



(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)



1-0032261

(51)⁷ C12N 5/071; C12N 5/10; C12N 5/079

(13) B

(21) 1-2017-03069

(22) 13/01/2016

(86) PCT/JP2016/050784 13/01/2016

(87) WO 2016/114285 21/07/2016

(30) 2015-006074 15/01/2015 JP

(45) 25/06/2022 411

(43) 27/11/2017 356A

(73) OSAKA UNIVERSITY (JP)

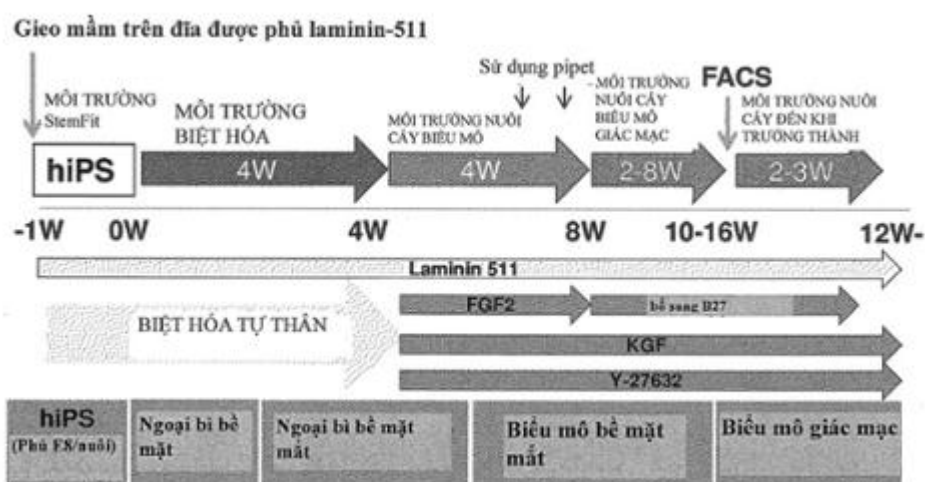
1-1, Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 5650871, Japan

(72) NISHIDA, Kohji (JP); HAYASHI, Ryuhei (JP); ISHIKAWA, Yuki (JP).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP TẠO RA KHUẨN LẠC GỒM CÁC VÙNG ĐỒNG TÂM CỦA CÁC DÒNG TẾ BÀO NGOẠI BÌ KHÁC NHAU VÀ KHUẨN LẠC GỒM CÁC VÙNG ĐỒNG TÂM CỦA CÁC DÒNG TẾ BÀO NGOẠI BÌ KHÁC NHAU ĐƯỢC TẠO RA BẰNG PHƯƠNG PHÁP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra khuẩn lạc gồm các vùng đồng tâm của dòng tế bào ngoại bì khác nhau. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra các tế bào liên quan đến mắt, các tế bào biểu mô giác mạc và tẩm tế bào giác mạc. Sáng chế cũng đề cập đến khuẩn lạc gồm các vùng đồng tâm của dòng tế bào ngoại bì khác nhau có nguồn gốc từ tế bào gốc toàn năng, tẩm tế bào biểu mô giác mạc đã phân tầng có nguồn gốc từ các tế bào gốc toàn năng, và tế bào biểu mô giác mạc có nguồn gốc từ tế bào gốc toàn năng.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp cảm ứng sự biệt hóa của các tế bào biểu mô giác mạc từ tế bào gốc toàn năng. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp biệt hóa tự thân các tế bào gốc toàn năng (đặc biệt là, các tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng) thành dòng tế bào ngoại bì trong môi trường không có huyết thanh mà không sử dụng tế bào nuôi và cảm ứng sự biệt hóa của tế bào dòng ngoại bì bề mặt mắt thu được thành tế bào biểu mô giác mạc.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Những năm gần đây, công cuộc nghiên cứu về y học tái tạo (y học tế bào) vẫn đang tiếp diễn nhằm bổ sung cho các mô và cơ quan bị tổn thương bằng cách cảm ứng sự biệt hóa của tế bào chưa biệt hóa (tế bào gốc). Đặc biệt, tế bào gốc phôi (tế bào ES) có thể được biệt hóa thành tất cả các tế bào ngoại trừ tế bào nhau thai, và vì vậy việc cảm ứng sự biệt hóa các tế bào này thành nhiều dòng tế bào khác nhau và việc xác định yếu tố quyết định sự biệt hóa của chúng hiện đang nhận được nhiều sự quan tâm. Tuy nhiên, việc nghiên cứu và sử dụng tế bào gốc vẫn còn nhiều hạn chế do vấn đề đạo đức liên quan đến việc phá bỏ trứng đã thụ tinh khi chúng làm tổ, và cũng gặp vấn đề về phản ứng đào thải do tế bào ES lấy từ bệnh nhân thực hiện cấy ghép không thể được tạo thành. Vì vậy, trong tình huống đó, các loại bệnh điều trị được bằng tế bào ES bị hạn chế và tính hữu dụng trong lâm sàng của các tế bào này vẫn chưa rõ ràng.

Ngược lại, một số yếu tố nhất định được đưa vào tế bào sinh dưỡng hoặc tế bào gốc chưa biệt hóa để tạo thành tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng có khả năng biệt hóa toàn năng tương tự với khả năng của tế bào ES. Các ví dụ điển hình về tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng này bao gồm tế bào iPS được Yamanaka *et al.* tạo ra. Y học tái tạo sử dụng tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng này không gặp phải các vấn đề

về đạo đức và cũng có thể sử dụng tế bào lấy từ bệnh nhân làm nguồn tế bào để tránh gặp phải vấn đề về phản ứng đào thải.

Các tế bào biểu mô đã được báo cáo là có thể được cảm ứng tạo ra sự biệt hóa từ tế bào iPS hoặc tế bào ES của người (tài liệu Patent 1 và các tài liệu không phải Patent 1 đến 2). Nhiều tế bào biểu mô đã cảm ứng biểu hiện gen đánh dấu tế bào biểu mô phân tầng, như keratin 14 và p63, cũng cho phép biệt hóa thành tế bào biểu mô phân tầng, như biểu mô da. Các tác giả sáng chế đã thông báo về việc biệt hóa thành biểu mô giác mạc trong số các biểu mô phân tầng (Các tài liệu Patent 2 đến 3 và tài liệu không phải Patent 3); tuy nhiên, việc không thể được tạo thành dạng tấm, việc không thể cảm ứng được tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc có khả năng tăng trưởng cao, và việc sử dụng tế bào nuôi sẽ gặp khó khăn khi sử dụng trong lâm sàng.

Để sử dụng trong lâm sàng, tấm biểu mô giác mạc cần có cấu trúc mô chức năng, phân tầng và việc biểu hiện các gen đánh dấu (đặc biệt là, keratin 12, pax6, và MUC16) có thể được tạo ra từ tế bào iPS của người mà không sử dụng tế bào nuôi; tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có báo cáo nào như vậy.

Danh mục trích dẫn

Tài liệu Patent

Tài liệu Patent 1: Công bố quốc tế số WO 2012/073238

Tài liệu Patent 2: Công bố quốc tế số WO 2010/134619

Tài liệu Patent 3: Công bố quốc tế số WO2012/144582

Tài liệu không phải Patent

Tài liệu không phải Patent 1: Guenou, H., et al., The Lancet 374, (2009) p1745-1753.

Tài liệu không phải Patent 2: Metallo, C.M., et al., Stem cells (2008) 26, 372-380.

Tài liệu không phải Patent 3: R. Hayashi et al., Volume 7, Issue 9, e45435, PLOS ONE, 2012

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Mục tiêu của sáng chế là đề xuất phương pháp cảm ứng sự biệt hóa các tế bào gốc toàn năng (đặc biệt là tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng) thành dòng tế bào biểu mô bề mặt mắt, như biểu mô giác mạc hoặc biểu mô kết mạc, mà không sử dụng tế bào nuôi hoặc huyết thanh và đề xuất tẩm tế bào biểu mô giác mạc chức năng được nuôi cấy và phân tầng từ tế bào gốc toàn năng (đặc biệt là tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng).

Giải pháp cho vấn đề

Các tác giả sáng chế đã tiến hành nghiên cứu chuyên sâu nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, và phát hiện ra rằng khi tế bào iPS của người được nuôi cấy trong môi trường biệt hóa chứa KSR và các thành phần tương tự mà không sử dụng huyết thanh hoặc tế bào nuôi, thì các tế bào này biệt hóa tự thân trong khoảng 4 tuần và tạo thành khuẩn lạc (nhiều vùng) gồm các vùng đồng tâm của dòng tế bào ngoại bì khác nhau. Ngoài ra, các tác giả sáng chế cũng phát hiện ra rằng các tế bào dòng ngoại bì bề mặt mắt gồm cả tế bào gốc biểu mô có thể được tách ra khỏi khuẩn lạc thu được, và tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc được cảm ứng biệt hóa, được phân lập và tiếp tục được nuôi cấy đến khi trưởng thành để tạo ra tế bào biểu mô giác mạc phân tầng. Tế bào biểu mô giác mạc thu được có thể thu hồi ở dạng tẩm và cấy ghép và đã được công nhận là có chức năng như tế bào biểu mô giác mạc *in vitro* và *in vivo* thì giống như tế bào biểu mô giác mạc có nguồn gốc từ tế bào sinh dưỡng.

Sáng chế đã được thực hiện dựa trên các phát hiện ở trên, và liên quan đến các đối tượng nêu trong các điểm từ (1) đến (15) sau đây:

(1) Phương pháp tạo ra khuẩn lạc gồm các vùng đồng tâm của dòng tế bào ngoại bì khác nhau, bao gồm bước nuôi cấy hai chiều tế bào gốc toàn năng (đặc biệt là tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng) trong môi trường không có huyết thanh mà không sử dụng tế bào nuôi;

(2) Phương pháp theo điểm (1) ở trên, trong đó các vùng đồng tâm của dòng tế bào ngoại bì khác nhau được tạo thành thông qua việc biệt hóa tự thân các tế bào gốc toàn năng;

(3) Phương pháp theo điểm (1) hoặc (2) ở trên, trong đó môi trường không có huyết thanh này không chứa lượng bằng 0,5nM hoặc cao hơn 0,5nM của BMP4 (protein tạo hình xương 4), yếu tố tăng trưởng biến nạp, hoặc activin;

(4) Phương pháp theo điểm (3) ở trên, trong đó môi trường không có huyết thanh này còn không chứa ít nhất một hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm axit retinoic nồng độ cao, chất ức chế BMP, chất ức chế TGF β , và Noggin;

(5) Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (4) ở trên, trong đó các tế bào gốc toàn năng được nuôi cấy bằng cách sử dụng bình nuôi cấy được phủ một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm collagen, fibronectin, laminin hoặc các mảnh laminin, vitronectin, cơ chất màng đáy, gelatin, axit hyaluronic, polylysin, vitronectin, và axit hyaluronic;

(6) Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (5) ở trên, trong đó khuôn lặc chứa các vùng tế bào dòng ngoại bì thần kinh, tế bào dòng mào thần kinh/tế bào dòng đài thị giác, tế bào dòng ngoại bì bề mặt mắt, và tế bào dòng ngoại bì bề mặt, theo thứ tự tương ứng;

(7) Phương pháp tạo ra các tế bào liên quan đến mắt, phương pháp này bao gồm các bước:

tạo ra khuôn lặc gồm các vùng đồng tâm của dòng tế bào ngoại bì khác nhau bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (6) ở trên,

tách các tế bào nằm trong vùng cụ thể ra khỏi khuôn lặc đó, và

cảm ứng sự biệt hóa của các tế bào thành tế bào liên quan đến mắt;

(8) Phương pháp theo điểm (7) ở trên, trong đó các tế bào liên quan đến mắt là tế bào bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm tế bào biểu mô giác mạc, tế bào biểu mô sắc tố võng mạc, tế bào thần kinh võng mạc, tế bào biểu mô kết mạc, tế bào biểu mô rìa giác mạc, tế bào nội mô giác mạc, tế bào keratin, tế bào mô đệm móng mắt, tế bào màng cứng, tế bào biểu mô sắc tố móng mắt, tế bào biểu mô lông mi, tế bào thần kinh thị giác, nguyên bào sợi dưới rìa giác mạc, nguyên bào sợi dưới kết mạc, tế bào tuyến lệ, tế bào tuyến nhử mắt, tế bào đài, tế bào biểu mô thủy tinh thể, và tế bào biểu mô mí mắt;

(9) Phương pháp tạo ra các tế bào biểu mô giác mạc, phương pháp này bao gồm các bước:

tạo ra khuẩn lạc gồm các vùng đồng tâm của dòng tế bào ngoại bì khác nhau bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (6) ở trên,

nuôi cấy khuẩn lạc này trong môi trường chứa yếu tố tăng trưởng,

tách các tế bào nằm trong vùng tế bào dòng ngoại bì bề mặt mắt và nuôi cấy các tế bào trong môi trường chứa KGF, chất ức chế Rock, và chất thay thế huyết thanh để cảm ứng tạo ra sự biệt hóa thành tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc, và

phân lập các tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc và cảm ứng tạo ra sự biệt hóa thành tế bào biểu mô giác mạc;

(10) Phương pháp theo điểm (9) ở trên, trong đó tế bào biểu mô giác mạc được phân lập bằng cách kiểm tra việc biểu hiện hay không biểu hiện của một hoặc nhiều gen đánh dấu được chọn từ nhóm bao gồm ITG β 4, SSEA4, TRA-1-60, và CD200, tốt hơn là tính dương với ITG β 4 và tính dương với SSEA4, tốt hơn nữa là tính âm với TRA-1-60 hoặc CD200 và tính dương với ITG β 4 và SSEA4, tốt hơn nữa là tính âm với CD200 và tính dương với ITG β 4 và tính âm với SSEA4, làm chỉ số;

(11) Tế bào biểu mô giác mạc được tạo ra bằng phương pháp theo điểm (9) hoặc (10) ở trên, trong đó tế bào biểu mô giác mạc này dương tính với K12, pax6, và p63;

(12) Phương pháp tạo ra tấm tế bào giác mạc, phương pháp này bao gồm bước tạo ra các tế bào biểu mô giác mạc bằng phương pháp theo điểm (9) hoặc (10) ở trên và một bước nữa là nuôi cấy phân tầng tế bào biểu mô giác mạc thu được;

(13) Khuẩn lạc gồm các vùng đồng tâm của dòng tế bào ngoại bì khác nhau có nguồn gốc từ tế bào gốc toàn năng (đặc biệt là tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng);

(14) Khuẩn lạc theo điểm (13) ở trên, được tạo ra bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (6) ở trên;

(15) Tầm tế bào biểu mô giác mạc phân tầng có nguồn gốc từ các tế bào gốc toàn năng (đặc biệt là tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng), trong đó các tế bào biểu mô giác mạc dương tính với K12, pax6, và MUC16; và

(16) Tế bào biểu mô giác mạc có nguồn gốc từ các tế bào gốc toàn năng (đặc biệt là tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng) được tạo ra bằng cách tách và nuôi cấy các tế bào nằm trong vùng tế bào dòng ngoại bì bề mặt mắt trong khuôn lặc theo điểm (13) hoặc (14), các tế bào biểu mô giác mạc này dương tính với K12, pax6, và p63.

Hiệu quả của sáng chế

Cho đến nay đã có báo cáo về phương pháp cảm ứng các tế bào biểu mô từ tế bào iPS của người; tuy nhiên, vẫn chưa tạo ra được tế bào chức năng phân tầng giữ gen đánh dấu đặc hiệu cho tế bào biểu mô giác mạc, như keratin 12, pax6, và MUC16. Tế bào biểu mô thu được bằng phương pháp theo sáng chế biểu hiện các gen đánh dấu này, có thể cấy ghép được, và hoạt động như tế bào biểu mô giác mạc *in vitro* và *in vivo* thì giống như tế bào biểu mô giác mạc có nguồn gốc từ tế bào sinh dưỡng. Phương pháp theo sáng chế không sử dụng tế bào nuôi có nguồn gốc từ động vật hoặc huyết thanh; vì vậy, các tế bào thu được có độ an toàn cao và phù hợp để sử dụng trong lâm sàng.

Ngoài ra, không chỉ các tế bào biểu mô giác mạc mà cả các tế bào khác nhau cấu thành nên mắt, như tế bào biểu mô kết mạc, tế bào võng mạc, và tế bào tuyến lệ, đều có thể được tạo ra từ khuôn lặc gồm các vùng đồng tâm của dòng tế bào ngoại bì khác nhau thu được bằng phương pháp theo sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là bản vẽ thể hiện sơ đồ thực hiện phương pháp cảm ứng sự biệt hóa từ các tế bào iPS của người thành tế bào biểu mô bề mặt mắt/biểu mô giác mạc.

Fig.2 là loạt ảnh thể hiện quy trình cảm ứng sự biệt hóa từ các tế bào iPS của người thành tế bào biểu mô bề mặt mắt/biểu mô giác mạc trong đó Fig.2A là loạt ảnh vào ngày 0, ngày 5, ngày 10, ngày 15, ngày 20, và ngày 25, và Fig.2B là ảnh sau 6 tuần.

