



(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)



1-0033643

(51)⁷ C12M 3/00

(13) B

(21) 1-2018-00617

(22) 14/07/2016

(86) PCT/JP2016/003319 14/07/2016

(87) WO 2017/010100 19/01/2017

(30) 2015-142201 16/07/2015 JP; 2016-004339 13/01/2016 JP

(45) 25/10/2022 415

(43) 26/04/2018 361A

(73) 1. DAIKIN INDUSTRIES, LTD. (JP)

Umeda Center Bldg., 2-4-12, Nakazaki-Nishi, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 5308323, Japan

2. OTSUKA PHARMACEUTICAL FACTORY, INC. (JP)

115, Aza Kuguhara, Tateiwa, Muya-cho, Naruto-shi, Tokushima 7728601, Japan

(72) HIGUCHI, Tatsuya (JP); KOMAZAWA, Kozue (JP); MOHARA, Yoshiko (JP); DEMPO, Takayuki (JP); NISHIMURA, Masuhiro (JP).

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

(54) VẬT CHỨA ĐỂ PHÂN PHỐI, BẢO QUẢN HOẶC NUÔI CẤY TẾ BÀO ĐỘNG VẬT CÓ VÚ

(57) Sáng chế đề cập đến vật chứa để phân phối, bảo quản hoặc nuôi cấy tế bào động vật có vú. Khi tế bào động vật có vú được phân phối bằng cách sử dụng vật chứa mà bề mặt của nó tiếp xúc với tế bào động vật có vú được tạo thành từ vật liệu nhựa flo ít nhất một phần có nhóm đầu tận cùng -CF₃ hoặc vật chứa mà bề mặt của nó tiếp xúc với tế bào động vật có vú được tạo thành từ vật liệu nhựa flo có tổng số đầu tận cùng mang nhóm không được flo hóa và đầu tận cùng mang nhóm -CF₂H trong nhựa flo bằng 70 hoặc ít hơn tính trên mỗi 1 × 10⁶ nguyên tử cacbon, hoặc tế bào động vật có vú được bảo quản hoặc được nuôi cấy trong vật chứa này, sự bám dính tế bào trên bề mặt bên trong vật chứa và sự giảm tỷ lệ sống sót tế bào có thể được ức chế hiệu quả. Do đó, bằng cách sử dụng các vật chứa này, chất lỏng chứa tế bào động vật có vú có nồng độ cao và tỷ lệ tế bào sống cao có thể được phân phối, được bảo quản hoặc được tạo ra, góp phần vào y học tái sinh sử dụng chất lỏng chứa tế bào động vật có vú (chất lỏng dạng huyền phù).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vật chứa dùng để phân phối, bảo quản hoặc nuôi cấy tế bào động vật có vú, trong đó bề mặt của vật chứa này tiếp xúc với tế bào động vật có vú được tạo thành từ nhựa flo có một hoặc nhiều nhóm $-CF_3$ ở đầu tận cùng, hoặc nhựa flo có tổng số đầu tận cùng mang nhóm không được flo hóa và đầu tận cùng mang nhóm $-CF_2H$ trong nhựa flo này bằng 70 hoặc ít hơn tính trên 1×10^6 nguyên tử cacbon.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tế bào gốc toàn năng như tế bào gốc phôi (tế bào ES) và tế bào gốc toàn năng cảm ứng (tế bào iPS) là tế bào có khả năng tăng sinh không giới hạn và đa năng với tế bào mô nhiều loại. Tế bào gốc toàn năng của người được kỳ vọng có thể áp dụng cho y học tái sinh trong đó tế bào gốc toàn năng của người in vitro được gây cảm ứng để biệt hóa thành tế bào có các loại chức năng khác nhau, mà sau đó được dùng cho bệnh nhân được kỳ vọng là cho hiệu quả sử dụng. Ngoài ra, tế bào gốc thân như tế bào gốc trung mô cũng được kỳ vọng có tác dụng trị liệu thông qua việc giải phóng yếu tố dinh dưỡng và xytokin, và tác dụng tập hợp vùng mô bị tổn thương và sau đó biệt hóa thành tế bào cấu tạo của chúng và hỗ trợ và phục hồi vùng, và các nghiên cứu trong lâm sàng về chúng đã được thực hiện. Để đạt được mục đích, các tế bào có chất lượng cao cần được nuôi cấy ổn định hoặc được bảo quản với lượng lớn, và khi dùng chúng vẫn giữ được chất lượng.

Vật chứa dạng túi (túi) dùng để nuôi cấy tế bào đã được thiết kế để làm vật chứa để nuôi cấy tế bào nổi (Tài liệu Patent 1). Loại túi này chứa hợp kim polyme trong đó hỗn hợp polyme của copolyme khối poly(etylenbutylen)polystyren với polypropylen được trộn với copolyme etylen acrylat, và có ưu điểm là độ trong suốt và khả năng thấm khí. Mặt khác, các túi thích hợp để nuôi cấy tế bào bám dính cũng đã được thiết kế (các Tài liệu Patent 2, 3). Túi được mô tả trong Tài liệu Patent 2 là loại túi được cải tiến để

tế bào dễ dàng bám dính vào bề mặt bên trong túi bằng cách tăng tính ưa nước bằng cách xử lý phóng điện hoa đối với bề mặt. Ngoài ra, túi được mô tả trong Tài liệu Patent 3 gồm tấm nhựa tổng hợp có độ cứng khi uốn ở giá trị định trước để túi không dễ bị biến dạng khi cấy, và có ưu điểm là có khả năng ngăn cản việc bị bong ra và chết của các tế bào được tạo ra do sự biến dạng của vật chứa khi di chuyển túi.

Ngoài ra, các túi đang bán trên thị trường đã được biết đến, và có bán trên thị trường, ví dụ, túi xoay CultiLife(R) (sản xuất bởi Takara Pac Ltd.) sử dụng copolyme etylen (Et)-vinyl axetat (VA) (EVA) làm vật liệu chế tạo, túi VueLife FEP 32-C (sản xuất bởi American Floseal Corp.) sử dụng copolyme tetrafloetylen (TFE)-hexaflopropylen (HFP) (FEP) là nhựa flo làm vật liệu chế tạo, và túi nuôi cấy A-1000NL (sản xuất bởi Nipro Corp.).

Tuy nhiên, không có túi nào trong số các túi nêu trên ngăn được sự bám dính của tế bào bám dính vào bề mặt bên trong túi và giữ hoặc nuôi cấy tế bào ở trạng thái nổi.

Trong khi đó, đã biết rằng khi bề mặt của dụng cụ xử lý và gia nhiệt thực phẩm được phủ màng nhựa flo trong đó nhóm nằm ở đầu tận cùng không bền của copolyme TFE-perfloalkylvinyl ete (PFVE) (PFA) được flo hóa để loại bỏ các nhóm không ổn định nằm tại đầu tận cùng, cải thiện khả năng chống cháy nhờ chống bám bẩn (Tài liệu patent 4). Tuy nhiên, tính bám dính tế bào của nhựa flo có các nhóm ở đầu tận cùng đã được flo hóa là chưa được biết đến.

Tài liệu kỹ thuật có liên quan

Tài liệu patent

Tài liệu patent 1: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa thẩm định số 03-65177

Tài liệu patent 2: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa thẩm định số 06-98756

Tài liệu patent 3: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa thẩm định số 2008-17839

Tài liệu patent 4: Patent Nhật Bản số 3962153

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các vấn đề được giải quyết nhờ sáng chế

Sáng chế đề xuất vật chứa có khả năng phân phối, bảo quản hoặc tạo ra chất lỏng chứa tế bào động vật có vú có nồng độ cao và tỷ lệ tế bào sống cao.

Biện pháp giải quyết vấn đề

Kết quả của các nghiên cứu triệt để để giải quyết vấn đề là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng khi tế bào động vật có vú được dùng bằng cách sử dụng vật chứa mà bề mặt tiếp xúc với tế bào động vật có vú được tạo thành từ nhựa flo có một hoặc nhiều nhóm $-CF_3$ ở đầu tận cùng, hoặc nhựa flo có tổng số đầu tận cùng mang nhóm không được flo hóa và đầu tận cùng mang nhóm $-CF_2H$ trong nhựa flo bằng 70 hoặc ít hơn tính trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon, và tế bào động vật có vú được bảo quản hoặc nuôi cấy trong vật chứa này, sự bám dính tế bào vào bề mặt bên trong vật chứa và sự giảm tỷ lệ sống sót tế bào được ức chế hiệu quả, và chất lỏng chứa tế bào động vật có vú có nồng độ cao và tỷ lệ tế bào sống cao có thể được phân phối, bảo quản hoặc tạo ra. Phát hiện này dẫn đến việc hoàn thiện sáng chế.

