



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

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

(11)



1-0033654

(51)<sup>7</sup> C12N 5/0775

(13) B

(21) 1-2018-02977

(22) 10/07/2018

(30) 10-2017-0146906 06/11/2017 KR

(45) 25/10/2022 415

(43) 27/05/2019 374A

(73) SCM LIFESCIENCE CO., LTD. (KR)

310, 366, Seohae-daero, Jung-gu Incheon 22332, Republic of Korea

(72) SONG, Sun Uk (US); KIM, Si Na (KR); CHO, Yun Kyoung (KR); HAM, Dong Sik (KR).

(74) Công ty TNHH Trà và cộng sự (TRA & ASSOCIATES CO.,LTD)

(54) PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY PHÂN ĐOẠN THỨ CẤP TẾ BÀO GỐC

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp tế bào gốc và phương pháp tăng sinh tế bào gốc đơn dòng thu được theo phương pháp này. Theo phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp tế bào gốc và sự tăng sinh của chúng theo các phương án thực hiện của sáng chế, phương pháp có ưu điểm là các tế bào gốc đơn dòng có thể thu được một cách nhanh mà không lây nhiễm, và các tế bào gốc đơn dòng mong muốn có thể thu được nhiều trong thời gian ngắn thông qua sự tăng sinh nhanh, theo cách đó được sử dụng để điều chế tác nhân điều trị tế bào gốc.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp tế bào gốc và phương pháp tăng sinh tế bào gốc đơn dòng thu được khi sử dụng phương pháp này.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Các tế bào gốc có tiềm năng phát triển thành các mô của tất cả 210 cơ quan trong cơ thể của chúng ta, các cơ quan này có thể được phân chia nhiều và có thể được phân lập thành các cơ quan mong muốn bởi thao tác thích hợp. Tế bào gốc là các tác nhân điều trị mới nổi do các đặc tính này. Hơn nữa, người ta kỳ vọng rằng các tế bào gốc được sử dụng vì khả năng cao về điều trị các bệnh khó chữa, theo cách đó chữa các bệnh khác nhau như bệnh bạch cầu, bệnh loãng xương, bệnh viêm gan, bệnh Parkinson, bệnh sa sút trí nhớ và bồng.

Tuy nhiên, tế bào gốc vẫn có nhiều nhược điểm vì khó thu được tế bào gốc giống nhau ở quy mô lớn. Mặc dù phương pháp thu tế bào gốc từ các tế bào phôi thai đông lạnh có thể hiệu quả, nhưng vẫn còn nhiều tranh luận về mặt đạo đức. Để khắc phục các nhược điểm này, nhiều nghiên cứu đã được tiến hành để thu được các tế bào gốc sử dụng chuyển nhân tế bào soma hoặc tế bào gốc của người trưởng thành. Các nghiên cứu về tế bào gốc trưởng thành được tiến hành tích cực hơn so với các nghiên cứu về tế bào gốc phôi thai. Các tế bào gốc trưởng thành có trong các cơ quan khác nhau như hệ thống thần kinh trung ương và tủy xương để tham gia vào sự phát triển của cơ quan trong giai đoạn phát triển và sự tái tạo tổn thương. Vì vậy, có thể thu được các tế bào gốc trưởng thành ở các vị trí khác nhau như tủy xương, lá lách và các tế bào mỡ. Tuy nhiên, tủy xương là nguồn phổ biến nhất. Trong khi đó, khó để thu được các tế bào có hình đồng nhất ở mọi thời điểm trong khi các tế bào gốc trung mô trong số nhiều loại tế bào tủy xương được phân lập và nuôi cấy. Vì vậy, các nghiên cứu được tiến hành để giải quyết những vấn đề này.

Phương pháp tách của Friedenstein và Cộng sự vẫn được sử dụng rộng rãi, đây là một phương pháp trong đó chỉ các tế bào đơn nhân được phân lập ở giai đoạn chia ban đầu sử dụng phương pháp gọi là Ficoll-paque và gắn vào một bình nuôi cấy. Tuy nhiên, những phương pháp này khiến cho các đặc tính tế bào không đều và không tạo

ra nhóm tế bào đơn vì tế bào gốc trung mô có mặt cùng với các tế bào đơn nhân khác. Do vậy, một vài nghiên cứu đã được đưa ra để thu được thêm các tế bào giống nhau. Phương pháp của Luria và cộng sự phân lập tất cả các tế bào gắn vào đáy của bình nuôi cấy nhưng có nhược điểm là có thể phân lập các tế bào gốc khác chứ không phải là các tế bào gốc trung mô (Luria *et al.*, Transfusion, 11: 345-349, 1971). Phương pháp của Simmons và cộng sự đã sử dụng một kháng thể sử dụng một kháng thể cụ thể chống lại Sca-1 và STRO-1 trong số các kháng nguyên bề mặt tế bào trung mô, vì vậy luôn có nhược điểm là chi phí cao và vấn đề lây nhiễm (Simmon *et al.*, Blood, 78: 55-62, 2002). Phương pháp của Hung và cộng sự là phương pháp tách tế bào gốc trung mô sử dụng sự khác nhau về kích thước tế bào, phương pháp này cũng có nhược điểm là sự thuần khiết của các tế bào gốc trung mô không ổn định và các tế bào gốc khác có thể được trộn (Hung *et al.*, Stem Cells, 20: 249-258, 2002).

Để khắc phục được các nhược điểm trên đây, các tác giả sáng chế đã tạo ra phương pháp phân lập tế bào gốc được gọi là “Phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp”. Các tác giả sáng chế đã nộp đơn xin cấp bằng sáng chế cho phương pháp theo Đơn Sáng chế Hàn Quốc số 10-2006-0075676 và đơn sáng chế này đã được cấp Patent. Phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp có thể được tiến hành với chi phí thấp hơn so với các phương pháp khác. Ngoài ra, có vấn đề lây nhiễm, và có thể thu được tế bào gốc trung mô đơn dòng (MSC) một cách hiệu quả mà không có khả năng kết hợp với các tế bào gốc khác. Vì vậy, phương pháp này có một ưu điểm tuyệt vời so với các phương pháp khác là thu được các tế bào gốc.

Các tác giả sáng chế đã thiết kế phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp (SCM) mới thu được MCS đơn dòng có nguồn gốc tế bào đơn từ tế bào của chuột và người, phương pháp này không cần sự phân hủy ly tâm hoặc enzym. Nguyên tắc của phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp bao gồm việc phân lập MSC dựa vào mật độ tế bào và việc gắn tẩm nuôi cấy.

Tuy nhiên, mặc dù phương pháp có ưu điểm nhưng phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp có hạn chế trong đó khó để thu được một cách nhanh chóng nhóm tế bào gốc trung mô đơn dòng. Đó là vì để sản xuất hàng loạt MSC đơn dòng được sử dụng như sản phẩm cuối cùng, phương pháp này đòi hỏi tạo ra một ngân hàng tế bào hoạt động được sử dụng để thực hiện quy trình thu được sản phẩm cuối cùng, theo cách đó thu được một lượng đủ các tế bào gốc trung mô đơn dòng và cần nuôi cấy với cấy

truyền 10 đến cây truyền 12.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Sáng chế đã được thực hiện với nỗ lực để cải thiện phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp để tạo ra sự tăng sinh nhanh của tế bào gốc đơn dòng. Do vậy, các tác giả sáng chế đã tìm ra rằng mật độ nuôi cấy các tế bào gốc đơn dòng được giảm xuống, và môi trường nuôi cấy được bổ sung chất chống oxy hóa, theo cách đó tạo ra một sự tăng hiệu quả tốc độ tăng sinh tế bào. Các tác giả sáng chế đã hoàn thành sáng chế này.

Do vậy, mục đích của sáng chế là đề xuất một phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp và phương pháp tăng sinh tế bào gốc, phương pháp này cải thiện phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp truyền thống trong lĩnh vực kỹ thuật đã biết.

Phương án thực hiện của sáng chế đề xuất một phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp tế bào gốc và sự tăng sinh của tế bào gốc, phương pháp bao gồm bước 1) nuôi cấy tủy xương được phân lập từ một cá thể; 2) chỉ chuyển phần dịch nổi ở bước 1) vào bình chứa mới và nuôi cấy phần dịch nổi; 3) chỉ tách phần dịch nổi ở bước 2), nuôi cấy phần dịch nổi trong bình nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 1 đến 3 giờ, lặp lại việc nuôi cấy phần dịch nổi ở nhiệt độ 37°C trong thời gian từ 12 đến 36 giờ từ 2 đến 3 lần, sau đó nuôi cấy phần dịch nổi ở nhiệt độ 37°C trong thời gian từ 24 đến 72 giờ, trong đó mỗi phần dịch nổi được chuyển vào một bình nuôi cấy mới để lặp lại việc nuôi cấy; 4) thu được tế bào gốc đơn dòng trong bình nuôi cấy cuối cùng; và 5) cấy tế bào gốc đơn dòng trong môi trường nuôi cấy ở mật độ tế bào trong khoảng từ 50 đến 1000 tế bào/ cm<sup>2</sup> để nuôi cấy tế bào.

Theo phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp tế bào gốc và sự tăng sinh của chúng theo phương án thực hiện theo sáng chế, phương pháp này có ưu điểm là tế bào gốc đơn dòng có thể được thu một cách nhanh mà không lây nhiễm, và một lượng lớn tế bào gốc đơn dòng mong muốn có thể thu được trong một thời gian ngắn thông qua sự tăng sinh nhanh, theo cách đó được sử dụng để điều chế các tác nhân điều trị tế bào gốc.

Phân tóm tắt trên đây chỉ nhằm minh họa và không nhằm giới hạn theo bất kỳ cách nào. Ngoài các khía cạnh minh họa, các phương án thực hiện và các đặc trưng được mô tả trên đây, các khía cạnh, phương án thực hiện và đặc tính khác sẽ trở lên rõ ràng cùng với việc tham chiếu đến các hình vẽ và phần mô tả chi tiết sau đây.

### Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ minh họa phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp để phân lập tế bào gốc trung tâm từ mô xương của con người.

Fig.2 minh họa kết quả thu được bằng kính hiển vi đối với các thay đổi hình thái của tế bào gốc trung mô theo mật độ nuôi cấy tế bào và dòng nuôi cấy tế bào;

Fig.3A minh họa kết quả phân tích FACS về kích thước tế bào và độ kết hạt của các tế bào gốc trung mô trong các phương tiện SSC theo mật độ nuôi cấy tế bào và lần cấy truyền tế bào (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  và \*\*\* $p < 0,005$ );

Fig.3B minh họa kết quả phân tích FACS về kích thước tế bào và độ kết hạt của tế bào gốc trung mô trong phương tiện SSC theo mật độ nuôi cấy tế bào và lần cấy truyền tế bào (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  và \*\*\* $p < 0,005$ );

Fig.4 minh họa kết quả xác nhận liệu các tế bào có bị lão hóa hay không sau khi nhuộm các tế bào gốc trung mô bằng cách nhuộm beta-gal không trong đó mật độ nuôi cấy tế bào và lần cấy truyền tế bào thay đổi;

Fig.5 minh họa các kết quả RT-PCR của P15 và P16 là các gen liên quan đến tuổi và PCNA là chỉ điểm tăng sinh thu được sau khi nuôi cấy tế bào gốc trung mô của lần cấy truyền 15 trong khi mật độ nuôi cấy tế bào thay đổi.

Fig.6 minh họa kết quả xác nhận khả năng tăng sinh của tế bào gốc trung mô qua thời gian nhân đôi quần thể (PDT) và mức nhân đôi quần thể (PDK) theo mật độ nuôi cấy tế bào và lần cấy truyền tế bào (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  và \*\*\* $p < 0,005$ );

Fig.7 minh họa các kết quả xác nhận khả năng biệt hóa của tế bào gốc trung mô theo mật độ nuôi cấy tế bào và lần cấy truyền tế bào (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  và \*\*\* $p < 0,005$ );

Fig.7A minh họa kết quả xác nhận khả năng biệt hóa của tế bào gốc trung mô thành tế bào mỡ qua nhuộm mô học Oil red O theo mật độ nuôi cấy tế bào và lần cấy truyền tế bào;

Fig.7B là hình vẽ minh họa minh họa các kết quả định lượng mức nhuộm mô học được mô tả trên Fig.7A;

Fig.7C minh họa kết quả xác nhận khả năng biệt hóa tế bào gốc trung mô thành

các tế bào tạo xương qua việc nhuộm mô học Alizarin red S theo mật độ nuôi cấy tế bào và lần cấy truyền tế bào;

Fig.7D là hình vẽ minh họa kết quả định lượng mức độ nhuộm mô học đã mô tả trên Fig.7C;

Fig.8A là hình vẽ minh họa tổng lượng ROS của tế bào gốc trung mô theo mật độ nuôi cấy tế bào và lần cấy truyền tế bào;

Fig.8B là hình vẽ minh họa kết quả thử nghiệm sao chổi về tổn thương gây ra bởi tổng sản lượng ROS theo mật độ nuôi cấy tế bào và lần cấy truyền tế bào (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  và \*\*\* $p < 0,005$ );

Fig.9 là hình vẽ minh họa kết quả đo nồng độ 8-OHdG (8-hydroxy-deoxyguanosin) để xác nhận mức độ tổn thương ADN bởi ROS được sản sinh theo mật độ nuôi cấy tế bào và lần cấy truyền tế bào (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  và \*\*\* $p < 0,005$ );

Fig.10 minh họa các kết quả xác nhận các thay đổi về khả năng tăng sinh của tế bào thu được bằng cách nuôi cấy tế bào gốc trung mô của lần cấy truyền từ 11 đến 15 ở điều kiện chỉ mật độ cao (HD) và mật độ cao + axit ascorbic (HD + AA);

Fig.11 minh họa các kết quả so sánh các mức độ ROS được sản sinh bằng cách nuôi cấy tế bào gốc trung mô của lần cấy truyền từ 11 đến 15 ở điều kiện chỉ mật độ cao (HD) và mật độ cao + axit ascorbic (HD + AA) (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  và \*\*\* $p < 0,005$ );

Fig.12 là sơ đồ dưới dạng giản đồ minh họa một thí nghiệm để cải thiện phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp.

Fig.13 minh họa các kết quả xác nhận tốc độ tăng sinh của tế bào trong đó các tế bào gốc trung mô đơn dòng SCM01 thu được bằng phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp được cấy ở mật độ 1000 hoặc 4000 tế bào/cm<sup>2</sup>, và các tế bào được nuôi cấy sử dụng môi trường nuôi cấy LG-DMEM và  $\alpha$ -MEM có hoặc không có chất chống oxy hóa.

Fig.13A minh họa các thay đổi về số lượng tế bào theo lần cấy truyền 1 (P1) đến lần cấy truyền 5 (P5) của mỗi nhóm thí nghiệm;

Fig.13B minh họa các kết quả PDT và PDL của mỗi nhóm thí nghiệm;

Fig.14 minh họa các kết quả của việc xác nhận tốc độ tăng sinh tế bào trong đó các tế bào gốc trung mô đơn dòng SCM02 thu được bởi phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp được cấy ở mật độ 1000 hoặc 4000 tế bào/cm<sup>2</sup>, và các tế bào được nuôi cấy sử dụng môi trường nuôi cấy LG-DMEM và  $\alpha$ -MEM có hoặc không có chất chống oxy hóa;

Fig.14A minh họa sự thay đổi về số lượng tế bào theo lần cấy truyền 1(P1) đến lần cấy truyền 5 (P5) của mỗi nhóm thí nghiệm;

Fig.14B minh họa kết quả PDT và PDL trong mỗi nhóm thí nghiệm;

Fig.15 minh họa kết quả xác nhận tốc độ tăng sinh tế bào trong đó tế bào gốc trung mô đơn dòng SCM03 thu được bởi phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp được cấy ở mật độ 1000 hoặc 4000 tế bào /cm<sup>2</sup>, và tế bào được nuôi cấy sử dụng môi trường nuôi cấy LG-DMEM và  $\alpha$ -MEM có hoặc không có chất chống oxy hóa;

Fig.15A minh họa sự thay đổi về số lượng tế bào theo lần cấy truyền 1 (P1) đến lần cấy truyền 5 (P5) của mỗi nhóm thí nghiệm.