Fig.3 là loạt ảnh thể hiện các đặc điểm của tế bào nằm trong vùng tế bào ngoại bì được biệt hóa tự thân từ tế bào iPS của người trong đó Fig.3A thể hiện sự biểu hiện của pax6 và p63 trong các vùng từ vùng thứ nhất đến vùng thứ ba, Fig.3B, sự biểu hiện của pax6 và p63 trong các vùng từ vùng thứ hai đến vùng thứ tư, Fig.3C, sự biểu hiện của E-cadherin và p63 trong các vùng từ vùng thứ nhất đến vùng thứ ba, và Fig.3D, sự biểu hiện của β III-tubulin và p63 trong các vùng từ vùng thứ nhất đến vùng thứ ba. Các kết quả này thể hiện sự có mặt của tế bào biểu mô bề mặt mắt dương tính kép với p63/pax6 chỉ ở vùng thứ ba.

Fig.4 là loạt ảnh thể hiện các đặc điểm của tế bào nằm trong vùng tế bào ngoại bì được biệt hóa tự thân từ tế bào iPS của người. Fig.4A thể hiện sự biểu hiện của tế bào thần kinh võng mạc dương tính với CHX10 ở bên trong vùng thứ hai và tế bào biểu mô sắc tố võng mạc ở bên ngoài; Fig.4B thể hiện sự biểu hiện của tế bào mào thần kinh dương tính kép với p75/SOX 10 trong vùng giả định của vùng thứ hai ở khoảng tuần biệt hóa thứ 2; và Fig.4C thể hiện sự biểu hiện của tế bào thủy tinh thể trong các vùng từ vùng thứ 2 đến vùng thứ 3 ở tuần biệt hóa thứ 4 và sự phân tán rộng của chúng trong các phần vùng từ vùng thứ 2 đến vùng thứ 3 suốt quá trình cảm ứng biệt hóa.

Fig.5 là loạt biểu đồ thể hiện sự biểu hiện của các gen đánh dấu trong vùng tế bào ngoại bì được biệt hóa tự thân từ tế bào iPS của người (vùng thứ nhất (thứ nhất): dòng ngoại bì thần kinh (Sox2+, TUBB3+, và Sox6+), vùng thứ 2 (thứ 2): dòng tế bào mào thần kinh/túi thị giác (pax6+, Sox10+, và Rx+), vùng thứ 3 (thứ 3): dòng ngoại bì bề mặt mắt (pax6+, p63+, E-cadherin+, và K18), và vùng thứ 4 (thứ 4): dòng ngoại bì bề mặt (p63+, E-cadherin+, và K18+).

Fig.6 là loạt ảnh thể hiện sự biểu hiện của các gen đánh dấu có liên quan đến biểu mô giác mạc trong chu kỳ cảm ứng biệt hóa (từ 1 đến 12 tuần).

Fig.7 là loạt ảnh thể hiện sự biểu hiện của các gen đánh dấu có liên quan đến biểu mô giác mạc trong quá trình phát triển mắt ở chuột (từ E9.5 đến 18.5) (PCE: vùng giả định của biểu mô giác mạc, OSEpi: biểu mô bề mặt mắt, CE: biểu mô giác mạc, CS: mô đệm giác mạc, LV: túi thủy tinh thể, LE: thủy tinh thể, AC: buồng trước, EL: mí mắt, và OV: túi khướu giác).

Fig.8 minh họa sự phân lập các tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc bằng phân tích FACS ở tuần thứ 12 của quá trình nuôi cấy biệt hóa các tế bào vùng thứ 3 (P1: vùng thứ nhất, P2: vùng thứ 2, P3: vùng thứ 3, và P4: vùng thứ 4).

Fig.9 là loạt đồ thị thể hiện sự biểu hiện của các gen đánh dấu biểu mô giác mạc trong vùng thứ 2 (P2) và vùng thứ 3 (P3).

Fig.10 là loạt ảnh thể hiện các kết quả của việc quan sát đặc tính của tế bào biểu mô giác mạc được biệt hóa từ tế bào iPS của người sử dụng sự biểu hiện gen đánh dấu. Tế bào biểu mô giác mạc được quan sát trong vùng thứ 3 (P3) và biểu mô kết mạc và các tế bào biểu mô phân tầng âm tính với pax6 được quan sát trong vùng thứ 2 (P2).

Fig.11 minh họa sự biểu hiện gen đánh dấu sau khi nuôi cấy đến khi trưởng thành các tế bào biểu mô giác mạc (có nguồn gốc từ vùng thứ 3 (P3)) được biệt hóa từ tế bào iPS của người. Fig.11A thể hiện rằng tế bào biểu mô giác mạc có nguồn gốc từ tế bào iPS của người có dạng như đá cuội và được phân tầng thành từ 3 đến 4 vùng. Fig.11B thể hiện rằng tế bào sau khi nuôi cấy đến khi trưởng thành biểu hiện các gen đánh dấu, ZO-1, MUC1, MUC4, và MUC16, thiết yếu cho chức năng làm màng ngăn giác mạc. Fig.11C thể hiện rằng theo kết quả từ phân tích FACS của tế bào biểu mô giác mạc có nguồn gốc từ tế bào iPS của người đối với K14 và K12, khoảng 99% tế bào dương tính với K14 và khoảng 60% dương tính với K12.

Fig.12 là loạt ảnh thể hiện các kết quả của việc cấy ghép tám tế bào biểu mô giác mạc có nguồn gốc từ tế bào iPS của người lên mắt thỏ. Tám tế bào biểu mô giác mạc có nguồn gốc từ tế bào iPS của người có thể được thu hồi ở dạng tấm (bên trái). Trong quan sát qua khe sau khi cấy ghép, việc nhuộm màu bằng florescein (phía trên bên phải) và phân tích hóa mô miễn dịch (phía dưới bên phải) cho thấy rằng tám tế bào biểu mô giác mạc có nguồn gốc từ tế bào iPS của người được ghép vào bề mặt của mô đệm giác mạc sau khi cấy ghép và thể hiện chức năng làm màng ngăn giác mạc.

Fig.13 là loạt ảnh thể hiện các tế bào giống tế bào dài kết mạc và tế bào giống tuyến lệ xuất hiện trong quá trình nuôi cấy lâu dài trong môi trường để nuôi cấy biểu mô giác mạc. Fig.13A thể hiện rằng quần thể tế bào dương tính với PAS và dương

tính với PAX6 biểu hiện MUC5AC và K7 dưới dạng gen đánh dấu của tế bào đài kết mạc. Fig.13B thể hiện rằng mô tuyến mà thu được bằng cách nuôi cấy ba chiều tập hợp tế bào có cấu trúc giống tuyến trong Matrigel biểu hiện AQP5, LTF, và MUC7 dưới dạng gen đánh dấu của tuyến lệ/tuyến nước bọt.

Fig.14 minh họa sự cảm ứng của các tế bào mào thần kinh quanh mắt. Fig.14A thể hiện rằng khối tế bào được cảm ứng từ cấu trúc nhiều vùng biểu hiện PITX2 và AP2b dưới dạng gen đánh dấu của các tế bào mào thần kinh quanh mắt. Fig.14B thể hiện rằng theo kết quả từ phản ứng RT-PCR, SOX10 dưới dạng gen đánh dấu mào thần kinh ban đầu biến mất trong 4 tuần, và sau đó sự biểu hiện của các gen đánh dấu của mào thần kinh quanh mắt, như PITX2 và FOXC1, được cảm ứng.

Fig.15 minh họa việc phân lập bằng cách sử dụng gen đánh dấu âm (CD200) cho các tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc được cảm ứng từ tế bào iPS. Trong số các tế bào âm tính với CD200, các tế bào đã được phân lập là tế bào dương tính với SSEA4 và dương tính với ITG β 4 (P3) được phân tầng, biểu hiện K12, p63, và PAX6, và thể hiện đặc điểm của tế bào biểu mô giác mạc đã được biệt hóa.

Mô tả chi tiết sáng chế

1. Định nghĩa

Một số thuật ngữ sử dụng trong bản mô tả này sẽ được mô tả dưới đây.

(1) Tế bào gốc toàn năng

Thuật ngữ "tế bào gốc toàn năng" được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm tất cả các tế bào có hoạt tính biệt hóa toàn năng mà có khả năng biệt hóa thành tất cả các tế bào ngoại trừ tế bào nhau, và cũng bao gồm cả tế bào ES và dòng tế bào ES cũng như các tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng, như tế bào iPS.

Thuật ngữ "tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng" dùng để chỉ tế bào được lập trình lại (khởi tạo) để có hoạt tính biệt hóa toàn năng tương tự với hoạt tính của tế bào ES bằng cách đưa một số yếu tố nhất định vào tế bào sinh dưỡng của động vật có vú hoặc tế bào gốc không được biệt hóa.

"Tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng" lần đầu tiên được Yamanaka *et al.* tạo ra bằng cách đưa 4 yếu tố Oct3/4, Sox2, Klf4, và c-Myc vào nguyên bào sợi của chuột, và đặt tên là "tế bào iPS (tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng)" (Takahashi K, Yamanaka S., *Cell*, (2006) 126: 663-676). Sau đó, tế bào iPS của người cũng được tạo thành bằng cách đưa 4 yếu tố giống như trên vào nguyên bào sợi của người (Takahashi K, Yamanaka S., *et al. Cell*, (2007) 131: 861-872.; Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). *Nature* 448, 313-317.), và các phương pháp tạo thành tế bào iPS an toàn hơn ít cảm ứng hình thành khối u hơn, như phương pháp không sử dụng c-Myc, (Nakagawa M, Yamanaka S., *et al. Nature Biotechnology*, (2008) 26, 101-106) được thiết lập thành công hơn nữa.

Thomson *et al.* từ Đại học Wisconsin đã thành công thiết lập ra tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng được tạo ra bằng cách đưa 4 gen Oct3/4, Sox2, NANOG, và LIN28 vào (Yu J., Thomson JA. *et al.*, *Science* (2007) 318: 1917-1920.). Daley *et al.* từ Đại học Harvard cũng đã báo cáo việc thiết lập được tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng được tạo ra bằng cách đưa 6 gen Oct3/4, Sox2, KLF4, C-MYC, hTERT, và SV40 dòng T lớn vào tế bào da (Park IH, Daley GQ. *et al.*, *Nature* (2007) 451: 141-146).

Sakurada *et al.* đã báo cáo rằng tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng một cách hiệu quả hơn thu được bằng cách đưa Oct3/4, Sox2, Klf4, và c-Myc vào, và cách tương tự sử dụng tế bào gốc chưa biệt hóa có trong mô sau khi sinh làm nguồn tế bào nhưng không phải tế bào sinh dưỡng (Patent Nhật số 2008-307007).

Ngoài ra, tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng được báo cáo rằng được tạo ra bằng cách đưa Oct3/4, KLF4, và hợp chất thấp phân tử vào tế bào tiền sinh thần kinh của chuột hoặc tương tự (Shi Y., Ding S., *et al.*, *Cell Stem Cell*, (2008) Vol 3, Issue 5, 568-574), tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng được tạo ra bằng cách đưa Oct3/4 và KLF4 vào tế bào gốc thần kinh của chuột biểu hiện nội sinh Sox2 và C-MYC (Kim JB., Scholer HR., *et al.*, *Nature*, (2008) 454, 646-650), và tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng được tạo ra bằng cách sử dụng chất ức chế Dnmt hoặc chất ức chế HDAC mà không sử dụng C-MYC (Huangfu D., Melton, DA., *et al.*, *Nature Biotechnology*, (2008) 26, No 7, 795-797).

Ví dụ về các tài liệu patent đã biết bao gồm các tài liệu liên quan đến tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng ở trên bao gồm các Patent Nhật Bản số 2008-307007 và 2008-283972, các Patent Mỹ số 2008-2336610 và 2009-047263, và các đơn quốc tế số WO 2007-069666, WO 2008-118220, WO 2008-124133, WO 2008-151058, WO 2009-006930, WO 2009-006997, và WO 2009-007852.

Thuật ngữ "tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng" được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm các tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng đã biết và tất cả các tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng tương đương miễn là nó thỏa mãn định nghĩa được mô tả ở phần đầu và không ảnh hưởng đến hiệu quả của sáng chế, và nguồn tế bào, các yếu tố được đưa vào, phương pháp đưa vào, và điều tương tự không bị giới hạn cụ thể.

Nguồn tế bào tốt hơn nếu có nguồn gốc từ người (tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng của người), tốt hơn nữa nếu có nguồn gốc từ bệnh nhân cần điều trị sử dụng quần thể tế bào tiền sinh biểu mô/tế bào gốc, quần thể tế bào biểu mô bao gồm tế bào biểu mô giác mạc, hoặc quần thể tế bào biểu bì đã được biệt hóa từ tế bào gốc.

(2) Dòng tế bào ngoại bì

Phôi của người tạo ra ba dòng phôi, tức là nội bì, trung bì, và ngoại bì, trong giai đoạn phát triển. Điều đó có nghĩa là, phôi tạo ra nội bì, trung bì, và ngoại bì. Trong số này, trung bì trở thành biểu mô niêm mạc của dạ dày và ruột non, gan, lá lách, hoặc cơ quan tương tự; trung bì trở thành cơ, xương, mạch máu, máu, mô dưới da, tim, thận, hoặc cơ quan tương tự; và ngoại bì tạo nên dây thần kinh, mắt, biểu bì, hoặc dạng tương tự. Thuật ngữ "dòng tế bào ngoại bì" được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là dòng tế bào có nguồn gốc từ ngoại bì, tức là các tế bào tạo nên hệ thần kinh trung ương/các cơ quan cảm giác, biểu bì, hoặc mắt trong tương lai.

Ví dụ về "tế bào dòng tế bào ngoại bì" bao gồm các tế bào dòng ngoại bì thần kinh, tế bào dòng mào thần kinh/tế bào dòng đài thị giác, tế bào dòng ngoại bì bề mặt mắt, và tế bào dòng ngoại bì bề mặt.

"Tế bào dòng ngoại bì thần kinh" là tế bào có khả năng biệt hóa thành các tế bào liên quan đến thần kinh trong tương lai, và được đặc trưng dưới dạng tế bào Sox2+, TUBB3+, Sox6+.

"Tế bào dòng mào thần kinh" là tế bào có khả năng biệt hóa thành các tế bào liên quan đến mào thần kinh, như tế bào thần kinh ngoại biên, tế bào thần kinh đệm, tế bào sắc tố, tế bào nội mô giác mạc, và tế bào keratin, và được đặc trưng dưới dạng tế bào dương tính với sox10, âm tính với pax6.

"Tế bào dòng dải thị giác" là tế bào có khả năng biệt hóa thành các tế bào liên quan đến dải thị giác, như võng mạc, biểu mô sắc tố võng mạc, và biểu mô sắc tố móng mắt, và được đặc trưng dưới dạng tế bào Rx+.

"Tế bào dòng ngoại bì bề mặt mắt" là tế bào có khả năng biệt hóa thành các tế bào bề mặt mắt, như biểu mô giác mạc và biểu mô kết mạc, và được đặc trưng dưới dạng tế bào pax6+, p63+, E-cadherin+.

(3) Tế bào liên quan đến mắt

"Tế bào liên quan đến mắt" được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là tế bào tạo nên mắt có nguồn gốc từ ngoại bì, và các ví dụ về chúng bao gồm tế bào biểu mô giác mạc, tế bào biểu mô sắc tố võng mạc, tế bào thần kinh võng mạc, tế bào biểu mô kết mạc, tế bào biểu mô rìa giác mạc, tế bào nội mô giác mạc, tế bào keratin, tế bào mô đệm móng mắt, tế bào màng cứng, tế bào biểu mô sắc tố móng mắt, tế bào biểu mô lông mi, tế bào thần kinh thị giác, nguyên bào sợi dưới rìa giác mạc, nguyên bào sợi dưới kết mạc, tuyến lệ, tuyến nhử mắt, tế bào dải, tế bào biểu mô thủy tinh thể, và tế bào biểu mô mí mắt.

(4) Tế bào biểu mô giác mạc và tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc

Giác mạc có cấu trúc 3 lớp là lớp biểu mô giác mạc, lớp mô đệm giác mạc, và lớp nội mô giác mạc theo thứ tự từ bề mặt. "Tế bào biểu mô giác mạc" là tế bào cấu thành nên lớp ngoài cùng của giác mạc và gồm từ 4 đến 5 lớp tế bào biểu mô giác mạc. "Tế bào biểu mô giác mạc" có nguồn gốc từ ngoại bì biểu bì trong khi đó mô đệm giác mạc và nội mô có nguồn gốc từ mào thần kinh; chúng được xem là các tế bào gốc riêng rẽ. Theo sáng chế, "tế bào biểu mô giác mạc" đặc trưng bởi sự biểu hiện của keratin 12 dưới dạng gen đánh dấu biệt hóa biểu mô giác mạc ngoài pax6 và p63.

"Tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc" là tế bào biểu mô giác mạc không biệt hóa, đặc trưng bởi sự biểu hiện của pax6 và p63, và ít biểu hiện keratin 12 (K12) dưới dạng gen đánh dấu biệt hóa.

(5) Gen đánh dấu tế bào

Theo sáng chế, gen đánh dấu đặc hiệu cho mỗi dòng tế bào được sử dụng để nhận biết tế bào được biệt hóa. Các gen đánh dấu điển hình sẽ được mô tả dưới đây.

Keratin 14 (xytokeratin 14: K14): keratin 14 là gen đánh dấu điển hình của tế bào biểu mô đáy.

p63: p63, một protein nhân thuộc họ gen p53, là gen đánh dấu điển hình của tế bào tiền sinh biểu mô/tế bào gốc và được thấy là biểu hiện ở các tế bào biểu bì và các tế bào đáy nang của người bình thường.