Nghĩa là, sáng chế như sau.

(1) Vật chứa để phân phối, bảo quản hoặc nuôi cấy tế bào động vật có vú, trong đó bề mặt của vật chứa tiếp xúc với tế bào động vật có vú được tạo thành từ nhựa flo có tổng số đầu tận cùng mang nhóm không được flo hóa và đầu tận cùng mang nhóm $-CF_2H$ trong nhựa flo bằng 70 hoặc ít hơn tính trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon.

(2) Vật chứa để phân phối, bảo quản hoặc nuôi cấy tế bào động vật có vú, trong đó bề mặt của vật chứa tiếp xúc với tế bào động vật có vú được tạo thành từ nhựa flo có một hoặc nhiều nhóm $-CF_3$ ở đầu tận cùng.

(3) Vật chứa để phân phối, bảo quản hoặc nuôi cấy tế bào động vật có vú theo (2), trong đó bề mặt của vật chứa tiếp xúc với tế bào động vật có vú được tạo thành từ nhựa flo có số đầu tận cùng mang nhóm không được flo hóa bằng 70 hoặc ít hơn tính trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon.

(4) Vật chứa để phân phối, bảo quản hoặc nuôi cấy tế bào động vật có vú theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (3), trong đó nhựa flo là ít nhất một nhựa flo được chọn từ copolyme gốc tetrafloetylen-hexafloropropylene và copolyme gốc tetrafloetylen-perfluoroalkylvinyl etc.

(5) Vật chứa để phân phối, bảo quản hoặc nuôi cấy tế bào động vật có vú theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (4), trong đó vật chứa là túi.

(6) Vật chứa để phân phối, bảo quản hoặc nuôi cấy tế bào động vật có vú theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (5), trong đó tế bào động vật có vú là tế bào kết dính.

(7) Vật chứa để phân phối, bảo quản hoặc nuôi cấy tế bào động vật có vú theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (6), trong đó tế bào động vật có vú là tế bào gốc trung mô.

Hiệu quả của sáng chế

Khi sử dụng vật chứa để phân phối, bảo quản hoặc nuôi cấy tế bào theo sáng chế, chất lỏng chứa tế bào động vật có vú được phân phối hoặc lưu trữ, hoặc tế bào động vật có vú được nuôi cấy, vì sự bám dính tế bào vào bề mặt bên trong vật chứa và sự giảm tỷ lệ sống sót tế bào có thể được ức chế hiệu quả, có thể thực hiện phân phối, bảo quản hoặc tạo ra chất lỏng chứa tế bào động vật có vú có nồng độ cao và tỷ lệ tế bào sống cao, góp phần vào y học tái sinh sử dụng chất lỏng chứa tế bào động vật có vú (chất lỏng dạng huyền phù).

Mô tả chi tiết sáng chế

Vật chứa để phân phối, bảo quản hoặc nuôi cấy theo sáng chế (sau đây, dùng đơn giản là "vật chứa theo sáng chế" trong một số trường hợp) không bị giới hạn cụ thể miễn là trong vật chứa để phân phối, bảo quản hoặc nuôi cấy tế bào động vật có vú, bề mặt của chúng tiếp xúc với tế bào động vật có vú (chất lỏng chứa tế bào động vật có vú) được tạo thành từ nhựa flo có một hoặc nhiều nhóm $-CF_3$ ở đầu tận cùng hoặc nhựa flo có tổng số đầu tận cùng mang nhóm không được flo hóa và đầu tận cùng mang nhóm $-CF_2H$ trong nhựa flo là 70 hoặc ít hơn trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon (sau đây, các

nhựa flo này nói chung được gọi là "nhựa flo theo sáng chế" trong một số trường hợp); và vật chứa nhìn chung là tùy ý được tạo thành từ nhựa flo theo sáng chế. Vật chứa theo sáng chế có đặc điểm là bề mặt vật chứa tiếp xúc với tế bào động vật có vú được tạo thành từ nhựa flo theo sáng chế. Khi chất lỏng chứa tế bào động vật có vú được phân phối hoặc bảo quản, hoặc tế bào động vật có vú được nuôi cấy bằng cách sử dụng vật chứa có đặc điểm này, vì sự bám dính tế bào và sự giảm tỷ lệ sống sót tế bào được ức chế hiệu quả, vật chứa theo sáng chế có thể thích hợp được sử dụng để phân phối và/hoặc bảo quản chất lỏng chứa tế bào nổi và nuôi cấy tế bào nổi, và ngoài ra, để phân phối và/hoặc bảo quản chất lỏng chứa tế bào bám dính và nuôi cấy nổi tế bào bám dính. Trong trường hợp sử dụng để phân phối và/hoặc bảo quản chất lỏng chứa tế bào, và nuôi cấy nổi tế bào, vật chứa tốt hơn là vật chứa trong đó bề mặt bên trong vật chứa không được phủ bằng (hoặc được bố trí trên đó bằng) chất kết dính tế bào như Matrigel, entactin, fibronectin, polyme nhạy với nhiệt độ (PIPAAm hoặc tương tự), polycation (polylysin hoặc tương tự), gelatin, lectin, polysaccarit (axit hyaluronic hoặc tương tự), axit polylactic, axit polyglycolic, ϵ -aminocaprolacton, collagen typ I, collagen typ IV, chitosan và laminin. Trong bản mô tả này, theo sáng chế, "bảo quản" bao gồm bảo quản trong khi vận chuyển.

Các tế bào nổi bao gồm các tế bào như hồng cầu, và bạch cầu (thu được từ máu ngoại biên) (bạch cầu trung tính, bạch cầu đơn nhân [bạch cầu đơn nhân to và tế bào lympho], đại thực bào, và tương tự).

Ví dụ về tế bào bám dính bao gồm: tế bào gốc bao gồm tế bào gốc toàn năng như tế bào gốc phôi (tế bào ES), tế bào mầm phôi (tế bào EG), tế bào gốc dòng giao tử (tế bào GS) và tế bào gốc toàn năng cảm ứng (tế bào iPS); tế bào gốc đa năng như tế bào gốc trung mô, tế bào gốc tạo huyết và tế bào gốc thần kinh, và tế bào gốc đơn năng (tế bào tiền thân) như tế bào tiền thân cơ tim, tế bào tiền thân nội mô mạch, tế bào tiền thân neuron, tế bào tiền thân mỡ, nguyên bào sợi da, nguyên bào cơ cơ vân, nguyên bào xương và nguyên bào tạo ngà; và tế bào trưởng thành như tế bào cơ tim, tế bào nội mạc mạch máu, tế bào thần kinh, tế bào mỡ, nguyên bào sợi da, tế bào cơ vân, tế bào xương, tế bào

gan (tế bào của gan), tế bào nội mạc tĩnh mạch dây rốn, tế bào nội mạc bạch huyết nhỏ của da, tế bào sừng, tế bào biểu mô phế quản, melanin bào, tế bào cơ nhẵn và tế bào răng. Tế bào gốc trung mô được ưu tiên.

Nhựa flo theo sáng chế tốt hơn nếu không có đầu tận cùng mang nhóm $-CF_2H$, và ở nhựa flo, tổng số đầu tận cùng mang nhóm không được flo hóa (ví dụ, nhóm chức như $-COF$, $-COOH$, $-COOH$ gắn với nước, $-CH_2OH$, $-CONH_2$ và $-COOCH_3$) và đầu tận cùng mang nhóm $-CF_2H$ tốt hơn nếu là 70 hoặc ít hơn trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon, và tốt hơn nữa nếu là 35 hoặc ít hơn trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon. Ngoài ra, số lượng tốt hơn khác nữa nếu là 20 hoặc ít hơn trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon, và đặc biệt tốt hơn nếu là 10 hoặc ít hơn trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon.