Fig.15B minh họa kết quả PDT và PDL của mỗi nhóm thí nghiệm;

Fig.16 minh họa các kết quả xác nhận tốc độ tăng sinh tế bào trong đó tế bào gốc trung mô đơn dòng SCM04 thu được bởi phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp được cấy ở mật độ 1000 hoặc 4000 tế bào/ cm<sup>2</sup>, và các tế bào được nuôi cấy sử dụng môi trường nuôi cấy LG-DMEM và  $\alpha$ -MEM có hoặc không có chất chống oxy hóa;

Fig.16A minh họa sự thay đổi về số lượng tế bào theo lần cấy truyền 1 (P1) đến lần cấy truyền 5 (P5) của mỗi nhóm thí nghiệm;

Fig.16B minh họa các kết quả PDT và PDL của mỗi nhóm thí nghiệm;

Fig.17 minh họa kết quả xác nhận tốc độ tăng sinh của tế bào trong đó tế bào gốc trung mô đơn dòng SCM05 thu được theo phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp được cấy ở mật độ 1000 hoặc 4000 tế bào/cm<sup>2</sup>, các tế bào được nuôi cấy sử dụng môi trường nuôi cấy LG-DMEM và  $\alpha$ -MEM có hoặc không có chất chống oxy hóa;

Fig.17A minh họa sự thay đổi về số lượng tế bào theo lần cấy truyền 1 (P1) đến lần cấy truyền 5 (P5) của mỗi nhóm thí nghiệm;

Fig.17B minh họa kết quả PDT và PDL của mỗi nhóm thí nghiệm;

Fig.18 minh họa kết quả xác nhận tốc độ tăng sinh tế bào trong đó tế bào gốc trung mô đơn dòng SCM06 thu được bằng phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp được cấy ở mật độ 1000 hoặc 4000 tế bào/cm<sup>2</sup>, và các tế bào được nuôi cấy sử dụng môi trường nuôi cấy LG-DMEM và  $\alpha$ -MEM có hoặc không có chất chống oxy hóa;

Fig.18A minh họa sự thay đổi về số lượng tế bào theo lần cấy truyền 1 (P1) đến lần cấy truyền 5 (P5) của mỗi nhóm thí nghiệm;

Fig.18B minh họa kết quả PDT và PDL của mỗi nhóm thí nghiệm;

Fig.19 minh họa kết quả xác nhận tốc độ tăng sinh tế bào trong đó tế bào gốc trung mô đơn dòng SCM07 thu được bằng phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp được cấy ở mật độ 1000 hoặc 4000/cm<sup>2</sup>, và các tế bào được nuôi cấy sử dụng môi trường nuôi cấy LG-DMEM và  $\alpha$ -MEM có hoặc không có chất chống oxy hóa;

Fig.19A minh họa sự thay đổi về số lượng tế bào theo lần cấy truyền 1 (P1) đến lần cấy truyền 5 (P5) của mỗi nhóm thí nghiệm;

Fig.19B minh họa các kết quả PDT và PDL của mỗi nhóm thí nghiệm;

Fig.20 minh họa kết quả xác nhận tốc độ tăng sinh tế bào trong đó tế bào gốc trung mô đơn dòng SCM08 thu được bằng phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp được cấy ở mật độ 1000 hoặc 4000 tế bào/cm<sup>2</sup>, và các tế bào được nuôi cấy sử dụng môi trường nuôi cấy LG-DMEM và  $\alpha$ -MEM có hoặc không có chất chống oxy hóa;

Fig.20A minh họa sự thay đổi về số lượng tế bào theo lần cấy truyền 1 (P1) đến lần cấy truyền 5 (P5) của mỗi nhóm thí nghiệm;

Fig.20B minh họa kết quả PDT và PDL của mỗi nhóm thí nghiệm;

Fig.21 minh họa kết quả xác nhận tốc độ tăng sinh tế bào của mỗi nhóm thí nghiệm trong đó sử dụng LG-DMEM không có chất chống oxy hóa, và mật độ tế bào thay đổi ở mật độ 1000 hoặc 4000 tế bào/cm<sup>2</sup>;

Fig.22 minh họa kết quả xác nhận PDT và PDL của mỗi nhóm thí nghiệm trong đó sử dụng LG-DMEM không có chất chống oxy hóa, và mật độ tế bào thay đổi ở mật độ 1000 hoặc 4000 tế bào/cm<sup>2</sup>;

Fig.23 minh họa các kết quả xác nhận tốc độ tăng sinh tế bào của mỗi nhóm thí nghiệm trong đó sử dụng  $\alpha$ -MEM có chất chống oxy hóa, và mật độ tế bào thay đổi ở



mật độ 1000 hoặc 4000 tế bào/cm<sup>2</sup>;

Fig.24 minh họa các kết quả xác nhận PDT và PDL của mỗi nhóm thí nghiệm trong đó  $\alpha$ -MEM có chất chống oxy hóa được sử dụng, và mật độ tế bào thay đổi ở mật độ 1000 hoặc 4000 tế bào /cm<sup>2</sup>;

Fig.25 minh họa kết quả xác nhận tốc độ tăng sinh tế bào của mỗi nhóm thí nghiệm trong đó mật độ tế bào được cố định ở mật độ 1000 tế bào/cm<sup>2</sup>, và môi trường nuôi cấy là LG-DMEM hoặc  $\alpha$ -MEM; và

Fig.26 minh họa kết quả xác nhận PDT và PDL trong một nhóm thí nghiệm trong đó mật độ tế bào được cố định ở mật độ 1000 tế bào/cm<sup>2</sup>, và môi trường nuôi cấy là LG-DMEM hoặc  $\alpha$ -MEM.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Trong phần mô tả chi tiết dưới đây, việc tham chiếu được thực hiện đến các hình vẽ kèm theo, hình vẽ tạo thành một phần của phần mô tả. Các phương án thực hiện minh họa mô tả trong phần mô tả chi tiết, hình vẽ và yêu cầu bảo hộ không nhằm giới hạn. Các phương án thực hiện khác có thể được sử dụng, và các thay đổi khác có thể được thực hiện mà không tách rời khỏi tình thần và phạm vi của đối tượng nêu ra trong tài liệu này.

Sáng chế đề xuất phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp của tế bào gốc trung mô và sự tăng sinh của chúng.

Phương pháp theo sáng chế cải thiện các phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp truyền thống, phương pháp này có ưu điểm là các tế bào gốc đơn dòng, tốt hơn là các tế bào gốc trung mô đơn dòng, có thể được thu một cách nhanh chóng mà không lây nhiễm, và một lượng lớn tế bào gốc đơn dòng mong muốn có thể thu được trong thời gian ngắn qua sự tăng sinh nhanh tế bào gốc đơn dòng, tốt hơn là tế bào gốc trung mô đơn dòng.

Dưới đây, sáng chế được mô tả chi tiết.

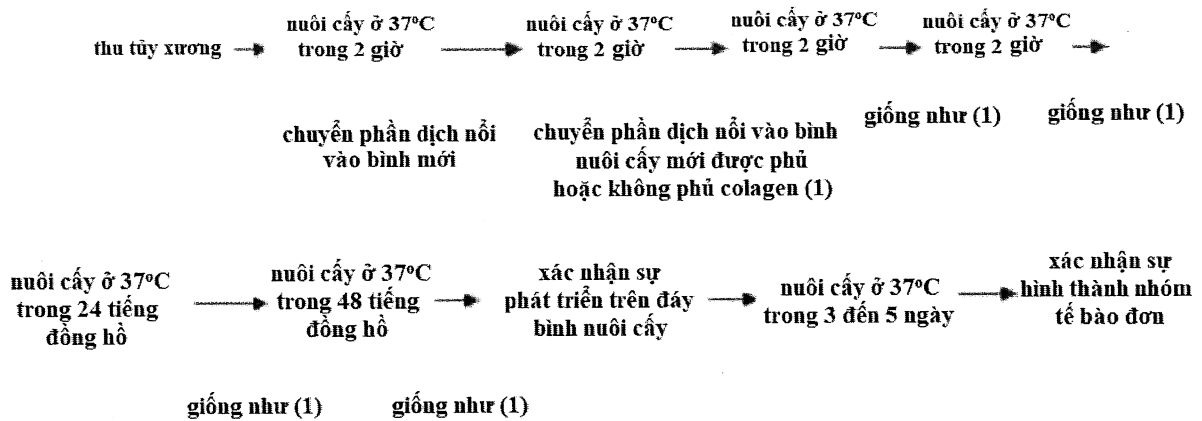
Sáng chế đề xuất một phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp tế bào gốc và sự tăng sinh tế bào gốc, phương pháp bao gồm: bước 1) nuôi cấy tủy xương được phân lập từ một cá thể; 2) chỉ chuyển phần dịch nổi ở bước 1) vào bình chứa mới và nuôi cấy phần dịch nổi; 3) chỉ tách phần dịch nổi ở bước 2), nuôi cấy phần dịch nổi trong

một bình nuôi cấy ở 37°C trong thời gian từ 1 đến 3 giờ, lặp lại việc nuôi cấy phần dịch nổi ở nhiệt độ 37°C trong thời gian từ 12 đến 36 giờ từ 2 đến 3 lần, sau đó nuôi cấy phần dịch nổi ở nhiệt độ 37°C trong thời gian từ 24 đến 72 giờ, trong đó mỗi phần dịch nổi được chuyển vào bình nuôi cấy mới để lặp lại việc nuôi cấy; 4) thu được tế bào gốc đơn dòng trong bình chứa cuối cùng; và 5) cấy tế bào gốc đơn dòng trong môi trường nuôi cấy ở mật độ tế bào trong khoảng từ 50 đến 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> để nuôi cấy tế bào.

Các bước 1) đến 3) có thể được thực hiện theo cùng phương pháp như phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp được mô tả trong Đơn sáng chế Hàn Quốc số 10-2006-0075676, và Đơn Sáng chế Hàn Quốc số 10-2006-0075676 có thể được đưa vào tài liệu này bằng cách tham khảo.

Thuật ngữ “Phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp” được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến phương pháp phân lập tế bào gốc theo trọng lượng riêng, cho thấy một quy trình, trong đó đầu tiên, tùy xương của người được tách và nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy tế bào, sau đó, chỉ thu phần dịch nổi, chuyển vào bình nuôi cấy có hoặc không xử lý bằng chất phủ, và được nuôi cấy, và sau đó các quy trình như được mô tả trên đây được lặp lại vài lần. Phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp như vậy đặc trưng ở chỗ việc thu và nuôi cấy phần dịch nổi theo cách lặp lại mà không cần ly tâm. Ưu điểm là các tế bào gốc đơn dòng, tốt hơn là các tế bào gốc trung mô đơn dòng cuối cùng có thể thu được mà không làm lây nhiễm các tế bào.

Việc nuôi cấy trong các bước 2) và 3) được thực hiện ở nhiệt độ 37°C trong 4 giờ hoặc ngắn hơn, tốt hơn là trong thời gian từ 1 đến 3 giờ, tốt hơn nữa là từ 1 giờ 30 phút đến 2 giờ 30 phút. Việc nuôi cấy lặp lại được thực hiện ở nhiệt độ 37°C trong 4 giờ hoặc ngắn hơn (tốt hơn là trong thời gian từ 1 đến 3 giờ, tốt hơn nữa là từ 1 giờ 30 phút đến 2 giờ 30 phút) sau đó được thực hiện ở 37°C trong thời gian từ 12 đến 36 giờ (tốt hơn là từ 18 đến 30 giờ) được lặp lại 2 hoặc 3 lần. Việc nuôi cấy tiếp theo được thực hiện ở 37°C trong thời gian từ 24 đến 72 giờ (tốt hơn là 36 đến 60 giờ). Mỗi phần dịch nổi có thể được chuyển vào bình nuôi cấy mới để thực hiện thí nghiệm tiếp theo. Theo một phương án thực hiện của sáng chế, tóm tắt ngắn gọn về phương pháp phân lập như sau.



Các tế bào nuôi cấy được tạo thành các nhóm tế bào đơn dòng. Các nhóm tế bào đơn dòng này có thể được phân lập và nuôi cấy thêm. Sáng chế bao gồm bước 5) nuôi cấy để thu được tế bào gốc đơn dòng với số lượng lớn một cách nhanh chóng, các tế bào gốc đơn dòng này có thể thu được qua phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp.

Bước 5) là quy trình cấy tế bào gốc đơn dòng vào môi trường nuôi cấy ở mật độ tế bào 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> hoặc thấp hơn, tốt hơn là trong khoảng từ 50 đến 1000 tế bào/cm<sup>2</sup>.

Tốt hơn, việc nuôi cấy có thể từ lần cấy truyền 1 đến lần cấy truyền 5. Sáng chế có thể tạo ra sự tăng sinh nhanh của các tế bào gốc đơn dòng sao cho có thể thu được sản phẩm cuối cùng một cách nhanh chóng. Hơn nữa, một ngân hàng tế bào chính (MCB) có thể được chuẩn bị qua việc nuôi cấy từ lần cấy truyền 1 đến lần cấy truyền 5.

Khi mật độ các tế bào gốc đơn dòng của sáng chế vượt quá 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> sao cho các tế bào gốc đơn dòng được nuôi cấy ở mật độ cao 4000 tế bào/cm<sup>2</sup> như trong phương pháp truyền thống, khả năng tăng sinh tế bào có thể được giảm rõ rệt, các chỉ điểm của tế bào gốc trung mô có thể được thay đổi, và khả năng biệt hóa có thể được loại bỏ. Vì vậy, tế bào gốc đơn dòng thu được qua phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp có thể được nuôi cấy ở mật độ thấp hoặc mật độ trung bình, đó là mật độ tế bào 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> hoặc thấp hơn, tốt hơn là ở mật độ tế bào trong khoảng từ 50 đến 1000 tế bào/cm<sup>2</sup>, tốt hơn nữa là ở mật độ 1000 tế bào/cm<sup>2</sup>.

Khi tế bào gốc trung mô đơn dòng được nuôi cấy ở mật độ tế bào 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> hoặc thấp hơn, khả năng tăng sinh tế bào là cao rõ rệt giai đoạn nuôi cấy kéo

dài so với tế bào gốc trung mô được nuôi cấy ở mật độ cao 4000 tế bào/cm<sup>2</sup>. Vì vậy, phương pháp mang lại một ưu điểm là lượng lớn tế bào gốc đơn dòng mong muốn có thể thu được nhanh mà không lặp lại số lượng lớn các dòng. Ngoài ra, khi tế bào gốc trung mô đơn dòng được nuôi cấy ở mật độ tế bào đã đề cập trên đây, tế bào có ưu điểm là ADN của chúng có thể ít bị tổn thương, và các tế bào cũng ít bị lão hóa, theo cách đó duy trì một cách hiệu quả khả năng biệt hóa của tế bào gốc. Vì vậy, tế bào gốc trung mô đơn dòng có thể được thu một cách nhanh chóng để có các đặc tính tế bào gốc tuyệt vời.

Môi trường được sử dụng theo sáng chế có thể bao gồm một môi trường không có chất chống oxy hóa, một môi trường được bổ sung chất chống oxy hóa, hoặc một môi trường có chất chống oxy hóa.

Môi trường không có chất chống oxy hóa có thể, nhưng không giới hạn ở, bao gồm DMEM. Nếu cần, chất chống oxy hóa có thể được bổ sung thêm vào môi trường để thực hiện nuôi cấy. Nếu cần,  $\alpha$ -MEM chứa chất chống oxy hóa có thể được sử dụng để thực hiện việc nuôi cấy.

Chất chống oxy hóa theo sáng chế có thể bao gồm, mà không giới hạn, các chất chống oxy hóa có thể được sử dụng trong nuôi cấy tế bào. Các chất chống oxy hóa có thể bao gồm một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm glutathion, xystein, xysteamin, ubiquinol, beta-mercaptoetanol và axit ascorbic. Khi môi trường được bổ sung chất chống oxy hóa, chất chống oxy hóa có thể được thêm vào với nồng độ trong khoảng từ 10 đến 50  $\mu$ g/ml, tốt hơn là trong khoảng từ 10 đến 30  $\mu$ g/ml, và tốt hơn nữa là 25  $\mu$ g/ml.

Trong một phương án thực hiện của sáng chế, DMEM, tốt hơn là LG-DMEM, được sử dụng như một môi trường mà không có chất chống oxy hóa, và  $\alpha$ -MEM được sử dụng như một môi trường chứa axit ascorbic làm chất chống oxy hóa.

Trong khi đó, theo phương pháp của sáng chế, tế bào gốc đơn dòng có thể được tăng sinh rất hiệu quả, theo cách đó không bao gồm một quy trình tạo ra ngân hàng tế bào hoạt động (WCB) sử dụng MCB. Điều này dẫn đến phương pháp đơn giản hơn so với phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp truyền thống trong đó WCB nên được tạo ra sau khi MCB được tạo ra.

Việc nuôi cấy ở bước 5) theo sáng chế có thể đặc trưng ở chỗ nuôi cấy ở mật độ tế bào 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> hoặc thấp hơn trong lần cấy truyền 1 đến lần cấy truyền 5. Tốt hơn, các tế bào gốc đơn dòng được cấy và nuôi cấy trong môi trường ở mật độ tế bào trong khoảng từ 50 đến 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> trong lần cấy truyền 1. Sau khi các tế bào được tăng sinh, các tế bào gốc đơn dòng được cấy và nuôi cấy trong môi trường ở mật độ tế bào 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> hoặc thấp hơn trong lần cấy truyền 2 đến lần cấy truyền 5, tốt hơn là trong khoảng từ 700 đến 1000 tế bào/cm<sup>2</sup>, và thậm chí tốt hơn là 1000 tế bào/cm<sup>2</sup>.

Sáng chế có thể sử dụng một môi trường có chất chống oxy hóa làm môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy có thể được bổ sung gentamicin làm chất kháng sinh.

Tế bào gốc trung mô thu được bởi phương pháp theo sáng chế có thể là tế bào gốc trung mô cuối cùng của lần cấy truyền 5 đến lần cấy truyền 10, tốt hơn là các tế bào gốc trung mô của lần cấy truyền 6 đến lần cấy truyền 8. Đây là số lần cấy truyền thấp hơn so với quy trình truyền thống trong đó các kết quả là tế bào gốc trung mô thu được bởi ít nhất lần cấy truyền 10 đến lần cấy truyền 12, chứng tỏ rằng mật độ cấy tế bào được kiểm soát để dễ dàng thu được một số lượng lớn tế bào gốc trung mô tăng sinh một cách nhanh chóng trong lần cấy truyền thấp.

Tế bào gốc trung mô thu được có thể không chỉ là các tế bào gốc đơn dòng thu được bằng phương pháp phân đoạn thứ cấp mà còn là tế bào gốc trung mô duy trì một cách hiệu quả khả năng biệt hóa chúng. Đặc biệt, các tế bào gốc đơn dòng được nuôi cấy ở mật độ tế bào 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> hoặc thấp hơn có thể duy trì các tế bào nuôi cấy biệt hóa tế bào xương một cách hiệu quả so với tế bào nuôi cấy ở mật độ nhiều hơn 1000 tế bào/cm<sup>2</sup>.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Dưới đây, sáng chế được mô tả chi tiết với các ví dụ kèm theo.

Các ví dụ sau đây chỉ nhằm minh họa sáng chế mà không giới hạn nội dung của sáng chế.

#### **Ví dụ 1: phân tích tế bào gốc trung mô theo mật độ tế bào**

Để tạo ra một phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp cải tiến thêm của tế bào gốc và sự tăng sinh của tế bào gốc so với phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp

được mô tả trong Đơn Sáng chế Hàn Quốc số 10-2006-0075676, mật độ tế bào và môi trường nuôi cấy được thay đổi theo điều kiện nuôi cấy. Theo đó, các đặc tính của tế bào gốc trung mô thu được được so sánh và phân tích.

Trong các thí nghiệm dưới đây, mật độ nuôi cấy tế bào của tế bào gốc trung mô đơn dòng (MSC) thu được bằng phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp được thay đổi trong 50 tế bào/cm<sup>2</sup> (mật độ thấp), 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> (mật độ trung bình) và 4.000 tế bào/cm<sup>2</sup> (mật độ cao), theo cách đó phân tích các đặc tính tế bào.

#### 1.1. Xác nhận các thay đổi hình thái của MSC theo mật độ tế bào

Đầu tiên, các thí nghiệm được thực hiện để xác nhận các thay đổi hình thái của MSC theo mật độ tế bào khi nuôi cấy trong thời gian dài. MSC có lần cấy truyền 5 (P5), lần cấy truyền 10 (P10) và lần cấy truyền 15 (P15) được sử dụng cho các điều kiện nuôi cấy trong thời gian dài. MSC được cấy tương ứng trong DMEM ở điều kiện mật độ thấp, mật độ trung bình và mật độ cao. Sau đó, các thay đổi hình thái của tế bào được quan sát qua kính hiển vi để xác định liệu tế bào gốc có bị lão hóa hay không. Các kết quả được minh họa trên Fig.2.

Như được minh họa trên Fig.2, kích thước tế bào và mẫu hình thái của P5 và P10 là khác nhau theo mật độ tế bào. Đặc biệt, P15 được nuôi cấy ở điều kiện nuôi cấy mật độ cao có MSC phẳng và mở rộng. Mẫu hình thái này chỉ ra loại lão hóa của MSC, điều này xác nhận rằng mật độ tế bào được kiểm soát trong nuôi cấy thời gian dài, dẫn đến việc kiểm soát lão hóa của MSC.

#### 1.2 Xác nhận kích thước MSC và độ kết hạt theo mật độ tế bào

Để xác nhận thêm sự thay đổi của các tế bào gốc theo mật độ tế bào, kích thước tế bào và độ kết hạt tế bào, được biết đến là tăng lên ở tế bào lão hóa, được phân tích bởi phân tích FACS. Vì vậy, kết quả được minh họa trên Fig.3.