Keratin 12 (xytokeratin 12: K12): keratin 12 và 3 là các gen đánh dấu biệt hóa đặc hiệu điển hình của biểu mô giác mạc.

Pax6 (homeobox-6 ghép đôi): pax6 là yếu tố điều hòa phiên mã, liên quan đến sự tạo nên mắt, và là gen đánh dấu điển hình cho tế bào biểu mô giác mạc, tế bào biểu mô thủy tinh thể, và tế bào võng mạc.

MUC16 (mucin 16): MUC16 là loại mucin gắn kết màng, được biểu hiện có chọn lọc ở tế bào biểu mô giác mạc, và có các vai trò quan trọng trong việc duy trì lớp dịch nhầy trên bề mặt mắt và thực thi chức năng làm màng ngăn.

2. Biệt hóa tự thân tế bào gốc toàn năng

Theo sáng chế, các tế bào gốc toàn năng được biệt hóa tự thân đầu tiên để tạo thành khuẩn lạc gồm các vùng đồng tâm của dòng tế bào ngoại bì khác nhau. Thuật ngữ "sự biệt hóa tự thân (biệt hóa theo cách tự thân)" có nghĩa là chính tế bào đó tự biệt hóa mà không nhận tác nhân kích thích bên ngoài, như tác nhân cảm ứng biệt hóa hoặc gen khởi đầu cảm ứng biệt hóa.

(1) Môi trường

Theo sáng chế, công đoạn nuôi cấy được thực hiện bằng cách sử dụng môi trường không có huyết thanh. Thuật ngữ "môi trường không có huyết thanh" có nghĩa

là môi trường không có huyết thanh không được điều hòa hoặc không được tinh chế, và môi trường nhiễm tạp các thành phần có nguồn gốc từ máu đã tinh chế hoặc các thành phần có nguồn gốc từ mô động vật đã tinh chế (ví dụ, yếu tố tăng trưởng) tương ứng với môi trường không có huyết thanh này.

Bất kỳ môi trường nào hữu dụng để nuôi cấy tế bào động vật, chẳng hạn như môi trường DMEM, môi trường BME, môi trường α MEM, môi trường không có huyết thanh DMEM/F12, môi trường BGJb, môi trường CMRL 1066, môi trường Glasgow MEM, môi trường tùy chọn kẽm cải thiện MEM, môi trường IMDM, môi trường Medium 199, môi trường Eagle MEM, môi trường Ham, môi trường RPMI 1640, môi trường Fischer, môi trường McCoy, và môi trường Williams E, cũng có thể được sử dụng làm môi trường cơ sở để biệt hóa; tuy nhiên, các môi trường dùng cho tế bào gốc, như môi trường bất hoạt KnockOut (TM) DMEM, môi trường Medium 154, và môi trường StemPro (R) hESC SFM, được ưu tiên hơn.

Môi trường dùng cho các tế bào gốc toàn năng, tốt hơn nếu không có các thành phần có nguồn gốc từ người/động vật, và môi trường chẳng hạn như môi trường có bán trên thị trường, như mTeSR(TM) 1 (BD Japan Co., Ltd.) và StemFit (R) cũng có thể được sử dụng làm môi trường cơ sở để duy trì.

Môi trường có thể chứa "chất thay thế huyết thanh". Các ví dụ về chất thay thế huyết thanh bao gồm albumin (ví dụ, albumin giàu lipid), transferin, axit béo, tiền chất collagen, yếu tố vi lượng (ví dụ, kẽm và selen), thành phần bổ sung B-27 (R), thành phần bổ sung N2, chất thay thế huyết thanh bất hoạt (KSR từ Invitrogen Co., Ltd.), 2-mercaptoethanol, và 3' thiol glyxerol. Nồng độ của chúng trong môi trường này nằm trong khoảng từ 0,01 đến 10% khối lượng, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,5 đến 4% khối lượng đối với thành phần bổ sung B-27.

Các nguồn chất dinh dưỡng đa dạng cần cho việc duy trì và tăng trưởng tế bào và các thành phần cần cho việc cảm ứng biệt hóa có thể được bổ sung một cách chính xác vào môi trường. Ví dụ, môi trường làm nguồn chất dinh dưỡng có thể chứa: nguồn cacbon, như glyxerol, glucoza, fructoza, sucroza, lactoza, mật ong, tinh bột, và dextrin; hydrat cacbon, như axit béo, dầu và mỡ, lexitin, và rượu; nguồn nitơ, như amoni sulfat, amoni nitrat, amoni clorua, ure, và natri nitrat; muối vô cơ, như muối

ăn, muối kali, phosphat, muối magie, muối canxi, muối sắt, và muối mangan; monokali phosphat, dikali phosphat, magie sulfat, natri clorua, sắt sulfat, natri molybdat, natri vonframmat, và mangan sulfat; vitamin; và axit amin.

Theo sáng chế, tế bào gốc toàn năng biệt hóa tự thân thành dòng tế bào ngoại bì và vì vậy môi trường không cần phải chứa tác nhân cảm ứng biệt hóa, như BMP4 (protein tạo hình xương 4), yếu tố tăng trưởng biến nạp, hoặc activin. Cụ thể là, môi trường này về cơ bản không chứa một hoặc nhiều hơn một, tốt hơn là hai hoặc nhiều hơn hai, tốt hơn nữa là tất cả các tác nhân cảm ứng biệt hóa. BMP4 có thể có mặt với nồng độ nhỏ hơn khoảng 0,5nM, nhưng tốt hơn nếu hoàn toàn không có mặt.

Môi trường này cũng không cần phải chứa gen khởi đầu cảm ứng biệt hóa, như axit retinoic nồng độ cao, chất ức chế BMP, chất ức chế TGF β , hoặc Noggin. Axit retinoic nồng độ cao nghĩa là axit retinoic có nồng độ khoảng 1 μ M, đặc biệt là 10 μ M. Nói cách khác, môi trường này không chứa một hoặc nhiều hơn một, tốt hơn là hai hoặc nhiều hơn hai, tốt hơn nữa là tất cả gen khởi đầu cảm ứng biệt hóa. Ngoài ra, môi trường này cũng không cần phải chứa Wnt, chất hoạt hóa tín hiệu Wnt, chordin, hoặc hợp chất tương tự.

Môi trường thu được bằng cách trộn các thành phần ở trên có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 9,0, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5.

(2) Điều kiện nuôi cấy

Theo sáng chế, các tế bào gốc toàn năng được nuôi cấy hai chiều mà không sử dụng tế bào nuôi. Bình nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể miễn là nó được sử dụng để nuôi cấy tế bào; bình thót cổ, bình thót cổ nuôi cấy mô, đĩa, đĩa petri, đĩa nuôi cấy mô, đĩa đa năng, tấm vi thể, tấm vi lỗ, tấm đa năng, tấm nhiều lỗ, lát cắt hiển vi, tấm chia ngăn, vỏ, ống, khay, túi nuôi cấy, và chai lăn có thể được sử dụng.

Để tăng cường sự bám dính và phát tán của các tế bào, bề mặt trong của bình nuôi cấy tốt hơn nếu được phủ một hoặc nhiều chất bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm collagen, fibronectin, laminin hoặc các mảnh laminin, vitronectin, cơ chất màng đáy, gelatin, axit hyaluronic, polylysin, vitronectin, và axit hyaluronic. Trong số đó,

laminin hoặc các mảnh laminin, như mảnh laminin E8 và mảnh laminin 511E8, được ưu tiên sử dụng.

Việc nuôi cấy được thực hiện trong điều kiện từ 36°C đến 38°C, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 36,5°C đến 37,5°C, từ 1% đến 25% O₂, và từ 1% đến 15% CO₂.

Chu kỳ nuôi cấy để biệt hóa tự thân dài nhất là từ 1 tuần đến 8 tuần, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 2 tuần đến 6 tuần, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 3 tuần đến 5 tuần.

(3) Tạo thành khuôn lạc

Các tế bào gốc toàn năng được nuôi cấy hai chiều mà không sử dụng tế bào nuôi trong môi trường không có huyết thanh biệt hóa tự thân để tạo thành khuôn lạc nhiều vùng của dòng tế bào ngoại bì. Khuôn lạc này gồm các vùng đồng tâm của dòng tế bào ngoại bì khác nhau từ tâm đến ngoại biên, và chứa vùng thứ nhất (tế bào dòng ngoại bì thần kinh (Sox2+, TUBB3+, Sox6+)), vùng thứ 2 (tế bào dòng mào thần kinh/tế bào dòng đài thị giác (pax6+, Sox10+, Rx+)), vùng thứ 3 (tế bào dòng ngoại bì bề mặt mắt (pax6+, p63+, E-cadherin+)), và vùng thứ 4 (tế bào dòng ngoại bì bề mặt (p63+, E-cadherin+)).

3. Cảm ứng sự biệt hóa của tế bào liên quan đến mắt từ khuôn lạc

Khuôn lạc tạo thành thông qua việc biệt hóa tự thân của các tế bào gốc toàn năng gồm các vùng các đồng tâm của dòng tế bào ngoại bì khác nhau, mà chứa các vùng quần thể tế bào riêng biệt; vùng thứ nhất (tế bào dòng ngoại bì thần kinh), vùng thứ 2 (tế bào dòng mào thần kinh/tế bào dòng đài thị giác), vùng thứ 3 (tế bào dòng ngoại bì bề mặt mắt), và vùng thứ 4 (tế bào dòng ngoại bì bề mặt). Dòng tế bào nằm trong mỗi vùng của khuôn lạc là được chứa trong một dòng khác; vì vậy, dựa trên điều này, tế bào nằm trong vùng cụ thể có thể được tách (được phân lập) và được biệt hóa để tạo ra tế bào liên quan đến mắt mục tiêu.

Vì vậy, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra tế bào liên quan đến mắt, phương pháp này bao gồm các bước: tạo ra khuôn lạc gồm các vùng đồng tâm của dòng tế bào ngoại bì khác nhau bằng phương pháp được mô tả trong đoạn trên, tách

các tế bào nằm trong vùng cụ thể ra khỏi khuôn lạc này, và cảm ứng sự biệt hóa của các tế bào đó thành tế bào liên quan đến mắt.

Ví dụ, tế bào biểu mô kết mạc được biệt hóa từ dòng tế bào biểu mô bề mặt mắt bao gồm các tế bào vùng thứ 3 như biểu mô giác mạc. Sau khi nuôi cấy trong môi trường biệt hóa biểu mô giác mạc, FACS có thể được sử dụng để phân lập tế bào biểu mô kết mạc như tế bào dương tính với pax6, dương tính với K13, âm tính với K12 từ trong số các tế bào được phân lập dưới dạng các tế bào âm tính với SSEA4, dương tính với ITGB4.

Các tế bào biểu mô sắc tố võng mạc là các tế bào có nguồn gốc từ ngoại bì thần kinh, và vì vậy có thể quan sát được dưới dạng tế bào biểu mô dạng đá cuội với sắc tố ở các vùng từ vùng thứ nhất đến vùng thứ hai trong quá trình cảm ứng biệt hóa. Tế bào sắc tố có thể được phân lập bằng mắt thường dưới kính hiển vi, và khuôn lạc biểu mô sắc tố được chọn có thể được nuôi cấy phân lập, trong môi trường, như DMEM chứa FBS 10%, ví dụ, trên đĩa nuôi cấy được phủ gelatin.

Tế bào mào thần kinh xuất hiện trong vùng thứ 2 ở giai đoạn sớm (khoảng 2 tuần) của quá trình cảm ứng biệt hóa, và vì vậy có thể thu hồi các tế bào ở 2 tuần hoặc sau 2 tuần và phân lập các tế bào đó bằng FACS sử dụng gen đánh dấu tế bào mào thần kinh, như p75NTR hoặc ITGA4. Các tế bào mào thần kinh thu được có thể được biệt hóa thành tế bào biểu mô giác mạc. Tế bào mào thần kinh ban đầu được cảm ứng thành tế bào mào thần kinh quanh mắt bằng cách tiếp tục nuôi cấy. Tế bào mào thần kinh quanh mắt có thể được nhận biết thông qua sự biểu hiện của gen đánh dấu mào thần kinh quanh mắt, như PITX2 hoặc FOXC1.

4. Cảm ứng sự biệt hóa của tế bào biểu mô giác mạc từ tế bào gốc toàn năng

Tế bào tiền sinh biểu mô có khả năng biệt hóa thành biểu mô giác mạc có mặt ở vùng thứ 2 và vùng thứ 3 của khuôn lạc, và đặc biệt là tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc này có mặt ở vùng thứ 3 (tế bào dòng ngoại bì bề mặt mắt). Vì vậy, tế bào dòng ngoại bì bề mặt mắt có thể được biệt hóa thành tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc, mà sau đó được phân lập và được nuôi cấy đến khi trưởng thành để tạo ra tế bào biểu mô giác mạc.

Cụ thể là, khuẩn lạc có dạng các hình tròn đồng tâm được tạo ra bằng cách biệt hóa tự thân từ tế bào gốc toàn năng và sau đó được cấy bằng cách thay thế môi trường biệt hóa cho biểu mô, chứa yếu tố tăng trưởng. Việc này dẫn đến sự xuất hiện của tế bào gốc biểu mô bề mặt mắt được đặc trưng bởi pax6+, p63+, và E-cadherin+ ở vùng thứ 3.

Các tế bào gốc biểu mô bề mặt mắt được phân lập bằng cách dùng ống pipet hoặc dạng tương tự, được cấy trong môi trường dùng để nuôi cấy biểu mô giác mạc, và được biệt hóa thành tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc. Sau đó, các tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc này được phân lập bằng cách sử dụng FACS hoặc phương pháp tương tự và được nuôi cấy đến khi trưởng thành để tạo ra tế bào biểu mô giác mạc.

Ở mỗi bước cảm ứng biệt hóa, công đoạn nuôi cấy được thực hiện trong môi trường không có huyết thanh mà không sử dụng các tế bào nuôi. Môi trường và các điều kiện nuôi cấy sẽ được mô tả dưới đây.

(1) Môi trường

(1-1) Môi trường biệt hóa dùng cho biểu mô

Để thúc đẩy việc biệt hóa thành tế bào gốc biểu mô, thì môi trường biệt hóa dùng cho biểu mô chứa các yếu tố tăng trưởng, như KGF, chất ức chế Rock, bFGF, và chất thay thế huyết thanh. Môi trường cơ sở được sử dụng có thể là môi trường bất kỳ, như môi trường DMEM, môi trường BME, hoặc môi trường α MEM, mà được sử dụng cho quy trình biệt hóa tự thân, miễn là nó là môi trường (môi trường không có huyết thanh) có thể sử dụng để nuôi cấy tế bào biểu mô. Các môi trường dùng cho các tế bào gốc, như KnockOut(TM) DMEM, Medium 154, hoặc StemPro (R) hESC SFM, các môi trường nuôi cấy tế bào biểu mô, như CNT20, Cnt50, CnT-PR, hoặc KSFM, hoặc môi trường hỗn hợp của chúng là các môi trường được mong muốn. Trong phần ví dụ thực hiện sáng chế được mô tả sau đây, 50% môi trường không có huyết thanh dùng cho biệt hóa tự thân và 50% Cnt20 hoặc CntPR được trộn để sử dụng.

(1-2) Môi trường dùng để nuôi cấy biểu mô giác mạc

Để thúc đẩy việc cảm ứng tạo ra sự biệt hóa thành tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc, môi trường dùng để nuôi cấy biểu mô giác mạc có thể chứa KGF, chất ức chế Rock, và chất thay thế huyết thanh (ví dụ, thành phần bổ sung B27). Ngoài ra, môi trường này có thể chứa FGF2, insulin, và transferrin. "Chất ức chế Rock" dùng để chỉ chất ức chế Rho kinaza (ROCK: protein kinaza chứa xoắn đôi, có liên quan đến Rho); ví dụ, N-(4-pyridinyl)-4 β -(R)-1-aminoethyl]xyclohexan-1 α -carboxamit (Y-27632), Fasudil (HA1077), (2S)-2-metyl-1-[(4-metyl-5-isoquinoliny]sulfonyl]hexahydro-1H-1, 4-diazepin (H-1152), 4 β -(1R)-1-aminoethyl]-N-(4-pyridyl)benzen-1 α -carboxamit (Wf-536), N-(1H-pyrololo[2,3-b]pyridin-4-yl)-4-PER(R)-1-aminoethyl]xyclohexan-1 α -carboxamit (Y-30141), N-(3-{[2-(4-amin-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-1-etyl-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-6-yl]oxy}phenyl)-4-{[2-(4-morphorinyl)etyl]-oxy}benzamit (GSK269962A), và N-(6-flo-1H-indazol-5-yl)-6-metyl-2-oxo-4-[4-(triflometyl)phenyl]-3,4-dihydro-1H-pyridin-5-carboxamit (GSK429286A) có thể được sử dụng.

Môi trường giống như môi trường biệt hóa dùng cho biểu mô có thể được sử dụng làm môi trường cơ sở.

