



(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)



1-0033933

(51)⁷ C12N 5/02

(13) B

(21) 1-2017-02498

(22) 01/12/2015

(86) PCT/US2015/063114 01/12/2015

(87) WO2016/089825 A1 09/06/2016

(30) 62/086,526 02/12/2014 US; 14/954,335 30/11/2015 US

(45) 25/11/2022 416

(43) 25/01/2018 358A

(73) PolarityTE, Inc. (US)

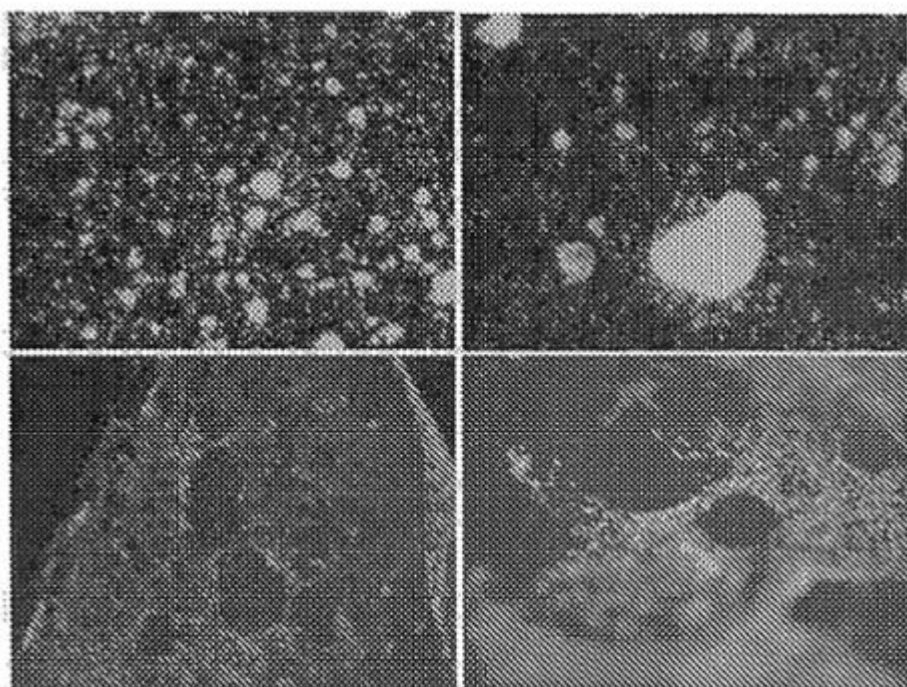
615 Arapeen Drive, Suite 102, Salt Lake City, UT 84108, United States of America

(72) LOUGH, Denver, M. (US).

(74) Công ty TNHH Sở hữu công nghiệp Sao Bắc Đẩu (SAO BAC DAU IP CO.,LTD)

(54) PHƯƠNG PHÁP BẢO CHẾ CHẾ PHẨM ĐA BÀO VI KẾT TỤ CÓ CỰC TỐI THIỂU

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp bào chế chế phẩm đa bào vi kết tụ có cực tối thiểu. Cấu trúc của các mảnh ghép đa bào vi kết tụ có cực tối thiểu theo sáng chế chứa các tế bào biểu hiện của thụ thể cặp đôi G-protein chứa đơn vị lặp lại giàu Leuxin (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled Receptor - LGR) để ứng dụng trong điều trị vết thương, kỹ thuật mô, ứng dụng trong liệu pháp tế bào, ứng dụng trong y học tái tạo, ứng dụng trong y học/điều trị, ứng dụng trong việc làm lạnh mô, ứng dụng trong điều trị miễn dịch, và ứng dụng trong điều trị bằng cách ghép mô, tốt hơn là liên quan đến vecto/chất nền/giá thể/khung protein có khả năng phân phối dùng cho ứng dụng trực tiếp.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến cấu trúc của các mảnh ghép đa bào vi kết tụ chứa các tế bào biểu hiện thụ thể cặp đôi G-protein chứa đơn vị lặp lại giàu Leuxin (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled Receptor - LGR) để ứng dụng trong điều trị vết thương, kỹ thuật mô, ứng dụng trong liệu pháp tế bào, ứng dụng trong y học tái tạo, ứng dụng trong y học/điều trị, ứng dụng trong việc làm lành vết thương, ứng dụng trong điều trị miễn dịch, và ứng dụng trong điều trị bằng cách ghép mô. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến LGR đa bào vi kết tụ có khả năng phân phối cấu thành trên véc tơ/chất nền /giá thể/khung protein phân phối dùng cho ứng dụng trực tiếp.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Qua nhiều năm, các bác sĩ lâm sàng và các nhà nghiên cứu đã tiến hành nghiên cứu các thuốc kháng sinh mà không chỉ làm giảm phạm vi vết thương do vi sinh vật mà còn có tác dụng phụ về độc tính thấp. Từ vết bỏng đến cả các vết thương cấp và mãn tính, có thể thao tác các peptit kháng vi sinh vật có nguồn gốc tự nhiên, xuất hiện tự nhiên, trong đó các tác nhân này thường hoạt động nhờ sự thấm qua màng, một cơ chế ít có khả năng dẫn đến tác dụng kháng khuẩn. Với nguy cơ tiếp tục bị nhiễm trùng ở các vết thương và dịch bệnh kháng vi khuẩn đang tiến triển đối với các liệu pháp kháng sinh hiện nay, có nhu cầu thực sự đối với sự phát triển một lớp thuốc kháng sinh khu trú mới để sử dụng cho các vết bỏng và vết thương ở da.

Có bốn giai đoạn chính để làm lành vết thương đã được mô tả trong thế kỷ qua: (1) sự cân bằng huyết tó, (2) viêm, (3) sự tăng sinh, và (4) mô hình hóa lại. Các giai đoạn tuần tự này được xác định trước bởi các loại tế bào đã đi vào vết thương và sau đó là do các loại cytokin và yếu tố sinh trưởng biểu hiện trong các mô.

Với sự tiến bộ gần đây trong việc tách và cấy ghép tế bào gốc có nguồn gốc trung mô và mỡ, các nhà nghiên cứu đã bắt đầu nghiên cứu làm thế nào các tế bào này cải thiện

quá trình lành và thay đổi biểu hiện trong từng giai đoạn, đặc biệt là trong suốt giai đoạn viêm để mô phỏng hóa lại các giai đoạn. Giống như các tế bào gốc có nguồn gốc trung mô và mỡ từ khoang sâu hơn, tế bào gốc biểu mô phát triển từ ngoại bì mầm, sau này phát triển các tế bào biểu mô bề mặt hơn, và do đó cũng có vai trò tiềm ẩn trong việc làm lành vết thương ở da. Vào thời điểm này, có rất ít nghiên cứu về cách ghép và sử dụng các tế bào gốc biểu mô biểu hiện LGR4, LGR5 và LGR6 được tách ra làm thay đổi biểu hiện gen làm lành vết thương.

Biết rằng quần thể tế bào gốc biểu mô biểu hiện LGR4, LGR5 và LGR6 thường bị phá hủy sau thiệt hại nghiêm trọng đủ dày lên da, để lại các mô không có khả năng sản xuất khoang biểu mô không có khả năng sống và tự duy trì. Mặc dù có sự kết hợp giữa các nỗ lực tạo hạt và fibrotic do viêm khu trú và các hóa chất tiếp theo của một loạt các thực thể tế bào, không có tế bào biểu mô, các mô còn lại được để lại mà không có khả năng tái tạo để hình thành biểu mô chức năng, nang lông, tuyến mồ hôi, hoặc tương tự.

Các tổn thương phức tạp đủ dày đối với mô người và mô của động vật có vú và/hoặc các vết thương phức tạp liên quan đến nhiều yếu tố mô (da, cơ, chất béo, mạch máu, dây thần kinh và xương) rất khó chữa được. Những tổn thương này và các vết thương tiếp theo cũng rất khó chữa trị thông qua các phương pháp chăm sóc vết thương hiện tại, can thiệp phẫu thuật với các công nghệ được chấp thuận hiện tại sử dụng các tế bào, các mô, các thiết bị, các thuốc sinh học, thuốc và/hoặc các yếu tố sinh trưởng. Một lý do phổ biến cho các khó khăn như vậy là các mô nằm trong hoặc xung quanh một ổ mô bị thương hoặc ổ mô bị tổn thương mà thường không có phụ thuộc lẫn nhau, các thành phần cần thiết: 1) tế bào di truyền và/hoặc quần thể tế bào gốc; 2) các yếu tố chất nền ngoại bào/khung protein và chất nền; và 3) sự kết hợp của các tương tác giữa hai và giữa nhiều thực thể tế bào và các chất nền. Sự thiếu hụt trong khoang tế bào, protein lõi của ECM (chất nền ngoại bào) và các giao diện tương tác liên quan sau đó dẫn đến sự thiếu sót trong việc tái tạo hoặc tạo ra kết cấu đa chiều cần thiết cho sự di chuyển tế bào, sự biệt hóa và sự phân cực mô. Nếu không có sự tương tác giữa tế bào với tế bào và tế bào với cơ chất, các thực thể tế bào còn lại bên trong ổ vết thương, bất kể khả năng tăng sinh hoặc tạo ra chuỗi thể hệ của chúng, đầu tiên đều phải tạo ra màng hữu ích hơn là phát triển cấu

trúc đa mô, phức tạp hơn có khả năng “hoạt động” chấp nhận được. Do đó, vết thương - liên quan đến da, cơ, mỡ, gân, xương - sẽ trở thành sẹo, rối loạn và rối loạn chức năng.

Các ứng dụng hiện tại trong lĩnh vực kỹ thuật mô của da nuôi cấy, sụn, xương, cơ, mạch máu, dây thần kinh, bạch huyết và các phần thay thế chủ yếu dựa vào chiến lược gồm ba phần: 1) lấy nguồn mô và thu hoạch huyền phù chứa tế bào từ các mô đó; 2) đưa các tế bào này lên chất nền hoặc khung protein; và 3) ghép mảnh cấu trúc lên hoặc vào vị trí đích của người hoặc động vật. Tuy nhiên, trong trường hợp không có các thành phần cần thiết, phụ thuộc lẫn nhau được xác định ở trên, các ứng dụng kỹ thuật mô, các ứng dụng điều trị bằng tế bào, các ứng dụng y học tái tạo, các ứng dụng làm lành vết thương và các ứng dụng điều trị ghép mô không có các kết cấu vi kết tụ tế bào tự nhiên cần để sắp xếp thành thạo các mô phân cực có chức. Vì vậy, do thiếu sự phụ thuộc lẫn nhau, khối lượng tế bào gốc và khung protein thích hợp ngăn ngừa các cấu trúc này có ích trong các ứng dụng điều trị như tái tạo mô nhiều ngăn và/hoặc tái tạo xương và cơ.

Do đó, một phần do những vấn đề nêu trên, các nỗ lực và nguồn lực đáng kể đã được cả ngành công nghiệp và các viện nghiên cứu định hướng để phát triển các chất thay thế mô tổng hợp, các cấu trúc tự ghép, cũng như các mảnh tự ghép kéo dài biểu bì thu được từ người bệnh (tức là, EPICEL® của Vericel Corporation of Cambridge MA.). Các sản phẩm này, mặc dù có lợi, thường đắt và không cung cấp cho bệnh nhân cấu trúc mô nhiều ngăn thật sự. Chẳng hạn, mảnh ghép tự thân biểu mô tự nuôi cấy (cultured epithelial autograft - CEA) không thể khôi phục lại cả hai lớp biểu bì và vùng da ở da nguyên thể. Nhưng do sự vắng mặt của các khoang có chức phụ thuộc lẫn nhau, các tế bào nuôi cấy được để lại mà không có sự gia tăng số lượng tế bào gốc và sự phân cực mô tiến hóa cần thiết để phát triển lớp biểu bì, da, tuyến và lông - điều này thực sự xác định làn da. Vấn đề này lần lượt dẫn đến sự đơn lớp, sự giòn, sự mất ổn định về biểu mô, sự phá vỡ rào cản, và sẹo.

Theo cách khác, các chất nền không tế bào mạnh khỏe hơn như ALLODERM® của LifeCell Corporation, INTEGRA® của Integra LifeSciences Corporation và DERMAMATRIX® sản phẩm của Foundation Transplant Musculoskeletal, mặc dù có

các phương pháp tái tạo tuyệt vời, thiếu các quần thể tế bào gốc của chuỗi tế bào được đặt vị trí cần thiết để phát triển các mô nguyên thể chức năng.

Các tác giả sáng chế gần đây đã báo cáo về sự nhận biết LGR5 và LGR6 như là chất đánh dấu của cả tế bào gốc ở ruột và biểu bì ở động vật có vú. Trong *Stimulation of the Follicular Bulge LGR5+ and LGR6+ Stem Cells with the Gut-Derived Human Alpha Defensin 5 Results in Decreased Bacterial Presence, Enhanced Wound Healing, and Hair Growth from Tissues Devoid of Adnexal Structures*, *Plast. Reconstr. Surg.* 132: 1159, 2013, thụ thể kết hợp G-protein chứa các đơn vị lặp lại giàu Leuxin là thụ thể protein xuyên màng có bảy đoạn có trình tự rõ rệt và cấu trúc tương đồng với các họ thụ thể của hormone kích thích nang, hormone kích thích tuyến giáp và hormone thể vàng.

Trong nghiên cứu này, các tác giả sáng chế đã nhận ra rằng alpha defensin 5 peptit làm tăng đáng kể sự hàn gắn vết thương và làm giảm lượng vi khuẩn cơ bản so với beta defensin 1 và sulfadiazin ở người. Alfa defensin 5 ở người là liệu pháp duy nhất để kích thích sự di chuyển tế bào gốc LGR vào ổ vết thương. Thêm vào đó, việc lập bản đồ nhiệt gen cho thấy sự điều chỉnh mRNA đáng kể của quá trình lành vết thương và các bản ghi đường dẫn Wnt như Wnt1 và Wisp1. Vì vậy, kết luận rằng alfa defensin 5 có thể được sử dụng để làm lành vết thương hiệu quả do sự gia tăng quan sát được sự di truyền của tế bào gốc LGR tăng lên ở các vết thương và làm giảm lượng vi khuẩn liên quan và tạo ra lông thông qua việc tăng các bản sao của Wnt và sản phẩm phiên mã hàn vết thương. Tóm lại, điều này và các điều khác đã dẫn tới việc nhận ra tiềm năng sử dụng LGR4 +, LGR5 + và LGR6 + biểu hiện các tế bào gốc biểu mô trong các cấu trúc mô mềm sinh học trực tiếp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm đa bào vi kết tụ có cực tối thiểu bao gồm các tế bào biểu hiện LGR sống được tách ra và giá thể đa chiều được chọn từ nhóm gồm có khung protein, collagen, chất nền, hạt, và sợi.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm đa bào vi kết tụ có cực tối thiểu bao gồm các tế bào biểu hiện LGR sống được tách ra và giá thể đa chiều được chọn từ nhóm gồm có khung protein, collagen, chất nền, hạt, và sợi, trong đó các tế bào biểu hiện

LGR được bổ sung các yếu tố sinh trưởng và trong đó các tế bào biểu hiện LGR được chọn từ nhóm gồm có LGR4, LGR5 và LGR6.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm đa bào vi kết tụ có cực tối thiểu bao gồm các tế bào biểu hiện LGR sống được tách ra và giá thể đa chiều được chọn từ nhóm gồm có khung protein, collagen, chất nền, hạt, và sợi trong đó các tế bào biểu hiện LGR được bổ sung với chất phân tích động/hồi phục và các tế bào biểu hiện LGR được chọn từ nhóm gồm có LGR4, LGR5 và LGR6.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm đa bào vi kết tụ có cực tối thiểu bao gồm các tế bào biểu hiện LGR sống được tách ra và giá thể đa chiều được chọn từ nhóm gồm có khung protein, collagen, chất nền, hạt, và sợi trong đó các tế bào biểu hiện LGR được bổ sung với các thành phần liên kết đặc hiệu LGR được chọn từ nhóm gồm có các họ phối tử, R spondin, EDGF, PDGF, Wnt, VEGF, và các peptit kháng vi sinh vật và trong đó các tế bào biểu hiện LGR được chọn từ nhóm gồm có LGR4, LGR5 và LGR6.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm đa bào vi kết tụ có cực tối thiểu bao gồm các tế bào biểu hiện LGR sống được tách ra và giá thể đa chiều được chọn từ nhóm gồm có khung protein, collagen, chất nền, hạt, và sợi trong đó chế phẩm được dùng làm sản phẩm chữa bệnh cho đích chọn lọc bao gồm vùng mô, vết thương, chỗ rỗng, mô hư hỏng, hoặc máu để thay thế cả mô liền kề xung quanh.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm đa bào vi kết tụ có cực tối thiểu, khác biệt ở chỗ, các tế bào biểu hiện LGR sống được tách ra được ghép vào mô hư hỏng để thúc đẩy sự hàn gắn ở đó.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm đa bào vi kết tụ có cực tối thiểu để sửa chữa hệ mô hoặc khôi phục toàn bộ cơ thể bao gồm khung protein phụ trợ với các tế bào chứa LGR được tách ra được cố định trên đó.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất mảnh ghép mô để sử dụng cho hệ mô có nguồn gốc từ ngoại bì, trung bì hoặc nội bì trên toàn bộ cơ thể động vật có vú.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp thu được chế phẩm đa bào vi kết tụ có cực tối thiểu đặc trưng bởi các bước nuôi cấy và phân lập các tế bào biểu hiện LGR sống để ghép vào mô đích của động vật có vú chọn lọc.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp thu được chế phẩm đa bào vi kết tụ có cực tối thiểu đặc trưng bởi các bước nuôi cấy và phân lập các tế bào biểu hiện LGR sống để ghép vào mô đích của động vật có vú chọn lọc, khác biệt ở chỗ, phương pháp này còn bao gồm bước cố định các tế bào biểu hiện LGR sống được tách ra lên giá thể đa chiều được chọn từ nhóm gồm có khung protein, collagen, chất nền, hạt, và sợi.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp thu được chế phẩm đa bào vi kết tụ có cực tối thiểu đặc trưng bởi các bước nuôi cấy và phân lập các tế bào biểu hiện LGR sống để ghép vào mô đích của động vật có vú chọn lọc, khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm bước lựa chọn các tế bào biểu hiện LGR từ nhóm gồm có LGR4, LGR5 và LGR6.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp bao gồm bước áp dụng đa bào vi kết tụ có cực tối thiểu lên một trong số nhóm gồm có hệ biểu mô, các tuyến, lông, thần kinh, xương, cơ, mỡ, gân, mạch máu, mô gân, mô mắt và các thành phần tế bào tiết peptit sử dụng hệ phân phối bởi phương pháp được chọn từ nhóm bao gồm áp dụng, ghép, cấy, nuôi cấy trực tiếp, di chuyển trực tiếp, lựa chọn trực tiếp, trong việc sắp đặt, tạo lớp mỏng và/hoặc bơm thành phần tế bào tạo ra, tái tạo, gia tăng và hàn gắn.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp thu nhận chế phẩm đa bào vi kết tụ có cực tối thiểu đặc trưng bởi các bước nuôi cấy và phân lập các tế bào biểu hiện LGR sống để ghép vào mô đích của động vật có vú chọn lọc, khác biệt ở chỗ, phương pháp này còn bao gồm bước áp dụng chế phẩm đa bào vi kết tụ có cực tối thiểu trực tiếp lên mô *in vivo* để khôi phục mô.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp thu nhận chế phẩm đa bào vi kết tụ có cực tối thiểu đặc trưng bởi các bước nuôi cấy và phân lập các tế bào biểu hiện LGR sống để ghép vào mô đích của động vật có vú chọn lọc, khác biệt ở chỗ,

phương pháp này còn bao gồm bước áp dụng không trực tiếp chế phẩm đa bào vi kết tụ có cực tối thiểu qua dòng máu để khôi phục mô trong cơ thể.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp để sản xuất chế phẩm đa bào vi kết tụ có cực tối thiểu đặc trưng bởi các bước:

- a) thu mẫu mô;
- b) chiết các đơn vị có chức có cực tối thiểu chứa các tế bào biểu hiện LGR từ mẫu nêu trên;
- c) xử lý các thành phần tế bào mỡ ở hạ bì và dưới da từ nguồn thích hợp;
- d) bổ sung các thành phần mỡ ở hạ bì và dưới da đã xử lý vào các đơn vị có chức có cực tối thiểu được chiết để tạo ra đơn vị đơn của tế bào gốc biểu mô;
- e) làm giàu đơn vị đơn của tế bào gốc biểu mô;
- f) bổ sung đơn vị đơn của tế bào gốc biểu mô vào khung protein cấu trúc; và
- g) kiểm tra sự duy trì sự phân cực tối thiểu của chế phẩm thu được.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất môi trường được sử dụng để thu được chế phẩm đa bào vi kết tụ có cực tối thiểu bằng cách sử dụng môi trường giữ tế bào để làm giảm khả năng sống được của vi sinh vật trong quá trình vận chuyển và xử lý mô, khác biệt ở chỗ, môi trường này chứa: a) hỗn hợp của các tế bào biểu mô và tế bào sừng ; b) ít nhất một chất được chọn từ nhóm gồm có penicillin, streptomycin, và amphotericin B; và c) fibrinogen.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất môi trường giữ tế bào để làm giảm khả năng sống được của các vi sinh vật trong quá trình vận chuyển và xử lý mô, khác biệt ở chỗ, môi trường này chứa: a) hỗn hợp của các tế bào và tế bào sừng biểu mô; b) ít nhất một chất được chọn từ nhóm gồm có penicillin, streptomycin, và amphotericin B; và c) fibrinogen, trong đó fibrinogen là người và trong đó chất này bao gồm cả chất kháng sinh và thuốc chống nấm để làm ổn định mô của người.

Theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế, khác biệt ở chỗ, các tế bào biểu hiện LGR được áp dụng lên nền khung protein, và/hoặc sợi nhơ đó tạo nên các mảnh ghép đa bào vi

kết tụ dùng cho ứng dụng trong kỹ thuật mô, ứng dụng điều trị tế bào, ứng dụng trong y học tái tạo, ứng dụng trong điều trị/y học, các mảnh ghép được áp dụng trực tiếp lên mô hoặc máu để gia tăng và hoặc thay thế hệ biểu mô của toàn bộ cơ thể.

Theo khía cạnh thứ hai của sáng chế, khác biệt ở chỗ, các tế bào biểu hiện LGR được áp dụng lên khung protein, chất nền, và/hoặc sợi có hoặc không có các yếu tố gia tăng bổ sung hoặc các chất phân tích trước hoặc sau khi được áp dụng lên mô hoặc máu để gia tăng và hoặc thay thế *in vivo* hệ biểu mô.

Theo khía cạnh thứ ba của sáng chế, khác biệt ở chỗ, các tế bào biểu hiện LGR được thay thế bởi các yếu tố gia tăng hoặc các chất phân tích, được áp dụng như là đích trong cơ thể, mô hoặc máu để gia tăng và/hoặc thay thế hệ biểu mô thông qua sự di chuyển cục bộ hoặc xa qua toàn bộ cơ thể và/hoặc để khôi phục sự phát triển tuyến và lông.

Theo khía cạnh thứ tư của sáng chế, khác biệt ở chỗ, việc ghép các tế bào biểu hiện LGR từ mô, máu hoặc nuôi cấy để thay thế mô liền kề xung quanh hoặc các mô xa như, nhưng không chỉ bao gồm, các tế bào biểu hiện LGR được áp dụng lên khung protein, chất nền, và sợi trước hoặc sau khi được áp dụng lên mô hoặc máu để gia tăng và hoặc thay thế các hệ mô có nguồn gốc từ ngoại bì, trung bì hoặc nội bì qua toàn bộ cơ thể.

Theo khía cạnh thứ năm của sáng chế, khác biệt ở chỗ, việc áp dụng trực tiếp các tế bào biểu hiện LGR đến chất mang nền phân phối được chọn từ nhóm gồm có khung protein, chất nền, và sợi có hoặc không có các yếu tố gia tăng bổ sung hoặc các chất phân tích trước hoặc sau khi được áp dụng lên mô hoặc máu để gia tăng và hoặc thay thế các hệ mô có nguồn gốc từ ngoại bì, trung bì hoặc nội bì của toàn bộ cơ thể.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, khác biệt ở chỗ, việc kết hợp các tế bào biểu hiện LGR được thay thế bởi các yếu tố gia tăng hoặc các chất phân tích, với chất nền phụ trợ phân phối như là đích trong cơ thể, mô hoặc máu để gia tăng và hoặc thay thế các hệ mô có nguồn gốc từ ngoại bì, trung bì hoặc nội bì của toàn bộ cơ thể thông qua sự di chuyển cục bộ hoặc xa qua toàn bộ cơ thể.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, khác biệt ở chỗ, việc dính kết các tế bào biểu hiện LGR lên chất nền phụ trợ để phân phối, áp dụng, ghép, cấy, nuôi cấy trực tiếp,

di chuyển trực tiếp, lựa chọn trực tiếp, trong việc sắp đặt, tạo lớp mỏng và/hoặc bơm thành phần tế bào tạo ra, tái tạo, gia tăng và/hoặc hàn gắn hệ biểu mô, các tuyến mồ hôi, nang lông, thần kinh, xương, cơ, mỡ, gân, mạch máu, mô gân, mô mắt và các thành phần tế bào tiết peptit.