Như được minh họa trên Fig.3, kích thước tế bào không cho thấy sự khác biệt đáng kể ở P5, nhưng P10 và P15 thể hiện sự khác biệt đáng kể theo mật độ tế bào. Đặc biệt, các kích thước tế bào ở P10 và P15 tăng đáng kể ở một điều kiện nuôi cấy ở mật độ tế bào cao, theo cách đó thúc đẩy thêm sự lão hóa của tế bào. Tương tự, độ kết hạt tế bào cũng tăng đáng kể vì mật độ tế bào tăng trong tất cả các lần cấy truyền. Do vậy, việc kiểm soát mật độ tế bào của MSC khi nuôi cấy trong thời gian dài có thể là một

yếu tố để kiểm soát sự lão hóa của tế bào. Hơn nữa, mật độ nuôi cấy tế bào là thấp hơn để cải thiện các thay đổi hình thái trong lần cấy truyền cuối.

### 1.3 Xác nhận sự lão hóa của MSC theo mật độ tế bào nuôi cấy

Phân tích nhuộm màu beta-gal được thực hiện để xác nhận liệu các thay đổi hình thái được xác nhận trong các ví dụ 1.1 và 1.2 thực sự là một hiện tượng phụ thuộc vào tuổi của MSC hay không, có thể nhuộm có lựa chọn các tế bào lão hóa, và RT-PCR được thực hiện để so sánh sự biểu hiện của các gen liên quan đến lão hóa P15, P16 và gen PCNA, một chỉ điểm sự tăng sinh. Các kết quả được minh họa tương ứng trên Fig.4 và Fig.5.

Như được minh họa trên Fig.4, P5 và P10 không có việc nhuộm các tế bào lão hóa ở tất cả các mật độ tế bào, nhưng P15 có việc nhuộm tế bào lão hóa tăng rõ rệt vì mật độ tế bào tăng. Như minh họa trên Fig.5, trong P15, việc biểu hiện gen của chất ức chế CDK P15 và P16, đây là các gen liên quan đến lão hóa, tăng lên khi mật độ tế bào tăng, và PCNA, là một chỉ điểm của sự tăng sinh giảm.

Các kết quả chứng minh rằng các thay đổi hình thái của MSC liên quan đến sự lão hóa MSC và việc điều khiển mật độ tế bào có thể kiểm soát sự lão hóa của MSC.

### 1.4 Xác nhận thay đổi khả năng tăng sinh của MSC theo mật độ tế bào nuôi cấy

Người ta đã biết rằng khả năng tăng sinh của MSC giảm dần khi các tế bào được nuôi cấy thêm và lão hóa. Do vậy, khả năng tăng sinh có thể được sử dụng như một tiêu chí để xác nhận sự lão hóa của MSC. Vì vậy, khả năng tăng sinh của MSC theo mật độ nuôi cấy tế bào được so sánh trong khi nuôi cấy tế bào trong thời gian dài. Khả năng tăng sinh của mỗi tế bào được xác định bằng cách tính tốc độ tăng sinh theo mỗi lần cấy truyền sử dụng số lượng tế bào được cấy ban đầu và số lượng tế bào thu được sau khi nuôi cấy. Các kết quả được thể hiện trên Bảng 1 và Fig.6.

[Bảng 1]

| Lần tăng                  |          |          |          |
|---------------------------|----------|----------|----------|
| (tế bào/cm <sup>2</sup> ) | P5       | P10      | P15      |
| 50                        | 88,4±6,5 | 34,3±5,0 | 16,4±1,3 |
| 1000                      | 8,5±0,3  | 4,9±0,5  | 3,1±0,4  |

|      |         |         |         |
|------|---------|---------|---------|
| 4000 | 3,0±0,1 | 1,9±0,1 | 1,1±0,1 |
|------|---------|---------|---------|

Như thể hiện trên Bảng 1, các lần tăng tương ứng là 88,4, 34,3 và 16,4 ở P5, P10 và P15, trong các MSC được nuôi cấy ở mật độ thấp. Trong khi đó, các lần tăng trong các MSC được nuôi cấy ở mật độ trung bình tương ứng là 8,5, 4,9 và 3,1 ở P5, P10 và P15. Ngoài ra, các lần tăng tương ứng là 3,0, 1,9 và 1,1 ở P5, P10 và P15, trong các MSC được nuôi cấy ở mật độ cao. Như được minh họa trên Fig.6, PDT và PDL cũng có cùng mẫu về lần tăng. Kết quả này chỉ ra khả năng tăng sinh của các MSC có thể được duy trì bằng cách giảm mật độ tế bào trong nuôi cấy MSC trong thời gian dài và thậm chí qua việc thực hiện nuôi cấy thêm giống nhau, sự lão hóa của các MSC có thể được ức chế và khoảng thời gian sống của các MSC có thể được kéo dài.

1.5 Việc xác nhận sự thay đổi tiềm năng biệt hóa của MSC theo mật độ tế bào nuôi cấy.

Tiềm năng biệt hóa theo các nuôi cấy P5 đến P15 được so sánh để xác nhận liệu mật độ tế bào nuôi cấy có ảnh hưởng đến khả năng của tế bào gốc hay không. Khả năng của tế bào gốc để biệt hóa thành tế bào tạo mỡ và tế bào xương được xác nhận. Các phân tích định tính và định lượng được thực hiện ở mỗi lần cấy truyền và mật độ. Đặc biệt, NCS (serum huyết thanh sơ sinh) (Gibco) dexametason  $10^{-7}$  mol (Sigma), IBMX 0,5mM (Sigma), insulin 10  $\mu$ g/ml (Sigma), và indometaxin 100  $\mu$ M (Sigma) được thêm vào môi trường nuôi cấy DMEM glucoza cao để điều chế môi trường biệt hóa tế bào tạo mỡ, và sau đó thực hiện thí nghiệm. Sau 7 ngày biệt hóa, người ta xác nhận bằng cách nhuộm hóa mô Oil Red O. Sau khi nhuộm mô hóa Oil red O, nó được tách rửa bằng rượu isopropyl và được đo ở 500nm và phân tích định lượng.

Môi trường biệt hóa tế bào hủy xương được điều chế và sử dụng bằng cách thêm FBS (Gibco), ascorbic 2-phosphate 50  $\mu$ g/ml (Sigma), dexametason  $10^{-8}$  mol (Sigma) và glycerophosphat 10 mM  $\beta$ - (Sigma) vào  $\alpha$ -MEM. Sau 21 ngày biệt hóa, người ta xác nhận bởi nhuộm hóa mô hóa học Alizarin red S. Sau khi nhuộm hóa mô hóa học Alizarin Red S, tách rửa bằng 10% axit axetic, được đo ở 405nm và phân tích định lượng. Khả năng biệt hóa tế bào tạo mỡ và khả năng biệt hóa tế bào hủy xương được xác nhận như mô tả trên đây. Các kết quả được minh họa trên Fig.7.



Như được minh họa trên Fig.7, khả năng biệt hóa tế bào tạo mỡ giảm tổng thể vì lần cấy truyền phát triển, nhưng sự khác nhau theo mật độ là không rõ ràng. Mặt khác, khả năng biệt hóa tế bào hủy xương giảm đáng kể trong nhóm nuôi cấy P15 ở điều kiện mật độ cao. Các kết quả này cho thấy rằng khả năng biệt hóa tế bào hủy xương của các MSC có thể được duy trì tốt hơn khi nuôi cấy ở mật độ tế bào thấp.

#### 1.6 Phân tích đặc trưng kháng nguyên của MSC theo mật độ tế bào nuôi cấy

Các thí nghiệm được thực hiện để xác nhận liệu có hay không mật độ nuôi cấy tế bào cũng ảnh hưởng đến sự thể hiện kháng nguyên của tế bào gốc. Việc đếm tế bào dòng chảy được thực hiện để xác nhận các thay đổi về biểu hiện kháng nguyên dương và âm theo mỗi lần cấy truyền và mật độ nuôi cấy. Các kết quả được thể hiện trên Bảng 2.

[Bảng 2]

| Lần cấy truyền |        | P5   |      |      | P10  |      |      | P15  |      |      |
|----------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Mật độ         |        | LD   | MD   | HD   | LD   | MD   | HD   | LD   | MD   | HD   |
| Dương          | CD29   | 98,8 | 97,8 | 99,7 | 95,2 | 99,2 | 94,2 | 87,3 | 97,8 | 48,5 |
|                | CD44   | 95,2 | 95,4 | 99,6 | 94,6 | 75,8 | 72,7 | 93,8 | 80,6 | 31,4 |
|                | CD73   | 71,7 | 78,9 | 80,8 | 86,6 | 31,2 | 22,3 | 60,3 | 20,9 | 3,8  |
|                | CD90   | 90,5 | 98,6 | 99,4 | 92,2 | 98,7 | 95,2 | 94,9 | 98,5 | 65,0 |
|                | CD105  | 69,9 | 71,0 | 30,6 | 59,  | 49,8 | 44,1 | 15,7 | 3,6  | 4,4  |
|                | CD146  | 61,0 | 24,9 | 28,5 | 37,2 | 42,0 | 16,6 | 33,8 | 18,9 | 4,9  |
| Âm             | CD31   | 2,7  | 3,8  | 4,0  | 1,6  | 3,8  | 3,9  | 1,6  | 2,7  | 3,2  |
|                | CD104  | 2,1  | 3,6  | 4,0  | 1,5  | 4,6  | 4,2  | 2,6  | 3,8  | 2,1  |
|                | HLA-DR | 2,8  | 3,0  | 3,6  | 2,4  | 4,5  | 4,0  | 2,1  | 3,4  | 2,8  |
|                | CD14   | 3,2  | 3,9  | 4,0  | 3,3  | 5,8  | 4,2  | 2,4  | 3,1  | 2,9  |

Dữ liệu đại diện từ hai thí nghiệm độc lập được thể hiện

Như được thể hiện trên Bảng 2, sự thay đổi việc thể hiện chỉ hiệu âm là không rõ ràng, như mức thể hiện của một số chỉ điểm dương được thay đổi theo mật độ nuôi cấy tế bào ngay cả trong cùng lần cấy truyền. Đặc biệt, CD105 và CD146 thể hiện một mức giảm rõ rệt vì mật độ nuôi cấy tế bào tăng. Ngoài ra, việc thể hiện của CD73 có xu hướng giảm đáng kể vì mật độ nuôi cấy tăng trong P10 hoặc lần cấy truyền cao

hơn. Đặc biệt, khi các tế bào được nuôi cấy ở mật độ cao trong P15, mức thể hiện của các chỉ dấu dương nhất được giảm đáng kể. Ngoài ra, CD73, CD105 và CD105 cho thấy sự biểu hiện âm. Vì vậy, việc nuôi cấy tế bào với mật độ tế bào thấp có thể là một yếu tố quan trọng.

#### 1.7 So sánh việc tạo ra ROS và tổn thương ADN theo mật độ tế bào nuôi cấy.

Người ta đã biết rằng việc giảm chức năng tế bào gốc trung mô có liên quan đến tổn thương ADN. Đặc biệt, tổn thương ADN gây ra bởi ROS, đây là một loại oxy hoạt tính, được biết đến để thúc đẩy sự lão hóa các MSC. Do vậy, để xác nhận rằng có hoặc không có tổng lượng ROS tạo ra và tổn thương ADN gây ra là khác nhau, phân tích cường độ huỳnh quang được thực hiện để so sánh tổng lượng tế bào ROS theo lần cấy truyền và mật độ nuôi cấy tế bào. Phân tích sao chổi được thực hiện để xác nhận mức độ tổn thương ADN. Các kết quả được minh họa trên Fig.8.

Như minh họa trên Fig.8, tổng lượng ROS có xu hướng tăng lên khi mật độ nuôi cấy tế bào tăng trong tất cả các lần cấy truyền. Đặc biệt, lượng ROS tăng đáng kể ở P10 và P15 (xem Fig.8A). Trong phân tích sao chổi, dữ liệu được phân loại từ CC1 đến tổn thương ADN yếu nhất đến CC5 với tổn thương ADN nghiêm trọng nhất. CC5 với tổn thương ADN nghiêm trọng nhất cho thấy một sự tăng đáng kể khi mật độ nuôi cấy tế bào tăng. Mặt khác, CC1 có xu hướng giảm đáng kể khi mật độ tế bào tăng (xem Fig.8B).

Ngoài ra, để xác nhận liệu có hay không ROS gây ra tổn thương ADN, một thí nghiệm được thực hiện để xác nhận nồng độ 8-OHdG có thể nhận biết tổn thương ADN gây ra bởi ROS. Việc phân tích 8-OHdG như sau. 50  $\mu$ l mẫu ADN thu từ mỗi tế bào được đặt trên tấm phủ chất liên kết 8-OHdG và cấy ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Sau đó, kháng thể chống 8-OHdG được thêm vào và hỗn hợp được cấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau khi làm sạch ba lần, chất liên kết enzym kháng thể thứ cấp được thêm vào mỗi giếng, và hỗn hợp được cấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau khi làm sạch ba lần, dung dịch chất nền được thêm vào và hỗn hợp được cấy ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Cuối cùng, dung dịch dừng phản ứng được thêm vào đó. Cường độ hấp thụ được đo ở 450nm. Kết quả được minh họa trên Fig.9.

Như được minh họa trên Fig.9, vì mật độ nuôi cấy tế bào tăng, nồng độ 8-OHdG cũng tăng đáng kể trong nhóm P15 trong đó tổn thương ADN là nghiêm trọng nhất.

Các kết quả này chứng tỏ rằng ROS tạo ra dưới điều kiện nuôi cấy ở mật độ cao làm cho tổn thương ADN tăng, theo cách đó thúc đẩy việc lão hóa các MSC.

Những kết quả này thể hiện việc rằng giảm mật độ nuôi cấy tế bào có thể đóng vai trò trong việc bảo vệ các MSC khỏi tổn thương ADN gây ra do lượng ROS của MSC tăng lên.

#### 1.8 Xác nhận tăng sinh MSC và khả năng tạo ROS theo điều trị chống oxy hóa.

Để xác nhận liệu có hay không ROS được tạo ra ở điều kiện nuôi cấy của mật độ cao ảnh hưởng sự tăng sinh của các MSC, một thí nghiệm để loại bỏ ROS được thực hiện. Axit ascorbic 25  $\mu\text{l/ml}$ , chất chống oxy hóa, được thêm vào môi trường nuôi cấy dưới điều kiện nuôi cấy ở mật độ cao trong P11 đến P15. Sau đó, số lần tăng của sự tăng sinh được so sánh giữa hai nhóm. Kết quả được minh họa trên Fig.10.

Như được minh họa trên Fig.10, số lần tăng là 2,6, 1,9 và 1,6 ở P11 đến P15 ở điều kiện nuôi cấy mật độ cao. Vì số lần cấy truyền tăng nên khả năng tăng sinh giảm, và vì vậy bắt đầu lão hóa. Tuy nhiên, việc điều trị bằng chất chống oxy hóa được đưa ra để duy trì khả năng tăng sinh cao là khoảng 50% trong tất cả các lần cấy truyền. Trong nhóm điều trị bằng chất chống oxy hóa, số lần tăng về sự tăng sinh tương ứng là 3,8, 2,9 và 2,5 trong P11 đến P15. Khả năng tăng sinh được duy trì cao ở P15.

Ở điểm cuối P15, các mức ROS được xác nhận giữa điều kiện nuôi cấy mật độ cao riêng và nhóm điều trị bằng chất chống oxy hóa + điều kiện nuôi cấy mật độ cao. Các kết quả được minh họa trên Fig.11.

Như minh họa trên Fig.11, các mức ROS cũng giảm ở điều kiện mà sự tăng sinh tăng nhờ điều trị bằng axit ascorbic, chất chống oxy hóa. Do vậy, tốt hơn việc nuôi cấy MSC được thực hiện ở mật độ tế bào thấp hơn là mật độ tế bào cao. Lượng ROS gây ra bởi mật độ nuôi cấy tế bào cao bị triệt trừ bằng chất chống oxy hóa, theo cách đó dẫn đến việc tăng khả năng tăng sinh MSC. Mặt khác, ROS ở mật độ cao ức chế khả năng tăng sinh MSC. Vì mật độ tế bào là thấp hơn, nên lượng ROS giảm, và thúc đẩy khả năng tăng sinh MSC.

Tóm lại, các kết quả này chỉ ra rằng việc kiểm soát mật độ tế bào ở mật độ 1000 tế bào/ $\text{cm}^2$  hoặc thấp hơn trong các điều kiện nuôi cấy là quan trọng để duy trì sự tăng sinh, việc nuôi cấy và khả năng tế bào gốc của tế bào gốc trung mô đơn dòng thu được

bằng phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp. Việc nuôi cấy với chất chống oxy hóa ức chế ứng suất chất oxy hóa gây ra bởi việc nuôi cấy tế bào, theo cách đó thúc đẩy một cách hiệu quả tăng sinh MSC.

### **Ví dụ 2: Xác minh phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp cải tiến**

Ví dụ 1 đã xác nhận rằng việc kiểm soát mật độ tế bào và việc bổ sung chất chống oxy hóa có thể là các yếu tố quan trọng trong việc nuôi cấy MSC thu được bởi phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp. Do vậy, các thí nghiệm được thực hiện để so sánh khả năng tăng sinh của mỗi MSC cụm đơn và hiệu quả của chúng về việc thu được các tế bào trong khi thay đổi mật độ nuôi cấy tế bào của tế bào gốc trung mô đơn dòng thu được theo phương pháp truyền thống, phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp được mô tả trong Đơn sáng chế Hàn Quốc số 10-2006-0075676 và sử dụng môi trường nuôi cấy chứa axit ascorbic làm chất chống oxy hóa.

Đơn sáng chế Hàn Quốc số 10-2006-0075676 như bộc lộ trước đã mô tả các tế bào trung mô được chuyển đến các giếng trong khoảng từ 100 đến 600 tế bào trên mỗi giếng, và sau đó được nuôi cấy ở 4000 tế bào/cm<sup>2</sup> trong việc nuôi cấy thêm chúng.

Đặc biệt, sáng chế đề xuất phương pháp nuôi cấy tế bào để điều chỉnh số lượng tế bào là 1000/cm<sup>2</sup> trong lần cấy truyền 1 (P1), tạo ra sự tăng sinh hiệu quả của tế bào. Ngoài ra, trong việc nuôi cấy thêm sau lần cấy truyền 2 (P2), các tế bào được cấy trên các giếng với 1000 tế bào hoặc thấp hơn đây là mật độ thấp. Các giếng này được so sánh với hiệu quả của việc nuôi cấy 4000 tế bào. Ngoài ra, môi trường  $\alpha$ -MEM chứa chất chống oxy hóa và môi trường LG-DMEM không chứa chất chống oxy hóa được sử dụng làm môi trường nuôi cấy tế bào, theo cách đó so sánh các hiệu quả tăng sinh tế bào của tế bào của chúng.

Các nhóm thí nghiệm để xác nhận hiệu quả của phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp cải tiến được thể hiện trên Bảng 3. Các quy trình cải tiến được minh họa dưới dạng giản đồ trên Fig.12.

