(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11) **2-0003200**

(51) **C12N 5/0775**; C12N 5/02; C12N 5/071
2021.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00304
(22) 11/06/2019
(67) 1-2019-03102
(45) 25/07/2023 424
(43) 25/09/2019 378A
(73) Viện nghiên cứu Tế bào gốc và Công nghệ gen Vinmec (VN)
458 Minh Khai, Phường Vĩnh Tuy, Quận Hai Bà Trưng, Thành phố Hà Nội
(72) Hoàng Minh Đức (VN); Nguyễn Thanh Liêm (VN).
(74) CÔNG TY LUẬT TRÁCH NHIỆM HỮU HẠN AMBYS HÀ NỘI (AMBYS HANOI)

(54) PHƯƠNG PHÁP TẠO RA SẢN PHẨM TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỪ MÔ MỠ CHỨA CÁC DÒNG TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỪ PHÂN ĐOẠN MẠCH NỀN

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp tạo ra sản phẩm tế bào gốc trung mô từ mô mỡ bao gồm quy trình phân lập và tách chiết, nuôi cấy, và lưu trữ sản phẩm tế bào gốc trung mô từ mô mỡ. Phương pháp theo Giải pháp hữu ích có thể được thực hiện bán tự động bằng cách phối hợp phương pháp cơ học sử dụng máy xử lý mô tự động gentleMACS Octo Dissociator (MACS Miltenyi Biotec). Phương pháp theo Giải pháp hữu ích sử dụng enzym để thu thập toàn bộ các tế bào có bên trong mô mỡ và nuôi cấy tế bào và bảo quản sản phẩm tế bào gốc trung mô này trong môi trường không chứa các chất có nguồn gốc từ huyết thanh (serum-free) và không có nguồn gốc từ động vật (xeno-free) hướng đến việc sử dụng các dòng tế bào gốc trung mô từ mô mỡ trong ứng dụng lâm sàng. Kỹ thuật này làm tăng tỉ lệ thành công lên đến 99% đối với mô mỡ có trọng lượng nhỏ dưới 5 gram được thu thập từ trẻ em (dưới <18 tuổi), người khỏe mạnh, người bệnh, và người lớn tuổi (>65 tuổi). Ngoài ra, kỹ thuật này làm giảm thời gian xử lý mô xuống dưới 3 giờ nhưng vẫn đảm bảo tính chất của khối tế bào gốc trung mô theo định nghĩa của tổ chức ISCT ban hành vào năm 2013.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích này đề cập đến phương pháp sản xuất ra sản phẩm tế bào gốc trung mô từ mô mỡ, trong đó phương pháp bao gồm kỹ thuật phân lập bán tự động, tách chiết tế bào gốc/dòng tế bào gốc trung mô (vạn năng/hoặc đa năng, hay mesenchymal stem/stromal cells – MSCs) có bên trong mô mỡ, kỹ thuật nuôi cấy tế bào gốc trung mô (vạn năng/hoặc đa năng, hay mesenchymal stem/stromal cells – MSCs) từ mô mỡ để ứng dụng điều trị bệnh trên người và kỹ thuật lưu trữ sản phẩm tế bào gốc trung mô (vạn năng/hoặc đa năng, hay mesenchymal stem/stromal cells – MSCs) có nguồn gốc từ mô mỡ ở nhiệt độ âm sâu dưới -90°C.

Tình trạng kỹ thuật của Giải pháp hữu ích

Các kiến thức về tế bào gốc trung mô từ mô mỡ đa số bắt nguồn từ các nghiên cứu sinh học cơ bản về mô mỡ và chức năng của chúng bên trong cơ thể con người. Mô mỡ là loại mô nền bên dưới da, hoặc bao quanh các cấu trúc nội tạng bên trong cơ thể với chức năng bảo vệ, giữ nhiệt, và lưu trữ năng lượng cho cơ thể. Có hai loại mô mỡ được tìm thấy bao gồm mô mỡ nâu và mô mỡ trắng. Mô mỡ nâu là mô mỡ có chức năng chuyên biệt và được tìm thấy nhiều ở các trẻ sơ sinh để giữ nhiệt cho cơ thể. Mô mỡ nâu có chứa rất nhiều ti thể với khả năng trao đổi chất lớn và thường ít khi thấy ở người lớn ngoài trừ ở vị trí xung quanh cổ. Ở người lớn, mô mỡ trắng chiếm đa số nằm nhiều bên dưới da.

Mô mỡ có nguồn gốc từ phần trung mô trong quá trình phát triển của người và là nguồn dồi dào tế bào gốc trung mô. Tại mô mỡ, quá trình hình thành mỡ (adiposegenesis) bao gồm quá trình trưởng thành các tế bào mỡ và quá trình hình thành khối mô mỡ bên trong cơ thể. Để có thể hoàn thành quy trình này, chức năng của tế bào gốc trung mô đóng một vai trò rất quan trọng vì tế bào gốc trung mô duy trì khả năng biệt hóa của mình thành các tế bào mỡ trưởng thành. Tương tự như tủy xương, dòng tế bào gốc trung mô cũng được tìm thấy ở mô mỡ với những đặc tính

tương tự như khả năng tăng sinh và khả năng biệt hóa (đa năng). Mô mỡ sau khi được thu thập thông qua thực hiện phẫu thuật thu thập mô mỡ hoặc thông qua hút mỡ (liposuction) được xử lý với enzym collagenaza để thu thập phân đoạn mạch nền (Stromal-vascular cell fraction – SVF). Phân đoạn mạch nền này chứa các tế bào nội mô (endothelial cells), nguyên bào sợi (fibroblast), hồng cầu, bạch cầu, đại thực bào, tế bào quanh mạch (pericytes), và tế bào gốc trung mô.

Theo định nghĩa của tổ chức ISCT (International Society for Cellular Therapy) năm 2006, một tế bào được xác định là tế bào gốc trung mô khi và chỉ khi (1) tế bào này có khả năng bám dính trên bề mặt nuôi cấy sau khi tách ra khỏi mô gốc, (2) có các biểu hiện markers bề mặt như CD73, CD90, và CD105, và không biểu hiện các markers bề mặt của dòng tế bào tạo máu như CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79alpha hay CD19, và HLA-DR. Ngoài ra, tế bào sau khi phân lập phải có khả năng biệt hoá thành các tế bào xương, sụn, và mỡ *in vitro*.

Tuy nhiên, đối với khối tế bào từ mô mỡ tách chiết từ phân đoạn mạch nền, biểu hiện các marker bề mặt được định nghĩa lại bởi tổ chức ISCT vào năm 2013 bao gồm dương tính với CD73, CD90, và CD105, trong khi đó âm tính với CD45 và CD31. Để phân biệt với các tế bào gốc trung mô từ tủy xương, khối tế bào gốc trung mô từ mô mỡ dương tính vớ CD36 và âm tính với CD106. Ngoài ra, khối tế bào sau khi phân lập phải có khả năng tạo cụm (CFU – colony forming unit) và có khả năng biệt hóa thành tế bào xương, sụn, và mỡ *in vitro*.

Hầu hết các phương pháp phân lập tế bào gốc trung mô từ mô mỡ thường bao gồm 3 bước chính:

Bước 1: mô mỡ sau khi được thu thập bằng phương pháp mổ hở hoặc hút mỡ (liposuction) sẽ được loại bỏ các cấu trúc da, mạch máu và biểu bì xung quanh khối mô mỡ.

Bước 2: Sử dụng các enzym như trypsin, collagenaza I, II, hay IV, dispaza, protaza, hoặc hyaluronidaza để phân huỷ các cấu trúc dạng sợi cũng như hệ thống các mô liên kết của mô mỡ, giải phóng các tế bào ra môi trường bên ngoài sau khi dùng phương pháp cơ học để nghiền nhỏ các mô.

Bước 3: chuyển các mô đã được nghiền nhỏ và xử lý bằng enzym vào môi trường nuôi cấy có chứa huyết thanh từ người hoặc từ động vật (FBS) hoặc huyết tương giàu tiểu cầu và bổ sung thêm một số chất kích thích sự phát triển MSCs như nhân tố sinh trưởng nguyên bào sợi beta (Fibroblast growth factor beta- FGFb), nhân tố sinh trưởng biểu bì (Epidermal growth factor- EGF), nhân tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu (Plalete-derived growth factor- PDGF) và nhân tố sinh trưởng nội mạc mạch máu (Vascular Endothelial growth factor- VEGF).

Tuy nhiên, các phương pháp truyền thống và các phương pháp đã được yêu cầu bảo hộ có các nhược điểm như:

- Khối lượng mô mỡ lấy từ người hiến hoặc bệnh nhân lớn (>10 gram mỡ hoặc 100 ml dung dịch mỡ).
- Thời gian phân lập thường kéo dài trên 6 giờ.
- Phương pháp nuôi cấy sử dụng các chất không xác định rõ được thành phần và nồng độ (sử dụng huyết thanh – serum), huyết tương giàu tiểu cầu và có chứa các thành phần có nguồn gốc từ động vật.
- Phương pháp cấy chuyển tế bào dùng dung dịch enzym có nguồn gốc từ động vật.
- Thời gian tăng sinh để cấy chuyển lần thứ nhất kéo dài (từ 14 đến 21 ngày).
- Sản phẩm tạo ra hướng đến mục đích nghiên cứu, khó triển khai trong ứng dụng lâm sàng trên người.

