



(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)



1-0038391

(51)¹⁹ C12N 5/0783; A61K 35/17; A61K 9/19; (13) B
A61K 35/15; A61K 9/08

(21) 1-2019-02446

(22) 14/11/2017

(86) PCT/KR2017/012883 14/11/2017

(87) WO2018/088875 17/05/2018

(30) 10-2016-0151411 14/11/2016 KR

(45) 25/01/2024 430

(43) 25/09/2019 378A

(73) PAEAN BIOTECHNOLOGY INC. (KR)

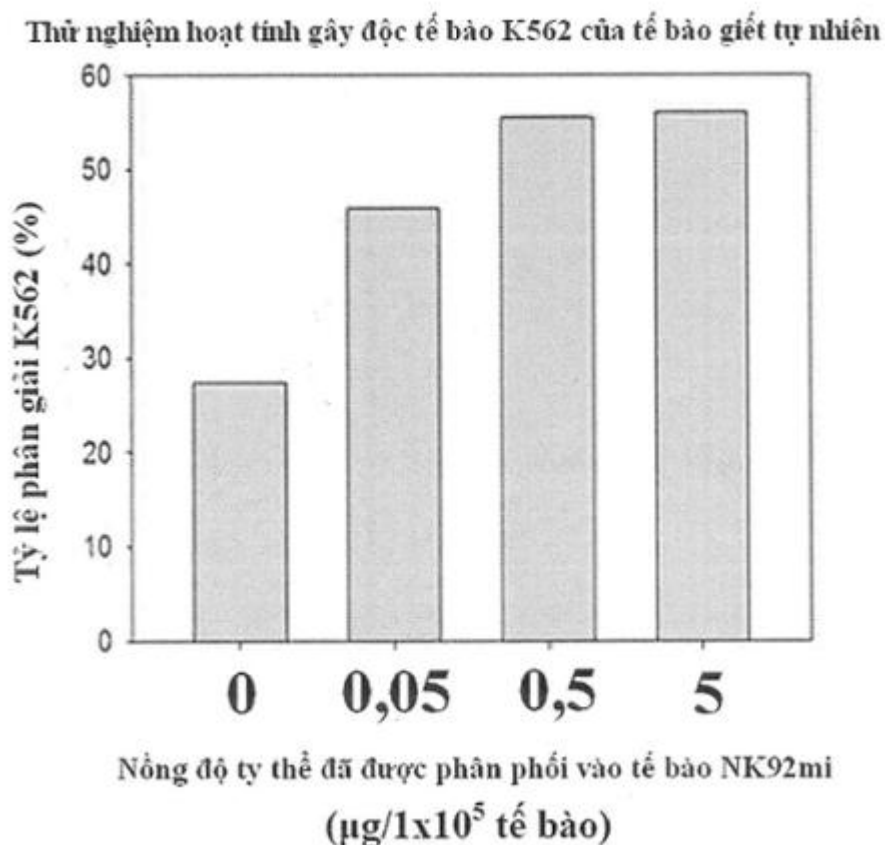
4th Fl. 160, Techno 2-ro Yuseong-gu Daejeon 34028, Republic of Korea

(72) HAN, Kyuboem (KR); LEE, Youngjun (KR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) DƯỢC PHẨM ĐỀ ĐIỀU TRỊ BỆNH UNG THƯ HOẶC BỆNH LÂY NHIỄM

(57) Sáng chế đề cập đến dược phẩm để điều trị bệnh ung thư hoặc bệnh lây nhiễm, chứa hoạt chất là tế bào giết tự nhiên, chứa ty thể ngoại sinh được phân lập.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến tế bào giết tự nhiên hoặc tế bào đơn nhân máu ngoại vi chứa ty thể ngoại sinh, và được phẩm chứa chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Gần đây, hoạt chất sinh học đã được phát triển để điều trị nhiều bệnh nan y. Hoạt chất sinh học bao gồm dược chất protein, dược chất kháng thể và dược chất tế bào. Theo sáng chế, thuật ngữ “dược chất tế bào” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ dược chất để điều trị, chuẩn đoán, hoặc phòng ngừa bệnh và dược chất tế bào có thể được thu nhận bằng một loạt các bước quy trình, như bước phân lập *ex vivo* và tăng sinh hoặc bằng cách biến đổi đặc tính sinh học của tế bào bằng các phương pháp khác. Dược chất tế bào có thể là tế bào tự ghép, dị sinh hoặc ngoại lai. Phụ thuộc vào loại tế bào, dược chất tế bào có thể được phân loại thành dược chất tế bào soma và dược chất tế bào gốc.

Mặt khác, liệu pháp miễn dịch bằng cách sử dụng chức năng miễn dịch của đối tượng bị bệnh đã được chú ý trong điều trị bệnh ung thư. Trong liệu pháp miễn dịch, các đặc tính của tế bào miễn dịch có các chức năng khác nhau được sử dụng và tế bào ung thư được loại bỏ thông qua các tương tác phức tạp của tế bào miễn dịch. Tế bào đơn nhân máu ngoại vi trong máu của người là tế bào máu có nhân hình cầu, như tế bào lympho hoặc bạch cầu đơn nhân, và bao gồm tế bào B, tế bào T, đại thực bào, tế bào đuôi gai, và tế bào giết tự nhiên. Trong số các tế bào này, tế bào giết tự nhiên và tế bào lympho T gây độc tế bào loại bỏ trực tiếp tế bào ung thư. Các tế bào trình diện kháng nguyên đến các tế bào tác động này bao gồm tế bào đuôi gai hoặc tế bào T. Ngoài ra, tế bào T hỗ trợ và tế bào T điều hòa bài tiết các cytokin khác nhau, và các chất tương tự tham gia vào các đáp ứng miễn dịch. Trong số các tế bào này, tế bào giết tự nhiên là tế bào miễn dịch tiềm năng trong liệu pháp miễn dịch tế bào.

Cụ thể, do tế bào giết tự nhiên có khả năng tiêu diệt tế bào ung thư theo cơ chế không đặc hiệu, nên nhiều nghiên cứu đã được thực hiện trên tế bào giết tự nhiên. Trên cơ sở các nghiên cứu này, liệu pháp điều trị bệnh ung thư bằng tế bào giết tự nhiên, đã trở thành phương pháp tiềm năng để điều trị tế bào ung thư. Cụ thể, đã được ghi nhận rằng tế bào giết tự nhiên đóng vai trò quan trọng trong các phản ứng miễn dịch bẩm sinh và thu

được thông qua quá trình bài tiết xytokin, chống lại các tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho đối tượng hoặc bệnh ung thư.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo đó, các tác giả sáng chế đã nỗ lực nghiên cứu để phát triển phương pháp thể mới để cải thiện hoạt tính gây độc tế bào của tế bào giết tự nhiên và tế bào đơn nhân máu ngoại vi. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã phát triển được phương pháp làm tăng hoạt tính gây độc tế bào của tế bào giết tự nhiên và tế bào đơn nhân máu ngoại vi, do đó sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư bằng cách sử dụng hoạt tính gây độc tế bào này, và hoàn thành sáng chế này.

Theo một mục đích, sáng chế đề cập đến tế bào giết tự nhiên có hoạt tính gây độc tế bào được gia tăng và được phẩm chứa tế bào này.

Theo một mục đích khác, sáng chế đề cập đến tế bào đơn nhân máu ngoại vi có hoạt tính gây độc tế bào được gia tăng và được phẩm chứa tế bào này.

Để đạt được các mục đích nêu trên, sáng chế đề cập đến tế bào giết tự nhiên chứa ty thể ngoại sinh, và được phẩm phòng ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư hoặc bệnh lây nhiễm, chứa tế bào này.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến tế bào đơn nhân máu ngoại vi chứa ty thể ngoại sinh, và được phẩm phòng ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư hoặc bệnh lây nhiễm, chứa tế bào này.

Tế bào giết tự nhiên và tế bào đơn nhân máu ngoại vi chứa ty thể ngoại sinh theo sáng chế, có hoạt tính gây độc tế bào được gia tăng tạo ra hoạt tính tiêu diệt đặc hiệu bệnh ung thư được gia tăng, và cũng không gây ra các tác dụng không mong muốn như các tế bào miễn dịch tồn tại *in vivo*. Ngoài ra, hoạt tính của chính tế bào giết tự nhiên và tế bào đơn nhân máu ngoại vi theo sáng chế được cải thiện, do đó có thể được sử dụng để điều trị nhiều bệnh gây ra bởi tế bào giết tự nhiên và tế bào đơn nhân máu ngoại vi. Kết quả là, các dược phẩm chứa tế bào giết tự nhiên và tế bào đơn nhân máu ngoại vi có hoạt tính điều trị cao.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 là hình ảnh thể hiện kết quả thu được bằng phương pháp phân tích PCR để xác định xem ty thể có nguồn gốc từ tế bào gan bình thường của người (WRL68) đã được

phân phối vào tế bào giết tự nhiên hay chưa.

Fig.2 là đồ thị thể hiện kết quả thu được bằng phương pháp phân tích FACS để xác định xem ty thể có nguồn gốc từ tế bào gan bình thường của người đã được phân phối vào tế bào giết tự nhiên hay chưa.

Fig.3 là hình ảnh thể hiện kết quả thu được bằng kính hiển vi huỳnh quang, để xác định vị trí ty thể có nguồn gốc từ tế bào gan bình thường của người được phân phối vào tế bào giết tự nhiên.

Fig.4A và Fig.4B là đồ thị thể hiện kết quả đánh giá hoạt tính chống bệnh ung thư của tế bào giết tự nhiên đã được phân phối ty thể ngoại sinh bằng thử nghiệm mất hạt CD107a.

Fig.5 là biểu đồ thể hiện kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của tế bào giết tự nhiên đã được phân phối ty thể ngoại sinh bằng thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào K562.

Fig.6 là đồ thị thể hiện kết quả thu được bằng phương pháp phân tích FACS để xác định xem ty thể có nguồn gốc từ tế bào gốc trung mô dây rốn (UC-MSC) đã được phân phối vào tế bào giết tự nhiên hay chưa.

Fig.7 là biểu đồ thể hiện kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của tế bào giết tự nhiên đã được phân phối ty thể có nguồn gốc từ tế bào gốc trung mô dây rốn bằng thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào K562.

Fig.8A-Fig.8C là đồ thị thể hiện kết quả đánh giá hoạt tính điều trị của bào giết tự nhiên, đã được phân phối ty thể có nguồn gốc từ tế bào gốc trung mô dây rốn trên mô hình chuột nhất thử nghiệm bị bệnh bạch cầu tủy cấp, theo trọng lượng cơ thể và tỷ lệ sống sót của các chuột nhất thử nghiệm.

Fig.9 là hình ảnh thể hiện kết quả đánh giá mức độ phân bố biểu hiện của các chất chỉ thị khối u máu trên mô hình chuột nhất thử nghiệm bị bệnh bạch cầu tủy cấp được sử dụng tế bào giết tự nhiên đã được phân phối ty thể có nguồn gốc từ tế bào gốc trung mô dây rốn.

