



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
1-0043703
(51)^{2022.01} C12N 5/0784; C12N 5/0786; C12N (13) B
5/0783

(21) 1-2022-07732 (22) 31/08/2017
(62) 1-2019-01068
(86) PCT/JP2017/031419 31/08/2017 (87) WO 2018/043660 08/03/2018
(30) 2016-170996 01/09/2016 JP
(45) 25/02/2025 443 (43) 25/04/2023 421A
(73) RIKEN IMMUNE REGENERATIVE MEDICINE INC. (JP)
10-2 Ichibancho, Chiyoda-ku, Tokyo 1020082, Japan
(72) NOGUCHI Katsuo (JP); TADAKI Toshio (JP).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT TẾ BÀO ĐUÔI GAI KÍCH THÍCH TẾ BÀO T DIỆT
TỰ NHIÊN (NKT)

(21) 1-2022-07732

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT, phương pháp này bao gồm các bước: bước đặt tế bào đơn nhân trong bình nuôi cấy và để cho một số tế bào đơn nhân lắng trên bề mặt đáy của bình bằng cách giữ yên môi trường nuôi cấy; bước loại bỏ tế bào nổi khác với các tế bào đã lắng trên bề mặt đáy của bình nuôi cấy; bước làm cho bạch cầu đơn nhân to trong số các tế bào đã lắng trên bề mặt đáy biệt hóa thành tế bào đuôi gai chưa thành thực bằng cách bổ sung yếu tố đã được xác định trước vào bình nuôi cấy; và bước cảm ứng tế bào đuôi gai thành thực thành tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT bằng cách bổ sung α -galactosylxeramit vào bình nuôi cấy.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT, và phương pháp sản xuất chế phẩm tế bào chứa tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT và tế bào NKT.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong số các phương pháp điều trị ung thư gần đây, ngoài phẫu thuật, hóa trị liệu, và xạ trị, trị liệu miễn dịch bao gồm việc chiết tế bào miễn dịch từ bệnh nhân, hoạt hóa tế bào này, và sau đó đưa tế bào này trở lại bệnh nhân đang được chú ý. Sự giảm số lượng tế bào miễn dịch trong cơ thể hoặc giảm hoạt tính của tế bào miễn dịch có thể là nguyên nhân dẫn đến sự bất đầu của bệnh ung thư. Trong trị liệu miễn dịch, điều này được khắc phục bằng cách làm tăng số lượng tế bào miễn dịch hoặc tương tự để tấn công tế bào ung thư.

Trong một ví dụ đã biết của phương pháp trị liệu miễn dịch ung thư, ung thư được điều trị bằng cách tạo xung tế bào đơn nhân ngoại vi với α -galactosylxeromit để hoạt hóa hoặc tăng sinh tế bào NKT mà được bao gồm trong tế bào đơn nhân, và sau đó sử dụng tế bào NKT cho bệnh nhân. Nghiên cứu lâm sàng của trị liệu này với sự tập trung vào ung thư phổi đang ngày càng tiến triển (ví dụ, tham khảo tài liệu phi sáng chế 1).

Tế bào NKT là nhóm phụ của tế bào T có đặc tính của cả tế bào T và tế bào diệt tự nhiên (Tế bào NK). Tế bào NKT tạo nên chỉ khoảng 0,1% tế bào T trong máu ngoại vi. Dấu hiệu xác định của tế bào NKT là ở chỗ khi được hoạt hóa, chúng sản xuất lượng lớn của IFN- γ , IL-4, và yếu tố kích thích tạo cụm đại thực bào bạch cầu hạt (GM-CSF).

Đã biết rằng tế bào NKT được hoạt hóa trong quá trình truyền tín hiệu hoạt hóa thông qua thụ thể tế bào T V α 24V β 11 trên bề mặt của tế bào NKT khi α -galactosylxeromit (α -GalCer) được trình diện bởi phân tử CD-1d trên bề mặt của tế bào trình diện kháng nguyên (tế bào đuôi gai).

Danh mục tài liệu trích dẫn

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Shinichiro Motohashi, Kaoru Nagato, Naoki Kunii, Heizaburo Yamamoto, Kazuki Yamasaki, Kohsuke Okita, Hideki Hanaoka, Naomi Shimizu, Makoto Suzuki, Ichiro Yoshino, Masaru Taniguchi, Takehiko Fujisawa, and Toshinori Nakayama, A Phase I-II Study of α -Galactosylceramide-Pulsed IL-2/GM-CSF-Cultured Mononuclear Cells in Patients with Advanced and Recurrent Non-Small Cell Lung Cancer¹, The Journal of Immunology 182:2492-2501 (2009)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề cần được giải quyết bởi sáng chế

Không có phương pháp nào để sản xuất một cách hiệu quả và kinh tế tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT đã được biết đến trước đây.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất một cách kinh tế tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT.

Biện pháp giải quyết vấn đề

Một phương án của sáng chế là phương pháp sản xuất tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT. Phương pháp sản xuất này được đặc trưng bởi việc bao gồm các bước sau:

đặt tế bào đơn nhân vào bình nuôi cấy và giữ cho bình nuôi cấy đứng yên để cho phép một số tế bào đơn nhân kết dính với bề mặt đáy của bình;

loại bỏ tế bào đã được tạo huyền phù khác với tế bào mà đã kết dính với bề mặt đáy của bình nuôi cấy;

bổ sung yếu tố đã được xác định trước vào bình nuôi cấy để làm cho

bạch cầu đơn nhân to trong số các tế bào mà đã kết dính với bề mặt đáy biệt hóa thành tế bào đuôi gai chưa thành thực;

bổ sung yếu tố đã được xác định trước vào bình nuôi cấy để làm thành thực tế bào đuôi gai chưa thành thực; và

bổ sung α -galactosylxeromit vào bình nuôi cấy để cảm ứng tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT từ tế bào đuôi gai trưởng thành.

Theo phương án này, tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT có thể thu được một cách hiệu quả, trong khoảng thời gian tương đối ngắn, và với lượng nhỏ môi trường nuôi cấy bằng cách làm cho bạch cầu đơn nhân to trong số tế bào đơn nhân kết dính với bề mặt đáy của bình nuôi cấy và biệt hóa các bạch cầu đơn nhân to này thành tế bào đuôi gai. Do đó, phương pháp sản xuất theo phương án này làm cho tế bào đuôi gai kích thích NKT có thể được điều chế theo cách kinh tế hơn và với độ chính xác cao hơn so với, ví dụ, phương pháp thu được tế bào đuôi gai kích thích NKT được bộc lộ trong Tài liệu phi sáng chế 1.

Phương án khác của sáng chế là phương pháp sản xuất chế phẩm tế bào chứa tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT và tế bào NKT. Phương pháp sản xuất này được đặc trưng bởi việc bao gồm các bước sau: đặt tế bào đơn nhân vào bình nuôi cấy thứ nhất và giữ cho bình nuôi cấy đứng yên để cho phép một số tế bào đơn nhân kết dính với bề mặt đáy của bình; thu gom và bảo quản tế bào đã được tạo huyền phù khác với tế bào mà đã kết dính với bề mặt đáy của bình; bổ sung yếu tố đã được xác định trước vào bình nuôi cấy thứ nhất để làm cho bạch cầu đơn nhân to trong số các tế bào mà đã kết dính với bề mặt đáy biệt hóa thành tế bào đuôi gai chưa thành thực; bổ sung yếu tố đã được xác định trước vào bình nuôi cấy thứ nhất để làm thành thực tế bào đuôi gai chưa thành

thực; bổ sung α -galactosylxeramit vào bình nuôi cấy thứ nhất để cảm ứng tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT từ tế bào đuôi gai trưởng thành; và đặt tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT và tế bào tạo huyền phù đã được bảo quản trong bình nuôi cấy thứ hai và nuôi cấy các tế bào này để cảm ứng tế bào NKT từ một số tế bào đã được tạo huyền phù.

Theo phương án này, các tế bào đã được tạo huyền phù mà không kết dính với bề mặt đáy của bình nuôi cấy được thu gom, và sau đó được trộn và được nuôi cấy với tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT trong bước tiếp theo. Nhờ đó, tế bào NKT có thể được cảm ứng từ một số tế bào đã được tạo huyền phù, và chế phẩm tế bào chứa tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT và tế bào NKT có thể thu được.

Phương pháp sản xuất tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT theo phương án nêu trên có thể còn bao gồm bước bảo quản lạnh tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT thu được. Ngoài ra, phương pháp sản xuất chế phẩm tế bào theo phương án nêu trên cũng có thể còn bao gồm bước bảo quản lạnh chế phẩm tế bào thu được.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Theo sáng chế, tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT có thể được tạo ra một cách kinh tế và với độ chính xác cao trong khoảng thời gian tương đối ngắn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 thể hiện kết quả vào Ngày 0, Ngày 7, và Ngày 14 trong quá trình phân tích tế bào NKT sử dụng bào kế chảy trong thử nghiệm nuôi cấy của Ví dụ 1.

FIG. 2 thể hiện kết quả vào Ngày 0, Ngày 7, và Ngày 14 trong quá trình phân tích tế bào NKT sử dụng bào kế chảy trong thử nghiệm nuôi cấy của Ví dụ 1.

FIG. 3 thể hiện kết quả vào Ngày 0, Ngày 7, và Ngày 14 trong quá trình phân tích tế bào NKT sử dụng bào kế chảy trong thử nghiệm nuôi cấy của Ví dụ 1.

FIG. 4 thể hiện tổng số lượng tế bào và tỷ lệ tế bào sống sót trong nhóm thử nghiệm của Ví dụ 1.

FIG. 5 thể hiện tỷ lệ biệt hóa của tế bào đuôi gai trong nhóm thử nghiệm của Ví dụ 1.

FIG. 6 thể hiện kết quả vào Ngày 0, trước khi kết đông, và sau khi kết đông và làm tan đông trong quá trình phân tích CD14, CD83, và CD86 trên bề mặt tế bào sử dụng bào kế chảy trong thử nghiệm nuôi cấy của Ví dụ 2.

FIG. 7 thể hiện kết quả vào Ngày 0, trước khi kết đông, và sau khi kết đông và làm tan đông trong quá trình phân tích CD14, CD83, và CD86 trên bề mặt tế bào sử dụng bào kế chảy trong thử nghiệm nuôi cấy của Ví dụ 2.

FIG. 8 thể hiện kết quả vào Ngày 0, trước khi kết đông, và sau khi kết đông và làm tan đông trong quá trình phân tích CD14, CD83, và CD86 trên bề mặt tế bào sử dụng bào kế chảy trong thử nghiệm nuôi cấy của Ví dụ 2.

FIG. 9 thể hiện tổng số lượng tế bào và tỷ lệ tế bào sống sót trước khi kết đông và sau khi kết đông và làm tan đông trong nhóm thử nghiệm của Ví dụ 2.

FIG. 10(A) đến 10(C) thể hiện kết quả vào Ngày 0, Ngày 2, và Ngày 6 trong quá trình phân tích tế bào NKT sử dụng bào kế chảy trong thử nghiệm

nuôi cấy của Ví dụ 3.