Nghĩa là, một khía cạnh theo sáng chế bao gồm vật chứa để phân phối, bảo quản hoặc nuôi cấy tế bào động vật có vú, trong đó bề mặt của vật chứa tiếp xúc với tế bào động vật có vú được tạo thành từ nhựa flo có tổng số đầu tận cùng mang nhóm không được flo hóa và đầu tận cùng mang nhóm $-CF_2H$ ở nhựa flo là 70 hoặc ít hơn trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon.

Số lượng trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon của $-COF$, $-COOH$, $-COOH$ gắn với nước, $-CH_2OH$, $-CONH_2$, $-COOCH_3$ và $-CF_2H$ có thể tính toán bằng FT-IR.

Ngoài ra, nhựa flo theo sáng chế thỏa mãn nếu có một hoặc nhiều nhóm $-CF_3$ ở đầu tận cùng và có cấu trúc đầu tận cùng được làm ổn định hơn; và nhựa flo theo sáng chế bao gồm nhựa flo trong đó một phần của đầu tận cùng mang nhóm không được flo hóa được flo hóa và có $-CF_3$.

Nhóm đầu tận cùng $-CF_3$ có thể được phân tích bằng thiết bị đo ^{19}F NMR nhiệt độ cao.

Theo sáng chế, "đầu tận cùng mang nhóm không được flo hóa" có nghĩa là đầu tận cùng có một số tính phản ứng được và thường được gọi đầu tận cùng không bền, và cụ thể bao gồm nhóm chức như $-COF$, $-COOH$, $-COOH$ gắn với nước, $-CH_2OH$, $-CONH_2$ và $-COOCH_3$.

Tổng số đầu tận cùng mang nhóm không được flo hóa (ví dụ, nhóm chức như -COF, -COOH, -COOH gắn với nước, -CH₂OH, -CONH₂ và -COOCH₃) ở nhựa flo theo sáng chế tốt hơn nếu là 70 hoặc ít hơn trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon, tốt hơn nữa nếu là 50 hoặc ít hơn trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon, tốt hơn khác nữa nếu là 35 hoặc ít hơn trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon, ngoài ra tốt hơn khác nữa nếu là 15 hoặc ít hơn trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon, ngoài ra tốt hơn khác nữa nếu là 10 hoặc ít hơn trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon, cụ thể tốt hơn nếu là 5 hoặc ít hơn trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon, và ngoài ra cụ thể tốt hơn nếu là 2 hoặc ít hơn trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon.

Nghĩa là, một khía cạnh theo sáng chế bao gồm vật chứa để phân phối, bảo quản hoặc nuôi cấy tế bào động vật có vú, trong đó bề mặt của vật chứa tiếp xúc với tế bào động vật có vú được tạo thành từ nhựa flo có một hoặc nhiều nhóm -CF₃ ở đầu tận cùng trong nhựa flo số đầu tận cùng mang nhóm không được flo hóa là 70 hoặc ít hơn trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon.

Nhựa flo theo sáng chế cụ thể bao gồm polytetrafloetylen (PTFE), copolyme gốc tetrafloetylen (TFE)-hexafloropropylen (HFP) (FEP) và copolyme gốc TFE-perfloalkylvinyl ete (PAVE) (PFA); trong số này, FEP và PFA có thể tốt hơn nếu được làm ví dụ và FEP có thể được làm ví dụ thích hợp.

"Copolyme gốc TFE-HFP" có nghĩa là copolyme chứa ít nhất TFE và HFP. Nghĩa là, "copolyme gốc TFE-HFP" bao gồm, ngoài copolyme bậc hai (copolyme TFE/HFP; FEP) của TFE và HFP, copolyme bậc ba như copolyme của TFE, HFP và vinyl florua (VF) (copolyme TFE/HFP/VF), copolyme của TFE, HFP và vinyliden florua (VDF) (copolyme TFE/HFP/VDF) và copolyme của TFE, HFP và perflo(alkylvinyl ete)(PAVE) (copolyme TFE/HFP/PAVE), copolyme bậc bốn như copolyme của TFE, HFP, VF và VDF (copolyme TFE/HFP/VF/VDF), copolyme của TFE, HFP, VF và PAVE (copolyme TFE/HFP/VF/PAVE) và copolyme của TFE, HFP, VDF và PAVE (copolyme TFE/HFP/VDF/PAVE), và copolyme bậc năm như copolyme của TFE, HFP, VF, VDF và PAVE (copolyme TFE/HFP/VF/VDF/PAVE).

Copolymer gốc TFE-HFP tốt hơn nếu là copolymer TFE/HFP hoặc copolymer TFE/HFP/PAVE. Tỷ lệ khối lượng của TFE và HFP ở copolymer TFE/HFP này tốt hơn nếu là 80 đến 97 / 3 đến 20, và tốt hơn nữa nếu là 84 đến 92 / 8 đến 16. Ngoài ra, tỷ lệ khối lượng của TFE, HFP và PAVE ở copolymer TFE/HFP/PAVE tốt hơn nếu là 70 đến 97 / 3 đến 20 / 0,1 đến 10, và tốt hơn nữa nếu là 81 đến 92 / 5 đến 16 / 0,3 đến 5.

"Copolymer gốc TFE-PAVE" có nghĩa là copolymer chứa ít nhất TFE và PAVE. Nghĩa là, "copolymer gốc TFE-PAVE" bao gồm, ngoài copolymer bậc hai của TFE và PAVE (copolymer TFE/PAVE; PFA), copolymer bậc ba như copolymer của TFE, PAVE và hexafluoropropylene (HFP) (copolymer TFE/PAVE/HFP), copolymer của TFE, PAVE và vinylidene fluoride (VDF) (copolymer TFE/PAVE/VDF) và copolymer của TFE, PAVE và chlorotrifluoroethylene (CTFE) (copolymer TFE/PAVE/CTFE), copolymer bậc bốn như copolymer của TFE, PAVE, HFP và VDF (copolymer TFE/PAVE/HFP/VDF), copolymer của TFE, PAVE, HFP và CTFE (copolymer TFE/PAVE/HFP/CTFE) và copolymer của TFE, PAVE, VDF và CTFE (copolymer TFE/PAVE/VDF/CTFE), và copolymer bậc năm như copolymer của TFE, PAVE, HFP, VDF và CTFE (copolymer TFE/PAVE/HFP/VDF/CTFE).

PAVE cấu tạo đơn vị PAVE không bị giới hạn cụ thể, và ví dụ của chúng bao gồm perfluoromethyl vinyl ether [PMVE], perfluoroethyl vinyl ether [PEVE], perfluoropropyl vinyl ether [PPVE], perfluorobutyl vinyl ether, perfluoropentyl vinyl ether, perfluorohexyl vinyl ether và perfluoroheptyl vinyl ether).

Tỷ lệ khối lượng của TFE và PAVE ở copolymer gốc TFE-PAVE tốt hơn nếu là 90 đến 98 / 2 đến 10, và tốt hơn nữa nếu là 92 đến 97 / 3 đến 8.

Nhựa fluoro theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách cho nhóm đầu tận cùng của nhựa fluoro được tổng hợp theo phương pháp thông thường của polymer hóa huyền phù, polymer hóa nhũ tương hoặc tương tự xử lý fluoro hóa bằng phương pháp đã biết như phương pháp trong đó trước khi nhựa fluoro được ép đùn chảy, nhựa fluoro và hợp chất chứa fluoro (ví dụ, nguồn chứa gốc fluoro) được tiếp xúc với nhau để tiến hành xử lý ổn định, và phương pháp trong đó viên nhựa fluoro thu được sau khi nhựa fluoro được ép đùn chảy và hợp

chất chứa flo được tiếp xúc với nhau để tiến hành xử lý flo hóa. Ngoài ra, nhựa flo theo sáng chế cũng có thể thu được bằng cách sử dụng tác nhân chuyển mạch và xúc tác polyme hóa có khả năng kiểm soát nhóm đầu tận cùng cùng với monome flo trong việc sản xuất (phản ứng polyme hóa) nhựa flo. Ngoài ra, sản phẩm có bán trên thị trường có thể được sử dụng làm nhựa flo theo sáng chế. Việc xử lý flo hóa cũng có thể được tiến hành bằng cách cho hợp chất chứa flo tiếp xúc với khuôn đúc từ nhựa flo, như màng đúc bằng cách làm nóng chảy nhựa flo, vật chứa đúc từ màng và vật chứa đúc từ nhựa flo. Ngoài ra, các phương pháp xử lý này cũng có thể được kết hợp.

