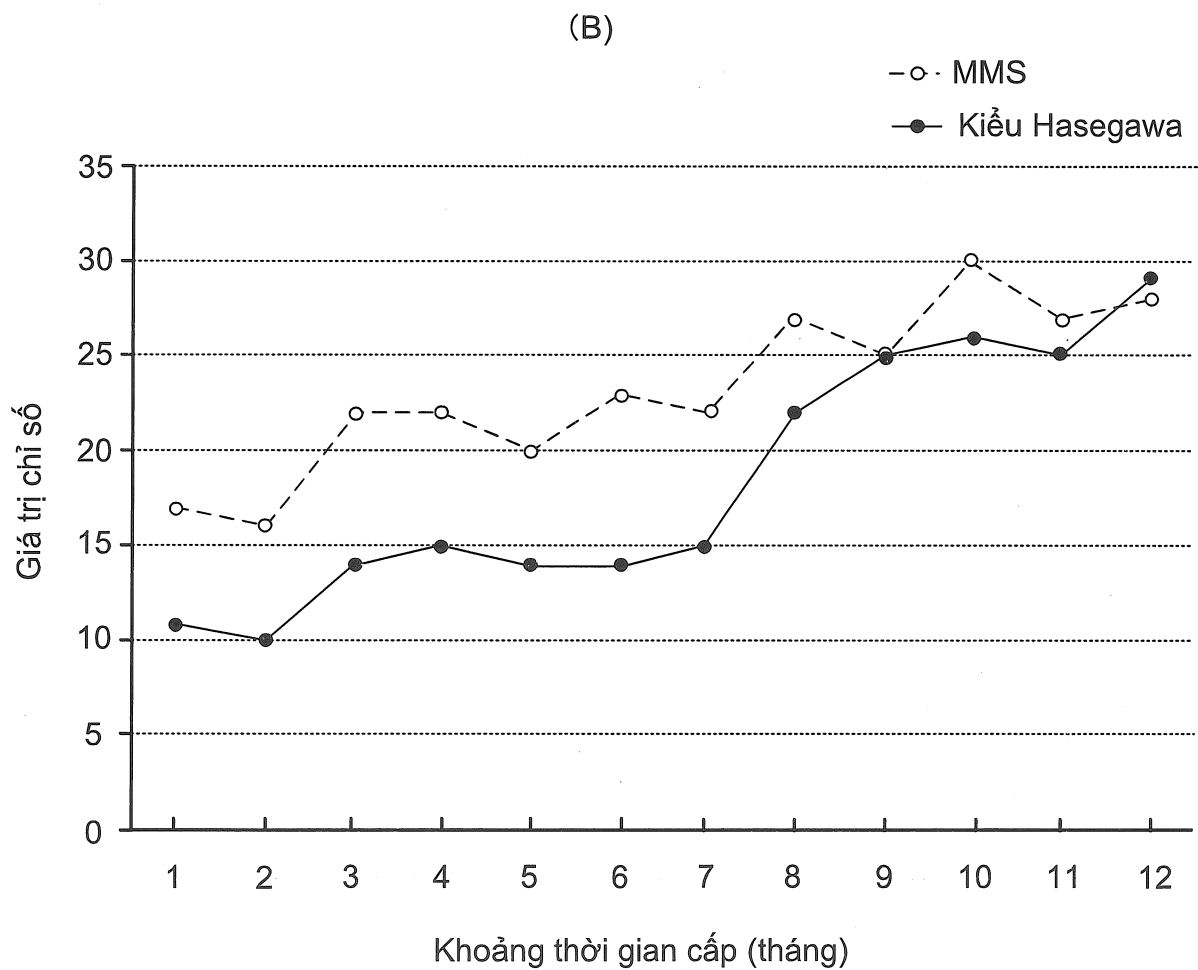
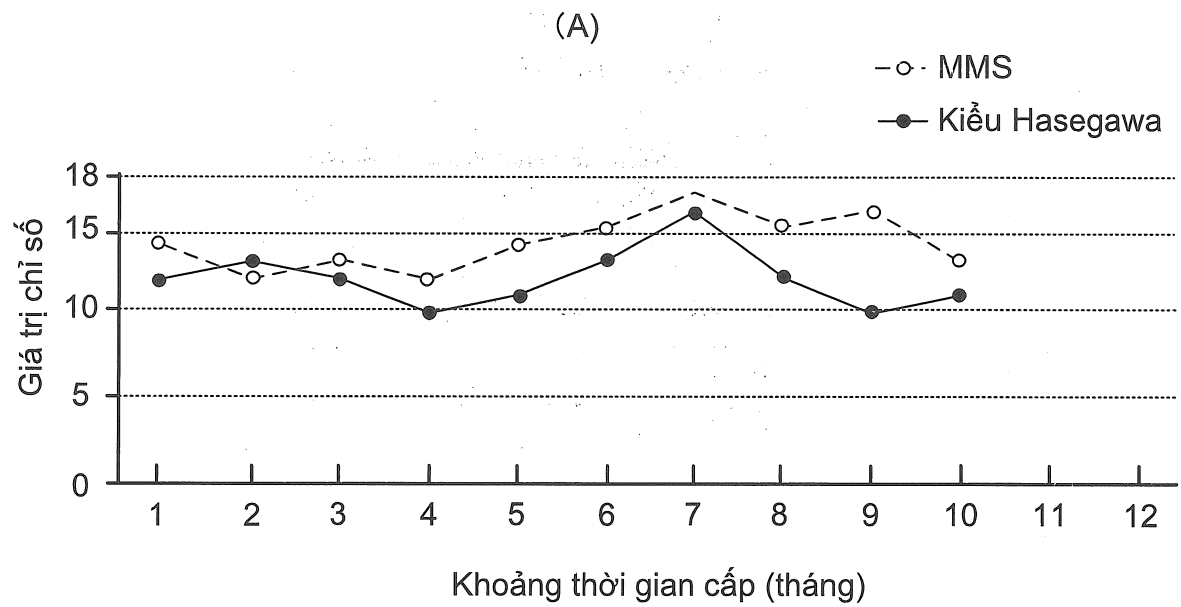


Fig. 19

(A)



(B)