[Bảng 3]

| Nhóm | Mật độ nuôi cấy | Điều kiện môi trường | Cấy truyền | Giai đoạn nuôi cấy thứ cấp | Sự thay đổi môi trường |
|------|-----------------|----------------------|------------|----------------------------|------------------------|
|------|-----------------|----------------------|------------|----------------------------|------------------------|

|           |                             |           |              |     |                      |
|-----------|-----------------------------|-----------|--------------|-----|----------------------|
| 4000LG    | 4000 tế bào/cm <sup>2</sup> | LG-DMEM   | <b>P2-P5</b> | 3-4 | X                    |
| 4000alpha | 4000 tế bào/cm <sup>2</sup> | Alpha-MEM |              | 3-4 | X                    |
| 1000LG    | 1000 tế bào/cm <sup>2</sup> | LG-DMEM   |              | 7   | O (3-4 ngày một lần) |
| 1000alpha | 1000 tế bào/cm <sup>2</sup> | Alpha-MEM |              | 7   | O (3-4 ngày một lần) |
|           |                             |           |              |     |                      |
|           |                             |           |              |     |                      |

Các dòng tế bào được tách bởi phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp và được gọi tên tương ứng là từ SCM01 đến SCM05.

### 2.1 Xác nhận hiệu quả tăng sinh theo mật độ đường tế bào và môi trường

Các tế bào được nuôi cấy sử dụng các dòng tế bào từ SCM01 đến SCM08. Để xác nhận hiệu quả tăng sinh tế bào theo việc nuôi cấy thêm đến lần cấy truyền 5(P5), số lượng tế bào, thời gian nhân đôi quần thể (PDT) và mức nhân đôi quần thể (PDL) được so sánh tương ứng. Kết quả được minh họa trên Fig.13 đến Fig.20.

Như được minh họa từ Fig.13 đến Fig.20, hiệu quả tăng sinh tế bào của tất cả các nhóm thí nghiệm được cấy và nuôi cấy với mật độ tế bào là 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> là cao hơn hiệu quả tăng sinh tế bào của các nhóm thí nghiệm được cấy và nuôi cấy với mật độ tế bào là 4000 tế bào/cm<sup>2</sup>. Hơn nữa, thậm chí trong cùng nhóm mật độ tế bào 1000, nhóm thí nghiệm 1000- alpha trong  $\alpha$ -MEM chứa axit ascorbic như chất chống oxy hóa thể hiện hiệu quả tăng sinh tế bào đáng kể hơn các nhóm khác.

### 2.2 So sánh hiệu quả tăng sinh theo mật độ đường tế bào

Để so sánh chính xác hơn về tốc độ tăng sinh theo số lượng tế bào nuôi cấy, LG-DMEM và  $\alpha$ -MEM, được thiết lập tương ứng làm môi trường nuôi cấy, và mật độ cấy được thiết lập tương ứng là 1000 và 4000 tế bào. Theo đó, hiệu quả tăng sinh tế bào được so sánh. Các kết quả được minh họa trên Fig.21 đến Fig.24.

Như được minh họa trên Fig.21, khi các dòng tế bào từ SCM01 đến SC08 được cấy với 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> được nuôi cấy trong LG-DMEM, tốc độ tăng sinh của P2 đến P5 cao hơn đáng kể so với tốc độ tăng sinh của nhóm được cấy với 4000 tế bào/cm<sup>2</sup>. Tốc độ tăng sinh của nhóm được cấy với 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> ít nhất là 3,08 đến 48,50 lần so với tốc độ tăng sinh của nhóm cấy với 4000 tế bào/cm<sup>2</sup> trong lần cấy truyền 5 (P5). Ngoài ra, như được minh họa trên Fig.22, giá trị PDT của nhóm được cấy với 1000 tế

bào/cm<sup>2</sup> cũng thấp hơn hoặc tương tự với giá trị PTD của nhóm được cấy 4000 tế bào/cm<sup>2</sup> trong tất cả các dòng tế bào, và giá trị PDL của nhóm được cấy với 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> là cao hơn so với giá trị của nhóm được cấy 4000 tế bào/cm<sup>2</sup> trong tất cả các dòng tế bào.

Hơn nữa, như được minh họa trên Fig.23, khi tất cả dòng tế bào từ SCM01 đến SCM08 được nuôi cấy trong  $\alpha$ -MEM được cấy và nuôi cấy với 1000 tế bào/cm<sup>2</sup>, xu hướng của chúng là tương tự với xu hướng trong nhóm thí nghiệm DMEM. Tốc độ tăng sinh của nhóm được cấy với 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> ít nhất là 6,32 đến nhiều nhất 85,63 lần được so sánh với tốc độ tăng sinh của nhóm được cấy với 4000 tế bào/cm<sup>2</sup> trong lần cấy truyền 5 (P5). Hơn nữa, như được minh họa trên Fig.24, giá trị PDT của nhóm được cấy với 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> cũng thấp hơn hoặc tương tự với giá trị PDT của nhóm được cấy 4000 tế bào/cm<sup>2</sup> trong tất cả các dòng tế bào, và giá trị PDL của nhóm được cấy với 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> là cao hơn giá trị PDL của nhóm cấy 4000 tế bào/cm<sup>2</sup> trong tất cả các dòng.

Các kết quả này chứng minh rằng việc cấy với 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> hoặc ít hơn có thể tạo ra sự tăng sinh nhanh của tế bào gốc trung mô đơn dòng so với việc cấy dòng tế bào mật độ cao 4000 tế bào/cm<sup>2</sup>.

### 2.3 So sánh hiệu quả tăng sinh trong môi trường nuôi cấy

Ví dụ 2.2 xác nhận rằng nuôi cấy 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> cho thấy hiệu quả tăng sinh tuyệt vời so với việc nuôi 4000 tế bào/cm<sup>2</sup>. Do vậy, thí nghiệm được thực hiện để so sánh hiệu quả tăng sinh tế bào trong khi số lượng tế bào được thiết lập là 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> và môi trường thay đổi như một biến số. Vì vậy, hiệu quả tăng sinh được xác minh thêm theo điều kiện môi trường nuôi cấy. Các kết quả được minh họa trong Fig.25 và Fig.26.

Như được minh họa trên Fig.25, tốc độ tăng sinh tế bào được so sánh giữa  $\alpha$ -MEM và DMEM. Các kết quả thể hiện rằng tốc độ tăng sinh của nhóm sử dụng  $\alpha$ -MEM là ít nhất từ 1,77 đến 6,39 lần so với nhóm sử dụng LG-DMEM. Hơn nữa, như được minh họa trên Fig.26, PDT là thấp hơn trong tất cả các nhóm  $\alpha$ -MEM và PDL tăng trong tất cả các nhóm  $\alpha$ -MEM.

Các kết quả này chỉ ra rằng hiệu quả tăng sinh tế bào có thể được tối đa hóa

bằng cách nuôi cấy tế bào sử dụng một môi trường chứa chất chống oxy hóa ngoài việc điều khiển mật độ cấy tế bào 1000/cm<sup>2</sup> tế bào hoặc thấp hơn và nuôi cấy của tế bào trong lần cấy truyền 2 (P2) đến lần cấy truyền 5 (P5).

### Ví dụ 3: Thiết lập quy trình cải tiến

Các ví dụ, như được mô tả trên đây, xác nhận rằng việc kiểm soát mật độ tế bào và việc thêm chất chống oxy hóa có thể là các yếu tố quan trọng trong nuôi cấy MSC. Dựa vào phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp truyền thống được mô tả trong Đơn Sáng chế Hàn Quốc số 10-2006-0075676, quy trình cải tiến được thực hiện bằng cách thay đổi mật độ nuôi cấy tế bào và các điều kiện môi trường để thu được một cách hiệu quả tế bào gốc trung mô khuẩn đơn lạc. Các ví dụ được thể hiện chung trong Bảng 4 sau đây (điều kiện nuôi cấy sử dụng DMEM) và Bảng 5 (điều kiện nuôi cấy sử dụng  $\alpha$ -MEM).

[Bảng 4]

| Quy trình            | Danh mục                      | Sản phẩm sống                       | Sản phẩm đông lạnh                  |                                   |                                   |
|----------------------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
|                      |                               |                                     | Quy trình A                         | Quy trình B                       |                                   |
|                      |                               |                                     |                                     | Quy trình B-1                     | Quy trình B-2                     |
| <b>Tủy xương MCB</b> | Môi trường nuôi cấy           | DMEM                                | DMEM                                | DMEM                              | DMEM                              |
|                      | Kháng sinh (nồng độ)          | Penixilin-streptomycin              | Penixilin-streptomycin              | Penixilin-streptomycin            | Penixilin-streptomycin            |
|                      |                               | Penixilin (100đơn vị/mL)            | Penixilin (100đơn vị/mL)            | Penixilin (100đơn vị/mL)          | Penixilin (100đơn vị/mL)          |
|                      |                               | Streptomycin (100 $\mu$ g/mL)       | Streptomycin (100 $\mu$ g/mL)       | Streptomycin (100 $\mu$ g/mL)     | Streptomycin (100 $\mu$ g/mL)     |
|                      | Mật độ nuôi cấy tế bào        | 4000~5700<br>Tế bào/cm <sup>2</sup> | 4000~5700<br>Tế bào/cm <sup>2</sup> | 50~1000<br>Tế bào/cm <sup>2</sup> | 50~1000<br>Tế bào/cm <sup>2</sup> |
|                      | Giai đoạn nuôi cấy thứ cấp    | 3~4 ngày                            | 3~4 ngày                            | 5~14 ngày                         | 5~14 ngày                         |
|                      | Thay đổi môi trường           | X                                   | X                                   | O (3~4 ngày một lần)              | O (3~4 ngày một lần)              |
|                      | Nuôi cấy thứ cấp (Cấy truyền) | P1~P5                               | P1~P5                               | P1~P5                             | P1~P5                             |

| Quy trình          | Danh mục                      | Sản phẩm sống                       | Sản phẩm đông lạnh                  |                                    |                                    |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
|                    |                               |                                     | Quy trình A                         | Quy trình B                        |                                    |
|                    |                               |                                     |                                     | Quy trình B-1                      | Quy trình B-2                      |
|                    | Số lượng tế bào/lọ nhỏ        | $2\sim 3\times 10^6$ /lọ nhỏ        | $2\sim 3\times 10^6$ /lọ nhỏ        | $2\sim 3\times 10^6$ /lọ nhỏ       | $2\sim 3\times 10^6$ /lọ nhỏ       |
| MCB~<br>WCB        | Môi trường nuôi cấy           | DMEM                                | DMEM                                | X                                  | X                                  |
|                    | Kháng sinh (nồng độ)          | Penixilin-streptomycin              | Penixilin-streptomycin              |                                    |                                    |
|                    |                               | Penixilin (100đơn vị/mL)            | Penixilin (100đơn vị/mL)            |                                    |                                    |
|                    |                               | Streptomycin (100 $\mu$ g/mL)       | Streptomycin (100 $\mu$ g/mL)       |                                    |                                    |
|                    | Mật độ nuôi cấy tế bào        | 4000~5700<br>Tế bào/cm <sup>2</sup> | 4000~5700<br>Tế bào/cm <sup>2</sup> |                                    |                                    |
|                    | Giai đoạn nuôi cấy thứ cấp    | 3~4 ngày                            | 3~4 ngày                            |                                    |                                    |
|                    | Thay đổi môi trường           | X                                   | X                                   |                                    |                                    |
|                    | Nuôi cấy thứ cấp (cấy truyền) | P6~P9                               | P6~P9                               |                                    |                                    |
| Sản phẩm cuối cùng | Môi trường nuôi cấy           | DMEM                                | DMEM                                | $\alpha$ -MEM                      | $\alpha$ -MEM                      |
|                    | Kháng sinh (Nồng độ)          | Penixilin-streptomycin              | Penixilin-streptomycin              | Gentamixin                         | Gentamixin                         |
|                    |                               | Penixilin (100đơn vị/mL)            | Penixilin (100đơn vị/mL)            | 20 $\mu$ g/mL                      | 20 $\mu$ g/mL                      |
|                    |                               | Streptomycin (100 $\mu$ g/mL)       | Streptomycin (100 $\mu$ g/mL)       |                                    |                                    |
|                    | Mật độ nuôi cấy tế bào        | 4000~5700<br>Tế bào/cm <sup>2</sup> | 4000~5700<br>Tế bào/cm <sup>2</sup> | 700~1000<br>Tế bào/cm <sup>2</sup> | 700~1000<br>Tế bào/cm <sup>2</sup> |
|                    | Giai đoạn nuôi cấy thứ cấp    | 3~4 ngày                            | 3~4 ngày                            | 5~7 ngày                           | 5~7 ngày                           |
|                    | Thay đổi môi trường           | X                                   | X                                   | O (3~4 ngày một lần)               | O (3~4 ngày một lần)               |
|                    | Nuôi cấy thứ cấp              | P10~P12                             | P10~P12                             | P6~P8                              | P6~P8                              |



| Quy trình | Danh mục                                       | Sản phẩm sống | Sản phẩm đông lạnh |               |                            |
|-----------|------------------------------------------------|---------------|--------------------|---------------|----------------------------|
|           |                                                |               | Quy trình A        | Quy trình B   |                            |
|           |                                                |               |                    | Quy trình B-1 | Quy trình B-2              |
|           | (cây truyền)                                   |               |                    |               |                            |
|           | Thể tích cuối cùng/túi<br>(Trọng lượng cơ thể) | -             | 7,5mL (25Kg)       | 6mL (20Kg)    | 6mL (20Kg),<br>12mL (40Kg) |

[Bảng 5]

| Quy trình          | Danh mục                      | Sản phẩm sống                        | Sản phẩm đông lạnh                   |                                      |
|--------------------|-------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
|                    |                               |                                      | Quy trình A                          | Quy trình B                          |
|                    |                               |                                      |                                      | Quy trình B-3                        |
| Tủy xương ~<br>MCB | Môi trường nuôi cấy           | DMEM                                 | DMEM                                 | $\alpha$ -MEM                        |
|                    | Kháng sinh (nồng độ)          | Penixilin-streptomycin               | Penixilin-streptomycin               | Gentamixin                           |
|                    |                               | Penixilin (100đơn vị/mL)             | Penixilin (100đơn vị/mL)             | 20 $\mu$ g/mL                        |
|                    |                               | Streptomycin (100 $\mu$ g/mL)        | Streptomycin (100 $\mu$ g/mL)        |                                      |
|                    | Mật độ nuôi cấy tế bào        | 4000~5700<br>Tế bào/cm <sup>2</sup>  | 4000~5700<br>Tế bào/cm <sup>2</sup>  | 50~1000 tế bào/cm <sup>2</sup>       |
|                    | Giai đoạn nuôi cấy thứ cấp    | 3~4 ngày                             | 3~4 ngày                             | 5~14 ngày                            |
|                    | Thay đổi môi trường           | X                                    | X                                    | O (3~4 ngày một lần)                 |
|                    | Nuôi cấy thứ cấp (cây truyền) | P1~P5                                | P1~P5                                | P1~P5                                |
|                    | Số lượng tế bào/Lọ nhỏ        | 2~3 $\times$ 10 <sup>6</sup> /lọ nhỏ | 2~3 $\times$ 10 <sup>6</sup> /lọ nhỏ | 2~3 $\times$ 10 <sup>6</sup> /lọ nhỏ |
| MCB~<br>WCB        | Môi trường nuôi cấy           | DMEM                                 | DMEM                                 | X                                    |
|                    | Kháng sinh (nồng độ)          | Penixilin-streptomycin               | Penixilin-streptomycin               |                                      |

| Quy trình          | Danh mục                                             | Sản phẩm sống                       | Sản phẩm đông lạnh                  |                                 |
|--------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
|                    |                                                      |                                     | Quy trình A                         | Quy trình B                     |
|                    |                                                      |                                     |                                     | Quy trình B-3                   |
|                    |                                                      | Penixilin<br>(100đơn vị/mL)         | Penixilin (100bộ<br>phần/mL)        |                                 |
|                    |                                                      | Streptomycin<br>(100µg/mL)          | Streptomycin<br>(100µg/mL)          |                                 |
|                    | Mật độ nuôi cấy tế<br>bào                            | 4000~5700<br>Tế bào/cm <sup>2</sup> | 4000~5700<br>Tế bào/cm <sup>2</sup> |                                 |
|                    | Giai đoạn nuôi cấy<br>thứ cấp                        | 3~4 ngày                            | 3~4 ngày                            |                                 |
|                    | Thay đổi môi trường                                  | X                                   | X                                   |                                 |
|                    | Nuôi cấy thứ cấp<br>(cấy truyền)                     | P6~P9                               | P6~P9                               |                                 |
|                    |                                                      |                                     |                                     |                                 |
| Sản phẩm cuối cùng | Môi trường nuôi cấy                                  | DMEM                                | DMEM                                | α-MEM                           |
|                    | Kháng sinh (nồng độ)                                 | Penixilin-streptomycin              | Penixilin-streptomycin              | Gentamixin                      |
|                    |                                                      | Penixilin<br>(100đơn vị/mL)         | Penixilin<br>(100units/mL)          | 20µg/mL                         |
|                    |                                                      | Streptomycin<br>(100µg/mL)          | Streptomycin<br>(100µg/mL)          |                                 |
|                    | Mật độ nuôi cấy tế<br>bào                            | 4000~5700<br>Tế bào/cm <sup>2</sup> | 4000~5700<br>Tế bào/cm <sup>2</sup> | 700~1000 tế bào/cm <sup>2</sup> |
|                    | Giai đoạn nuôi cấy<br>thứ cấp                        | 3~4 ngày                            | 3~4 ngày                            | 5~7 ngày                        |
|                    | Thay đổi môi trường                                  | X                                   | X                                   | O (3~4 ngày một lần)            |
|                    | Nuôi cấy thứ cấp<br>(cấy truyền)                     | P10~P12                             | P10~P12                             | P6~P8                           |
|                    | Thể tích cuối<br>cùng/túi<br>(Trọng lượng cơ<br>thể) | -                                   | 7,5mL (25Kg)                        | 6mL (20Kg), 12mL (40Kg)         |

Cụ thể hơn, quy trình nuôi cấy phân đoạn thứ cấp và nuôi cấy tăng sinh tế bào

gốc trung mô lấy từ tủy xương theo sáng chế được thực hiện như sau.

Phần hông của một người hiến tủy xương được gây mê bằng thuốc tê tại chỗ. Sau đó, tủy xương được thu bằng cách đâm kim vào xương hông. 14ml môi trường Dulbecco's Modified Eagle (DMEM, GIBCO-BRL, Life-technologies, MD, USA) chứa 20% FBS và 1% penixilin/streptomycin, và 1ml tủy xương người được đặt trong bình nuôi cấy 100mm, và hỗn hợp được nuôi cấy trong chất kháng thể tế bào 5% CO<sub>2</sub> ở 37°C trong 2 giờ. Sau khi nuôi cấy, bình nuôi cấy được nghiêng nhẹ sang một bên và chỉ phần dịch nổi của bình nuôi cấy được chuyển vào bình mới trong khi tế bào gắn vào đáy được ngăn khỏi rơi.