(1-3) Môi trường để nuôi cấy tế bào đến giai đoạn trưởng thành

Mặc dù biểu mô giác mạc có thể được phân tầng và trưởng thành bằng cách sử dụng môi trường biểu mô giác mạc ở trên, việc nuôi cấy sử dụng môi trường chứa huyết thanh để nuôi cấy đến khi trưởng thành trong khoảng 1 tuần cuối cũng thúc đẩy sự phân tầng và trưởng thành. Môi trường để nuôi cấy đến khi trưởng thành tốt hơn nếu chứa huyết thanh (nếu cần thiết), KGF, chất ức chế Rock, insulin, transferin, và selen. Môi trường giống như môi trường để nuôi cấy biểu mô giác mạc có thể được sử dụng làm môi trường cơ sở.

Tất cả các môi trường (môi trường biệt hóa cho biểu mô, môi trường để nuôi cấy biểu mô giác mạc, và môi trường để nuôi cấy tế bào đến giai đoạn trưởng thành) có thể chứa "chất thay thế huyết thanh". Các ví dụ về chất thay thế huyết thanh bao gồm các chất được mô tả trong đoạn ở trên, ví dụ, albumin (ví dụ, albumin giàu lipid), transferrin, axit béo, tiền chất collagen, yếu tố vi lượng (ví dụ, kẽm và selen), thành phần bổ sung B-27 (R), và thành phần bổ sung N2. Nồng độ của chúng trong môi

trường nằm trong khoảng từ 0,01 đến 10% khối lượng, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,5 đến 4% khối lượng đối với thành phần bổ sung B-27.

Các nguồn chất dinh dưỡng đa dạng cần để duy trì và tăng trưởng tế bào và các thành phần cần cho việc cảm ứng biệt hóa có thể được bổ sung một cách chính xác vào môi trường. Ví dụ, môi trường có thể chứa: nguồn cacbon, như glyxerol, glucoza, fructoza, sucroza, lactoza, mật ong, tinh bột, và dextrin; hydrat cacbon, như axit béo, dầu và mỡ, lexitin, và rượu; nguồn nitơ, như amoni sulfat, amoni nitrat, amoni clorua, ure, và natri nitrat; muối vô cơ, như muối ăn, muối kali, phosphat, muối magie, muối canxi, muối sắt, và muối mangan; monokali phosphat, dikali phosphat, magie sulfat, natri clorua, sắt sulfat, natri molybdat, natri vonframat, và mangan sulfat; vitamin; và axit amin làm nguồn chất dinh dưỡng.

(2) Điều kiện nuôi cấy

Ở mỗi bước, công đoạn nuôi cấy được thực hiện mà không sử dụng các tế bào nuôi. Bình nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể miễn là nó được sử dụng để nuôi cấy tế bào; bình thót cổ, bình thót cổ nuôi cấy mô, đĩa, đĩa petri, đĩa nuôi cấy mô, đĩa đa năng, tấm vi thể, tấm vi lỗ, tấm đa năng, tấm nhiều lỗ, lát cắt hiển vi, tấm chia ngăn, vỏ, ống, khay, túi nuôi cấy, và chai lắc có thể được sử dụng.

Để thúc đẩy sự bám dính và phát tán của các tế bào, bề mặt trong của bình nuôi cấy tốt hơn nếu được bao bằng một hoặc nhiều chất bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm collagen, fibronectin, laminin hoặc các mảnh laminin, vitronectin, cơ chất màng đáy, gelatin, axit hyaluronic, polylysin, vitronectin, và axit hyaluronic. Ngoài ra, laminin hoặc các mảnh laminin, như mảnh laminin E8 và mảnh laminin 511E8, được ưu tiên sử dụng.

Công đoạn nuôi cấy được thực hiện trong các điều kiện từ 36°C đến 38°C, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 36,5°C đến 37,5°C, từ 1% đến 25% O₂, và từ 1% đến 15% CO₂.

Chu kỳ nuôi cấy ít nhất là từ 1 tuần đến 8 tuần, tốt hơn nếu từ 2 tuần đến 6 tuần, tốt hơn nữa nếu từ 3 tuần đến 5 tuần để nuôi cấy trong môi trường biệt hóa dùng cho biểu mô nhằm cảm ứng sự biệt hóa của các tế bào gốc biểu mô bề mặt mắt.

Chu kỳ ít nhất là từ 1 tuần đến 12 tuần, tốt hơn nếu từ 1 tuần đến 8 tuần, tốt hơn nữa nếu từ 2 tuần đến 6 tuần để nuôi cấy trong môi trường dùng để nuôi cấy biểu mô giác mạc nhằm cảm ứng sự biệt hóa của các tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc.

Chu kỳ ít nhất là 4 ngày, tốt hơn nếu là 1 tuần hoặc hơn 1 tuần, tốt hơn nữa nếu từ 2 đến 3 tuần để phân tầng/nuôi cấy đến khi trưởng thành trong môi trường dùng để nuôi cấy biểu mô giác mạc sau khi phân lập các tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc.

(3) Phân lập tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc

Công đoạn phân lập các tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc có thể được thực hiện một cách dễ dàng bằng cách sử dụng kháng thể đặc hiệu cho mỗi gen đánh dấu theo phương pháp thông thường. Ví dụ, việc phân lập có thể được thực hiện bằng cách tách sử dụng các hạt từ tính đã đánh dấu kháng thể, cột trên đó kháng thể được định pha rắn, hoặc thiết bị phân loại tế bào sử dụng kháng thể đã đánh dấu huỳnh quang (FACS). Kháng thể này có thể là kháng thể có bán trên thị trường hoặc có thể được tạo ra theo phương pháp thông thường.

Ví dụ, các tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc có thể được phân lập một cách đơn giản bằng FACS hoặc phương pháp tương tự bằng cách sử dụng sự biểu hiện của ITG β 4 và/hoặc SSEA4 làm chỉ số. Công đoạn chọn lọc âm bằng cách sử dụng TRA-1-60 hoặc CD200 tốt hơn nếu được thực hiện trước khi chọn lọc dương bằng cách sử dụng ITG β 4 hoặc SSEA4. Lần đầu tiên phát hiện ra rằng SSEA4 và CD200 có thể được sử dụng để phân lập các tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc theo sáng chế. SSEA4 (kháng nguyên phôi đặc hiệu theo giai đoạn-4) đã biết là được biểu hiện trong tế bào gốc trung mô, tế bào hồng cầu, và tế bào tương tự ngoài u quái, tế bào mầm phôi (EG) của người, và tế bào ES của người. SSEA4 có mức biểu hiện thấp hơn trên tế bào ES của người khi quá trình biệt hóa tiếp diễn, và vì vậy được sử dụng rộng rãi để đánh giá bằng cách theo dõi sự biệt hóa tế bào ES của người này. CD200 trước đây chưa được biết đến, ví dụ, là được biểu hiện trong tế bào gốc toàn năng hoặc không được biểu hiện trong biểu mô giác mạc, và là gen đánh dấu rất ưu việt cho phép loại bỏ các tạp chất ở phạm vi rộng hơn so với TRA-1-60 đã biết.

Khi tiếp tục được cấy trong môi trường dùng để nuôi cấy biểu mô giác mạc, thì các tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc có thể biệt hóa thành tế bào đài kết mạc hoặc tế bào nước mắt. Các tế bào đài kết mạc có thể được nhận biết thông qua sự biểu hiện của MUC5AC và K7 dưới dạng gen đánh dấu tế bào đài kết mạc. Tế bào nước mắt có thể được nhận biết bởi sự biểu hiện của AQP5, LTF, và MUC7 dưới dạng gen đánh dấu tuyến lệ/tuyến nước bọt, và các tế bào này có thể cấu tạo nên mô tuyến bằng cách thực hiện nuôi cấy ba chiều.

(4) Đặc tính của tế bào biểu mô giác mạc

Các tế bào biểu mô giác mạc phân tầng cấy ghép được thu được bằng cách nuôi cấy đến giai đoạn trưởng thành các tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc. Các tế bào biểu mô giác mạc thu được dương tính với K12, pax6, và p63 và hoạt động như biểu mô giác mạc *in vitro* và *in vivo* thì giống như tế bào biểu mô giác mạc có nguồn gốc từ tế bào sinh dưỡng. Sáng chế cũng đề cập đến tế bào biểu mô giác mạc chức năng có nguồn gốc từ tế bào gốc toàn năng, đặc biệt là tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng, được đặc trưng bởi K12, pax6, và p63.

5. Sử dụng cho y học tái tạo

5.1 Y học tế bào

Các tế bào dòng ngoại bì thần kinh, tế bào dòng mào thần kinh/tế bào dòng đài thị giác, tế bào dòng ngoại bì bề mặt mắt, và tế bào dòng ngoại bì bề mặt thu được bằng phương pháp theo sáng chế, hoặc tế bào liên quan đến mắt đã được biệt hóa từ các tế bào này có thể được sử dụng chính chúng cho y học nghiên cứu hoặc y học tái tạo hoặc để chuẩn bị cho y học tế bào được mô tả dưới đây.

Y học tế bào theo sáng chế có thể chứa khung hoặc thành phần hỗ trợ duy trì/tăng trưởng tế bào hoặc dùng cho phân bố ảnh hưởng và chất mang được dùng. Các ví dụ về thành phần cần cho sự duy trì/tăng trưởng của tế bào bao gồm các thành phần môi trường, như nguồn cacbon, nguồn nitơ, vitamin, chất khoáng, muối, và các xytokin khác nhau, hoặc chế phẩm cơ chất ngoại bào, như Matrigel TM.

Các ví dụ về khung và thành phần hỗ trợ việc dùng cho phân bố ảnh hưởng bao gồm polyme phân hủy sinh học, ví dụ, collagen, axit polylactic, axit hyaluronic,

xenluloza, và các dẫn xuất của chúng, và phức hợp gồm 2 hoặc nhiều hơn 2 hợp chất trong số chúng, và dung dịch chứa nước dùng để tiêm, ví dụ, dung dịch đệm sinh lý, như nước muối, môi trường, và PBS, và dung dịch đẳng trương chứa glucoza và các chất phụ trợ khác (ví dụ, D-sorbitol, D-mannoza, D-mannitol, và natri clorua); chất hòa tan thích hợp, ví dụ, rượu, như etanol hoặc rượu đa chức (ví dụ, propylen glycol hoặc polyetylen glycol) hoặc chất hoạt động bề mặt không ion, như polysorbat 80 hoặc HCO-50, có thể được sử dụng cùng với đó.

Ngoài ra, dung môi hữu cơ được dùng, rượu polyvinyl, polyvinylpyrrolidon, carboxyvinyl polyme, carboxymetylxenluloza natri, natri polyacrylat, alginat natri, dextran tan trong nước, carboxymetyl tinh bột natri, pectin, metyloxenluloza, etyloxenluloza, gôm xanthan, gôm Arabic, casein, thạch agar, polyetylen glycol, diglyxerin, glyxerin, propylen glycol, vaselin, parafin, rượu stearyl, axit stearic, mannitol, sorbitol, hoặc lactoza, chất hoạt động bề mặt được dùng, dung dịch đệm, chất nhũ hóa, chất tạo huyền phù, chất làm dịu, chất ổn định, hoặc các chất tương tự có thể có mặt, nếu cần.

Chất phụ gia trên thực tế được chọn từ trong số các chất ở trên một mình hoặc kết hợp; tuy nhiên, không dự định là bị giới hạn ở các chất đó.

Các ví dụ về bệnh là mục tiêu đối với y học tế bào theo sáng chế bao gồm hội chứng Stevens-Johnson, bệnh bỏng nước trong mắt dạng pemphigut, tổn thương do nhiệt/hóa chất, tật không mỏng mắt, thoái hóa giác mạc Salzmann, rối loạn biểu mô viêm kết mạc giác mạc tự phát, sẹo sau đau mắt hột, thủng giác mạc, loét ngoại biên giác mạc, và mòn biểu mô giác mạc sau khi điều trị bằng tia laser excimer.

5. 2 Tấm tế bào giác mạc được nuôi cấy

Quần thể tế bào tiền sinh biểu mô thu được bằng phương pháp theo sáng chế và/hoặc quần thể tế bào biểu mô giác mạc được biệt hóa từ quần thể tế bào có thể được phân tầng để tạo ra tấm tế bào biểu mô giác mạc được nuôi cấy.

Theo phương pháp theo sáng chế, các tế bào biểu mô giác mạc dạng tấm đã phân tầng có thể thu được một cách đơn giản bằng cách sử dụng môi trường không có huyết thanh mà không sử dụng tế bào nuôi. Các tế bào thu được giữ các gen đánh dấu đặc hiệu đối với tế bào biểu mô giác mạc, như keratin 12, pax6, và MUC16, và có chức năng giống với chức năng của tế bào biểu mô giác mạc có nguồn gốc từ tế bào sinh dưỡng. Các tế bào này cũng có độ an toàn cao và phù hợp để sử dụng trong lâm sàng vì chúng được tạo mà không sử dụng tế bào nuôi có nguồn gốc từ động vật hoặc huyết thanh. Sáng chế đề cập đến tấm tế bào biểu mô giác mạc chức năng đã phân tầng có nguồn gốc từ tế bào gốc toàn năng, đặc biệt là tế bào gốc toàn năng đã cảm ứng, đặc trưng ở chỗ dương tính với K12, pax6, và MUC16, và phương pháp tạo ra tấm này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dưới đây dựa trên các ví dụ thực hiện sáng chế. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ thực hiện sáng chế này.

Ví dụ 1: Cảm ứng tạo ra sự biệt hóa từ tế bào iPS của người thành tế bào biểu mô bề mặt mắt/biểu mô giác mạc

Từ các tế bào iPS của người, tế bào biểu mô bề mặt mắt/biểu mô giác mạc được biệt hóa trong môi trường không có huyết thanh mà không sử dụng tế bào nuôi. Sơ đồ thực hiện phương pháp cảm ứng biệt hóa được thể hiện trên Fig.1.

Dòng tế bào 201B7 (dòng tế bào iPS được tạo ra bằng cách đưa Oct3/4, OX2, c-Myc, và Klf4 vào nguyên bào sợi) được sử dụng làm các tế bào iPS của người, và các tế bào này được gieo mầm ở mật độ gieo mầm nằm trong khoảng từ 200 đến 1500 tế bào/cm², nằm trong khoảng từ 300 đến 1000 tế bào/cm², hoặc nằm trong khoảng từ 450 đến 700 tế bào/cm² trong StemFit (từ Ajinomoto Co., Inc.) trên tấm 6 lỗ được phủ mảnh laminin 511E8, và được nuôi cấy trong khoảng từ 7 đến 13 ngày.

Môi trường này được thay thế bằng môi trường biệt hóa (GMEM chứa KSR 10%, natri pyruvat 1mM, axit amin không thiết yếu 0,1mM, và monothioglycerol 55μm), và sau đó được thay thế bằng môi trường biệt hóa mới mỗi 2 đến 3 ngày một lần để thực hiện nuôi cấy trong khoảng 4 tuần.

Môi trường này được thay thế bằng môi trường biệt hóa dùng cho biểu mô chứa yếu tố tăng trưởng ở hoặc sau tuần thứ 4, và công đoạn nuôi cấy được thực hiện tiếp trong 4 tuần. Ở khoảng 2 đến 3 tuần sau khi thay thế bằng môi trường biệt hóa dùng cho biểu mô (50% môi trường biệt hóa chứa KGF 20 ng/ml, FGF2 5 ng/ml, và Y27632 10μM, và 50% Cnt20 (hoặc CntPR; không EGF/FGF2 (CELLnTEC)), các tế bào không phải biểu mô được loại bỏ bằng cách dùng ống pipet để nuôi cấy có chọn lọc duy nhất tế bào biểu mô bề mặt trong vùng thứ 3. Sau 4 tuần nuôi cấy, môi trường này được thay thế bằng môi trường nuôi cấy biểu mô giác mạc, và công đoạn nuôi cấy được thực hiện trong 4 tuần, tiếp đó sẽ phân lập các tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc bằng FACS. Các tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc đã phân lập này được nuôi cấy tiếp trong môi trường nuôi cấy biểu mô giác mạc (DMEM/F12 (2:1) chứa KGF 20 ng/ml, Y27632 10μM, và thành phần bổ sung B27 2%) trong khoảng từ 2 đến 3 tuần để tạo ra tấm tế bào biểu mô giác mạc đã nuôi cấy và phân tầng. Nếu cần, thì sau 1 đến 2 tuần nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy biểu mô giác mạc, cũng có thể thay thế môi trường này bằng môi trường chứa huyết thanh để nuôi cấy đến khi trưởng thành (DMEM/F12 (3:1) chứa KGF 20 ng/ml, Y27632 10μM, insulin, transferin, selen, và FBS 5%), và tiến hành nuôi cấy trong khoảng 1 tuần để tạo ra cùng một tấm tế bào biểu mô giác mạc được nuôi cấy như vậy.

Trong khoảng 4 tuần nuôi cấy biệt hóa, các tế bào dòng ngoại bì quan sát được là đồng tâm được cảm ứng để tạo ra khuôn lạc gồm các vùng đồng tâm của dòng tế bào ngoại bì khác nhau (Fig.2).

Các đặc tính của tế bào trong các vùng cấu thành khuôn lạc này được thử nghiệm (Fig.3). Khuẩn lạc đã biệt hóa ở dạng các vùng đồng tâm, và các tế bào của các dòng khác nhau có mặt trong mỗi vùng. Cụ thể là, các vùng từ vùng thứ nhất đến vùng thứ 3 dương tính với pax6; các vùng từ vùng thứ 3 đến vùng thứ 4 dương tính

với p63 và dương tính với E-cadherin; và các vùng từ vùng thứ nhất đến vùng thứ 2 dương tính với TUBB3.