Nghĩa là, tổng số đầu tận cùng mang nhóm không được flo hóa và tổng số đầu tận cùng mang nhóm không được flo hóa và đầu tận cùng mang nhóm $-CF_2H$ không cần là 70 hoặc ít hơn trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon trong mỗi giai đoạn của nhựa flo, viên và màng để trở thành vật liệu thô, và nó thỏa mãn nếu trên bề mặt của vật chứa cuối cùng tiếp xúc với tế bào, tổng số của chúng là 70 hoặc ít hơn trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon. Ngoài ra, trong trường hợp nhựa flo có một hoặc nhiều nhóm $-CF_3$ ở đầu tận cùng, số nhóm đầu tận cùng $-CF_3$ không cần thiết là một hoặc nhiều trong mỗi giai đoạn của nhựa flo, viên và màng để trở thành vật liệu thô, và nó thỏa mãn nếu trên bề mặt của vật chứa cuối cùng tiếp xúc với tế bào, nhựa flo có một hoặc nhiều nhóm $-CF_3$ ở đầu tận cùng.

Nguồn chứa gốc flo không bị giới hạn cụ thể, nhưng ví dụ của chúng bao gồm halogen florua như IF_5 và ClF_3 , khí F_2 , CoF_3 , AgF_2 , UF_6 , OF_2 , N_2F_2 và CF_3OF . Khí F_2 tùy ý có nồng độ là 100%, nhưng, từ khía cạnh an toàn, được sử dụng bằng cách trộn với khí trơ và nhờ đó pha loãng 5 đến 50% khối lượng, tốt hơn nếu 15 đến 30% khối lượng. Ví dụ về khí trơ bao gồm khí nitơ, khí heli và khí argon, và từ quan điểm hiệu quả về chi phí, ưu tiên khí nitơ.

Việc xử lý flo hóa được thực hiện ở nhiệt độ tốt hơn nếu 20 đến $220^\circ C$, và tốt hơn nữa nếu 100 đến $200^\circ C$. Việc xử lý flo hóa được thực hiện tốt hơn nếu trong 5 đến 30 giờ, và tốt hơn nữa nếu trong 10 đến 20 giờ.

Vật chứa thu được theo sáng chế tùy ý là vật chứa trong đó độ nhám trung bình cộng (Ra) của độ nhám bề mặt, độ nhám quân phương (RMS) của độ nhám bề mặt, và năng lượng tự do bề mặt đã được điều chỉnh. Ví dụ về vật chứa bao gồm vật chứa có bề mặt bên trong vật chứa của nó có Ra của độ nhám bề mặt là 3,5 đến 6,5 nm, RMS của độ nhám bề mặt là 4,5 đến 8,0 nm, và năng lượng tự do bề mặt là 16,5 đến 18,5 (mJ/m²).

Ví dụ về dạng vật chứa theo sáng chế bao gồm đĩa, đĩa có lỗ, túi, chai, ống ly tâm, lọ nhỏ, bơm tiêm và ống; trong trường hợp vật chứa theo sáng chế là vật chứa để sử dụng tế bào, ưu tiên là bơm tiêm, túi (để nhỏ giọt), chai (để nhỏ giọt), và ống; trong trường hợp vật chứa theo sáng chế là vật chứa để bảo quản tế bào, ưu tiên là đĩa, đĩa có lỗ, túi, chai, ống ly tâm và lọ nhỏ; và trong trường hợp vật chứa theo sáng chế là vật chứa để nuôi cấy tế bào, ưu tiên là đĩa, đĩa có lỗ, túi và chai. Đặc biệt vật chứa theo sáng chế có dạng túi, vì nó có thể được sử dụng cho mọi ứng dụng để sử dụng, bảo quản và nuôi cấy tế bào, có thể được lấy ví dụ một cách thích hợp.

Đĩa, đĩa có lỗ, túi, chai, ống ly tâm, lọ nhỏ, bơm tiêm, ống và tương tự có thể được tạo ra bằng phương pháp đúc bao gồm đúc áp lực, ép đùn, đúc chuyển, đúc phòng, đúc thổi, đúc phun, đúc quay, đúc lót, ép đùn xộp và đúc màng, cần kết hợp với phương pháp gắn kín như gắn kín bằng nhiệt, dung hợp tần số cao và dung hợp siêu âm.

Túi có thể được tạo ra cụ thể bằng cách phủ màng (tấm) của nhựa flo theo sáng chế vật liệu và gắn kín bằng nhiệt phần mép bằng cách sử dụng máy hàn kín dùng xung.

Màng được sử dụng để đúc túi có thể là màng một lớp hoặc màng nhiều lớp bao gồm nhiều lớp là hai lớp hoặc nhiều hơn; và trong trường hợp màng nhiều lớp bao gồm nhiều lớp, nó thỏa mãn nếu túi được đúc sao cho ít nhất bề mặt bên trong tiếp xúc với tế bào động vật có vú là màng lớp vật liệu nhựa flo theo sáng chế, và mỗi màng lớp khác thậm chí được phép là màng lớp vật liệu (ví dụ, vật liệu nhựa polyolefinic) khác với nhựa flo theo sáng chế. Việc cán màng được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp như phương pháp cán nhiệt, phương pháp nén nhiệt, phương pháp gia nhiệt tần số cao, phương pháp đúc dùng dung môi và phương pháp cán ép đùn.

Ngoài ra, vật chứa theo sáng chế cũng có thể thu được bằng cách cho vật liệu nền, như đĩa, đĩa có lỗ, túi, chai, ống ly tâm, lọ nhỏ, bơm tiêm và ống, được tạo ra từ thủy tinh, kim loại, nhựa hoặc tương tự, xử lý phủ bằng tác nhân phủ bao gồm nhựa flo theo sáng chế. Có thể sử dụng phương pháp bất kỳ theo dạng vật liệu nền. Ví dụ về xử lý phủ bao gồm phủ quay, phủ phun, phủ thanh, phủ cuộn, nhúng, phủ chải, quay lót và phủ tĩnh điện. Vật liệu nền được phủ bằng tác nhân phủ nhựa flo, và sau đó cho xử lý sấy và xử lý gia nhiệt nhiệt độ cao để nhờ đó tạo thành lớp phủ. Ngoài ra, lớp phủ được phép làm dày đến độ dày bất kỳ bằng cách phủ kép thêm tác nhân phủ chứa nhựa flo theo sáng chế.

Vật chứa theo sáng chế có thể được sử dụng, ví dụ, đối với trường hợp chất lỏng chứa tế bào động vật có vú được bảo quản cryo, trường hợp chất lỏng chứa tế bào động vật có vú được bảo quản (ít nhất trong 6 giờ) ở nhiệt độ mà chất lỏng không đông lạnh (thường trong khoảng từ 0 đến 37°C, tốt hơn nếu từ 0 đến 25°C [nhiệt độ phòng]), trường hợp tế bào động vật có vú nổi hoặc kết dính được tạo ra ở lượng lớn bằng phương pháp cấy đậm đặc, hoặc trường hợp chất lỏng chứa tế bào động vật có vú sau khi bảo quản ở nhiệt độ mà chất lỏng không đông lạnh được phân phối (được cấy) do nó không được chuyển sang vật chứa khác.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả cụ thể hơn bởi phần ví dụ thực hiện sáng chế, nhưng phạm vi kỹ thuật của sáng chế không bị giới hạn bởi phần Ví dụ thực hiện sáng chế này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

1. Sản xuất túi tế bào

Ba loại màng có kích cỡ 16 cm × 15 cm và độ dày 100 µm được gắn kín bằng nhiệt sử dụng máy hàn kín xung trong điều kiện thời gian gắn kín là 50 giây, áp suất gắn là 0,2 MPa và độ rộng mỗi hàn là 5 mm để nhờ đó sản xuất 12 loại túi tế bào (túi tế bào A đến C [mẫu ví dụ so sánh 1 đến 3], túi tế bào D đến G [mẫu ví dụ 1 đến 4], túi tế bào H (mẫu ví dụ so sánh 4), túi tế bào I đến K [mẫu ví dụ 5 đến 7], và túi tế bào L [mẫu ví

dự so sánh 5]) (xem bảng 2). Trong bản mô tả này, túi tế bào M (mẫu ví dụ so sánh 6) được sử dụng là túi tế bào được làm từ polyvinyl clorua (thu được bằng cách xử lý túi bốn Kawasumi ACP-AMP, sản xuất bởi Kawasumi Laboratories, Inc.) (xem bảng 2).