Fig.10 là biểu đồ thể hiện kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của tế bào đơn nhân máu ngoại vi đã được phân phối ty thể ngoại sinh bằng thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào K562

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến tế bào giết tự nhiên chứa nhiều ty thể ngoại sinh.

Thuật ngữ “ty thể ngoại sinh” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ ty thể được đưa từ nguồn ngoại sinh vào tế bào chứ không phải ty thể có mặt trong tế bào giết tự nhiên. Theo sáng chế, ty thể ngoại sinh có thể được thu nhận từ cùng đối tượng để thu nhận tế bào giết tự nhiên, nhưng có thể được thu nhận từ một đối tượng khác. Theo sáng chế, ty thể ngoại sinh có thể được thu nhận từ động vật có vú, và tốt hơn nếu có thể được thu nhận từ người. Ví dụ ty thể ngoại sinh có thể được thu nhận từ tế bào cơ, tế bào gan, nguyên bào sợi, tế bào biểu mô, neuron tế bào thần kinh, tế bào tạo mỡ, tế bào xương, bạch cầu, tế bào lympho, hoặc tế bào niêm mạc, và tốt hơn nếu có thể được thu nhận từ tế bào cơ có hoạt tính ty thể rất cao. Ngoài ra, ty thể có thể được thu nhận từ các tế bào được nuôi cấy *ex vivo*.

Mặt khác, ty thể ngoại sinh có thể thu được bằng cách phá vỡ các tế bào và thực hiện bước ly tâm, hoặc bằng cách nuôi cấy các tế bào, phá vỡ các tế bào, và thực hiện bước ly tâm. Để thu nhận ty thể, phương pháp thông thường được sử dụng để thu nhận cơ quan có thể được sử dụng.

Theo sáng chế, tế bào giết tự nhiên chứa ty thể ngoại sinh có thể được thu nhận bằng cách phân phối ty thể ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 500 μ g, nằm trong khoảng từ 0,1 đến 450 μ g, nằm trong khoảng từ 0,5 đến 300 μ g, nằm trong khoảng từ 1 đến 100 μ g, hoặc nằm trong khoảng từ 2 đến 10 μ g, tính trên 10^5 tế bào giết tự nhiên. Theo sáng chế, tế bào giết tự nhiên có thể chứa 1 đến 10^3 hoặc 10 đến 10^2 ty thể ngoại sinh. Cụ thể, số lượng của ty thể ngoại sinh có thể bằng khoảng 1, 10, 100, hoặc 500 ty thể ngoại sinh được chứa trong một tế bào giết tự nhiên. Theo sáng chế, số lượng của ty thể ngoại sinh được chứa trong tế bào giết tự nhiên có thể được điều chỉnh bằng cách kiểm soát hàm lượng của ty thể ngoại sinh được phân phối vào tế bào giết tự nhiên. Mỗi tế bào giết tự nhiên theo sáng chế có thể chứa số lượng khác nhau của ty thể ngoại sinh.

Ngoài ra, các tế bào giết tự nhiên có thể là có nguồn gốc từ động vật có vú hoặc người. Tốt hơn nếu, các tế bào giết tự nhiên có thể được thu nhận từ đối tượng cần điều trị bằng liệu pháp tế bào giết tự nhiên. Theo sáng chế, các tế bào giết tự nhiên có thể được

phân lập trực tiếp từ máu của đối tượng và sử dụng, hoặc có thể được thu nhận bằng cách biệt hóa tế bào giết tự nhiên chưa trưởng thành hoặc tế bào gốc thu được từ đối tượng và sử dụng.

Đồng thời, để phân phối ty thể ngoại sinh vào tế bào giết tự nhiên, ty thể ngoại sinh và tế bào giết tự nhiên có thể được trộn, sau đó hỗn hợp thu được có thể được xử lý bằng bước ly tâm sao cho ty thể được phân phối hữu hiệu vào các tế bào giết tự nhiên. Điều kiện ở thời điểm thực hiện bước ly tâm có thể được điều chỉnh thích hợp để phân phối hữu hiệu ty thể mà không gây tổn thương tế bào. Theo sáng chế, bước ly tâm có thể được thực hiện ở nhiệt độ phòng, và điều kiện nhiệt độ có thể được chọn thích hợp theo độ ổn định của tế bào. Theo sáng chế, ở thời điểm phân phối ty thể ngoại sinh, các tế bào giết tự nhiên và ty thể ngoại sinh có thể được trộn trong sự có mặt của chất hoạt động bề mặt so để tăng khả năng thấm màng tế bào của ty thể ngoại sinh vào các tế bào giết tự nhiên, nhờ đó làm tăng hiệu suất phân phối ty thể ngoại sinh.

Theo sáng chế, bước ly tâm có thể được thực hiện ở tốc độ bawngd 100 x g, 300 x g, 500 x g, 800 x g, 1000 x g, 1200 x g, 1500 x g, 1,800 x g, 2000 x g, 2400 x g, 3000 x g, 5000 x g, hoặc 10000 x g. Ngoài ra, thời gian ly tâm có thể nằm trong khoảng từ 0,1 phút đến 60 phút, nhưng không chỉ giới hạn ở khoảng trị số này. Cụ thể, thời gian ly tâm có thể bằng 1 phút, 2 phút, 3 phút, 5 phút, 10 phút, 20 phút, hoặc 30 phút. Ngoài ra, bước ly tâm có thể được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 40°C, nằm trong khoảng từ 20°C đến 38°C, hoặc nằm trong khoảng từ 30°C đến 37°C.

Do đó, bằng cách tác động lực ly tâm vào cả các tế bào giết tự nhiên và ty thể ngoại sinh, ty thể có thể được phân phối vào các tế bào giết tự nhiên với hiệu suất cao đồng thời ít gây tổn thương cho các tế bào giết tự nhiên.

Ngoài ra, chất hoạt động bề mặt có thể được sử dụng để tăng cường khả năng thấm màng tế bào của ty thể ngoại sinh vào các tế bào giết tự nhiên. Thời điểm ở đó chất hoạt động bề mặt được bổ sung có thể là trước, trong, hoặc sau khi trộn các tế bào giết tự nhiên với ty thể ngoại sinh. Ngoài ra, sau khi chất hoạt động bề mặt được bổ sung vào các tế bào giết tự nhiên, các tế bào giết tự nhiên có thể được ủ trong khoảng thời gian nhất định để tăng cường đặc tính thấm màng tế bào của ty thể ngoại sinh vào các tế bào giết tự nhiên. Thời gian ủ có thể nằm trong khoảng từ 0,1 đến 60 phút. Cụ thể, thời gian để thực hiện bước ủ có thể bằng 1 phút, 5 phút, 10 phút, 20 phút, hoặc 30 phút, nhưng

không chỉ giới hạn ở.

Cụ thể, tốt hơn nếu chất hoạt động bề mặt là chất hoạt động bề mặt dạng không ion, và có thể là poloxame. Theo sáng chế, poloxame là copolyme ba khối bao gồm chuỗi polyoxypropylen kỵ nước trung tâm được giới hạn hai đầu bằng hai chuỗi polyoxyetylen thân nước. Ngoài ra, chất hoạt động bề mặt trong hỗn hợp có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/mL, nằm trong khoảng từ 3 đến 80mg/mL, hoặc nằm trong khoảng từ 5 đến 40mg/mL, và có thể là tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 10 đến 30mg/mL.

Ngoài ra, phương pháp theo sáng chế có thể còn bao gồm bước ủ hỗn hợp thu được trong điều kiện nhiệt độ và thời gian xác định trước. Bước ủ có thể được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 40°C, nằm trong khoảng từ 20°C đến 38°C, hoặc nằm trong khoảng từ 30°C đến 37°C. Ngoài ra, bước ủ có thể được thực hiện trong thời gian từ 0,1 đến 4 giờ, từ 0,5 đến 3,8 giờ, hoặc từ 0,8 đến 3,5 giờ. Ngoài ra, bước ủ có thể được thực hiện trong thời gian xác định trước sau khi bước ly tâm được thực hiện để phân phối ty thể ngoại sinh vào các tế bào giết tự nhiên. Ngoài ra, thời gian để thực hiện bước ủ có thể được chọn thích hợp phụ thuộc vào loại tế bào và lượng ty thể.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm để điều trị bệnh ung thư hoặc bệnh lây nhiễm, chứa hoạt chất là tế bào giết tự nhiên chứa ty thể ngoại sinh.

Theo sáng chế, bệnh ung thư có thể là tế bào bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư thanh quản, bệnh bạch cầu tủy cấp, khối u não, u nguyên bào thần kinh, u nguyên bào vồng mạc, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư tuyến nước bọt, và u lympho. Ngoài ra, bệnh lây nhiễm có thể là tế bào bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm bệnh lây nhiễm virus viêm gan B, bệnh lây nhiễm virus viêm gan C, bệnh lây nhiễm virus gây u nhú ở người, bệnh lây nhiễm virus cytomegalo, bệnh lây nhiễm virus đường hô hấp, và bệnh lây nhiễm virus cúm.

Ngoài ra, dược phẩm có thể được bào chế ở dạng lỏng hoặc dạng lạnh đông. Ngay cả khi được rã đông một lần nữa sau khi lạnh đông, dược phẩm có chức năng tế bào không bị suy giảm và có thể duy trì khả năng sống sót tế bào cao và khả năng tiêu diệt tế

bào cao. Do đó, dược phẩm có thể dễ dàng được bảo quản và phân phối ở dạng bảo quản lỏng hoặc lạnh đông mà không cần xử lý bổ sung.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh, bao gồm bước sử dụng dược phẩm chứa hoạt chất là tế bào giết tự nhiên ty thể ngoại sinh cho đối tượng.

Phương pháp này bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu của tế bào giết tự nhiên theo sáng chế cho đối tượng bị bệnh hoặc đối tượng có nguy cơ bị bệnh. Ví dụ tế bào đã được phân phối ty thể ngoại sinh có thể được sử dụng cho đối tượng, tốt hơn nếu động vật có vú, dưới dạng dược phẩm. Tế bào có thể được sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da. Khi dược phẩm theo sáng chế được bào chế để sử dụng ngoài đường tiêu hóa, như qua đường tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da, qua đường mắt, tiêm màng bụng, hoặc tiêm bắp, tốt hơn nếu dược phẩm theo sáng chế được bào chế ở dạng chứa nước, hoặc tốt hơn nếu dược phẩm theo sáng chế chứa dịch cơ thể sinh lý, hỗn dịch, hoặc dung dịch. Do đó, chất mang hoặc chất dẫn dược dụng có thể được bổ sung vào dược phẩm theo sáng chế và phân phối vào đối tượng bị bệnh. Chất mang hoặc chất dẫn này không ảnh hưởng quá mức đến khả năng điện giải của đối tượng bị bệnh. Do đó, dung dịch nước muối sinh lý có thể được sử dụng làm chất mang để bào chế.

Phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh bằng cách sử dụng tế bào theo sáng chế cũng có thể bao gồm bước sử dụng dược chất hoặc hoạt chất khác có hoạt tính phòng ngừa hoặc điều trị bệnh, kết hợp với tế bào theo sáng chế. Đường đưa thuốc, thời gian, và liều để sử dụng kết hợp có thể được xác định phụ thuộc vào loại bệnh, đối tượng bị bệnh's bệnh state, mục đích điều trị hoặc phòng ngừa, và dược chất hoặc hoạt chất khác được sử dụng kết hợp.

Ngoài ra, bệnh có thể là bệnh ung thư hoặc bệnh lây nhiễm. Theo sáng chế, bệnh ung thư có thể là được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư thanh quản, bệnh bạch cầu tủy cấp, khối u não, u nguyên bào thần kinh, u nguyên bào võng mạc, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư tuyến nước bọt, và u lympho. Bệnh lây nhiễm có thể là tế bào bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm bệnh lây nhiễm virus viêm gan B, bệnh lây nhiễm virus viêm gan C, bệnh lây nhiễm virus gây u nhú ở người, bệnh lây nhiễm virus cytomegalo, bệnh lây nhiễm virus

đường hô hấp, và bệnh lây nhiễm virus cúm.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào đơn nhân máu ngoại vi chứa ty thể ngoại sinh.

Thuật ngữ “tế bào đơn nhân máu ngoại vi” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ tế bào có nhân hình cầu có mặt trong máu ngoại vi. Tế bào đơn nhân máu ngoại vi có thể bao gồm tế bào miễn dịch, như tế bào B, tế bào T, đại thực bào, tế bào đuôi gai, và tế bào giết tự nhiên. Tế bào đơn nhân máu ngoại vi có thể được thu nhận từ máu của đối tượng. Theo sáng chế, ty thể ngoại sinh có thể được thu nhận từ mô hoặc tế bào của đối tượng như mô tả nêu trên.

Theo sáng chế, tế bào đơn nhân máu ngoại vi chứa ty thể ngoại sinh có thể được thu nhận bằng cách phân phối ty thể ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 500 μ g, nằm trong khoảng từ 0,1 đến 450 μ g, nằm trong khoảng từ 0,5 đến 300 μ g, nằm trong khoảng từ 1 đến 100 μ g, hoặc nằm trong khoảng từ 2 đến 10 μ g, tính trên 10^5 tế bào đơn nhân máu ngoại vi. Theo sáng chế, ty thể ngoại sinh có thể được chứa ở lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 10^3 hoặc 10 đến 100/tế bào đơn nhân máu ngoại vi. Ngoài ra, phương pháp phân phối ty thể ngoại sinh vào tế bào đơn nhân máu ngoại vi có thể được thực hiện bằng bước ly tâm như mô tả nêu trên. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến được phẩm để điều trị bệnh ung thư hoặc bệnh lây nhiễm, chứa hoạt chất là tế bào đơn nhân máu ngoại vi chứa ty thể ngoại sinh.

Theo sáng chế, như mô tả nêu trên, bệnh ung thư có thể là được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư thanh quản, bệnh bạch cầu tủy cấp, khối u não, u nguyên bào thần kinh, u nguyên bào vồng mạc, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư tuyến nước bọt, và u lympho. Ngoài ra, bệnh lây nhiễm có thể là tế bào bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm bệnh lây nhiễm virus viêm gan B, bệnh lây nhiễm virus viêm gan C, bệnh lây nhiễm virus gây u nhú ở người, bệnh lây nhiễm virus cytomegalo, bệnh lây nhiễm virus đường hô hấp, và bệnh lây nhiễm virus cúm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ sau. Tuy nhiên, các ví dụ

này chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế.

I. Sản xuất tế bào giết tự nhiên đã được phân phối ty thể ngoại sinh, và xác định chức năng của nó

Ví dụ 1. Sản xuất tế bào giết tự nhiên đã được phân phối ty thể ngoại sinh

Tế bào gan bình thường của người (WRL-68) (CRL 1458, ATCC) được tạo mầm trong môi trường DMEM có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (FBS; Gibco), 100µg/mL streptomycin, và 100U/mL ampicillin và nuôi cấy trong 72 giờ. Sau khi kết thúc nuôi cấy, các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch muối đệm phosphat Dulbecco (DPBS; Gibco). Các tế bào đã được rửa được xử lý bằng trypsin-EDTA 0,25% (TE; Gibco) để thu được các tế bào. Đối với các tế bào thu được, để chiết tách ty thể, máy đếm huyết cầu được sử dụng để đo số lượng tế bào, và các tế bào ở mật độ khoảng 3×10^6 tế bào/mL được thu nhận.

Sau đó, dòng tế bào được xử lý bằng bước ly tâm thứ nhất ở nhiệt độ khoảng 4°C trong 10 phút ở tốc độ bằng 350 x g. Hạt thu được được thu nhận, và tạo hỗn dịch lại và đồng nhất hóa trong dung dịch đệm trong 10 đến 15 phút. Hỗn hợp chứa hạt thu được được xử lý bằng bước ly tâm thứ hai ở nhiệt độ khoảng 4°C trong 3 phút ở tốc độ nằm trong khoảng từ 1,100 x g, để thu được dịch nổi. Sau đó, dịch nổi được xử lý bằng bước ly tâm thứ ba ở nhiệt độ khoảng 4°C trong 15 phút ở tốc độ bằng 12000 x g, để phân lập ty thể từ dòng tế bào.

Ty thể được phân lập được tiêm ở hàm lượng bằng 1×10^5 , vào ống thử nghiệm chứa các tế bào giết tự nhiên riêng biệt của người (NK92mi) (CRL2408; ATCC), và ly tâm ở nhiệt độ khoảng 4°C trong 15 phút ở tốc độ bằng 2500 x g. Sau khi loại bỏ dịch nổi, bước rửa bằng PBS được thực hiện và bước ly tâm được thực hiện ở nhiệt độ khoảng 4°C trong thời gian 5 phút. Bước rửa được thực hiện hai lần trong cùng điều kiện. Theo sáng chế, ty thể được phân lập được phân phối ở lượng bằng 0,05µg, 0,05µg, 0,5µg, và 5µg, tính trên 1×10^5 tế bào thể nhận.

Ví dụ 2. Xác định tỷ lệ phân phối của ty thể có nguồn gốc từ tế bào gan bình thường của người (WRL68) vào tế bào giết tự nhiên (phương pháp phân tích PCR)

Kit tinh chế ADN (NucleoSpin; MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) được sử dụng để chiết tách toàn bộ gen từ tế bào giết tự nhiên được thu nhận theo ví dụ 1.

ADN được chiết tách được trộn tương ứng với các đoạn môi đặc hiệu ty thể WRL-68 (F: 5'-CTA TTC TCT GTT CTT TCA TGG-3' (SEQ ID NO.1), R: 5'-AAG TAT TTA TGG TAC CGT ACG-3' (SEQ ID NO.2)). Sau đó, hỗn hợp phản ứng Master PCR 2X (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) và nước cất ba lần được bổ sung vào sao cho tổng thể tích của hỗn hợp thu được bằng 10 μ L, và thiết bị phản ứng PCR chu trình nhiệt 96 giếng Veriti (Applied Biosystems) được sử dụng để khuếch đại đoạn ADN mong muốn.

Phản ứng PCR được thực hiện để thu được ADN được khuếch đại. Để xác định ADN được khuếch đại, phân tích điện di trên gel agarosa 1,5% được thực hiện, sau đó nhuộm bằng Loading Star (DYNEBIO INC., Seongnam, Korea) được thực hiện. Thiết bị quang phổ UV (Chemi-Doc XRS; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) được sử dụng để xác định các băng ADN được khuếch đại. GAPDH được chọn làm gen cấu trúc duy trì chức năng tế bào. Để thực hiện bước này, các đoạn môi (F- 5'-GGA AGG TGA AGG TCG GAG-3' (SEQ ID NO.3), R- 5'-GGC AAC AAT ATC CAC TTT ACC-3' (SEQ ID NO.4)) có khả năng khuếch đại GAPDH được sử dụng. Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Fig.1.

Kết quả thử nghiệm trên Fig.1 cho thấy hàm lượng của ty thể ngoại sinh được phân phối vào các tế bào giết tự nhiên được gia tăng khi các lượng (0,005 μ g, 0,05 μ g, 0,5 μ g, và 5 μ g) của ty thể được trộn với các tế bào giết tự nhiên được gia tăng.

Ví dụ 3. Xác định tỷ lệ phân phối của ty thể có nguồn gốc từ tế bào gan bình thường của người (WRL68) vào tế bào giết tự nhiên (phương pháp phân tích FACS)

Phương pháp phân tích sàng lọc tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS) được thực hiện để xác định xem ty thể có nguồn gốc từ tế bào gan bình thường của người đã được phân phối vào tế bào giết tự nhiên hay chưa. Ty thể được phân lập từ tế bào gan bình thường của người được xử lý với mẫu dò màu xanh mitotracker (500nM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Hỗn hợp thu được được để phản ứng trong 10 phút trong tủ nuôi cấy trong điều kiện 5% CO₂ ở nhiệt độ 37°C, và rửa. Ty thể có nguồn gốc từ tế bào gan được đánh dấu huỳnh quang được phân phối vào tế bào miễn dịch bằng cách sử dụng phương pháp ly tâm, sau đó tế bào miễn dịch được tạo hỗn dịch lại trong PBS (1mL). Sau đó, phân phối ty thể được xác định và phân tích bằng cách sử dụng thiết bị đếm tế bào theo dòng chảy FACS Calibur (BDBiosciences, San Jose, CA, USA). Kết quả

thử nghiệm được thể hiện trên Fig.2.

Kết quả thử nghiệm trên Fig.2 cho thấy các tế bào giết tự nhiên có thể được phân biệt phụ thuộc vào các lượng (0,005 μ g, 0,05 μ g, 0,5 μ g, và 5 μ g) của ty thể được phân phối vào các tế bào giết tự nhiên.

Ví dụ 4. Xác định tỷ lệ phân phối của ty thể có nguồn gốc từ tế bào gan bình thường của người (WRL68) vào tế bào giết tự nhiên (quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang)

Để xác định xem ty thể có nguồn gốc từ tế bào gan bình thường của người (WRL68) đã được phân phối vào tế bào giết tự nhiên của người (NK92mi) hay chưa, ty thể của các tế bào giết tự nhiên này được xử lý với mẫu dò màu xanh mitotracker (500nM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), và để phản ứng trong 10 phút trong tủ nuôi cấy trong điều kiện 5% CO₂ ở nhiệt độ 37°C. Ty thể được phân lập của tế bào gan được xử lý với mẫu dò màu đỏ mitotracker (500nM). Hỗn hợp thu được được để phản ứng trong 10 phút trong tủ nuôi cấy trong điều kiện 5% CO₂ ở nhiệt độ 37°C, sau đó được phân phối vào tế bào giết tự nhiên. Sau khi ty thể (5 μ g) được phân phối, hỗn hợp thu được được tạo mầm trong đĩa 24 giếng và ủ trong tủ nuôi cấy trong điều kiện 5% CO₂ ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, kính hiển vi huỳnh quang được sử dụng để xác định ty thể được phân phối nội bào trong vòng 24 giờ. Chất phản ứng DAPI để nhuộm nhân tế bào được sử dụng chất phản ứng nhuộm đối chứng. Các kết quả được thể hiện trên Fig.3.