Các quy trình tương tự được lặp lại một hoặc nhiều lần, và dung dịch nuôi cấy cuối cùng được chuyển vào bình nuôi cấy (Becton Dickinson) phủ collagen ở đáy và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 2 giờ. Dung dịch nuôi cấy được chuyển vào bình mới phủ collagen. Sau 24 giờ, dung dịch nuôi cấy được chuyển vào bình đựng mới. Một lần nữa, sau 24 giờ, dung dịch nuôi cấy được chuyển vào bình mới. Cuối cùng, sau 48 giờ, dung dịch nuôi cấy được chuyển vào bình mới. Sau đó, người ta xác nhận trực quan rằng các tế bào còn lại được phát triển và bám vào đáy bình nuôi cấy. Có thể giả định rằng các tế bào có thể đến gần bước này qua quy trình nuôi cấy phân đoạn thứ cấp nhỏ hơn nhiều so với các tế bào khác. Sau khoảng từ 10 ngày đến 14 ngày, các tế bào tạo thành một khuẩn lạc đơn. Nhóm tế bào đơn dòng này được điều trị bằng trypsin để phân lập. Sau đó, các tế bào được chuyển vào bình nuôi cấy 6 giếng ở 50-200 tế bào/cm<sup>2</sup>. Các tế bào được nuôi cấy trong lồng ấp tế bào 5% CO<sub>2</sub> ở nhiệt độ 37°C trong 4 đến 5 ngày. Sau đó, khi tế bào phát triển đến khoảng 80%, tế bào được điều trị bằng trypsin /1mM EDTA (GIBCO-BRL) 0,25%, theo cách đó thu được tế bào. Sau đó, tế bào được chuyển vào bình nuôi cấy 75 cm<sup>2</sup> và được nuôi cấy thứ cấp.

Khi tế bào được nuôi cấy ở mật độ tế bào giảm xuống đến 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> trong lần cấy truyền 2 đến lần cấy truyền 5 sớm nhưng các quy trình khác được điều chỉnh theo cùng một cách, khả năng tăng sinh và các đặc tính tế bào gốc của MSC được duy trì tốt để tạo ra sự tăng sinh hiệu quả ngay cả trong cùng lần cấy truyền. Đặc biệt, khi tế bào được nuôi cấy ở mật độ tế bào được giảm xuống như đã mô tả trên đây, có thể không bao gồm quy trình chuẩn bị ngân hàng tế bào hoạt động (WCB) trong MSC, WCB này cần trong quy trình truyền thống, theo cách đó rút ngắn giai đoạn tạo

ra tế bào một cách hiệu quả. Đặc biệt, khi giảm lần cấy truyền, các tế bào ít lão hóa có thể được thu với lượng lớn. Người ta kỳ vọng rằng, các tế bào như vậy được sử dụng làm tác nhân trị liệu dẫn đến hiệu quả trị liệu tuyệt vời.

Hơn nữa, khi  $\alpha$ -MEM bổ sung chất chống oxy hóa được sử dụng làm môi trường nuôi cấy, việc điều trị bằng chất chống oxy hóa có thể giảm một cách hiệu quả ứng suất ROS tạo ra trong nuôi cấy tế bào mật độ cao và phục hồi khả năng tăng sinh tế bào của các MSC, theo cách đó rút ngắn việc cấy truyền tế bào một cách đáng kể và thu được một cách nhanh và ổn định MSC khuẩn lạc đơn trong trạng thái sống mà không lão hóa, điều này duy trì các đặc tính của MSC.

Tóm lại, việc nuôi cấy tế bào ở mật độ thấp có thể không chỉ thu được số lượng lớn tế bào trong thời gian ngắn, theo cách đó, đơn giản hóa quy trình sản xuất, mà còn thu được các tế bào không lão hóa để duy trì các đặc tính nguyên vẹn của các MSC khi nuôi cấy trong thời gian dài. Do vậy, điều này dẫn đến lượng tế bào gốc chất lượng cao. Theo đó, người ta kỳ vọng rằng chúng là hữu ích cao cho công nghệ sản xuất trên quy mô lớn cho sự phát triển các tác nhân điều trị tế bào.

Từ những điều trên đây, sẽ được đánh giá cao rằng các phương án thực hiện khác nhau của sáng chế đã được mô tả trong tài liệu này nhằm mục đích minh họa và các thay đổi khác nhau có thể được thực hiện mà không tách rời khỏi phạm vi của sáng chế. Theo đó, các phương án thực hiện khác nhau được bộc lộ trong tài liệu này không nhằm giới hạn, với phạm vi đúng được chỉ ra bởi các yêu cầu bảo hộ sau đây.

### Yêu cầu bảo hộ

1. Phương pháp nuôi cấy phân đoạn thứ cấp tế bào gốc và tăng sinh chúng, phương pháp này bao gồm các bước:

- 1) nuôi cấy tủy xương được phân lập từ một cá thể;
  - 2) chỉ chuyển phần dịch nổi ở bước 1) vào bình chứa mới và nuôi cấy phần dịch nổi;
  - 3) chỉ tách phần dịch nổi ở bước 2), nuôi cấy phần dịch nổi ở bình nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong thời gian từ 1 đến 3 giờ, lặp lại việc nuôi cấy phần dịch nổi ở nhiệt độ 37°C trong thời gian từ 12 đến 36 giờ từ 2 đến 3 lần, sau đó nuôi cấy phần dịch nổi ở nhiệt độ 37°C trong thời gian từ 24 đến 72 giờ, trong đó mỗi phần dịch nổi được chuyển vào bình nuôi cấy mới để lặp lại việc nuôi cấy;
  - 4) thu được tế bào gốc đơn dòng trong bình nuôi cấy cuối cùng; và
  - 5) cấy tế bào gốc đơn dòng trong môi trường nuôi cấy ở mật độ tế bào 50 đến 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> để nuôi cấy tế bào, trong đó môi trường nuôi cấy ở bước 5) được bổ sung chất chống oxy hóa.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc nuôi cấy ở bước 5) là cấy truyền 1 đến cấy truyền 5.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nuôi cấy ở bước 5) được thực hiện bằng cách cấy tế bào gốc đơn dòng trong môi trường nuôi cấy ở mật độ tế bào 1000 tế bào/cm<sup>2</sup>.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chất chống oxy hóa được bổ sung với nồng độ trong khoảng từ 10 µg/ml đến 30 µg/ml.
5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó môi trường nuôi cấy được bổ sung chất chống oxy hóa ở bước 5) là DMEM được bổ sung chất chống oxy hóa hoặc  $\alpha$ -MEM.
6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nuôi cấy theo bước 5) được thực hiện trong cấy truyền 1 bằng cách nuôi tế bào gốc đơn dòng trong môi trường nuôi cấy ở mật độ tế bào trong khoảng từ 50 đến 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> để nuôi cấy tế bào.
7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nuôi cấy ở bước 5) được thực hiện trong cấy truyền 2 đến cấy truyền 5 bằng cách nuôi tế bào gốc đơn dòng trong môi trường nuôi cấy ở mật độ tế bào trong khoảng từ 700 đến 1000 tế bào/cm<sup>2</sup> để nuôi cấy tế bào.

8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó môi trường nuôi cấy ở bước 5) được bổ sung gentamycin vào.
9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tế bào gốc thu được theo phương pháp là tế bào gốc có cây truyền 5 đến cây truyền 10.
10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tế bào gốc thu được theo phương pháp có khả năng biệt hóa tế bào xương.