1-1 Đo số đầu tận cùng mang nhóm không được flo hóa và số đầu tận cùng mang nhóm $-CF_2H$

Mẫu nhựa tương ứng có độ dày khoảng 250 đến 300 μm được sản xuất, và được phân tích bằng cách sử dụng quang phổ kế FT-IR 1760X (sản xuất bởi PerkinElmer, Inc.).

Mẫu của nhựa tương ứng có độ dày khoảng 250 đến 300 μm được sản xuất bằng cách lăn viên bằng máy nén thủy lực. Ngoài ra, việc đo được thực hiện bằng cách sử dụng màng (được sản xuất từ viên bằng cách đúc nóng chảy) cấu tạo nên túi tế bào, và trong trường hợp độ dày không đủ, bằng cách phủ màng.

Các phổ khác nhau từ mẫu chuẩn (mẫu đã flo hóa đủ cho đến khi về căn bản không có khác biệt bất kỳ nào quan sát thêm được ở phổ) thu được; sự hấp thụ của mỗi đỉnh được đọc; và số đầu tận cùng mang nhóm không được flo hóa và số đầu tận cùng mang nhóm $-CF_2H$ trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon được tính toán cho mỗi mẫu theo công thức sau. Số đầu tận cùng mang nhóm không được flo hóa và số đầu tận cùng mang nhóm $-CF_2H$ trong mỗi túi tế bào A đến M được thể hiện trong bảng 2.

Số đầu tận cùng mang nhóm không được flo hóa và đầu tận cùng mang nhóm $-CF_2H$ (trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon) = $l \cdot k / t$

l: sự hấp thụ

k: số tương quan (xem bảng 1)

t: độ dày mẫu (mm)

Bảng 1: Số sóng hấp thụ và số tương quan của mỗi nhóm đầu tận cùng nhóm không được flo hóa và đầu tận cùng mang nhóm $-CF_2H$

Nhóm đầu tận cùng	Số sóng hấp thụ (cm^{-1})	Số tương quan
-------------------	-------------------------------	---------------

COF	1884	405
COOH (tự do)	1813	455
COOH (liên kết)	1775 1790	455
COOCH ₃	1795	355
CONH ₂	3438	480
CH ₂ OH	3648	2325
CF ₂ H	3006	26485

Bảng 2: Số đầu tận cùng mang nhóm không được flo hóa và số đầu tận cùng mang nhóm -CF₂H của túi tế bào

			Trước khi sản xuất túi tế bào		Sau khi sản xuất túi tế bào	
	Túi tế bào	Nhựa flo	Số đầu tận cùng mang nhóm không được flo hóa	Số đầu tận cùng mang nhóm -CF ₂ H	Số đầu tận cùng mang nhóm không được flo hóa	Số đầu tận cùng mang nhóm -CF ₂ H
Mẫu ví dụ so sánh 1	A	FEP	0	486	15	507
Mẫu ví dụ so sánh 2	B	FEP	19	392	21	424
Mẫu ví dụ so sánh 3	C	FEP	30	230	43	256
Mẫu ví dụ 1	D	FEP	46	0	68	0
Mẫu ví dụ 2	E	FEP	0	0	13	0
Mẫu ví dụ 3	F	FEP	2	0	12	0
Mẫu ví dụ 4	G	FEP	0	0	7	0
Mẫu ví dụ so sánh 4	H	PFA	178	138	201	159
Mẫu ví dụ 5	I	PFA	0	0	25	0
Mẫu ví dụ 6	J	PFA	0	0	11	0

Mẫu ví dụ 7	K	PFA	0	0	29	0
Mẫu ví dụ so sánh 5	L	- (poly-etylen)	-	-	-	-
Mẫu ví dụ so sánh 6	M	- (polyvinyl chloride)	-	-	-	-

"Trước khi sản xuất túi tế bào" trong bảng có nghĩa là mẫu thu được bằng cách lăn viên nhựa flo được sử dụng để sản xuất túi tế bào.

"Sau khi sản xuất túi tế bào" trong bảng có nghĩa là mẫu thu được từ màng (được sản xuất bằng cách đúc nóng chảy từ viên) cấu tạo túi tế bào.

1-2 Đo khi có mặt/vắng mặt nhóm đầu tận cùng -CF₃

Màng nhựa tương ứng được làm nóng chảy ở 370°C và được sản xuất thành dải; và phổ của chúng bằng NMR ¹⁹F nhiệt độ cao được đo bằng cách sử dụng phổ kế cộng hưởng từ hạt nhân AVANCE 300WB (sản xuất bởi Bruker Corp.).

Các phổ khác nhau từ dải được sản xuất bằng cách làm nóng chảy nhựa mà có tỷ lệ bố cục giống như nhựa tương ứng và trong đó không thu được nhóm đầu tận cùng -CF₃ nào có mặt; khi đỉnh được quan sát ở $\delta = -82$ ppm, nhóm đầu tận cùng -CF₃ được dự đoán có mặt, và khi không quan sát được đỉnh ở $\delta = -82$ ppm, nhóm đầu tận cùng -CF₃ được dự đoán vắng mặt. Sự có mặt/vắng mặt của nhóm đầu tận cùng -CF₃ trong mỗi túi tế bào A đến M được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3: Sự có mặt/vắng mặt của nhóm đầu tận cùng -CF₃

	Túi tế bào	Nhựa flo	Đầu tận cùng - CF ₃
Mẫu ví dụ so sánh 1	A	FEP	vắng mặt
Mẫu ví dụ so sánh 2	B	FEP	vắng mặt
Mẫu ví dụ so sánh 3	C	FEP	vắng mặt
Mẫu ví dụ 1	D	FEP	có mặt
Mẫu ví dụ 2	E	FEP	có mặt
Mẫu ví dụ 3	F	FEP	có mặt
Mẫu ví dụ 4	G	FEP	có mặt
Mẫu ví dụ so sánh 4	H	PFA	vắng mặt

Mẫu ví dụ 5	I	PFA	có mặt
Mẫu ví dụ 6	J	PFA	có mặt
Mẫu ví dụ 7	K	PFA	có mặt
Mẫu ví dụ so sánh 5	L	- (polyetylen)	-
Mẫu ví dụ so sánh 6	M	- (polyvinyl chloride)	-

Ví dụ 2

2. Lưu trữ tế bào gốc trung mô thu được từ tủy xương của người (hMSCs) bằng cách sử dụng túi tế bào

Trong trường hợp tế bào được bảo quản bằng cách sử dụng túi tế bào theo ví dụ 1, nó được phân tích xem liệu sự bám dính tế bào có thể được ức chế để nhờ đó bảo quản tế bào ở trạng thái nổi.

2-1 Phương pháp

2-1-1 Điều chế chất lỏng bảo quản tế bào

Liều phun Lactec(R) chứa trehalosa 6,0% (khối lượng/thể tích) (sản xuất bởi Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.) và liều phun dextran L thấp phân tử (phun Lactec chứa dextran 10% (khối lượng/thể tích)) (sản xuất bởi Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.) được trộn theo tỷ lệ 1:1 để nhờ đó điều chế chất lỏng bảo quản tế bào.

2-1-2 Chuẩn bị tế bào động vật có vú

[1] 4×10^5 hMSCs (sản xuất bởi Lonza Ltd., PT-2501) được nuôi cấy khi có mặt môi trường nuôi cấy MSC (sản xuất bởi Lonza Ltd., PT-3001) trong bình 75cm² trong thiết bị ủ ở 37°C trong điều kiện CO₂ 5%, và được cấy chuyển trong hợp dòng khoảng 90% bằng phương pháp thông thường.