Kết quả thử nghiệm trên Fig.3 cho thấy ty thể ngoại sinh đã được phân phối vào các tế bào giết tự nhiên.

Ví dụ 5. Phân tích các thay đổi về hoạt tính chống bệnh ung thư của tế bào giết tự nhiên đã được phân phối ty thể (thử nghiệm mất hạt CD107a)

Trong tế bào giết tự nhiên của người (NK92mi) được thu nhận theo ví dụ 1, đã được phân phối ty thể ngoại sinh, để xác định mức độ biểu hiện CD107a do mất hạt là chất chỉ thị cho hoạt tính của tế bào giết tự nhiên, tế bào giết tự nhiên của người và tế bào đích cần tiêu diệt (K562) được trộn ở tỷ lệ bằng 10:1, sau đó hỗn hợp thu được được xử lý với kháng thể kháng CD107a được liên hợp với chất huỳnh quang. Hỗn hợp thu được được ủ đồng thời trong 4 giờ. Sau khi ủ đồng thời, hỗn hợp thu được được xử lý với kháng thể kháng CD56 để nhuộm bề mặt và để phản ứng trong 30 phút. Sau đó, phương pháp phân tích sàng lọc tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS) được thực hiện. Các

kết quả được thể hiện trên Fig.4A và Fig.4B.

Kết quả thử nghiệm trên Fig.4A và Fig.4B cho thấy hoạt tính kháng bệnh ung thư của các tế bào giết tự nhiên được gia tăng với các lượng (0,05µg, 0,5µg, và 5µg) của ty thể ngoại sinh.

Ví dụ 6: Xác định các thay đổi về hoạt tính kháng bệnh ung thư của tế bào giết tự nhiên đã được phân phối ty thể (thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào K562)

Để xác định hoạt tính kháng bệnh ung thư của các tế bào giết tự nhiên được thu nhận theo ví dụ 1, tế bào giết tự nhiên được thu nhận được trộn ở tỷ lệ bằng 10:1, với tế bào đích cần tiêu diệt (K562) được đánh dấu bằng chất nhuộm huỳnh quang màu xanh (CFSE; Invitrogen), sau đó hỗn hợp thu được được ủ đồng thời trong 4 giờ trong tủ nuôi cấy ở điều kiện 5% CO₂ ở nhiệt độ 37°C. Sau khi ủ đồng thời, để phân tích các tế bào đích bị tiêu diệt bởi các tế bào giết tự nhiên, hỗn hợp thu được được xử lý với chất nhuộm huỳnh quang màu đỏ (7-AAD; Invitrogen), sau đó để phản ứng trong 10 phút. Mật độ huỳnh quang của các tế bào đích bị tiêu diệt được phân tích bằng phương pháp phân tích sàng lọc tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS). Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Fig.5.

Kết quả thử nghiệm trên Fig.5 cho thấy hoạt tính gây độc tế bào K562 được gia tăng với các lượng (0,05µg, 0,5µg, và 5µg) của ty thể ngoại sinh được phân phối.

Ví dụ 7. Sản xuất tế bào giết tự nhiên đã được phân phối ty thể của tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ dây rốn

Tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ dây rốn (do CHA bundang medical center cung cấp, IRB No. 1044308-201511-BR-022-02) được tạo mầm trong môi trường Alpha-MEM có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (FBS; Gibco), 100µg/mL streptomycin, và 100U/mL ampicillin, và nuôi cấy trong 72 giờ.

Sau khi kết thúc nuôi cấy, các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch muối đệm phosphat Dulbecco (DPBS; Gibco). Các tế bào đã được rửa được xử lý bằng trypsin-EDTA 0,25% (TE; Gibco) để thu được các tế bào. Đối với các tế bào thu được, để chiết tách ty thể, máy đếm huyết cầu được sử dụng để đo số lượng tế bào, và các tế bào ở mật độ khoảng 2×10^7 tế bào/mL được thu nhận.

Sau đó, dòng tế bào được xử lý bằng bước ly tâm thứ nhất ở nhiệt độ khoảng 4°C

trong 10 phút ở tốc độ bằng 350 x g. Hạt thu được được thu nhận, và tạo hỗn dịch lại và đồng nhất hóa trong dung dịch đệm trong 10 đến 15 phút. Hỗn hợp chứa hạt thu được được xử lý bằng bước ly tâm thứ hai ở nhiệt độ khoảng 4°C trong 3 phút ở tốc độ nằm trong khoảng từ 1,100 x g, để thu được dịch nổi. Sau đó, dịch nổi được xử lý bằng bước ly tâm thứ ba ở nhiệt độ khoảng 4°C trong 15 phút ở tốc độ bằng 12000 x g, để phân lập ty thể từ dòng tế bào.

Ty thể được phân lập được tiêm ở hàm lượng bằng 1×10^5 , vào ống thử nghiệm chứa các tế bào giết tự nhiên riêng biệt của người (NK92mi) (CRL2408; ATCC), và ly tâm ở nhiệt độ khoảng 4°C trong 15 phút ở tốc độ bằng $2500 \times g$. Sau khi loại bỏ dịch nổi, bước rửa bằng PBS được thực hiện và bước ly tâm được thực hiện ở nhiệt độ khoảng 4°C trong thời gian 5 phút. Bước rửa được thực hiện hai lần trong cùng điều kiện. Theo sáng chế, ty thể được phân lập được phân phối ở lượng bằng 0,3µg, 1µg, 3µg, 5µg, và 10µg, tính trên 1×10^5 tế bào thể nhận.

Ví dụ 8. Xác định tỷ lệ phân phối của ty thể của tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ dây rốn (UC-MSC) vào tế bào giết tự nhiên (phương pháp phân tích FACS)

Phương pháp phân tích sàng lọc tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS) được thực hiện để xác định xem ty thể có nguồn gốc từ tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ dây rốn đã được phân phối vào tế bào giết tự nhiên hay chưa. Ty thể được phân lập từ tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ dây rốn được xử lý với mẫu dò màu đỏ mitotracker (500nM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Hỗn hợp thu được được để phản ứng trong 30 phút trong tủ nuôi cấy trong điều kiện 5% CO₂ ở nhiệt độ 37°C và rửa. Ty thể được đánh dấu huỳnh quang của tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ dây rốn được phân phối vào tế bào miễn dịch bằng cách sử dụng phương pháp ly tâm, sau đó các tế bào được tạo hỗn dịch lại trong PBS (1mL). Sau đó, phân phối ty thể được xác định và phân tích bằng cách sử dụng thiết bị đếm tế bào theo dòng chảy FACS Calibur (BDBiosciences, San Jose, CA, USA). Các kết quả được thể hiện trên Fig.6.

Kết quả thử nghiệm trên Fig.6 cho thấy các tế bào giết tự nhiên có thể được phân biệt với các lượng (0,3µg, 1µg, 3µg, 5µg, và 10µg) của ty thể của tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ dây rốn đã được phân phối vào các tế bào giết tự nhiên.

Ví dụ 9. Xác định các thay đổi về hoạt tính kháng bệnh ung thư của tế bào giết tự nhiên đã được phân phối ty thể có nguồn gốc từ tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ dây

rôn (UC-MSK) (thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào K562)

Để xác định hoạt tính kháng bệnh ung thư của các tế bào giết tự nhiên được thu nhận theo ví dụ 7, tế bào giết tự nhiên được thu nhận được trộn ở tỷ lệ bằng 10:1, với tế bào đích cần tiêu diệt (K562) được đánh dấu bằng chất nhuộm huỳnh quang màu xanh (CFSE; Invitrogen), sau đó hỗn hợp thu được được ủ đồng thời trong 4 giờ trong tủ nuôi cấy ở điều kiện 5% CO₂ ở nhiệt độ 37°C. Sau khi ủ đồng thời, để phân tích các tế bào đích bị tiêu diệt bởi các tế bào giết tự nhiên, hỗn hợp thu được được xử lý với chất nhuộm huỳnh quang màu đỏ (7-AAD; Invitrogen), và để phản ứng trong 10 phút. Mật độ huỳnh quang của các tế bào đích bị tiêu diệt được phân tích bằng phương pháp phân tích sàng lọc tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS). Các kết quả được thể hiện trên Fig.7.

Kết quả thử nghiệm trên Fig.7 cho thấy hoạt tính gây độc tế bào K562 được gia tăng với các lượng (0,5µg, 1µg, 3µg, 5µg, và 10µg) của ty thể ngoại sinh được phân phối.

Ví dụ 10. Xác định hoạt tính điều trị bệnh bạch cầu tủy cấp thông qua mức độ thay đổi trọng lượng cơ thể và tỷ lệ sống sót

Các chuột nhắt đực NOD.cg-Prkdcscid IL2rgtm1Sug/JicKoat từ 6 đến 8 tuần tuổi do Koatech Co., Ltd. (Gyeonggi-do, Korea) cung cấp được trải qua thời gian thích nghi trong khu vực sạch của trung tâm động vật thử nghiệm tại CHA University, sau đó thử nghiệm được thực hiện. Trong thời gian thích nghi, các chuột nhắt thử nghiệm được nuôi trong môi trường ở điều kiện 12 giờ chiếu sáng và 12 giờ trong bóng tối, và duy trì ở nhiệt độ phòng bằng 23 ± 2°C và độ ẩm nằm trong khoảng từ 40% đến 60%. Các chuột nhắt thử nghiệm được để thích ứng trong thời gian 7 ngày, sau đó được vào thử nghiệm. Sau đó các chuột nhắt thử nghiệm được tiêm qua đường tĩnh mạch đuôi với tế bào K562 ở mật độ bằng 2 × 10⁵ tế bào/100µL, để thu được các chuột nhắt thử nghiệm bị bệnh bạch cầu tủy cấp.

Theo sáng chế, các chuột nhắt thử nghiệm bị bệnh bạch cầu tủy cấp nêu trên được tiêm qua đường tĩnh mạch đuôi với các tế bào giết tự nhiên (NK92mi) được sản xuất theo ví dụ 7 ở mật độ bằng 2 × 10⁶ tế bào/100µL, để thu được nhóm thử nghiệm. Theo cách thức tương tự, nhóm đối chứng được tạo ra bằng cách tiêm qua đường tĩnh mạch đuôi với tế bào giết tự nhiên bình thường (NK92mi), không được phân phối ty thể, ở mật độ bằng 2 × 10⁶ tế bào/100µL. Mức độ thay đổi trọng lượng cơ thể và tỷ lệ sống sót của nhóm thử nghiệm và nhóm đối chứng được phân tích trong 24 ngày từ thời điểm tiêm dòng tế bào

bệnh bạch cầu tủy cấp (K562). Các kết quả được thể hiện trên Fig.8A-Fig.8C.