Khía cạnh cuối cùng của sáng chế là đề cập đến việc tạo ra các tế bào gốc biểu hiện LGR là các đơn vị có chức năng đa bào vì kết tụ thể hiện sự phân cực tối thiểu để ghép và áp dụng trực tiếp lên đích trong cơ thể động vật có vú, mô hoặc máu để gia tăng và thúc đẩy việc tạo ra, tái tạo, gia tăng và/hoặc hàn gắn mô.

Theo các khía cạnh chung nhất, sáng chế bao gồm việc ghép và/hoặc phân phối các tế bào biểu hiện LGR được tách ra (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor) để tạo ra, tái tạo, khôi phục hoặc gia tăng hệ biểu mô, lông, tuyến, xương. Sáng chế cũng bao gồm việc áp dụng lên cả mô khu trú/lân cận và xa/khoảng cách trong các cấu trúc dùng cho y học lâm sàng, kỹ thuật y sinh và/hoặc nghiên cứu bằng cách sử dụng chất mang phân phối trong dạng khung protein, chất nền hoặc sợi có hoặc không có việc bổ sung các yếu tố sinh trưởng động/chất phân tích phục hồi hoặc yếu tố liên kết đặc hiệu LGR như, nhưng không chỉ giới hạn ở, họ phối tử: R-spondin, EDGF, PDGF, Wnt, VEGF, peptit kháng khuẩn.

Việc sử dụng các tế bào gốc biểu mô LGR, đặc biệt kết hợp với nền khung protein thu được, tạo ra các vết thương đủ dày và hoặc chỗ rỗng trong hệ biểu mô với phần tử thay thế mô giàu tế bào gốc. Hơn nữa, việc bổ sung đơn vị tế bào có chức năng cực tối thiểu (MPFU) này đến hệ biểu mô làm gia tăng/cải thiện tình trạng của biểu mô mà bao gồm sự phát triển, tạo ra hoặc tái tạo lông, các tuyến, các peptit kháng khuẩn được tiết ra, các yếu tố sinh trưởng và các chất phân tích thường yêu cầu để duy trì và thúc đẩy sự hồi phục và khả năng sống được của các thành phần biểu mô và mô xung quanh.

Nhận ra rằng tế bào gốc LGR4+, LGR5+ và LGR6+ và động học tăng sinh tế bào gốc vẫn duy trì mức cao, đặc biệt là khi tiếp xúc với nền khung protein, tỉ lệ luân chuyển biểu mô hoàn toàn thường ít hơn 12 ngày (khoảng cách giữa các quần thể 1cm). Khả năng tái tạo lớp mô kép đủ và có chức năng rào chắn sau đó cho thấy vai trò đối với các tế bào như là một loại của sự phát triển sinh học cho các vết thương đa mô phức tạp đủ dày.

Ngoài khả năng tái tạo da, cơ và xương nhanh chóng, tế bào tiền thân của các tế bào gốc LGR4, LGR5 và LGR6 cũng có khả năng tạo ra các peptit kháng khuẩn nguyên thể mà không chỉ làm giảm mức cơ bản của vi sinh vật trong vết thương mà còn tăng lên sự khuếch đại và sự biệt hóa của các tế bào tiền thân, dẫn đến giảm các vết thương và sự viêm nhiễm quanh vết thương, làm lành vết thương nhanh hơn, và sự phát triển nang lông.

Sáng chế đề cập đến khả năng phiên mã của khung protein được cung cấp tế bào gốc biểu mô biểu hiện LGR để tạo ra rào chắn mô trung gian, phân phối được và có thể sống được mà có khả năng duy trì dòng tế bào gốc tập trung với tế bào con mới hình thành. Từ các nhân tế bào gốc, tế bào con mới có thể phải chịu sự biệt hóa - tăng sinh di chuyển để kích thích các thành phần biểu mô, hàn gắn và tích hợp mảnh ghép. Đã phát hiện ra rằng các tế bào gốc biểu mô LGR có thể được áp dụng một mình, với khung protein, hòa tan các yếu tố sinh trưởng và/hoặc tế bào bổ sung thúc đẩy sự phân cực của quần thể xung quanh khung protein cũng như kết cấu mô bên trong cần thiết để hàn gắn biểu mô và tái tạo tế bào.

Theo nghĩa rộng nhất, phương pháp theo sáng chế bao gồm: a) thu hoạch mô người/động vật có vú sống; b) xử lý thành phần mô để tạo ra các đơn vị có chức đa bào vi kết tụ chứa các tế bào biểu hiện LGR; c) áp dụng các đơn vị có chức đa bào vi kết tụ tế bào biểu hiện LGR vào nền chất mang phân phối được chọn từ nhóm gồm có khung protein, chất nền, hạt, các tế bào và sợi để tạo ra cấu trúc; d) tùy ý bao gồm các yếu tố gia tăng bổ sung chọn lọc; và e) áp dụng sản phẩm lên các mô để tạo ra, tái tạo, gia tăng và/hoặc hàn gắn hệ mô bao gồm các mô liên quan đến các mô có nguồn gốc ngoại bì, trung bì và/hoặc nội bì bao gồm, nhưng không giới hạn ở, da, các tuyến, lông, thần kinh, xương, cơ, mỡ, gân, mạch máu, mô gân, mô mắt, xương tủy, phổi, tim, móng tay, mô ruột dạ dày, mô miệng, răng, vị giác, niệu mô sinh dục, mô thận, mô sinh sản, mô bạch huyết, mô/thành phần hệ miễn dịch và các thành phần phụ liên quan và tế bào protein.

Sáng chế cũng đề cập đến sự phân phối trực tiếp tế bào gốc biểu mô biểu hiện LGR trực tiếp bằng cách áp dụng, ghép, cấy, nuôi cấy trực tiếp, di chuyển trực tiếp, lựa

chọn trực tiếp, trong việc sắp đặt, tạo lớp mỏng và/hoặc bơm thành phần tế bào để thay thế mô của động vật có vú trong việc điều trị, thiết bị, y học, thuốc và kỹ thuật y sinh.

Các định nghĩa

Trong phần mô tả chi tiết sáng chế, việc viện dẫn đến “một phương án”, “phương án”, hoặc “theo phương án” dùng để chỉ đặc điểm đi kèm bao gồm trong ít nhất một phương án theo sáng chế. Hơn nữa, việc viện dẫn tách riêng “một phương án”, “phương án”, hoặc “theo phương án” không nhất thiết dùng để chỉ cùng phương án; tuy nhiên, không phương án nào loại trừ hoàn toàn, trừ phi thể hiện như vậy, và ngoại trừ việc là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Vì vậy, sáng chế có thể bao gồm nhiều tổ hợp và/hoặc tích hợp các phương án nêu trên. Thuật ngữ được sử dụng ở đây chỉ cho mục đích mô tả phương án cụ thể duy nhất và không dự định giới hạn sáng chế.

Trong bản mô tả này, dạng từ, “một”, v.v., được dự định bao gồm nhiều dạng số nhiều cũng như, trừ khi phần mô tả được chỉ ra rõ ràng theo cách khác. Cũng cần phải hiểu là từ gốc “bao gồm” hoặc “có”, khi được sử dụng trong phần mô tả này, cụ thể hóa sự có mặt của các đặc điểm, bước, công đoạn, thành phần, và/hoặc hợp phần, nhưng không bao gồm sự có mặt hoặc bổ sung ít nhất một đặc điểm khác, bước, công đoạn, yếu tố khác và/hoặc nhóm của nó.

Trong bản mô tả này xương là mô liên kết cứng gồm các tế bào gắn vào khuôn gồm chất nền được khoáng hóa và sợi collagen. Các sợi này được nhiễm thành phần vô cơ, bao gồm tinh thể canxi phosphat, do đó bằng cách sử dụng chụp x-quang, xương cho thấy được cấu tạo từ mẫu hydroxyapatit (canxi phosphat chiếm 85% trọng lượng) còn thêm canxi cacbonat (10%), và magie; trọng lượng, xương gồm có 65-75% chất vô cơ và 25-35% chất hữu cơ; một phần của mô xương có hình dạng và kích thước nhất định, tạo thành một phần bộ xương của động vật; ở người có khoảng 200 xương khác nhau trong bộ xương, không bao gồm các xương nhỏ thính giác của lỗ nhĩ hoặc xương vùng trừ hai xương bánh chè. Xương được bao bởi màng sợi, màng xương mà phủ toàn bộ bề mặt của xương ngoại trừ sụn khớp. Bên dưới màng xương là lớp đặc, xương đặc, và bên dưới nó là lớp xốp, xương xốp. Lõi của xương dài chứa đầy tủy.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “là”, “bao gồm”, “gồm có”, “chứa”, “có”, “có chứa” hoặc bất kỳ biến khác nào của nó, được dự định bao gồm khái niệm không giới hạn. Ví dụ, quy trình, phương pháp, sản phẩm, hoặc thiết bị mà bao gồm sự liệt kê các đặc điểm không cần thiết chỉ giới hạn ở các đặc điểm này mà còn bao gồm các đặc điểm khác không được liệt kê hoặc ngụ ý như quy trình, phương pháp, sản phẩm, hoặc thiết bị này.

Trong bản mô tả này biểu mô là lớp tế bào bao phủ toàn bộ các bề mặt tự do, da, màng nhầy, và huyết thanh, bao gồm các tuyến và các cấu trúc khác có nguồn gốc từ đó.

Trong bản mô tả này GMP dùng để chỉ sự thực hành sản xuất tốt.

Trong bản mô tả này màng bao dùng để chỉ lớp màng bao cơ thể; bao gồm, ngoài biểu bì và da, tất cả dạng của biểu bì, lông, móng tay, các tuyến mồ hôi và bã nhờn, và các tuyến vú, cũng như mô dưới da.

Trong bản mô tả này LGR4 dùng để chỉ thụ thể liên kết G-protein chứa đoạn lặp lại giàu leuxin 4, thụ thể liên kết G-protein (GPCRs) đóng vai trò quan trọng trong nhiều có chức sinh lý học. Các thành viên của họ GPCR (LGR) giàu leuxin, như GPR48, có nhiều đoạn lặp lại giàu leuxin ở đầu tận cùng N (LRRs) và 7 vùng xuyên màng. LGR4 (Thụ thể liên kết G-protein chứa đoạn lặp lại giàu leuxin 4) là một gen mã hóa cho protein. Các bệnh liên quan đến LGR4 bao gồm loãng xương. Trong số cáccon đường liên quan đến nó là con đường truyền tín hiệu Wnt (KEGG). Lời giải thích GO liên quan đến gen này gồm hoạt động của thụ thể liên kết G-protein và hoạt động của thụ thể xuyên màng. Paralog quan trọng của gen này là LGR6. Thụ thể của R-spondins tạo tiềm năng cho con đường truyền tín hiệu Wnt tiêu chuẩn và liên quan đến sự hình thành nhiều cơ quan khác nhau. Khi liên kết với R-spondins (RSPO1, RSPO2, RSPO3 hoặc RSPO4), cùng với LRP6 được phosphoryl hóa và thụ thể frizzled được hoạt hóa bởi thụ thể Wnt ngoại bào, khởi động con đường truyền tín hiệu Wnt tiêu chuẩn để tăng biểu hiện của gen đích.

Ngược lại với thụ thể liên kết G-protein kinh điển, LGR4 không hoạt hóa heterotrimeric G-proteins để truyền tín hiệu. Có chức hoạt hóa con đường truyền tín hiệu Wnt là cần thiết cho sự phát triển của nhiều cơ quan khác nhau, bao gồm gan, thận, ruột, xương, đường sinh dục và mắt. LGR4 có thể cũng hoạt động như là thụ thể của norrin

(NDP) và cần trong suốt quá trình sinh tinh để hoạt hóa con đường truyền tín hiệu Wnt ở tế bào dạng cơ quanh ống. Tương tự như vậy, LGR4 cần cho sự duy trì các tế bào gốc của ruột và tế bào Paneth biệt hóa trong khe ruột sau khi sinh. LGR4 cũng đóng vai trò là chất điều biến sự hình thành và mô hình hóa lại xương cùng với tham gia vào sự phát triển của thận; cần thiết để duy trì chồi niệu quản ở trạng thái chưa biệt hóa. LGR4 liên quan đến sự phát triển của phần trước của mắt, cần thiết cho quá trình tạo hồng cầu và đóng vai trò là chất điều biến giảm của hệ miễn dịch bẩm sinh bằng cách ức chế sự nhận biết mẫu liên kết với TLR2/TLR4 và sự sản sinh cytokin tiền viêm. LGR đóng vai trò quan trọng trong điều hòa nhịp ngày đêm của lipid huyết tương, một phần thông qua sự biểu hiện nhịp nhàng của MTTP (bằng cách tương tự). Tên thường được biết đến của LGR4 bao gồm: GPR48; thụ thể liên kết G Protein 48; BNMD17; thụ thể liên kết G-protein chứa đoạn lặp lại giàu leuxin 4; thụ thể liên kết G-protein chứa đoạn lặp lại giàu leuxin 4; và thụ thể liên kết G-Protein 48. Các ký hiệu nhận dạng của cơ sở dữ liệu ngoài của LGR4 bao gồm: HGNC: 13299 Entrez Gene: 55366 Ensembl: ENSG00000205213 OMIM: 606666 và UniProtKB: Q9BXXB.

Trong bản mô tả này LGR5 là thụ thể liên kết G-protein chứa đoạn lặp lại giàu leuxin 5, gen mã hóa cho protein. Trông số các con đường liên quan đến nó là con đường truyền tín hiệu Wnt (KEGG). Lời chú giải GO liên quan đến gen này bao gồm hoạt tính thụ thể liên kết G-protein và hoạt tính thụ thể xuyên màng. Một paralog quan trọng của gen này là LGR6. Thụ thể LGR5 là thụ thể của R-spondins mà tạo tiềm năng cho con đường truyền tín hiệu Wnt và hoạt động như là chỉ thị tế bào gốc của biểu mô ruột và nang lông. Khi liên kết với R-spondins (RSPO1, RSPO2, RSPO3 hoặc RSPO4), cùng với LRP6 được phosphoryl hóa và thụ thể frizzled mà được hoạt hóa bởi thụ thể Wnt ngoại bào, khởi động con đường truyền tín hiệu Wnt tiêu chuẩn để gia tăng sự biểu hiện của gen đích. Ngược lại với thụ thể liên kết G-protein kinh điển, LGR5 không hoạt hóa heterotrimeric G-proteins để truyền tín hiệu. Tham gia vào sự phát triển và/hoặc duy trì các tế bào gốc ruột trưởng thành trong suốt quá trình phát triển sau giai đoạn phôi. Tên thường được biết đến của LGR5 bao gồm: thụ thể liên kết G-Protein HG38; thụ thể liên kết G-Protein 49; thụ thể liên kết G-Protein 67; GPR67; GPR49 và thụ thể liên kết G-protein chứa đoạn lặp lại giàu leuxin 5. Các ký hiệu nhận dạng của cơ sở dữ liệu ngoài

của LGR5 bao gồm HGNC: 4504 Entrez Gene: 8549 Ensembl: ENSG00000139292 OMIM: 606667 và UniProtKB: O75473.

Trong bản mô tả này LGR6 là thụ thể liên kết G-protein chứa đoạn lặp lại giàu leuxin 6, nó là một gen mã hóa cho protein, một gen mã hóa cho thành viên dưới phân nhóm chứa đoạn lặp lại giàu leuxin của siêu họ protein xuyên màng 7 lần liên kết G protein. Protein được mã hóa là một thụ thể hormon glycoprotein có vùng ngoại bào có đầu tận cùng N lớn mà chứa vùng lặp lại giàu leuxin quan trọng với sự hình thành motif tương tác hình móng ngựa đối với liên kết phối tử. Sự cắt nối khác của gen này hình thành nhiều biến thể phiên mã. Các bệnh liên quan đến LGR6 bao gồm chứng phù niêm và u tuyến nang buồng trứng. Con đường liên quan đến nó là con đường truyền tín hiệu Wnt (KEGG) và GPCRs, Lời giải thích khác liên quan đến gen này bao gồm hoạt tính thụ thể liên kết G-protein và hoạt tính thụ thể truyền tín hiệu xuyên màng. Một paralog quan trọng của gen này là TSHR. Thụ thể của R-spondins mà tạo tiềm năng cho con đường truyền tín hiệu Wnt tiêu chuẩn và hoạt động như là chất chỉ thị tế bào gốc đa tiềm năng ở biểu bì. Khi liên kết với R-spondins (RSPO1, RSPO2, RSPO3 hoặc RSPO4), cùng với LRP6 được phosphoryl hóa và thụ thể frizzled mà được hoạt hóa bởi thụ thể Wnt ngoại bào, khởi động con đường truyền tín hiệu Wnt tiêu chuẩn để gia tăng sự biểu hiện của gen đích. Ngược lại với thụ thể liên kết G-protein kinh điển, LGR6 không hoạt hóa heterotrimeric G-proteins để truyền tín hiệu và hoạt động như chất ức chế khối u. Tên thông thường của LGR6 :gồm thụ thể Gonadotropin Receptor; VTS20631 và GPCR. Các ký hiệu nhận dạng của cơ sở dữ liệu ngoài của LGR6 bao gồm HGNC: 19719 Entrez Gene: 59352 Ensembl: ENSG00000133067 OMIM: 606653 và UniProtKB: Q9HBX8.

Trong bản mô tả này trung mô là quần tụ của các tế bào trung mô. Mô liên kết phôi mầm bao gồm các tế bào trung mô, thường ở dạng sao, được đỡ trong lớp đông trung gian.

Trong bản mô tả này cơ là mô sơ cấp, bao gồm chủ yếu là các tế bào co rút được đặc hiệu cao, được phân loại gồm cơ xương, cơ tim, hoặc cơ trơn; về mặt hiển vi, cơ trơn không có đặc tính hệ vạch ngang như hai loại cơ còn lại; một trong những cơ quan co rút của cơ thể mà bởi nó sự chuyển động của nhiều cơ quan và bộ phận khác bị ảnh hưởng;

cơ thông thường là một khối các sợi cơ (bụng của bắp cơ hoặc bầu), được gắn ở mỗi đầu tận cùng, bằng gân, vào xương hoặc cấu trúc khác; điểm gắn càng gần đầu hoặc càng gần cổ định gọi là gốc (q.v.), điểm gắn càng xa hoặc càng dễ chuyển động là phần đính(q.v.); phần hẹp nhất của bụng bắp cơ được gắn vào gân của gốc được gọi là đầu hoặc đầu mút.

Trong bản mô tả này thần kinh dùng để chỉ bất kỳ một cấu trúc nào chứa tế bào thần kinh hoặc mấu của các tế bào này, hoặc trong quá trình phát triển tiếp theo biệt hóa thành tế bào thần kinh. Liên quan đến phần lưng của cơ thể động vật có xương sống hoặc tổ tiên của nó, là nơi định vị của tủy sống, tương phản với mạch máu.

Trong bản mô tả này, và trừ phi được thể hiện theo các khác, “hoặc” dùng để chỉ hoặc bao gồm và không phải hoặc loại trừ. Ví dụ, điều kiện A hoặc B đáp ứng điều kiện bất kỳ trong số các điều kiện sau: A là đúng (hoặc có mặt) và B là sai (hoặc không có mặt), A là sai (hoặc không có mặt) và B là đúng (hoặc có mặt), và cả A và B là đúng (hoặc có mặt).

Trong bản mô tả này hạt dùng để chỉ vùng lớn nhất của nó là mười micron hoặc nhỏ hơn và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hạt nano, tập hợp của các đại phân tử, mixen, xác tế bào, dendrimer, và hạt tương tự mà đóng vai trò là nơi neo đậu thích hợp cho sự vi kết tụ của tế bào.

Trong bản mô tả này sự phân cực là xu hướng của (các)mô, tế bào và/hoặc cơ quan để phát triển một cách biệt hóa theo một trục.

Trong bản mô tả này môi trường giải cứu xung (PRM) là chế phẩm của hỗn hợp các môi trường giữ tế bào bao gồm Keratinocyte-SFM (1X), chất kháng sinh-thuốc chống nấm được chọn từ nhóm gồm có penicillin, streptomycin, và amphotericin B, và fibrinogen trong đó Keratinocyte-SFM gồm có hỗn hợp của các tế bào biểu mô và tế bào sừng. Thuốc thử này hữu ích để làm bền các mô sơ cấp và giảm khả năng sống được của các vi sinh vật trong quá trình vận chuyển và xử lý.

Trong bản mô tả này da là lớp bảo vệ toàn bộ cơ thể, bao gồm biểu bì và hạ bì (bì).

Trong bản mô tả này tế bào gốc là bất cứ tế bào tiền thân nào; tế bào và tế bào con của nó có thể biệt hóa thành các dạng tế bào khác; tế bào mà có khả năng duy trì số lượng của chính nó trong khi sản sinh ra thế hệ con thành một hoặc nhiều dòng tế bào.

Trong bản mô tả này “về cơ bản,” “nói chung,” và các từ khác của mức độ là chất cải tiến tương đối dự định để chỉ sự thay đổi cho phép từ đặc trưng được cải biến. Không dự định giới hạn bởi giả trị tuyệt đối hoặc đặc trưng mà là cải biến nhưng các quy trình xử lý khác nhiều hơn các đặc trưng vật lý và có chức hơn phía đối diện của nó, và tốt hơn là đạt đến hoặc xấp xỉ đặc trưng vật lý hoặc có chức của nó.

Trong bản mô tả này mô là tập hợp các tế bào tương tự nhau và chất gian bào xung quanh chúng. Có bốn loại mô cơ bản trong cơ thể: biểu mô; mô liên kết bao gồm mô mỡ, máu, xương, và sụn; mô cơ; và mô thần kinh. Vỏ, bao, hoặc phủ bất cứ phần hoặc bộ phận nào của cơ thể.

Trong phần mô tả sau, việc tham khảo liên quan đến hình vẽ được đưa ra nhằm mục đích minh họa. Phương án minh họa sau được mô tả chi tiết đủ để cho phép người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này thực hiện sáng chế. Cần phải hiểu rằng các phương án khác có thể được sử dụng và các sự thay đổi về cấu trúc dựa trên cấu trúc đã biết và/hoặc tương đương có chức có thể được tạo ra mà không nằm ngoài phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1A là hình vẽ minh họa một ví dụ về vị trí của các tế bào biểu hiện LGR có nguồn gốc từ da.

Hình 1B là hình vẽ minh họa đồ thị sắp xếp tế bào hoạt hóa bằng huỳnh quang.

Hình 1C là ảnh chụp của phổ của các chất mang vô bào khác nhau được xem xét để sử dụng theo sáng chế.

Hình 2A là ảnh của cấu trúc tế bào thô/khung protein collagen được loại bỏ tế bào hữu ích để nuôi cấy.

Hình 2B là ảnh chụp hiển vi miễn dịch huỳnh quang của cấu trúc collagen tiếp theo việc nuôi cấy với các chất kết tụ của các tế bào đã được tiêu hóa một phần.

Hình 3A - 3F là các hình ảnh khác nhau thu được từ các kỹ thuật khác nhau của một dãy các chất nền được nuôi cấy bằng tế bào gốc biểu mô LGR6+ khác nhau.

Hình 4A là hình vẽ minh họa quá trình làm lành theo thời gian *in vivo* của các mẫu đối chứng và một ví dụ về chất nền được nuôi cấy bằng LGR. Hình 4B là sự biểu diễn bằng hình ảnh của biểu hiện phiên mã Cytokeratin-17 ở ngày thứ mười. Các hình 4C-E là hình vẽ minh họa các mẫu đối chứng và chất nền được nuôi cấy bằng LGR ESC bằng kính hiển vi điện tử tạo và quét hình ảnh phát quang sinh học.

Các hình 5A-E là hình vẽ minh họa một ví dụ về cấu trúc nói trên với các LGR ESC và các quần thể tách tế bào phân đoạn tế bào tạo mạch nền thể hiện dạng ban đầu của quá trình phân cực được mô tả bằng so sánh đồ họa.

Các hình 6A-B là hình vẽ minh họa cấu trúc chứa tế bào LGR có và không có các thực thể tế bào phân đoạn tế bào tạo mạch nền và sự tạo ra các yếu tố sinh trưởng liên quan.

Các hình 7A-H là hình vẽ minh họa vết thương mức độ ba và xác minh sự loại trừ của nang chứa tế bào gốc LGR và cấu trúc thuộc bộ phận phụ của tử cung.

Các hình 8A-Q là hình vẽ minh họa sự tiến triển theo thời gian của vết thương/tổn thương/chỗ rỗng với DEFA5 khi liên quan đến vi khuẩn bám dính.