[2] Môi trường nuôi cấy cho hMSC đã cấy chuyển (tế bào được cấy chuyển ba lần, hợp dòng gần như 100%) được loại bỏ bằng thiết bị hút; và súc hMSC bằng 8 ml PBS (sản xuất bằng Invitrogen Corp.) với mỗi bình.

[3] PBS được loại bỏ bằng thiết bị hút; và bổ sung 3,75 ml trypsin-EDTA (sản xuất bởi Lonza Ltd., CC-3232) với mỗi bình vào dung dịch thu được và được phép để yên ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.

[4] Dung dịch thu được được lắc từ từ cho đến khi khoảng 90% hMSC bong ra dưới sự quan sát bằng kính hiển vi.

[5] Bổ sung 3,75 ml môi trường nuôi cấy MSC vào mỗi bình để dừng phản ứng trypsin; và hMSC được phục hồi bằng cách dùng pipet, và được chuyển vào ống ly tâm 50ml.

[6] Dung dịch thu được được cho ly tâm ở 600xg trong 5 phút ở 25°C.

[7] Chất bề mặt được loại bỏ bằng thiết bị hút; và bổ sung 3 ml chất lỏng bảo quản tế bào vào mỗi bình và viên hMSC (chất kết tủa) được tạo huyền phù.

[8] 10 μ L chất lỏng dạng huyền phù hMSC-BM được thu gom; đo số tế bào bằng cách sử dụng tấm đếm tế bào; và chất lỏng bảo quản tế bào được bổ sung sao cho số tế bào thành 5×10^5 tế bào/ml, và làm lạnh dung dịch thu được bằng đá.

2-1-3 Lưu trữ tế bào động vật có vú

[1] 3 ml chất lỏng bảo quản tế bào chứa hMSC gồm 5×10^5 tế bào/ml được gieo mầm trong mỗi loại trong 13 loại túi tế bào A đến M.

[2] Sau khi chất lỏng dạng huyền phù có tế bào được phép để yên và được bảo quản trong 6 giờ ở thiết bị ủ (25°C, 5%CO₂) (sản xuất bởi As One Co., Ltd., PIC100), một phần của chúng (20 μ L) được phục hồi, và được trộn với 20 μ L trypan xanh 0,4% (sản xuất bởi Gibco); nồng độ tế bào và số tế bào sống của chất lỏng dạng huyền phù có tế bào được đo dưới kính hiển vi (ECLIPSE TS100, sản xuất bởi Nikon Corp.) bằng cách sử dụng tấm đếm tế bào; và tỷ lệ thu hồi tế bào tương ứng (xem các bảng 4, 7 và 10) và tỷ lệ sống sót tế bào (xem các bảng 5, 8 và 11) được tính toán. Ngoài ra, một phần túi được cắt ra bằng kéo và đặt trên đĩa có 6 lỗ; và tế bào dính trên túi được quan sát dưới kính hiển vi (IX-70, sản xuất bởi Olympus Corp.). Trong bản mô tả này, mỗi kết quả trong bảng 4 đến bảng 6, bảng 7 đến bảng 9 và bảng 10 đến bảng 12 thu được bằng thử nghiệm độc lập (có thời gian chuẩn bị khác cho hMSC).

Bảng 4: Tỷ lệ thu hồi tế bào (%) 1 của hMSC

Túi tế bào	Ngay sau khi bắt đầu lưu trữ	Sau khi bảo quản 6 giờ
- (Pre)	100 $\pm$ 3	

Mẫu ví dụ so sánh 1	A	39 ± 1
Mẫu ví dụ so sánh 2	B	43 (n=1)
Mẫu ví dụ so sánh 3	C	34 ± 13
Mẫu ví dụ 1	D	50 ± 2
Mẫu ví dụ 3	F	69 ± 4**
Mẫu ví dụ 4	G	99 (n=1)
Mẫu ví dụ so sánh 4	H	40 ± 12
Mẫu ví dụ 6	J	70 ± 14**
Mẫu ví dụ 7	K	80 ± 8***
Mẫu ví dụ so sánh 5	L	38 ± 12
Mẫu ví dụ so sánh 6	M	36 ± 4

Tỷ lệ thu hồi tế bào (%) được thể hiện dưới dạng tỷ lệ của tổng số tế bào trong chất lỏng dạng huyền phù có tế bào sau khi bảo quản với tổng số tế bào trong chất lỏng dạng huyền phù ngay sau khi bắt đầu bảo quản (Pre) ([tổng số tế bào trong chất lỏng dạng huyền phù có tế bào sau khi bảo quản / tổng số tế bào trong chất lỏng dạng huyền phù ngay sau khi bắt đầu bảo quản (Pre) × 100]) (giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn, n = 3). Trong bản mô tả này, trong bảng, "***" và "****" thể hiện rằng có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê ($p < 0,01$ và $p < 0,001$, một cách tương ứng) từ túi tế bào L (mẫu ví dụ so sánh 5) bằng phương pháp Dunnett.

Bảng 5: Tỷ lệ sống sót tế bào (%) 1 của hMSC

	Túi tế bào	Ngay sau khi bắt đầu lưu trữ	Sau khi bảo quản 6 giờ
	- (Pre)	97 ± 2	
Mẫu ví dụ so sánh 1	A		89 ± 6
Mẫu ví dụ so sánh 2	B		87 (n=1)
Mẫu ví dụ so sánh 3	C		93 ± 3
Mẫu ví dụ 1	D		93 ± 3
Mẫu ví dụ 3	F		96 ± 0*
Mẫu ví dụ 4	G		93 (n=1)
Mẫu ví dụ so sánh 4	H		93 ± 1
Mẫu ví dụ 6	J		95 ± 1*

Mẫu ví dụ 7	K	$96 \pm 1^*$
Mẫu ví dụ so sánh 5	L	81 ± 14
Mẫu ví dụ so sánh 6	M	90 ± 7

Tỷ lệ sống sót tế bào (%) được thể hiện dưới dạng tỷ lệ của số tế bào sống với tổng số tế bào trong chất lỏng dạng huyền phù có tế bào ($[\text{số tế bào sống trong chất lỏng dạng huyền phù có tế bào} / \text{tổng số tế bào trong chất lỏng dạng huyền phù có tế bào} \times 100]$) (giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn, $n = 3$). Trong bản mô tả này, trong bảng, "*" thể hiện rằng có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê ($p < 0,05$) từ túi tế bào L (mẫu ví dụ so sánh 5) bằng phương pháp Dunnett.

Bảng 6: Tỷ lệ thu hồi 1 tế bào sống của hMSC

	Túi tế bào	Ngày sau khi bắt đầu lưu trữ	Sau khi bảo quản 6 giờ
	- (Pre)	97 ± 4	
Mẫu ví dụ so sánh 1	A		34 ± 2
Mẫu ví dụ so sánh 2	B		37 (n=1)
Mẫu ví dụ so sánh 3	C		31 ± 12
Mẫu ví dụ 1	D		46 ± 1
Mẫu ví dụ 3	F		$66 \pm 4^{**}$
Mẫu ví dụ 4	G		92 (n=1)
Mẫu ví dụ so sánh 4	H		37 ± 11
Mẫu ví dụ 6	J		$66 \pm 13^{**}$
Mẫu ví dụ 7	K		$77 \pm 8^{***}$
Mẫu ví dụ so sánh 5	L		31 ± 13
Mẫu ví dụ so sánh 6	M		32 ± 4

Tỷ lệ thu hồi tế bào sống được thể hiện dưới dạng giá trị của giá trị tỷ lệ thu hồi tế bào nhân với giá trị tỷ lệ sống sót tế bào (giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn, $n = 3$). Trong bản mô tả này, trong bảng, "***" và "****" thể hiện rằng có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê ($p < 0,01$ và $p < 0,001$, một cách tương ứng) từ túi tế bào L (mẫu ví dụ so sánh 5) bằng phương pháp Dunnett.

2-2 Kết quả

Tỷ lệ thu hồi hMSC sau khi lưu trữ, như được thể hiện trong bảng 4, trong trường hợp sử dụng túi tế bào A, B, C, H, L và M (mẫu ví dụ so sánh 1, 2, 3, 4, 5 và 6), một cách tương ứng là 39%, 43%, 34%, 40%, 38% và 36%, và ngược lại, trong trường hợp sử dụng túi tế bào D, F, G, J và K (mẫu ví dụ 1, 3, 4, 6 và 7), cao bằng 50%, 69%, 99%, 70% và 80%, một cách tương ứng.