Kết quả thử nghiệm trên Fig.8A-Fig.8C cho thấy nhóm được tiêm với các tế bào giết tự nhiên đã được phân phối ty thể của tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ dây rốn, có mức độ gia tăng trọng lượng cơ thể khoảng 5% và mức độ gia tăng tỷ lệ sống sót khoảng 40% hoặc cao hơn, so với nhóm được tiêm với tế bào giết tự nhiên bình thường không được phân phối ty thể của tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ dây rốn.

Ví dụ 11. Xác định hoạt tính điều trị bệnh bạch cầu tủy cấp bằng phương pháp phân tích các chất chỉ thị đặc hiệu khối u

Để xác định mức độ phân bố biểu hiện của các chất chỉ thị đặc hiệu khối u, tức là p53 và c-Myc, máu của nhóm thử nghiệm và nhóm đối chứng đã được thử nghiệm theo ví dụ 10 được thu nhận, sau đó ly tâm ở tốc độ bằng 12000 x g trong 15 phút để phân lập huyết thanh. Huyết thanh được phân lập được phân tích mức độ phân bố biểu hiện của p53 và c-Myc bằng cách sử dụng kit thăm tách Western (WB; Bio-Rad Laboratories, Inc.). Các kết quả được thể hiện trên Fig.9.

Kết quả thử nghiệm trên Fig.9 cho thấy nhóm được tiêm với các tế bào giết tự nhiên đã được phân phối ty thể của tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ dây rốn, có mức độ biểu hiện của c-Myc giảm và mức độ biểu hiện của p53 tăng, c-Myc và p53 là các chất chỉ thị đặc hiệu khối u máu.

II. Sản xuất tế bào đơn nhân máu ngoại vi đã được phân phối ty thể ngoại sinh và xác định chức năng của nó

Ví dụ 12. Sản xuất tế bào đơn nhân máu ngoại vi đã được phân phối ty thể ngoại sinh

Máu ngoại vi của tác giả sáng chế được lấy bởi bác sĩ lâm sàng (tại CHA medical center) được xử lý với Ficoll-Paque (Amersham Biosciences) ở tỷ lệ bằng 1:1 trong ống Falcon, sau đó hỗn hợp thu được được ly tâm ở 400 x g trong 35 phút, để thu được hạt tế bào đơn nhân máu ngoại vi. Tế bào đơn nhân máu ngoại vi thu được được rửa hai lần bằng PBS. Sau đó, ty thể có nguồn gốc từ tế bào gan bình thường của người (WRL68) đã được phân lập theo ví dụ 1 được phân phối vào tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở lượng bằng 0,05µg, 0,05µg, 0,5µg, và 5µg, tính trên 1×10^5 tế bào thể nhận.

Ví dụ 13. Xác định các thay đổi về hoạt tính kháng bệnh ung thư của tế bào đơn

nhân máu ngoại vi đã được phân phối ty thể (thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào K562)

Để xác định hoạt tính kháng bệnh ung thư của tế bào đơn nhân máu ngoại vi được thu nhận theo ví dụ 12, tế bào đơn nhân máu ngoại vi thu được được trộn ở tỷ lệ bằng 10:1, với tế bào đích cần tiêu diệt (K562) được đánh dấu bằng chất nhuộm huỳnh quang màu xanh (CFSE; Invitrogen), sau đó hỗn hợp thu được được ủ đồng thời trong 4 giờ trong tủ nuôi cấy ở điều kiện 5% CO₂ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 37°C. Sau khi ủ đồng thời, để phân tích các tế bào đích bị tiêu diệt bởi các tế bào giết tự nhiên, hỗn hợp thu được được xử lý với chất nhuộm huỳnh quang màu đỏ (7-AAD; Invitrogen), sau đó để phản ứng trong 10 phút. Mật độ huỳnh quang của các tế bào đích bị tiêu diệt được phân tích bằng phương pháp phân tích sàng lọc tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS). Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Fig.10.

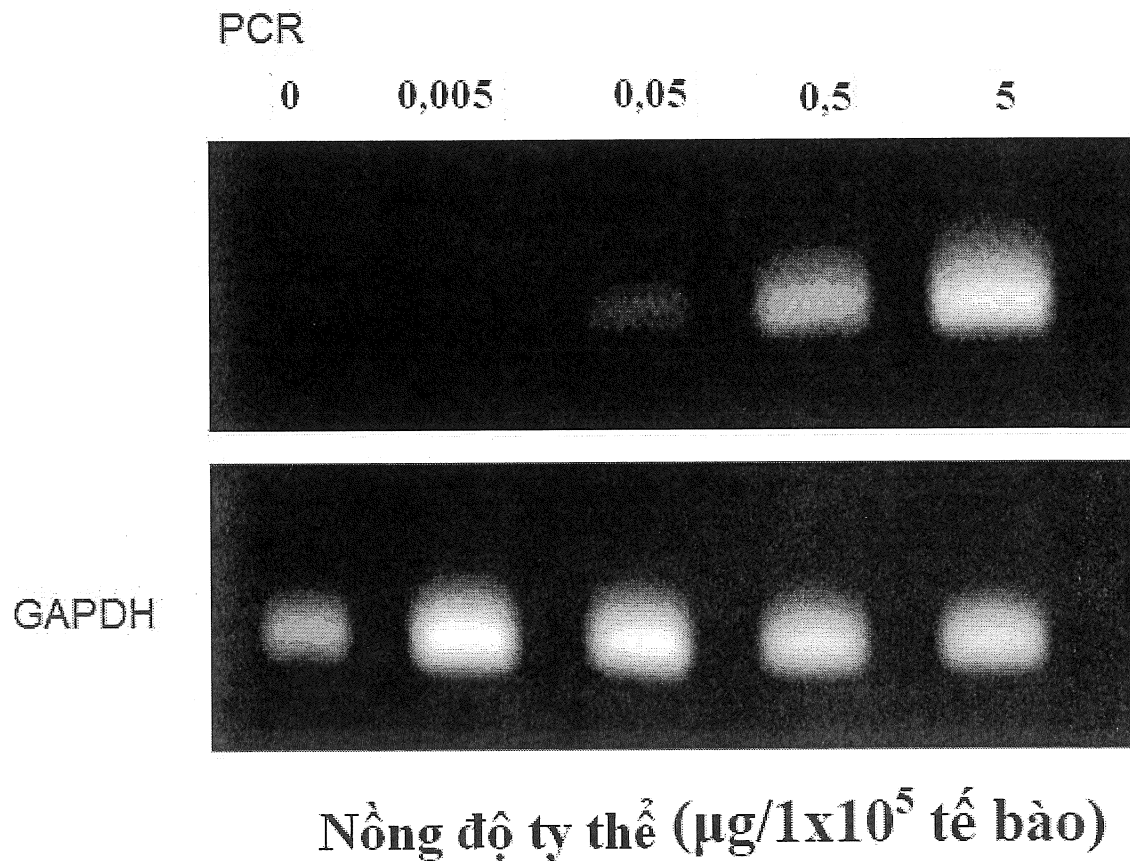
Kết quả thử nghiệm trên Fig.10 cho thấy hoạt tính gây độc tế bào K562 được gia tăng với các lượng (0,005µg, 0,05µg, và 0,5µg) của ty thể ngoại sinh được phân phối.

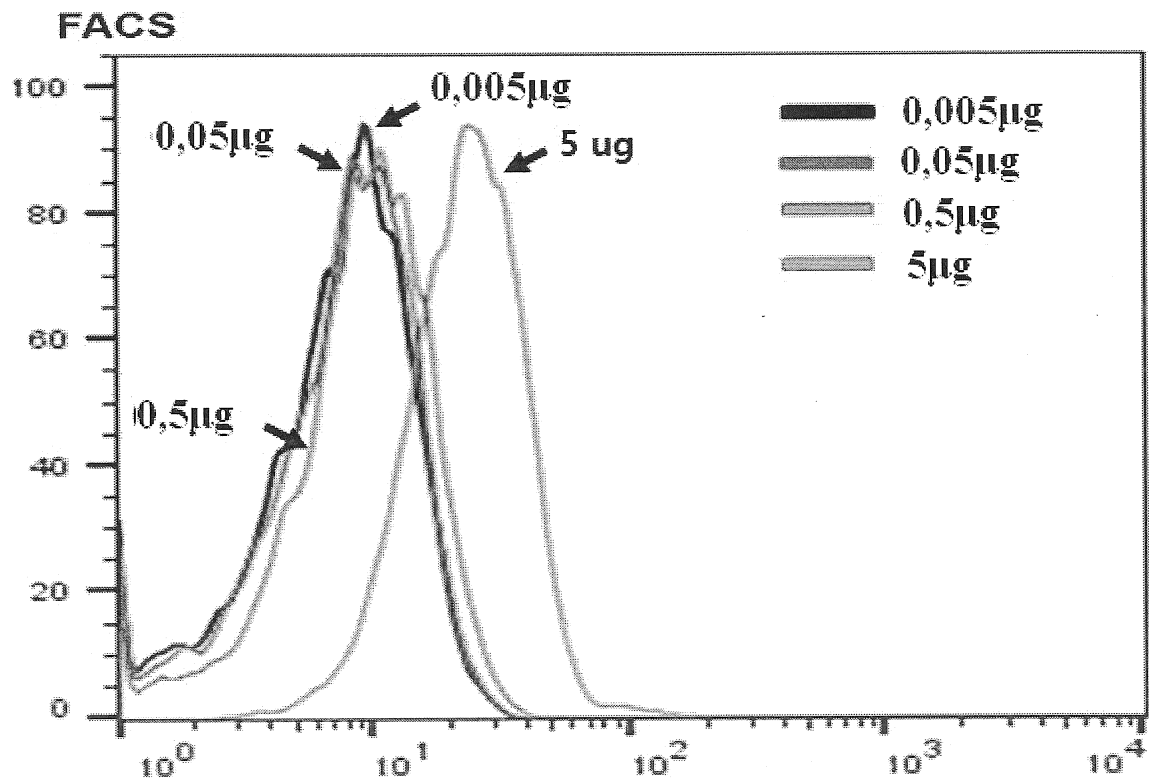
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm để điều trị bệnh ung thư hoặc bệnh lây nhiễm, chứa hoạt chất là tế bào giết tự nhiên, chứa ty thể ngoại sinh được phân lập.
2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó ty thể ngoại sinh được phân lập được thu nhận từ tế bào cơ, tế bào gan, nguyên bào sợi, tế bào biểu mô, neuron tế bào thần kinh, tế bào tạo mỡ, tế bào xương, bạch cầu, tế bào lympho, tế bào gốc, hoặc tế bào niêm mạc.
3. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó ty thể ngoại sinh được phân lập được chứa ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 10^3 /tế bào giết tự nhiên.
4. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó ty thể ngoại sinh được phân lập được phân phối vào tế bào giết tự nhiên bằng cách ly tâm hỗn hợp chứa ty thể ngoại sinh được phân lập được trộn với tế bào giết tự nhiên.
5. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này ở dạng lỏng hoặc dạng lạnh đông.
6. Dược phẩm để điều trị bệnh ung thư, chứa hoạt chất là tế bào giết tự nhiên, chứa ty thể ngoại sinh được phân lập, trong đó bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư thanh quản, bệnh bạch cầu tủy cấp, khối u não, u nguyên bào thần kinh, u nguyên bào vồng mạc, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư tuyến nước bọt, và u lympho.
7. Dược phẩm để điều trị bệnh lây nhiễm, chứa hoạt chất là tế bào giết tự nhiên, chứa ty thể ngoại sinh được phân lập, trong đó bệnh lây nhiễm được chọn từ nhóm bao gồm bệnh lây nhiễm virus viêm gan B, bệnh lây nhiễm virus viêm gan C, bệnh lây nhiễm virus gây u nhú ở người, bệnh lây nhiễm virus cytomegalo, bệnh lây nhiễm virus đường hô hấp, và bệnh lây nhiễm virus cúm.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	PAEAN BIOTECHNOLOGY INC.	
<120>	DƯỢC PHẨM ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH UNG THƯ HOẶC BỆNH LÂY NHIỄM	
<130>	PCB711058PBT	
<150>	KR 10-2016-0151411	
<151>	2016-11-14	
<160>	4	
<170>	KopatentIn 2,0	
<210>	1	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân đạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi xuôi để phát hiện ty thể WRL-68	
<400>	1	
	ctattctctg ttctttcatg g	21
<210>	2	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân đạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi ngược để phát hiện ty thể WRL-68	
<400>	2	
	aagtatttat ggtaccgtac g	21
<210>	3	
<211>	18	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân đạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi xuôi để phát hiện gen GAPDH	
<400>	3	
	ggaaggtgaa ggtcggag	18
<210>	4	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân đạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi ngược để phát hiện gen GAPDH	
<400>	4	
	ggcaacaata tccactttac c	21