Võng mạc thần kinh dương tính với CHX10 xuất hiện ở phần bên trong của vùng thứ 2, và các tế bào biểu mô sắc tố võng mạc dương tính với MITF xuất hiện từ phần bên ngoài của vùng này; các tế bào này có thể được phân lập dưới dạng tế bào dạng đá cuội chứa sắc tố bằng cách chọn và nuôi cấy tế bào. Các tế bào mào thần kinh xuất hiện dưới dạng tế bào dương tính kép với p75/SOX10 ở phần vùng thứ hai trong quá trình biệt hóa sớm (tuần thứ 2) (Fig.4). Tế bào thủy tinh thể biểu hiện α crystallin được xác nhận là xuất hiện ở giữa vùng thứ 2 và vùng thứ 3 (4 tuần và 6 tuần) (Fig.4).

Sự biểu hiện gen đánh dấu trong mỗi vùng được kiểm tra bằng phương pháp RT-PCR (Fig.5). Ngoại bì biểu mô bề mặt mắt (pax6+, p63+, và Ecad+) biểu diễn gốc của biểu mô giác mạc xuất hiện từ vùng thứ 3.

Ngoài ra, việc nhận biết hình mẫu biểu hiện (ở khoảng từ 1 đến 12 tuần của quá trình biệt hóa) của các gen đánh dấu có liên quan đến biểu mô giác mạc (K12, K14, p63, và pax6) trong chu kỳ cảm ứng biệt hóa bằng cách nhuộm màu miễn dịch (Fig.6) đã xác nhận rằng hình mẫu này khá tương tự với hình mẫu biểu hiện gen đánh dấu có liên quan đến biểu mô giác mạc trong quá trình phát triển mắt của chuột (từ E9.5 đến 18.5) (Fig.7) và việc cảm ứng của biểu mô bề mặt mắt/biểu mô giác mạc từ tế bào iPS diễn ra thông qua quá trình giống như quá trình phát triển giác mạc trên thực tế.

Các kết quả ở trên đã xác nhận rằng phương pháp nuôi cấy theo sáng chế có thể được sử dụng để cảm ứng quần thể tế bào liên quan đến mắt, bao gồm tế bào biểu mô bề mặt mắt, (võng mạc, thủy tinh thể, tế bào mào thần kinh, v.v) từ tế bào gốc toàn năng của người ở dạng bất chức sự phát triển sinh lý của các tế bào đó.

Ví dụ 2: Cảm ứng sự biệt hóa của tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc từ tế bào iPS của người

Các khuẩn lạc có dạng các hình tròn đồng tâm được tạo ra bằng cách biệt hóa tự thân (4 tuần) các tế bào iPS của người theo ví dụ 1, mỗi khuẩn lạc này được phân

lập bằng cách thay thế môi trường bằng môi trường biệt hóa dùng cho biểu mô chứa yếu tố tăng trưởng ở tuần thứ 4 hoặc sau tuần thứ 4 và loại bỏ các tế bào không phải biểu mô bằng cách dùng ống pipet ra khỏi các tế bào gốc biểu mô bề mặt mắt xuất hiện trong vùng thứ 3. Ngoài ra, ở tuần thứ 8 hoặc sau tuần thứ 8, môi trường này được thay thế bằng môi trường nuôi cấy biểu mô giác mạc, và sự biệt hóa thành tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc được cảm ứng.

Ở khoảng tuần thứ 12 của quá trình cảm ứng biệt hóa, FACS được thực hiện bằng cách sử dụng các gen đánh dấu bề mặt tế bào, như TRA-1-60, SSEA4 và ITGB4 (Fig.8). Đã nhận thấy rằng các tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc có thể được phân lập dựa trên sự biểu hiện của TRA-1-60, SSEA4, và ITGB4 và có mặt một cách chọn lọc trong các tế bào dương tính với ITGB4 và dương tính với SSEA4 (P3) và các tế bào dương tính với ITGB4 và âm tính với SSEA4 (P2) trong số các tế bào âm tính với TRA-1-60 (Fig.8 bên phải).

Ngoài ra, việc nhuộm màu miễn dịch thể hiện kết quả rằng các tế bào trong vùng P3 biểu hiện gen đánh dấu đặc hiệu biểu mô giác mạc trong khi đó biểu hiện ở mức thấp đối với chỉ thị biểu mô niêm mạc và gen đánh dấu biểu mô da (Fig.9). Điều này đã chứng minh rằng các tế bào biểu mô giác mạc được phân lập trong vùng P3 và tế bào biểu mô kết mạc và các tế bào biểu mô phân tầng khác được chứa trong vùng P2 (Fig.10).

Các tế bào đã phân lập từ vùng P3 được nuôi cấy đến khi trưởng thành trong khoảng từ 2 đến 3 tuần bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy biểu mô giác mạc để tạo ra tế bào biểu mô ở giác mạc phân tầng. Việc nhuộm màu miễn dịch thể hiện kết quả rằng các tế bào thu được biểu hiện các gen đánh dấu thiết yếu cho chức năng làm màng ngăn giác mạc, ZO-1, MUC1, MUC4, và MUC16 (Fig.11B). Theo kết quả từ phân tích FACS, độ tinh khiết của tế bào dương tính với K14 là khoảng 99%, và tỉ lệ dương tính của gen đánh dấu biệt hóa biểu mô giác mạc K12 là khoảng 60% (Fig.11C).

Ví dụ 3: Cấy ghép tấm tế bào biểu mô giác mạc có nguồn gốc từ tế bào iPS của người lên mắt thỏ

Lớp tế bào biểu mô trên toàn bộ chu vi của rìa giác mạc của thỏ được loại bỏ bằng cách cắt bỏ giác mạc để tạo ra mô hình thiếu tế bào gốc biểu mô giác mạc của thỏ. Sau đó, cấy ghép tấm tế bào biểu mô giác mạc có nguồn gốc từ tế bào iPS của người đã thu hồi ở dạng tấm.

(1) Hình ảnh quan sát bề mặt mắt

Vào ngày thứ 7 sau khi cấy ghép, độ trong giác mạc được duy trì trong nhóm cấy ghép tấm, và việc nhuộm màu florescein đã cho thấy rằng chức năng làm màng ngăn đã được phục hồi. Mặt khác, phần lớn của mắt đối chứng được nhuộm bằng florescein và vẫn ở tình trạng rối loạn chức năng làm màng ngăn (Fig.12 ở giữa).

(2) Tấm tế bào biểu mô giác mạc có nguồn gốc từ tế bào iPS của người sau khi cấy ghép

Mỗi con thỏ được trợ tử vào ngày 7 sau khi mổ, và nhãn cầu được cắt ra và sau đó được cố định bằng phương pháp hóa học bằng dung dịch formalin đậm trung tính 10%. Sau đó, mô giác mạc được quan sát bằng cách nhuộm màu hematoxylin-eosin. Tấm tế bào biểu mô giác mạc có nguồn gốc từ tế bào iPS của người cũng được ghép vào bề mặt của mô đệm giác mạc sau khi cấy ghép lên mắt động vật. Phân tích nhuộm màu miễn dịch với kháng thể kháng người (H2B) bằng cách sử dụng các phần đông lạnh đã chứng minh rằng lớp biểu mô đã ghép vào mắt thỏ có nguồn gốc từ tế bào iPS của người và có thể biết được rằng lớp này biểu hiện K12, pax6, p63, và MUC16 và giữ được tính chất của biểu mô giác mạc (Fig.12 bên phải).

Ví dụ 4: Cảm ứng sự biệt hóa của tế bào giống tế bào đài kết mạc và tế bào giống tuyến lệ từ tế bào iPS của người

Các khuẩn lạc có dạng các hình tròn đồng tâm được tạo ra bằng cách biệt hóa tự thân (4 tuần) các tế bào iPS của người theo ví dụ 1, mỗi khuẩn lạc này được phân lập bằng cách thay thế môi trường bằng môi trường biệt hóa dùng cho biểu mô chứa yếu tố tăng trưởng ở tuần thứ 4 hoặc sau tuần thứ 4 và loại bỏ các tế bào không phải biểu mô bằng cách sử dụng ống pipet ra khỏi các tế bào gốc biểu mô bề mặt mắt xuất hiện trong vùng thứ 3. Ngoài ra, ở tuần thứ 8 hoặc sau tuần thứ 8, môi trường này

được thay thế bằng môi trường nuôi cấy biểu mô giác mạc, và việc biệt hóa thành tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc được cảm ứng.

Sau khi cảm ứng sự biệt hóa thành các tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc, công đoạn nuôi cấy vẫn được tiếp tục trong môi trường nuôi cấy biểu mô giác mạc trong khi thay thế môi trường mỗi 2 đến 3 ngày. Ở khoảng tuần thứ 12 từ khi cảm ứng biệt hóa, quần thể tế bào dương tính với PAS và dương tính với PAX6 xuất hiện trong số quần thể tế bào giống biểu mô trong môi trường nuôi cấy biểu mô giác mạc. Kết quả từ việc nhuộm màu PAS và nhuộm màu miễn dịch chứng minh rằng các tế bào này biểu hiện MUC5AC và K7 dưới dạng gen đánh dấu tế bào đài kết mạc (Fig.13A).

Tương tự, sau khi biệt hóa thành các tế bào biểu mô giác mạc, tiếp tục nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy biểu mô giác mạc trong khi đó thay thế môi trường này. Ở khoảng tuần thứ 12 từ khi cảm ứng biệt hóa, tập hợp tế bào có cấu trúc dạng tuyến xuất hiện trong môi trường nuôi cấy biểu mô giác mạc. Mô dạng tuyến được tập hợp lại dưới kính hiển vi và được nuôi cấy 3 chiều trong Matrigel (R) bằng cách sử dụng môi trường KCM chứa FBS 5%, EGF, và Wnt3awp hoặc môi trường DMEM/F12 chứa B27 2%; kết quả là, mô này phát triển thành mô tuyến trong khoảng 25 ngày. Việc nhuộm màu miễn dịch chứng minh rằng mô tuyến đã biểu hiện AQP5, LTF, MUC7, PAX6, và SOX9 dưới dạng gen đánh dấu tuyến lệ/tuyến nước bọt (Fig.13B).

Các kết quả ở trên chứng minh rằng tế bào gốc/tế bào tiền sinh biểu mô bề mặt mắt đã được cảm ứng từ tế bào gốc toàn năng của người có thể được biệt hóa không những thành biểu mô giác mạc mà còn thành cả tế bào biểu mô kết mạc, tế bào đài kết mạc, và các tế bào nước mắt được xem là có cùng gốc phát triển như biểu mô giác mạc

Ví dụ 5: Cảm ứng sự biệt hóa của tế bào mào thần kinh quanh mắt từ tế bào iPS của người

Các tế bào iPS của người được biệt hóa tự thân trong môi trường biệt hóa (trong 4 tuần) theo ví dụ 1 để cảm ứng sự biệt hóa thành các khuôn lạc, mỗi khuôn lạc này có dạng các hình tròn đồng tâm (cấu trúc nhiều vùng). Ở tuần thứ 3 từ khi

cảm ứng biệt hóa, khối lượng tế bào dương tính với PITX2 và dương tính với AP2b (tế bào mào thần kinh quanh mắt) được cảm ứng chủ yếu trong vùng thứ 2.

Khối lượng tế bào có thể được cảm ứng khi việc nuôi cấy được thực hiện trong môi trường trong đó EGF, FGF2 (từ 1 đến 3 tuần), và axit retinoic nồng độ thấp ($0,5\mu\text{M}$) (từ 2 đến 3 tuần) được bổ sung vào môi trường biệt hóa.

Sự biểu hiện gen đánh dấu được nhận diện bằng phương pháp RT-PCR vào ngày thứ 9, ngày thứ 14, ngày thứ 21, ngày thứ 28, và ngày thứ 35 từ lúc bắt đầu nuôi cấy biệt hóa. Kết quả là, đã chứng minh được rằng sau khi gen đánh dấu mào thần kinh sớm, SOX10, biến mất trong 4 tuần, thì sự biểu hiện của các gen đánh dấu mào thần kinh quanh mắt, như PITX2 và FOXC1, được cảm ứng. Vì vậy, tế bào mào thần kinh sớm có nguồn gốc từ tế bào iPS của người được thể hiện là được cảm ứng thành tế bào mào thần kinh quanh mắt.

Các kết quả ở trên cho thấy rằng tế bào mào thần kinh quanh mắt mà tạo ra gốc phát triển của tế bào mào thần kinh cũng như tế bào nội mô giác mạc và tế bào mô đệm móng mắt có thể được cảm ứng bằng cách sử dụng các khuôn lạc, mỗi khuôn lạc này gồm các vùng đồng tâm của dòng tế bào ngoại bì đã cảm ứng theo sáng chế. Có thể là việc bổ sung EGF, FGF, và axit retinoic nồng độ thấp ($0,5\mu\text{M}$) vào môi trường biệt hóa đã thúc đẩy sự tăng trưởng của tế bào võng mạc trong vùng thứ 2 và việc bổ sung tín hiệu axit retinoic đã thúc đẩy việc cảm ứng tế bào mào thần kinh quanh mắt. Tín hiệu axit retinoic có nguồn gốc từ tế bào võng mạc được xem là quan trọng cho sự phát triển của mào thần kinh quanh mắt, và việc sử dụng hệ thống nuôi cấy này có thể dẫn đến việc bắt chước sự phát triển của nó.

Ví dụ 6: Phân lập tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc được cảm ứng từ tế bào iPS của người

Các tế bào iPS của người được biệt hóa tự thân trong môi trường biệt hóa theo ví dụ 1 để cảm ứng biệt hóa thành các khuôn lạc, mỗi khuôn lạc này có dạng các hình tròn đồng tâm (cấu trúc nhiều vùng). Ở tuần thứ 14 từ khi cảm ứng biệt hóa, FACS được thực hiện bằng cách sử dụng CD200, SSEA4, và ITG β 4 dưới dạng gen đánh dấu bề mặt tế bào.

Các tế bào dương tính với CD200 có thể được loại bỏ bằng cách cho phân lập các tế bào dương tính với SSEA4 và dương tính với ITG β 4 (P3) dưới dạng tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc từ trong số các tế bào âm tính với CD200. Các tế bào đã phân lập được phân tầng, biểu hiện K12, p63, và PAX6, và cho thấy đặc điểm của tế bào biểu mô giác mạc đã được biệt hóa (Fig.15).

Các kết quả ở trên chứng minh rằng tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc đã được cảm ứng từ tế bào iPS có thể được tinh chế bằng cách sử dụng CD200, SSEA4, và ITG β 4. CD200 trước đây chưa được biết đến, ví dụ, là được biểu hiện trong tế bào gốc toàn năng và không được biểu hiện trong biểu mô giác mạc, và có lẽ là gen đánh dấu rất ưu việt cho phép loại bỏ các tạp chất ở phạm vi rộng hơn so với TRA-1-60 đã biết.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Theo sáng chế, thu được các tế bào biểu mô giác mạc có thể cấy ghép được, phân tầng, có chức năng, và tinh khiết ở mức cao. Phương pháp theo sáng chế không sử dụng tế bào nuôi có nguồn gốc từ động vật hoặc huyết thanh và vì vậy các tế bào thu được có độ an toàn cao và phù hợp để sử dụng trong lâm sàng. Ngoài ra, theo phương pháp theo sáng chế, các tế bào khác nhau không những cấu thành biểu mô giác mạc mà còn cả bề mặt mắt, như biểu mô kết mạc, có thể được tạo ra từ tế bào gốc toàn năng, như tế bào iPS của người.

Tất cả các công bố, patent, và đơn sáng chế đã nêu trong bản mô tả được dự định là kết hợp toàn bộ vào trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Yêu cầu bảo hộ

1. Phương pháp tạo ra khuẩn lạc gồm các vùng đồng tâm của các dòng tế bào ngoại bì khác nhau, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy hai chiều các tế bào gốc toàn năng trong môi trường không có huyết thanh mà không sử dụng tế bào nuôi thông qua việc biệt hóa tự thân các tế bào gốc toàn năng này,

trong đó khuẩn lạc này chứa các vùng tế bào dòng ngoại bì thần kinh, tế bào dòng mào thần kinh/tế bào dòng đài thị giác, tế bào dòng ngoại bì bề mặt mắt, và tế bào dòng ngoại bì bề mặt, theo thứ tự tương ứng.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó môi trường không có huyết thanh không chứa nồng độ là 0,5nM hoặc nhiều hơn 0,5nM của BMP4 (protein tạo hình xương 4), yếu tố tăng trưởng biến nạp, hoặc activin.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó môi trường không có huyết thanh còn không chứa ít nhất một hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm axit retinoic nồng độ cao, chất ức chế BMP, chất ức chế TGF β , và Noggin.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó các tế bào gốc toàn năng được nuôi cấy bằng cách sử dụng bình nuôi cấy được phủ một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm collagen, fibronectin, laminin hoặc các mảnh laminin, vitronectin, cơ chất màng đáy, gelatin, axit hyaluronic, và polylysine.

5. Phương pháp tạo ra các tế bào liên quan đến mắt, phương pháp này bao gồm các bước:

tạo ra khuẩn lạc gồm các vùng đồng tâm của các dòng tế bào ngoại bì khác nhau bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4,

tách các tế bào nằm trong vùng cụ thể khỏi khuẩn lạc này, và

cảm ứng sự biệt hóa các tế bào đó thành tế bào liên quan đến mắt.