Các hình 9A-B là hình vẽ minh họa đồ thị so sánh của các thực thể tế bào biểu hiện DEFA5 bên trong vết thương mà liên quan đến việc làm lành được gia tăng, sự tái tạo mô và phần phụ và sự phát triển lông đáng kể ở vết bỏng được điều trị không có các cấu trúc của phần phụ.

Các hình 10A-L là hình vẽ minh họa sự đánh giá định lượng của động học làm lành vết thương và việc di cư tế bào gốc LGR5 và LGR6 vào mô bị bỏng sau khi xử lý bằng các tác nhân dùng khu trú.

Các hình 11A-B là hình vẽ minh họa định lượng RT-PCR và so sánh ánh xạ nhiệt gen trên các vết thương/tổn thương/chỗ rỗng trong mô được điều trị bằng DEFA5 đối với SDZ khi liên quan đến việc gia tăng các quá trình trước khi làm lạnh.

Các hình 12A-1 là hình vẽ minh họa biểu hiện LGR6 của các tế bào nang lông và việc sắp xếp tế bào hoạt hóa bằng huỳnh quang của các tế bào được gắn nhãn đồng biểu hiện LGR6+, CD34+ CD73+ GFP để mở rộng việc nuôi cấy.

Các hình 13A-D là hình vẽ minh họa các ảnh chụp kính hiển vi đồng tiêu và sự phát quang sinh học của khối đơn có chức (aFSU) tại thời điểm bắt đầu nuôi cấy và một ngày sau đó.

Các hình 13E là hình vẽ minh họa ảnh chụp hiển vi của khung protein collagen.

Các hình 14A-E là hình vẽ minh họa một ví dụ về các biến thể tế bào LGR vị trí khi liên quan đến vị trí, kiểu hình, giao diện và phân cực trong mô da. Quá trình phân lập và nuôi cấy của LGR6+ ESC từ hành lông (bulge).

Các hình 15A-E là hình vẽ minh họa một ví dụ về nhân tế bào biểu hiện LGR khi liên quan đến phương pháp phân phối thông qua việc sắp đặt xung quanh và/hoặc bên trong vết thương/tổn thương/chỗ rỗng trong mô.

Các hình 16A-D là hình vẽ minh họa một ví dụ về tế bào gốc có chứa LGR khi liên quan tới việc phân phối vào bên trong và xung quanh các vết thương thông qua véc tơ có thể giao nhận và việc làm lạnh, tái tạo mô và các cấu trúc phụ trợ đáng kể sau đó.

Các hình 17A-D là hình vẽ minh họa sự di chuyển tế bào gốc biểu mô LGR6+ và sự biệt hóa bên trong các ổ vết thương đủ dày trong vòng 10 ngày sau khi ghép.

Hình 18 là hình vẽ minh họa việc đánh giá RT-PCR và so sánh bản đồ nhiệt sắp xếp gen của vết thương/tổn thương/chỗ rỗng trong mô với nhân tế bào biểu hiện LGR này.

Hình 19 là hình vẽ mô tả một ví dụ về nhân tế bào biểu hiện LGR nêu trên khi liên quan đến việc phân phối vào bên trong và xung quanh vết thương/tổn thương/chỗ rỗng trong mô và sự gia tăng các yếu tố làm lành vết thương.

Các hình 20A-F là hình vẽ minh họa ví dụ về nhân tế bào biểu hiện LGR khi liên quan đến việc tái tạo các mô xương. Nhân LGR được tách ra có thể là xương được nuôi cấy và vẫn sống.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các hình 1A-C là hình vẽ minh họa một ví dụ về phép phân tích tế bào theo dòng chảy của quần thể tế bào có xung quanh nang lông và các khung protein mà các tế bào này bám dính vào khi nuôi cấy. Cụ thể hơn, hình 1A là hình vẽ minh họa ví dụ về vị trí của các tế bào biểu hiện LGR nêu trên có nguồn gốc từ da. Kính hiển vi đồng tiêu miễn dịch huỳnh quang ở độ phóng đại 40x chỉ ra hành lông (bulge) (mũi tên màu trắng), LGR6+ (màu xanh lá), DNA (màu xanh da trời). Hình 1B là đồ thị phân loại tế bào hoạt hóa bởi huỳnh quang bằng chất đánh dấu tế bào được làm ví dụ chỉ ra bằng phân tích cổng. Hình 1C là hình vẽ minh họa một dãy các loại tế bào có thể được sử dụng để nuôi cấy một loạt các cơ chất/chất nền/ khung protein/chất nền vô bào theo sáng chế.

Hình 2A là hình ảnh về một ví dụ của cấu trúc thô không có các đơn vị có chức năng bào vi kết tụ chứa nhân tế bào gốc biểu hiện LGR theo sáng chế. Hình 2B là hình vẽ mô tả cấu trúc sau khi nuôi cấy chất nền với các chất kết tụ của các tế bào đã được tiêu hóa một phần.

Hình 3A, ở dạng cột, là một dãy các ảnh chụp bằng kính hiển vi đồng tiêu tương phản giao thoa vi sai (DIC) của các cơ chất được nuôi cấy LGR từ các nguồn khác nhau. Hình 3B là cột tương ứng chụp bằng kính hiển vi đồng tiêu miễn dịch huỳnh quang ở độ phóng đại 20x của các chất nền nuôi cấy bằng LGR6+ ESC của các cấu trúc tương ứng chứa các tế bào biểu hiện LGR. Các ô màu trắng ghép vào biểu thị các vùng phóng đại tập trung được chỉ ra trong cột của hình 3D trong khi hình 3C là cột biểu diễn sự trộn lẫn số của hình ảnh tương ứng của hình 3A (DIC) và miễn dịch huỳnh quang của hình 3B cho thấy đường vành và đường biên của chất nền. Các cột của các hình 3E và 3F tương ứng biểu diễn mức phát quang sinh học đo được bằng hiệu suất bức xạ của mẫu đối chứng cơ chất vô bào và chất nền được nuôi cấy bằng LGR6+ ESC tương ứng ở thời điểm 72 giờ sau nuôi cấy.

Hình 4A-E là hình vẽ minh họa các ví dụ về cấu trúc chứa LGR được đặt vào cơ thể động vật có vú sống. Sự sắp đặt của việc nuôi cấy nang lông làm lạnh bởi sự gia tăng cơ chất được nuôi cấy bằng LGR6+ GFP ESC. Hình 4A là ma trận 3x3 của các ảnh chụp hiển vi 3mm của các vết bỏng dày đến lớp hạ bì được loại bỏ tế bào của người ở các thời điểm 5, 8 và 10 ngày không có chất nền (đối chứng bỏng), chất nền (đối chứng chất nền) và LGR6+ GFP ESC. Hình 4B là đồ thị minh họa mức biểu hiện tương đối của việc biểu hiện phiên mã Cytokeratin-17 ở thời điểm 10 ngày của các ổ vết thương mô tả trong hình 4A. Tỷ lệ phần trăm ổ vết thương lành được xác định bằng phép phân tích định lượng của tỷ lệ làm lạnh vết thương như hàm diện tích phần trăm trong phần mềm ImageJ NCBI. Đối chứng vết thương chỉ bao gồm ổ vết bỏng. Đối chứng chất nền chỉ chứa chất nền và LGR6+ GFP chứa ADM được nuôi cấy với LGR6+ GFP ESCs.

Hình 4C là ảnh chụp hiển vi của hình ảnh phát quang sinh học *in vivo* trong vết bỏng sâu trên chuột bạch ở ngày thứ 5. Hình 4D là ảnh chụp hiển vi của hạ bì người ở độ phóng đại 100 lần của các đối chứng và LGR6+ GFP bao gồm hạ bì ở thời điểm 12 giờ và 72 giờ và sau khi nuôi cấy với các ESC. Mũi tên màu trắng chỉ ra sự có mặt của lỗ ở da. Hình 4E là hình vẽ minh họa các hình ảnh của các đối chứng và cấu trúc theo sáng chế bao gồm lớp hạ bì của người được nuôi cấy với các ESC với lớp phủ bảo vệ silicon để ngăn mất nước. Hình ảnh chất nền LGR6+ GFP bao gồm các mũi tên nhỏ màu đen nhân đôi cho thấy các đám lông mới mọc từ ổ vết thương sâu trên chuột bạch Nu/Nu.

Các hình 5A-E là hình vẽ minh họa ví dụ về cấu trúc nói quả của việc bổ sung phân đoạn tế bào tạo mạch nền (SVF) vào chất nền được nuôi cấy bằng LGR6+ ESC trong việc thúc đẩy sự phân cực mô và hệ tương tự da hai ngăn. Hình 5A là hình ảnh cùng tiêu điểm 20x của quần thể tách tế bào biểu hiện phân đoạn tế bào tạo mạch nền 5×10^5 RFP 24 giờ sau khi được tạo hạt trên Adrenomedullin đại diện (ADM) (như sản phẩm của Integra LifeSciences Corporation dưới tên thương mại INTEGRA®). Figure 5B là hình ảnh cùng tiêu điểm 20x của quần thể tách tế bào LGR6+ biểu hiện 5×10^5 GFP 24 giờ sau khi được tạo hạt trên ADM (INTEGRA®) đại diện. Figure 5C là hình ảnh cùng tiêu điểm 20x của ADM đại diện (INTEGRA®) với SVF biểu hiện 5×10^5 RFP và quần thể phân lập LGR6+ biểu hiện 5×10^5 GFP 24 giờ sau khi cùng được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy. Hình 5D là chất nền cùng được nuôi cấy chứa SVF^{RFP} biểu hiện 5×10^5 RFP và

LGR6⁺ biểu hiện 5x10⁵GFP sau 5 ngày nuôi cấy môi trường nuôi cấy. Các đường song song rải rác cho thấy dòng biểu mô LGR6⁺GFP tích lũy ở mép của nền ADM. Khung nhỏ và khung lớn cho biết vị trí tương đối của hai ngăn tương ứng với sự phong phú của LGR6⁺GFP và SVF^{RFP}. Đường viền hình chữ “U” cho thấy vùng chứa lỗ được nuôi cấy trước gây ra bởi một mũi kim vô trùng 32 que. Hình 5E là đồ thị minh họa về động học tăng sinh của cơ chất collagen cùng được nuôi cấy với các tế bào biểu hiện LGR xanh và các tế bào biểu hiện SVF đỏ.

Hình 6A và 6B là hình vẽ minh họa cấu trúc chứa các tế bào LGR có và không có thực thể tế bào phụ trợ và sự tạo ra các yếu tố sinh trưởng liên quan. Profile biểu hiện tương quan của sự phiên mã tiền hình thành mạch và các chất phân tích protein từ cấu trúc nuôi cấy khung protein giàu LGR6⁺GFP ESC và SVF^{RFP}. Hình 6A là đồ thị biểu hiện phiên mã ($\Delta\Delta CT$) của thành phần được chỉ định từ tổng số RNA: LGR6⁺GFP ESC (viền đen), SVF^{RFP} (viền xám), và LGR6⁺GFP ESC + SVF^{RFP} cùng được nuôi cấy (hộp trắng) trên nền khung protein tương ứng. Ký hiệu trên trục X (LGR6 + SVF) thể hiện mức so sánh biểu hiện LGR6⁺GFP ESC + SVF^{RFP} đồng nuôi cấy với biểu hiện LGR6⁺GFP ESC và SVF^{RFP} đơn trên khung protein đã xác định. Biểu hiện gen FGF-2 trung bình trước đây cho cơ chất đồng nuôi cấy cao hơn mức biểu hiện trung bình của cả hai hệ đơn (Scaffold+LGR6 hoặc Scaffold +SVF) ngoại trừ đối với đồng nuôi cấy INTEGRA® (INTEGRA®+LGR6+SVF). Ký hiệu bên dưới trục X (LGR6) hoặc (SVF) xác định mức so sánh của các chất nền, trong khi số lượng tế bào giữ không đổi. Biểu hiện gen VEGF-A trước đây chỉ cho INTEGRA®+LGR6⁺GFP ESC so với chỉ có Dermamatrix®+LGR6⁺GFP ESC là không rõ ràng (NS). Hình 6B biểu diễn bằng hình vẽ đơn vị mật độ tương đối (RDU) của chất phân tích protein được xác định từ các phân tích protein tổng thể: LGR6⁺GFP ESC (vạch màu đen), SVF^{RFP} (vạch màu xám), và LGR6⁺GFP ESC + SVF^{RFP} đồng nuôi cấy (hộp màu trắng) trên cơ chất khung tương ứng. (*) xác định (p-value < 0,05), các thử nghiệm hoàn tất trong phần thứ ba, đối chứng cơ định GAPDH.

Các hình 7A-H là hình vẽ minh họa một ví dụ điều trị tiếp nhận vết thương/tổn thương/chỗ rỗng của sự di chuyển, sự tăng sinh và khả năng sống của tế bào LGR gia tăng vào vết thương tức là ổ vết thương mức độ ba và xác minh sự loại trừ hành lông (bulge) của nang chứa tế bào gốc LGR và cấu trúc thuộc bộ phận phụ của tử cung. Hình

7A mô tả mẫu vết thương đánh dấu bằng đường tròn đường kính 3mm. Hình 7B là hình vẽ minh họa cấu trúc vết thương vào thời điểm ngày 0 (thanh tỷ lệ màu trắng là 1mm). Hình 7C là hình vẽ minh họa một ví dụ về lưới vết thương 2x3 3mm. Hình 7D cho thấy việc sử dụng bên ngoài của peptit bị ức chế tại vị trí vết thương. Hình 7E là ảnh chụp hiển vi của vết H&E của da nguyên vẹn, không bị bong/da có nang lông và các cấu trúc phụ. Mũi tên xác định vị trí của nang được phóng to (hình ảnh chèn vào), trong đó thanh tỷ lệ là 500µm. Hình 7F là hình vẽ minh họa vết H&E của da lưng mẫu thử sau khi dội nước nóng dẫn đến việc bị mất lớp thượng bì, lớp hạ bì và các mô dưới da bao gồm hành lông (bulge) của nang. Hình 7G là hình vẽ minh họa vết DAPI/DNA (4',6-diamidino-2-phenylindol) của da nguyên vẹn, không bị bong có nang lông và các cấu trúc phụ. Mũi tên xác định nang được phóng to các kháng thể LGR5 và LGR6 được đánh dấu tương ứng màu xanh lá và màu đỏ (hình ảnh chèn thêm). Hình 7H là hình vẽ minh họa vết DAPI/DNA của mẫu thử da lưng sau khi dội nước nóng dẫn đến việc bị mất lớp thượng bì, lớp hạ bì và các mô dưới da bao gồm hành lông (bulge) của nang, trong đó thanh tỷ lệ màu trắng là 100 µm.

Các hình 8A-Q là hình vẽ minh họa vết thương/tổn thương/chỗ rỗng với LGR mà có liên quan đến khả năng kháng khuẩn qua thời gian năm và mười ngày. Bằng cách sử dụng các đầu dò oligonucleotit huỳnh quang rRNA 16S, lai hóa tại chỗ xác định sự có mặt của vi khuẩn bám dính ở vết bỏng độ ba. Hình 8A là hình vẽ minh họa nhãn DNA/DAPI của vết bỏng độ ba vào ngày thứ năm sau khi bỏng được xử lý hàng ngày với SDZ. Trong hình 8B, 5'- Cy3-EUB338 được gắn nhãn của vết bỏng độ ba tổ chức vi khuẩn 16s rRNA (các vết màu vàng) vào ngày thứ năm sau khi bỏng được xử lý hàng ngày với SDZ được mô tả. Hình 8C là hình ảnh được kết hợp bằng kỹ thuật số của các hình 8A và 8B. Hình 8D tương ứng với hình 8A ngoại trừ vào ngày thứ mười của vết bỏng độ ba với nhãn DNA/DAPI được xử lý hàng ngày với SDZ. Tương tự, hình 8E là ảnh chụp hiển vi của 5'-Cy3-EUB338 được gắn nhãn của vết bỏng độ ba tổ chức vi khuẩn 16s rRNA (các vết màu vàng) ở ngày thứ mười sau khi bỏng được xử lý hàng ngày với SDZ. Hình 8F là hình ảnh kết hợp của các hình 8D và E. Các hình 8G-8L là các hình ảnh tương ứng với ngày thứ năm và thứ mười sau khi bị bỏng của các hình 8A-F nhưng đối tượng được xử lý hàng ngày bằng cách sử dụng Defensin, alpha 5 (DEFA5) thay cho

SDZ. Mũi tên trong H cho thấy giao diện mô với vật liệu sợi phủ ngoài trong đó quan sát thấy ít vi khuẩn khi xử lý với DEFA5.

Hình 8M với 8N chèn thêm là hình vẽ minh họa việc định lượng cường độ điểm màu trắng của hình ảnh được chuyển thành hình ảnh sắc độ xám huỳnh quang Cy3 của vết thương được xử lý bằng SDZ và bao gồm nhiều hơn 16s rRNA gắn nhãn trên mỗi đơn vị diện tích. Hình 8O và hình 8P được chèn thêm là hình vẽ minh họa việc định lượng cường độ điểm màu trắng của hình ảnh được chuyển thành hình ảnh sắc độ xám của huỳnh quang Cy3 (hình ảnh chèn thêm p.) của vết thương được xử lý bằng DEFA5 và có chứa 16s rRNA gắn nhãn trên mỗi đơn vị diện tích đã giảm. Đồ thị chèn thêm mô tả cường độ điểm trắng trung bình của 16s rRNA được thể hiện trên cả hai vết thương được xử lý bằng SDZ và DEFA5 vào ngày thứ năm bằng cách sử dụng phần mềm hình ảnh sắc độ xám. Cuối cùng, hình 8Q là biểu đồ minh họa huỳnh quang kênh màu đỏ trung bình của 16s rRNA thể hiện trên cả hai vết bỏng được xử lý bằng SDZ và DEFA5 vào ngày thứ năm. Mũi tên màu trắng trong hình 8H là hình vẽ minh họa màng tiềm năng trong vết thương được xử lý bằng DEFA5 và mũi tên màu đen trong hình 8M xác định cường độ điểm màu trắng. Thanh tỷ lệ 100µm. (*) xác định giá trị $p < 0,05$.

Các hình 9A và B là một chuỗi các hình ảnh theo thời gian là một ví dụ về các thực thể tế bào biểu hiện LGR trong vết thương khi liên quan đến việc làm lành, tái tạo mô và da và phát triển lông gia tăng, động học làm lành vết thương và phát triển lông mới trong việc xử lý các vết bỏng không có các cấu trúc phụ. Các chuỗi hình ảnh bao gồm hình 9A là hình ảnh chung bằng cách sử dụng kính hiển vi phẫu thuật Leica Wild M680 để ghi hình quá trình làm lành các vết bỏng độ ba sau hơn 10 ngày trong khi được xử lý với lượng như nhau các tác nhân MQH2O, DEFA5, DEFB1, SDZ. Thanh tỷ lệ màu trắng thể hiện 1 mm. Chuỗi hình ảnh thứ hai của hình 9B lại bao gồm hình ảnh chung bằng cách sử dụng Leica Wild M680 để theo dõi quá trình sinh trưởng lông mới của các vết bỏng độ ba sau hơn 16 ngày với so sánh trực quan giữa DEFA5 và các vết thương được xử lý bằng đối chứng. Các mũi tên màu trắng xác định sự tăng trưởng của lông mới. Một lần nữa, thanh tỷ lệ là 1mm.

Các hình 10A-L là hình vẽ minh họa ví dụ về thực thể tế bào biểu hiện LGR nêu trên trong vết thương/tổn thương/chỗ rỗng trong mô khi liên quan đến quá trình làm lành, lan rộng gia tăng của thực thể nêu trên. Các đồ thị bao gồm các hình 10K và 10L cung cấp bằng chứng về sự đánh giá định lượng của động học làm lành vết thương và việc di cư tế bào gốc LGR5 và LGR6 vào mô bị hỏng sau khi xử lý bằng các tác nhân dùng khu trú. Một cách vắn tắt, các thử nghiệm này được tiến hành để xác nhận các mẫu cường độ của kính hiển vi cùng tiêu điểm định lượng từ hình ảnh LGR5 và LGR6 được ghi hình, và dựa trên phản ứng chuỗi polymeraza phiên mã ngược trên mô của vết bỏng. Như có thể thấy trên các đồ thị, mức biểu hiện mRNA LGR5 và LGR6 trung bình bên trong các vết thương alpha defensin 5 của người được tìm thấy một cách tương ứng là $95,8 \pm 10,6$ và $259,2 \pm 20,2$, so với mức không phát hiện được của LGR5 và LGR6 ở các vết thương xử lý bằng sulfadiazin ở ngày thứ năm (hình 4, phải). Độ lớn của các so sánh bậc này trong các mô được điều trị bằng alpha defensin 5 của người và các mẫu được điều trị bằng sulfadiazin cho thấy đó là sự hiện diện tuyệt đối hoặc chỗ rỗng của các tế bào biểu hiện LGR5 và LGR6 di chuyển vào vết thương mà xác định các giá trị gấp.

Quay trở lại các con số cụ thể, hình 10A là hình ảnh của vùng vết thương với thanh tỉ lệ màu trắng thể hiện 1mm và tính toán vùng vết thương bằng màu đen.

Hình 10B là đồ thị thể hiện tỷ lệ làm lành vết thương trung bình được biểu diễn dưới dạng phần trăm % diện tích vết thương còn lại sau 10 ngày khi sử dụng chất chính khu trú được chỉ định. Dấu hoa thị (*) là giá trị $p < 0,05$. Hình 10C-J là hình vẽ minh họa việc ghi nhãn kháng thể miễn dịch huỳnh quang LGR5 và LGR6 đối với vết thương ở DEFA5 vào ngày thứ 5, trong đó hình 10C là DNA/DAPI/Blue, hình 10D là LGR5/FITC/Green Hình 10E là LGR6/TRITC/Red và Hình 10F kết hợp 10C-10E.

Hình 10G-I lần lượt là ghi nhãn kháng thể miễn dịch huỳnh quang LGR5 và LGR6 đối với SDB (sulfadiazin) vào ngày thứ 5 (DNA/DAPI/Blue, LGR5/FITC/Green và LGR6/TRITC/Red). Hình 10J là hình ảnh hợp nhất của 10G-10I và là phần rời thể hiện mức biểu hiện của LGR5 và LGR6 trung bình sử dụng cường độ huỳnh quang xanh và đỏ trên mỗi vết thương vào ngày thứ 5. Các giá trị so sánh thu được từ việc định lượng PCR

phiên mã ngược của lần tăng ARN thu được từ nhân đôi vết thương với DEFA5 và SDZ. Thanh tỷ lệ trắng 50 μ m và một lần nữa, dấu hoa thị (*) biểu thị giá trị $p < 0,05$.

Các hình 11A và B minh họa vết thương/tổn thương/chỗ rỗng trong mô có các thực thể tế bào biểu hiện LGR được đặt trong vết thương vì nó liên quan đến sự gia tăng quá trình chữa bệnh. Các con số này tương ứng với định lượng RT-PCR và so sánh ánh xạ gen trên các vết thương với DEFA5 đối với SDZ. Các con số này cho thấy vai trò của alpha defensin 5 so với sulfadiazin trong việc gia tăng biểu hiện phiên mã chính trong vết thương. Kết quả cho thấy rằng một số tập con của gen được điều chỉnh lên đáng kể trong các vết thương tiếp nhận alpha defensin 5 ở người khi so sánh với liệu pháp sulfadiazin và một số tập con của con đường Wnt được điều chỉnh lên đáng kể theo đáp ứng của hệ tế bào gốc LGR với các phối tử Wnt trong cả ruột và da.

Hình 11A là bản đồ nhiệt con đường Averaged Wound Healing RT2-PCR Array và bản đồ gen tương ứng với sự điều hòa gấp nếp vết thương bằng cách so sánh DEFA5 với các hệ xử lý SDZ. Hình 11B là bản đồ nhiệt con đường làm lạnh Averaged Wnt RT2-PCR Array và bản đồ gen tương ứng với sự điều hòa nếp vết thương so sánh DEFA5 với các hệ được điều trị bằng SDZ. Màu sắc của bản đồ nhiệt được chỉ ra là màu đỏ, nhiều hơn thể hiện trong DEFA5 xử lý bóng để màu xanh lá cây nhiều hơn thể hiện trong vết bong được điều trị bằng SDZ.

Hình 12A-I là hình vẽ minh họa một ví dụ về đơn vị đa bào vi kết tụ chứa thực thể tế bào gốc biểu hiện LGR khi liên quan đến vị trí, cường độ quần thể và khả năng làm lành vết thương. Việc sử dụng phương pháp làm lạnh vết thương *ex vivo* đơn giản và các phân loại tế bào hoạt hóa bằng huỳnh quang, các tế bào ở chuột LGR6 +, CD34 + và CD73 + C57BL/6 (UBC-GFP) được tách ra để mở rộng nuôi cấy tế bào.