**Fig.1**



Mẫu dò màu đỏ mitotracker

Fig.2

Kính hiển vi huỳnh quang

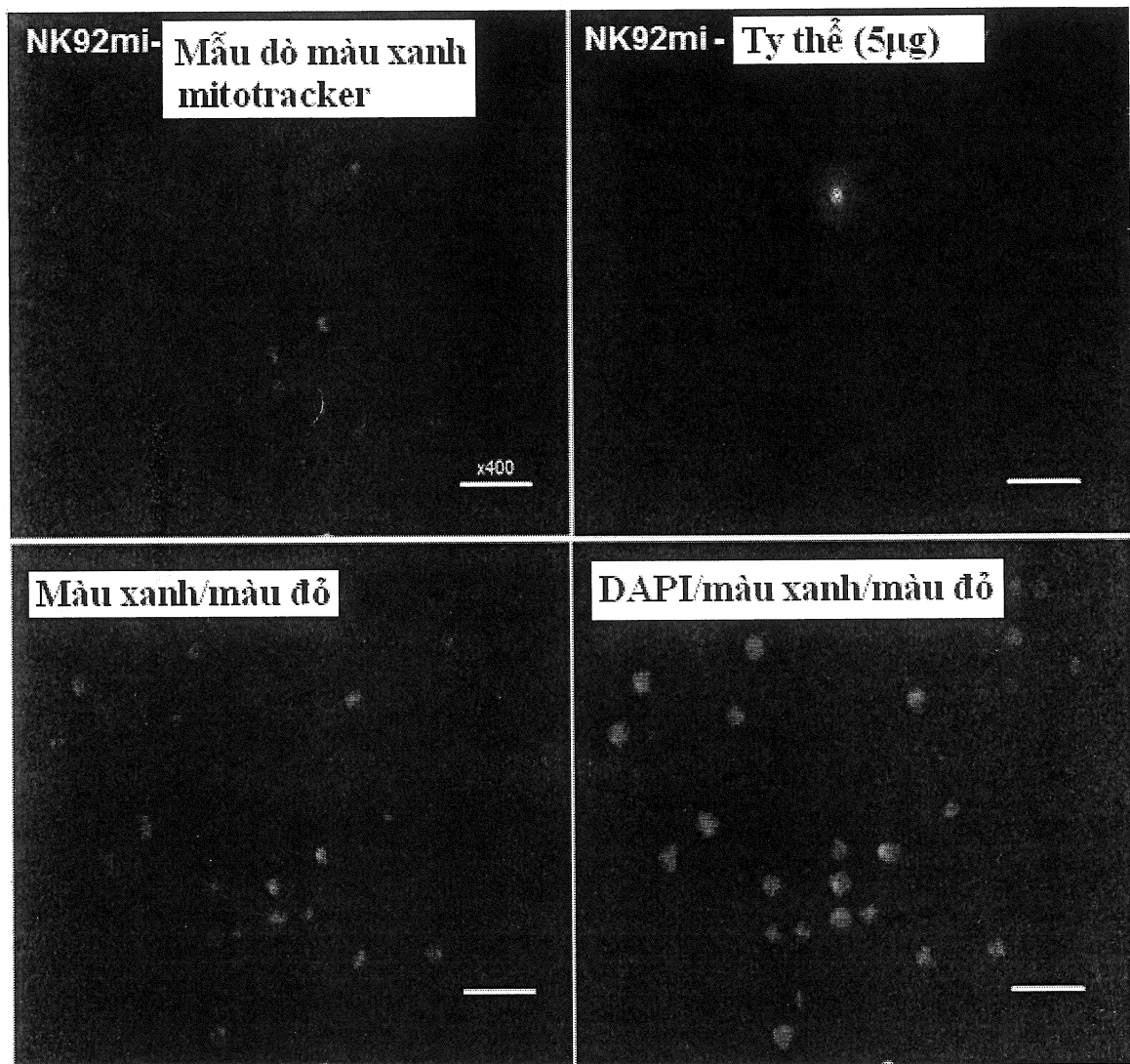
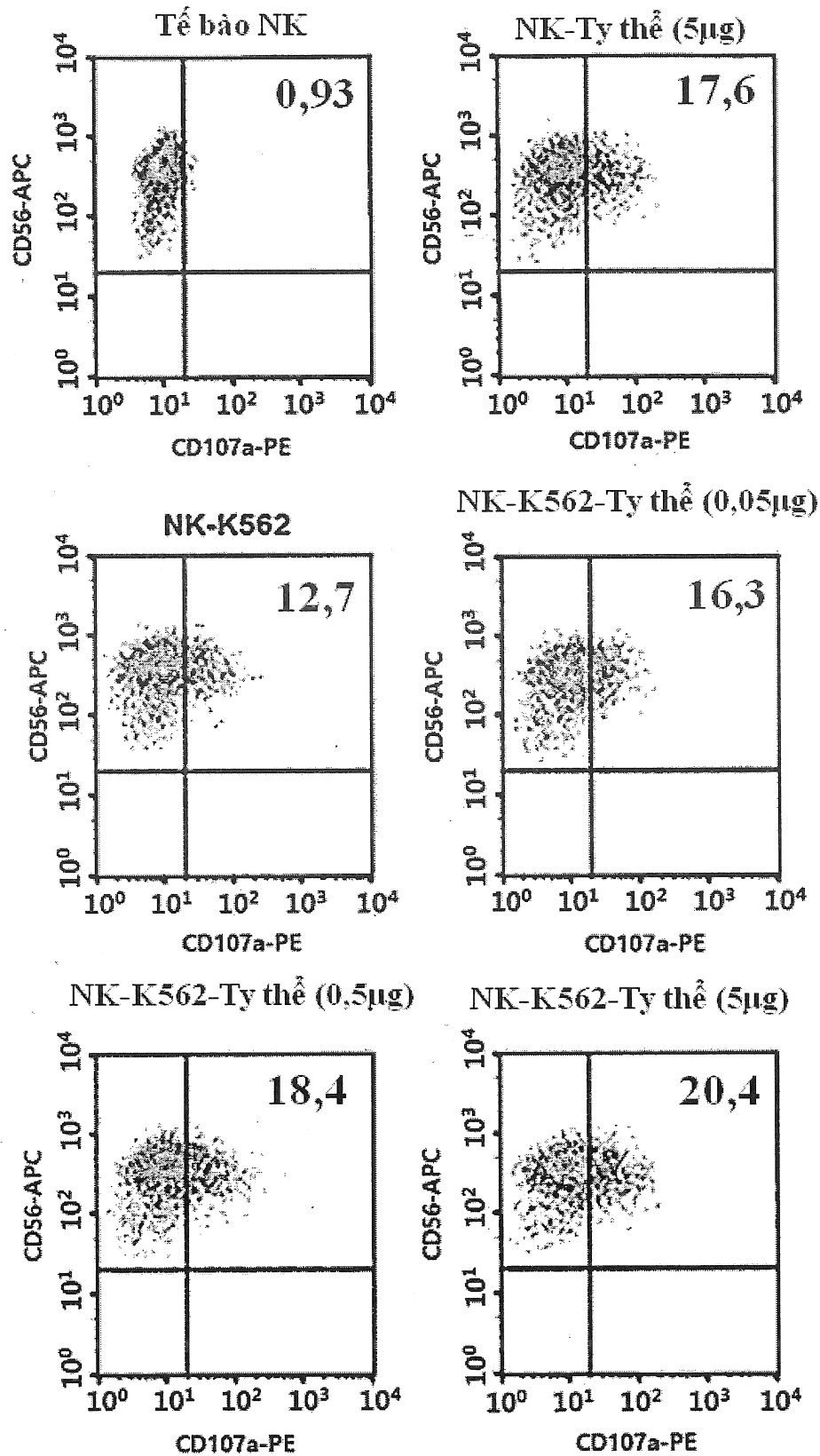