Ngoài ra, tỷ lệ sống sót của hMSC sau khi lưu trữ, như được thể hiện trong bảng 5, trong trường hợp sử dụng túi tế bào D, F, G, J và K (mẫu ví dụ 1, 3, 4, 6 và 7), một cách tương ứng là 93%, 96%, 93%, 95% và 96%, và bất kỳ tỷ lệ nào cũng cao bằng 90% hoặc cao hơn.

Do đó, tỷ lệ thu hồi (tỷ lệ sống sót tế bào $\times$ tỷ lệ thu hồi tế bào) của hMSC sống sót sau khi lưu trữ, như được thể hiện trong bảng 6, trong trường hợp bảo quản trong túi tế bào D, F, G, J và K (mẫu ví dụ 1, 3, 4, 6 và 7) (một cách tương ứng là 46%, 66%, 92%, 66% và 77%) cao hơn trường hợp bảo quản trong túi tế bào A, B, C, H, L và M (mẫu ví dụ so sánh 1, 2, 3, 4, 5 và 6) (một cách tương ứng là 34%, 37%, 31%, 37%, 31% và 32%).

Bảng 7: Tỷ lệ thu hồi tế bào (%) 2 của hMSCs

	Túi tế bào	Ngay sau khi bắt đầu lưu trữ	Sau khi bảo quản 6 giờ
	- (Pre)	100 ± 4	
Mẫu ví dụ so sánh 2	B		30 ± 25
Mẫu ví dụ 4	G		$80 \pm 9^{***}$
Mẫu ví dụ so sánh 5	L		25 ± 6

Tỷ lệ thu hồi tế bào (%) được thể hiện dưới dạng tỷ lệ của tổng số tế bào trong chất lỏng dạng huyền phù có tế bào sau khi bảo quản với tổng số tế bào trong chất lỏng dạng huyền phù có tế bào ngay sau khi bắt đầu bảo quản (Pre) ($[\text{tổng số tế bào trong chất lỏng dạng huyền phù có tế bào sau khi bảo quản} / \text{tổng số tế bào trong chất lỏng dạng huyền phù có tế bào ngay sau khi bắt đầu bảo quản (Pre)} \times 100]$) (giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn, $n = 3$). Trong bản mô tả này, trong bảng, "***" thể hiện rằng có sự

khác biệt đáng kể về mặt thống kê ($p < 0,001$) từ túi tế bào L (mẫu ví dụ so sánh 5) bằng phương pháp Dunnett.

Bảng 8: Tỷ lệ sống sót tế bào (%) 2 của hMSC

	Túi tế bào	Ngày sau khi bắt đầu lưu trữ	Sau khi bảo quản 6 giờ
	- (Pre)	98 ± 1	
Mẫu ví dụ so sánh 2	B		88 ± 6
Mẫu ví dụ 4	G		95 ± 4
Mẫu ví dụ so sánh 5	L		86 ± 7

Tỷ lệ sống sót tế bào (%) được thể hiện dưới dạng tỷ lệ của số tế bào sống với tổng số tế bào trong chất lỏng dạng huyền phù có tế bào ([số tế bào sống trong chất lỏng dạng huyền phù có tế bào / tổng số tế bào trong chất lỏng dạng huyền phù có tế bào × 100]) (giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn, $n = 3$).

Bảng 9: Tỷ lệ thu hồi 2 tế bào sống của hMSC

	Túi tế bào	Ngày sau khi bắt đầu lưu trữ	Sau khi bảo quản 6 giờ
	- (Pre)	98 ± 4	
Mẫu ví dụ so sánh 2	B		27 ± 24
Mẫu ví dụ 4	G		76 ± 11***
Mẫu ví dụ so sánh 5	L		22 ± 7

Tỷ lệ thu hồi tế bào sống được thể hiện dưới dạng giá trị của giá trị tỷ lệ thu hồi tế bào nhân với giá trị tỷ lệ sống sót tế bào (giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn, $n = 3$). Trong bản mô tả này, trong bảng, "***" thể hiện rằng có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê ($p < 0,001$) từ túi tế bào L (mẫu ví dụ so sánh 5) bằng phương pháp Dunnett.

2-3 Kết quả

Tỷ lệ thu hồi hMSC sau khi lưu trữ, như được thể hiện trong bảng 7, trong trường hợp sử dụng túi tế bào B và L (mẫu ví dụ so sánh 2 và 5), 30% và 25%, một cách tương ứng, và ngược lại, trong trường hợp sử dụng túi tế bào G (mẫu ví dụ 4), cao bằng 80%.

Ngoài ra, tỷ lệ sống sót của hMSC sau khi lưu trữ, như được thể hiện trong bảng 8, trong trường hợp sử dụng túi tế bào G (mẫu ví dụ 4), cao bằng 95%.

Do đó, tỷ lệ thu hồi (tỷ lệ sống sót tế bào $\times$ tỷ lệ thu hồi tế bào) của hMSC sống sót sau khi lưu trữ, như được thể hiện trong bảng 9, trong trường hợp bảo quản trong túi tế bào G (mẫu ví dụ 4) (76%) cao hơn trong trường hợp (27% và 22%, một cách tương ứng) bảo quản trong túi tế bào B và L (mẫu ví dụ so sánh 2 và 5).

Bảng 10: Tỷ lệ thu hồi tế bào (%) 3 hMSC

	Túi tế bào	Ngay sau khi bắt đầu lưu trữ	Sau khi bảo quản 6 giờ
	- (Pre)	100 $\pm$ 10	
Mẫu ví dụ so sánh 2	B		49 $\pm$ 9
Mẫu ví dụ 2	E		83 $\pm$ 10*
Mẫu ví dụ 3	F		75 $\pm$ 11
Mẫu ví dụ 5	I		84 $\pm$ 9*
Mẫu ví dụ 7	K		67 $\pm$ 4

Tỷ lệ thu hồi tế bào (%) được thể hiện dưới dạng tỷ lệ của tổng số tế bào trong chất lỏng dạng huyền phù có tế bào sau khi bảo quản với tổng số tế bào trong chất lỏng dạng huyền phù có tế bào ngay sau khi bắt đầu bảo quản (Pre) ([tổng số tế bào trong chất lỏng dạng huyền phù có tế bào sau khi bảo quản / tổng số tế bào trong chất lỏng dạng huyền phù có tế bào ngay sau khi bắt đầu bảo quản (Pre) $\times$ 100]) (giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn, n = 3). Trong bản mô tả này, trong bảng, "*" thể hiện rằng có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê ($p < 0,05$) từ túi tế bào B (mẫu ví dụ so sánh 2) bằng phương pháp Dunnett.

Bảng 11: Tỷ lệ sống sót tế bào (%) 3 hMSC

	Túi tế bào	Ngay sau khi bắt đầu lưu trữ	Sau khi bảo quản 6 giờ
	- (Pre)	97 $\pm$ 1	
Mẫu ví dụ so sánh 2	B		92 $\pm$ 3
Mẫu ví dụ 2	E		93 $\pm$ 2
Mẫu ví dụ 3	F		93 $\pm$ 1
Mẫu ví dụ 5	I		91 $\pm$ 2

Mẫu ví dụ 7

K

 92 ± 1

Tỷ lệ sống sót tế bào (%) được thể hiện dưới dạng tỷ lệ của số tế bào sống với tổng số tế bào trong chất lỏng dạng huyền phù có tế bào ($[\text{số tế bào sống trong chất lỏng dạng huyền phù có tế bào} / \text{tổng số tế bào trong chất lỏng dạng huyền phù có tế bào} \times 100]$) (giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn, $n = 3$).