Hình 12A là hình vẽ minh họa sự biểu hiện (màu xanh lá cây) của kháng thể huỳnh quang hiệu ứng LGR6 của các tế bào trên nang lông sau khi tiêu hủy một phần tế bào da 10 μ l/ μ L. (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, N.J.) tiêu hóa trong 30 phút ở 37°C trên máy lắc chậm. Hình 12B là hình ảnh của các tế bào LGR6 + thể hiện các dấu hiệu CD34 và CD73 bổ sung (mũi tên chỉ số quần thể được tách ra chiếm khoảng 1 đến 3 phần trăm của tất cả các tế bào). Hình 12C-H là đồ thị biểu hiện eFluor450 của thử

nghiệm vết thương *in vitro* tương ứng cho thấy biểu hiện GFP nội tại định kỳ từ tế bào chuột của C57BL/6 (UBC-GFP), biểu hiện CD34 + PE/Cy7, biểu hiện của LGR6 + APC và CD73 +. Các đường chấm chấm chỉ khoảng thời gian phân tách ở 0, 6, và 12 giờ sau sự phá vỡ lớp tế bào và thanh tỷ lệ = 50 μ m. Đồ thị trong hình 121 cho thấy sự giảm trung bình của đường khoảng cách theo thời gian thể hiện dưới dạng phần trăm của khoảng cách ban đầu sau khi phân loại huỳnh quang, trong đó dấu sao (*) biểu diễn giá trị $p < 0,05$.

Hình 13A-D là chụp ảnh bằng kính hiển vi đồng tiêu điểm và sự phát quang sinh học của đơn vị đơn có chức được hoạt hóa (aFSU) tại thời điểm nuôi cấy ban đầu và 1 ngày sau đó minh họa một ví dụ về đơn vị đa bào vi kết tụ chứa LGR biểu hiện các tế bào gốc tế bào trong khi trải qua sự nhân giống ban đầu trên cơ chất collagen, hình 13 E.

Các hình 14A-E là hình vẽ minh họa một ví dụ về vị trí các tế bào LGR theo vị trí, kiểu hình, giao diện và phân cực trong mô da. Hình 14A là hình vẽ minh họa việc thể hiện bằng cách nhuộm miễn dịch, khu vực khu trú của biểu hiện LGR6 (Green/fluorescein isothiocyanate (FITC)) và LGR5 (Red/tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC)). Thanh tỉ lệ khoảng 20 μ m.

Hình 14B là hình vẽ cho thấy sự tách tế bào biểu mô hoạt hóa bằng huỳnh quang của tế bào gốc biểu mô LGR6^{+GFP} từ da của chuột C57BL/6 (UBCGFP) với cổng phân loại cuối cùng sử dụng LGR6 +, CD34 và CD73 ở đồ thị bên trái và đồ thị cá thể mô tả biểu hiện tế bào GFP và tương quan kháng thể -cấu hình các nhãn: CD73/PE-7, LGR6/Cy5, CD34/eFlour450 ở bên phải. Hình 14C cho thấy hình ảnh tương phản nhiễu khác nhau của tế bào gốc biểu mô tế bào LGR6^{+GFP} được mạ sau khi được tách phân loại tế bào hoạt hóa bằng huỳnh quang. Hình 14D là hình vẽ minh họa sự biểu hiện GFP nội tại của các tế bào gốc biểu mô tế bào LGR6^{+GFP} và hình 14E là một hình ảnh được sáp nhập hình 14C và 14 D. Thanh tỉ lệ là 20 μ m.

Hình 15A-E minh họa một ví dụ về nhân tế bào biểu hiện LGR khi nó liên quan đến phương pháp phân phối thông qua việc đặt xung quanh và/hoặc trong vết thương/tổn thương/chỗ rỗng trong mô. Ba hình ảnh trong hình 15A lần lượt mô tả mẫu bóng ban đầu; vết bóng trên đầu sau của con chuột Nu/Nu; và phân phối tế bào gốc biểu mô LGR6⁺ GFP

chứa 10^5 HYDROGEL® vào nền vết thương. Thanh tỷ lệ cho hình 15A là 1mm. Hình 15B là hình ảnh miễn dịch huỳnh quang của túi bơm DNA/DAPI-BLUE vào ngày 0. Hình 15B là hình ảnh miễn dịch huỳnh quang của nhãn kháng thể anti-LGR6/TRITC và hình 15C tương tự cho tế bào gốc biểu mô LGR6⁺GFP. Hình 15E là hình ảnh được trộn vào hình 15B-D và có thanh tỷ lệ 20µm. Hình 15A-E cho thấy sự tạo thành vết bỏng đủ dày và kiểm tra xác nhận sự xâm nhập tế bào gốc của LGR6⁺ vào mức hư hỏng mô mềm tiếp theo.

Hình 16A-D là hình vẽ minh họa một ví dụ về tế bào gốc chứa LGR liên quan đến việc phân phối vào và xung quanh vết thương thông qua vector phân phối và tiếp đó hàn gắn, tái tạo mô và các cấu trúc phụ trợ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, mạch máu và/hoặc phát triển hệ mạch máu. Sự tiến triển hàn gắn vết thương sau ghép mô tế bào gốc biểu bì LGR6⁺ thành vết thương đủ dày. Sự tiến triển của việc hàn gắn vết thương được mô tả sau khi bơm HYDROGEL® của BD Biosciences, San Jose, Calif. (đối chứng) trong Hình 16A so với hình 16B, tế bào gốc biểu mô LGR6⁺GFP nuôi cấy hydrogel biểu hiện trên 15 ngày. Thanh tỷ lệ là 1mm. Trong hình 16C, cho thấy túi cấy ghép sau ngày 15, mũi tên trắng cho thấy có sự hiện diện của tế bào gốc LGR6⁺GFP còn lại nằm trong vết thương. Trong hình 16D, mũi tên màu đen cho thấy vị trí của vết thương không có tế bào gốc LGR6⁺GFP.

Các hình 17A-D mô tả một ví dụ về tế bào gốc chứa LGR tập trung sau khi phân phối vào và/hoặc quanh vết thương với sự hàn gắn tiếp theo và tái tạo các mô và mô liên kết như, nhưng không giới hạn ở, nang lông và các cấu trúc phụ trợ liên quan. Hình 17A là chất nền bốn thành phần của các hình ảnh tiêu điểm của mẫu mô được đánh dấu miễn dịch huỳnh quang vào ngày 10 sau ghép tế bào gốc LGR6⁺ với mô hình di chuyển vào ổ vết thương 10 ngày. Các hình ảnh bao gồm hình 17A gồm có DNA/DAPI-BLUE; kháng thể anti-LGR6/TRITC; biểu hiện GFP của LGR6⁺GFP ESC.

Hình 17B là hình ảnh cấu trúc giao thoa khác biệt giữa các kênh. Mũi tên đỏ chỉ định các vùng phát triển nang non. (Xem thêm hình ảnh bên trên). Đường chấm chấm thể hiện sự phân cực biểu mô nằm trên nang lông mới trong khi mũi tên trắng cho biết vị trí của túi bơm mảnh ghép (Xem thêm hình phóng to ở hình ảnh bên dưới của hình ảnh cho

quần thể tế bào gốc ở túi bom mảnh ghép ban đầu. Mảnh ghép chèn vào của hình 17B cho thấy sự biểu hiện gen KRT17/cytokeratin 17 so sánh trong các vết thương được chỉ ra của thử nghiệm so sánh và điều trị LGR6^{+GFP}.

Viện dẫn đến hình 17C, ba hình ảnh này là vòm ghép được sử dụng để bao phủ các vết thương đốt cháy quần thể nghiên cứu nang lông, vết thương được xử lý LGR6^{+GFP} ESC vào ngày 10 (mũi tên rắn) có nang lông mới (mũi tên rõ ràng) tạo ra kén nang và ổ vết thương so sánh vào ngày 10. Đồ thị bao gồm hình 17D định lượng vết thương vào ngày 10 từ vết thương thu được từ RT-PCR thể hiện sự biểu hiện gấp nếp gen tương đối của các phối tử WNT. Các số dương cho thấy biểu hiện cao hơn trong vết thương chứa tế bào gốc biểu mô LGR6^{+GFP} trong khi số âm thể hiện mức biểu hiện cao hơn ở các ổ vết thương đối chứng.

Hình 18 là hình vẽ minh họa số liệu RT-PCR và đánh giá sự so sánh nhiệt độ gen của vết thương/tổn thương/chỗ rỗng trong mô với nhân tế bào biểu hiện LGR liên quan đến việc phân phối vào và/hoặc xung quanh vết thương/tổn thương/chỗ rỗng trong mô khi liên quan đến sự lan rộng của cách thức hàn gắn sau và biểu hiện gen tương ứng với các tế bào gốc LGR6 + so với đối chứng. Các đồ thị minh họa sự biểu hiện gấp nếp tương đối của các gen cho sự hình thành mạch, hàn vết thương và yếu tố tăng trưởng biểu bì. Biểu diễn đồ họa tương quan của dữ liệu so sánh vết thương với mô tuyến và mô học liệu tế bào gốc LGR6 + điều trị. Đối với bản đồ nhiệt độ bên trong, màu đỏ là biểu hiện lớn hơn trong vết thương chứa tế bào gốc biểu mô LGR6 + trong khi màu xanh lá cây cho biết biểu hiện lớn hơn bên trong ổ thương đối chứng. Trong đồ thị thanh tỷ lệ, số dương để chỉ mức biểu hiện cao hơn trong vết thương chứa tế bào gốc LGR6^{+GFP} và số âm thể hiện mức biểu hiện cao hơn trong các ổ vết thương đối chứng. Thuật ngữ NCBI Unigene được chỉ ra ở đầu mỗi cột định lượng và giá trị P (*) có ý nghĩa <0,05.

Hình 19 là đồ thị biểu thị phép đo tỷ trọng tương đối của ví dụ về ổ tế bào biểu hiện LGR liên quan đến việc phân phối vào và/hoặc xung quanh vết thương/tổn thương/chỗ trống và sự lan rộng của các yếu tố hàn gắn vết thương. Chất phân tích phát triển hệ mạch máu so sánh biểu hiện vết thương nhận LGR6 + ESCs mảng Proteomic so sánh các protein thông thường điều chỉnh và gia tăng phát triển hệ mạch máu. Các cột

màu xám chỉ ra vết thương kiểm soát và các cột màu đen chỉ ra những vết thương nhận được LGR6^{+GFP} ESC. Hình ảnh inset cho thấy các màng tế bào proteome làm ví dụ sau khi phát triển với hóa trị liệu HRP. Màu sáng hơn cho thấy mức biểu hiện protein cao hơn.

Các hình 20A-F minh họa một ví dụ về nhân tế bào biểu hiện LGR khi nó liên quan đến sự tái tạo của mô xương. Nhân LGR được tách ra có thể là xương được tạo ra và vẫn giữ sống được. Hình 20 là hình ảnh xương thô của xương được thu hoạch để nuôi cấy. Hình 20B là hình ảnh DIC của xương chứa LGR GFP 7 ngày sau khi nuôi cấy. Hình 20C là hình ảnh cùng tiêu điểm Green laser 488 nm của xương chứa LGR6^{+GFP} 7 ngày sau khi nuôi cấy. Lưu ý rằng nhân LGR có thể phải chịu sự kích tạo xương *in-vitro*. Hình 20D là nhân LGR sau 1 tuần kích tạo xương bằng môi trường bổ sung. Hình 20E là vết đỏ Alizarin của ổ LGR tiếp sau khi quá trình kích tạo xương phải chịu kích tạo xương *in-vitro* và điều hòa gen tạo xương chính. Cuối cùng, hình 20F là số liệu RT-PCR thể hiện mức biểu hiện gen gấp tương đối nhờ đó cột xám có mặt (đối chứng) không hủy xương LGR và cột đen là LGR mà nhận được môi trường kích tạo xương 7 ngày sau nuôi cấy. GAPDH được sử dụng làm gen giữ nhà tiêu chuẩn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây là một số ví dụ minh họa trình tự của phương pháp để thực hiện một phương án của sáng chế.

Trước khi tạo ra các đơn vị có chức năng cực tối thiểu theo sáng chế, giá thể gelatin như khung protein collagen ba chiều có thể được tạo ra theo các quá trình thông thường như sau:

- i. Bổ sung từ từ một phần dung dịch đậm 10X PBS được làm nguội trong môi trường nuôi cấy 10X vào 8 phần dung dịch collagen được làm nguội có xoáy nhẹ. Bổ sung ECM và các protein khả năng sống vào huyền phù;
- ii. Điều chỉnh độ pH của hỗn hợp đến 7,2-7,6 bằng cách sử dụng NaOH 0,1M vô trùng và theo dõi việc điều chỉnh pH một cách cẩn thận;
- iii. Điều chỉnh thể tích cuối đến tổng thể tích 10 phần bằng nước cất phân tử vô trùng;

- iv. Duy trì nhiệt độ của hỗn hợp ở nhiệt độ 2-10°C để ngăn ngừa sự tạo gel,
- v. Tạo gel bằng cách làm nóng đến 37°C trong khoảng 90 đến 120 phút;
- vi. Tạo lỗ trên khung protein bằng máy ép kim nhỏ vô trùng (khung protein có thể trải qua quá trình sấy khô nếu cần để bảo quản).

Đề xuất là chất bổ sung là Pulse Rescue Media (PRM) được tạo ra và có sẵn trước khi bắt đầu quy trình chiết khối kết tụ LGR.

PRM, theo phương án này là đề cập đến người, là hỗn hợp môi trường giữ tế bào, không chứa huyết thanh Keratinocyte-SFM chứa L-glutamin được cung cấp bởi yếu tố tăng trưởng biểu bì tái tổ hợp ở người được đóng gói riêng biệt 1-53 (EGF 1-53) và dịch chiết tuyến yên ở bò (BPE) được Thermo Fisher Scientific bán dưới tên Keratinocyte-SFM (1X), theo đó các chất kháng sinh chống nấm penicillin, streptomycin và amphotericin B được thêm vào cùng với chất GMP-fibrinogen: người. Chất được sử dụng trong phương án này là Chất kháng sinh- chống nấm GIBCO® của Thermo Fisher Scientific, dung dịch chứa 10.000 đơn vị/ml penicillin, 10.000 µg/ml streptomycin, và 25 µg/ml thuốc chống nấm FUNGIZONE®. Bởi vì PRM được sử dụng để vận chuyển mô người, nên các thuốc thử bổ sung được sử dụng để ổn định mô nguyên sinh và giảm khả năng sống sót của vi sinh vật trong quá trình xử lý và vận chuyển.

Phần tiếp theo đề cập một cách cụ thể đến việc tạo và bảo quản các đơn vị có chức năng kết tụ của tế bào gốc chứa biểu mô biểu hiện LGR theo sáng chế.

Ví dụ 1

Ví dụ 1 liên quan đến phương pháp chiết các đơn vị có chức năng có cực tối thiểu theo phương án của sáng chế. Sau khi thu được mẫu, nó sẽ được lấy ra khỏi đồ chứa vận chuyển được gắn kết, sau đó:

- i. Đặt mẫu vào ống hình nón vô trùng 50 ml có chứa môi trường giải phóng xung và đặt lên máy lắc trong 5 phút, lặp lại với môi trường mới và các đồ chứa tổng cộng ba lần;

ii. Loại bỏ và đặt mẫu vật vào đĩa nuôi cấy vô trùng có chứa các môi trường xung và các phần tử mỡ và cắt các thành phần hạ bì và mỡ ra khỏi khoang da và biểu bì một cách cẩn thận. Các đơn vị nang được đặt đúng chỗ và không được cắt bỏ quá;

iii. Đặt các thành phần mỡ ở hạ bì vào riêng ống hình nón 50ml có chứa PRM và đặt ở +4°C trên máy lắc chậm.

iv. Phân chia các thành phần da còn lại có chứa khoang biểu bì, khoang nang lông và khoang da vào các đơn vị có chức năng cực tối thiểu (MPFU) bằng cách sử dụng Blades WECPREP® cực mạnh hoặc một số dạng lưới trích 16 micro; và

v. Đặt các thành phần của MPFU vào riêng một ống hình nón 50ml có chứa môi trường xung và đặt ở +4°C.

Tiếp sau đây liên quan đến quy trình thứ cấp, trong đó việc nuôi cấy sơ cấp được thiết lập và các thành phần mô có chức năng được chuẩn bị bằng cách sử dụng chế phẩm enzym sử dụng các thiết bị CLIA thông thường và các chất thử đạt chứng nhận FDA và/hoặc GMP.

Ví dụ 2

Ví dụ 2 đề cập đến việc xử lý các thành phần tế bào biểu bì và dưới da. Ví dụ 2 bao gồm các bước sau:

i. Xịt 70% etanol (EtOH) ở bên ngoài của đồ chứa chứa mô và đặt đồ chứa chứa mô vào khoang không khí lớp mỏng;

ii. Gửi mẫu mô hoặc môi trường chuyển đổi để thử nghiệm vi sinh vật;

iii. Đặt mô mỡ và hạ bì đã được rửa trước đó trong đĩa petri vô trùng;

iv. Rửa mô hai lần với PRM;

v. Cắt mô thành các miếng nhỏ (3mm) bằng dụng cụ phẫu thuật vô trùng và đặt vào đĩa nuôi cấy vô trùng có chứa môi trường xung trong khi việc giải phẫu đã hoàn thành;

vi. Hút môi trường ra khỏi đĩa và loại bỏ các mẫu bằng thìa vô trùng hoặc kẹp, sau đó đặt mẫu vào ống hình nón 50 ml có chứa môi trường tiêu hóa enzym MSC, dung dịch chứa enzym tiêu hóa được pha trộn trước (trên cơ sở collagenase và dispase), đặt vào chậu

nước 37°C hoặc máy lắc chậm làm khô bằng nhiệt và lắc trong 30 phút hoặc cho đến khi có ít chất dạng hạt còn lại;

vii. Bổ sung nước muối đệm phosphat (PBS) 37°C etylendiamin tetra axit axetic (EDTA) (thể tích cân bằng PBS-EDTA) để ngăn ngừa sự tiêu hóa;

viii. Ly tâm huyền phù trong 10 phút để tạo ra viên "mềm";

ix. Loại bỏ phần chất lỏng phía trên và sử dụng ột pipet vô trùng, tách quần thể mỡ ra phân đoạn mạch máu (stfal-vascular fraction - SVF) trong lượng đã được lưu;

x. Tái tạo huyền phù SVF trong dung dịch muối đệm phosphat/EDTA, PBS-EDTA (1 mM EDTA), và tạo huyền phù quần thể tế bào tạo mỡ trong PRM trong hai ống hình nón riêng biệt;

xi. Sử dụng 100 μ m vô trùng, lọc huyền phù vào ống nón vô trùng mới;

xii. Rửa dụng cụ lọc với PBS-EDTA;

xiii. Quay lọc chất huyền dịch trong 10 phút ở nhiệt độ phòng, tiếp theo hút môi trường và thay thế môi trường này bằng thể tích môi trường mới đã biết;

xiv. Sử dụng bộ đếm tế bào tự động COUNTESS® (Thermo Fisher Scientific), đếm số tế bào để xác định khả năng sống được;

xv. Loại bỏ 20% quần thể tế bào thu được để bảo quản lạnh bằng SYNTH-A-FREEZE® CTS™ (Cell Therapy Systems) của Thermo Fisher Scientific và sau đó chia thành loại một cách thích hợp trong khi sử dụng 80% quần thể cho việc tạo ra cấu trúc.

Ví dụ 3

Ví dụ 3 đề cập đến việc bổ sung các thành phần mỡ hạ bì và dưới da theo ví dụ về cấu trúc theo phương án của sáng chế. Ví dụ bổ sung về thành phần này được minh họa như sau:

i. Đặt đĩa nuôi cấy tế bào NUNC® Skin Graft vô trùng hoặc đĩa tự động đã chứa sẵn khung protein được tạo ra và rửa sạch vào miếng đệm dòng và rửa lại khung hai lần với môi trường xung trước khi bổ sung tế bào;

ii. Chèn một nhãn trên mỗi bình nuôi cấy và đánh số theo dõi;

- iii. Chuyển khoảng 5×10^5 đến 1×10^6 tế bào SVF hỗn hợp cho mỗi hệ đĩa và 1×10^5 tế bào tạo mỡ trên mỗi đĩa;
- iv. Bổ sung môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh có hoặc không có PRP cùng nguồn đã được chỉnh sửa theo yêu cầu cụ thể của tình huống, vào bình chứa nạp liệu;
- v. Chuyển các đĩa vào trong lồng ấp trên máy lắc chậm trong 1 giờ, sau đó lấy ra khỏi đó và để 48 giờ trong môi trường dự trữ riêng biệt;
- vi. Rửa môi trường nuôi cấy sau 48 giờ, loại bỏ các tế bào không gắn kết, và làm mới môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh. Chụp lại bằng thiết bị hình ảnh như EVOS® (ThermoFisher Scientific) và lưu trữ với số theo dõi đã được chỉ định.
- vii. Thay thế môi trường nuôi cấy sau mỗi 72 giờ;
- viii. Tại điểm giao thoa, rửa môi trường nuôi cấy với dung dịch muối đệm phosphat Dulbecco (DPBS) và thay môi trường nuôi cấy bằng môi trường tươi mới.
- ix. Đặt các cấu trúc duy nhất có chức chứa tế bào gốc biểu mô (ESC FSUs) trực tiếp trên bề mặt của cấu trúc tế bào gốc trung mô (MSC), bổ sung môi trường ESC để bao phủ cả cấu trúc, chụp ảnh tương tự và thay thế cấu trúc này vào lồng ấp.
- x. Thay đổi/thay thế môi trường cấu trúc sau mỗi 48 giờ.

Ví dụ 4

Ví dụ 4 liên quan đến việc làm giàu đơn vị đơn có cực tối thiểu của tế bào gốc biểu mô.

Tiếp theo ví dụ 1, các MPFU được đặt trong môi trường giải phóng xung trong ống hình nón 15ml và quay ly tâm vào viên mềm. Các chất liệu sau đó phải chịu quá trình tiêu hóa một phần như sau:

- i. Thu được dung dịch đệm tiêu hóa 10ml đã được đông lạnh trước (trên cơ sở collagenaza và dispaza), đã được đưa đến nhiệt độ phòng trước khi bổ sung MPFU;
- ii. Bổ sung dung dịch tiêu hoá vào viên mềm chứa MPFU và trộn nhẹ, bằng cách nhét, ống hình nón để làm cho MPFU phân tán trong dung dịch;
- iii. Đặt ống vào bể nước ở 37°C hoặc môi trường khô trong 10 phút;

- iv. Tháo ống ra khỏi lồng ấp/bể, bung nhẹ ống và kiểm tra thành phần của chuỗi;
- v. Quan sát chuỗi, ly tâm vào viên mềm;
- vi. Rửa viên chứa tế bào trong 5-10 mL môi trường SFM hoàn chỉnh (Keratinocyte-SFM (1X) của ThermoFisher Scientific) và ly tâm lại vào viên mềm lần nữa;
- vii. Tái tạo huyền phù viên chứa đơn vị đơn có chức được hoạt hóa trong 5 ML môi trường Keratinocyte-SFM hoàn chỉnh; và
- viii. Xác định mật độ tế bào của đơn vị bằng cách sử dụng COUNTESS® Automated Cell Counter (ThermoFisher Scientific).

Ví dụ 5

Ví dụ 5 liên quan đến việc bổ sung đơn vị đơn có chức chứa tế bào gốc biểu mô (ESC aFSUs) thu được từ Ví dụ 4 vào khung protein/cấu trúc. Quy trình như sau:

- i. Đặt đĩa nuôi cấy tế bào ghép bề mặt da UPCELL™ có chứa sẵn khung protein đã được tạo ra và rửa sạch, và để đảm bảo độ pH sinh lý, rửa lại khung protein hai lần với môi trường xung trước khi bổ sung các tế bào;
- ii. Ghi nhãn mỗi ống nuôi cấy với một số theo dõi duy nhất;
- iii. Chuyển ESC aFSUs sang cấu trúc thông qua việc chuyển một lần pipet sử dụng môi trường SFM Keratinocyte đã được xác định hoàn chỉnh (tùy ý bổ sung PRP cùng nguồn);
- iv. Bổ sung môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh vào bể chứa lựa chọn và đảm bảo bao phủ cấu trúc hoàn toàn;
- v. Chuyển đĩa vào lồng ấp lên máy lắc chậm trong 1 giờ. Sau đó loại bỏ ra khỏi máy lắc và để yên trong 48 giờ trong lồng ấp riêng;
- vi. Mỗi 48 giờ, hút môi trường nuôi cấy và bổ sung môi trường nuôi cấy Keratinocyte mới. Chụp ảnh việc nuôi cấy với EVOS® và lưu với số theo dõi đã được chỉ định. Gia tăng các nguyên bào nướu (GF) và protein có khả năng sống được và/hoặc bổ sung PRP nếu cần thiết được phát hiện tại thời điểm này.