Bản chất kỹ thuật của Giải pháp hữu ích

Mục đích của Giải pháp hữu ích nhằm khắc phục các nhược điểm trên cụ thể Giải pháp hữu ích nhằm đạt được các mục đích sau:

- Phương pháp thu thập mô mỡ là phương pháp phẫu thuật không dùng thuốc tê tại chỗ, ít gây hại cho bệnh nhân hay người hiến.
- Khối lượng mô mỡ thu thập từ người bệnh thấp (< 5 gram) nhưng vẫn đảm bảo khả năng phân lập tế bào gốc trung mô với tỉ lệ thành công là 99%.

- Dùng phương pháp tách chiết tế bào gốc từ mô bằng hệ thống bán tự động kết hợp với tác dụng của enzym để có thể giảm thời gian phân lập xuống từ 1,5 đến 3 giờ.
- Tế bào gốc trung mô được tách chiết và phân lập từ mô mỡ hiệu quả hơn và có tỉ lệ sống cao do mô mỡ đã được nghiền và phân hủy bằng enzym đặc hiệu để có thể tách tế bào gốc ra từ khối mô mô mỡ mà không ảnh hưởng đến chất lượng tế bào sau khi phân lập.
- Sử dụng dung dịch nuôi cấy đạt tiêu chuẩn cận lâm sàng (cGMP hoặc GMP) không chứa các chất từ huyết thanh (Serum-free), huyết tương giàu tiểu cầu và không có nguồn gốc từ động vật (Xeno-free).
- Sử dụng dung dịch enzym không có nguồn gốc từ động vật (Xeno-free) để cấy chuyển tế bào.
- Thời gian tăng sinh từ khi phân lập đến khi cấy chuyển lần thứ nhất được rút ngắn xuống từ 3 đến 5 ngày.
- Sản phẩm tế bào gốc trung mô từ mô mỡ hướng đến mục đích ứng dụng không những trong nghiên cứu mà còn trong lâm sàng và điều trị bệnh

Để đạt được mục đích nêu trên, Giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp tạo ra sản phẩm tế bào gốc trung mô (vạn năng và/hoặc đa năng, mesenchymal stem cells – MSCs) có nguồn gốc từ mô mỡ. Phương pháp tạo ra sản phẩm tế bào gốc trung mô từ mô mỡ theo Giải pháp hữu ích bao gồm quy trình phân lập-tách chiết, nuôi cấy và lưu tế bào gốc trung mô từ mô mỡ bằng kỹ thuật bán tự động. Kỹ thuật bán tự động theo Giải pháp hữu ích là việc phối hợp phương pháp cơ học sử dụng máy xử lý mô tự động gentleMACS Octo Dissociator (MACS Miltenyi Biotec) và phương pháp enzym để thu thập toàn bộ các tế bào có bên trong mô mỡ và nuôi cấy những tế bào này trong môi trường không chứa các chất có nguồn gốc từ huyết thanh (serum-free) và không có nguồn gốc từ động vật (xeno-free) hướng đến việc sử dụng các dòng tế bào gốc trung mô từ mô mỡ trong ứng dụng lâm sàng. Phương pháp bán tự động theo Giải pháp hữu ích chia thành các quy trình nhỏ gồm: phân lập và tách chiết tế bào gốc trung mô từ mô mỡ; nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ mô mỡ và lưu trữ tế bào gốc trung mô từ mô mỡ.

Quy trình phân lập và tách chiết tế bào gốc trung mô từ mô mỡ theo Giải pháp hữu ích được thực hiện bằng cách kết hợp máy xử lý tế bào tự động gentleMACS Octo Dissociator (MACS Miltenyi Biotec) và hỗn hợp enzym do các tác giả Giải pháp hữu ích đề xuất được gọi là CDS (cell dissociation solution) để kích thích sự phân tách tế bào. Quy trình bao gồm ba bước chính.

Đầu tiên, mô mỡ sau khi thu thập được cắt nhỏ thành từng mảnh có diện tích <2 mm^2 đồng thời loại bỏ lớp da, biểu bì, và mạch máu xung quanh.

Sau khi cắt nhỏ, mô mỡ được ủ trong hỗn hợp enzym với thời gian ủ từ 15 đến 90 phút ở nhiệt độ từ 31°C đến 39°C. Các enzym sử dụng trong hỗn hợp enzym là các enzym tái tổ hợp, không có nguồn gốc từ động vật. Theo một phương án khác nhiệt độ ủ mô mỡ nằm trong khoảng 31°C đến 41°C. Theo phương án khác, mẫu ủ trong hỗn hợp enzym tái tổ hợp có sự hỗ trợ tác động cơ học bằng việc lắc mẫu ở tốc độ từ 150 vòng/phút đến 800 vòng/phút theo chiều kim đồng hồ, ngược chiều kim đồng hồ, hay tổ hợp của cả hai.

Hỗn hợp enzym theo Giải pháp hữu ích chứa ít nhất một trong các hoạt chất sau: collagenaza loại I, loại II, hoặc loại IV với tỉ lệ phần trăm theo thể tích từ 0,1% đến 100%, hoặc có hoạt tính enzym từ 100 đơn vị hoạt độ đến 1000 đơn vị hoạt độ trên một đơn vị thể tích là ml; Trypsin (tên thương mại CTS™ TrypLE select Enzyme, A1285901, của hãng ThermoFisher Scientific, nồng độ 1X) với tỉ lệ phần trăm theo thể tích từ 0,1% đến 100%; hoạt chất EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) có chức năng khóa các ion liên kết kim loại đóng vai trò trong việc bám dính của tế bào gốc với tỉ lệ phần trăm theo thể tích từ 0,1% đến 100%; chất dẫn dịch nền Roswell Park Memorial Institute (RPMI) buffer theo thể tích nhỏ hơn 100%; hoặc hỗn hợp enzym có chứa các thành phần nêu trên theo tỉ lệ phần trăm theo thể tích như sau: Trypsin (CTS™ TrypLE select Enzyme, A1285901, ThermoFisher Scientific, 1X) với tỉ lệ phần trăm từ 0,1% đến 60%, hoạt chất EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) với tỉ lệ phần trăm từ 0,1% đến 60% và chất dẫn dịch nền RPMI với tỉ lệ phần trăm từ 0,1% đến 40%.

Sau khi ủ với hỗn hợp enzym, mô mỡ được chuyển vào hệ thống gentleMACS Octo Dissociator và sử dụng chương trình xử lý mô đã được thiết lập bởi các tác giả của Giải pháp hữu ích. Mẫu được chuyển vào ống xử lý theo bộ kit của hệ thống, sau đó hệ thống được chạy theo hai chương trình xử lý chính gồm chương trình ủ mẫu và chương trình xử lý mẫu. Trong chương trình ủ mẫu, hệ thống được chạy chế độ gia nhiệt đảm bảo nhiệt độ gia tăng và duy trì từ 32°C đến 40°C trong suốt quá trình thực hiện; mẫu được ủ trong thời gian đứt quãng cách nhịp với mỗi nhịp có thời gian từ 3 đến 10 phút. Chương trình xử lý mẫu được chia làm hai thì riêng biệt nhưng có thể kết hợp với nhau, bao gồm: chế độ gia nhiệt đảm bảo nhiệt độ gia tăng và duy trì từ 32°C đến 40°C trong suốt quá trình thực hiện; thì thứ nhất ống xử lý mẫu được quay theo chiều kim đồng hồ với tốc độ từ 100 vòng/phút đến 1200 vòng/phút; thì thứ hai ống xử lý mẫu được quay ngược chiều kim đồng hồ với tốc độ từ 100 vòng/phút đến 1200 vòng/phút; thời gian chạy thì thứ nhất kéo dài từ 1 phút 30 giây đến 9 phút 30 giây; thời gian chạy thì thứ hai kéo dài từ 1 phút 30 giây đến 9 phút 30 giây; kết hợp thì thứ nhất với thì thứ hai bằng cách ngay khi thì thứ nhất kết thúc sẽ chạy thì thứ hai tạo thành chương trình xử lý mẫu với thời gian không quá 18 phút và tạo thành chương trình xử lý mẫu. Chương trình ủ mẫu được phối hợp với chương trình xử lý mẫu bằng cách tạo thành một chu kỳ. Mỗi chu kỳ có chương trình ủ mẫu theo thời gian từ 2 phút đến 10 phút và chương trình xử lý mẫu từ 5 phút đến 15 phút và thời gian không quá 15 phút; mỗi lần chạy mẫu sẽ thực hiện tối đa 08 chu kỳ với thời gian không quá 120 phút.

Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ mô mỡ sau khi thu được từ phân đoạn mạch nên sử dụng quy trình phân lập và tách chiết nêu trên. Trong đó, các tế bào gốc trung mô từ mô mỡ sau khi xử lý được nuôi cấy trong môi trường không chứa các chất từ huyết thanh (serum-free) và không có nguồn gốc từ động vật (xeno-free).