Bảng 12: Tỷ lệ thu hồi 3 tế bào sống của hMSC

	Túi tế bào	Ngay sau khi bắt đầu lưu trữ	Sau khi bảo quản 6 giờ
	- (Pre)	97 ± 9	
Mẫu ví dụ so sánh 2	B		45 ± 10
Mẫu ví dụ 2	E		$77 \pm 9^*$
Mẫu ví dụ 3	F		69 ± 11
Mẫu ví dụ 5	I		76 ± 7
Mẫu ví dụ 7	K		61 ± 5

Tỷ lệ thu hồi tế bào sống được thể hiện dưới dạng giá trị của giá trị tỷ lệ thu hồi tế bào nhân với giá trị tỷ lệ sống sót tế bào (giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn, $n = 3$). Trong bản mô tả này, trong bảng, "*" thể hiện rằng có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê ($p < 0,05$) từ túi tế bào B (mẫu ví dụ so sánh 2) bằng phương pháp Dunnett.

2-4 Kết quả

Tỷ lệ thu hồi hMSC sau khi lưu trữ, như được thể hiện trong bảng 10, trong trường hợp sử dụng túi tế bào B (mẫu ví dụ so sánh 2), 49%, và ngược lại, trong trường hợp sử dụng túi tế bào E, F, I và K (mẫu ví dụ 2, 3, 5 và 7), một cách tương ứng cao bằng 83%, 75%, 84% và 67%.

Ngoài ra, tỷ lệ sống sót của hMSC sau khi lưu trữ, như được thể hiện trong bảng 11, trong trường hợp sử dụng túi tế bào E, F, I và K (mẫu ví dụ 2, 3, 5 và 7), một cách tương ứng bằng 93%, 93%, 91% và 92%, và bất kỳ tỷ lệ nào cũng cao bằng 90% hoặc cao hơn.

Do đó, tỷ lệ thu hồi (tỷ lệ sống sót tế bào $\times$ tỷ lệ thu hồi tế bào) của hMSC sống sót sau khi lưu trữ, như được thể hiện trong bảng 12, trong trường hợp bảo quản trong

túi tế bào E, F, I và K (mẫu ví dụ 2, 3, 5 và 7) (77%, 69%, 76% và 61%, một cách tương ứng) cao hơn trong trường hợp bảo quản trong túi tế bào B (mẫu ví dụ so sánh 2) (45%).

Ngoài ra, hMSC sau khi bảo quản được dính trên bề mặt bên trong của túi tế bào A đến C, H, L và M (mẫu ví dụ so sánh 1 đến 3, 4, 5 và 6), và ngược lại, được ức chế trong việc kết dính trên bề mặt bên trong của túi tế bào D đến G và I đến K (mẫu ví dụ 1 đến 4 và 5 đến 7); và gần như không có hMSC được bám dính đặc biệt trên bề mặt bên trong của túi tế bào E đến G và I đến K (mẫu ví dụ 2 đến 4 và 5 đến 7).

Các kết quả này thể hiện rằng việc kết dính tế bào sống được ức chế đáng kể khi bảo quản tế bào trong túi tế bào D đến G và I đến K (mẫu ví dụ 1 đến 4 và 5 đến 7) hơn bảo quản tế bào trong túi tế bào A đến C, H, L và M (mẫu ví dụ so sánh 1 đến 3, 4, 5 và 6).

Ví dụ 3

3. Cây tế bào 10T1/2 thu được từ tế bào gốc trung mô của chuột bằng cách sử dụng túi tế bào

Trong trường hợp tế bào được nuôi cấy bằng cách sử dụng túi tế bào được tạo ra theo ví dụ 1, nó được phân tích xem liệu sự bám dính tế bào có thể được ức chế để nhờ đó nuôi cấy tế bào ở trạng thái nổi.

3-1 Phương pháp

[1] Các tế bào 10T1/2 thu được từ tế bào gốc trung mô của chuột được tạo huyền phù trong môi trường nuôi cấy DMEM (sản xuất bởi Nacalai Tesque, Inc., 08458-45) chứa FBS 10% (sản xuất bởi Life Technologies Corp., tiêu chuẩn Gibco) sao cho nồng độ tế bào thành $1,0 \times 10^5$ tế bào/ml; 3 ml chất lỏng dạng huyền phù được gieo mầm trong mỗi hai loại túi tế bào B (mẫu ví dụ so sánh 2) và túi tế bào G (mẫu ví dụ 4).

[2] Dung dịch thu được được nuôi cấy trong thiết bị ủ (37°C , CO_2 5%); một phần (10 μL) mỗi chất lỏng dạng huyền phù có tế bào được phục hồi sau 4 giờ, và 1, 2, 3 và 6 ngày, và được trộn với 10 μL trypan xanh 0,4% (sản xuất bởi Gibco); và số tế bào sống được đo bằng cách sử dụng tấm đếm tế bào và tỷ lệ sống sót tế bào được tính toán. Ngoài

ra, tế bào bám dính trên túi tế bào được quan sát dưới kính hiển vi quang học (sản xuất bởi Nikon Corp.).

3-2 Kết quả

Tỷ lệ sống sót của tế bào 10T1/2 sau khi cấy cao bằng 70% hoặc cao hơn cả ở trường hợp sử dụng túi tế bào G (mẫu ví dụ 4) và túi tế bào B (mẫu ví dụ so sánh 2). Ngược lại, tỷ lệ của tế bào 10T1/2 bám dính trên bề mặt bên trong túi sau khi cấy trong trường hợp sử dụng túi tế bào G thấp hơn trong trường hợp sử dụng túi tế bào B.

Kết quả này thể hiện rằng việc kết dính tế bào sống có thể được ức chế đáng kể khi cấy tế bào trong túi tế bào G (mẫu ví dụ 4) hơn khi cấy tế bào trong túi tế bào B (mẫu ví dụ so sánh 2).

Các kết quả của Ví dụ 1 đến 3 thể hiện rằng vì khi tế bào được dùng, được bảo quản hoặc được nuôi cấy bằng cách sử dụng túi tế bào D đến G và I đến K (mẫu ví dụ 1 đến 7), sự bám dính tế bào vào bề mặt bên trong vật chứa và sự giảm tỷ lệ sống sót tế bào có thể được ức chế hiệu quả, chất lỏng chứa tế bào có nồng độ cao và tỷ lệ tế bào sống cao có thể được dùng, được bảo quản hoặc tạo ra.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Theo sáng chế, chất lỏng chứa tế bào có nồng độ cao và tỷ lệ tế bào sống cao có thể được dùng, được bảo quản hoặc tạo ra, mà góp phần vào y học tái sinh sử dụng chất lỏng chứa tế bào động vật có vú (chất lỏng dạng huyền phù).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vật chứa để phân phối, bảo quản hoặc nuôi cấy tế bào động vật có vú, trong đó bề mặt của vật chứa tiếp xúc với tế bào động vật có vú được tạo thành từ nhựa flo có tổng số đầu tận cùng mang nhóm không được flo hóa và đầu tận cùng mang nhóm $-CF_2H$ trong nhựa flo bằng 70 hoặc ít hơn tính trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon, trong đó nhựa flo là ít nhất một nhựa flo được chọn từ copolyme gốc tetrafloetylen-hexaflopropylen và copolyme gốc tetrafloetylen-perfloalkylvinyl etc.
2. Vật chứa để phân phối, bảo quản hoặc nuôi cấy tế bào động vật có vú, trong đó bề mặt của vật chứa tiếp xúc với tế bào động vật có vú được tạo thành từ nhựa flo có một hoặc nhiều nhóm $-CF_3$ ở đầu tận cùng, trong đó nhựa flo là ít nhất một nhựa flo được chọn từ copolyme gốc tetrafloetylen-hexaflopropylen và copolyme gốc tetrafloetylen-perfloalkylvinyl etc.
3. Vật chứa để phân phối, bảo quản hoặc nuôi cấy tế bào động vật có vú theo điểm 2, trong đó bề mặt của vật chứa tiếp xúc với tế bào động vật có vú được tạo thành từ nhựa flo có số đầu tận cùng mang nhóm không được flo hóa bằng 70 hoặc ít hơn tính trên mỗi 1×10^6 nguyên tử cacbon.
4. Vật chứa để phân phối, bảo quản hoặc nuôi cấy tế bào động vật có vú theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó vật chứa này là túi.
5. Vật chứa để phân phối, bảo quản hoặc nuôi cấy tế bào động vật có vú theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó tế bào động vật có vú là tế bào bám dính.
6. Vật chứa để phân phối, bảo quản hoặc nuôi cấy tế bào động vật có vú theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó tế bào động vật có vú là tế bào gốc trung mô.