- vii. Thay thế môi trường nuôi cấy sau mỗi 48-72 giờ;
- viii. Sau khi đạt được nhập dòng, rửa môi trường nuôi cấy với DPBS và thay môi trường. Giảm nhiệt độ bằng cách sử dụng hệ dựa vào nhiệt độ của khung cấu trúc protein ESC để tạo điều kiện giải phóng khỏi đĩa;
- ix. Đặt ESC trực tiếp lên bề mặt của cấu trúc MSC và bổ sung môi trường hỗn hợp để bao phủ cả hai cấu trúc. Chụp cấu trúc, đặt nó lại vào môi trường và thay đổi môi trường cấu trúc sau mỗi 48 giờ.
- x. Để xác nhận việc duy trì phân cực, chụp cấu trúc hàng ngày và bổ sung môi trường thích hợp. Hình thành môi trường vỏ sau khi xác nhận sự phân cực được duy trì trong 48 giờ;
- xi. Rửa cấu trúc hai lần với môi trường xung khí thu hoạch và thay thế các môi trường bằng môi trường được xác định vận chuyển sử dụng nền cơ sở CTS™ STEMPRO® MSC SFM.

Ví dụ 6

Ví dụ 6 đề cập đến các protocol minh họa cho đảm bảo chất lượng và việc hoàn tất cấu trúc liên quan việc bảo quản lạnh đòi hỏi sự chuẩn bị cấu trúc để vận chuyển theo quy trình sản xuất tốt (GMP) đối với các ứng dụng điều trị tế bào và bao gồm:

- i. Thu nhận được một khối lượng thích hợp môi trường bảo quản lạnh SYNTH-A-FREEZE® (Thermo Fisher Scientific) và lưu trữ môi trường ở 2°C đến 8°C cho đến khi sử dụng;
- ii. Chuẩn bị, thu hoạch và xác định mật độ tế bào sử dụng COUNTESS® Automated Cell Counter trước khi ly tâm một lượng tế bào như mong muốn trong đó mật độ tế bào điển hình để bảo quản lạnh với môi trường SYNTH-A-FREEZE® là 5×10^5 đến 3×10^6 ;
- iii. Tái tạo huyền phù các viên chứa tế bào trong thể tích được xác định trước từ 2°C đến 8°C của môi trường SYNTH-A-FREEZE®;
- iv. Phân phối ngay hỗn hợp thu được vào ống cryovial theo quy định của nhà sản xuất;

v. Đặt các ống cryovial vào hệ làm lạnh thích hợp, như hệ MR. FROSTY™ có sẵn của Thermo Fisher Scientific Inc., duy trì ở nhiệt độ đông lạnh -80°C ;

vi. Chuyển các bình đến kho lưu trữ pha hơi khí nitơ lỏng ở nhiệt độ -200°C đến -125°C .

Các phương án của sáng chế đã được mô tả với các đặc điểm kỹ thuật đi kèm. Cần phải hiểu rằng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể thực hiện sửa đổi và thực hiện các phương án của sáng chế từ các ý tưởng về sáng chế, được bộc lộ trong phần mô tả và các hình vẽ liên quan. Do đó, cũng cần hiểu rằng sáng chế không giới hạn ở các phương án cụ thể được trình bày ở đây, và các sửa đổi và phương án khác của sáng chế nằm trong phạm vi của sáng chế này. Hơn nữa, mặc dù các thuật ngữ cụ thể được sử dụng trong tài liệu này, chúng chỉ được mô tả chung, và không nhằm mục đích giới hạn mô tả sáng chế.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Sáng chế liên quan đến các phương pháp tạo ra và sử dụng các cấu trúc của các mảnh ghép đa bào đa vi kết tụ chứa các tế bào biểu hiện thụ thể cặp đôi G-protein chứa các đơn vị lặp lại giàu Leucine được tách ra (LGR) để phân phối, áp dụng, ghép, cấy, nuôi cấy trực tiếp, di chuyển trực tiếp, lựa chọn trực tiếp, trong việc sắp đặt, tạo lớp mỏng và/hoặc bơm thành phần tế bào tạo ra, tái tạo, gia tăng và/hoặc hàn gắn hệ biểu mô, các tuyến mồ hôi, lông, thần kinh, xương, cơ, mỡ, gân, mạch máu, mô gân, mô mắt và các thành phần tế bào tiết peptit cho việc ứng dụng điều trị vết thương, kỹ thuật mô, ứng dụng liệu pháp tế bào, ứng dụng y học tái tạo, ứng dụng điều trị làm lành vết thương, ứng dụng miễn dịch trị liệu, và các ứng dụng trị liệu ghép mô.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp bào chế chế phẩm đa bào vi kết tụ có cực tối thiểu, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:
 - (a) tách các thành phần hạ bì và mỡ ra khỏi các khoang da và biểu bì của mẫu mô của động vật có vú *ex vivo* để tạo ra các thành phần da còn lại có chứa khoang biểu bì, khoang da, và khoang nang lông; và
 - b) phân đoạn khoang biểu bì, khoang da, và khoang nang lông để mở khoang nang lông và cung cấp chế phẩm, trong đó chế phẩm này bao gồm đoạn biểu bì, đoạn da, và đoạn của khoang nang lông, trong đó các đoạn này được liên kết và trong đó đoạn của khoang nang lông bao gồm các tế bào gốc biểu hiện LGR sống mà được tiếp xúc, trong đó chế phẩm có khả năng tái tạo mô chức năng bao gồm biểu bì, da, và các phần phụ khi đã cấy vào vị trí mô bị tổn thương ở đối tượng cần chúng.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước bổ sung vào chế phẩm chất mang được dụng.
3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó các tế bào gốc biểu hiện LGR sống bao gồm các tế bào gốc biểu hiện LGR4, các tế bào gốc biểu hiện LGR5, các tế bào gốc biểu hiện LGR6, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.
4. Phương pháp theo điểm 2, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước bảo quản lạnh chế phẩm.
5. Phương pháp theo điểm 2, trong đó mẫu mô của động vật có vú là mẫu mô người.
6. Phương pháp theo điểm 2, trong đó bước b) bao gồm công đoạn phân đoạn khoang biểu bì, khoang da, và hành lông (bulge) của khoang nang lông.
7. Phương pháp theo điểm 2, trong đó bước b) bao gồm công đoạn phân đoạn khoang biểu bì, khoang da, và củ lông (bulb) của khoang nang lông.
8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước bổ sung vào chế phẩm chất nền phân phối được chọn từ khung protein, chất nền, hạt, các tế bào, sợi, hoặc các tổ hợp của chúng.

9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó các tế bào gốc biểu hiện LGR sống bao gồm các tế bào gốc biểu hiện LGR4, các tế bào gốc biểu hiện LGR5, các tế bào gốc biểu hiện LGR6, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.
10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước bảo quản lạnh chế phẩm.
11. Phương pháp theo điểm 1, trong đó mẫu mô của động vật có vú là mẫu mô người.
12. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước b) bao gồm công đoạn phân đoạn khoang biểu bì, khoang da, và hành lông (bulge) của khoang nang lông.
13. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước b) bao gồm bước phân đoạn khoang biểu bì, khoang da, và củ lông (bulb) của khoang nang lông.

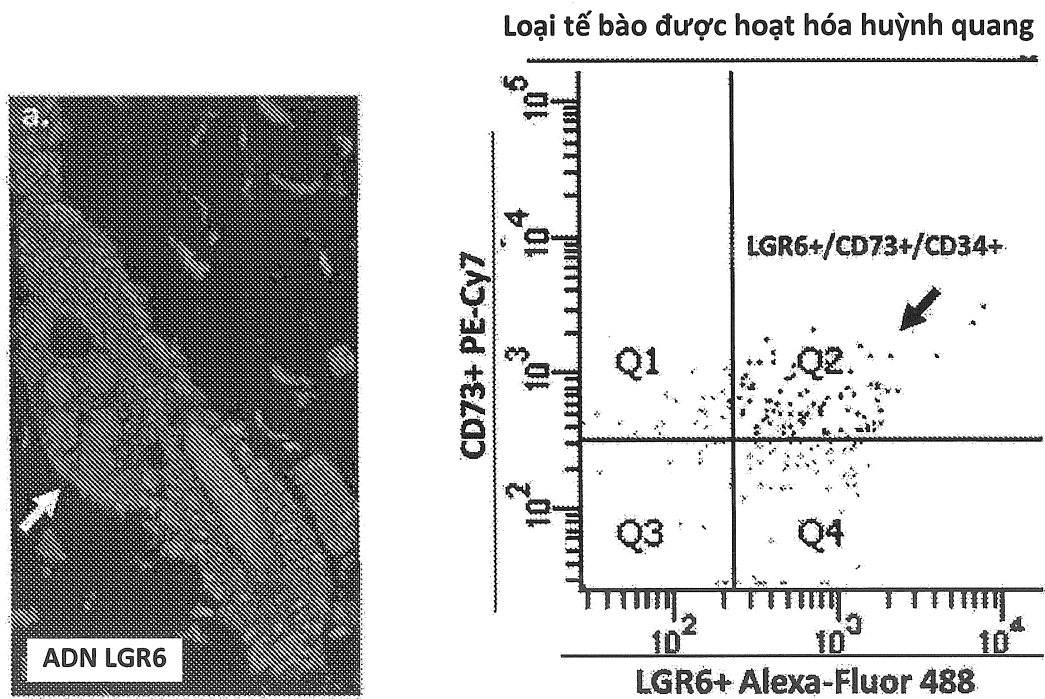


FIG. 1A

FIG. 1B

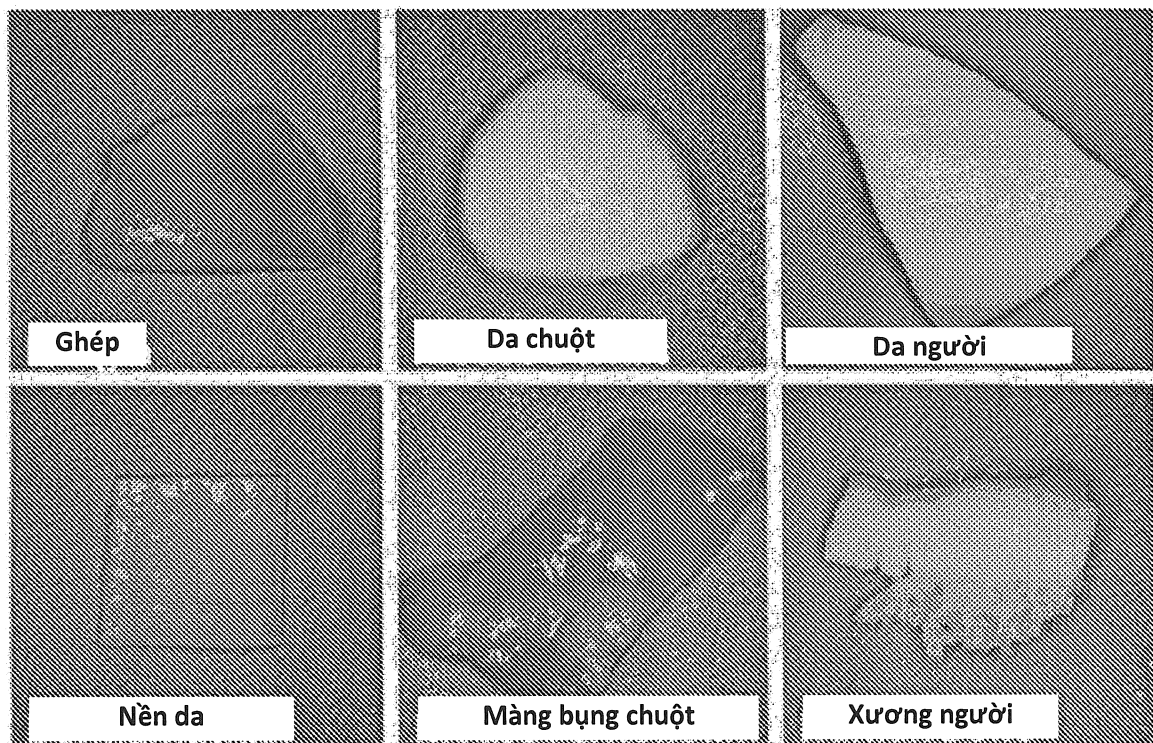


FIG. 1C

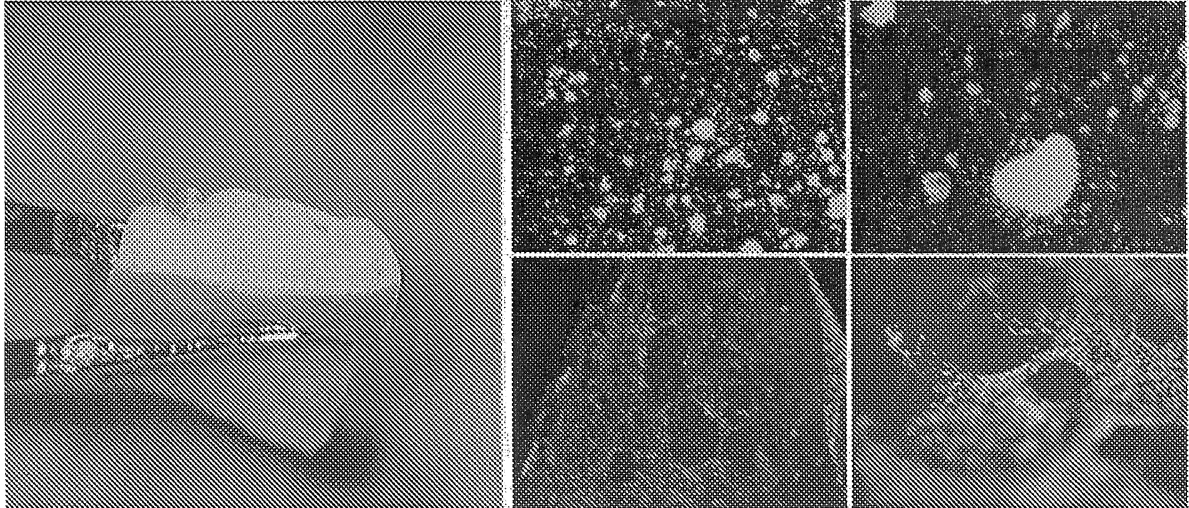
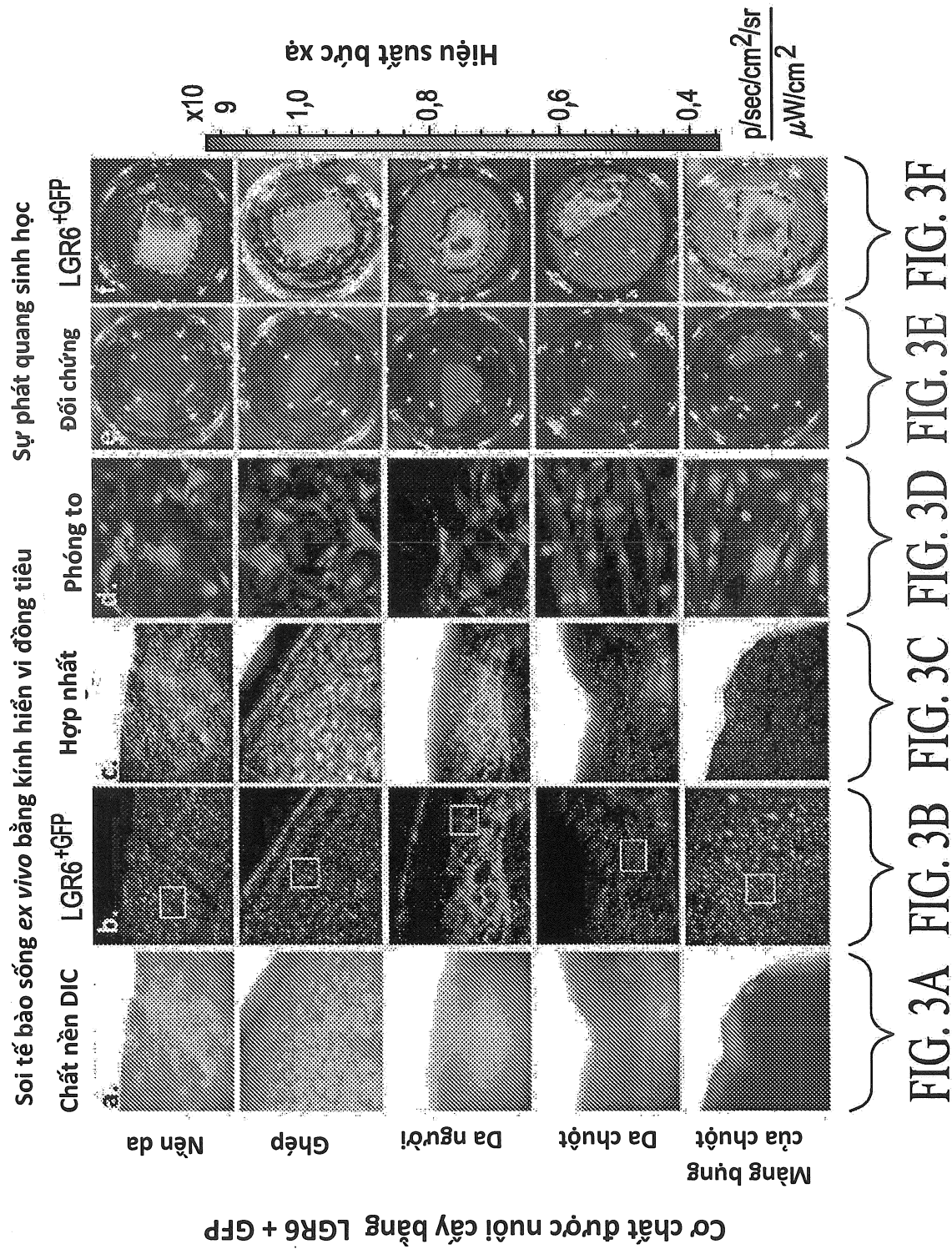