Dụng cụ nuôi cấy theo Giải pháp hữu ích là các chai nuôi cấy có diện tích bề mặt nuôi cấy từ 25 cm^2 đến 1000 cm^2 (hệ thống chai nuôi cấy cỡ lớn). Chai nuôi cấy có thể có nắp lọc hoặc lỗ thông để giúp quá trình trao đổi khí bên trong và bên ngoài chai nuôi cấy. Nắp của chai nuôi cấy được thiết kế với 02 chức năng đóng kín và đóng hở

(đảm bảo sự trao đổi khí giữa bên ngoài và bên trong chai nuôi cấy mà không ảnh hưởng đến độ tinh sạch của tế bào đang nuôi cấy bên trong). Theo một phương án khác chai nuôi cấy đã được xử lý bề mặt bằng các tia có bước sóng ngắn (tia gamma) hay xử lý bằng plasma để tạo độ bám dính tốt hơn trong nuôi cấy tế bào.

Quy trình nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ mô mỡ theo Giải pháp hữu ích bao gồm kỹ thuật xử lý bề mặt chai nuôi cấy trong đó kỹ thuật bao gồm phủ hợp chất ngoại bào (extracellular matrix) thường có thành phần hoá học chính là fibronectin, vitronectin, hoặc intergrin, lên trên bề mặt chai nuôi cấy để hỗ trợ sự tăng sinh và duy trình tính gốc của tế bào gốc trung mô mô mỡ. Các hợp chất ngoại bào được sử dụng là các hợp chất ngoại bào tái tổ hợp không có nguồn gốc từ động vật bao gồm một trong những hợp chất sau: CTS™ CELLStart™ substrate (Gibco, USA, A1014201); Recombinant human fibronectin GMP, CF (4305-GMP, R&D system); MesenCult™-SF attachment substrate (Cat: 05424, Stemcell Technologies); hoặc tổ hợp của các hợp chất trên. Các hợp chất ngoại bào nêu trên được pha loãng bằng dung dịch Phosphate Buffer Saline (PBS) theo tỉ lệ pha loãng của nhà sản xuất hoặc theo tỉ lệ pha loãng 1/100, 1/200, 1/300, 1/400, và 1/500. Sau khi pha loãng các hợp chất ngoại bào được phủ lên bề mặt chai nuôi cấy và có thể ủ chai nuôi cấy ở nhiệt độ từ 31°C đến 39°C trong khoảng thời gian từ 45 phút đến 180 phút để hợp chất ngoại bào bám dính trên bề mặt chai nuôi cấy.

Môi trường nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ mô mỡ không chứa các chất từ huyết thanh (serum-free) và không có nguồn gốc từ động vật (xeno-free) theo Giải pháp hữu ích là một trong những môi trường tiêu chuẩn sau: MesenCult-ACF culture kit (Cat: 5449, hãng sản xuất Stemcell Technologies); MesenCult-ACF plus culture kit (Cat: 5448, hãng sản xuất Stemcell Technologies); môi trường nuôi cấy tế bào gốc PowerStem MSC1-Serum-free (hãng sản xuất Pan Biotech); môi trường StemMACS MSC Expansion Media Kit Xeno-free và Serum-free (hãng sản xuất Miltenyi Biotec – Đức); môi trường nuôi cấy StemPro-34 SFM (hãng sản xuất ThermoFisher Scientific).

Trong giai đoạn nuôi cấy dung dịch nuôi cấy sẽ được thay theo định kỳ 2 – 4 ngày/lần cho đến khi tế bào đạt mật độ để cấy chuyển cho những lần tiếp theo.

Khi tế bào đạt đủ một trong hai điều kiện là thời gian nuôi cấy không quá 10 ngày hay mật độ bao phủ bề mặt >85% sẽ được cấy chuyển sang chai nuôi cấy mới sử dụng hỗn hợp enzym tái tổ hợp không chứa huyết thanh và không có nguồn gốc từ động vật. Hỗn hợp enzym chứa ít nhất 1 trong những thành phần theo tỉ lệ sau: thành phần tái tổ hợp của Trypsin (tên thương mại CTS^{TM} TrypLE select Enzyme, A1285901, của hãng ThermoFisher Scientific, nồng độ 1X) với tỉ lệ phần trăm theo thể tích từ 0,1% đến 100%; hoạt chất EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) có chức năng khóa các ion liên kết kim loại đóng vai trò trong việc bám dính của tế bào gốc với tỉ lệ phần trăm theo thể tích từ 0,1% đến 100%; chất dẫn dịch nền RPMI buffer theo thể tích nhỏ hơn 100%; hoặc tổ hợp của các chất nêu trên theo tỉ Trypsin với tỉ lệ phần trăm từ 0,1% đến 60%, hoạt chất EDTA với tỉ lệ phần trăm từ 0,1% đến 60%, và chất dẫn dịch nền RPMI với tỉ lệ phần trăm từ 0,1% đến 40%.

Quá trình cấy chuyển và/hoặc thu hoạch tế bào sử dụng hỗn hợp enzym nêu trên theo Giải pháp hữu ích bao gồm các bước: rửa bề mặt tế bào bằng dung dịch PBS sau khi loại bỏ dung dịch nuôi cấy cũ; hút bỏ PBS dịch rửa và ủ với một lượng enzym theo tỉ lệ thể tích là 0,2ml/cm^2 đến 1 ml/cm^2 trong thời gian từ 2 phút đến 7 phút ở nhiệt độ từ 34°C đến 39°C trong tủ nuôi cấy tế bào; sau khi xử lý với enzym và bất hoạt bằng môi trường nuôi cấy, dung dịch tại thời điểm này sẽ chứa các tế bào đơn và có thể được đếm bằng Trypan Blue và ly tâm ở tốc độ từ 200g đến 1400g trong thời gian từ 2 đến 10 phút để thu lại tế bào; tế bào sau khi thu hoạch sẽ được hòa tan với dung dịch nuôi cấy và cho vào chai nuôi cấy đã được xử lý bề mặt với hợp chất ngoại bào với tỉ lệ cấy chuyển tối thiểu tương đương 1:3 hay 4000 tế bào/cm^2.

Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình lưu trữ sản phẩm tế bào gốc trung mô từ mô mỡ sau khi thu hoạch từ giai đoạn nuôi cấy. Quy trình lưu trữ theo Giải pháp hữu ích bao gồm: hòa tan số lượng tế bào thu hoạch được bằng dung dịch lưu trữ tế bào để có nồng độ tế bào cuối cùng từ 0,5x10^6 tế bào/ml đến 5x10^6 tế bào/ml; dung dịch chứa tế bào gốc thu được được đóng vào từng ống bảo quản (Cryovials) với tổng thể tích trong mỗi ống từ 0,8 ml đến 1,8ml/vial; các ống cryovials này sẽ được hạ lạnh bằng hệ thống hạ lạnh tự động Thermo Scientific Forma với chương trình được cài đặt sẵn hạ lạnh từ nhiệt độ phòng (dao động từ 18°C đến 25°C) xuống -90°C với tốc độ hạ lạnh là -

1°C/phút và duy trì tại nhiệt độ -90°C cho đến khi mẫu được chuyển sang hệ thống lưu trữ tự động Brooks (hãng sản xuất Brooks, USA); sản phẩm tế bào gốc trung mô từ mô mỡ sau khi hạ lạnh sẽ được lưu trữ ở nhiệt độ từ -150°C đến -200°C trong thời gian từ 1 năm đến 20 năm.

Thành phần dung dịch lưu trữ tế bào gốc theo Giải pháp hữu ích là môi trường nuôi cấy không chứa các chất từ huyết thanh và không có nguồn gốc động vật như sử dụng trong quá trình nuôi cấy nêu trên và có hòa tan Dimethyl sulfoxide (DMSO) với lượng từ 2,5% đến 15% theo trọng lượng. Theo phương án khác, dung dịch lưu trữ tế bào không chứa huyết thanh (serum-free), và không chứa các chất từ động vật (xeno-free) bao gồm: CryoStor^{R} CS10 (Cat: 07930, hãng sản xuất Stemcell Technologies) và CTS^{TM} Synth-a-Freeze^{TM} medium (Cat: A1371301, hãng sản xuất Gibco, Thermofisher Scientific).

Mô tả chi tiết Giải pháp hữu ích

Trong bản mô tả Giải pháp hữu ích này, thuật ngữ tế bào gốc trung mô từ mô mỡ được sử dụng được dùng để chỉ sản phẩm tế bào gốc trung mô được phân lập, tách chiết từ toàn bộ mô mô mỡ và từ phân đoạn mạch nền sau khi xử lý.

Dòng tế bào gốc trung mô từ mô mỡ này được xác định tính chất và đặc tính theo định nghĩa của tổ chức ISCT 2013, dương tính với CD73, CD90, và CD105, trong khi đó âm tính với CD45 và CD31. Để phân biệt với các tế bào gốc trung mô từ tủy xương, khối tế bào gốc trung mô từ mô mỡ dương tính với CD36 và âm tính với CD106. Ngoài ra, khối tế bào sau khi phân lập phải có khả năng tạo cụm (CFU – colony forming unit) và có khả năng biệt hóa thành tế bào xương, sụn, và mỡ *in vitro*. Đây là một điểm mới và khác hoàn toàn so với các Giải pháp hữu ích khác.