FIG. 11(A) đến 11(C) thể hiện kết quả vào Ngày 0, Ngày 2, và Ngày 6 trong quá trình phân tích tế bào NKT sử dụng bào kế chảy trong thử nghiệm nuôi cấy của Ví dụ 3.

FIG. 12(A) đến 12(C) thể hiện kết quả vào Ngày 0, Ngày 2, và Ngày 6 trong quá trình phân tích tế bào NKT sử dụng bào kế chảy trong thử nghiệm nuôi cấy của Ví dụ 3.

FIG. 13(A) và 13(B) thể hiện kết quả vào Ngày 0 và Ngày 6 trong quá trình phân tích tế bào đuôi gai sử dụng bào kế chảy trong thử nghiệm nuôi cấy của Ví dụ 3.

FIG. 14(A) và 14(B) thể hiện kết quả vào Ngày 0 và Ngày 6 trong quá trình phân tích tế bào đuôi gai sử dụng bào kế chảy trong thử nghiệm nuôi cấy của Ví dụ 3.

FIG. 15(A) và 15(B) thể hiện kết quả vào Ngày 0 và Ngày 6 trong quá trình phân tích tế bào đuôi gai sử dụng bào kế chảy trong thử nghiệm nuôi cấy của Ví dụ 3.

FIG. 16 thể hiện tổng số lượng tế bào và tỷ lệ tế bào sống sót trong nhóm thử nghiệm của Ví dụ 3.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương án của sáng chế bây giờ sẽ được giải thích dưới đây. Trong các phương án này, kỹ thuật đã biết thông thường và đã biết trong tình trạng kỹ thuật có thể được viện dẫn và được thiết kế/cải biến một cách thích hợp.

Theo phương án của phương pháp sản xuất theo sáng chế, trước tiên, tế bào đơn nhân được đặt vào bình nuôi cấy và bình nuôi cấy này được để yên để cho phép một số tế bào đơn nhân kết dính với bề mặt đáy của bình. Ở đây,

nhiều bạch cầu đơn nhân to được bao gồm trong số các tế bào mà đã kết dính với bề mặt đáy của bình. Bằng cách phân lập bạch cầu đơn nhân to theo cách này, bạch cầu đơn nhân to có thể được biệt hóa một cách hiệu quả thành tế bào đuôi gai, và cuối cùng, tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT có thể thu được một cách hiệu quả trong khoảng thời gian tương đối ngắn. Ngoài ra, theo phương án này, vì bạch cầu đơn nhân to được phân lập như được mô tả trên đây, lượng môi trường nuôi cấy cần sử dụng có thể được làm giảm, và do đó, tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT có thể được sản xuất với chi phí thấp hơn.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “tế bào đơn nhân” chỉ quần thể tế bào bao gồm lymphô bào và bạch cầu đơn nhân to. Tế bào đơn nhân có thể thu được từ máu, như máu ngoại vi, tủy xương, và máu cuống rốn, sử dụng phương pháp đã biết công khai như ly tâm và bào kế chảy. Ngoài ra, tế bào đơn nhân có thể được thu gom trực tiếp từ người bằng kỹ thuật phân tách thành phần máu. Tốt hơn nếu thu được tế bào đơn nhân bằng kỹ thuật phân tách thành phần máu vì quy trình này có thể được đơn giản hóa và có ít ảnh hưởng đến đối tượng vì các thành phần máu khác với tế bào đơn nhân có thể được quay trở lại.

Môi trường nuôi cấy được bổ sung vào bình nuôi cấy. Đối với môi trường nuôi cấy, môi trường nuôi cấy đã biết công khai thích hợp để nuôi cấy tế bào đơn nhân có thể được sử dụng. Ví dụ, môi trường nuôi cấy thu được bằng cách bổ sung một cách thích hợp các chất phụ gia như huyết thanh, yếu tố sinh trưởng, xytokin, chất thay thế huyết thanh, vitamin, chất đệm, và muối vô cơ vào môi trường nuôi cấy cơ bản được sử dụng trong việc nuôi cấy tế bào động vật (ví dụ, môi trường tế bào đuôi gai không có huyết thanh CELL GRO GMP (Cell Genix, #20801-0500), v.v.) có thể được sử dụng. Để làm ví dụ cụ thể về môi trường nuôi cấy, có thể kể đến, nhưng không giới hạn ở, ALyS505N-0 (NIPRO, #1020P10), AIM-V@Medium CTS (ThermoFisher, #0870112-DK),

v.v..

Bình nuôi cấy được sử dụng không bị giới hạn một cách cụ thể, miễn là bình này thường được sử dụng để nuôi cấy tế bào động vật và có bề mặt đáy mà tế bào có thể được kết dính vào đó. Để làm ví dụ không giới hạn về bình nuôi cấy, có thể kể đến đĩa có sẵn trên thị trường (AGC TECHNO GLASS, #3810-006), đĩa (CRNING, CellBIND Surface 100 mm, #3296), bình (Sumitomo Bakelite, #MS-21050), v.v..

Khoảng thời gian để giữ yên cho bình nuôi cấy mà tế bào đơn nhân đã được đặt vào đó để cho phép một số tế bào đơn nhân kết dính với bề mặt đáy của bình không bị giới hạn một cách cụ thể, mà có thể là, ví dụ, 1 đến 12 giờ, tốt hơn là 2 giờ. Nhiệt độ và không khí trong khi giữ cho bình nuôi cấy đứng yên có thể là điều kiện được sử dụng để nuôi cấy tế bào đơn nhân, và các điều kiện này có thể được thiết lập bằng cách sử dụng thiết bị ỳ, v.v. mà thường được sử dụng để nuôi cấy. Ví dụ, nhiệt độ có thể nằm trong khoảng từ khoảng 35 đến 38°C, tốt hơn là 37°C, và nồng độ CO₂ có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 10%, tốt hơn là khoảng 5%.

Việc loại bỏ tế bào đã được tạo huyền phù không kết dính với bề mặt đáy của bình có thể được thực hiện bằng phương pháp thông thường. Ví dụ, các tế bào đã được tạo huyền phù có thể được loại bỏ bằng cách hút. Các tế bào đã được tạo huyền phù mà được loại bỏ có thể được loại bỏ hoặc được bảo quản. Cụ thể, theo phương án khác của sáng chế, các tế bào đã được tạo huyền phù không kết dính với bề mặt đáy của bình có thể được thu gom và được bảo quản. Ví dụ, các tế bào đã được tạo huyền phù mà đã được thu gom có thể được tạo huyền phù trong chất lỏng bảo quản lạnh thích hợp để bảo quản lạnh tế bào, được đặt trong bình bảo quản lạnh, và sau đó được bảo quản lạnh ở nhiệt độ

-80°C. Để làm ví dụ chất lỏng bảo quản lạnh tế bào, có thể kể đến CP-1 (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd., #324042-3), v.v..

Tiếp theo, môi trường nuôi cấy và (các) yếu tố quy định được đặt vào bình nuôi cấy trong đó tế bào đã kết dính với bề mặt đáy của nó để làm cho bạch cầu đơn nhân to trong số các tế bào mà đã kết dính với bề mặt đáy biệt hóa thành tế bào đuôi gai chưa thành thực. Môi trường nuôi cấy được giải thích trên đây có thể được sử dụng làm môi trường nuôi cấy. Để làm các yếu tố đã được xác định trước để làm cho bạch cầu đơn nhân to biệt hóa thành tế bào đuôi gai chưa thành thực, có thể kể đến IL-4 và GM-CSF, và hỗn hợp của cả hai trong số các yếu tố này là được ưu tiên. Nếu IL-4 được sử dụng, khoảng nồng độ của nó tốt hơn là từ 100 đến 1.000 ng/mL, tốt hơn nữa là từ 200 đến 800 ng/mL, và thậm chí tốt hơn nữa là từ 400 đến 600 ng/mL. Nếu GM-CSF được sử dụng, khoảng nồng độ của nó tốt hơn là từ 100 đến 1.000 ng/mL, tốt hơn nữa là từ 200 đến 800 ng/mL, và thậm chí tốt hơn nữa là từ 400 đến 600 ng/mL.

Trong quá trình nuôi cấy để biệt hóa, các điều kiện giống như các điều kiện nuôi cấy được mô tả trên đây có thể được sử dụng, và các điều kiện này có thể được cải biến một cách thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoài ra, thời gian nuôi cấy phải đủ để làm cho bạch cầu đơn nhân to biệt hóa thành tế bào đuôi gai chưa thành thực, và có thể được thiết lập một cách thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, thời gian nuôi cấy là từ 4 đến 6 ngày, tốt hơn là 5 ngày.

Tiếp theo, (các) yếu tố quy định được đặt vào bình nuôi cấy để làm thành thực tế bào đuôi gai chưa thành thực. Để làm (các) yếu tố quy định được sử dụng ở đây, có thể kể đến IL-4, GM-CSF, Yếu tố hoại tử khối u α (TNF α),

và Prostaglandin 2 (PGE₂). Hỗn hợp của các yếu tố này là được ưu tiên. Nếu IL-4 được sử dụng, khoảng nồng độ của nó tốt hơn là từ 100 đến 1.000 ng/mL, tốt hơn nữa là từ 200 đến 800 ng/mL, và thậm chí tốt hơn nữa là từ 400 đến 600 ng/mL. Nếu GM-CSF được sử dụng, khoảng nồng độ của nó tốt hơn là từ 100 đến 1.000 ng/mL, tốt hơn nữa là từ 200 đến 800 ng/mL, và thậm chí tốt hơn nữa là từ 400 đến 600 ng/mL. Nếu TNF α được sử dụng, khoảng nồng độ của nó tốt hơn là từ 1,0 đến 100 ng/mL, tốt hơn nữa là từ 5,0 đến 20 ng/mL, và thậm chí tốt hơn nữa là từ 8 đến 12 ng/mL. Nếu PGE₂ được sử dụng, khoảng nồng độ của nó tốt hơn là từ 100 đến 10.000 ng/mL, tốt hơn nữa là từ 500 đến 5.000 ng/mL, và thậm chí tốt hơn nữa là từ 800 đến 1.200 ng/mL.

Các điều kiện nuôi cấy để thành thực có thể là các điều kiện giống như các điều kiện nuôi cấy được mô tả trên đây, và các điều kiện này có thể được cải biến một cách thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Thời gian nuôi cấy phải đủ để cho phép tế bào đuôi gai chưa thành thực trở nên thành thực, và có thể được thiết lập một cách thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, thời gian nuôi cấy là từ 1 đến 3 ngày, tốt hơn là 2 ngày.

Tiếp theo, α -galactosylxeramit (α -GalCer) được bổ sung vào bình nuôi cấy để cảm ứng tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT từ tế bào đuôi gai đã thành thực. Ở đây, “tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT” biểu thị tế bào đuôi gai mà cảm ứng sự hoạt hóa và tăng sinh của tế bào NKT. Trên bề mặt của các tế bào đuôi gai này, α -GalCer được trình diện bởi các phân tử CD-1d, và tế bào NKT được hoạt hóa khi tế bào NKT nhận ra α -GalCer.