Fig.3

**Fig.4A**

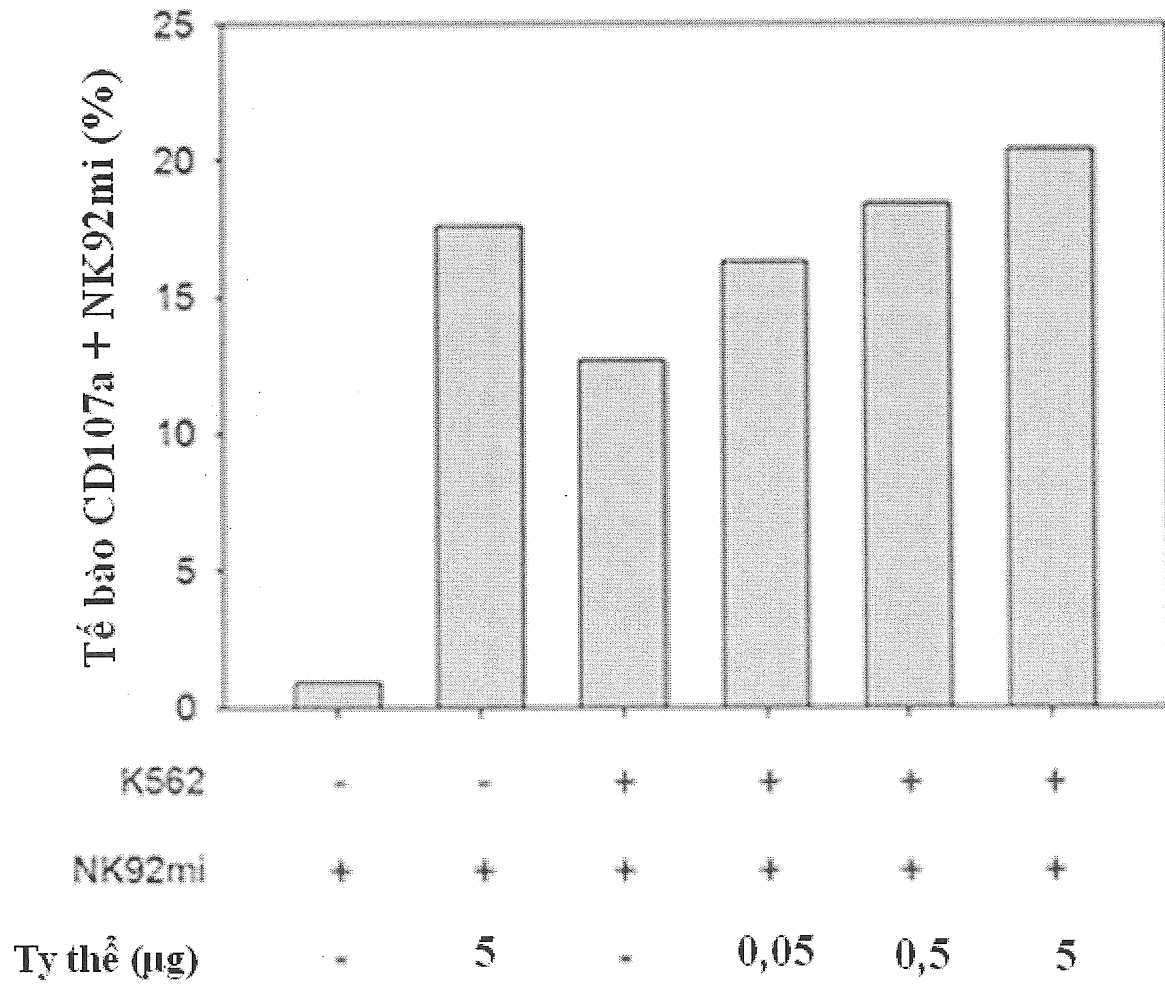
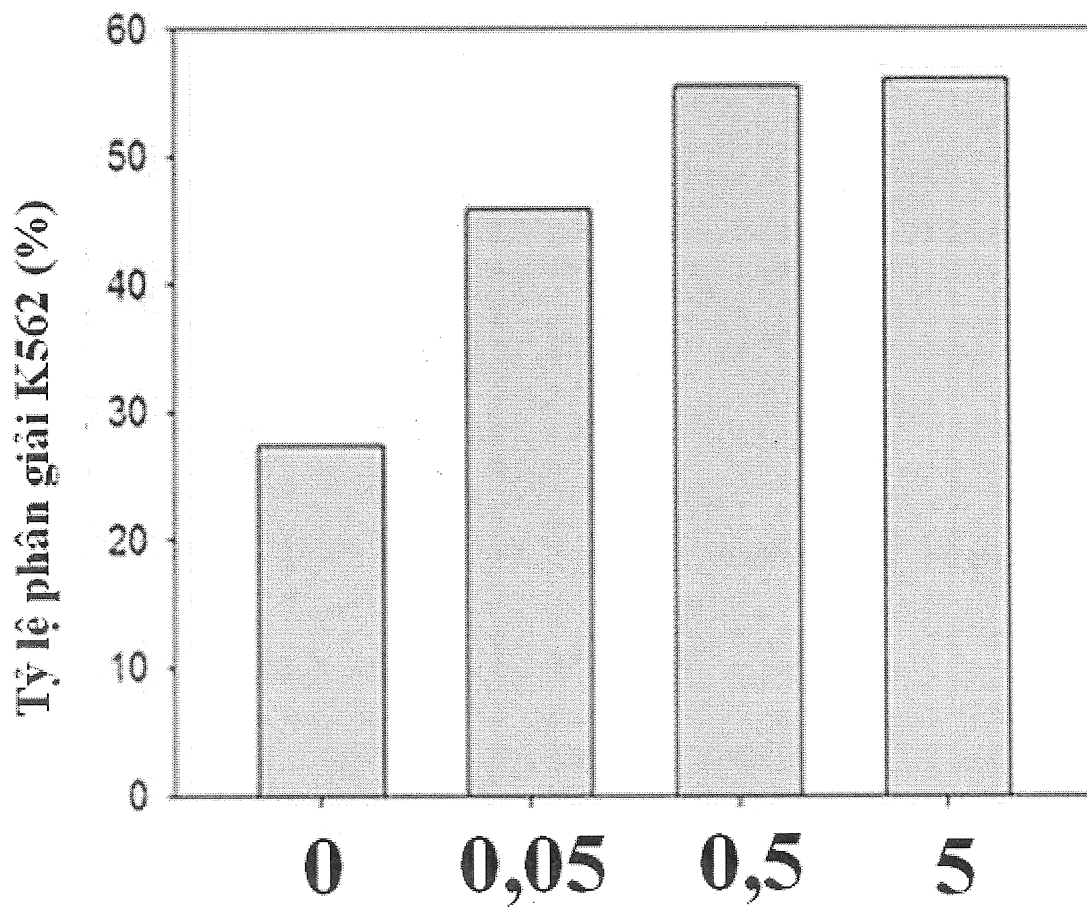


Fig.4B

Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào K562 của tế bào giết tự nhiên



Nồng độ ty thể đã được phân phối vào tế bào NK92mi
($\mu\text{g}/1 \times 10^5$ tế bào)

Fig.5

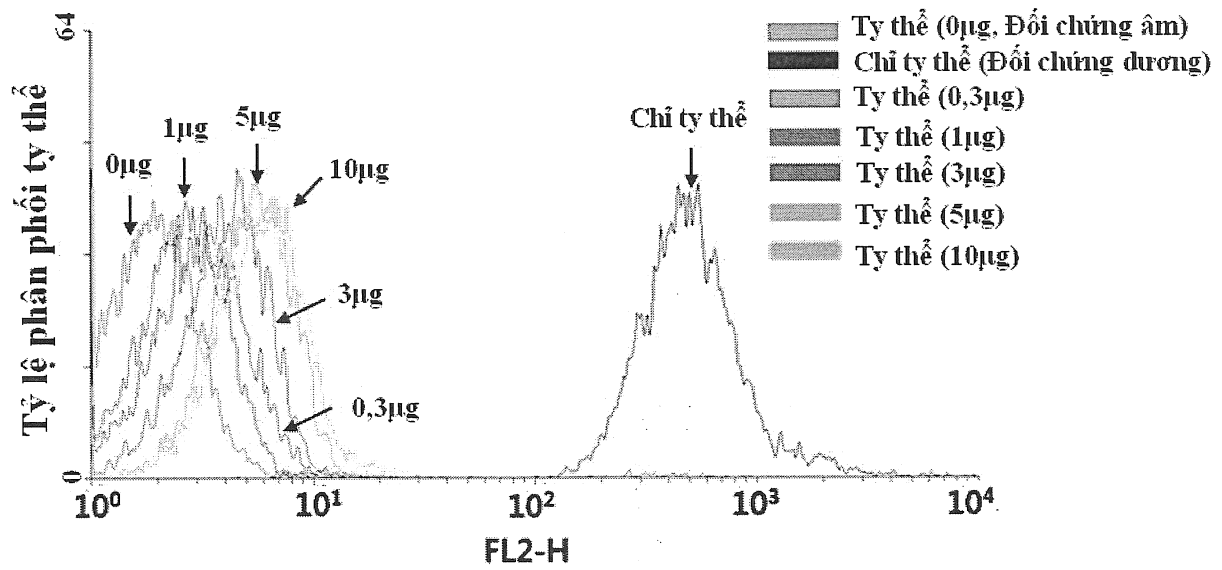
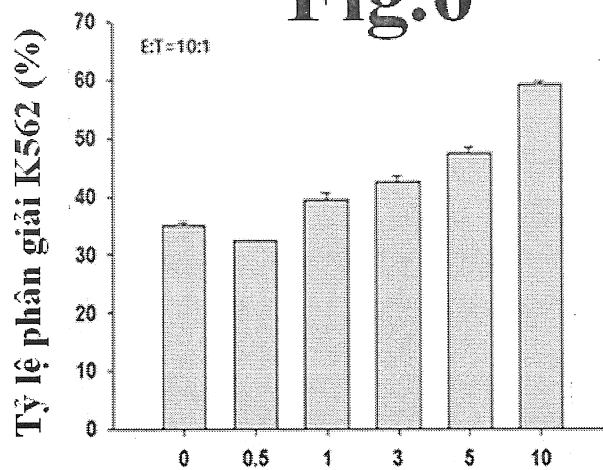
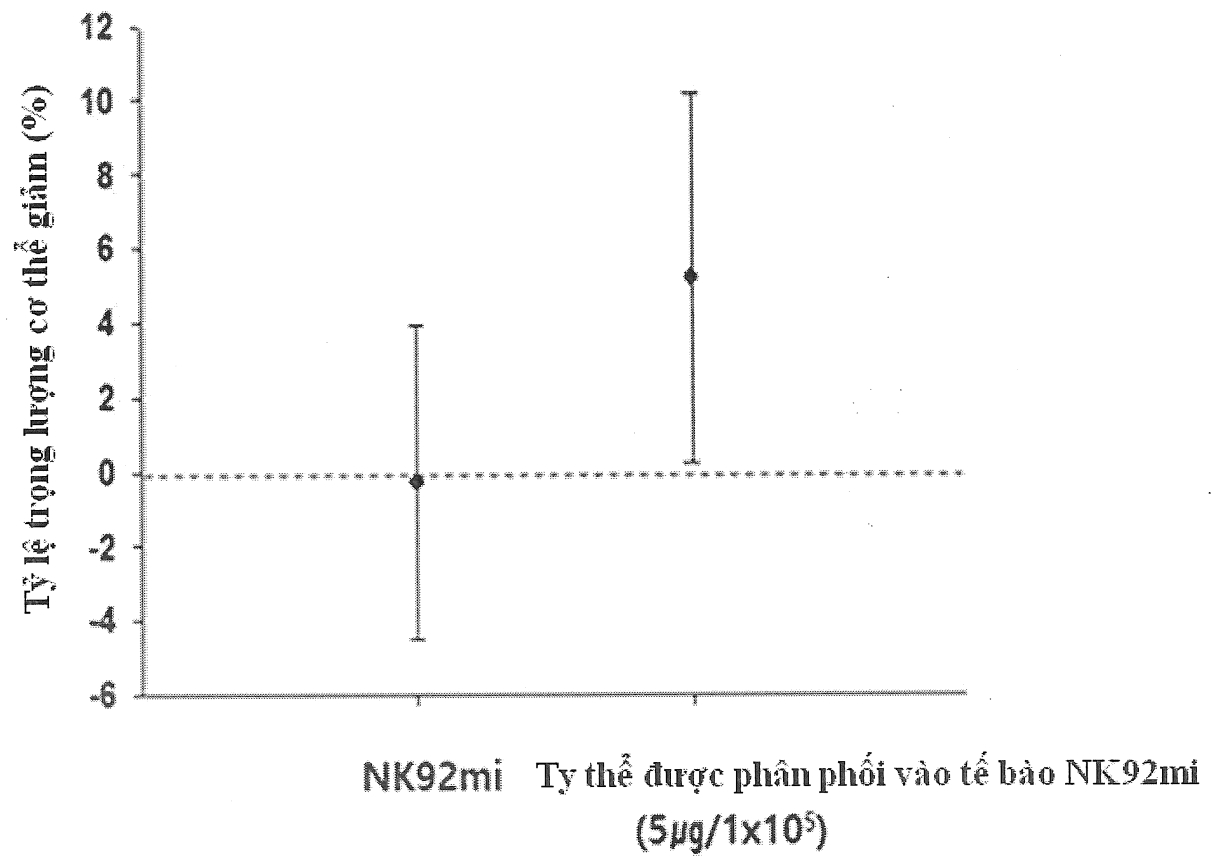