FIG. 2A

FIG. 2B



4/27

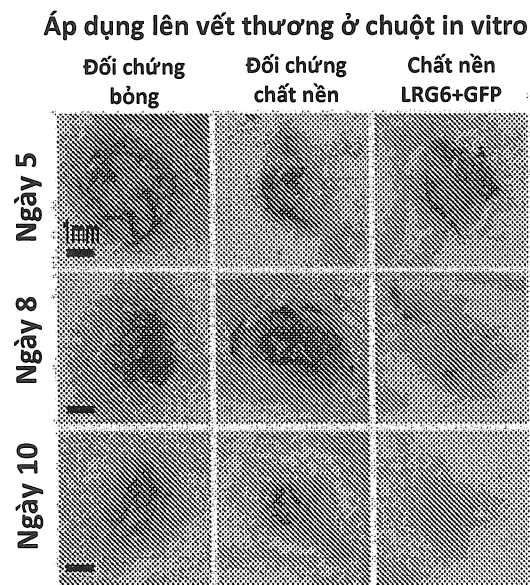


FIG. 4A

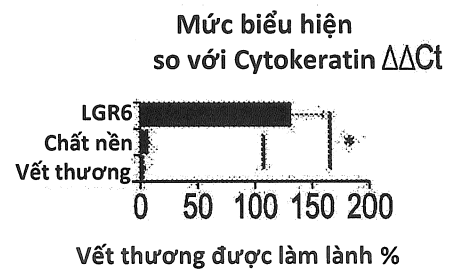


FIG. 4B

Phát quang sinh học in vivo

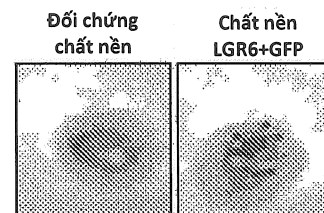


FIG. 4C

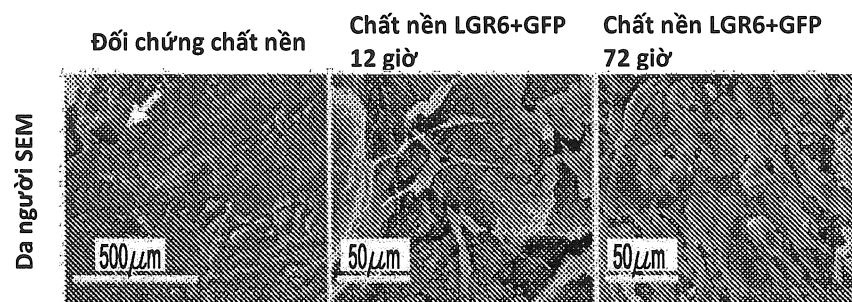


FIG. 4D

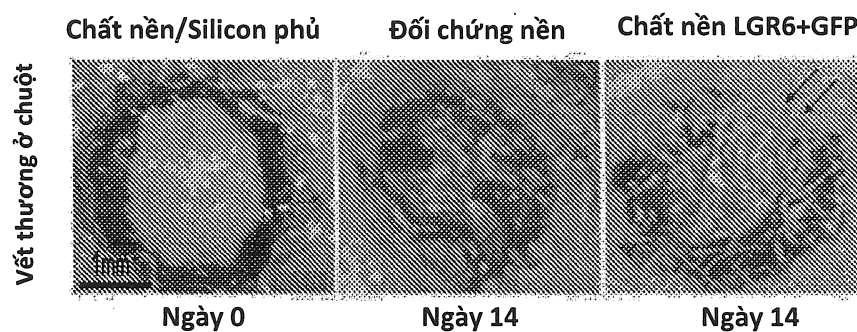


FIG. 4E

5/27

FIG. 5A

FIG. 5B

FIG. 5C

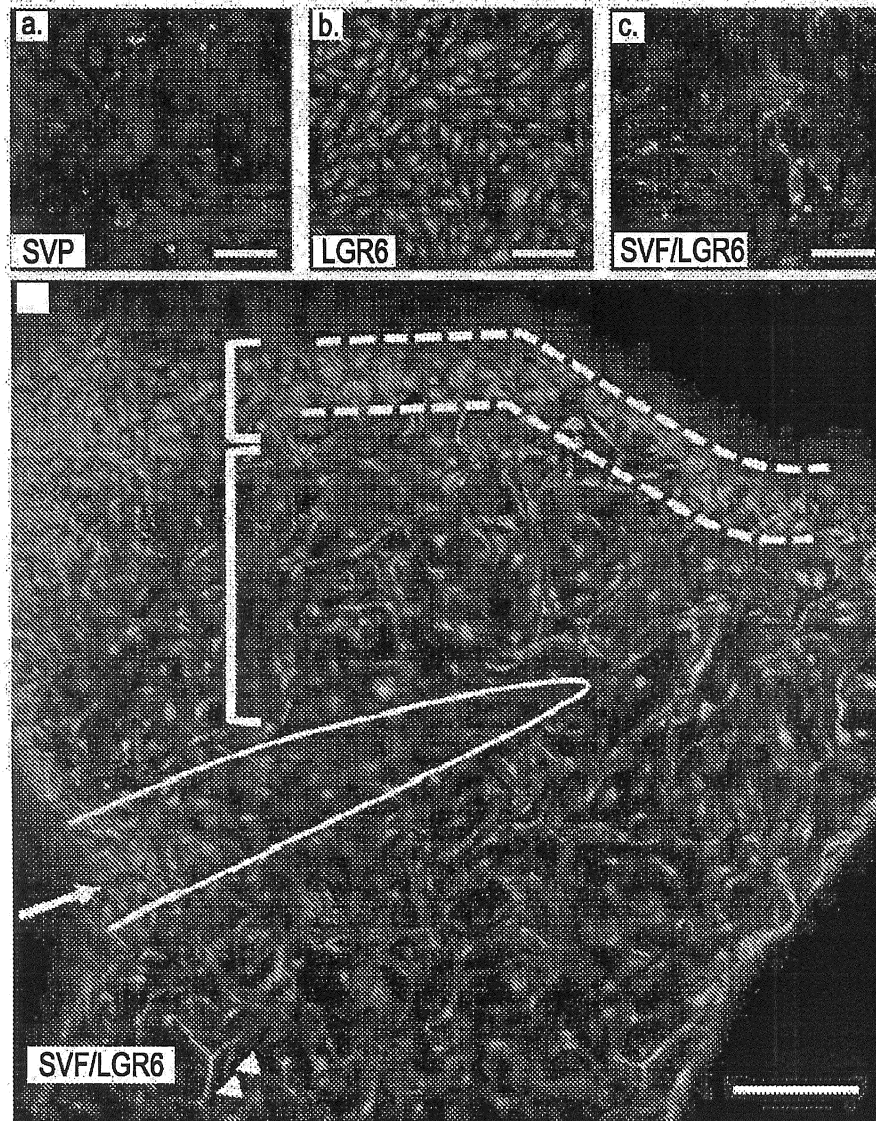


FIG. 5D

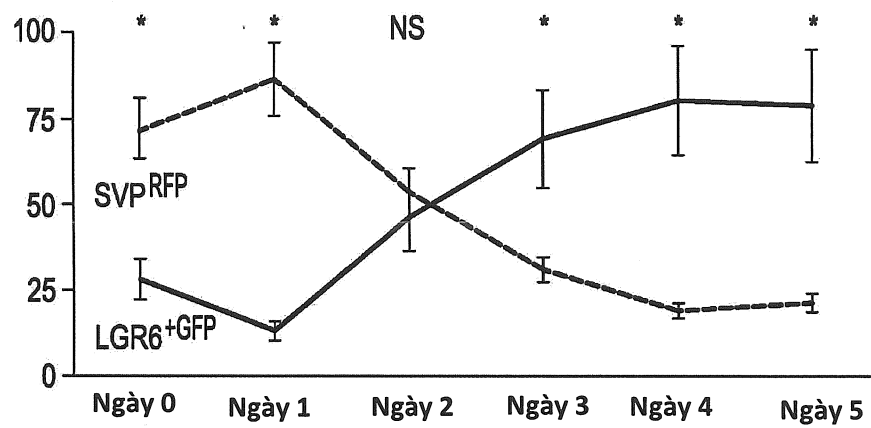


FIG. 5E

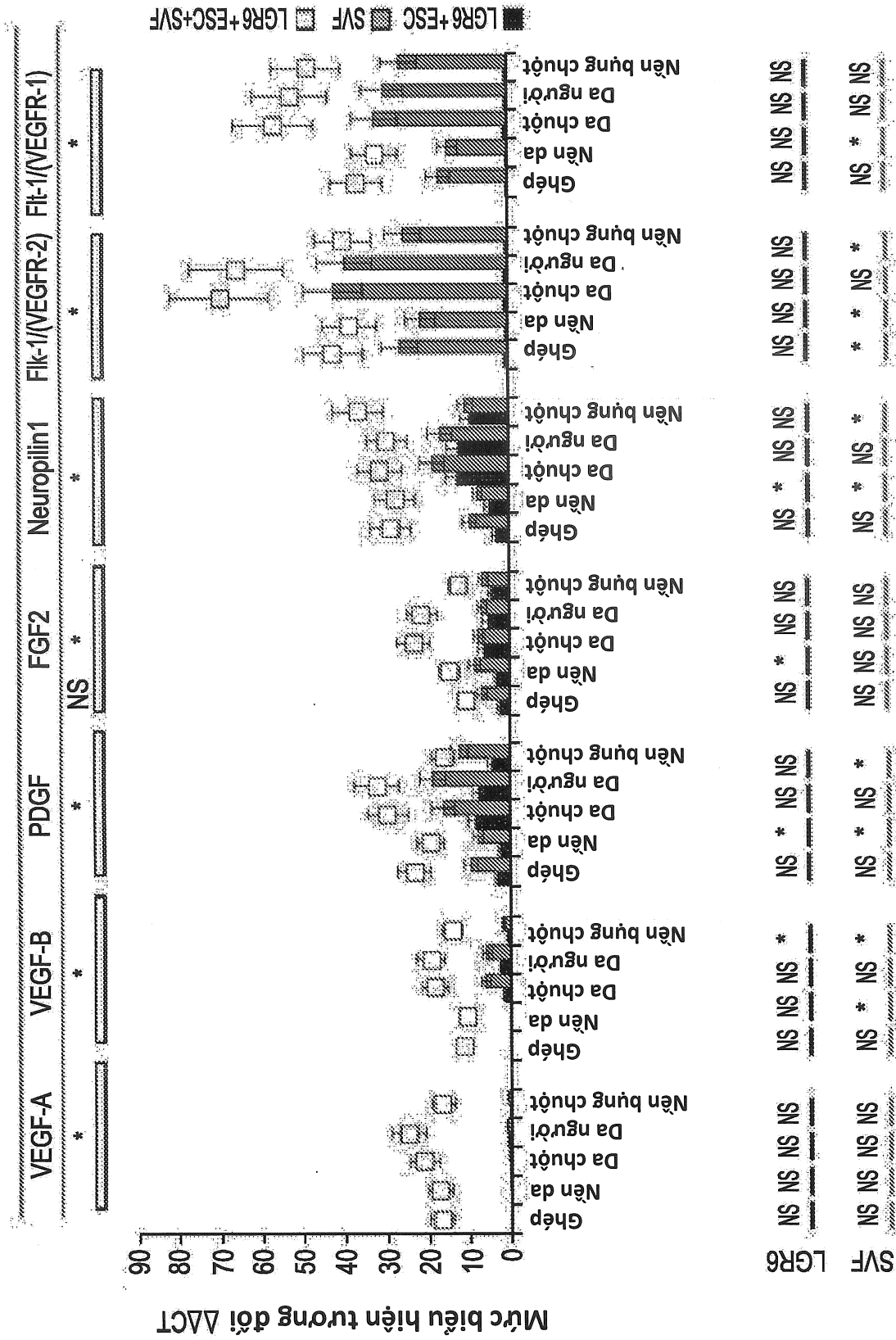


FIG. 6A

7/27

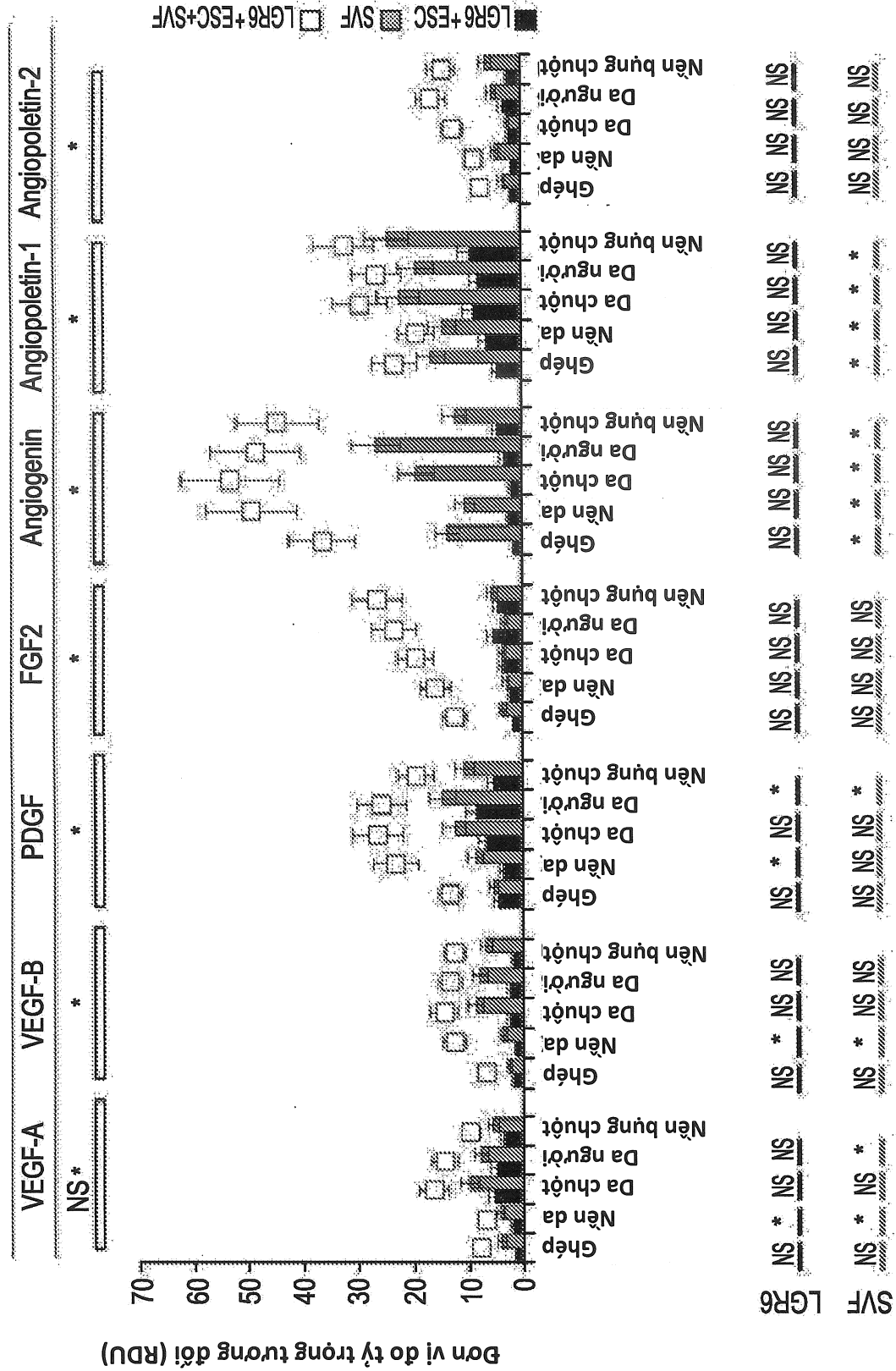


FIG. 6B



FIG. 7A

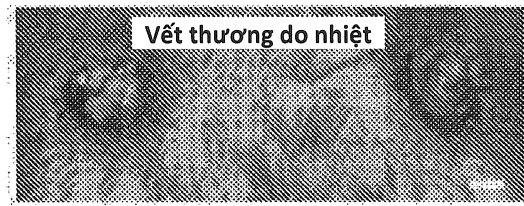


FIG. 7B

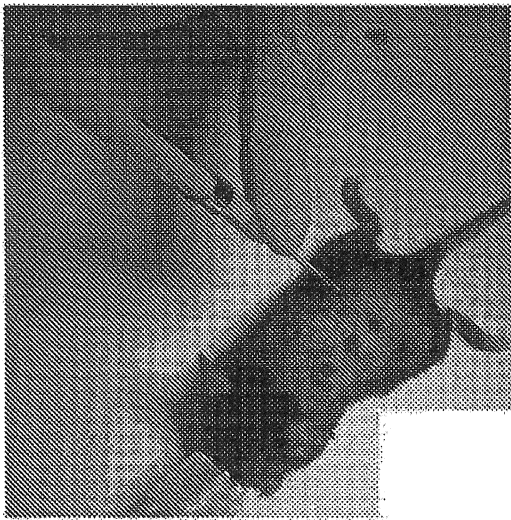


FIG. 7C

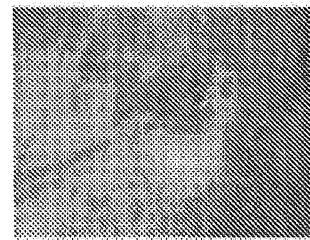


FIG. 7D

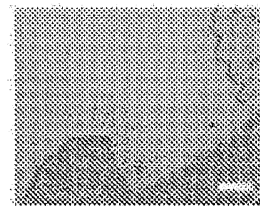


FIG. 7F

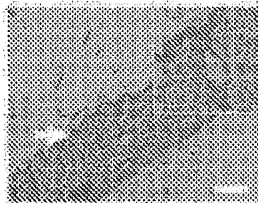


FIG. 7E

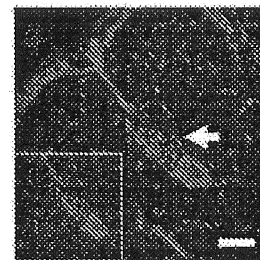


FIG. 7G

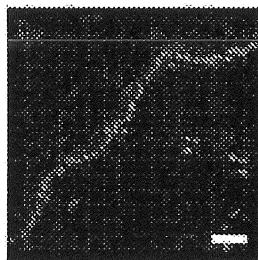
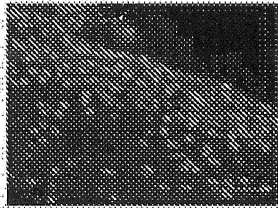


FIG. 7H

9/27

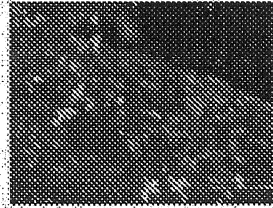
Ngày 5



ADN

FIG. 8A

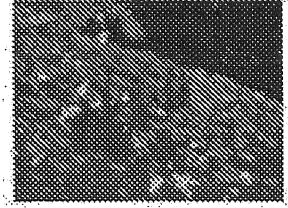
Ngày 5



16S rARN vi khuẩn

FIG. 8B

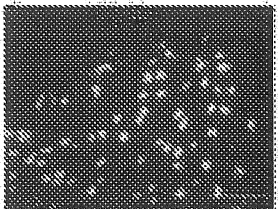
Ngày 5



Ghép

FIG. 8C

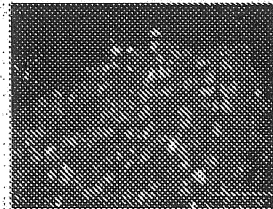
Ngày 10



ADN

FIG. 8D

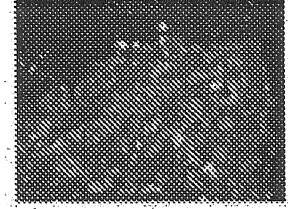
Ngày 10



16S rARN vi khuẩn

FIG. 8E

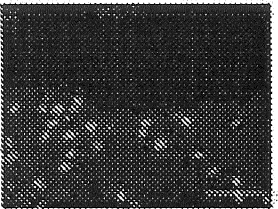
Ngày 10



Ghép

FIG. 8F

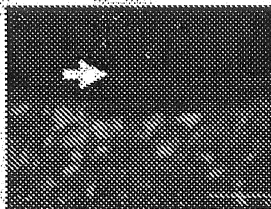
Ngày 5



ADN

FIG. 8G

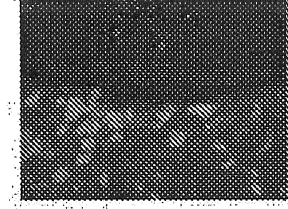
Ngày 5



16S rARN vi khuẩn

FIG. 8H

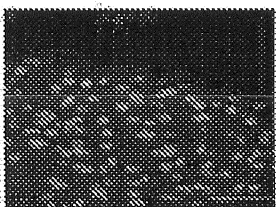
Ngày 5



Ghép

FIG. 8I

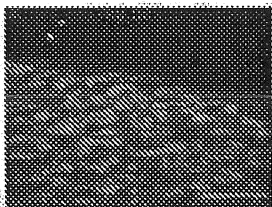
Ngày 10



ADN

FIG. 8J

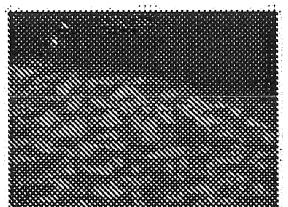
Ngày 10



16S rARN vi khuẩn

FIG. 8K

Ngày 10



Ghép

FIG. 8L

10/27

FIG. 8M

FIG. 8N

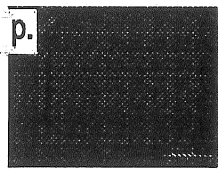
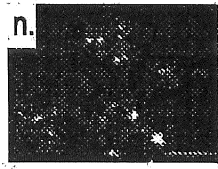
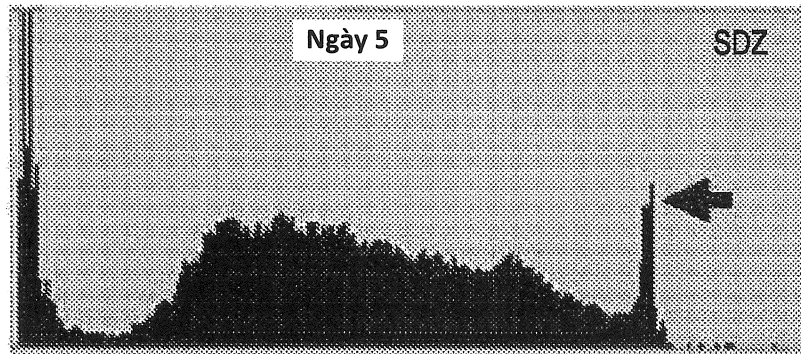
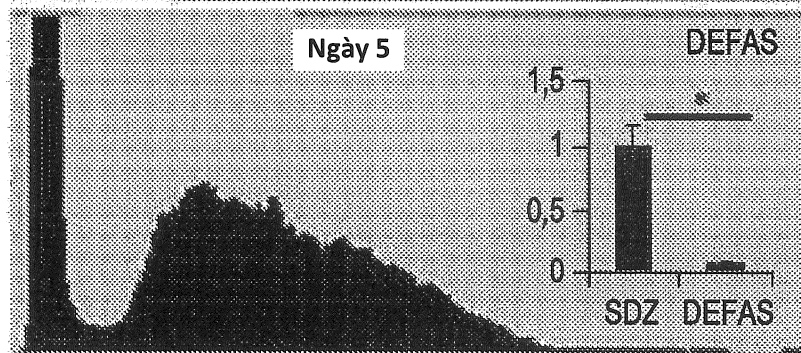


FIG. 8P

Số Pixel



Số Pixel



Mật độ màu trắng so sánh

FIG. 8O

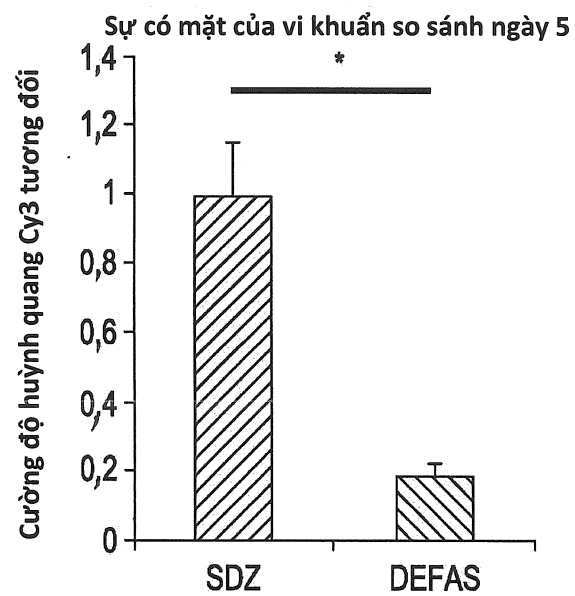
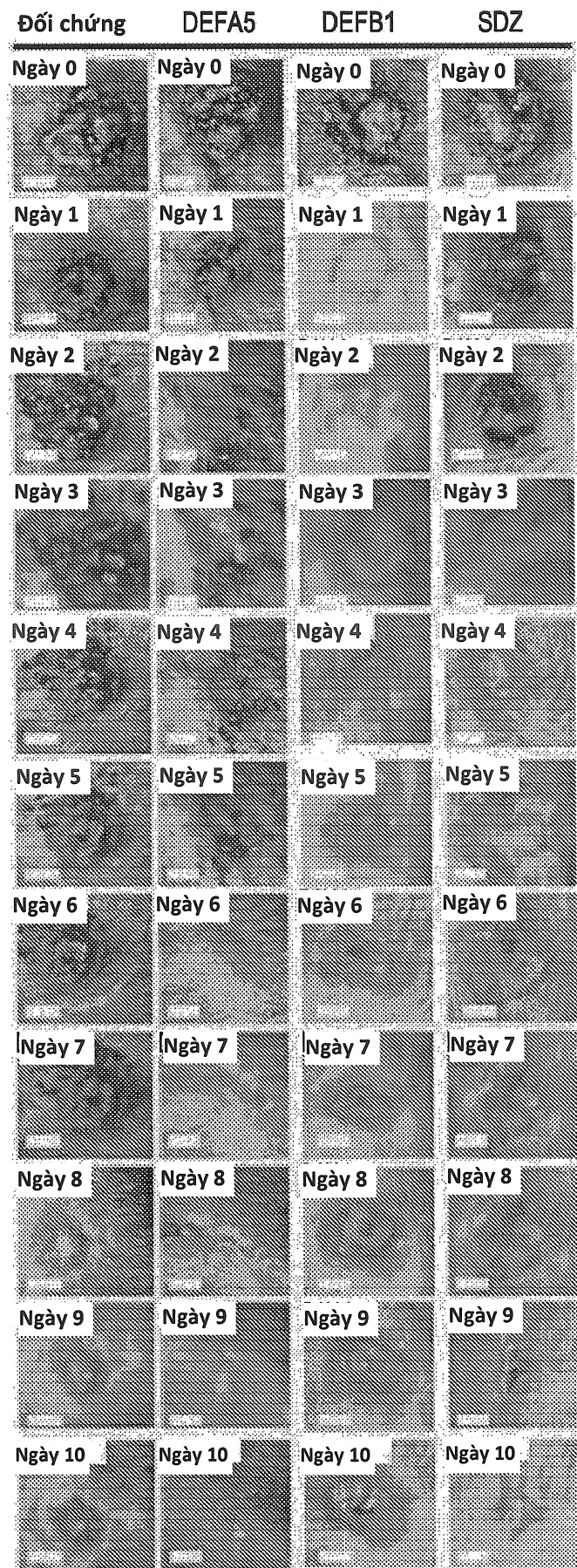