Khoảng nồng độ của α -GalCer trong bước này tốt hơn là từ 10 đến 1.000 ng/mL, tốt hơn nữa là từ 20 đến 800 ng/mL, và thậm chí tốt hơn nữa là từ 80

đến 120 ng/mL.

Trong bước này, các điều kiện giống như các điều kiện nuôi cấy được mô tả trên đây có thể được sử dụng cho điều kiện nuôi cấy để thu được tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT, và các điều kiện này có thể được cải biến một cách thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Thời gian nuôi cấy phải đủ để làm cho tế bào đuôi gai đã thành thực trở thành tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT, và có thể được thiết lập một cách thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, thời gian nuôi cấy là từ 0,25 đến 2 ngày, tốt hơn là 1 ngày.

Theo phương án khác, trong trường hợp các tế bào đã được tạo huyền phù mà không kết dính với bề mặt đáy được thu gom và được bảo quản, sau khi tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT thu được như được mô tả trên đây, các tế bào đuôi gai và các tế bào đã được tạo huyền phù này được đặt vào bình nuôi cấy khác và được nuôi cấy, và nhờ đó tế bào NKT có thể được cảm ứng từ một số tế bào đã được tạo huyền phù. Ở đây, nếu các tế bào đã được tạo huyền phù được thu gom được bảo quản lạnh, các tế bào đã được tạo huyền phù có thể được làm tan đông ở nhiệt độ, ví dụ, 37°C và sau đó được trộn với tế bào đuôi gai. Theo phương án này, tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT làm cho một số tế bào đã được tạo huyền phù biệt hóa thành tế bào NKT và trở nên được hoạt hóa. Nhờ đó, theo phương án này, có thể thu được chế phẩm tế bào chứa tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT và tế bào NKT. Ở đây, trong bản mô tả này, thuật ngữ “chế phẩm tế bào” biểu thị chế phẩm chứa tế bào và cũng chứa các thành phần khác với tế bào như môi trường nuôi cấy, chất lỏng bảo quản, v.v..

Phương pháp sản xuất theo các phương án đã được mô tả trên đây có thể còn bao gồm bước bảo quản lạnh tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT thu

được hoặc chế phẩm tế bào chứa các tế bào đuôi gai và tế bào NKT này. Tỷ lệ sống sót tế bào và sự biểu hiện của các chất đánh dấu sự biệt hóa không giảm ngay cả nếu tế bào đuôi gai hoặc chế phẩm tế bào được bảo quản lạnh, và do đó, không mất chức năng tế bào. Vì có thể bảo quản lạnh như được mô tả trên đây, tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT và chế phẩm tế bào chứa tế bào kích thích tế bào NKT và tế bào NKT có thể được tạo ra một cách ổn định. Việc bảo quản lạnh tế bào có thể được tiến hành bằng phương pháp bảo quản lạnh tế bào đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, việc bảo quản lạnh tế bào có thể được tiến hành bằng cách tạo huyền phù tế bào trong chất lỏng bảo quản đã biết công khai mà thích hợp để kết đông tế bào, kết đông dung dịch huyền phù với, ví dụ, nitơ lỏng, và bảo quản dung dịch huyền phù đã được làm đông lạnh ở nhiệt độ, ví dụ, -80°C hoặc thấp hơn.

Tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT và chế phẩm tế bào chứa tế bào đuôi gai và tế bào NKT thu được bằng phương pháp sản xuất theo các phương án đã được mô tả trên đây có tác dụng kích thích miễn dịch và tác dụng chống ung thư. Chế phẩm tế bào để sử dụng trong điều trị bệnh lây nhiễm hoặc trị liệu miễn dịch ung thư có thể được sản xuất bằng cách trộn tế bào đuôi gai hoặc chế phẩm tế bào với chất mang được dụng.

Trong phần sau đây, sáng chế sẽ được giải thích chi tiết thêm bằng cách ví dụ, nhưng phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ được giải thích dưới đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các tác giả sáng chế đã sản xuất tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT và chế phẩm tế bào chứa tế bào đuôi gai và tế bào NKT như được mô tả dưới đây sử dụng các mẫu máu (ID: NKT001-009) từ các cá thể khỏe mạnh.

Vật liệu

Vật liệu được sử dụng trong các thử nghiệm sau là như sau.

- α -GalCer: Osaka Synthetic Chemical Laboratories, Inc. (Osaka Synthetic), Lot No. N-32-A (Sản phẩm hạng GMP)
- GM-CSF: Miltenyi Biotec, #170-076-136
- IL-4: Miltenyi Biotec, #170-076-135
- IL-2: NIPRO, #87890
- Prostaglandin E-2: SIGMA, #P6532-1MG
- TNF-alpha: Miltenyi Biotec, #170-076-103
- môi trường nuôi cấy: ALyS505N-0 (NIPRO, #1020P10)

AIM-V@Medium CTS (ThermoFisher, #0870112-DK)

- kháng thể:

FITC IgG1 của chuột, Đối chứng isotyp κ (FC) Catalô #400114
BioLegend

FITC IgG2a của chuột, Đối chứng isotyp κ (FC) Catalô #400214
BioLegend

PE/Cy7 IgG1 của chuột, Đối chứng isotyp κ (FC) Catalô #400126
BioLegend

APC/Cy7 IgG1 của chuột, Đối chứng isotyp κ (FC) Catalô #400128
BioLegend

Kháng TCR V α 24-FITC Catalô # IM1589 BECKMAN COULTER

Kháng TCR V β 11-PE Catalô # IM2290 BECKMAN COULTER

PE/Cy7 kháng CD3 của người Catalô # 300420 BioLegend

APC/Cy7 kháng CD56 của người (NCAM) Catalô # 318332
BioLegend

Ví dụ 1

Vào ngày đầu tiên (Ngày 0), các thành phần tế bào trước tiên được phân lập by kỹ thuật phân tách thành phần máu. Các thành phần tế bào được tạo lớp thành các lớp, mỗi lớp 30 mL trong LeucoSep, và ly tâm (3000 vòng/phút, 20 phút, r/t, Accel: 1, Decel: 1) được tiến hành. Sau đó, lớp tế bào đơn nhân được thu gom trong ống ly tâm dung tích 50 mL, lượng tương đương của dung dịch muối sinh lý được bổ sung vào đó để tạo ra huyền phù, và sau đó ly tâm (1500 vòng/phút, 5 phút, r/t, Accel: 3, Decel: 2) được tiến hành. 30 mL AIM-V được bổ sung để tạo ra huyền phù, và sau đó khối kết tụ tế bào được loại bỏ bằng cách sử dụng bộ lọc tế bào và số lượng tế bào được xác định. 2×10^7 tế bào đơn nhân được lấy mẫu (đối với Ngày 0) để sử dụng trong phép đo bào kế chảy. Tế bào đơn nhân được gieo vào sáu bình nuôi cấy huyền phù 225 cm² đã được bổ sung 30 mL AIM-V, các bình được giữ yên trong hai giờ trong thiết bị ủ (37°C, CO₂ 5%), và tế bào không kết dính được thu gom. Tế bào không được kết dính đã được thu gom được ly tâm (1500 vòng/phút, 5 phút, r/t, Accel: 3, Decel: 3), và AIM-V được bổ sung để đạt đến 2×10^8 tế bào trong huyền phù. Lượng tương đương của CP-1 chứa 11,8% albumin huyết thanh người được bổ sung, và sau đó huyền phù tế bào không được kết dính được đặt trong túi chảy (NIPRO) và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C. ALyS505N-0 (NIPRO, #1020P10) được sử dụng làm môi trường nuôi cấy.

Trong khi đó, 30 mL AIM-V được bổ sung vào tế bào đã được kết dính trong bình, và IL-4 được bổ sung vào AIM-V trong bình để đạt đến 500 U/mL

và GM-CSF được bổ sung để đạt đến 500 U/mL, và sau đó các bình được giữ yên trong 5 ngày trong thiết bị ủ (37°C , CO_2 5%).

Vào ngày thứ năm từ khi bắt đầu nuôi cấy, IL-4 được bổ sung vào AIM-V trong bình để đạt đến 500 U/mL, GM-CSF được bổ sung để đạt đến 500 U/mL, $\text{TNF}\alpha$ được bổ sung để đạt đến 10 ng/mL, và PGE_2 được bổ sung để đạt đến 1 $\mu\text{g/mL}$, và sau đó các bình được giữ yên trong 1 ngày trong thiết bị ủ (37°C , CO_2 5%). Vào ngày thứ sáu từ khi bắt đầu nuôi cấy, α -GalCer được bổ sung vào AIM-V trong bình để đạt đến 100 ng/mL, và các bình được giữ yên trong 1 ngày nữa trong thiết bị ủ (37°C , CO_2 5%).

Vào ngày thứ bảy từ khi bắt đầu nuôi cấy, tế bào đã được tạo huyền phù được thu gom từ các bình, được ly tâm (1500 vòng/phút, 5 phút, r/t, Accel: 3, Decel: 3), và được tạo huyền phù bằng cách bổ sung 30 mL dung dịch muối sinh lý. Ly tâm (1500 vòng/phút, 5 phút, r/t, Accel: 3, Decel: 2) lại được tiến hành, và 30 mL ALyS505N-0 (chứa 100 U/mL IL-2) được bổ sung để tạo ra huyền phù. Ở đây, tế bào không được kết dính được bảo quản vào Ngày 0 được làm tan đông ở nhiệt độ 37°C , được ly tâm (1500 vòng/phút, 5 phút, r/t, Accel: 3, Decel: 2), và 30 mL ALyS505N-0 (chứa 100 U/mL IL-2) được bổ sung để tạo ra huyền phù. Các nhóm tế bào này được gieo vào các túi (với 2L môi trường nuôi cấy) thu được bằng cách nối hai túi 1L với ALyS505N-0 (chứa 100 U/mL IL-2) sử dụng ống nối, và các túi được giữ yên trong 1 ngày trong thiết bị ủ (37°C , CO_2 5%). 1 mL được lấy mẫu từ các túi đã được gieo đối với phép xác định ELISA và sau đó được ly tâm (1500 vòng/phút, 5 phút, r/t, Accel: 3, Decel: 3). Trong đó, nồng độ tế bào và tỷ lệ tế bào sống sót của tế bào được nuôi cấy trong túi 2L được xác định. Ngoài ra, phân tử bề mặt tế bào được xác định bằng bào kế chảy sử dụng một số tế bào đã được nuôi cấy trong túi 2L.

Việc xác nhận tế bào NKT được tiến hành với TCR V α 24-FITC hoặc TCR V α 24-PerCP/Cy5,5, TCR V β 11-PE, CD3-PE/Cy7, CD56-APC hoặc CD56-APC/Cy7, và việc xác nhận tế bào đuôi gai được tiến hành với CD14-PE, CD83-PE, CD80-PE hoặc CD86-PE. Các tế bào còn lại trong túi 2L còn được nuôi cấy liên tục trong từ 1 đến 2 tuần. Phân tích bào kế chảy được tiến hành để xác nhận tế bào NKT trong tế bào đã được nuôi cấy liên tục.