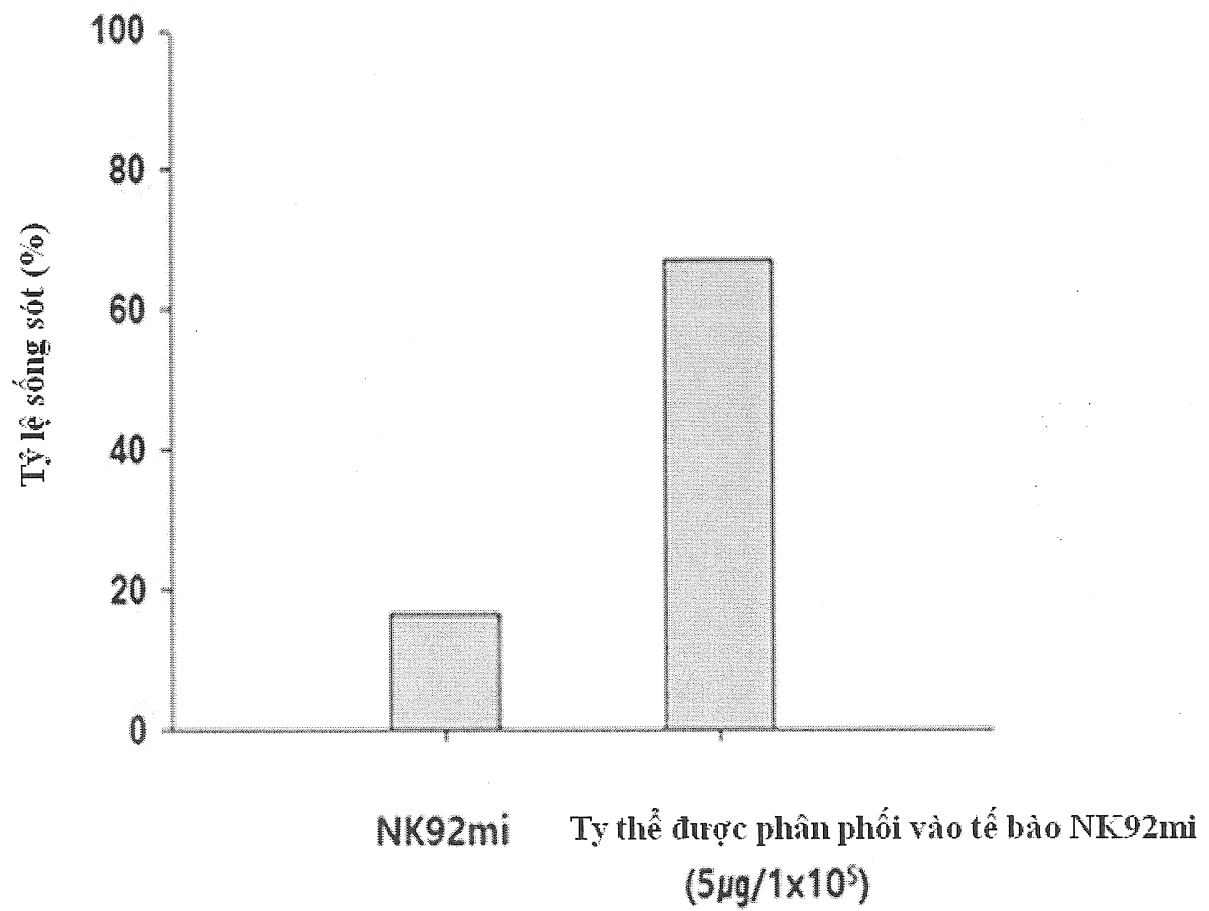
Fig.6

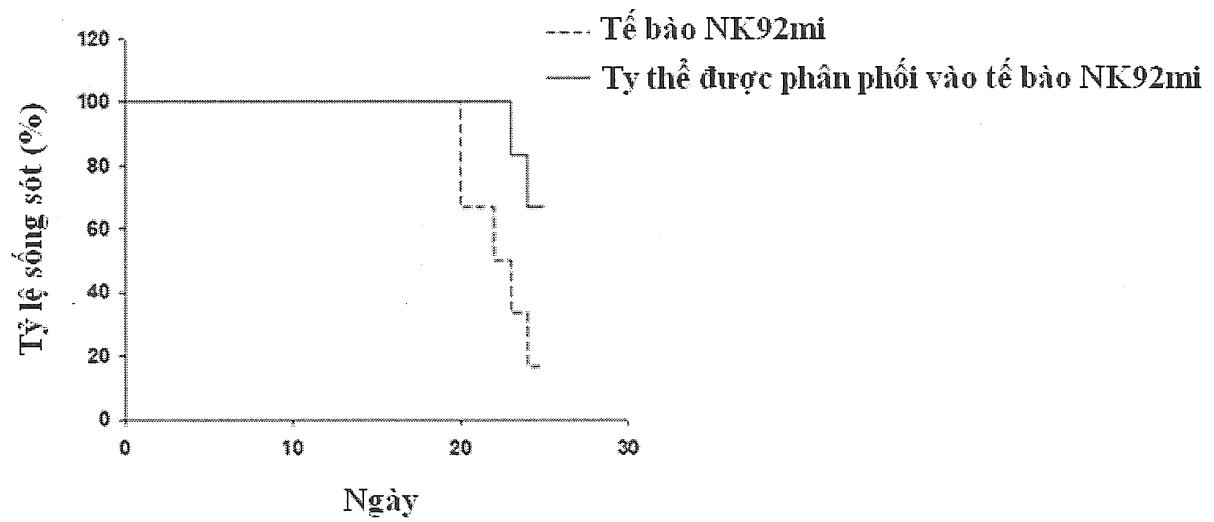


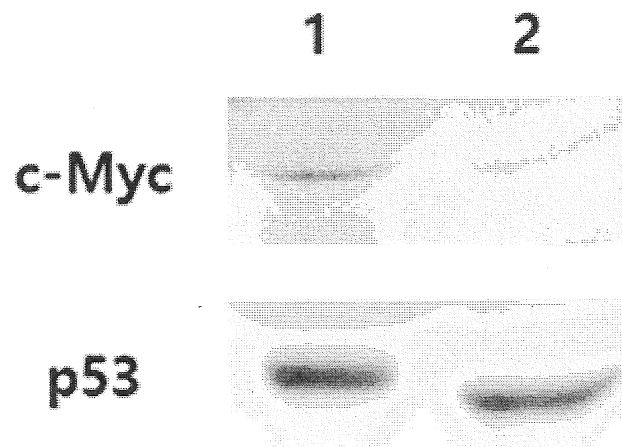
Nồng độ ty thể đã được phân phối vào tế bào NK92mi
($\mu\text{g}/1 \times 10^5$ tế bào)

Fig.7

**Fig.8A**

**Fig.8B**

**Fig.8C**

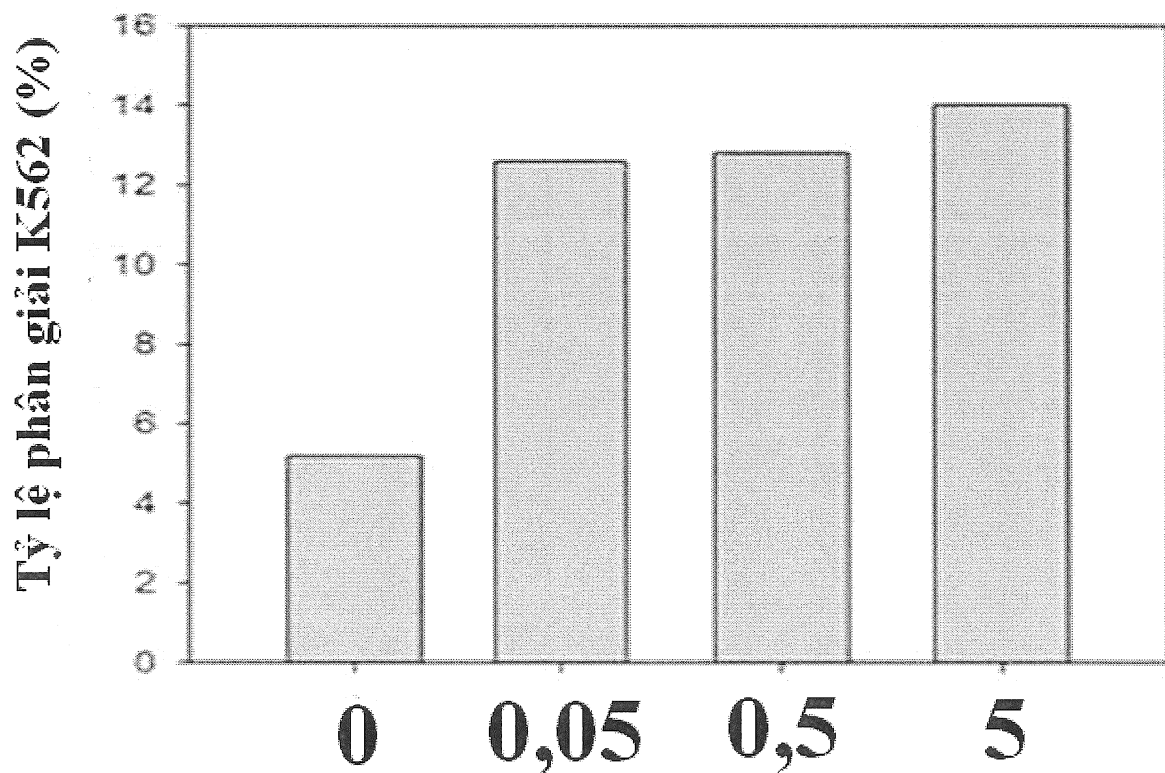


1: Tế bào NK92mi

2: Ty thể được phân phối vào tế bào NK92mi
($5\mu\text{g}/1 \times 10^5$)

Fig.9

Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào K562 của tế bào PBMC



Nồng độ ty thể đã được phân phối vào tế bào PBMC
($\mu\text{g}/1 \times 10^5$ tế bào)

Fig.10