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó các tế bào liên quan đến mắt là tế bào bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm tế bào biểu mô giác mạc, tế bào biểu mô sắc tố võng mạc, tế bào thần kinh võng mạc, tế bào biểu mô kết mạc, tế bào biểu mô rìa giác mạc, tế bào nội mô giác mạc, tế bào keratin, tế bào mô đệm móng mắt, tế bào màng cứng,

tế bào biểu mô sắc tố móng mắt, tế bào biểu mô lông mi, tế bào thần kinh thị giác, nguyên bào sợi dưới rìa giác mạc, nguyên bào sợi dưới kết mạc, tế bào tuyến lệ, tế bào tuyến nhử mắt, tế bào đài, tế bào biểu mô thủy tinh thể, và tế bào biểu mô mí mắt.

7. Phương pháp tạo ra các tế bào biểu mô giác mạc, phương pháp này bao gồm các bước:

tạo ra khuôn lặc gồm các vùng đồng tâm của các dòng tế bào ngoại bì khác nhau bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4,

nuôi cấy khuôn lặc này trong môi trường chứa yếu tố tăng trưởng,

tách các tế bào nằm trong vùng tế bào dòng ngoại bì bề mặt mắt và nuôi cấy các tế bào này trong môi trường chứa KGF, chất ức chế Rock, và chất thay thế huyết thanh để cảm ứng sự biệt hóa thành tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc, và

phân lập các tế bào tiền sinh biểu mô giác mạc này và cảm ứng sự biệt hóa thành tế bào biểu mô giác mạc.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó các tế bào biểu mô giác mạc được phân lập bằng cách xem xét việc biểu hiện hay không biểu hiện của một hoặc nhiều gen đánh dấu được chọn từ nhóm bao gồm ITG β 4, SSEA4, TRA-1-60, và CD200 làm chỉ số.

9. Phương pháp tạo ra tấm tế bào giác mạc, phương pháp này bao gồm bước tạo ra tế bào biểu mô giác mạc bằng phương pháp theo điểm 7 hoặc 8 và sau đó nuôi cấy phân tầng tế bào biểu mô giác mạc thu được.

10. Khuôn lặc gồm các vùng đồng tâm của các dòng tế bào ngoại bì khác nhau có nguồn gốc từ tế bào gốc toàn năng

trong đó khuôn lặc này chứa các vùng tế bào dòng ngoại bì thần kinh, tế bào dòng mào thần kinh/tế bào dòng đài thị giác, tế bào dòng ngoại bì bề mặt mắt, và tế bào dòng ngoại bì bề mặt, theo thứ tự tương ứng.

FIG.1

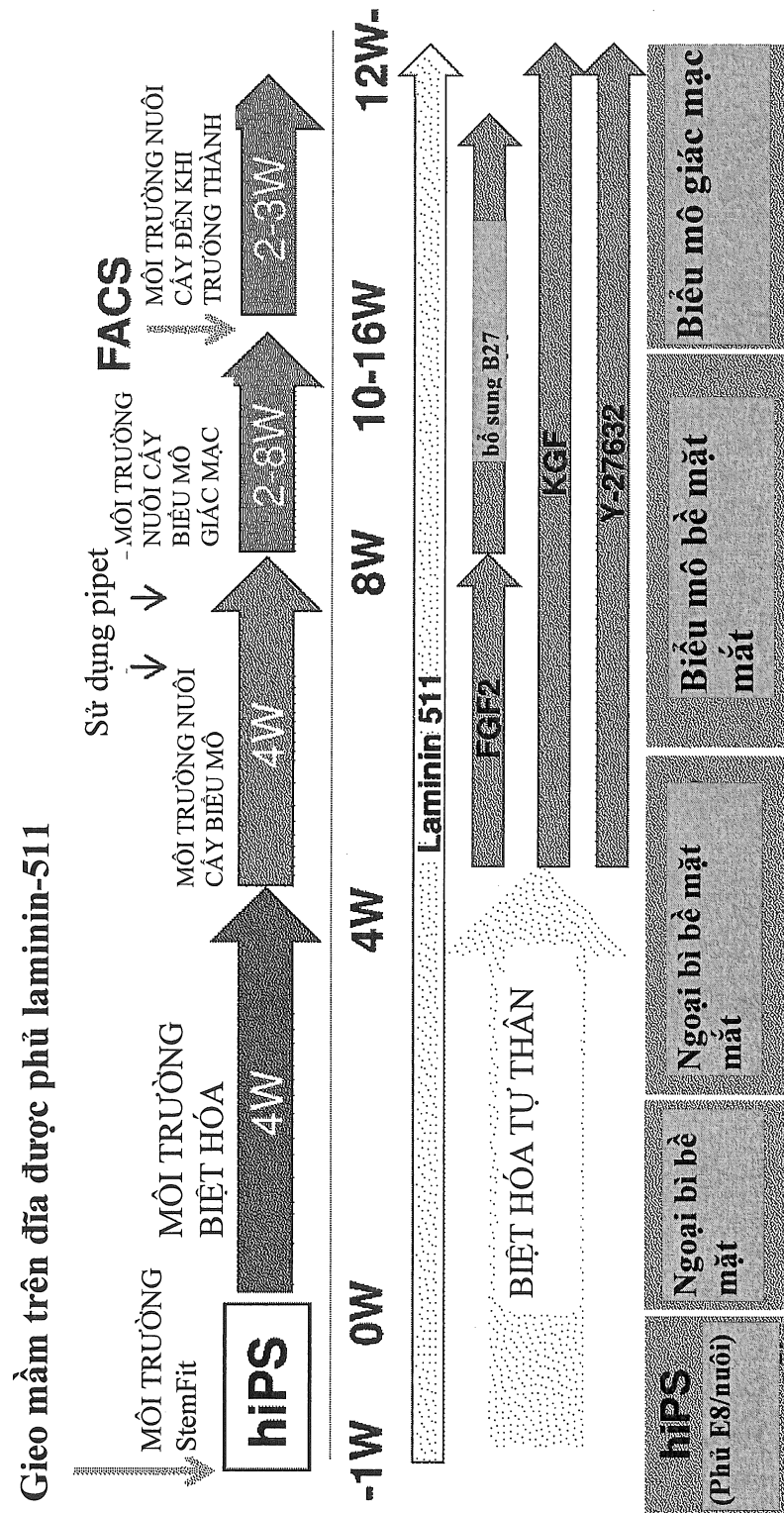


FIG.2

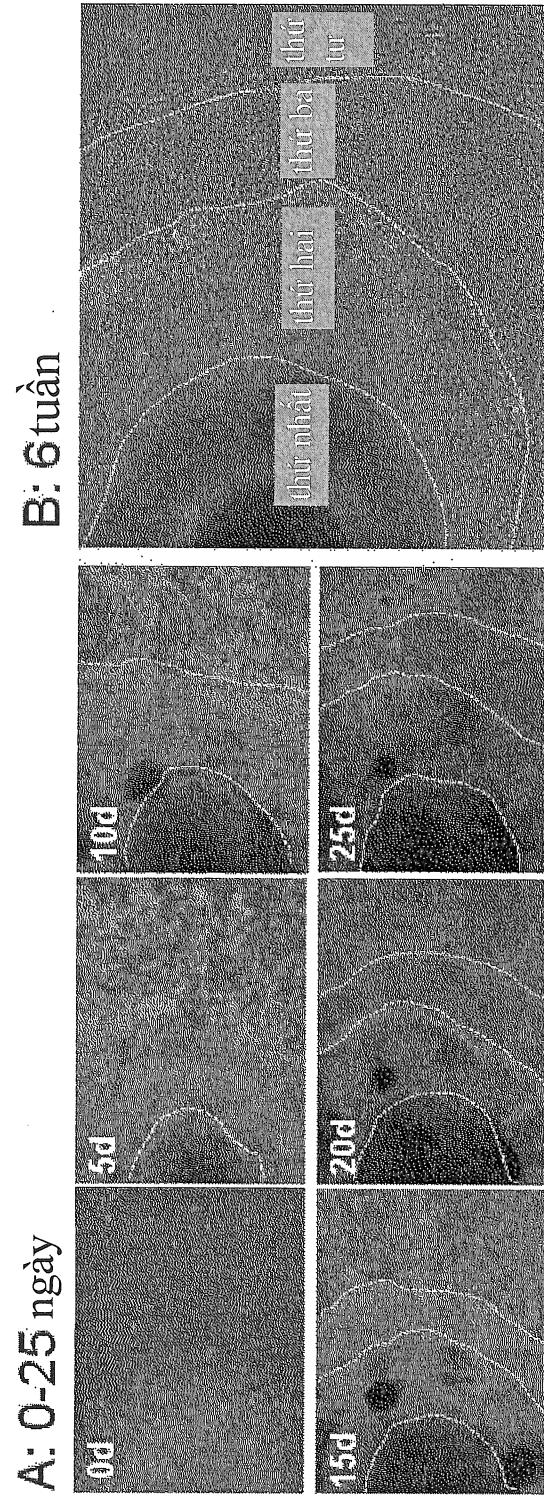


FIG.3

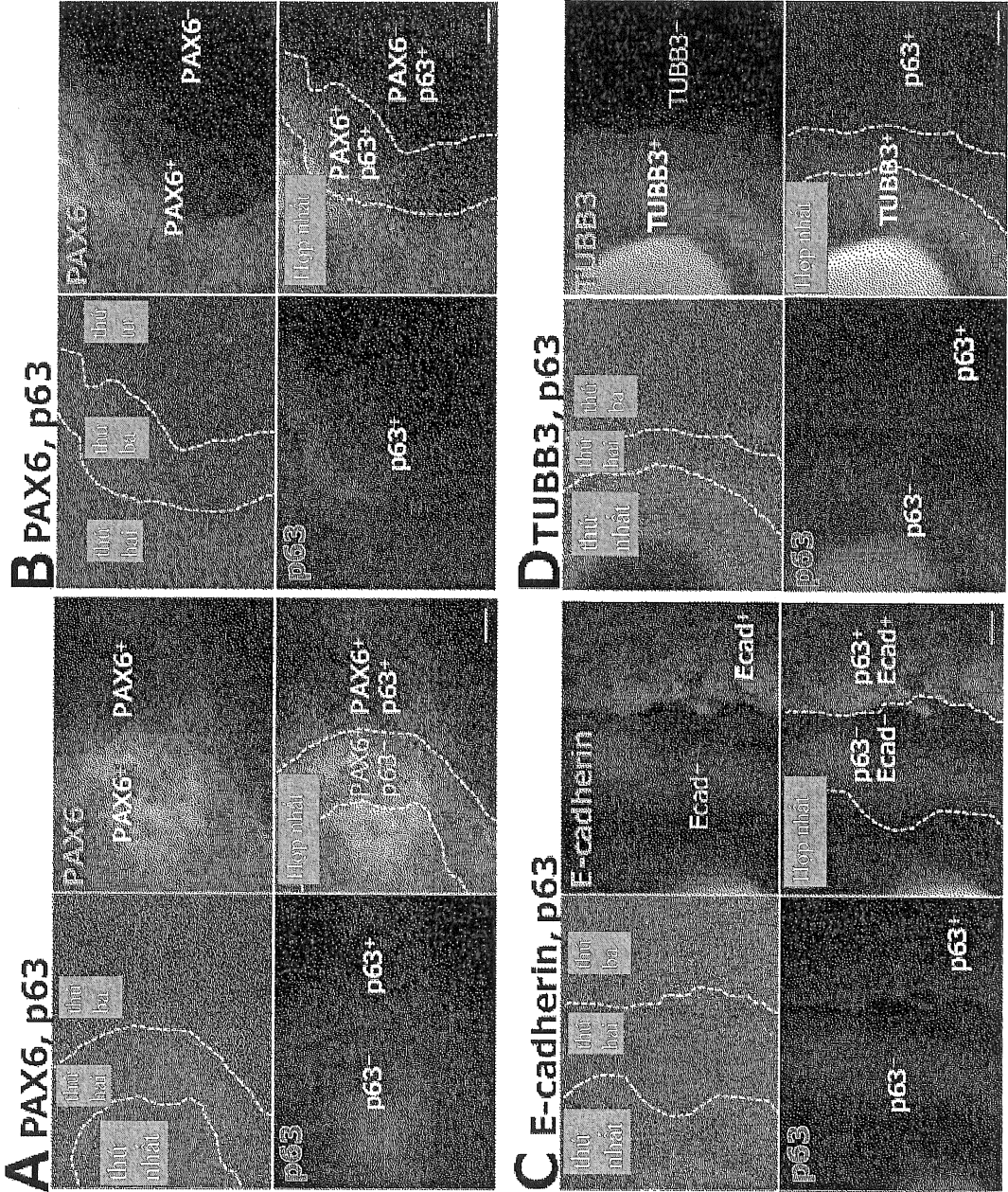
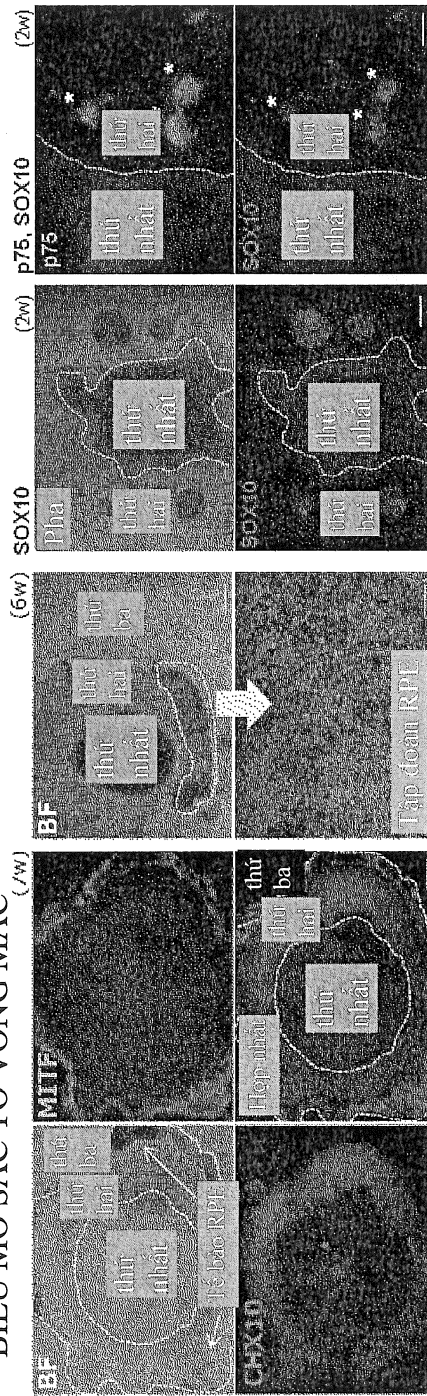