Kết quả phân tích bào kế chảy được thể hiện trên FIG. 1 đến 3. FIG. 1 đến 3 minh họa kết quả khi tiến hành thử nghiệm giống như vậy sử dụng tế bào thu được từ ba cá thể khỏe mạnh (ID: NKT004, NKT005, và NKT006). Va24 và Vb11 trong các hình vẽ này là hai cấu trúc siêu phân tử của thụ thể tế bào T (TCR) mà là phân tử thiết yếu đối với việc nhận diện kháng nguyên, và cũng là cấu trúc siêu phân tử TCR mà nhận diện α -GalCer. Nếu kháng thể huỳnh quang mà liên kết đặc hiệu với các cấu trúc siêu phân tử này được trộn với nhóm tế bào cần được kiểm tra và sau đó phân tích bào kế chảy được tiến hành, tế bào mà kháng thể nhận diện Va24 đã kết dính với nó sẽ dịch chuyển theo hướng nằm ngang và tế bào mà kháng thể nhận diện Vb11 đã kết dính với nó sẽ dịch chuyển theo hướng thẳng đứng, và mật độ huỳnh quang được phát hiện rõ ràng. Tế bào mà cả hai kháng thể này đã liên kết với xuất hiện dưới dạng các chấm trong hình vuông ở tâm của đồ thị. Mỗi trong số các chấm này đại diện cho tế bào NKT. Giá trị số (%) biểu thị trong các hình vẽ là tỷ lệ tế bào NKT chiếm so với tổng số lượng tế bào được sử dụng trong một phân tích. Trong tất cả các thử nghiệm, tỷ lệ tế bào NKT đạt được tối đa tại thời điểm một tuần từ khi bắt đầu nuôi cấy. FIG. 4 thể hiện tỷ lệ sống sót tế bào trong nhóm thử nghiệm này. FIG. 5 thể hiện tổng số lượng tế bào đuôi gai sau khi nuôi cấy, tỷ lệ tế bào sống sót, và tỷ lệ biệt hóa đối với tế bào đuôi gai (DC) trong nhóm thử nghiệm này.

Như rõ ràng từ FIG. 1 đến 3 và 5, sự tăng sinh tế bào NKT dễ thấy (đạt đến tối đa khoảng 30 lần) được xác nhận sau 1 tuần nuôi cấy khi phân lập bạch cầu đơn nhân to bằng cách làm cho bạch cầu đơn nhân to trong số tế bào đơn nhân kết dính với bề mặt đáy của bình và sau đó làm cho bạch cầu đơn nhân to biệt hóa thành tế bào đuôi gai. Cũng đã xác nhận được rằng tỷ lệ tế bào NKT có xu hướng giảm sau hai tuần. Trong khoảng thời gian nuôi cấy, không có sự thay đổi trong tổng số lượng tế bào, và không có sự giảm tỷ lệ tế bào sống sót (FIG. 4).

Ví dụ 2

Vào ngày đầu tiên (Ngày 0), các thành phần tế bào trước tiên được phân lập bằng kỹ thuật phân tách thành phần máu. Các thành phần tế bào được tạo lớp thành các lớp, mỗi lớp 30 mL trong LeucoSep, và ly tâm (3000 vòng/phút, 20 phút, r/t, Accel: 1, Decel: 1) được tiến hành. Lớp tế bào đơn nhân được thu gom trong ống ly tâm dung tích 50 mL, lượng tương đương của dung dịch muối sinh lý được bổ sung vào đó để tạo ra huyền phù, và sau đó ly tâm (1500 vòng/phút, 5 phút, r/t, Accel: 3, Decel: 2) được tiến hành. Sau đó, 30 mL AIM-V được bổ sung để tạo ra huyền phù, và khối kết tụ tế bào được loại bỏ bằng cách sử dụng bộ lọc tế bào và số lượng tế bào được xác định. 2×10^7 tế bào đơn nhân được lấy mẫu (đối với Ngày 0) để sử dụng trong phép đo bào kế chảy. Các tế bào này được xác định đối với CD14, CD83, và CD86 bằng bào kế chảy. Tế bào đơn nhân được gieo vào sáu bình nuôi cấy huyền phù 225 cm² đã được bổ sung 30 mL AIM-V, và các bình được giữ yên trong hai giờ trong thiết bị ủ (37°C, CO₂ 5%). Sau đó, tế bào không được kết dính được loại bỏ, và 30 mL AIM-V được bổ sung vào tế bào đã được kết dính trong bình. IL-4 được bổ sung vào AIM-V trong bình để đạt đến 500 U/mL và GM-CSF được bổ sung để

đạt đến 500 U/mL, và sau đó các bình được giữ yên trong 5 ngày trong thiết bị ủ (37°C , CO_2 5%).

Vào ngày thứ năm sau khi bắt đầu nuôi cấy, IL-4 được bổ sung vào AIM-V trong bình, để đạt đến 500 U/mL, GM-CSF được bổ sung để đạt đến 500 U/mL, TNF- α được bổ sung để đạt đến 10 ng/mL, và PGE₂ được bổ sung để đạt đến 1 $\mu\text{g/mL}$, và sau đó các bình được giữ yên trong 1 ngày trong thiết bị ủ (37°C , CO_2 5%). Vào ngày thứ sáu từ khi bắt đầu nuôi cấy, α -GalCer được bổ sung vào AIM-V trong bình để đạt đến 100 ng/mL, và các bình được giữ yên trong 1 ngày trong thiết bị ủ (37°C , CO_2 5%).

Vào ngày thứ bảy từ khi bắt đầu nuôi cấy, tế bào đã được tạo huyền phù được thu gom từ các bình, được ly tâm (1500 vòng/phút, 5 phút, r/t, Accel: 3, Decel: 3), và được tạo huyền phù bằng cách bổ sung 30 mL dung dịch muối sinh lý, và sau đó ly tâm (1500 vòng/phút, 5 phút, r/t, Accel: 3, Decel: 2) lại được tiến hành. Tế bào kết tủa được tạo huyền phù bằng cách bổ sung 30 mL dung dịch muối sinh lý và sau đó được ly tâm (1500 vòng/phút, 5 phút, r/t, Accel: 3, Decel: 2), và công đoạn tạo huyền phù giống như vậy bằng cách bổ sung 30 mL dung dịch muối sinh lý được lặp lại hai lần nữa. Một phần của chất lỏng huyền phù tế bào thu được được lấy mẫu, và nồng độ tế bào và tỷ lệ tế bào sống sót của nó được xác định. Ngoài ra, CD14, CD83, và CD86 trên bề mặt tế bào được xác định bằng bào kế chảy. Sau đó, ly tâm (1500 vòng/phút, 5 phút, r/t, Accel: 3, Decel: 2) được tiến hành và các tế bào đã được thu gom được tạo huyền phù trong 6 mL chất lỏng bảo quản lạnh (10% DMSO, 90% tự huyết thanh), và huyền phù này được phân phối vào các lọ với lượng bằng 1 mL mỗi lọ. Các lọ được bảo quản ở nhiệt độ -80°C . Sau khi làm tan đông, CD14, CD83, và CD86 trên bề mặt tế bào được xác định bằng bào kế chảy.

FIG. 6 đến 8 thể hiện kết quả trong quá trình phân tích CD14, CD83, và CD86 trên bề mặt tế bào bằng bào kế chảy vào Ngày 0, trước khi kết đông (sau khi cảm ứng sự biệt hóa), và sau khi kết đông và làm tan đông đối với tế bào của ba cá thể khỏe mạnh (ID: NKT007, NKT008, và NKT009). FIG. 9 thể hiện tổng số lượng tế bào và tỷ lệ tế bào sống sót trước khi kết đông và sau khi làm tan đông/rửa đối với nhóm thử nghiệm tương ứng với FIG. 6 đến 8. Trong mỗi mẫu, không có sự khác biệt về các chất đánh dấu bề mặt trước và sau khi kết đông đối với tế bào được cảm ứng biệt hóa, và sự biến mất của CD14 và sự tăng cường CD83 và CD86 được xác nhận (FIG. 6 đến 8). Ngoài ra, trong mỗi mẫu, không có sự thay đổi trong tỷ lệ tế bào sống sót trước và sau khi kết đông (FIG. 9).

Ví dụ so sánh

Tham chiếu đến phương pháp được bộc lộ trong Tài liệu phi sáng chế 1, thử nghiệm sau được tiến hành bằng cách sử dụng tế bào đơn nhân thu được từ ba cá thể khỏe mạnh (ID: NKT001, NKT002, NKT003). Vào ngày đầu tiên (Ngày 0), các thành phần tế bào trước tiên được phân lập bằng kỹ thuật phân tách thành phần máu. Các thành phần tế bào được tạo lớp thành các lớp, mỗi lớp 30 mL trong LeucoSep, và ly tâm (3000 vòng/phút, 20 phút, r/t, Accel: 1, Decel: 1) được tiến hành. Sau đó, lớp tế bào đơn nhân được thu gom trong ống ly tâm dung tích 50 mL, lượng tương đương của dung dịch muối sinh lý được bổ sung vào đó để tạo ra huyền phù, và sau đó ly tâm (1500 vòng/phút, 5 phút, r/t, Accel: 3, Decel: 2) được tiến hành. Sau khi loại bỏ dịch nổi bề mặt, 30 mL AlyS505N-0 (chứa 100 U/mL IL-2) sau đó được bổ sung để tạo ra huyền phù, và khối kết tụ tế bào được loại bỏ bằng cách sử dụng bộ lọc tế bào và số lượng tế bào được xác định. 2×10^7 tế bào đơn nhân được lấy mẫu (cho Ngày 0) để sử

dụng trong phép đo bào kế chảy. Tế bào đơn nhân được gieo vào bốn bình nuôi cấy huyền phù 225 cm² với lượng bằng 6×10^7 tế bào/60 mL, và (các) chất phản ứng được bổ sung như được thể hiện dưới đây vào bốn bình.

Bình 1: không có gì

Bình 2: 800 U/mL GM-CSF

Bình 3: 100 ng/mL α -GalCer

Bình 4: 800 U/mL GM-CSF + 100 ng/mL α -GalCer

Các bình được giữ yên trong thiết bị ủ (37°C, CO₂ 5%), và các tế bào còn lại được gieo vào các túi (với 2L môi trường nuôi cấy) thu được bằng cách nối hai túi 1L với ALyS505N-0 (chứa 100 U/mL IL-2, 800 U/mL GM-CSF, và 100 ng/mL α -GalCer) sử dụng ống nối. Các túi đã được gieo được giữ yên trong 6 ngày trong thiết bị ủ (37°C, CO₂ 5%). Phân tử bề mặt tế bào của các tế bào nêu trên để xác định bằng bào kế chảy được xác định theo cách giống như trong Ví dụ 1.