Theo Giải pháp hữu ích này, cụm từ "cơ bản bao gồm" và "bao gồm nhưng không hoàn toàn" được sử dụng để nói đến thành phần tế bào gốc trung mô được phân lập và tách chiết từ toàn bộ mô mỡ, có thể chứa thành phần tế bào khác tại thời điểm phân lập hoàn thành (P0) với nồng độ vào khoảng 0,001% đến dưới 5%. Thành phần tế bào gốc trung mô mô tả trong bản Giải pháp hữu ích này được đánh giá theo đúng tiêu chí của tổ chức ISCT năm 2013 với các tỉ lệ như sau:

- Dương tính (>90%) với các markers bề mặt như: CD73, CD90, và CD105.
- Âm tính (<5%) với các markers bề mặt như: CD45, CD14, CD11b, CD79alpha hay CD19, CD106 và HLA-DR.
- Có khả năng tạo cụm (Colony forming unit – CFU)
- Có khả năng bám dính trên bề mặt chai hoặc đĩa nuôi cấy. Tế bào gốc có hình thái dạng tế bào sợi (fibroblast-like cells) và có khả năng tăng sinh trong môi trường nuôi cấy *in vitro*.
- Có khả năng biệt hóa thành ít nhất 03 loại tế bào xương, sụn, và mỡ.
- Có khả năng duy trì ổn định bộ nhiễm sắc thể trong quá trình nuôi cấy khi kiểm tra bằng phương pháp karyotype (G-banding).

Quy trình phân lập và tách chiết tế bào gốc trung mô từ mô mỡ theo Giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

Bước 1: Lưu trữ mô mỡ trong kit vận chuyển sau khi thu thập mô mỡ từ người hiến khỏe mạnh hoặc bệnh nhân. Kit vận chuyển là ống/hộp đựng mẫu mô mỡ có thể tích từ 25ml đến 250ml có chứa dung dịch vận chuyển là DMEM, hoặc nước muối sinh lý (NaCl 0.9%), hoặc Ginger Lactate, hoặc kết hợp giữa nước muối sinh lý và human albumin hoặc kết hợp giữa Ginger Lacte với human albumin với thể tích từ 25 ml đến 150 ml có chứa chất kháng sinh như penicillin, streptomycine, normycine, v.v. có nồng độ từ 0,1% đến 5%, và dung dịch vận chuyển được bảo quản lạnh ở nhiệt độ từ 2°C đến 25°C. Mô mỡ sau khi thu thập trong kit vận chuyển sẽ được bảo quản ở nhiệt độ 2°C đến 25°C trong thời gian từ 12 giờ đến 72 giờ. Mô mỡ sau thu thập và lưu trữ sẽ được xử lý trong môi trường vô khuẩn và ở nhiệt độ phòng (từ 18°C đến 25°C) nhằm hạn chế tối đa các lây nhiễm từ nguồn vi sinh vật có hại như vi khuẩn, vi nấm.

Bước 2: Rửa mô mỡ trước khi xử lý. Mô mỡ sẽ được rửa với dung dịch có chứa cồn (trên 60°) trong thời gian từ 2 phút đến 6 phút tại nhiệt độ phòng và rửa sạch với dung dịch PBS để loại bỏ cồn. Cân nặng của mô mỡ sẽ được lưu lại sau khi rửa. Cân nặng trung bình của mô mỡ trước khi xử lý rơi vào khoảng từ 1,5 gram đến 2,5 gram.

Bước 3: Cắt nhỏ mô mỡ. Mô mỡ sau khi rửa sẽ được cắt nhỏ theo chiều dài của mô mỡ với diện tích mỗi mảnh mô mỡ nằm trong khoảng từ 0,5 mm^2 đến 12 mm^2.

Bước 4: Trộn các mẫu mô mỡ sau khi cắt nhỏ với hỗn hợp enzym hỗ trợ phân hủy được điều chế bởi các tác giả Giải pháp hữu ích với thành phần cơ bản bao gồm:

a. Dung dịch enzyme có chứa các thành phần tính theo thể tích bao gồm 40% dung dịch Trypsin tái tổ hợp, 40% dung dịch EDTA, và 20% dung dịch nền RPMI; hoặc

b. dung dịch enzyme có chứa thành phần hoặc là Trypsin tái tổ hợp (1X) hay dung dịch có chứa hợp chất Collagenase loại I, II, hoặc IV với nồng độ từ 200 đơn vị hoạt độ đến 1000 đơn vị hoạt độ.

Thể tích dung dịch enzym xử lý được tính theo trọng lượng của mô mỡ với tỉ lệ tương đương gram/thể tích là 1:1. Mẫu sẽ được trộn và lắc bằng máy trong thời gian từ 15 đến 60 phút ở nhiệt độ từ 32°C đến 40°C trước khi cho vào hệ thống gentleMACS Octo Dissociator.

Bước 5: Xử lý mẫu trong hệ thống gentleMACS Octo Dissociator với chương trình lập trình riêng bởi các tác giả Giải pháp hữu ích bao gồm hai chương trình:

Chương trình ủ mẫu:

i. Chế độ gia nhiệt đảm bảo nhiệt độ gia tăng và duy trì từ 32°C đến 40°C trong suốt quá trình thực hiện.

ii. Ủ mẫu trong thời gian đứt quãng cách nhịp với mỗi nhịp có thời gian từ 3 đến 10 phút.

iii. Chương trình ủ mẫu được kết hợp chung với chương trình xử lý mẫu.

Chương trình xử lý mẫu được chia làm 02 thì riêng biệt nhưng có thể kết hợp với nhau:

i. Chế độ gia nhiệt đảm bảo nhiệt độ gia tăng và duy trì từ 32°C đến 40°C trong suốt quá trình thực hiện.

ii. Thì thứ nhất ống xử lý mẫu được xoay theo chiều kim đồng hồ với tốc độ từ 100 vòng/phút (rpm) đến 1200 vòng/phút.

iii. Thì thứ hai ống xử lý mẫu được xoay ngược chiều kim đồng hồ với tốc độ từ 100 vòng/phút đến 1200 vòng/phút.

iv. Thời gian chạy thì thứ nhất kéo dài từ 1 phút 30 giây đến 9 phút 30 giây.

v. Thời gian chạy thì thứ hai kéo dài từ 1 phút 30 giây đến 9 phút 30 giây.

vi. Sự kết hợp giữa thì thứ nhất và thì thứ hai sẽ là ngay khi kết thúc thì thứ nhất sẽ lập tức chạy thì hai tạo thành chương trình xử lý mẫu.

Kết hợp chương trình ủ mẫu và chương trình xử lý mẫu thành một chu kỳ với tổng thời gian một chu kỳ không quá 15 phút. Chương trình xử lý mẫu được thiết lập bao gồm không quá 08 chu kỳ với thời gian xử lý không quá 120 phút. Hệ thống xử lý mẫu gentleMACS Octo Dissociator có 8 hộc xử lý riêng biệt và có thể xử lý đồng thời riêng rẽ mỗi hộc trong cùng một thời điểm. Trên thực thực tế, Giải pháp hữu ích này thiết lập chương trình có thể xử lý tối đa 08 mẫu mô mỡ trong cùng 1 thời điểm. Mỗi mẫu sẽ được chạy 01 chương trình chung, sử dụng 1 ống xử lý riêng trong 01 hộc xử lý của máy. Vì hệ thống vẫn cần nhân sự tham gia để xử lý và cho ống vào hộc xử lý, vì thế hệ thống này trong phạm vi của Giải pháp hữu ích được xem là hệ thống bán tự động theo chương trình được lập riêng.

Mẫu sau khi xử lý bằng hệ thống bán tự động theo chương trình đã được thiết lập riêng của nhóm Giải pháp hữu ích được gọi là đạt chuẩn khi và chỉ khi: không còn mảnh mô to > $2mm^2$ trong ống xử lý và tạo thành dung dịch huyền phù màu hồng sữa nhạt.

Bước 5: Thu tế bào sau khi xử lý mẫu bằng hệ thống gentleMACS Octo Dissociator. Mẫu sau khi xử lý bằng hệt thống bán tự động sẽ được chuyển sang 04 ống ly tâm 50 ml và được pha loãng với dung dịch PBS (được ủ lạnh sẵn ở nhiệt độ 2°C đến 8°C) để đạt được thể tích tối đa 50 ml. Ống dung dịch pha loãng được lắc với tốc độ từ 100 vòng/phút đến 1200 vòng/phút trong thời gian từ 2 đến 6 phút để đảm bảo giảm độ nhớt của dung dịch và hòa tan hoàn toàn dung dịch sau xử lý với dung dịch PBS lạnh.

Sau khi hòa tan hoàn toàn dung dịch huyền phù với PBS lạnh, hỗn hợp sẽ được ly tâm với tốc độ từ 200g đến 1400g trong tối đa 20 phút để thu hỗn hợp tế bào. Dịch nổi sẽ bị loại bỏ và hỗn hợp thu được sau khi ly tâm sẽ được dùng để nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc trung mô từ mô mỡ. Hỗn hợp tế bào sau khi ly tâm cơ bản bao gồm các

tế bào gốc trung mô từ mô mỡ. Hỗn hợp này có thể được sử dụng để đếm số lượng tế bào bằng phương pháp đếm tự động bằng máy hoặc đếm bằng tay với nhuộm sống chết bằng Trypan Blue.