FIG. 8Q

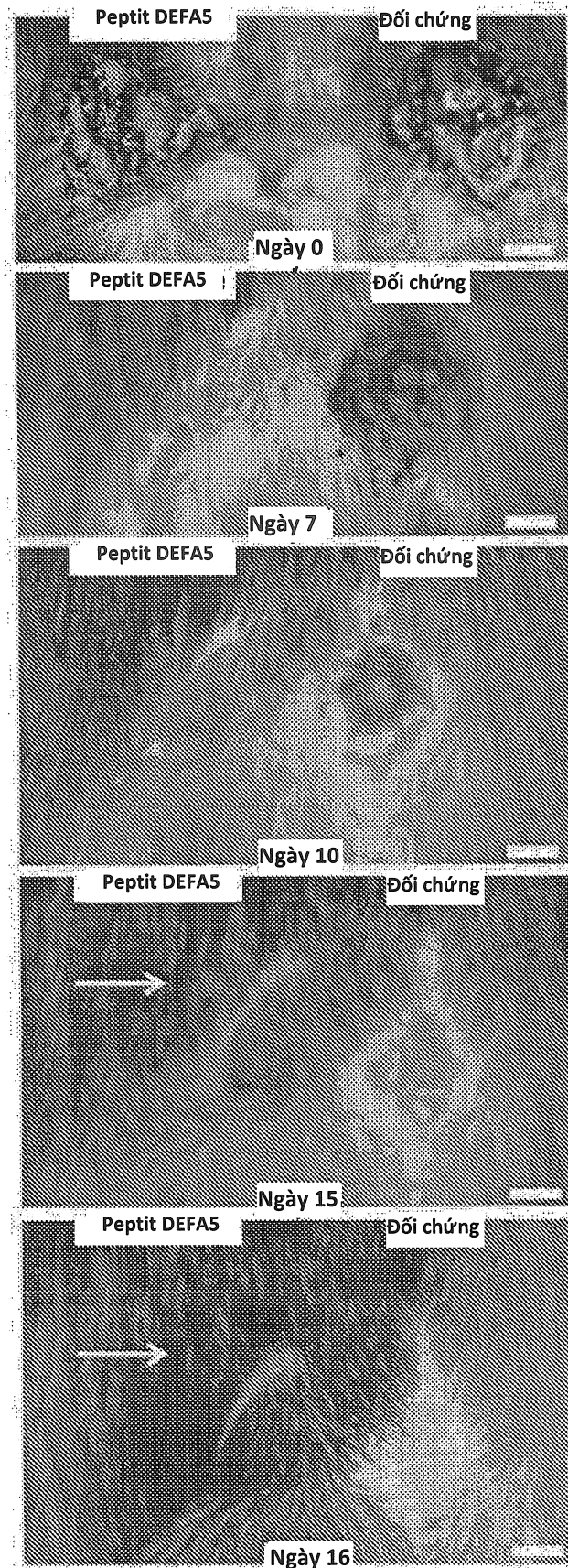
11/27

FIG. 9A



12/27

FIG. 9B



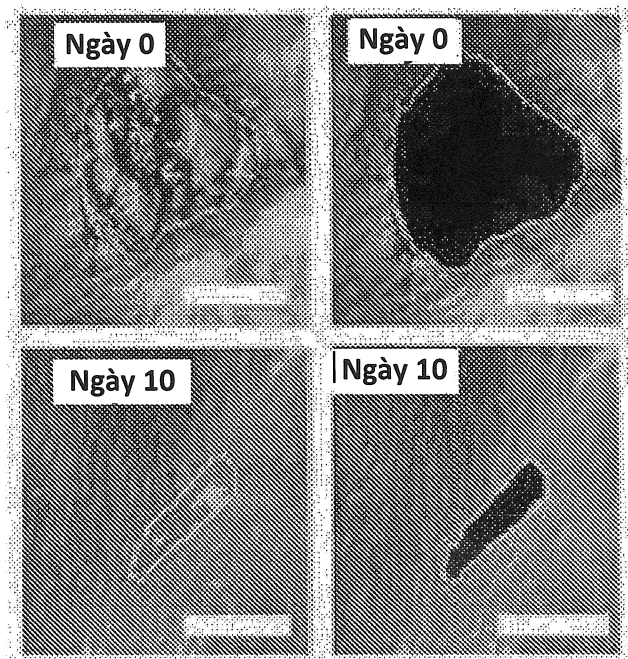


FIG. 10A

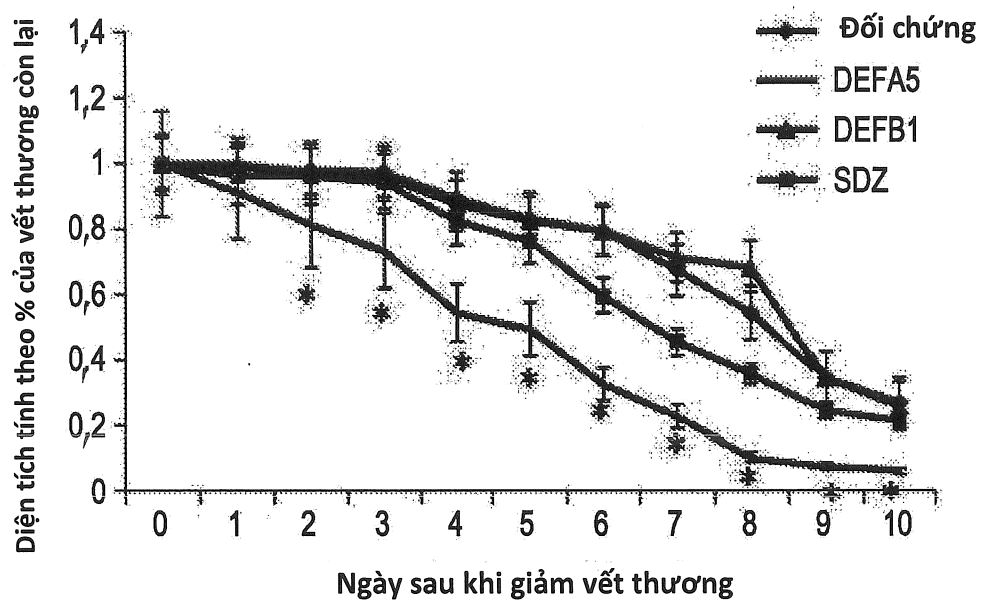


FIG. 10B

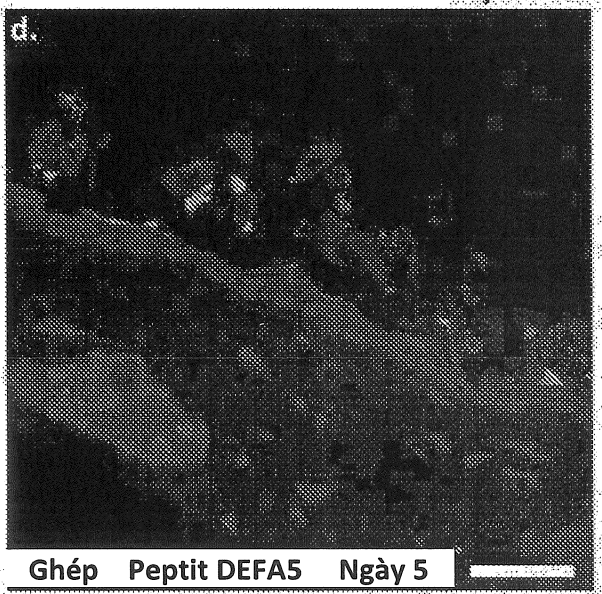
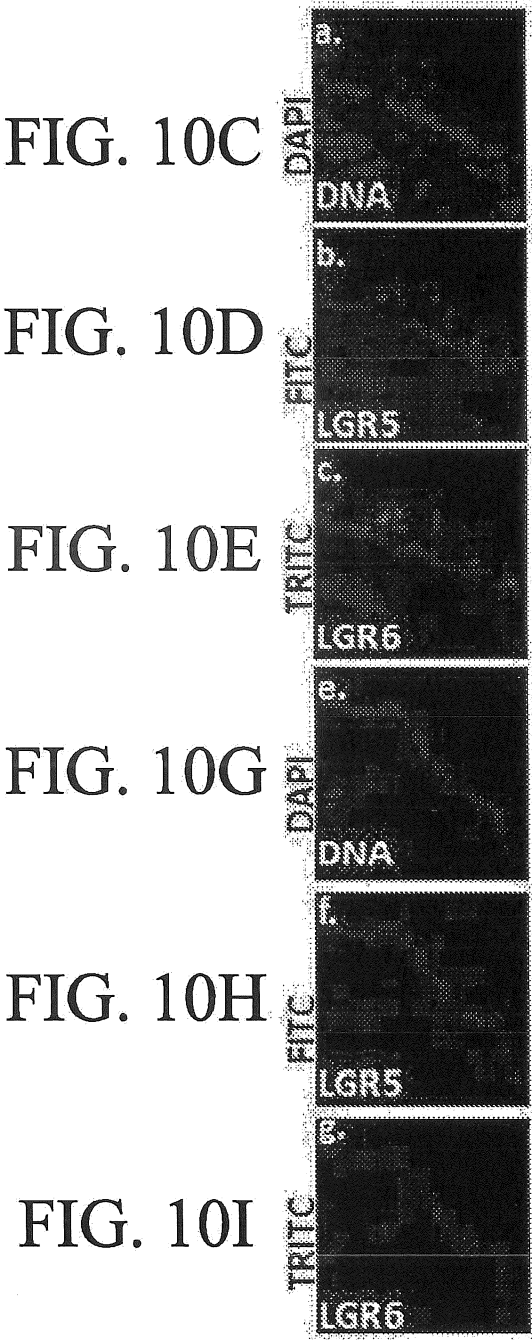


FIG. 10F

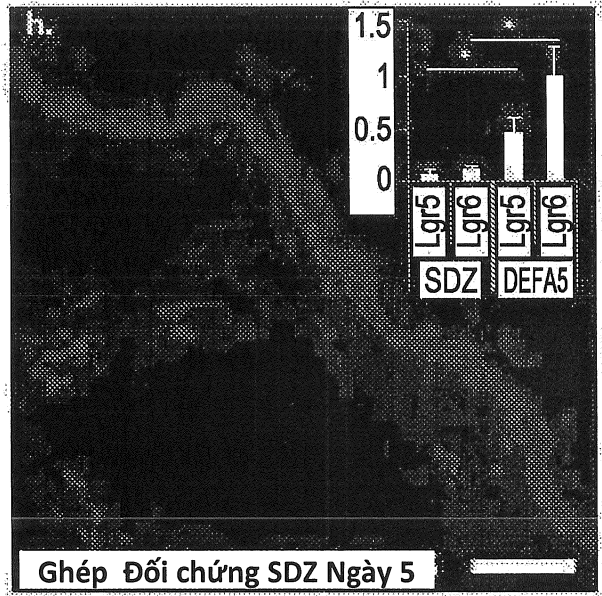


FIG. 10J

15/27

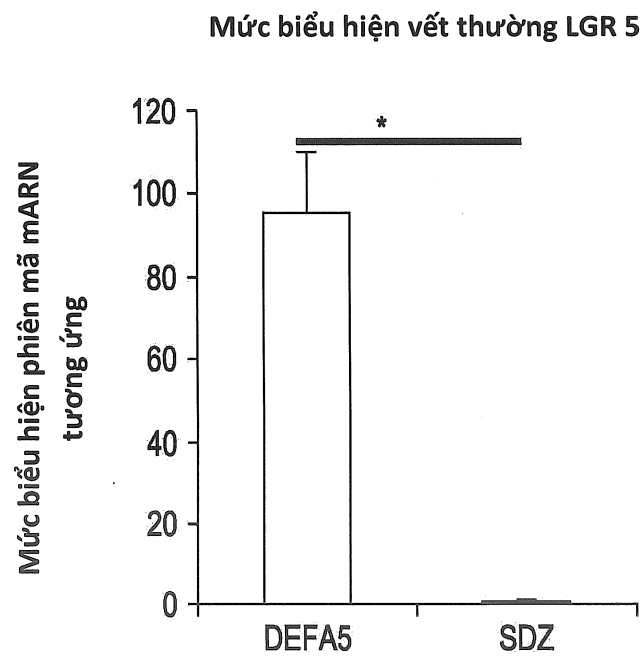


FIG. 10K

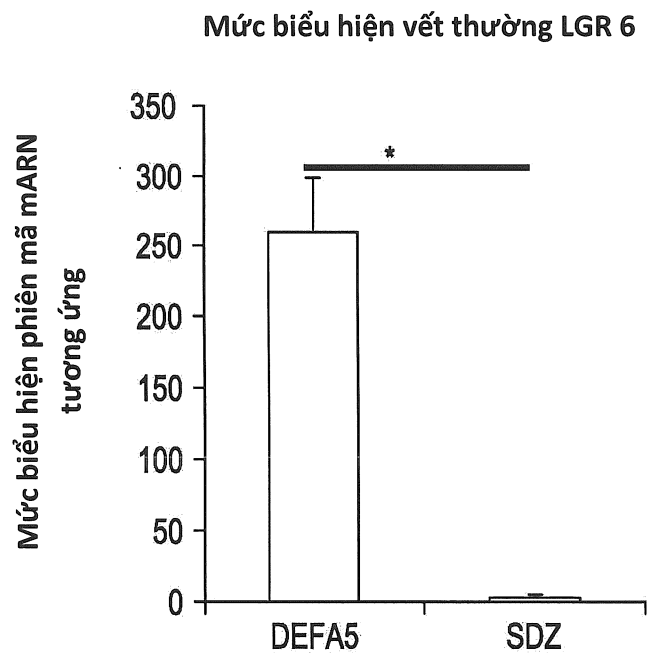
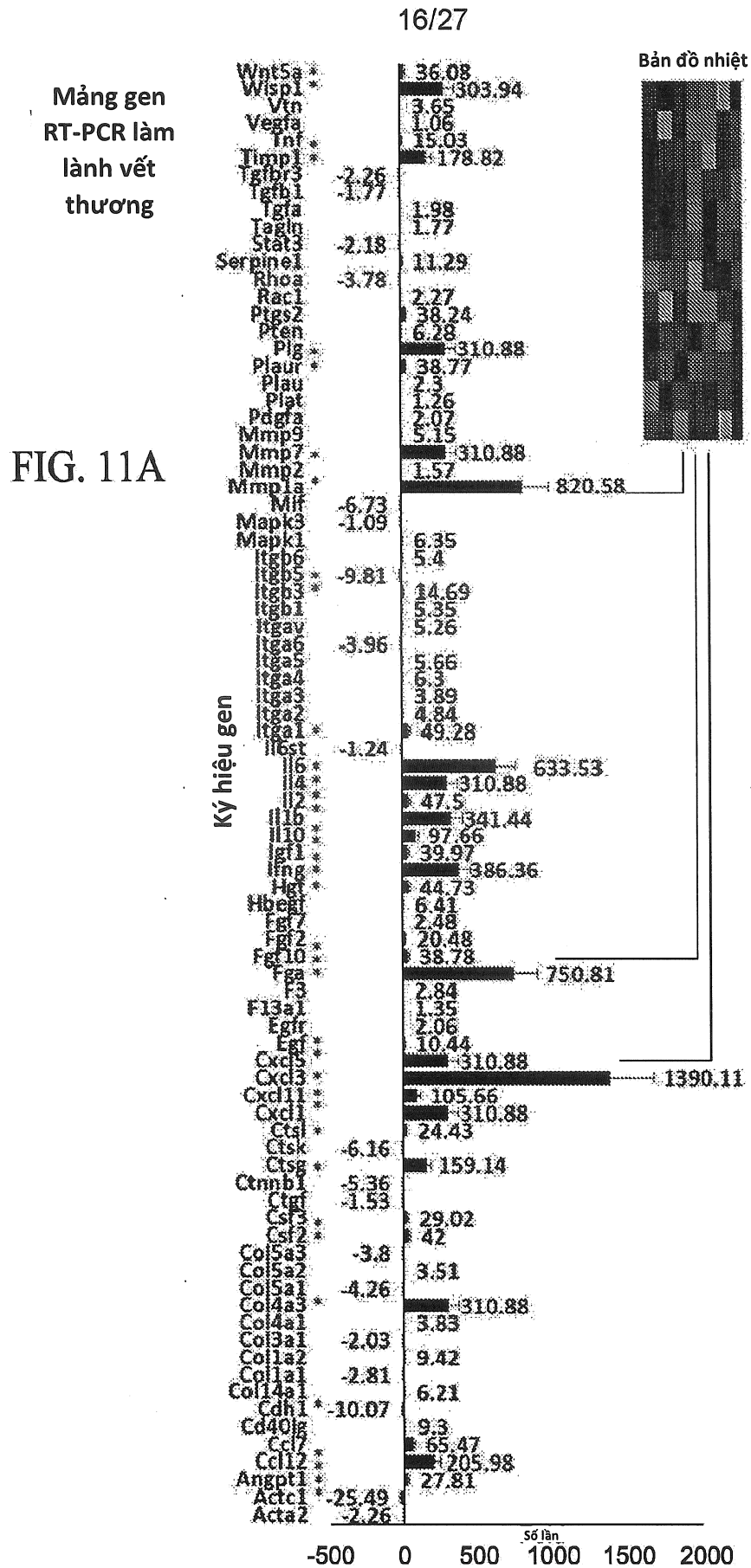


FIG. 10L



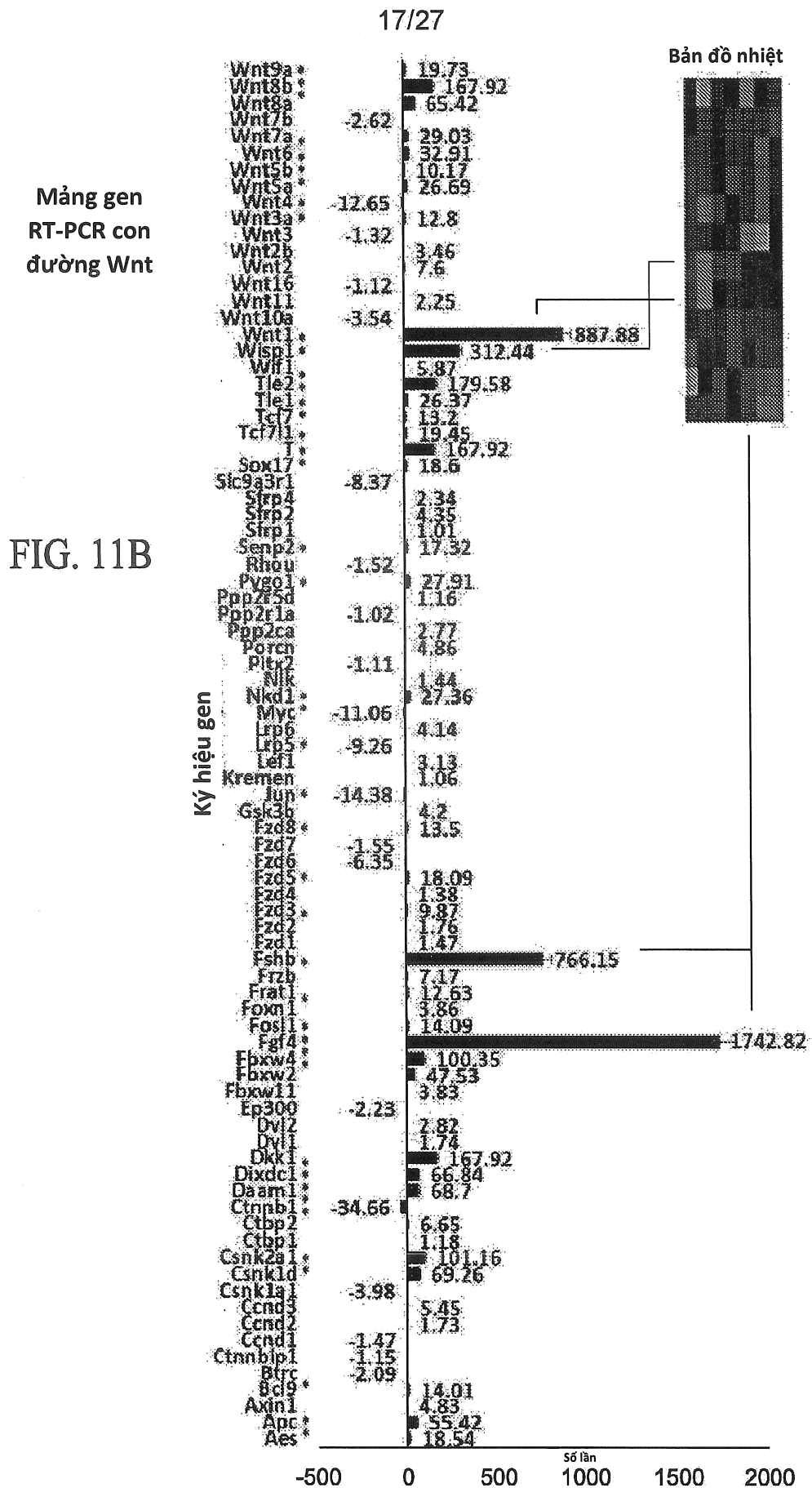


FIG. 11B

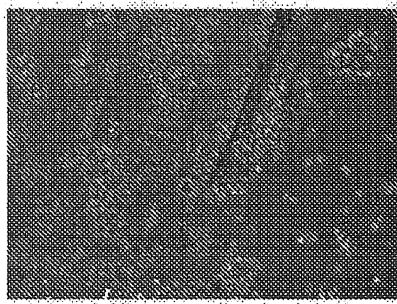


FIG. 12A

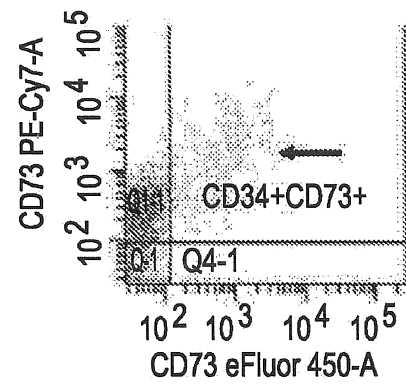


FIG. 12B

T0 giờ DEFS

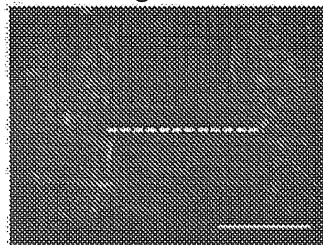


FIG. 12C

T0 giờ Đối chứng

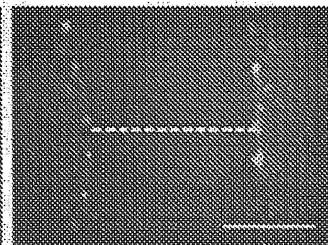


FIG. 12D

T6 giờ DEFS

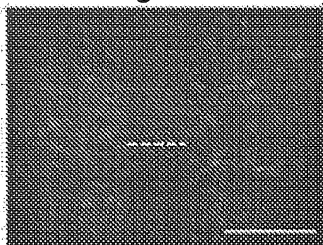


FIG. 12E

T6 giờ Đối chứng

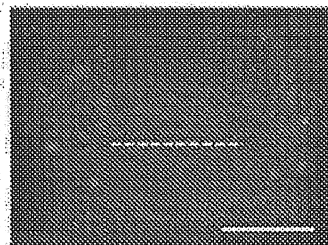


FIG. 12F

T12 giờ DEFS

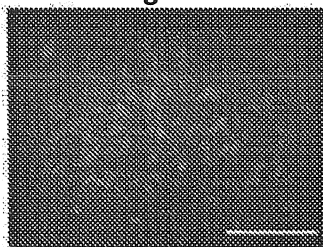


FIG. 12G

T12 giờ Đối chứng

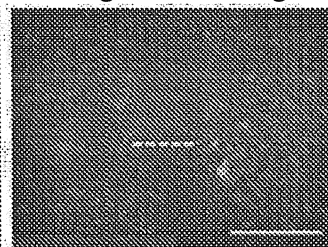


FIG. 12H

19/27

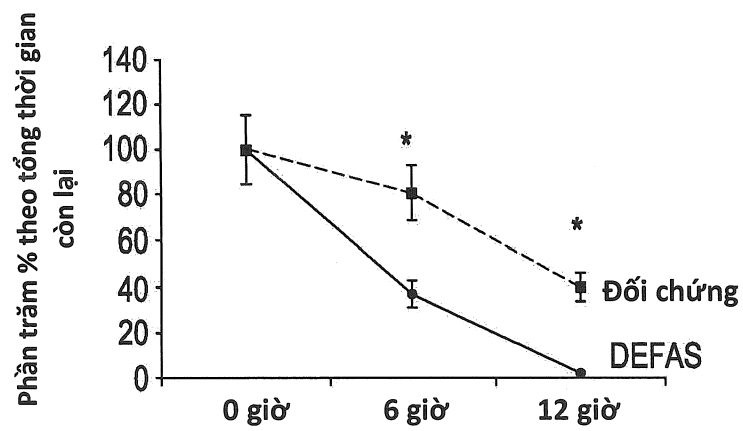


FIG. 12I

FIG. 13A FIG. 13B

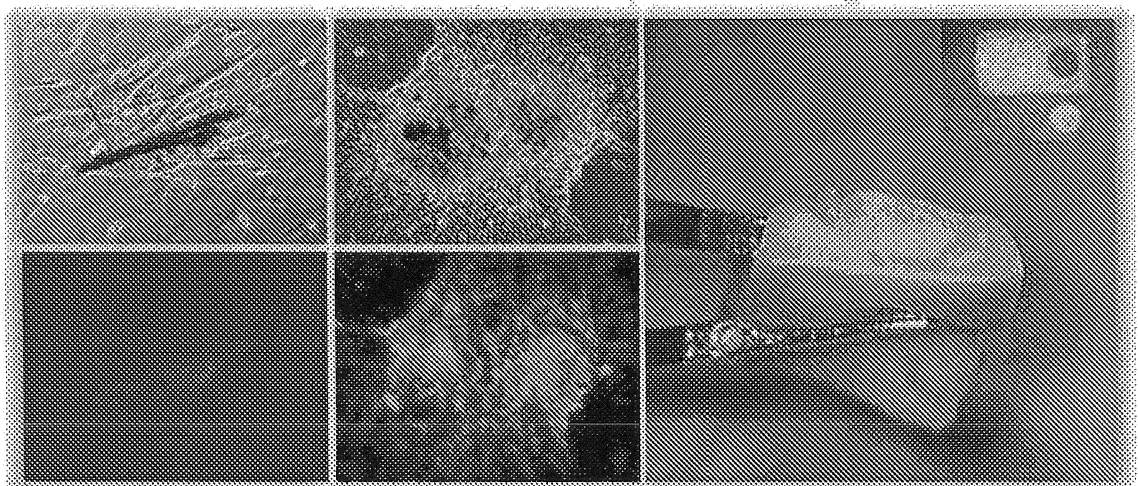
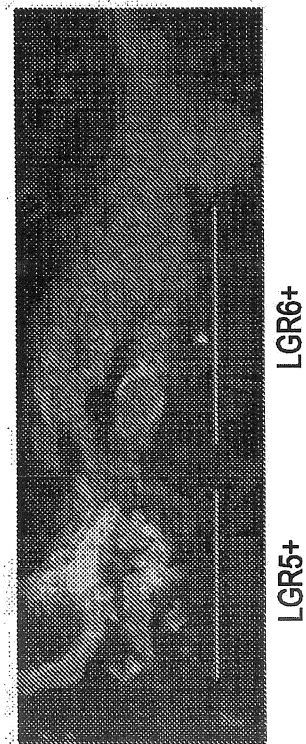


FIG. 13C FIG. 13D FIG. 13E

20/27

FIG. 14A



Cổng phân loại cuối cùng

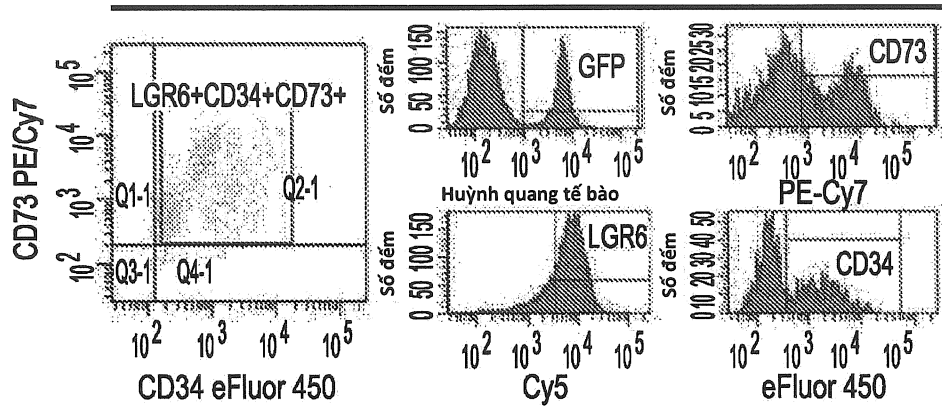


FIG. 14B

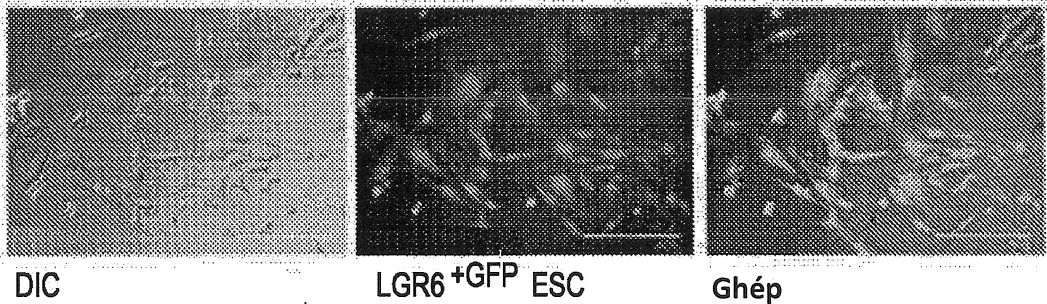
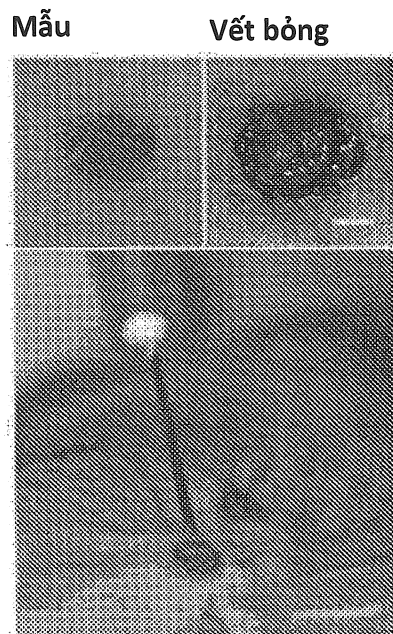