Vào ngày thứ hai (Ngày 2) sau khi bắt đầu nuôi cấy, 20 mL chất lỏng nuôi cấy được thu gom từ mỗi bình, và nồng độ tế bào và tỷ lệ tế bào sống sót được xác định. Sau đó, chất lỏng nuôi cấy được ly tâm (1500 vòng/phút, 5 phút, r/t, Accel: 3, Decel: 3), và sau đó 1 mL của chất lỏng này được lấy mẫu tiếp và được ly tâm (1500 vòng/phút, 5 phút, r/t, Accel: 3, Decel: 3). Phân tử bề mặt tế bào của tế bào đã được ly tâm được xác định bằng cách sử dụng bào kế chảy.

Vào ngày thứ sáu (Ngày 6) sau khi bắt đầu nuôi cấy, 20 mL được thu gom từ mỗi bình, và nồng độ tế bào và tỷ lệ tế bào sống sót được xác định. Sau đó, chất lỏng nuôi cấy được ly tâm (1500 vòng/phút, 5 phút, r/t, Accel: 3, Decel: 3), và sau đó 1 mL của chất lỏng này được lấy mẫu tiếp và được ly tâm

(1500 vòng/phút, 5 phút, r/t, Accel: 3, Decel: 3). Phân tử bề mặt tế bào của tế bào đã được ly tâm được xác định bằng cách sử dụng bào kế chảy.

Tế bào NKT được phân tích bằng bào kế chảy vào Ngày 0, Ngày 2, và Ngày 6, và tế bào đuôi gai được phân tích bằng bào kế chảy vào Ngày 0 và Ngày 6. Việc nuôi cấy được tiến hành trong các điều kiện trong đó không có xytokin được bổ sung, trong đó chỉ có GM-CSF được bổ sung, trong đó chỉ có α -GalCer được bổ sung, và trong đó cả GM-CSF và α -GalCer đều được bổ sung. FIG. 10(A) đến 10(C), FIG. 11(A) đến 11(C), và FIG. 12(A) đến 12(C) thể hiện kết quả khi phân tích bằng bào kế chảy đối với tế bào NKT vào Ngày 0, Ngày 2, và Ngày 6 đối với ba cá thể khỏe mạnh (ID: NKT001, NKT002, NKT003). FIG. 13(A) và 13(B), FIG. 14(A) và 14(B), và FIG. 15(A) và 15(B) thể hiện kết quả khi phân tích bằng bào kế chảy đối với tế bào đuôi gai vào Ngày 0 và Ngày 6 đối với ba cá thể khỏe mạnh (ID: NKT001, NKT002, NKT003). FIG. 16 thể hiện tỷ lệ sống sót tế bào trong nhóm thử nghiệm này. Như được thể hiện trên FIG. 10(C), 11(C), và 12(C), không có sự tăng sinh tế bào NKT có thể được xác nhận sau 1 tuần nuôi cấy. Không có sự thay đổi trong tổng số lượng tế bào trong khoảng thời gian nuôi cấy này, và không có sự giảm tỷ lệ tế bào sống sót (FIG. 16). Ngoài ra, như được thể hiện trên FIG. 13(B), 14(B), và 15(B), trong khi xu hướng đối với bạch cầu đơn nhân to để biệt hóa thành tế bào đuôi gai được quan sát thấy trong mỗi nhóm thử nghiệm, nhưng không thu được kết quả rõ ràng.

Dựa vào những gì nêu trên đây, có thể hiểu rằng trong phương pháp của Ví dụ 1 và 2, tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT thu được với hiệu quả tốt trong khoảng thời gian ngắn khoảng 1 tuần, và sự tăng sinh tế bào NKT đạt được, so với phương pháp của Ví dụ so sánh. Ngoài ra, trong phương pháp của

Ví dụ so sánh, môi trường nuôi cấy lỏng được sử dụng trong túi nuôi cấy tế bào và lượng môi trường nuôi cấy được sử dụng là lớn hơn trong phương pháp của Ví dụ 1 và 2. Nói cách khác, phương pháp của Ví dụ 1 và 2 sử dụng ít môi trường nuôi cấy hơn (khoảng một phần mười) so với phương pháp của Ví dụ so sánh, và do đó, có tính kinh tế.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Sáng chế là hữu ích trong việc sản xuất tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT và sản xuất chế phẩm tế bào chứa tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT và tế bào NKT, mà được sử dụng trong, ví dụ, trị liệu miễn dịch. Theo các phương pháp sản xuất này, phương pháp sản xuất tế bào đuôi gai và chế phẩm tế bào hiệu quả cao, ổn định, và kinh tế có thể được cung cấp, và do đó, sáng chế là hữu ích về mặt công nghiệp.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất tế bào đuôi gai kích thích tế bào T diệt tự nhiên (NKT), phương pháp này bao gồm các bước:

(a1) bước kết dính trong đó tế bào đơn nhân được đặt vào bình nuôi cấy và bình nuôi cấy này được để yên để cho phép một số tế bào đơn nhân kết dính với bề mặt đáy của bình;

(b1) bước loại bỏ trong đó tế bào đã được tạo huyền phù khác với tế bào mà đã kết dính với bề mặt đáy của bình nuôi cấy được loại bỏ;

(c1) bước biệt hóa trong đó yếu tố đã được xác định trước được bổ sung vào bình nuôi cấy để làm cho bạch cầu đơn nhân to trong số các tế bào mà đã kết dính với bề mặt đáy biệt hóa thành tế bào đuôi gai chưa thành thực;

(d1) bước thành thực trong đó yếu tố đã được xác định trước được bổ sung vào bình nuôi cấy để làm thành thực tế bào đuôi gai chưa thành thực; và

(e1) bước cảm ứng trong đó α -galactosylxeramit được bổ sung vào bình nuôi cấy để cảm ứng tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT từ tế bào đuôi gai trưởng thành.

2. Phương pháp sản xuất tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT theo điểm 1, trong đó yếu tố đã được xác định trước trong bước biệt hóa là ít nhất một trong số IL-4 và yếu tố kích thích tạo cụm đại thực bào bạch cầu hạt.

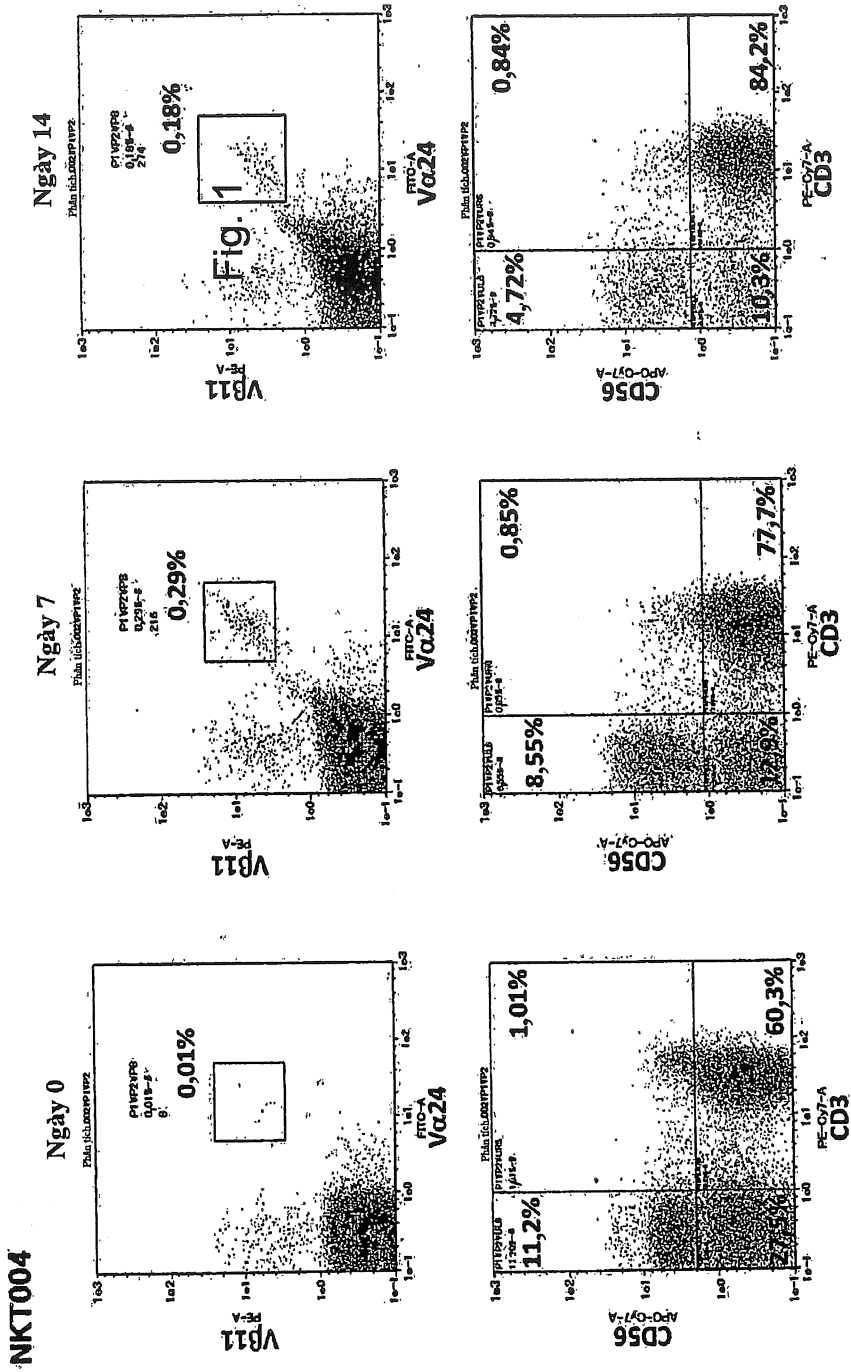
3. Phương pháp sản xuất tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT theo điểm 1 hoặc 2, trong đó yếu tố đã được xác định trước trong bước thành thực là ít nhất một yếu tố được chọn từ nhóm bao gồm IL-4, yếu tố kích thích tạo cụm đại thực bào bạch cầu hạt, yếu tố hoại tử khối u α , và prostaglandin E2.

4. Phương pháp sản xuất tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT theo điểm bất

kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó nồng độ của α -galactosylxeramit trong bước cảm ứng nằm trong khoảng từ 10 đến 1.000 ng/mL.

5. Phương pháp sản xuất tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước bảo quản lạnh tế bào đuôi gai kích thích tế bào NKT thu được.