Quy trình nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ mô mỡ thu được sau bước phân lập và tách chiết bao gồm các bước sau:

Bước 1: Xử lý bề mặt chai nuôi cấy tế bào trước khi nuôi cấy bằng hợp chất ngoại bào được tạo ra từ kỹ thuật protein tái tổ hợp:

Hợp chất ngoại bào (extracellular matrix) được sử dụng trong Giải pháp hữu ích này bao gồm thành phần cơ bản là fibronectin, vitronectin, hoặc intergrin. Hợp chất ngoại bào này được tạo ra hay sản xuất theo tiêu chuẩn cho ứng dụng lâm sàng, cGMP, và/hoặc GMP. Hợp chất ngoại bào được sử dụng trong Giải pháp hữu ích bao gồm một trong các hợp chất sau:

i. CTS™ CELLStart™ substrate (Gibco, USA, A1014201);

ii. Recombinant human fibronectin GMP, CF (4305-GMP, R&D system);

iii. MesenCult™-SF attachment substrate (Cat: 05424, Stemcell Technologies);

iv. Hoặc tổ hợp của các hợp chất trên.

Hợp chất ngoại bào trước khi sử dụng ở dạng lỏng (nồng độ cao) và được lưu trữ khi không sử dụng ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C. Hợp chất ngoại bào được pha loãng theo tỉ lệ từ 1:50 đến 1:500 bằng dung dịch PBS ở nhiệt độ phòng. Sau đó dung dịch chứa hợp chất ngoại bào được pha loãng sẽ được phủ lên bề mặt của chai nuôi cấy theo tỉ lệ 0,2 đến 1ml/cm^2.

Chai nuôi cấy với các diện tích nuôi cấy cỡ trung bình (từ 20 cm^2 đến 100 cm^2) và cỡ lớn (>150 cm^2) sẽ được phủ dung dịch chứa hợp chất ngoại bào được pha loãng và ủ ở nhiệt độ từ 32°C đến 38°C trong thời gian tối thiểu là 45 phút. Chai nuôi cấy theo Giải pháp hữu ích có thể là chai đã được xử lý bề mặt bằng tia gamma hoặc tia plasma với mục đích làm tăng khả năng bám dính của tế bào, đảm bảo chất lượng tế bào gốc trung mô trong quá trình nuôi cấy.

Bước 2: Rửa chai nuôi cấy

Sau khi đã hoàn thành xong bước xử lý bề mặt chai nuôi cấy. Dung dịch chứa hợp chất ngoại bào sẽ được hút bỏ và chai nuôi cấy sẽ được rửa với dung dịch PBS theo tỉ lệ 0,2 đến 1ml/cm^2.

Bước 3: Chuẩn bị môi trường nuôi cấy và bổ sung vào chai nuôi cấy.

Chai nuôi cấy được loại bỏ dung dịch rửa PBS và môi trường nuôi cấy sẽ được bổ sung vào chai nuôi cấy sau xử lý theo tỉ lệ 0,2 đến 1 ml/cm^2. Môi trường nuôi cấy theo Giải pháp hữu ích là môi trường nuôi cấy thương mại không chứa huyết thanh (serum-free) và không chứa các chất có nguồn gốc từ động vật (xeno-free). Các môi trường được sử dụng trong Giải pháp hữu ích này bao gồm:

v. MesenCult-ACF culture kit (Cat: 5449, hãng sản xuất Stemcell Technologies)

vi. MesenCult-ACF plus culture kit (Cat: 5448, hãng sản xuất Stemcell Technologies).

vii. Môi trường nuôi cấy tế bào gốc PowerStem MSC1-Serum-free (hãng sản xuất Pan Biotech).

viii. Môi trường StemMACS MSC Expansion Media Kit Xeno-free và Serum-free (hãng sản xuất Miltenyi Biotec – Đức).

ix. Môi trường nuôi cấy StemPro-34 SFM (hãng sản xuất ThermoFisher Scientific).

Mỗi loại môi trường theo kit có chứa 01 chai dung dịch nền (basal media) và 01 chai dung dịch chứa các hợp chất kích thích tế bào gốc trung mô tăng trưởng (01 supplement media). Môi trường sẽ được chuẩn bị theo hướng dẫn của nhà sản xuất và lưu trữ ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C. Trước khi sử dụng, môi trường sẽ được ủ ấm ở nhiệt độ từ 32°C đến 38°C trong thời gian tối thiểu là 25 phút.

Bước 4: Nuôi cấy tế bào

Tế bào ở bước phân lập sẽ được hòa tan đều và nhẹ nhàng với môi trường nuôi cấy như nêu trên sau đó sẽ được bổ sung vào chai nuôi cấy đã được xử lý bề mặt và chứa môi trường theo các bước 1, 2, và 3.

Tế bào sau khi chuyển vào chai nuôi cấy sẽ được nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ từ 34°C đến 39°C trong tủ nuôi cấy tế bào với nồng độ CO_2 duy trì đều đặn và liên tục ở 3,5 đến 6%, với độ ẩm không thấp hơn 90%. Tế bào sẽ được nuôi cấy trong thời gian từ 4 đến tối đa 10 ngày để đạt được mật độ bao phủ bề mặt là trên 85%. Khi tế bào đạt đủ 1 trong 2 điều kiện là thời gian nuôi cấy (không quá 10 ngày) hay mật độ bao phủ bề mặt (>85%) sẽ được cấy chuyển sang chai nuôi cấy mới bằng phương pháp enzym.

Phương pháp cấy chuyển miêu tả trong Giải pháp hữu ích này là phương pháp cấy chuyển dùng enzym tái tổ hợp không chứa huyết thanh (serum-free) và các chất có nguồn gốc từ động vật (xeno-free) đặc hiệu cho tế bào gốc trung mô từ mô mỡ, bao gồm các bước sau:

1. Tế bào gốc trung mô từ mô mỡ khi đạt điều kiện cấy chuyển sẽ được loại bỏ môi trường nuôi cấy và rửa 01 lần với dung dịch PBS ở nhiệt độ phòng và với thể tích dung dịch rửa theo tỉ lệ 0,2 đến 1ml/cm^2.
2. Sau khi loại bỏ dung dịch PBS, tế bào sẽ được xử lý với dung dịch enzym với thể tích xử lý từ 0,2 đến 1ml/cm^2 và có chứa 1 trong những thành phần cơ bản sau:
    a. Dung dịch enzyme có chứa các thành phần tính theo thể tích bao gồm 40% dung dịch Trypsin tái tổ hợp (CTS™ TrypLE select Enzyme, A1285901, ThermoFisher Scientific), 40% dung dịch EDTA, và 20% dung dịch nền RPMI.
    b. Hoặc dung dịch enzyme có chứa thành phần hoặc là Trypsin tái tổ hợp (CTS™ TrypLE select Enzyme, A1285901, ThermoFisher Scientific (1X)).
3. Tế bào sẽ được ủ với dung dịch enzym trong thời gian từ 2 phút đến 7 phút ở nhiệt độ từ 34°C đến 39°C trong tủ nuôi cấy tế bào.

4. Hết thời gian ủ, enzym sẽ bị bất hoạt bằng dung dịch nuôi cấy tế bào gốc trung mô được sử dụng ở bước (3) phần nuôi cấy tế bào với thể tích sử dụng là 0,2 đến 1ml/cm^2.

Sau khi xử lý với enzym và bất hoạt bằng môi trường nuôi cấy, dung dịch tại thời điểm này sẽ chứa các tế bào đơn và có thể được đếm bằng Trypan Blue và ly tâm ở tốc độ từ 200 vòng/phút đến 1400 vòng/phút trong thời gian từ 2 đến 10 phút để thu lại tế bào.

Tế bào sau khi thu hoạch sẽ được hòa tan với dung dịch nuôi cấy được sử dụng ở bước (3) phần nuôi cấy tế bào sẽ được cho vào chai nuôi cấy đã được xử lý bề mặt với hợp chất ngoại bào với tỉ lệ cấy chuyển tối thiểu tương đương 1:3 hay 4000 tế bào/cm^2.

Dung dịch nuôi cấy sẽ được thay theo định kỳ 2 – 4 ngày/lần cho đến khi tế bào đạt mật độ để cấy chuyển cho những lần tiếp theo.

Quy trình lưu trữ tế bào gốc trung mô từ mô mỡ theo Giải pháp hữu ích này được thực hiện theo các bước như sau:

Bước 1: Hòa tan tế bào trong dung dịch lưu trữ.

Tế bào gốc trung mô từ mô mỡ đạt tiêu chuẩn khi đạt điều kiện thu hoạch (độ bao phủ lớn hơn 85% bề mặt nuôi cấy) sẽ được thu hoạch theo phương pháp enzym đã nêu ở phần phương pháp cấy chuyển. Số lượng tế bào sẽ được đếm và xác định tỉ lệ sống chết bằng phương pháp Trypan Blue.

Tổng số tế bào sẽ được hòa tan với dung dịch lưu trữ tế bào gốc với cấu tạo thành phần các chất như sau để có được nồng độ tế bào cuối cùng từ 0,5x10^6 tế bào/ml đến 5x10^6 tế bào/ml:

a. dung dịch lưu trữ là môi trường nuôi cấy tế bào như sử dụng trong quy trình nuôi cấy và hòa tan với 2,5% đến 15% DMSO; hoặc

b. dung dịch lưu trữ tế bào không chứa huyết thanh (serum-free), và không chứa các chất từ động vật (xeno-free) bao gồm:

i. CryoStor^{R} CS10 (Cat: 07930, hãng sản xuất Stemcell Technologies)

ii. CTS^{TM} Synth-a-Freeze^{TM} medium (Cat: A1371301, hãng sản xuất Gibco, Thermofisher Scientific)

Bước 2: Đóng gói tế bào vào ống bảo quản.