FIG. 14C

FIG. 14D

FIG. 14E



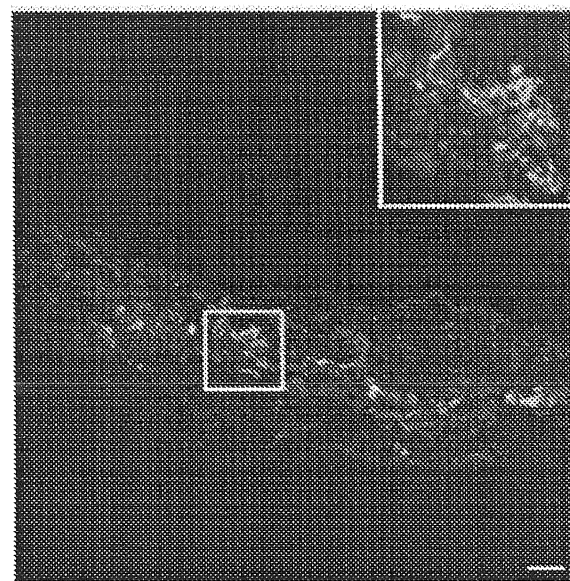
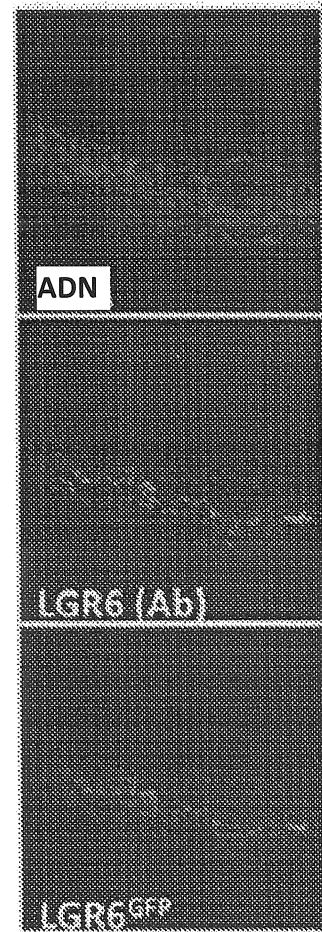
Ghép mô

FIG. 15A

FIG. 15B

FIG. 15C

FIG. 15D



Ghép

FIG. 15E

22/27

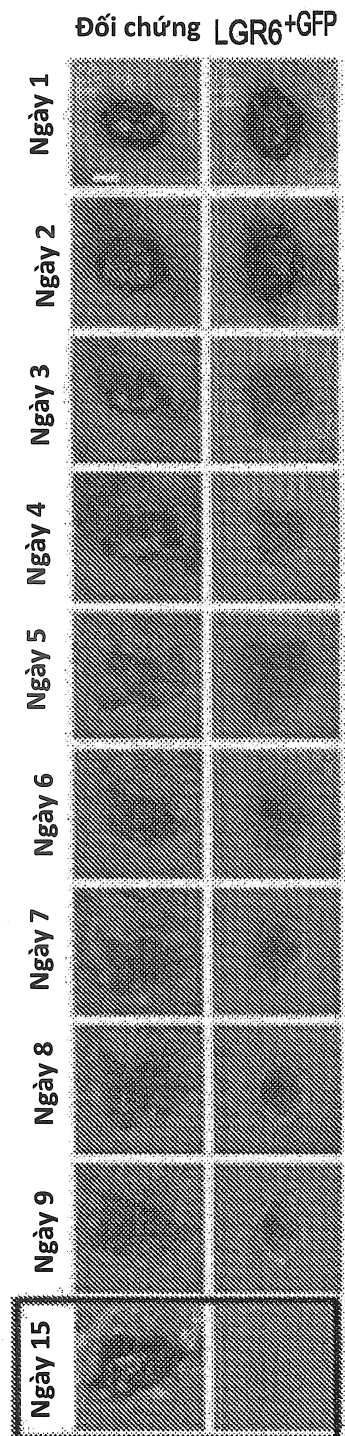


FIG. 16A

FIG. 16B

Túi cấy ngày 15



FIG. 16C

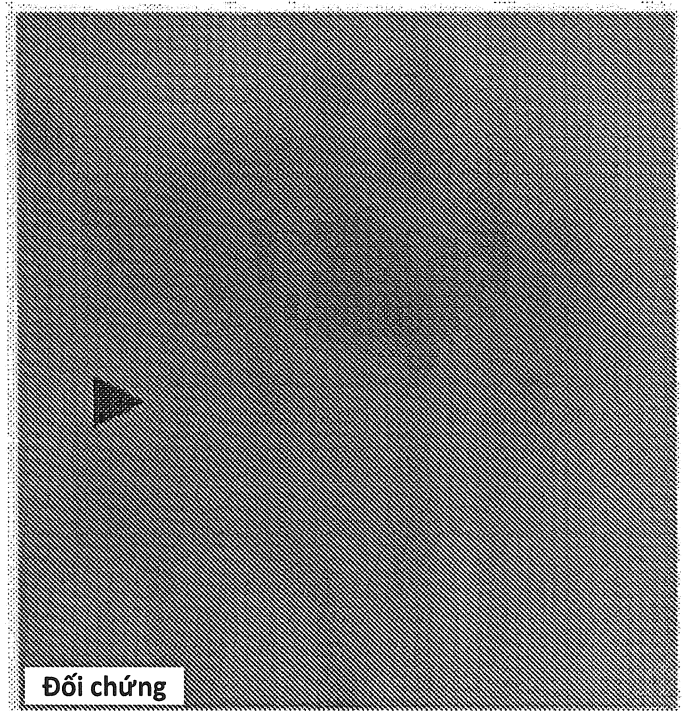


FIG. 16D

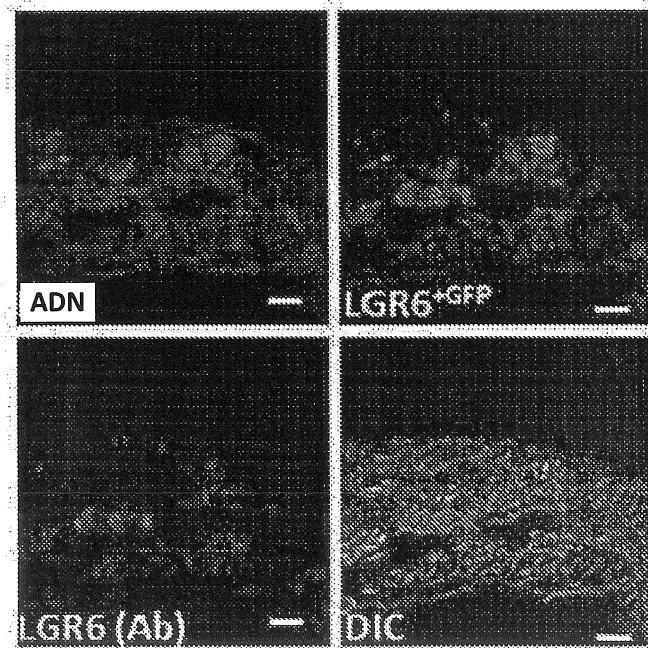


FIG. 17A

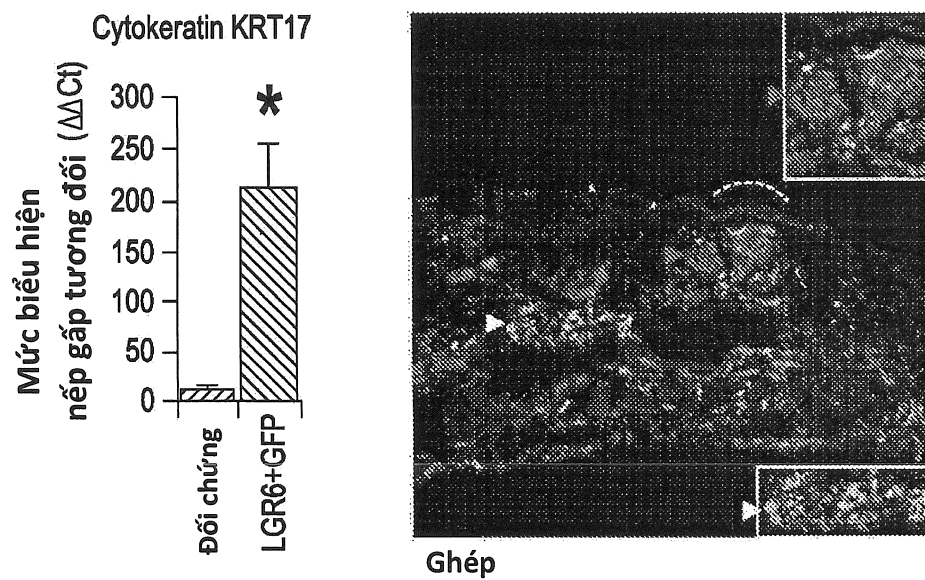


FIG. 17B

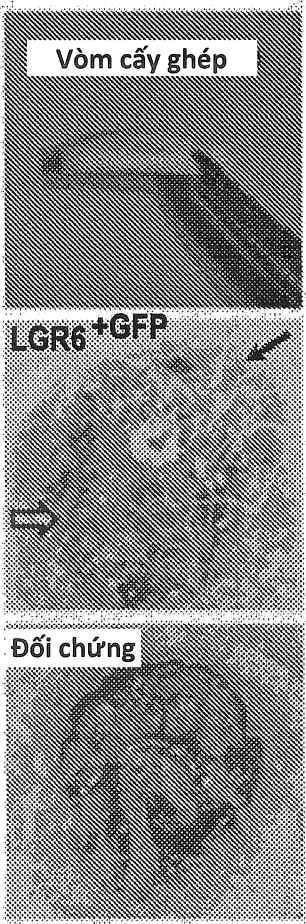


FIG. 17C

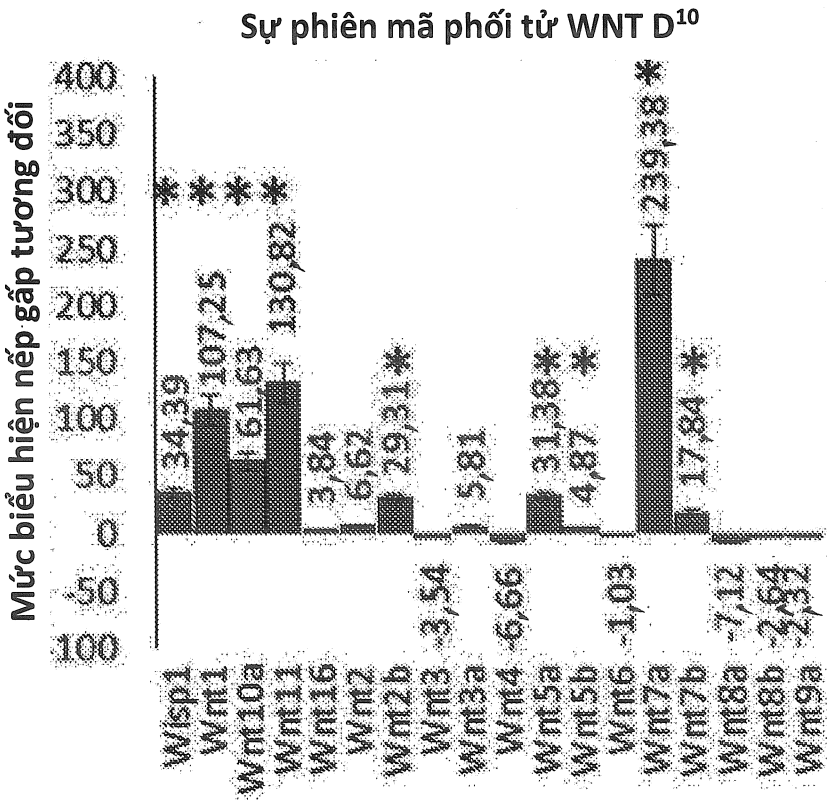


FIG. 17D

25/27

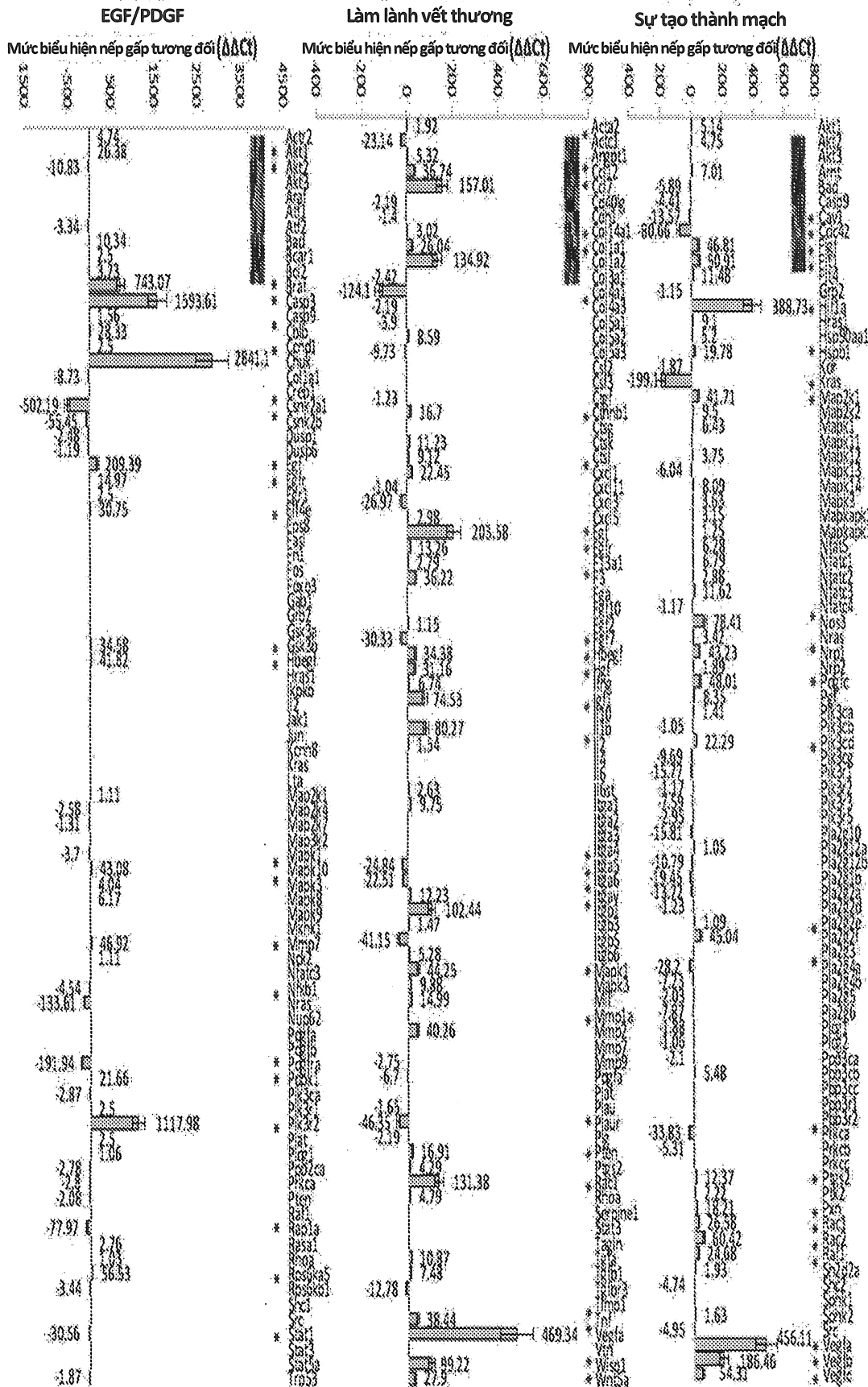
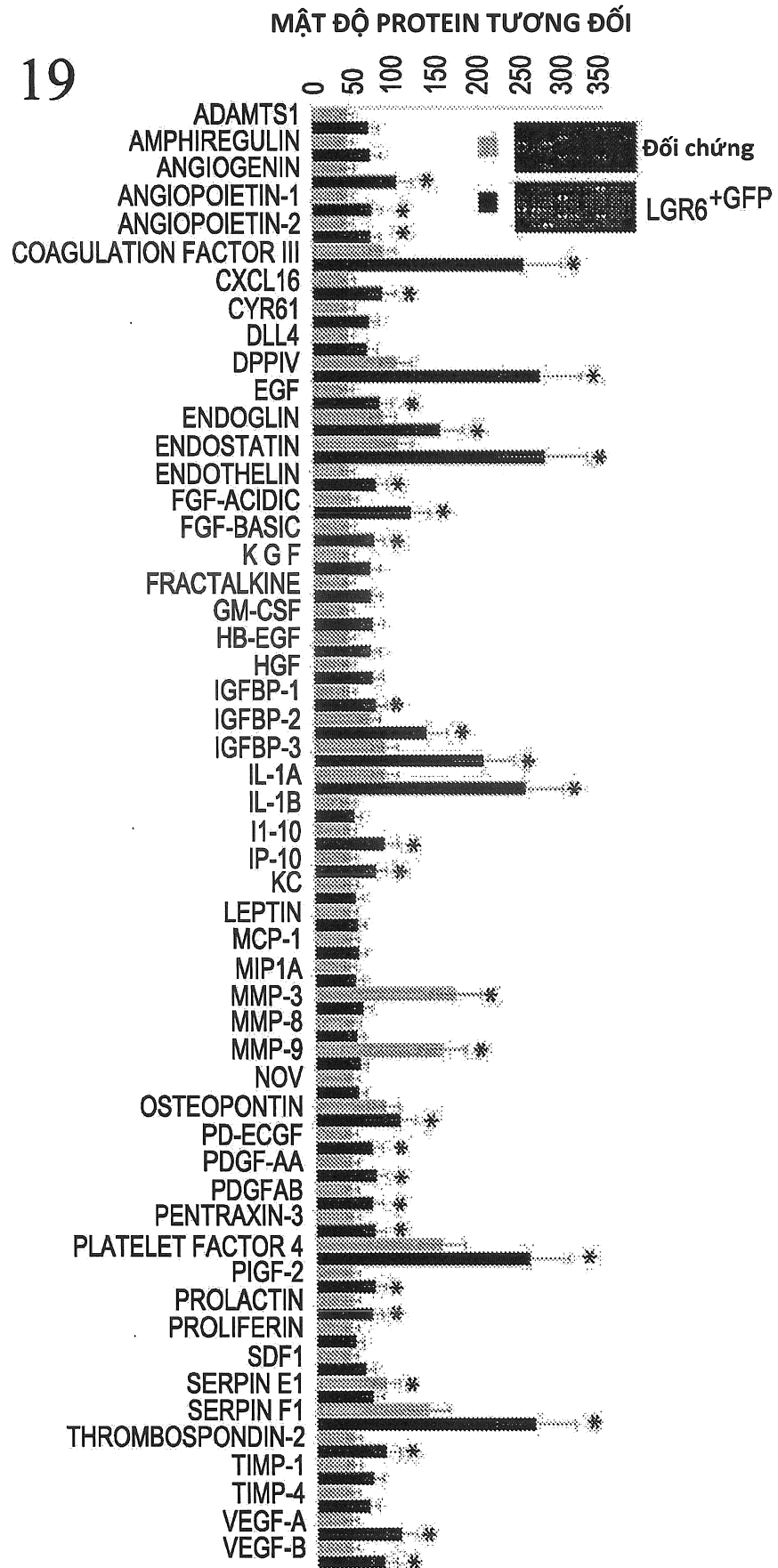
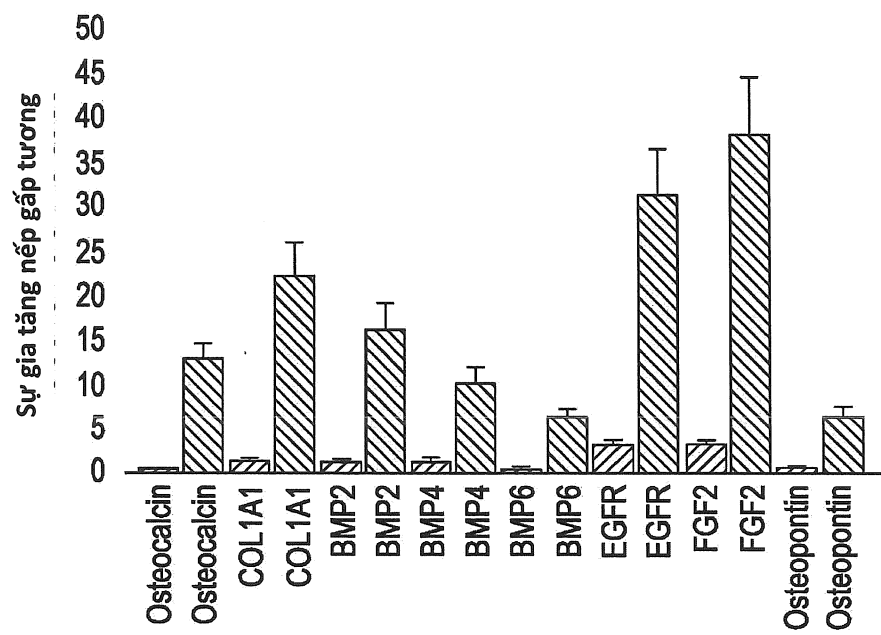
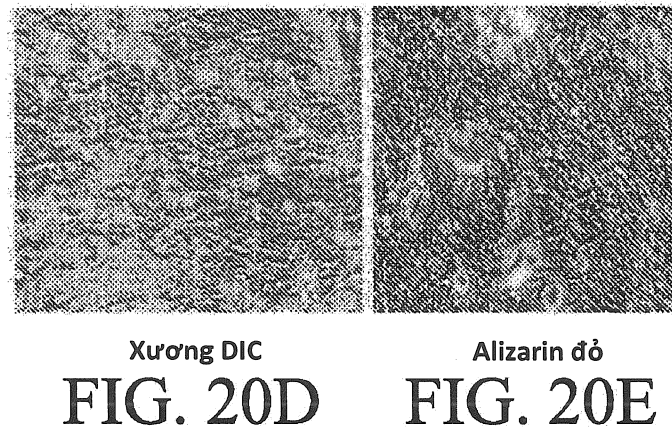
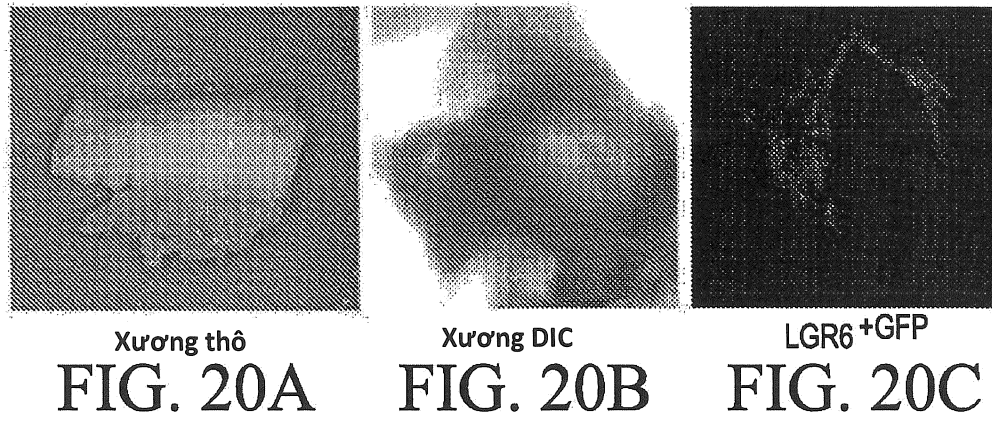


FIG. 18

FIG. 19



**FIG. 20F**