Fig. 1



WKT005

Ngày 7

Ngày 14

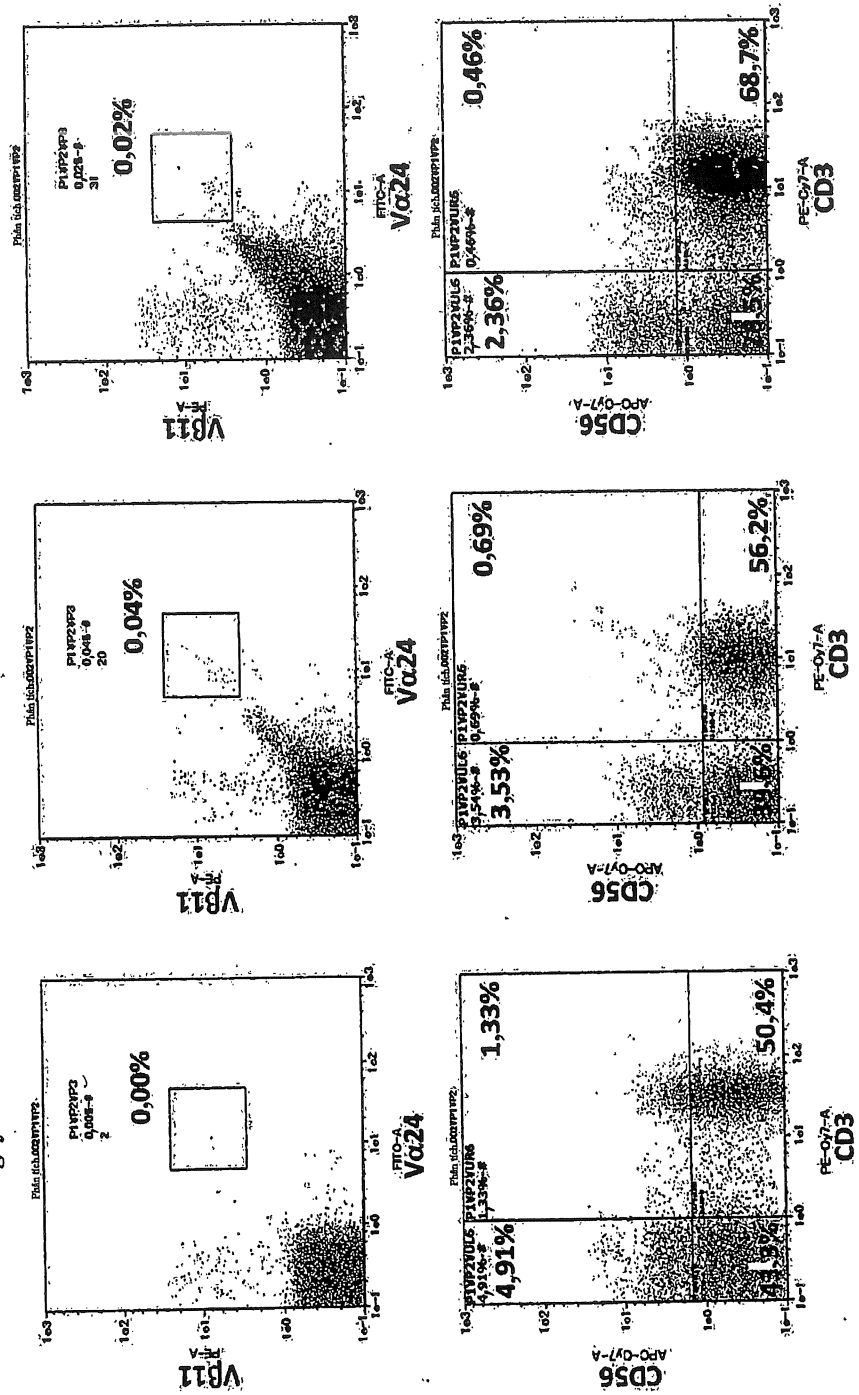


Fig. 3

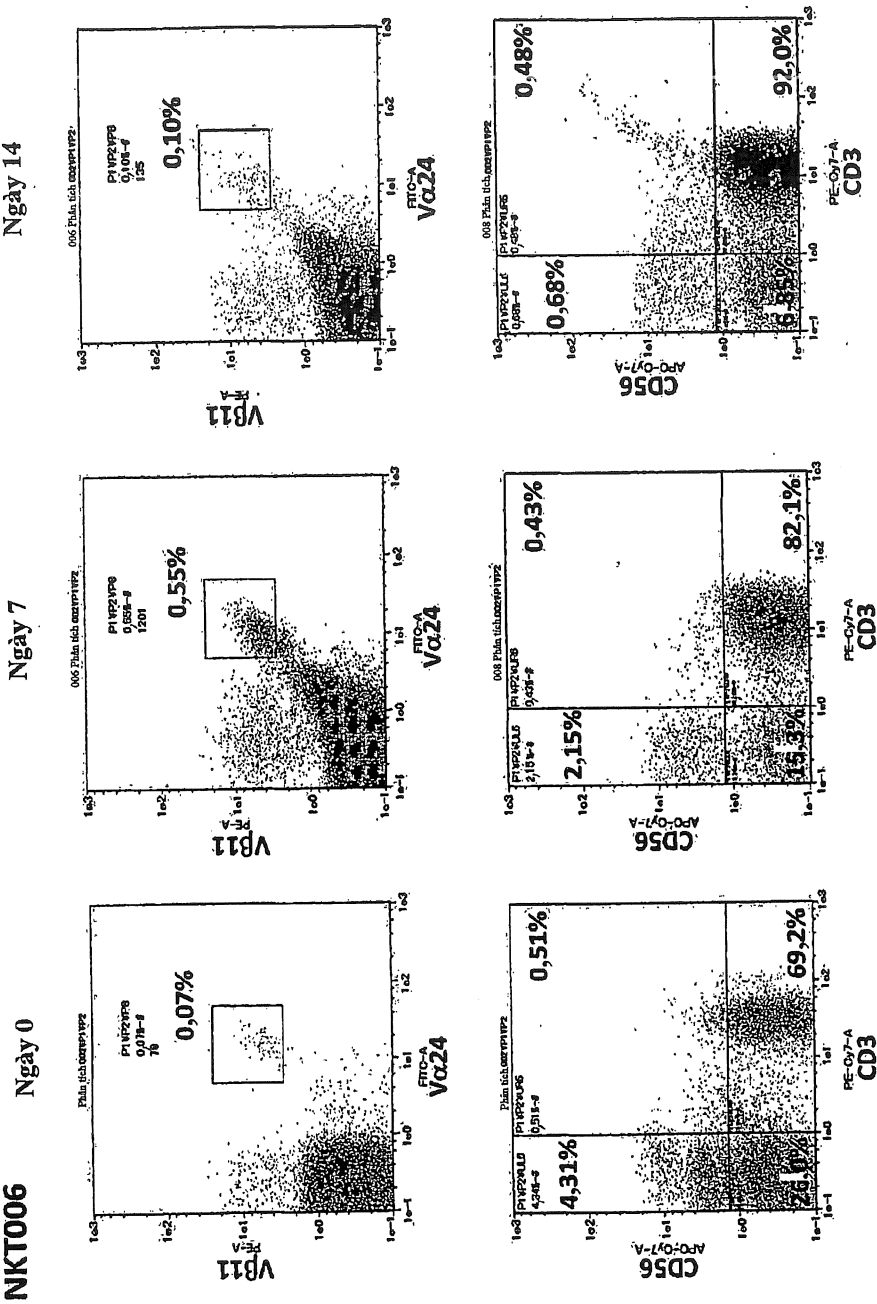


Fig. 4

Tổng số lượng tế bào và tỷ lệ tế bào sống sót (Nuôi cấy ngược)

	Ngày 0		Ngày 7		Ngày 14	
	Tổng số lượng tế bào	Tỷ lệ tế bào sống sót	Tổng số lượng tế bào	Tỷ lệ tế bào sống sót	Tổng số lượng tế bào	Tỷ lệ tế bào sống sót
NKT004	$1,11 \times 10^9$ tế bào	91,9%	$0,68 \times 10^9$ tế bào	91,2%	$0,82 \times 10^9$ tế bào	84,1%
NKT005	$2,61 \times 10^9$ tế bào	85,4%	$1,04 \times 10^9$ tế bào	88,5%	$1,34 \times 10^9$ tế bào	92,5%
NKT006	$0,77 \times 10^9$ tế bào	85,7%	$0,79 \times 10^9$ tế bào	92,4%	$0,41 \times 10^9$ tế bào	82,9%

5/24

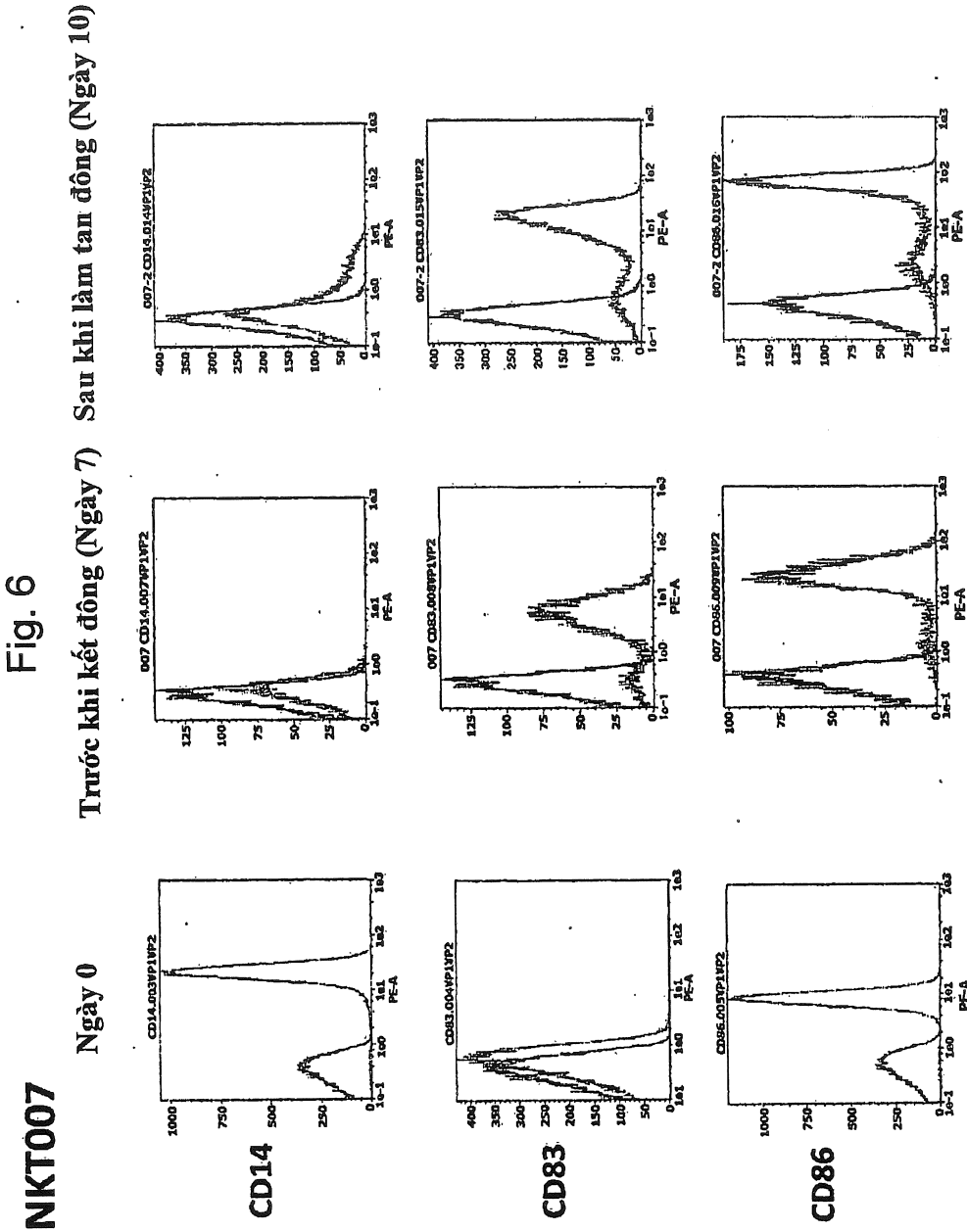
Fig. 5

Tổng số lượng tế bào	Tỷ lệ tế bào sống sót	Tỷ lệ biệt hóa DC
$10,0 \times 10^7$ tế bào ($\pm 3,90 \times 10^7$) tế bào	90,5% ($\pm 3,50$)	約 100%