Sản phẩm tế bào gốc trung mô từ mô mỡ sau khi thu hoạch và hòa tan với chất bảo quản ở nồng độ từ $0,5x10^6$ tế bào/ml đến $5x10^6$ tế bào/ml sẽ được đóng vào từng ống bảo quản (Cryovials) với tổng thể tích trong mỗi ống từ 0,8 ml đến 1,8ml/vial.

Bước 3: Bảo quản sản phẩm tế bào tế bào gốc trung mô trong điều kiện lạnh sâu

Các ống cryovials chứa tế bào gốc trung mô sẽ được hạ lạnh bằng hệ thống hạ lạnh tự động Thermo Scientific Forma với chương trình được cài đặt sẵn hạ lạnh từ nhiệt độ phòng (giao động từ 18°C đến 25°C) xuống -90°C với tốc độ hạ lạnh là -1°C/phút và duy trì tại nhiệt độ -90°C cho đến khi mẫu được chuyển sang hệ thống lưu trữ tự động Brooks (hãng sản xuất Brooks, USA).

Ví dụ thực hiện Giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Phân lập và tách chiết tế bào gốc trung mô từ mô mỡ của bệnh nhân A bằng phương pháp bán tự động kết hợp với enzym

Giai đoạn 1: thu thập, vận chuyển, và rửa mô mỡ:

Mô mỡ từ người khỏe mạnh hoặc người bệnh được chỉ định bởi bác sỹ sẽ được thu thập ở lằn ranh bụng dưới của bệnh nhân. Bác sỹ phẫu thuật sẽ thu thập một khối mỡ có thể tích tương đương từ 1 mm^3 đến 4 mm^3 với trọng lượng tương đương từ 1,5 gram đến 2,5 gram. Mô mỡ sau khi thu thập tại phòng mổ sẽ được bỏ vào ống đựng mẫu chứa dung dịch vận chuyển là nước muối sinh lý (NaCl 0.9%) và chuyển về trung tâm xử lý mô.

Giai đoạn 2: xử lý phân lập tế bào gốc mô mỡ

Sau khi kiểm tra định danh bệnh nhân, mô mỡ sẽ được chuyển vào bên trong tủ an toàn sinh học và được rửa với dung dịch cồn có nồng độ ít nhất 60° trong thời gian

ít nhất 2 phút để khử trùng bề mặt của mô mỡ và cân để đo trọng lượng mô mỡ (khoảng 24 gram). Mô mỡ sau đó được cắt nhỏ và cho vào ống nghiệm 50 ml có chứa 10 ml dung dịch enzym và ủ ấm trước khi cho vào ống xay với chương trình tự động đã được nhóm nghiên cứu lập trình đặc biệt ở máy gentleMACS Octo Dissociator. Sau khi xử lý, tế bào được thu thập bằng cách hòa loãng dịch huyền phù hay còn được gọi là phân đoạn mạch nền với PBS lạnh và ly tâm ở tốc độ trung bình để thu thập. Tế bào được thu gom sau khi loại bỏ dịch nổi và tiến hành nuôi cấy theo quy trình đã được miêu tả bên trên.

Tế bào thu được sẽ được nuôi cấy trong tủ nuôi cấy tế bào có nhiệt độ được duy trì liên tục trong dãy từ 34,5°C đến 39°C, với nồng độ CO_2 được duy trì ở mức 5% với độ ẩm trên 95%. Các tế bào khi được nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ trên sẽ tăng sinh trong môi trường nuôi cấy đặc hiệu sẽ cần từ 4 – 5 ngày để có thể đạt được mật độ cấy chuyển với độ bao phủ bề mặt chai nuôi cấy là trên 85%. Trong trường hợp chai nuôi cấy có diện tích bề mặt là 75 cm^2 (T75), mật độ cấy chuyển khi tế bào đạt 63,75 cm^2. Tại thời điểm cấy chuyển, chai nuôi cấy sẽ được chuyển vào tủ an toàn sinh học, dung dịch nuôi cấy sẽ được loại bỏ và tế bào sẽ được rửa 1 lần với dung dịch PBS. Sau khi loại bỏ dịch rửa, tế bào sẽ được ủ với dung dịch enzym (trong ví dụ này là TryPLE Select, 1X) với thể tích là 5 ml (đủ để phủ toàn bộ bề mặt của chai nuôi cấy) trong thời gian tối đa 7 phút. Sau đó, enzym sẽ được bất hoạt bằng cách sử dụng 5 ml dung dịch nuôi cấy đã được làm ấm và dùng serological pipette (10ml) để tách lớp tế bào ra khỏi bề mặt chai nuôi cấy bằng cách hút nhả dung dịch từ 5 đến 10 lần. Dung dịch chứa tế bào sau đó được chuyển qua ống ly tâm 50 ml để đếm tế bào bằng buồng đếm và kiểm tra độ sống chết bằng Trypan Blue. Tổng lượng tế bào gốc trung mô từ mô mỡ thu hoạch được từ 1 chai nuôi cấy T75 trung bình khoảng $4x10^6$ tế bào. Số lượng tế bào này sẽ được chia làm 2 phần bằng nhau, trong đó $2x10^6$ tế bào sẽ được sử dụng để kiểm tra chất lượng, và số còn lại sẽ được bảo quản và trữ đông.

Giai đoạn 3: Thu hoạch và bảo quản trữ đông tế bào

Tế bào sau khi nuôi cấy ở giai đoạn 2 sẽ đạt mật độ cấy chuyển (>85% độ phủ bề mặt) sẽ được thu hoạch bằng phương pháp enzym tại thời điểm sau khi phân lập (thời điểm Passage 0 – P0). $2x10^6$ tế bào sau khi thu hoạch sẽ được gửi để phân tích các

markers bề mặt bằng hệ thống phân tích tế bào dòng chảy (Flow Cytometry), số tế bào còn lại sẽ được chia làm đôi. Một phần sẽ được lưu trữ bằng hệ thống hạ lạnh tự động và bảo quản trong hệ thống lưu trữ tự động Brooks. Phần còn lại sẽ tiếp tục nuôi cấy ở chai nuôi cấy có diện tích lớn hơn (175 cm^2 hoặc 225 cm^2) tùy theo số lượng tế bào còn lại.

Ví dụ 2: Phân tích chất lượng tế bào

Tế bào tại các thời điểm thu hoạch như P0 (ở ví dụ 1), P1, và P3 sẽ được đếm và thu giữ $2x10^6$ tế bào để kiểm tra chất lượng sản phẩm bằng phương pháp phân tích tế bào dòng chảy (Flowcytometry). Bộ kit kiểm tra tính chất tế bào gốc trung mô "BD Stemflow hMSC analysis kit" sẽ được sử dụng để kiểm tra các markers bề mặt của tế bào gốc trung mô từ mô mỡ sau khi thu hoạch như dương tính với CD73, CD90, và CD105, âm tính với các markers như CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79alpha hay CD19, và HLA-DR. Kết quả trung bình sau khi nuôi cấy của tế bào gốc trung mô từ mô mỡ sau khi phân tích như sau: CD73 (99%), CD90 (100%) và CD105 (100%), âm tính với tất cả các markers CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79alpha hay CD19, và HLA-DR với tỉ lệ dưới 5% sau khi phân tích.

Ví dụ 3: Bảng phân tích tính hiệu quả của bằng Giải pháp hữu ích

Các bước cơ bản trong giải pháp hữu ích		Phương pháp truyền thống	Điểm mới	Hiệu quả cải thiện của giải pháp hữu ích
Phân lập tế bào gốc trung mô từ mô mỡ	Thu thập mô mỡ với trọng lượng <5 gram.	Thu thập mô mỡ với khối lượng lớn > 10 gram, hoặc dung dịch hút mỡ >100 ml. Tham khảo từ các đơn sáng chế số: CN104928238A, CN102002475A, CN103540564A.	Khối mô mỡ có trọng lượng nhỏ dưới 5 gram.	Giảm khối lượng mô mỡ thu thập ban đầu đảm bảo tính an toàn cho bệnh nhân hoặc người hiến trong quá trình phẫu thuật thu thập mô mỡ.
	Sử dụng máy xử lý	Không sử dụng hệ	Lập trình mới quy	Giảm đáng kể thời

Các bước cơ bản trong giải pháp hữu ích		Phương pháp truyền thống	Điểm mới	Hiệu quả cải thiện của giải pháp hữu ích
	mô MACS Octo Dissociator	thống xử lý mô tự động và không xây dựng chương trình xử lý tối ưu để giảm thời gian xử lý mô và tăng tỉ lệ sống của tế bào. Tham khảo từ các đơn sáng chế số: CN104928238A, EP2354220B, WO2012068710, CN101215547A.	trình xử lý mô mô mỡ sau khi cắt nhỏ với 2 quy trình xử lý mẫu và ủ mẫu với thời gian xử lý bằng máy không vượt quá 120 phút.	gian xử lý mô mô mỡ từ trên 10 giờ xuống còn dưới 3 giờ (không phụ thuộc vào cân nặng của mô mỡ)
	Sử dụng enzym tái tổ hợp không có nguồn gốc từ động vật	Sử dụng enzyme trực tiếp từ hãng không tạo ra công thức tối ưu, hoặc sử dụng enzyme có nguồn gốc từ động vật. Tham khảo từ các đơn sáng chế số: CN101215547A, CN109355257A, KR20080037281A	Enzyme tái tổ hợp từ công nghệ protein tái tổ hợp và công thức enzym mới được tạo ra từ nhóm Giải pháp hữu ích	Giảm thời gian ủ mẫu mô mỡ xuống còn 30 phút và thời gian xử lý kết hợp với máy xử lý mô MACS Octo Dissociator xuống dưới 3 giờ.
Nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ mô mỡ	Chai nuôi cấy tế bào gốc cỡ trung bình từ 20 cm^2 đến 100 cm^2) và cỡ lớn (>150 $cm^{2)}$	Sử dụng chai nuôi cấy tế bào thường quy, không cần xử lý bề mặt trước khi nuôi cấy. Tham khảo từ các đơn sáng chế số: CN101974486A,	Sử dụng chai nuôi cấy đã được xử lý bề mặt bằng tia gamma và/hoặc tia plasma từ nhà sản xuất.	Tăng khả năng bám dính của tế bào gốc, cải thiện khả năng tăng sinh và duy trì tính gốc của tế bào gốc trung mô mô mỡ.