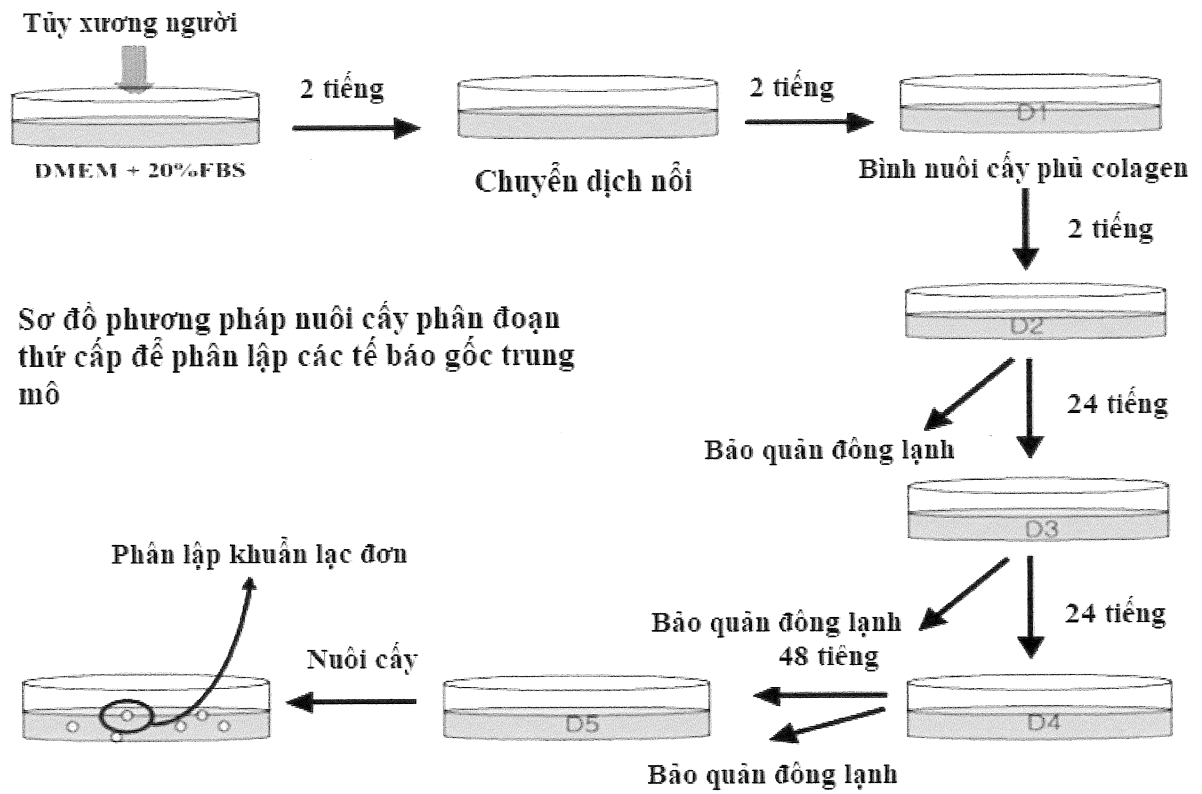


Fig. 1

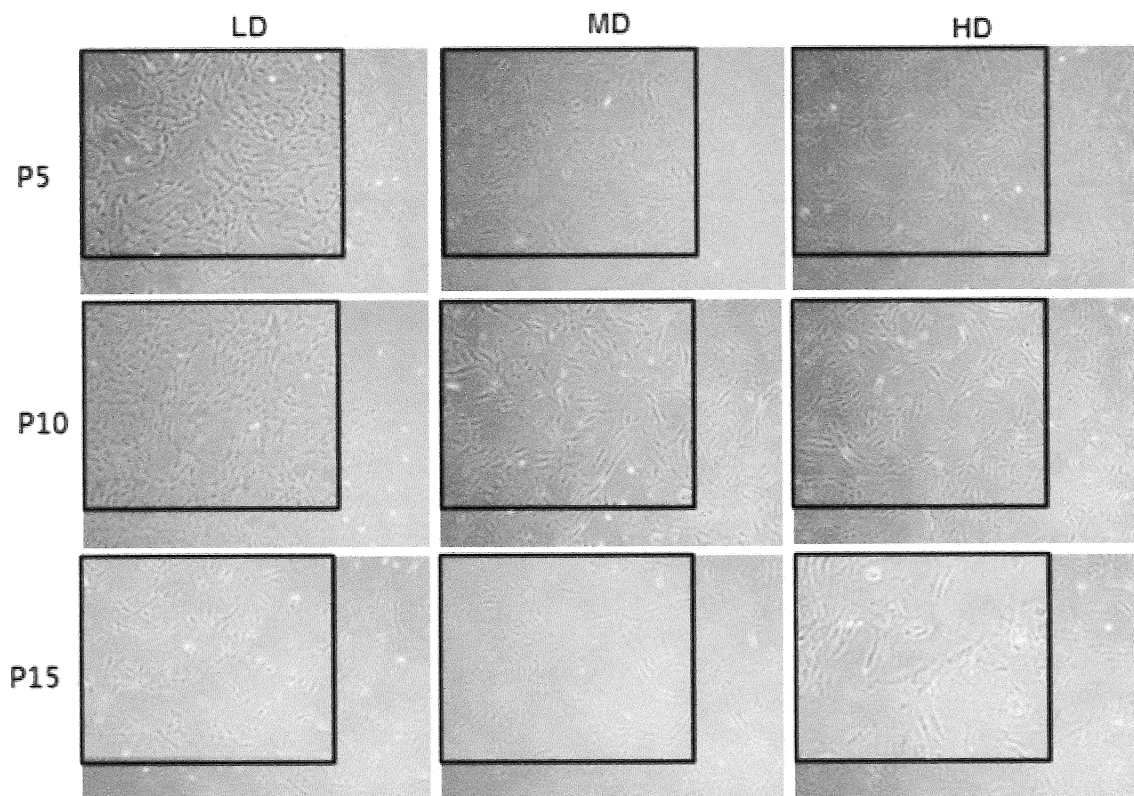


Fig. 2

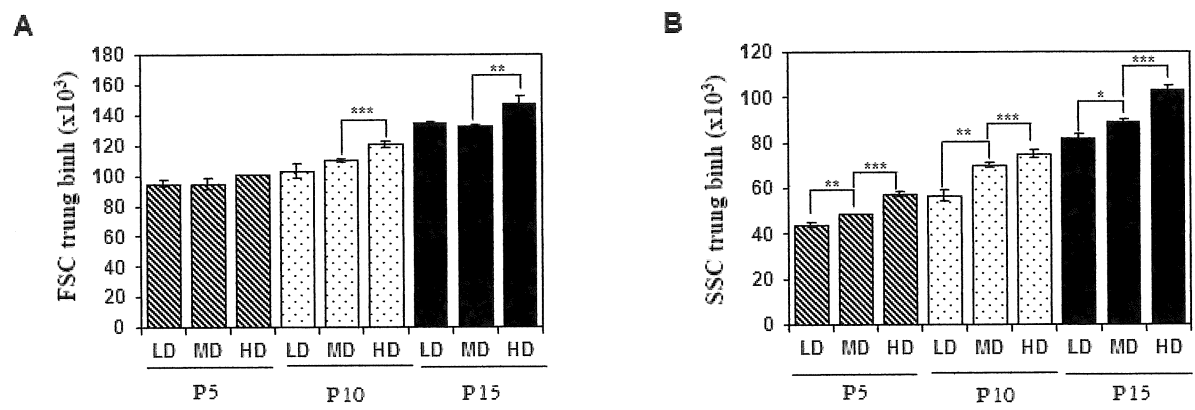


Fig. 3

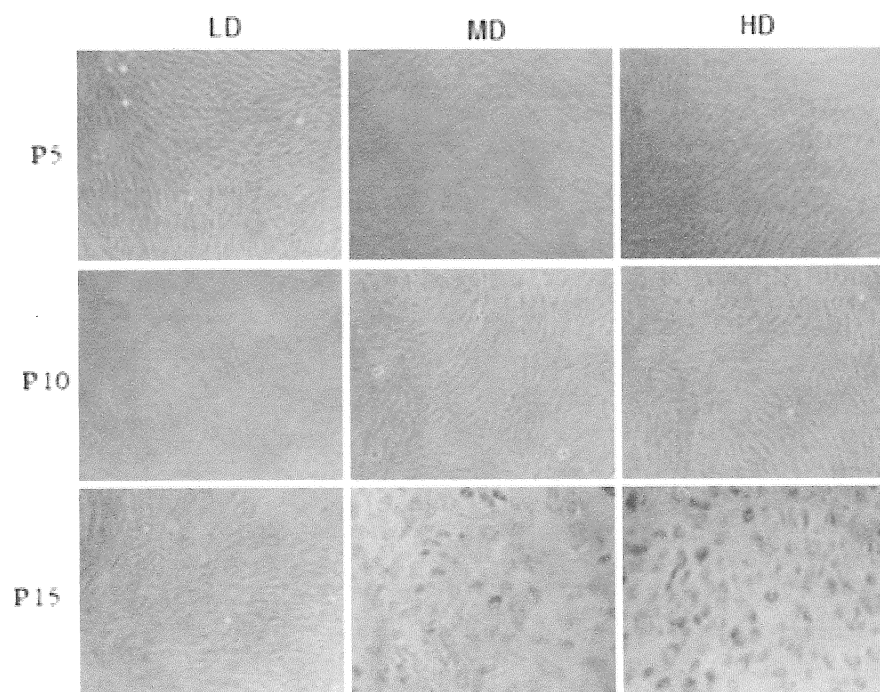


Fig. 4



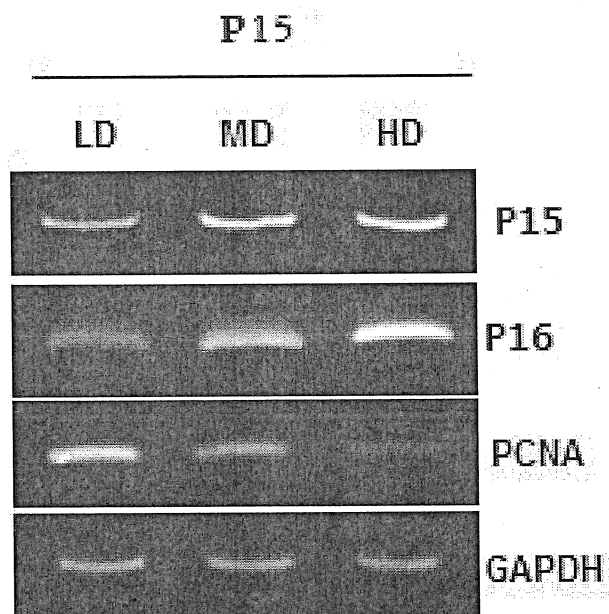


Fig. 5

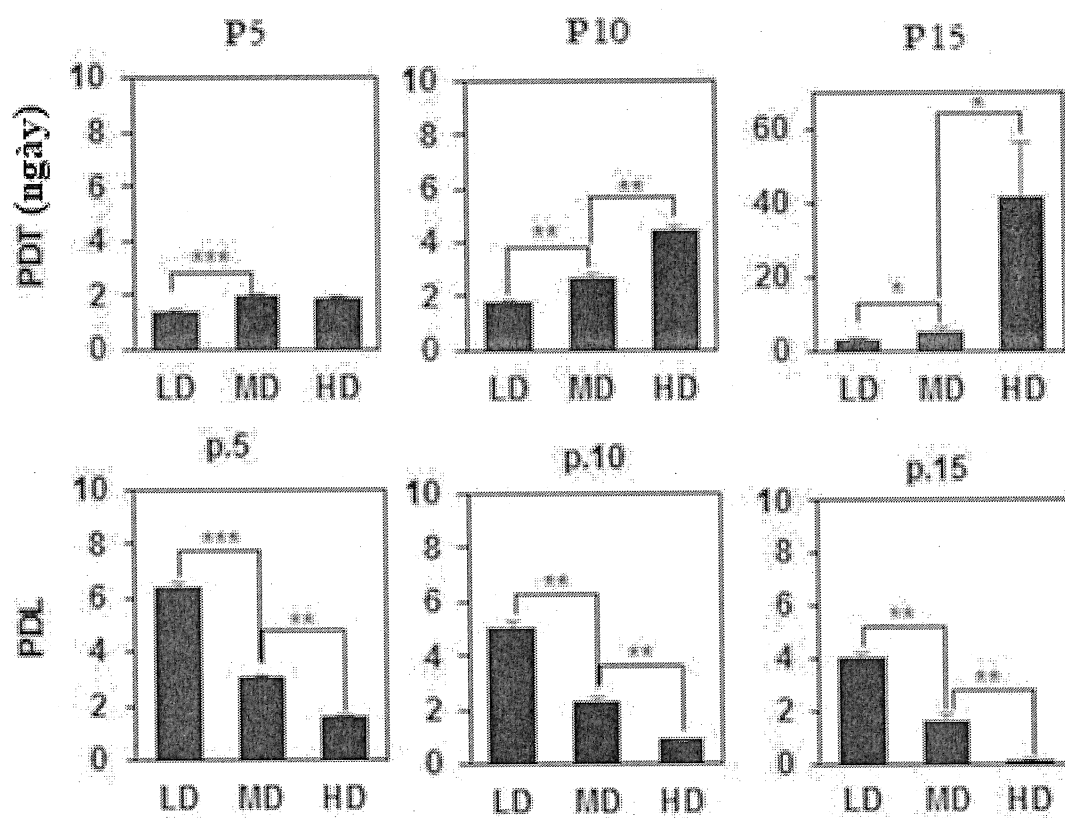


Fig. 6

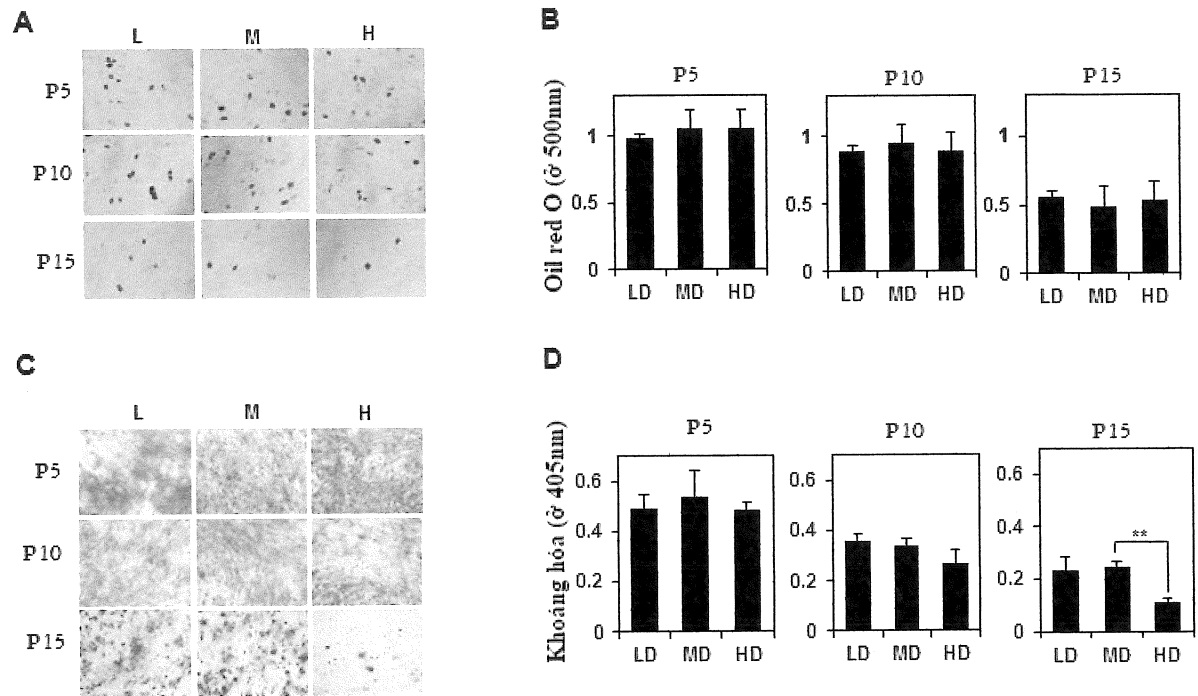


Fig. 7

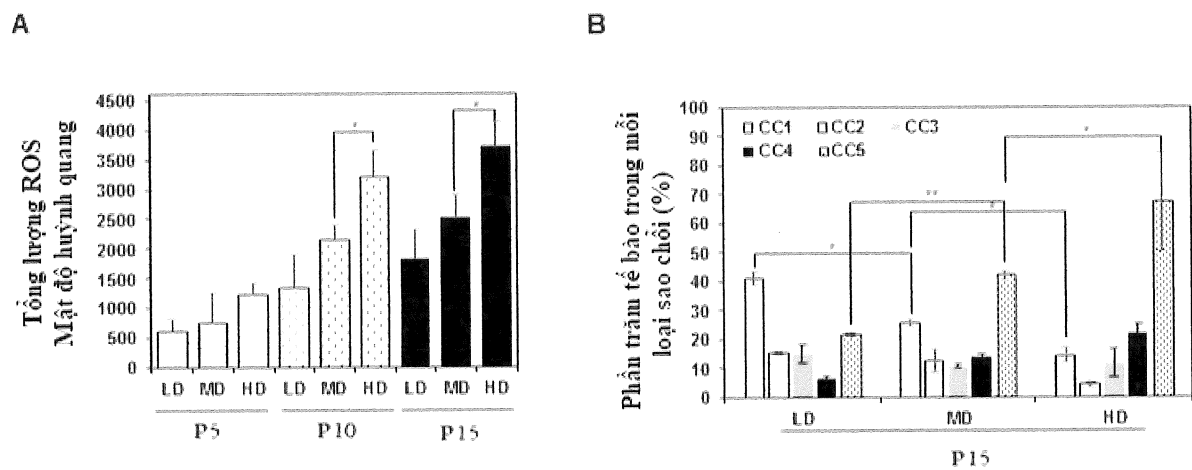
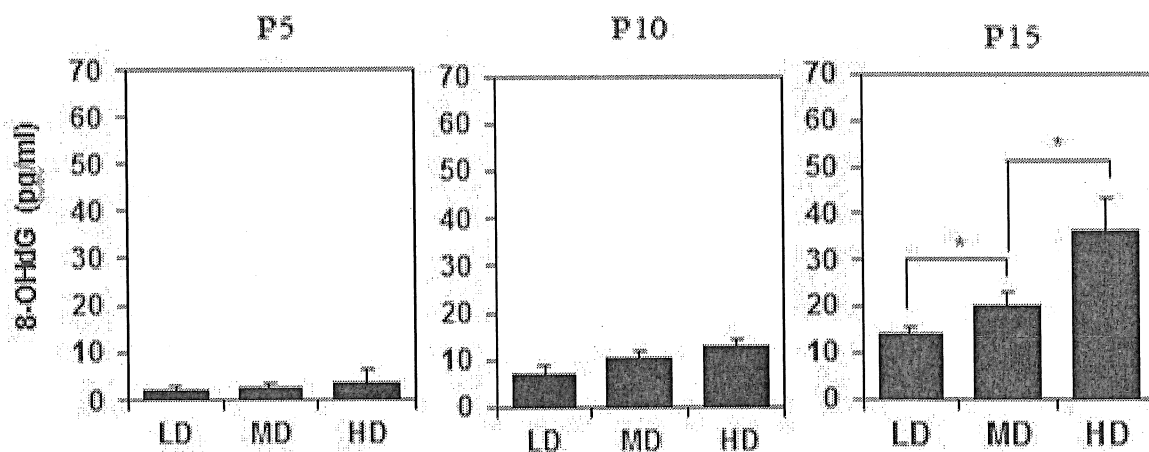


Fig. 8



\*8-OHdG:8-hydroxy- deoxyguanosin

Fig. 9

| Lần Tăng (F.I)         |         |         |         |
|------------------------|---------|---------|---------|
| tế bào/cm <sup>2</sup> | P11     | P13     | P15     |
| HD                     | 2,6±0,3 | 1,9±0,2 | 1,6±0,1 |
| HD + AA                | 3,8±0,5 | 2,9±0,1 | 2,5±0,2 |

| Chỉ số Tăng sinh Tương đối |      |      |      |
|----------------------------|------|------|------|
| tế bào/cm <sup>2</sup>     | p.11 | p.13 | p15  |
| HD                         | 1    | 1    | 1    |
| HD + AA                    | 1,46 | 1,52 | 1,56 |

Fig. 10

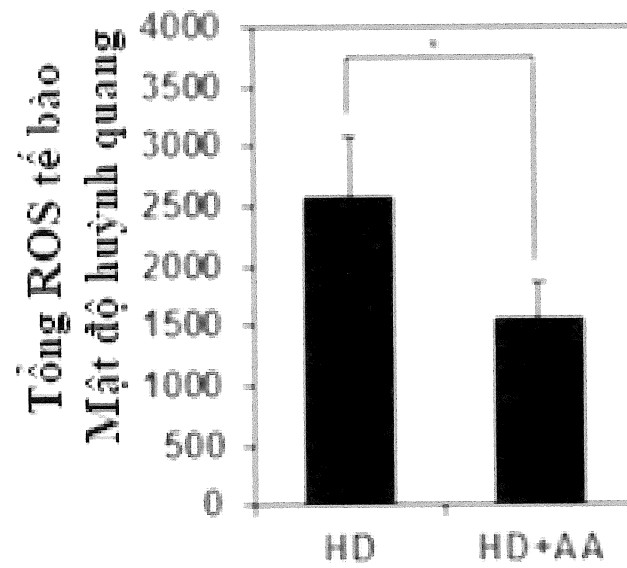


Fig. 11

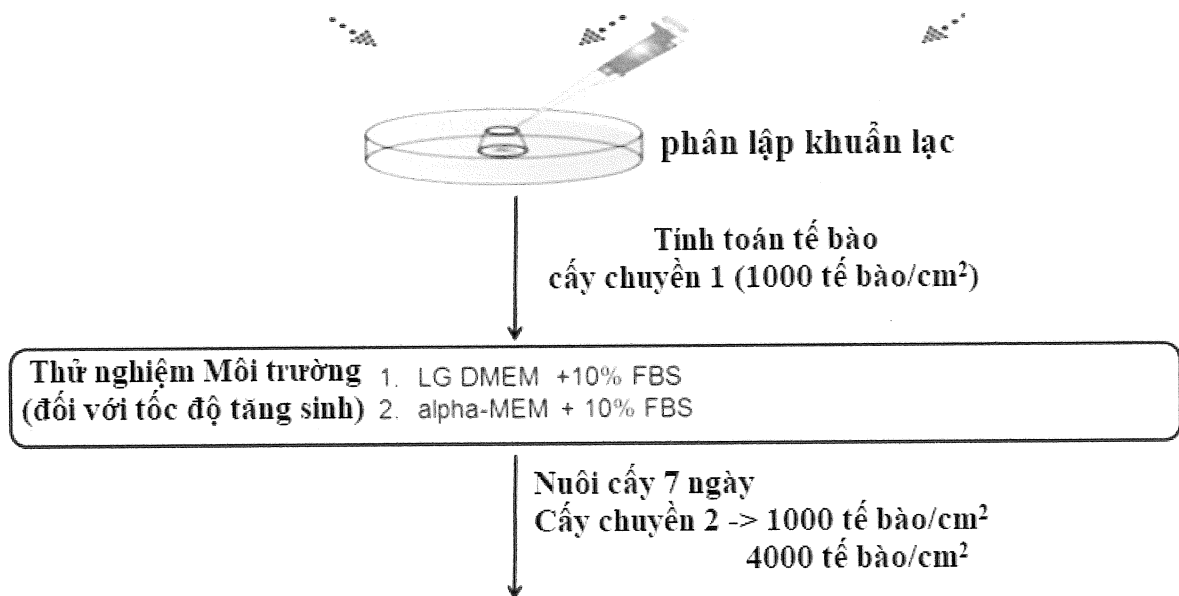


Fig. 12

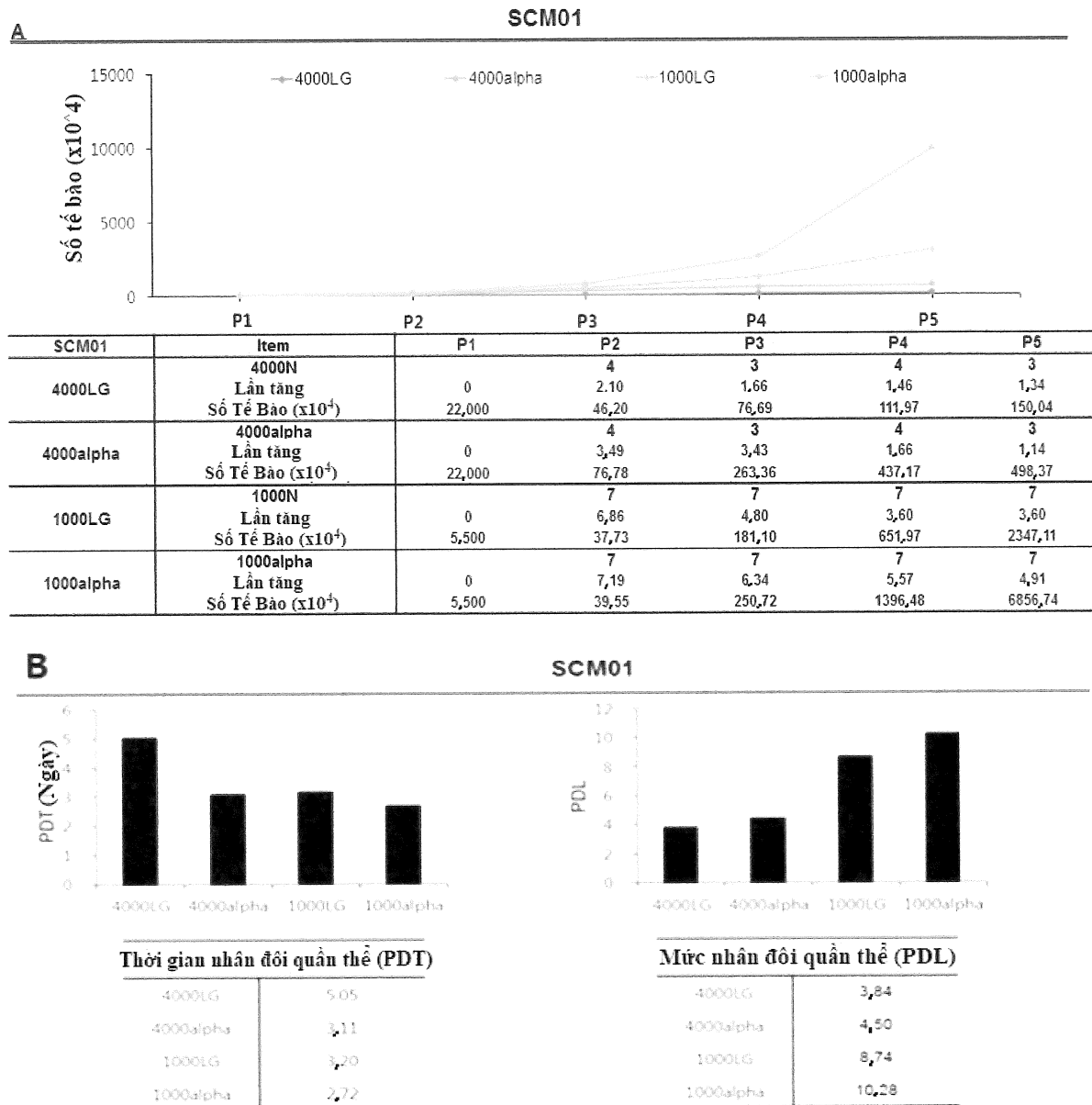
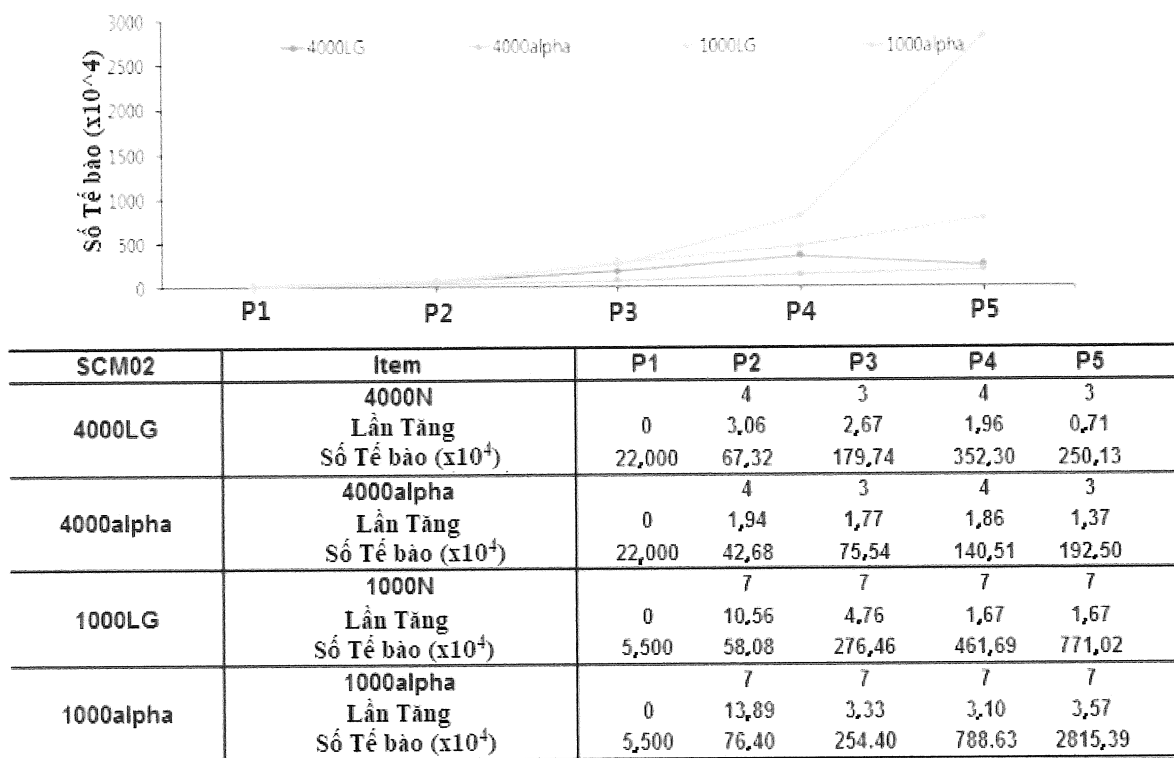