Fig. 9

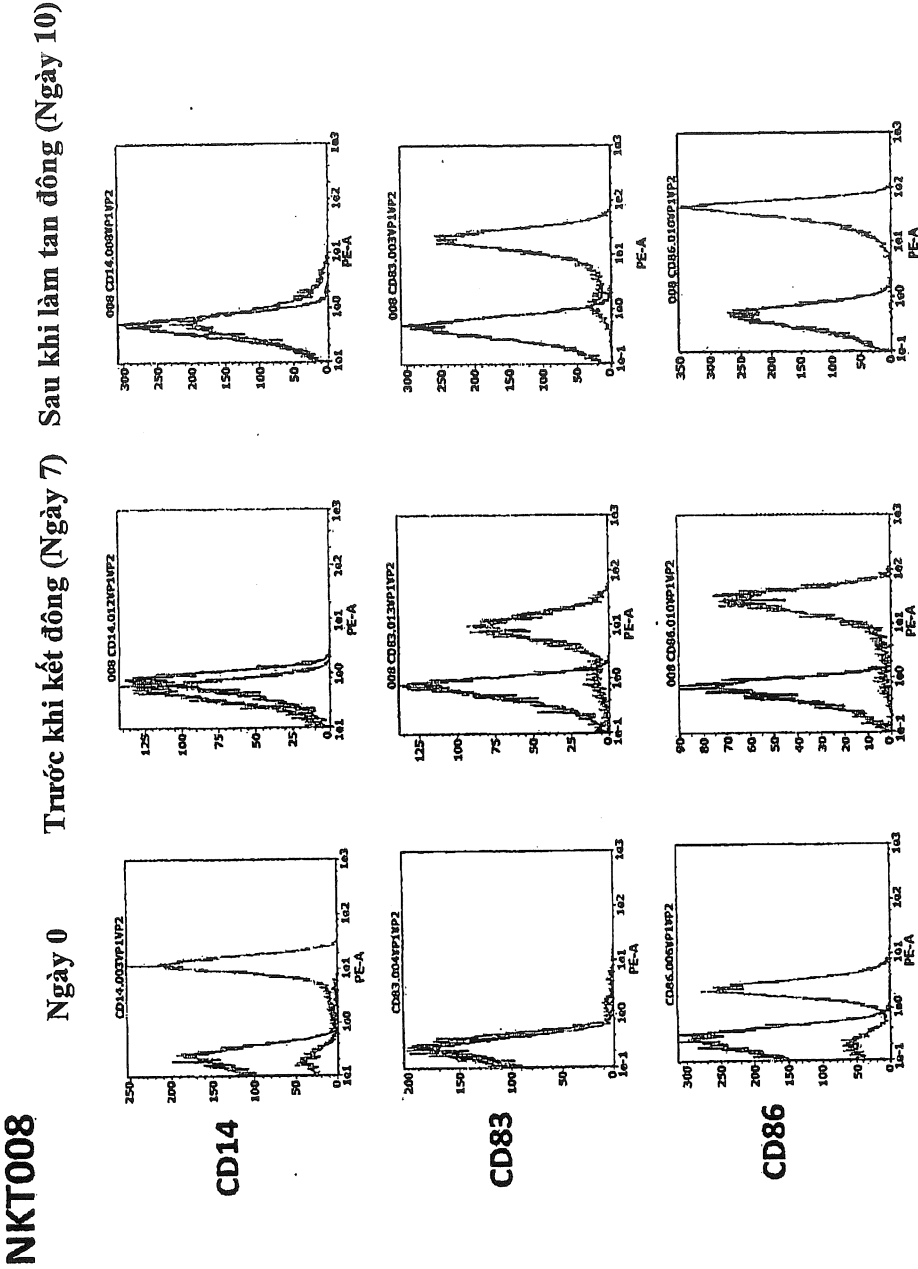
Tổng số lượng tế bào và tỷ lệ tế bào sống sót (Tế bào đuôi gai)

	Trước khi làm tan đông		Sau khi làm tan đông và rửa	
	Tổng số lượng tế bào	Tỷ lệ tế bào sống sót	Tổng số lượng tế bào	Tỷ lệ tế bào sống sót
NKT007	$9,87 \times 10^7$ tế bào	88,5%	$4,56 \times 10^7$ tế bào	92,3%
NKT008	$6,23 \times 10^7$ tế bào	94,0%	$3,26 \times 10^7$ tế bào	85,9%
NKT009	$13,9 \times 10^7$ tế bào	89,2%	$8,94 \times 10^7$ tế bào	87,2%

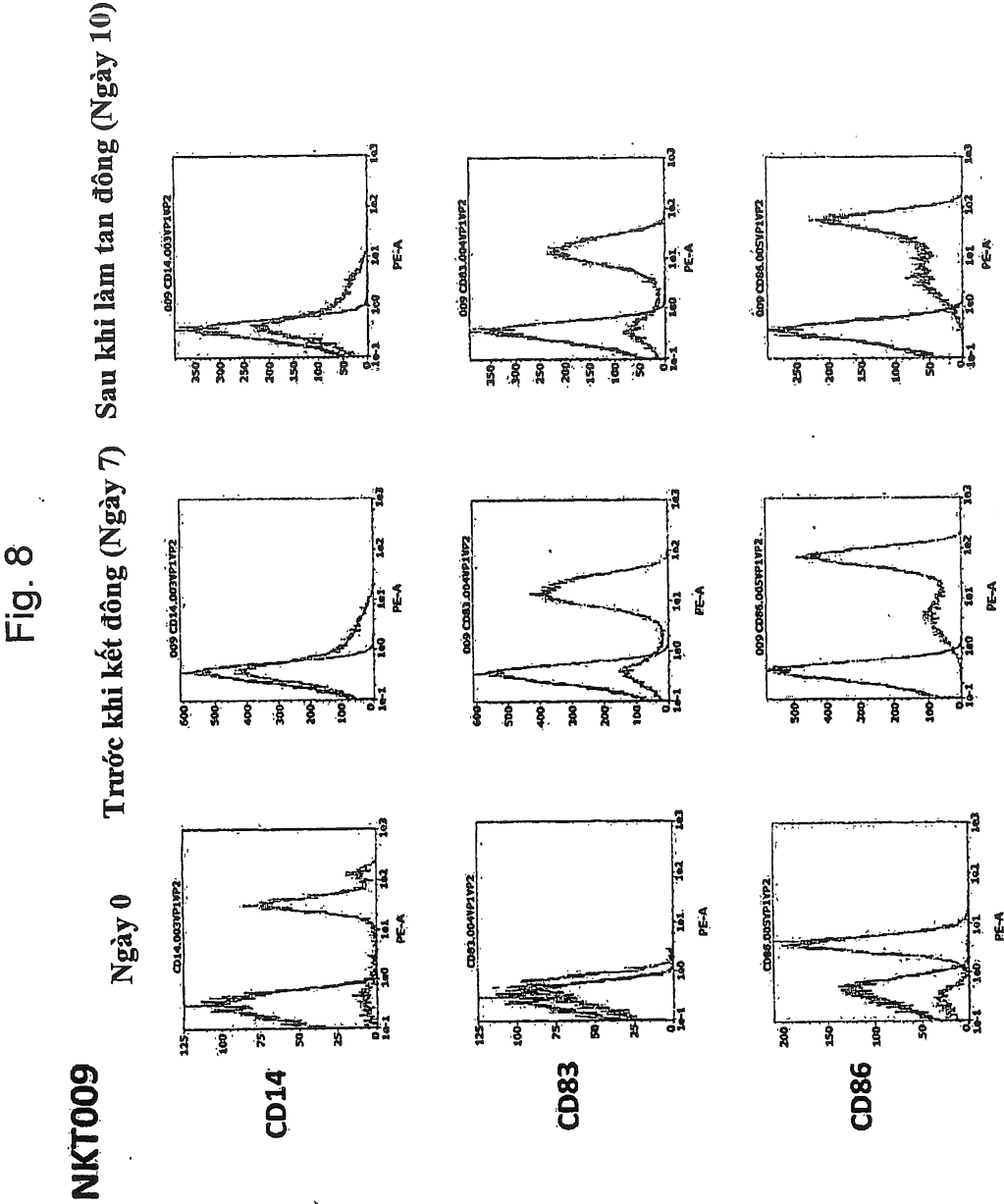


7/24

Fig. 7



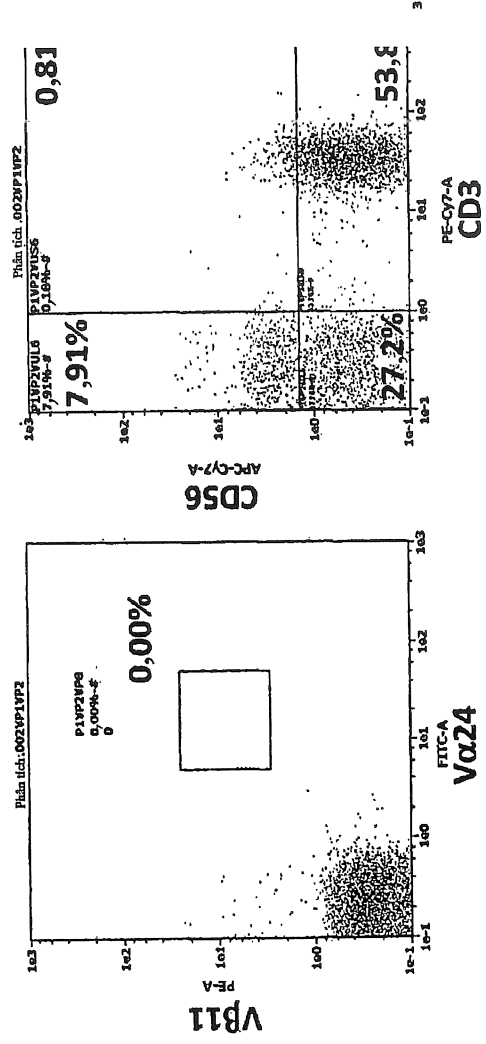
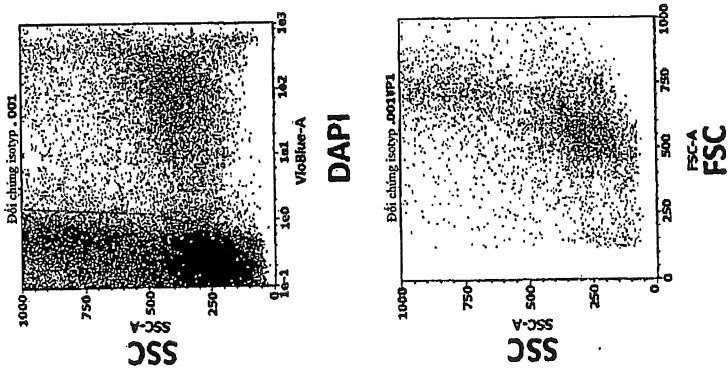
8/24