Các bước cơ bản trong giải pháp hữu ích		Phương pháp truyền thống	Điểm mới	Hiệu quả cải thiện của giải pháp hữu ích
		CN101215547A, WO2012068710, KR20080037281A		
	Phủ lớp dung dịch hợp chất ngoại bào lên bề mặt chai nuôi cấy.	Sử dụng các hợp chất ngoại bào có nguồn gốc từ động vật, hoặc không sử dụng hợp chất ngoại bào. Tham khảo từ các đơn sáng chế số: KR20080037281A, WO2007069813, CN109355257A, CN107384857A	Sử dụng hợp chất ngoại bào không có nguồn gốc từ động vật (xeno-free) và từ huyết thanh (serum-free).	Tăng khả năng bám dính của tế bào gốc, cải thiện khả năng tăng sinh và duy trì tính gốc của tế bào gốc trung mô mô mỡ. Nếu không phủ lớp hợp chất ngoài bào, tế bào gốc trung mô từ mô mỡ từ nhiều người hiến khác nhau sẽ không có sự phát triển đồng nhất và dễ dàng bong tróc khỏi chai nuôi cấy. Đối với người hiến là người lớn tuổi, phủ hợp chất bề mặt đảm bảo số lượng tế bào gốc sau phân lập có khả năng bám dính vào chai nuôi cấy tốt hơn.
	Dung dịch nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ mô mỡ	Sử dụng dung dịch có nguồn gốc từ huyết thanh động vật, huyết thanh người, hoặc các chất có nguồn gốc	Sử dụng dung dịch nuôi cấy có thể truy xuất nguồn gốc các thành phần (nồng độ), không chứa các chất từ động vật	Kết hợp với việc xử lý bề mặt chai nuôi cấy và phủ lớp hợp chất ngoại bào, việc sử dụng dung dịch nuôi cấy có thể truy

Các bước cơ bản trong giải pháp hữu ích		Phương pháp truyền thống	Điểm mới	Hiệu quả cải thiện của giải pháp hữu ích
		từ động vật. Không thể truy xuất thành phần nồng độ của các chất trong dung dịch nuôi cấy. Tham khảo từ các đơn sáng chế số: KR20080037281A, WO2007069813, CN109355257A, CN107384857A	(xeno-free) và không chứa huyết thanh (serum-free)	xuất nguồn gốc các thành phần (nồng độ), không chứa các chất từ động vật (xeno-free) và không chứa huyết thanh (serum-free) duy trình khả năng tăng sinh, tốc độ tăng sinh, và tính gốc của dòng tế bào gốc trung mô từ mô mỡ. Tế bào gốc trung mô mô mỡ khi được nuôi trong môi trường này có thể sử dụng trực tiếp cho các ứng dụng lâm sàng.
	Hợp chất enzym dùng để cấy chuyển tế bào gốc trung mô từ mô mỡ		Công thức enzym tái tổ hợp không có nguồn gốc từ động vật (xeno-free) và huyết thanh (serum-free)	Giúp việc cấy chuyển và phân tách các tế bào gốc trung mô mô mỡ bám dính trên bề mặt chai nuôi cấy dễ dàng hơn, tăng khả năng sống sót của tế bào sau khi cấy chuyển, và làm giảm thời gian ủ mẫu xuống còn dưới 5 phút.
Lưu trữ và bảo	Dung dịch bảo quản mô mỡ	Dung dịch bảo quản chứa nồng độ	Công thức mới của nhóm Giải pháp hữu	Tăng khả năng sống sót trong và sau quá

Các bước cơ bản trong giải pháp hữu ích		Phương pháp truyền thống	Điểm mới	Hiệu quả cải thiện của giải pháp hữu ích
quản tế bào gốc trung mô từ mô mỡ		DMSO cao >15% hoặc có chứa huyết thanh, hoặc các chất từ động vật. Tham khảo từ các đơn sáng chế số: KR20080037281A, WO2007069813, CN109355257A, CN107384857A, CN102002475A	ích sử dụng môi trường nuôi cấy hoà trộn với DMSO tỉ lệ từ 2.5% đến 15%, không chứa các chất có nguồn gốc từ động vật (xeno-free) và huyết thanh (serum-free), hoặc sử dụng dung dịch thương mại không chứa các chất có nguồn gốc từ động vật (xeno-free) và huyết thanh (serum-free) đã được kiểm nghiệm bởi nhóm Giải pháp hữu ích.	trình lưu trữ ở nhiệt độ âm sâu (<-150° C). Tế bào sau khi rã đông phục hồi tốt sau 02 ngày nuôi cấy với khả năng tăng sinh tốt, tốc độ tăng sinh nhanh và duy trì tính gốc của tế bào.
	Giảm nhiệt độ trong quá trình lưu trữ từ nhiệt độ phòng xuống -90°C		Sử dụng hệ thống hạ lạnh tự động được lập trình bởi nhóm Giải pháp hữu ích.	Chương trình hạ lạnh tự động giảm thời gian hạ lạnh từ trên 12 giờ xuống còn dưới 3 giờ mà vẫn đảm bảo nhiệt độ bảo quản, không ảnh hưởng đến khả năng sống sót và phục hồi của tế bào gốc trung mô mô mỡ sau khi rã đông.

Hiệu quả có lợi của Giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích sử dụng phương pháp phân lập bằng hệ thống xử lý mô tự động với chương trình được lập trình riêng kết hợp với enzym làm giảm thời gian xử lý mô xuống còn từ 1,5 đến 3 giờ.

Phương pháp được miêu tả trong Giải pháp hữu ích có khả năng phân lập tế bào gốc từ khối mô mỡ có trọng lượng nhỏ (dưới 5 gram) mà vẫn đảm bảo tỉ lệ thu thập tế bào gốc trung mô lên đến 99%, đảm bảo không lấy quá nhiều mô từ người hiến hoặc bệnh nhân và giảm thiểu tối đa các biến chứng có thể xảy ra khi thực hiện thủ thuật lấy mô mỡ.

Quy trình phân lập trong Giải pháp hữu ích đảm bảo khả năng thành công cao cho mô mỡ thu thập từ người khỏe mạnh hay người bệnh mà không có bất kỳ sự khác biệt nào. Ngoài ra, tỉ lệ thành công khi thực hiện với mẫu được thu tập từ người lớn tuổi (>65 tuổi) có tỉ lệ thành công cao trên 95%.

Giải pháp hữu ích dựa trên sự kết hợp giữa máy xử lý mô tự động GentleMACS Octo Dissociator với chương trình được lập trình riêng bởi các tác giả Giải pháp hữu ích và sử dụng hỗn hợp enzym để phân huỷ cấu trúc mô của mô mỡ giúp các tế bào gốc được tách ra khỏi khối mô mô mỡ một cách nhanh và tốt hơn, nhờ đó các tế bào gốc này có thể nhân lên và tăng sinh *in vitro* mà không cần sử dụng các hoạt chất kích thích hay huyết tương giàu tiểu cầu giúp cho các tế bào này hồi phục nhanh hơn và có tốc độ tăng sinh tốt hơn.

Quy trình nuôi cấy MSCs từ mô mỡ theo Giải pháp hữu ích hoàn toàn không sử dụng các thành phần chứa huyết thanh (serum-free) và không chứa các chất có nguồn gốc từ động vật (xeno-free). Điều này giúp kiểm soát rõ ràng các thành phần hoạt chất được sử dụng và có thể truy xuất nguồn gốc, truy xuất thành phần (trong trường hợp cần thiết), và truy xuất nồng độ các chất có trong dung dịch nuôi cấy. Ngoài ra, khi tế bào gốc trung mô từ mô mỡ được nuôi cấy trong môi trường không chứa huyết thanh, không chứa các chất từ động vật, và có thể biết các thành phần bên trong môi trường nuôi cấy theo Giải pháp hữu ích thì các tế bào có thể cấy chuyển trên 15 lần (>P15) và duy trì tốc độ tăng sinh nhanh (20 đến 28 giờ) đến P15.