FIG. 4

A: THẦN KINH VÕNG MẠC, TẾ BÀO
BIỂU MÔ SẮC TỔ VÕNG MẠC



B: TẾ BÀO MÀO THẦN KINH

C: LENS

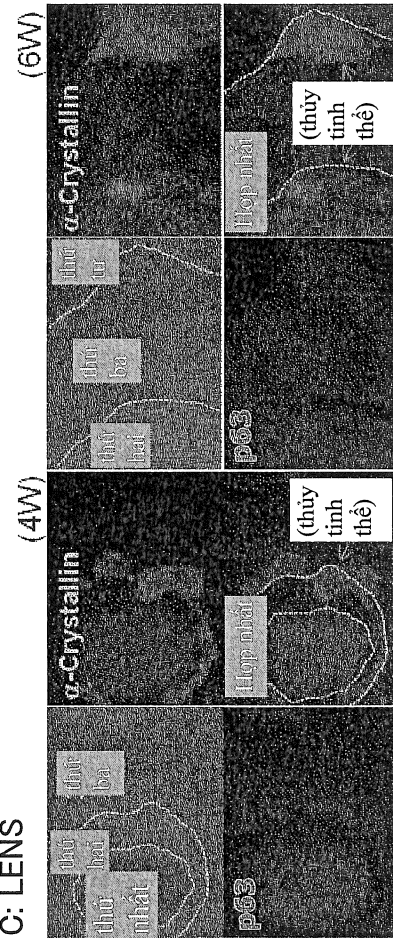


FIG.5

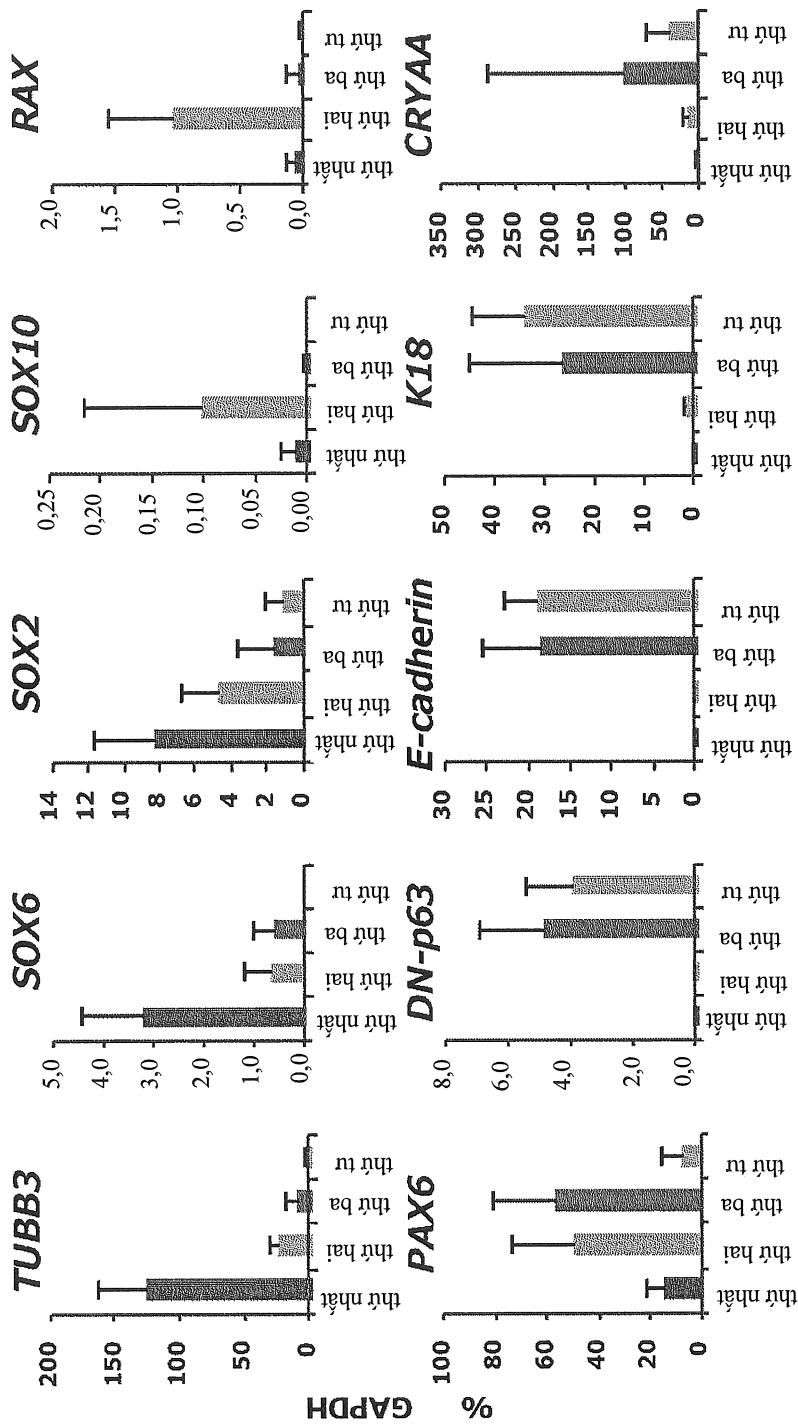


FIG.6

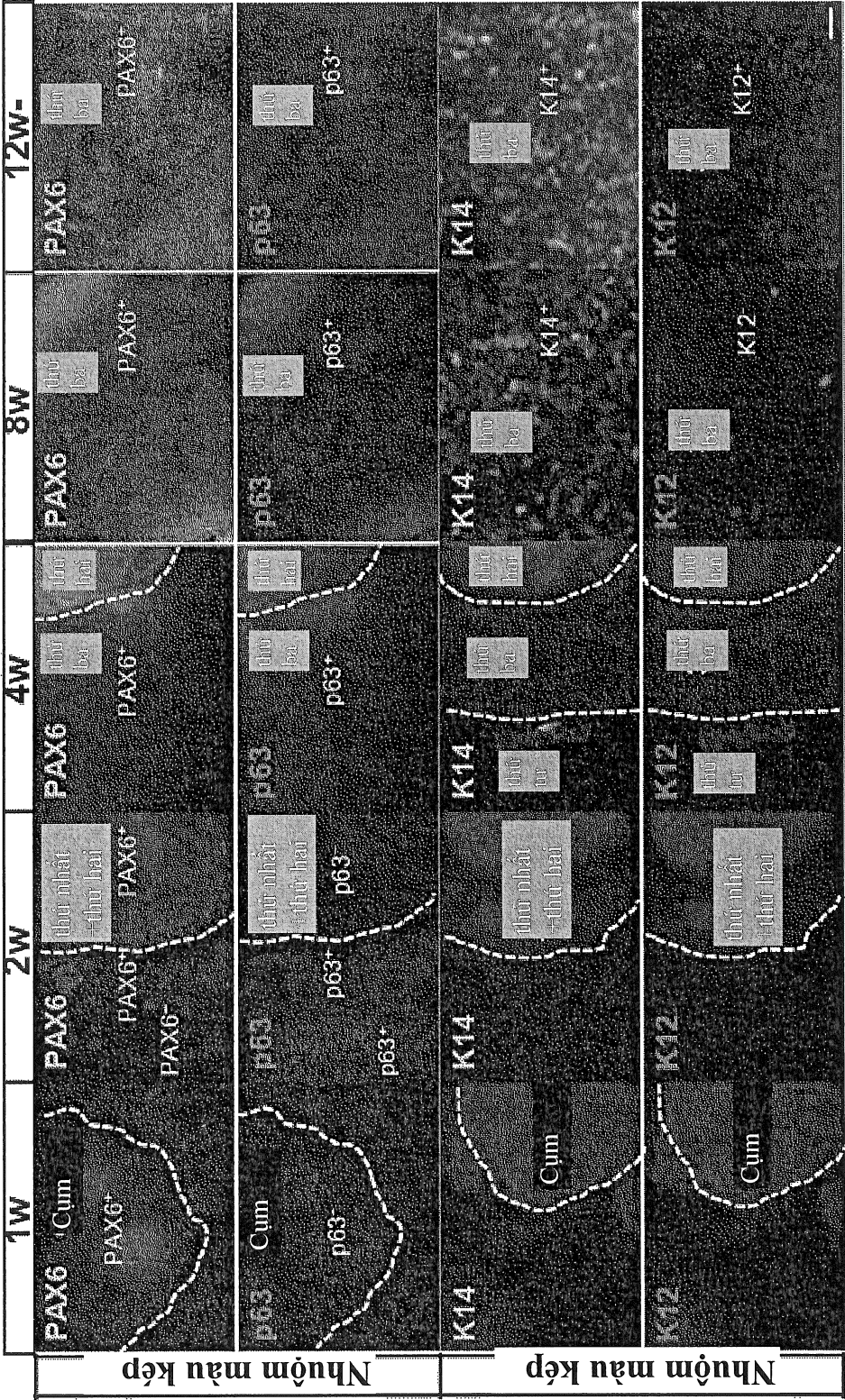


FIG.7

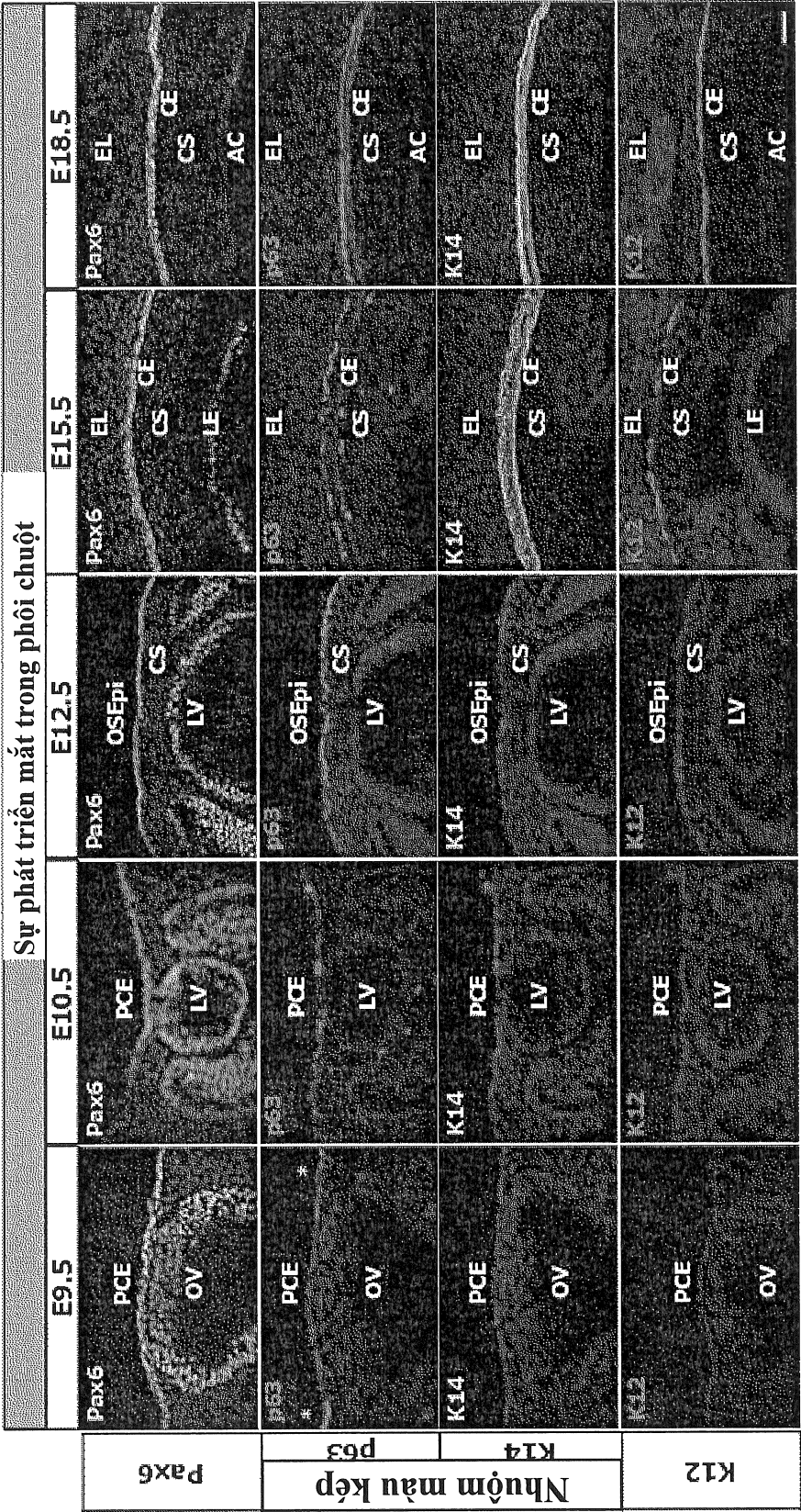
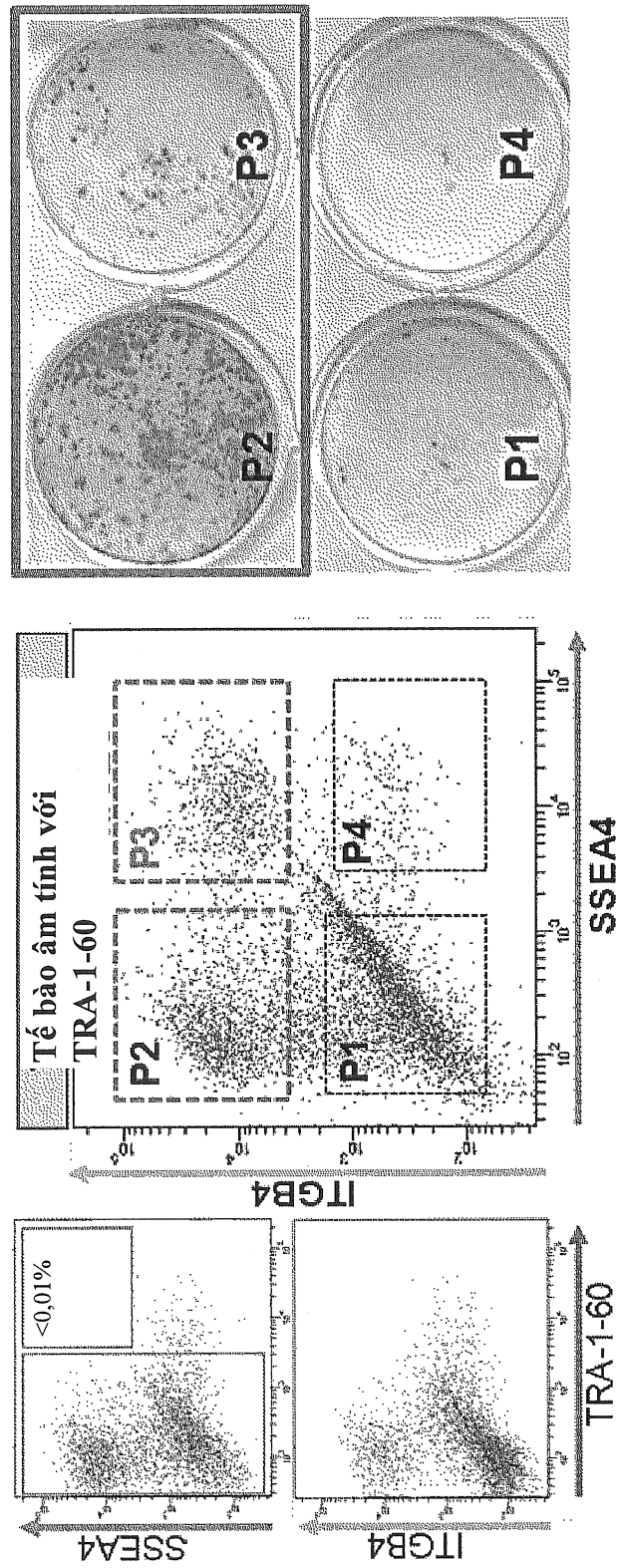