Fig. 13

A

SCM02



B

SCM02

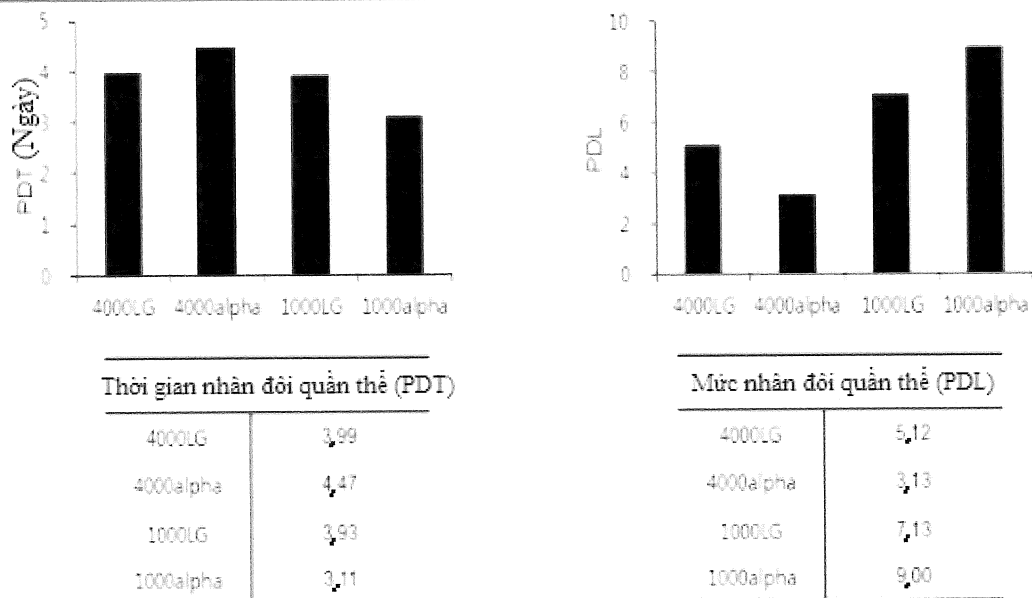


Fig. 14

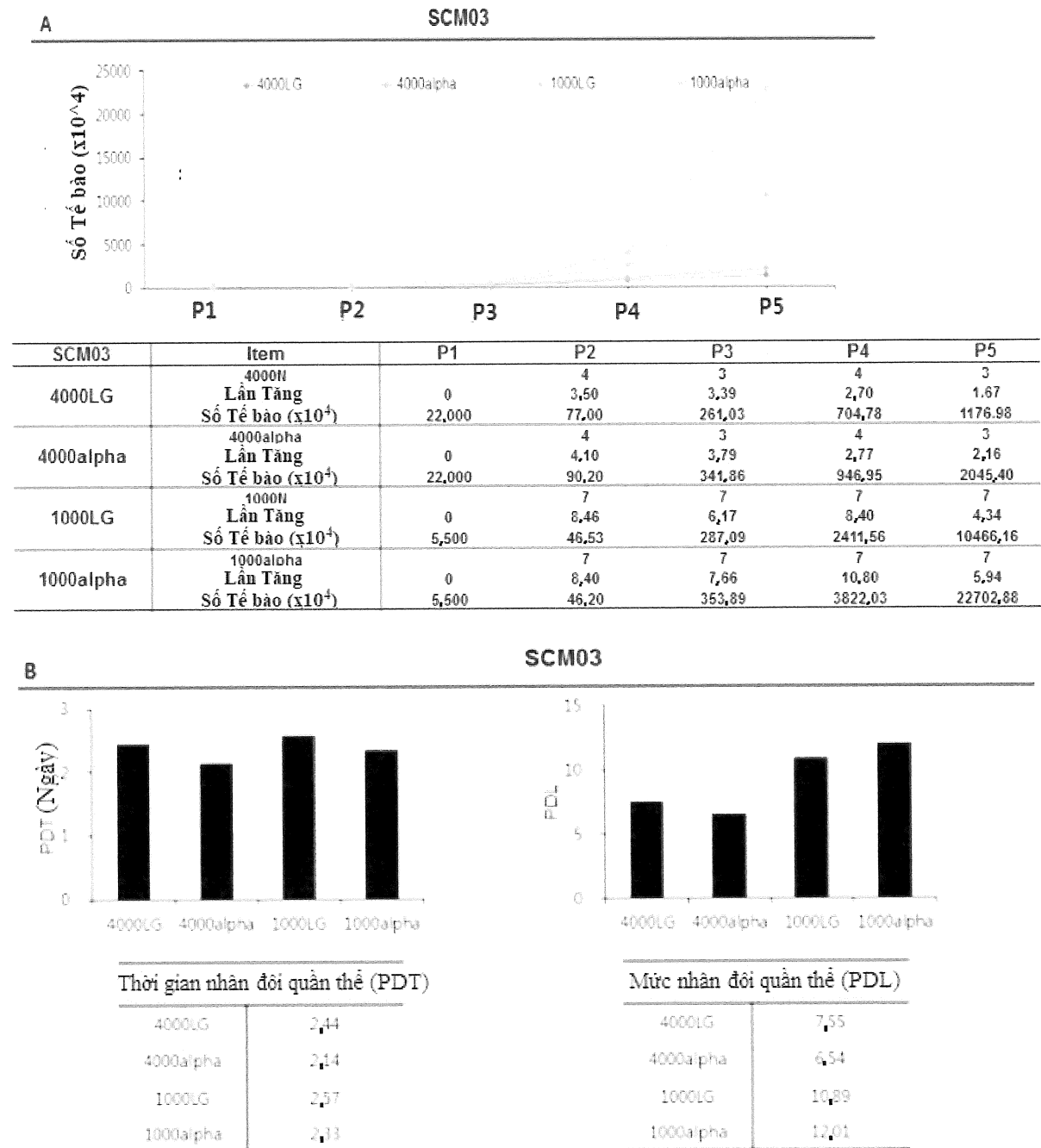


Fig. 15

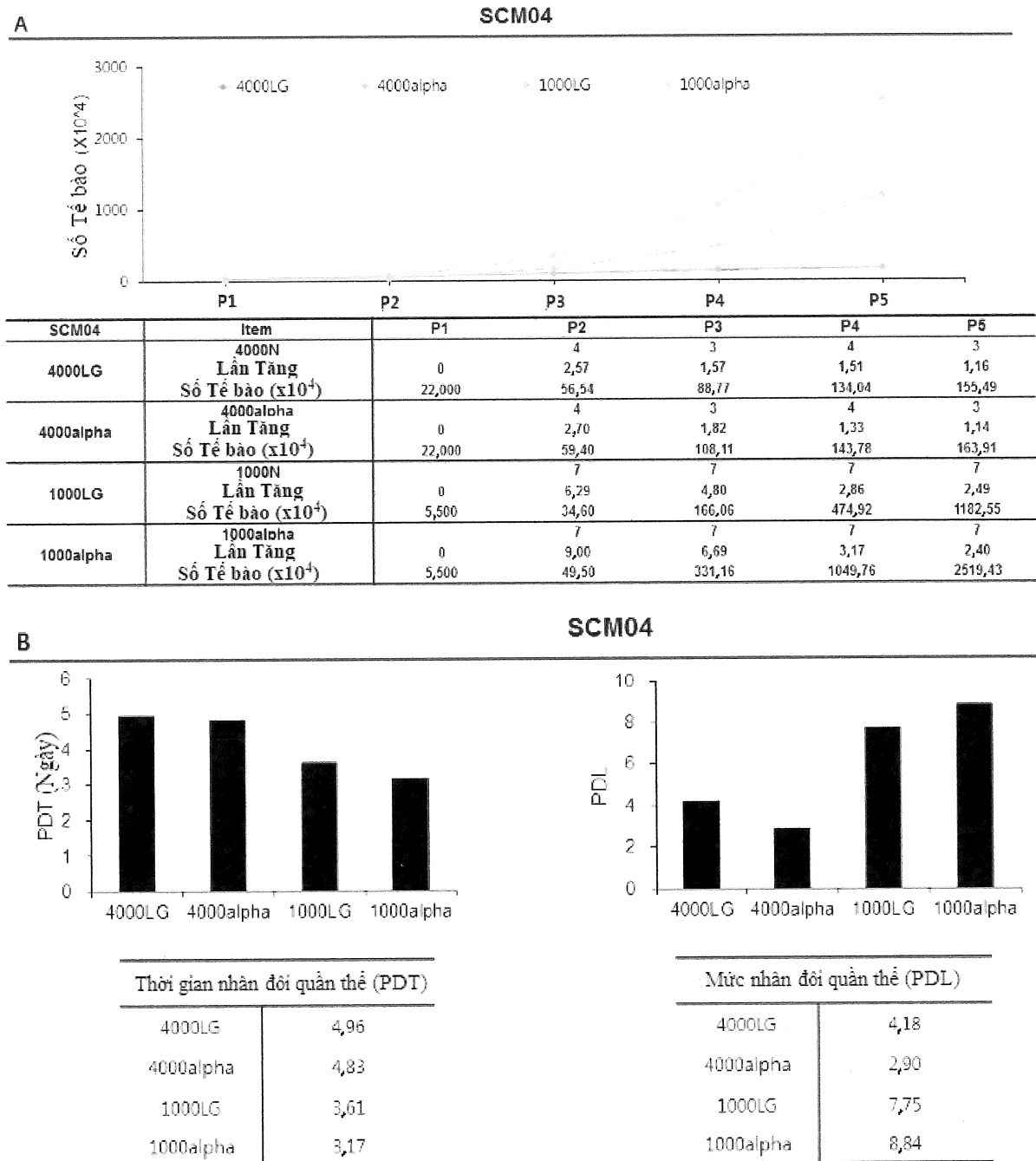


Fig. 16



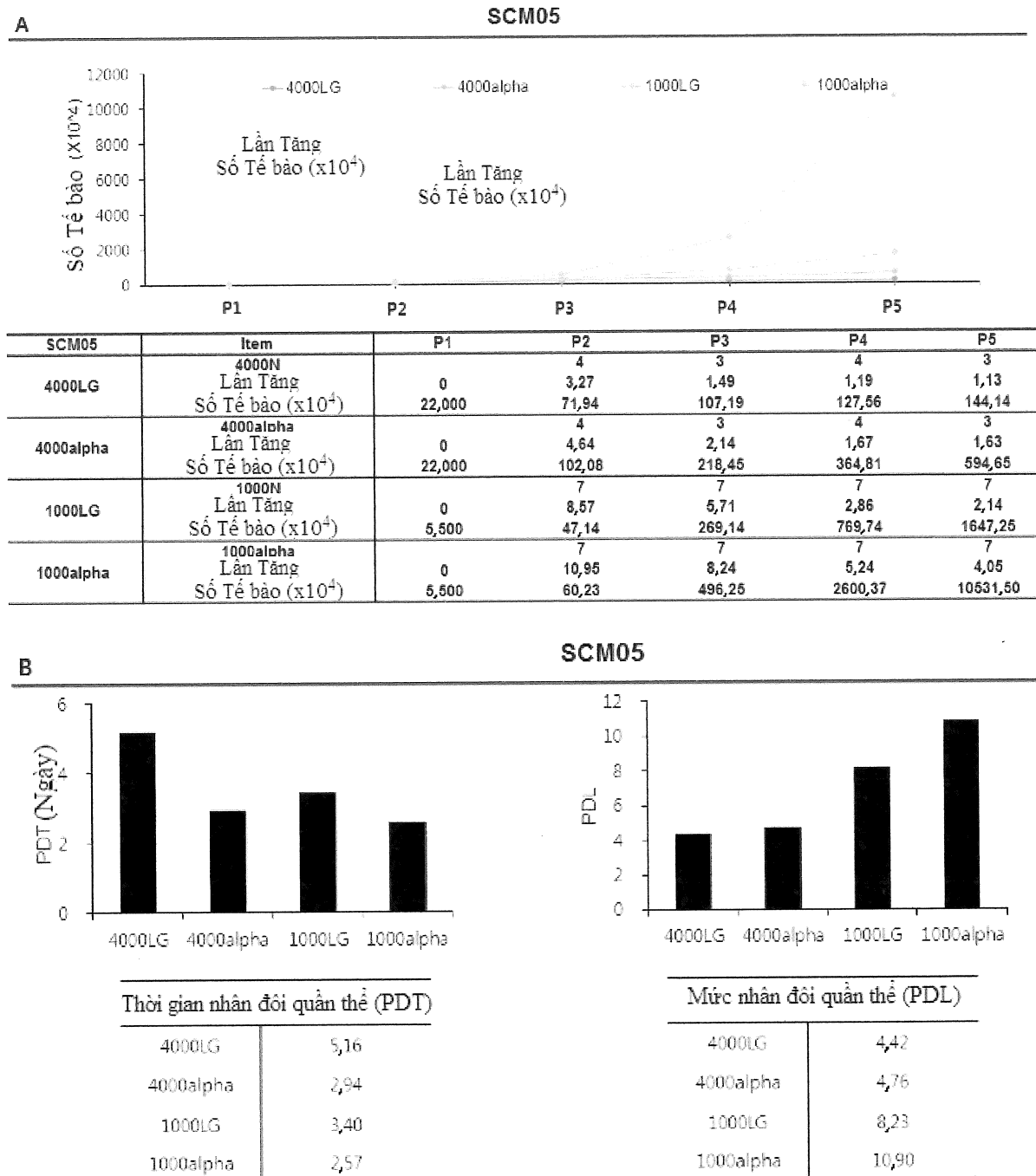


Fig. 17

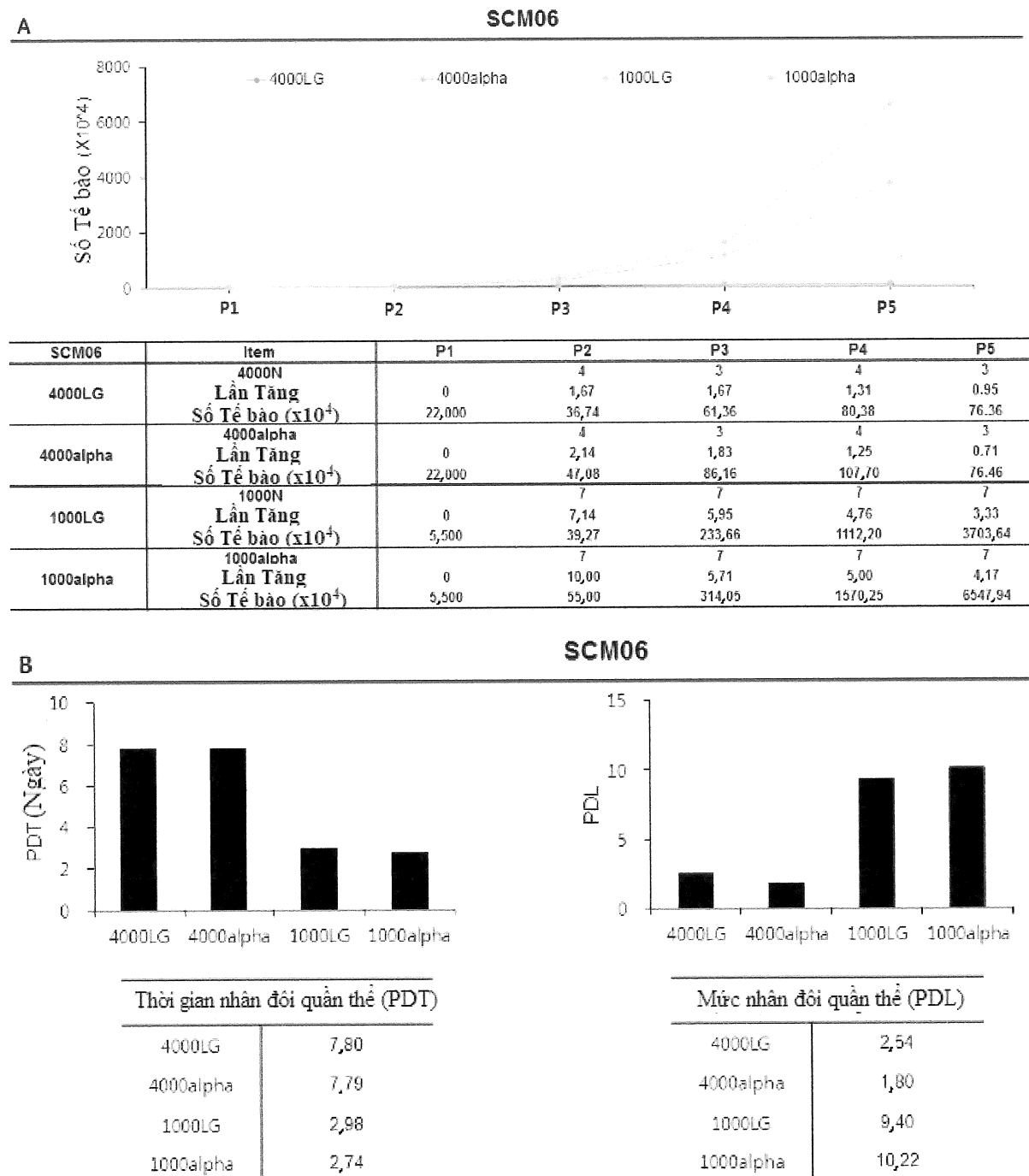


Fig. 18

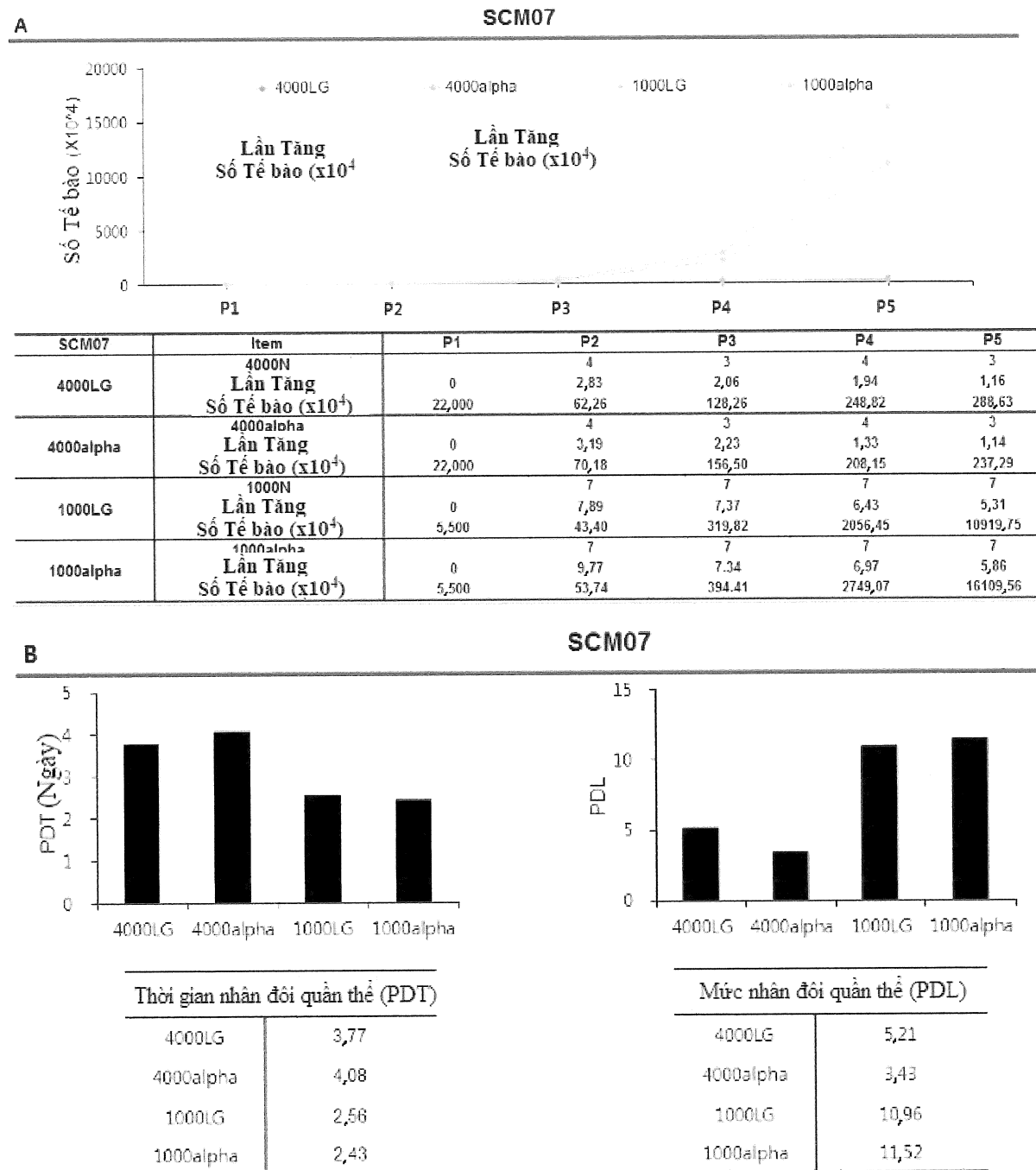


Fig. 19

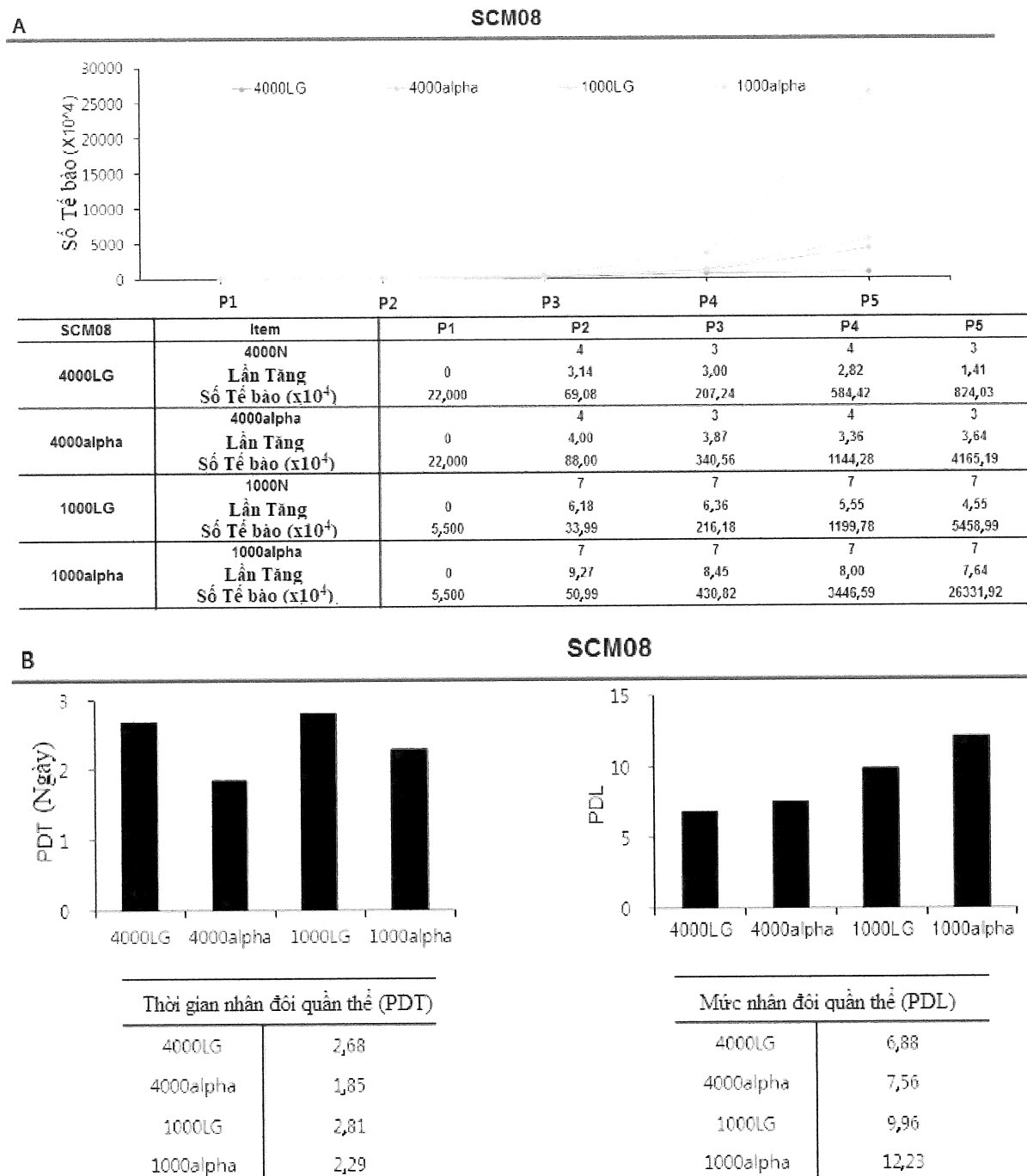


Fig. 20

| Tên Tế bào                                                 |                        | A0108   |        |          |         |         |         |          |         |
|------------------------------------------------------------|------------------------|---------|--------|----------|---------|---------|---------|----------|---------|
|                                                            |                        | SCM01   | SCM02  | SCM03    | SCM04   | SCM05   | SCM06   | SCM07    | SCM08   |
| 4000LG                                                     | P2 (X10 <sup>4</sup> ) | 22,00   | 22,00  | 22,00    | 22,00   | 22,00   | 22,00   | 22,00    | 22,00   |
|                                                            | P5 (X10 <sup>4</sup> ) | 150,04  | 250,13 | 1176,98  | 155,49  | 144,14  | 76,36   | 288,63   | 824,03  |
|                                                            | tốc độ tăng sinh P5/P2 | 6,82    | 11,37  | 53,50    | 7,07    | 6,55    | 3,47    | 13,12    | 37,46   |
| 1000LG                                                     | P2 (X10 <sup>4</sup> ) | 5,50    | 5,50   | 5,50     | 5,50    | 5,50    | 5,50    | 5,50     | 5,50    |
|                                                            | P5 (X10 <sup>4</sup> ) | 2347,11 | 771,02 | 10466,16 | 1182,55 | 1647,25 | 3703,64 | 10919,75 | 5458,99 |
|                                                            | tốc độ tăng sinh P5/P2 | 426,75  | 140,19 | 1902,94  | 215,01  | 299,50  | 673,39  | 1985,41  | 992,54  |
| tốc độ tăng sinh (P5)<br>1000 tế bào/cm2 / 4000 tế bào/cm2 |                        | 15,64   | 3,08   | 8,89     | 7,61    | 11,43   | 48,50   | 37,83    | 6,62    |

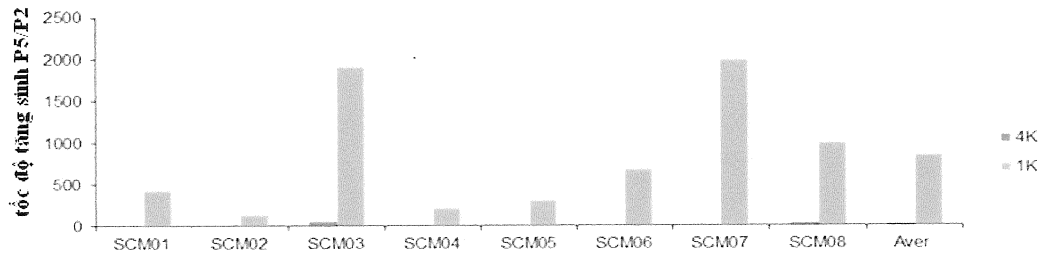


Fig. 21

| Tên Tế bào |        | A0108 |       |       |       |       |       |       |       |
|------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|            |        | SCM01 | SCM02 | SCM03 | SCM04 | SCM05 | SCM06 | SCM07 | SCM08 |
| PDT        | 4000LG | 5,05  | 3,99  | 2,44  | 4,96  | 5,16  | 7,80  | 3,77  | 2,68  |
|            | 1000LG | 3,20  | 3,93  | 2,57  | 3,61  | 3,40  | 2,98  | 2,56  | 2,81  |
| PDL        | 4000LG | 3,84  | 5,12  | 7,55  | 4,18  | 4,42  | 2,54  | 5,21  | 6,88  |
|            | 1000LG | 8,74  | 7,13  | 10,89 | 7,75  | 8,23  | 9,40  | 10,96 | 9,96  |

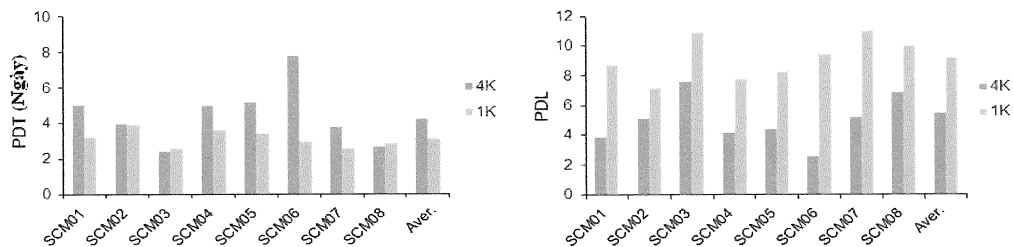


Fig. 22

| Tên Tế bào                                                                        |                        | A0108   |         |          |         |          |         |          |          |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------|---------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|----------|
|                                                                                   |                        | SCM01   | SCM03   | SCM04    | SCM05   | SCM06    | SCM07   | SCM08    | SCM09    |
| 4000alpha                                                                         | P2 (X10 <sup>4</sup> ) | 22,00   | 22,00   | 22,00    | 22,00   | 22,00    | 22,00   | 22,00    | 22,00    |
|                                                                                   | P5 (X10 <sup>4</sup> ) | 498,37  | 192,50  | 2045,40  | 163,91  | 594,65   | 76,46   | 237,29   | 4165,19  |
|                                                                                   | tốc độ tăng sinh P5/P2 | 22,65   | 8,75    | 92,97    | 7,45    | 27,03    | 3,48    | 10,79    | 189,33   |