Ngược lại, nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ mô mỡ bằng dung dịch có chứa huyết thanh theo tình trạng kỹ thuật sẽ mất dần tính gốc của tế bào được đánh giá bởi sự thay đổi của các markers bề mặt theo quy định của ISCT năm 2006 và 2013 (dương tính với CD73, CD90, và CD105 bé hơn 90% (<90%), và tăng gía trị dương tính của CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79alpha hay CD19, và HLA-DR lớn hơn 10% (>10%).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tạo ra sản phẩm tế bào gốc trung mô từ mô mỡ chứa các dòng tế bào gốc trung mô từ phân đoạn mạch nền bao gồm các bước:

(i) phân lập và tách chiết tế bào gốc từ mô mỡ:

mô mỡ sau khi thu thập được rửa bằng dung dịch cồn > 60° trong thời gian 2-6 phút tại nhiệt độ phòng, sau đó rửa sạch với dung dịch muối đệm phosphat (PBS) để loại bỏ cồn, chia mô mỡ thành từng phần xử lý có khối lượng 1,5-2,5 g;

cắt nhỏ mô mỡ mô mỡ sau khi rửa thành từng mảnh có diện tích 0,5 -12 mm^2;

ủ mô mỡ sau khi cắt nhỏ trong hỗn hợp enzym theo tỉ lệ mô mỡ:hỗn hợp enzym = 1:1 (khối lượng:thể tích) trong điều kiện lắc, thời gian ủ từ 15 phút đến 90 phút ở nhiệt độ từ 32°C đến 40°C, trong đó hỗn hợp enzym có thành phần tính theo % thể tích như sau:

- Trypsin (tên thương mại CTS™ TrypLE select Enzyme, A1285901, của hãng ThermoFisher Scientific, nồng độ 1X) với tỷ lệ 0,1-60%;
- hoạt chất EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) với tỷ lệ 0,1-60%; và
- chất dẫn dịch nền RPMI (Roswell Park Memorial Institute) với tỷ lệ 0,1-40%;

đưa mô mỡ sau khi ủ trong hỗn hợp enzym vào ống đựng mẫu;

phân lập mô mỡ sau khi ủ trong hỗn hợp enzym theo các chu kỳ có tổng thời gian mỗi chu kỳ không quá 15 phút, thực hiện tối đa 8 chu kỳ, thu được tế bào gốc trung mô từ mô mỡ ban đầu, trong đó mỗi chu kỳ bao gồm các công đoạn như sau:

- ủ ống đựng mẫu trong thời gian từ 2-10 phút, duy trì ở nhiệt độ từ 32°C đến 40°C; và
- xử lý ống đựng mẫu bằng cách quay ống đựng mẫu theo chiều kim đồng hồ với tốc độ 100-1200 vòng/phút, sau đó quay ống đựng mẫu ngược chiều kim đồng hồ với tốc độ 100-1200 vòng/phút, trong đó thời gian quay ống theo mỗi chiều là bằng nhau và tổng thời gian xử lý ống đựng mẫu là từ 5-13 phút;

chuyển mô mỡ trong các ống đựng mẫu vào 4 ống ly tâm 50 ml, pha loãng bằng dung dịch PBS có nhiệt độ 2-8°C để đạt được thể tích trong mỗi ống là 50 ml, lắc ống

ly tâm với tốc độ 100-1200 vòng/phút trong thời gian 2-6 phút, thu ống chứa hỗn hợp hòa tan;

thực hiện ly tâm ống chứa hỗn hợp hòa tan với tốc độ 200-1400 g trong 20 phút, loại bỏ dịch nổi, và thu hỗn hợp tế bào;

(ii) nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ mô mỡ ban đầu:

xử lý bề mặt chai nuôi cấy bằng tia gamma hoặc tia plasma;

pha loãng hợp chất ngoại bào có thành phần cơ bản là fibronectin, vitronectin hoặc intergrin với PBS ở nhiệt độ phòng theo tỷ lệ thể tích hợp chất ngoại bào:PBS =1:50-1:500;

phủ hợp chất ngoại bào đã pha loãng lên bề mặt của chai nuôi cấy theo tỷ lệ 0,2-1 ml hợp chất ngoại bào đã pha loãng cho 1 cm^2 bề mặt chai nuôi cấy, ủ ở nhiệt độ 32°C đến 38°C trong thời gian tối thiểu 45 phút;

hút bỏ phần dung dịch chứa hợp chất ngoại bào đã pha loãng, rửa bề mặt chai nuôi cấy bằng dung dịch PBS theo tỷ lệ 0,2-1 ml dung dịch PBS cho 1 cm^2 bề mặt chai nuôi cấy, loại bỏ phần dung dịch PBS, thu được chai nuôi cấy đã xử lý bề mặt;

chuẩn bị môi trường nuôi cấy bằng cách ủ các dung dịch môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ 32°C đến 38°C trong thời gian tối thiểu 25 phút, trong đó các môi trường nuôi cấy là môi trường thương mại không chứa huyết thanh (serum-free) và không chứa các chất có nguồn gốc từ động vật (xeno-free);

cho môi trường nuôi cấy đã chuẩn bị vào chai nuôi cấy đã xử lý bề mặt theo tỷ lệ 0,2-1 ml môi trường nuôi cấy cho 1 cm^2 bề mặt chai nuôi cấy;

chuyển hỗn hợp tế bào thu được từ bước (i) vào trong chai nuôi cấy, thực hiện nuôi cấy ở nhiệt độ 34°C đến 39°C trong tủ nuôi cấy với nồng độ CO_2 duy trì đều đặn và liên tục ở 3,5-6%, độ ẩm không thấp hơn 90%, trong thời gian 4-10 ngày để đạt mật độ bao phủ bề mặt >85%, thu được các chai nuôi cấy đủ điều kiện cấy chuyển;

(iii) cấy chuyển tăng sinh tế bào:

loại bỏ môi trường nuôi cấy trong các chai nuôi cấy đủ điều kiện cấy chuyển, rửa 1 lần với dung dịch PBS ở nhiệt độ phòng với thể tích dung dịch rửa theo tỷ lệ 0,2-1 ml dung dịch PBS cho 1 cm^2 bề mặt chai nuôi cấy, loại bỏ dung dịch PBS;

ủ tế bào với dung dịch enzym trong thời gian 2-7 phút ở nhiệt độ 34°C đến 39°C trong tủ nuôi cấy tế bào với thể tích dung dịch enzym xử lý theo tỷ lệ 0,2-1 ml dung

dịch enzym cho 1 cm^2 bề mặt chai nuôi cấy, trong đó dung dịch enzym bao gồm các thành phần tính theo % thể tích là 40% trypsin tái tổ hợp không chứa huyết thanh và không có nguồn gốc từ động vật, 40% dung dịch EDTA 40% và 20% dung dịch nền RPMI, hết thời gian ủ thì enzym sẽ được bất hoạt bằng cách bổ sung môi trường nuôi cấy theo tỷ lệ 0,2-1 ml môi trường nuôi cấy cho 1 cm^2 bề mặt chai nuôi cấy;

thu môi trường nuôi cấy trong các chai nuôi cấy, thực hiện ly tâm ở tốc độ 200-1400 vòng/phút trong thời gian 2-10 phút, thu tế bào;

hòa tan tế bào thu được trong môi trường nuôi cấy theo tỷ lệ cấy chuyển tối thiểu tương đương 1:3, đưa môi trường nuôi cấy đã hòa tan tế bào vào chai nuôi cấy đã được xử lý bề mặt theo tỷ lệ 0,2-1 ml môi trường nuôi cấy cho 1 cm^2 bề mặt chai nuôi cấy;

thực hiện nuôi cấy ở nhiệt độ 34°C đến 39°C trong tủ nuôi cấy với nồng độ CO_2 duy trì đều đặn và liên tục ở 3,5-6%, độ ẩm không thấp hơn 90%, thay môi trường nuôi cấy theo định kỳ 2-4 ngày/lần cho đến khi tế bào đạt mật độ bao phủ bề mặt >85%, thu được các chai nuôi cấy đủ điều kiện cấy chuyển; và

(iv) thu tế bào gốc trung mô từ mô mỡ:

loại bỏ môi trường nuôi cấy trong các chai nuôi cấy đủ điều kiện cấy chuyển, rửa 1 lần với dung dịch PBS ở nhiệt độ phòng với thể tích dung dịch rửa theo tỷ lệ 0,2-1 ml dung dịch PBS cho 1 cm^2 bề mặt chai nuôi cấy, loại bỏ dung dịch PBS;

ủ tế bào với dung dịch enzym trong thời gian 2-7 phút ở nhiệt độ 34°C đến 39°C trong tủ nuôi cấy tế bào với thể tích dung dịch enzym xử lý theo tỷ lệ 0,2-1 ml dung dịch enzym cho 1 cm^2 bề mặt chai nuôi cấy, trong đó dung dịch enzym bao gồm các thành phần tính theo % thể tích là 40% trypsin tái tổ hợp không chứa huyết thanh và không có nguồn gốc từ động vật, 40% dung dịch EDTA 40% và 20% dung dịch nền RPMI, hết thời gian ủ thì enzym sẽ được bất hoạt bằng cách bổ sung môi trường nuôi cấy theo tỷ lệ 0,2-1 ml môi trường nuôi cấy cho 1 cm^2 bề mặt chai nuôi cấy;

thu môi trường nuôi cấy trong các chai nuôi cấy, thực hiện ly tâm ở tốc độ 200-1400 vòng/phút trong thời gian 2-10 phút, thu tế bào gốc trung mô từ mô mỡ.