FIG.8



*hiCEC: TẾ BÀO BIỂU MÔ GIÁC MẠC CÓ NGUỒN GỐC TỪ TẾ BÀO iPS CỦA NGƯỜI

FIG.9

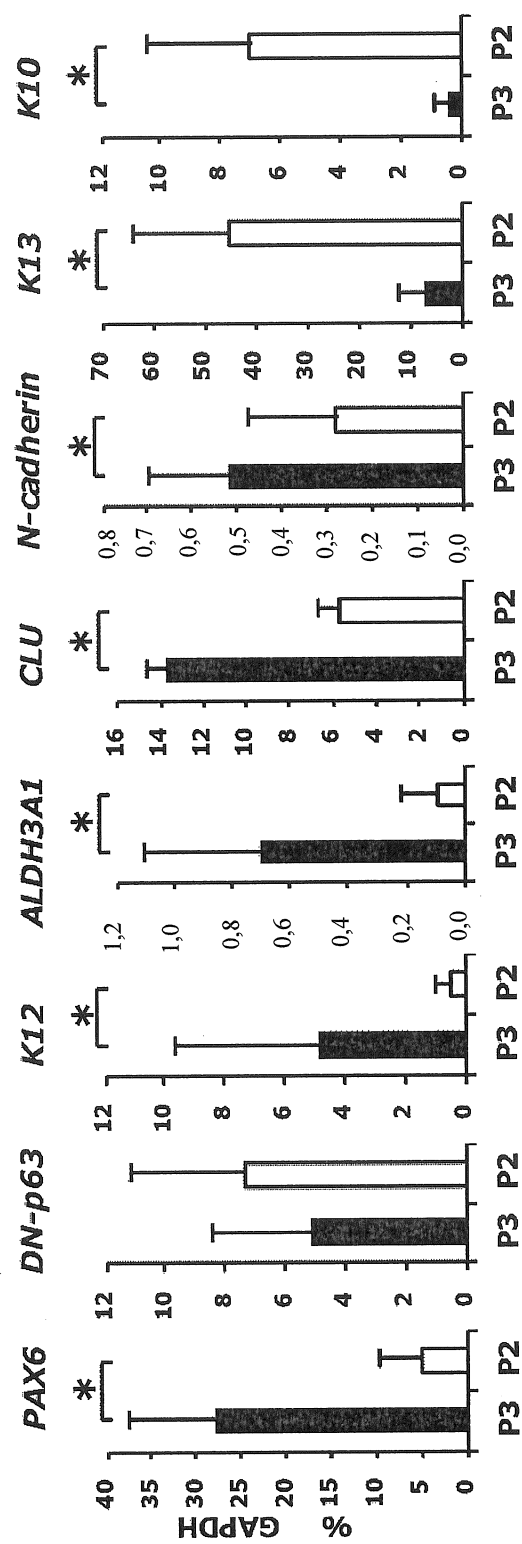


FIG.10

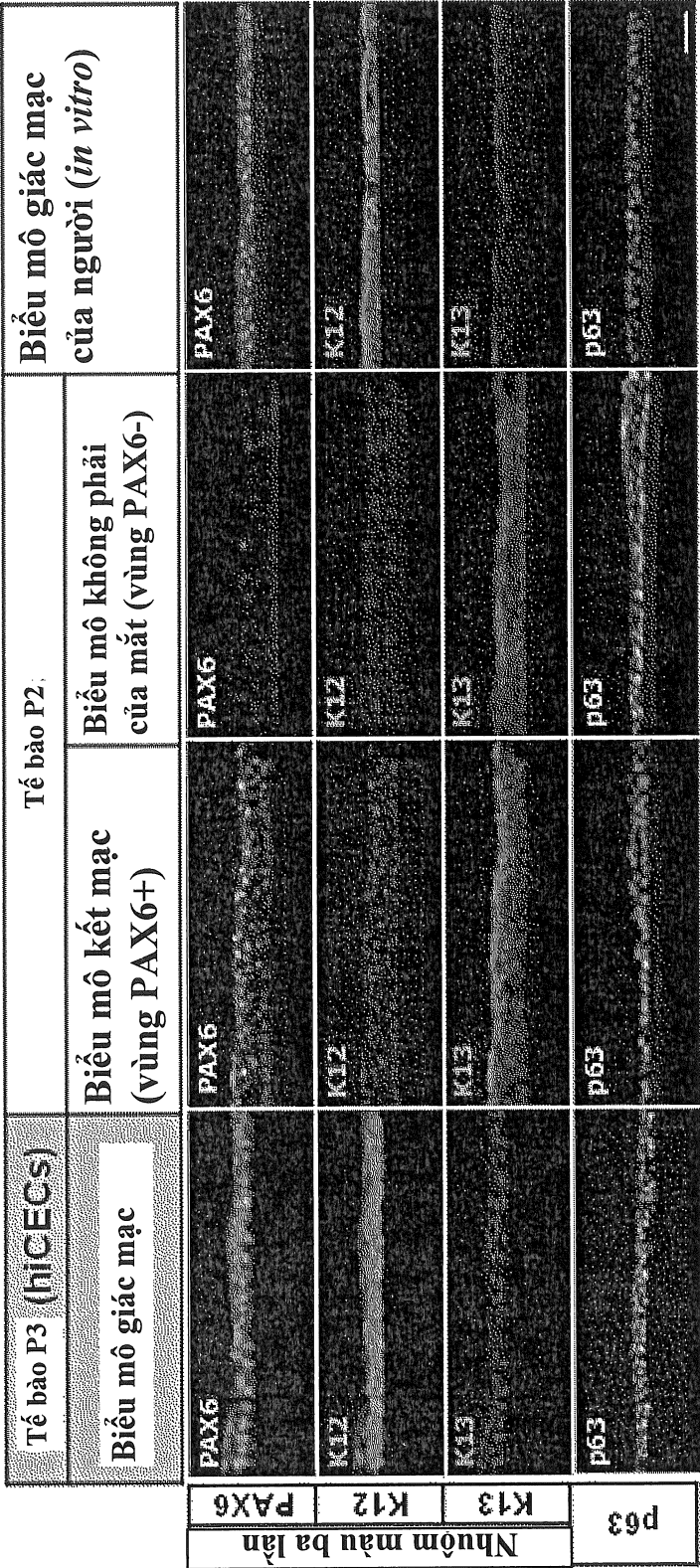
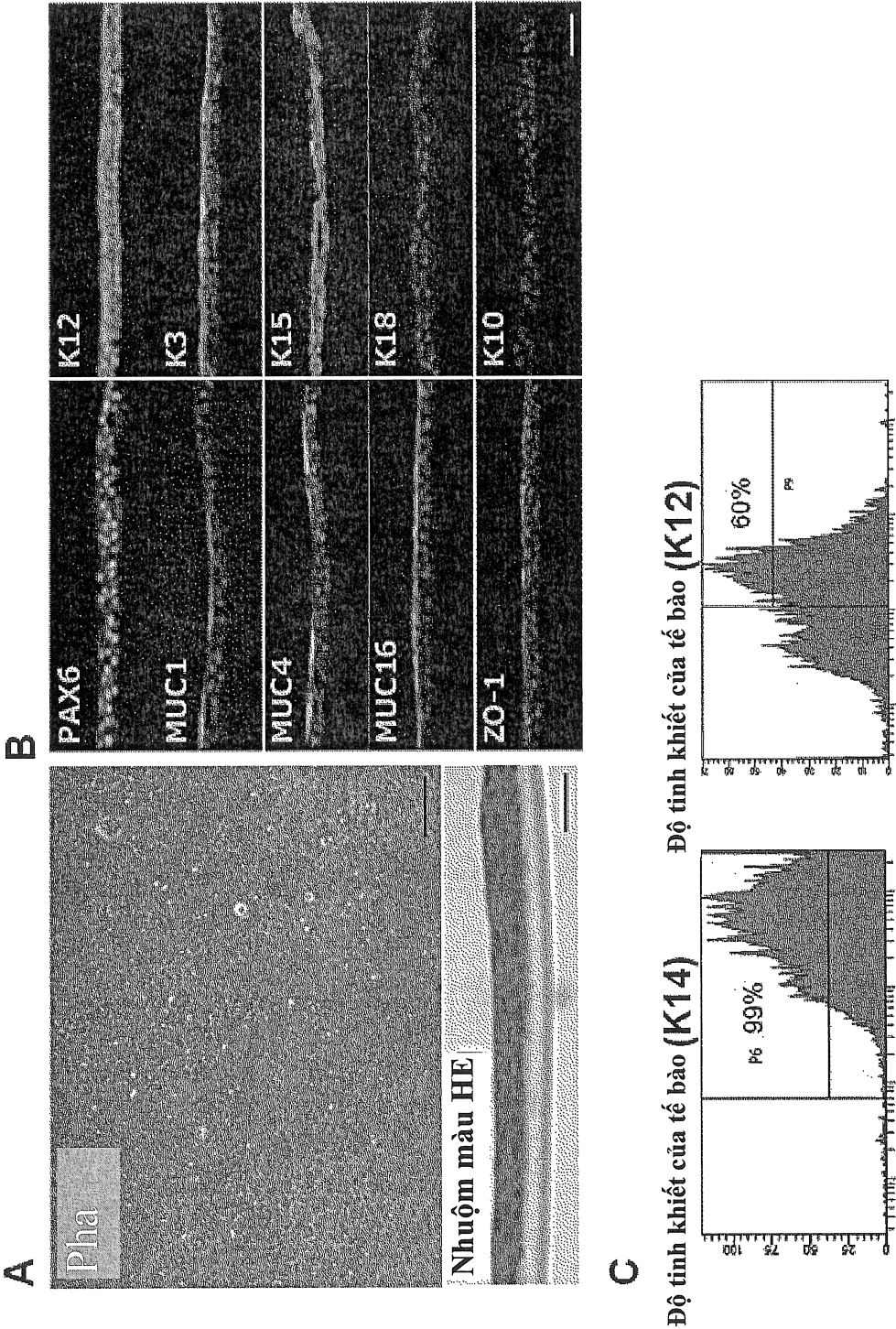


FIG.11



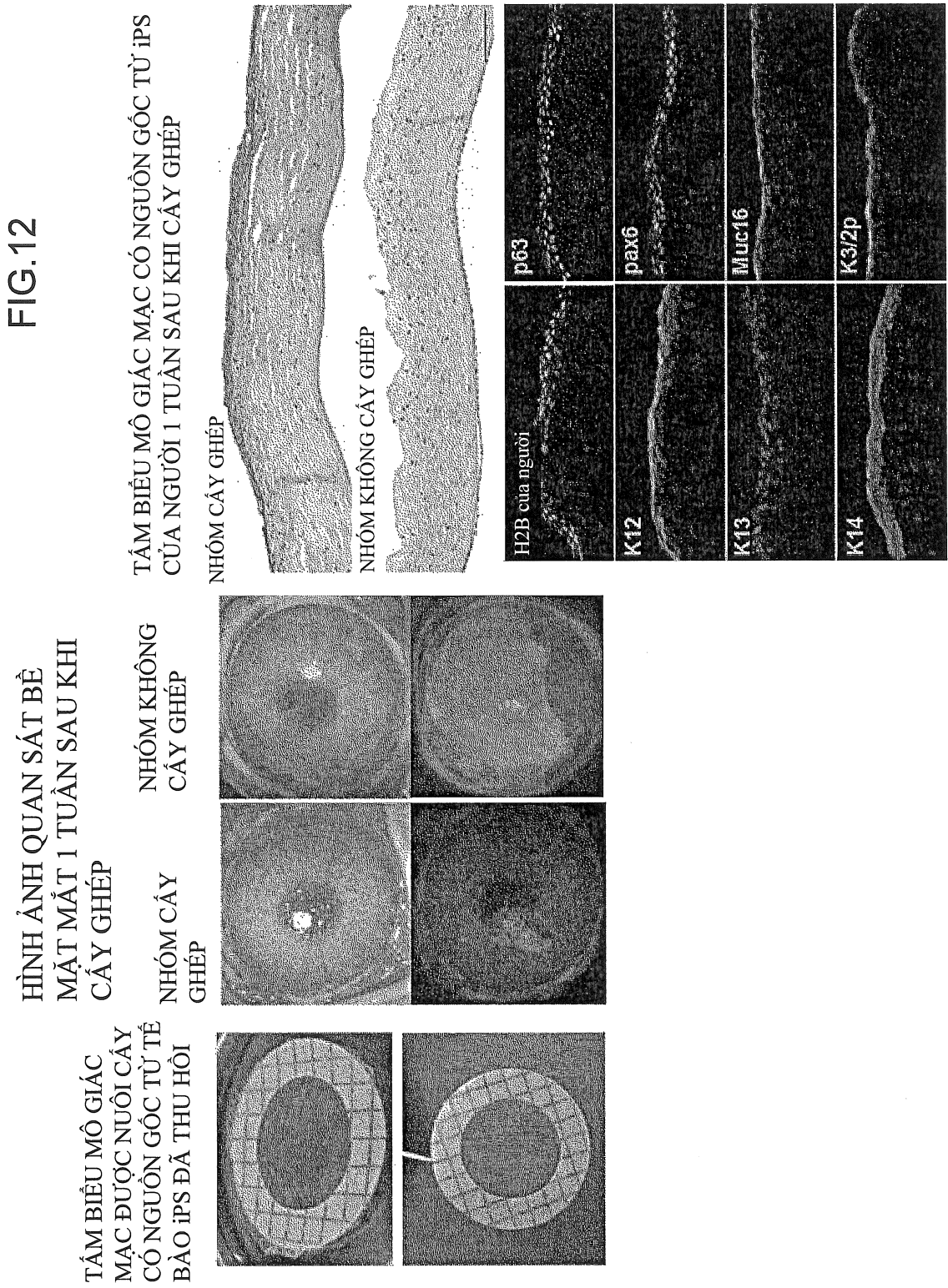
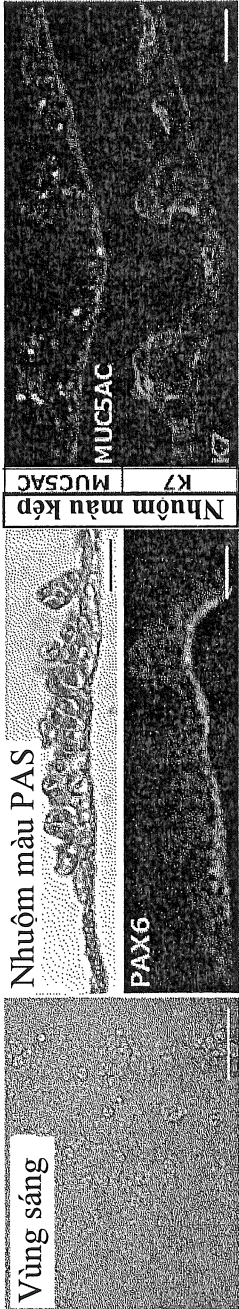


FIG.13

A. TẾ BÀO GIỐNG TẾ BÀO ĐÀI KẾT MẠC SAU KHI NUÔI CÂY THỜI GIAN DÀI TRONG MÔI TRƯỜNG ĐỀ NUÔI CÂY BIỂU MÔ GIÁC MẠC



B. TẾ BÀO DẠNG TUYẾN SAU KHI NUÔI CÂY THỜI GIAN DÀI TRONG MÔI TRƯỜNG ĐỀ NUÔI CÂY BIỂU MÔ GIÁC MẠC

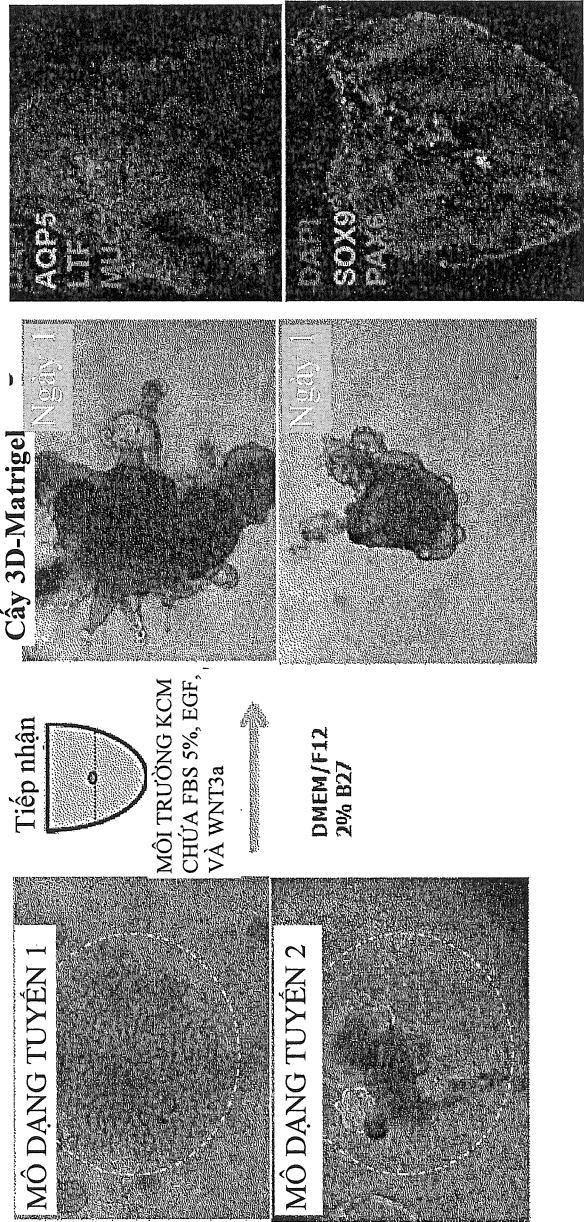


FIG.14

A. SỰ PHÁT TRIỂN CỦA TẾ BÀO MÀO THẦN KINH QUANH MẮT

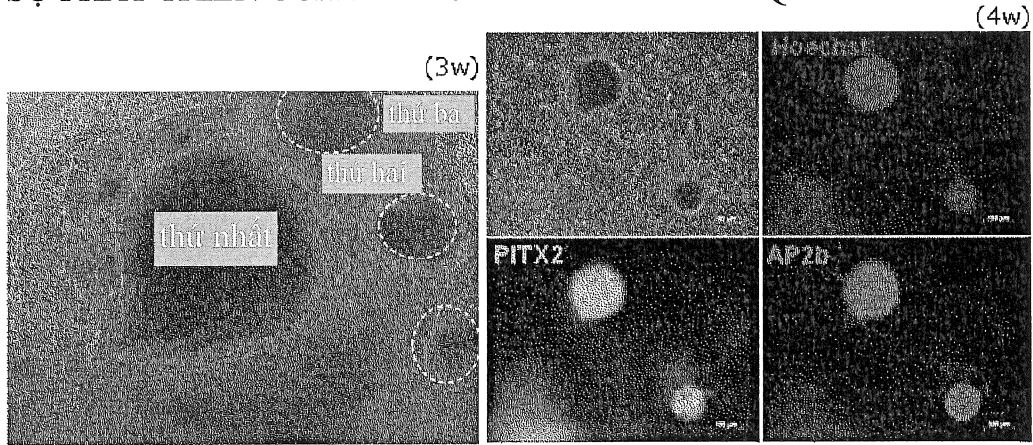
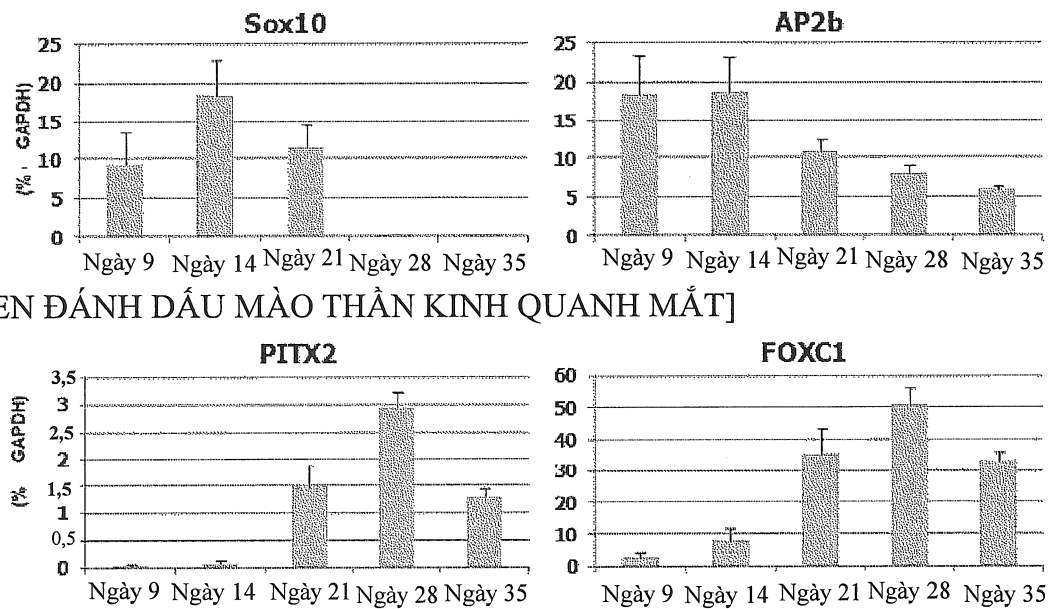
B. BIỂU HIỆN CỦA GEN ĐÁNH DẤU TẾ BÀO MÀO THẦN KINH QUANH MẮT
[GEN ĐÁNH DẤU MÀO THẦN KINH]

FIG.15