| 1000alpha                                                                         | P2 (X10 <sup>4</sup> ) | 5,50    | 5,50    | 5,50     | 5,50    | 5,50     | 5,50    | 5,50     | 5,50     |
|                                                                                   | P5 (X10 <sup>4</sup> ) | 6856,74 | 2815,39 | 22702,88 | 2519,43 | 10531,50 | 6547,94 | 16109,56 | 26331,92 |
|                                                                                   | tốc độ tăng sinh P5/P2 | 1246,68 | 511,89  | 4127,80  | 458,08  | 1914,82  | 1190,54 | 2929,01  | 4787,62  |
| tốc độ tăng sinh (P5)<br>1000 tế bào/cm <sup>2</sup> /4000 tế bào/cm <sup>2</sup> |                        | 13,76   | 14,63   | 11,10    | 15,37   | 17,71    | 85,63   | 67,89    | 6,32     |

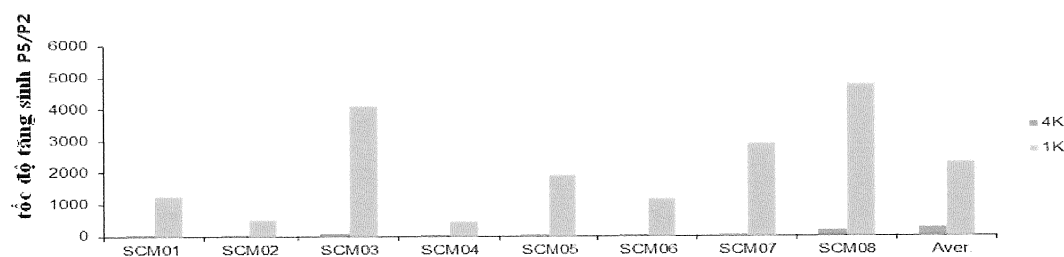


Fig. 23

| Tên Tế bào |           | A0108 |       |       |       |       |       |       |       |
|------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|            |           | SCM01 | SCM02 | SCM03 | SCM04 | SCM05 | SCM06 | SCM07 | SCM08 |
| PDT        | 4000alpha | 3,11  | 4,47  | 2,14  | 4,83  | 2,94  | 7,79  | 4,08  | 1,85  |
|            | 1000alpha | 2,72  | 3,11  | 2,33  | 3,17  | 2,57  | 2,74  | 2,43  | 2,29  |
| PDL        | 4000alpha | 4,50  | 3,13  | 6,54  | 2,90  | 4,76  | 1,80  | 3,43  | 7,56  |
|            | 1000alpha | 10,28 | 9,00  | 12,01 | 8,84  | 10,90 | 10,22 | 11,52 | 12,23 |

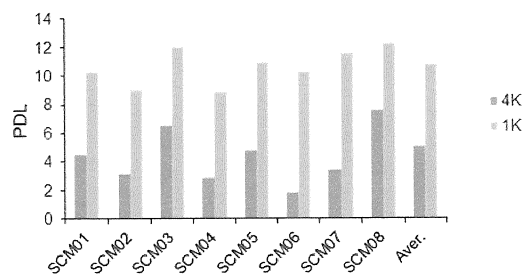
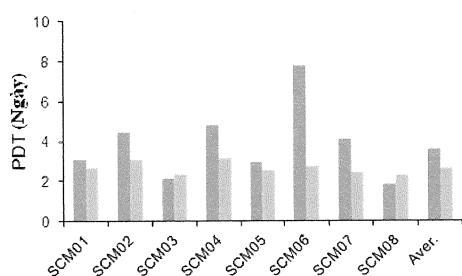


Fig. 24

| Tên Tế bào                          |                        | A0108   |         |          |         |          |         |          |          |
|-------------------------------------|------------------------|---------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|----------|
|                                     |                        | SCM01   | SCM02   | SCM03    | SCM04   | SCM05    | SCM06   | SCM07    | SCM08    |
| 1000 LG                             | P2 (X10 <sup>4</sup> ) | 5,50    | 5,50    | 5,50     | 5,50    | 5,50     | 5,50    | 5,50     | 5,50     |
|                                     | P5 (X10 <sup>4</sup> ) | 2347,11 | 771,02  | 10466,16 | 1182,55 | 1647,25  | 3703,64 | 10919,75 | 5458,99  |
|                                     | tốc độ tăng sinh P5/P2 | 426,75  | 140,19  | 1902,94  | 215,01  | 299,50   | 673,39  | 1985,41  | 992,54   |
| 1000 alpha                          | P2 (X10 <sup>4</sup> ) | 5,50    | 5,50    | 5,50     | 5,50    | 5,50     | 5,50    | 5,50     | 5,50     |
|                                     | P5 (X10 <sup>4</sup> ) | 6856,74 | 2815,39 | 22702,88 | 2519,43 | 10531,50 | 6547,94 | 16109,56 | 26331,92 |
|                                     | tốc độ tăng sinh P5/P2 | 1246,68 | 511,89  | 4127,80  | 458,08  | 1914,82  | 1190,54 | 2929,01  | 4787,62  |
| tốc độ tăng sinh (P5) α-MEM/LG DMEM |                        | 2,92    | 3,65    | 2,17     | 2,13    | 6,39     | 1,77    | 1,48     | 4,82     |

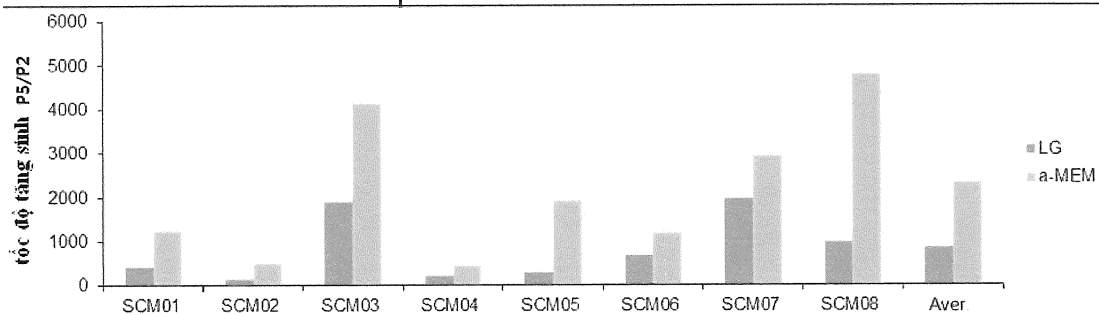


Fig. 25

| Cell Name |           | A0108 |       |       |       |       |       |       |       |
|-----------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|           |           | SCM01 | SCM02 | SCM03 | SCM04 | SCM05 | SCM06 | SCM07 | SCM08 |
| PDT       | 1000LG    | 3,20  | 3,93  | 2,57  | 3,61  | 3,40  | 2,98  | 2,56  | 2,81  |
|           | 1000alpha | 2,72  | 3,11  | 2,33  | 3,17  | 2,57  | 2,74  | 2,43  | 2,29  |
| PDL       | 1000LG    | 8,74  | 7,13  | 10,89 | 7,75  | 8,23  | 9,40  | 10,96 | 9,96  |
|           | 1000alpha | 10,28 | 9,00  | 12,01 | 8,84  | 10,90 | 10,22 | 11,52 | 12,23 |

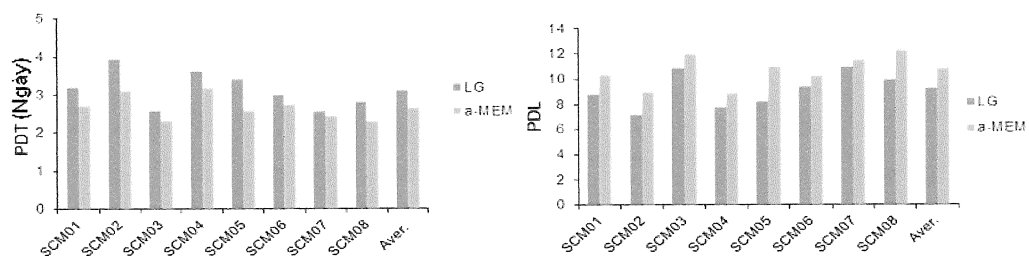


Fig. 26