9/24

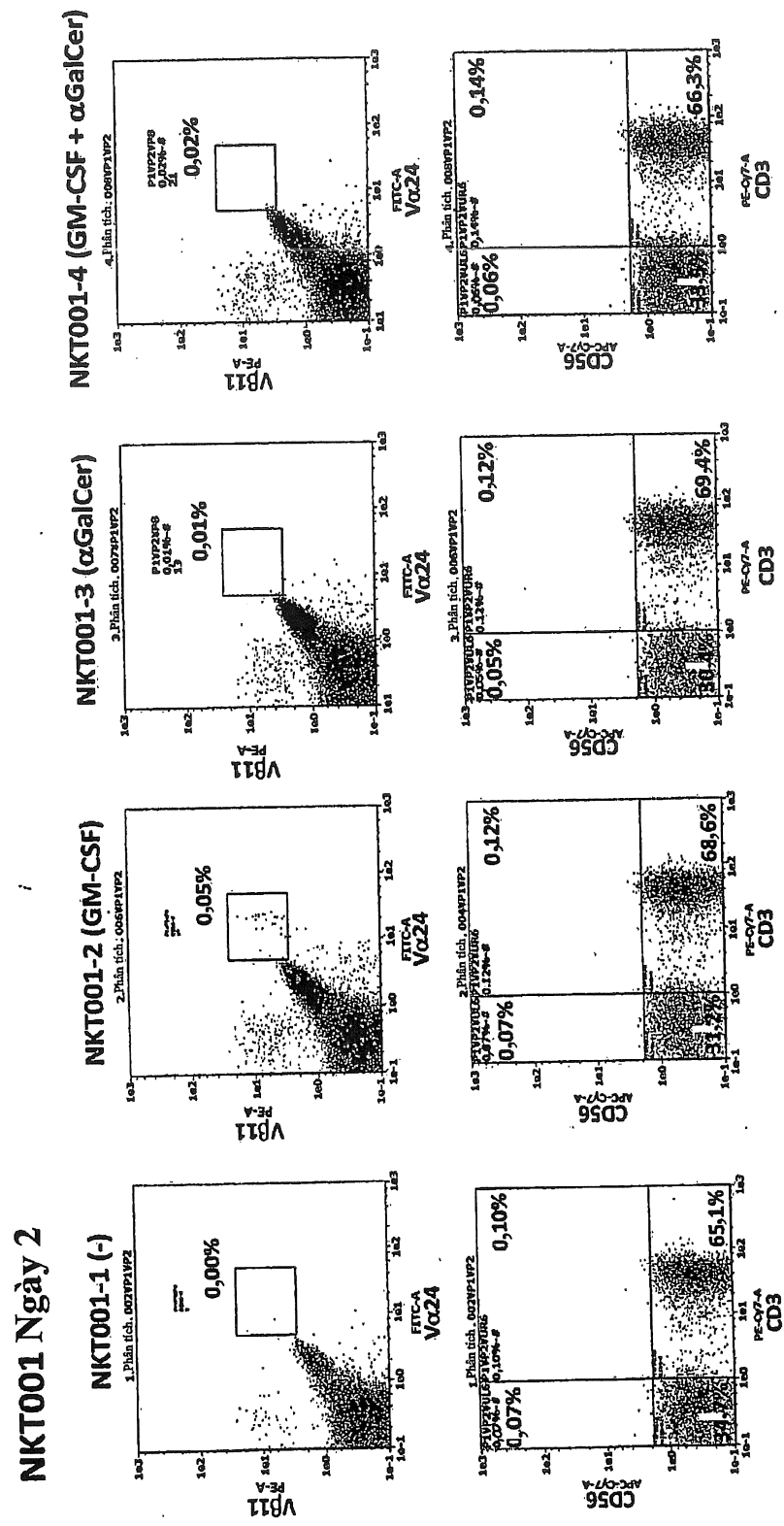
Fig. 10A

NKT001 Ngày 0



10/24

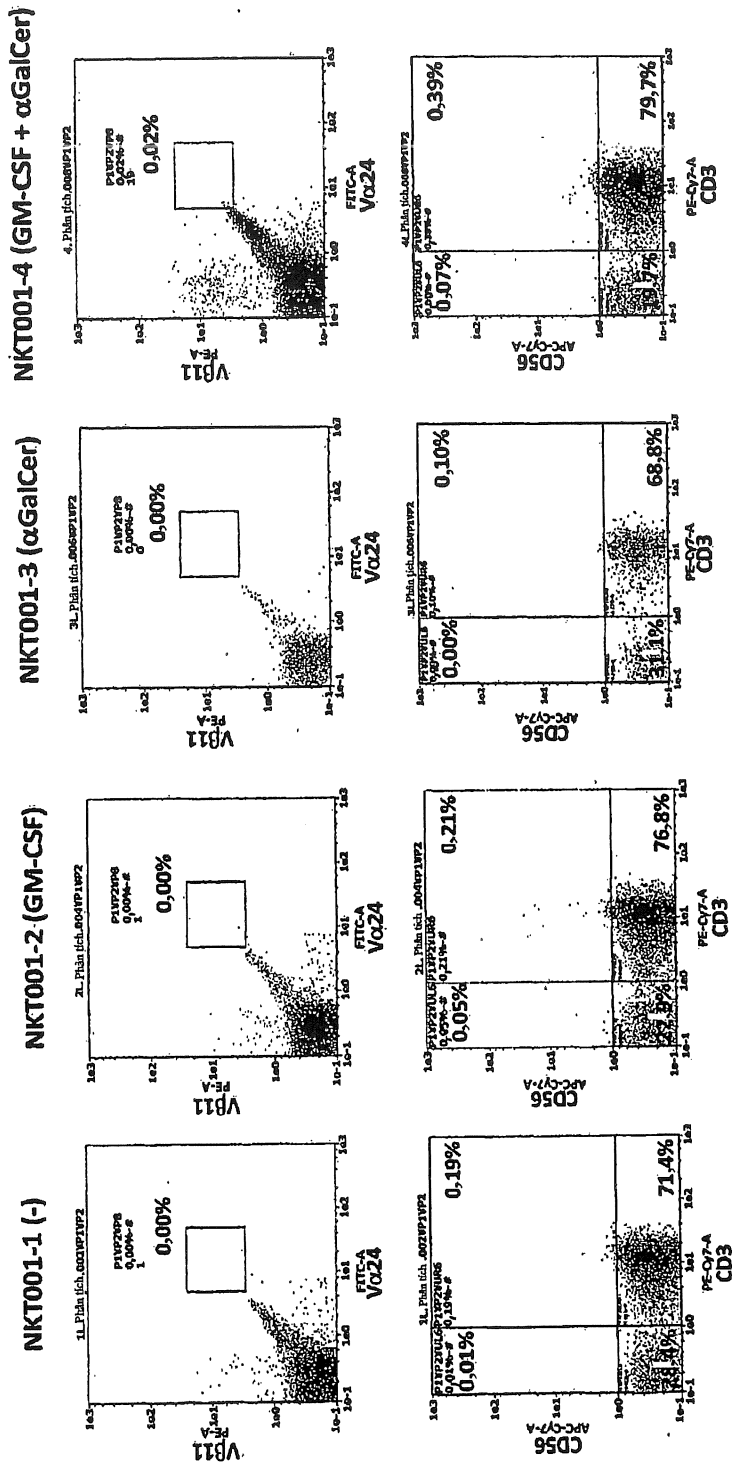
Fig. 10B



11/24

Fig. 10C

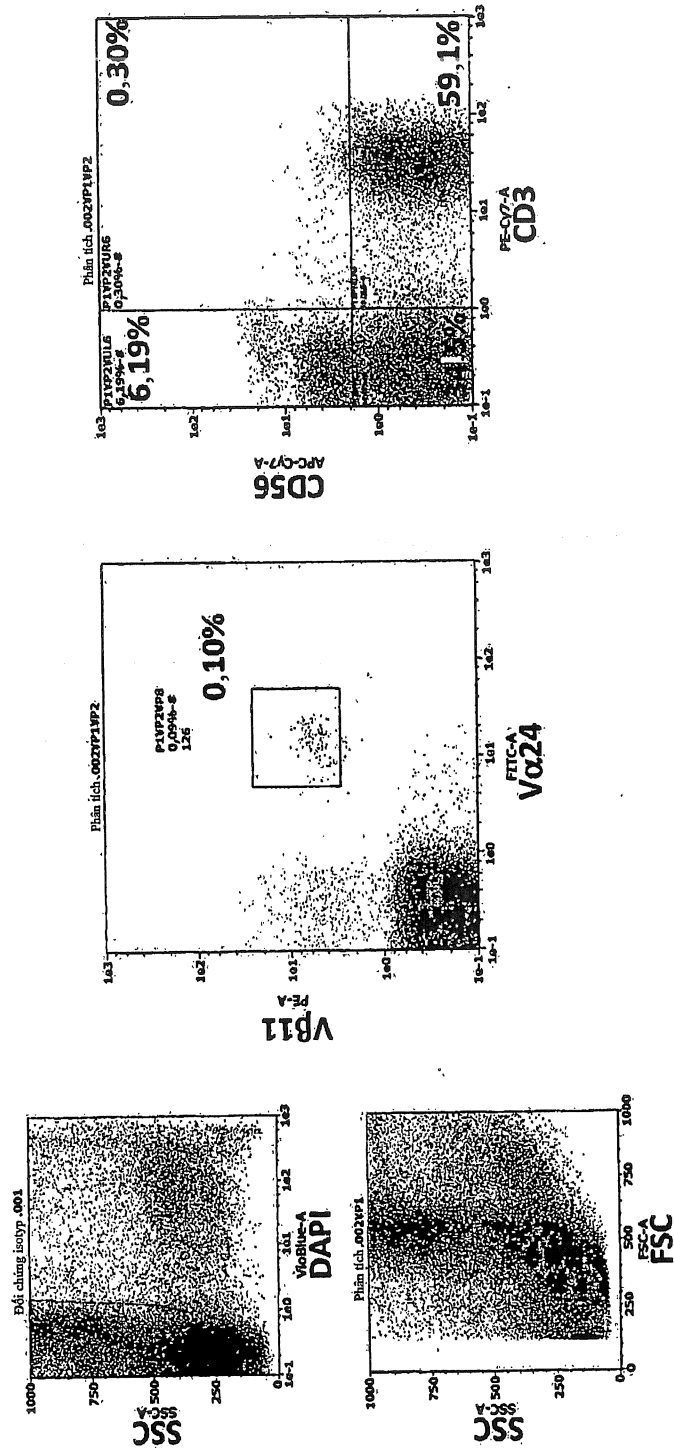
NKT001 Ngày 6



12/24

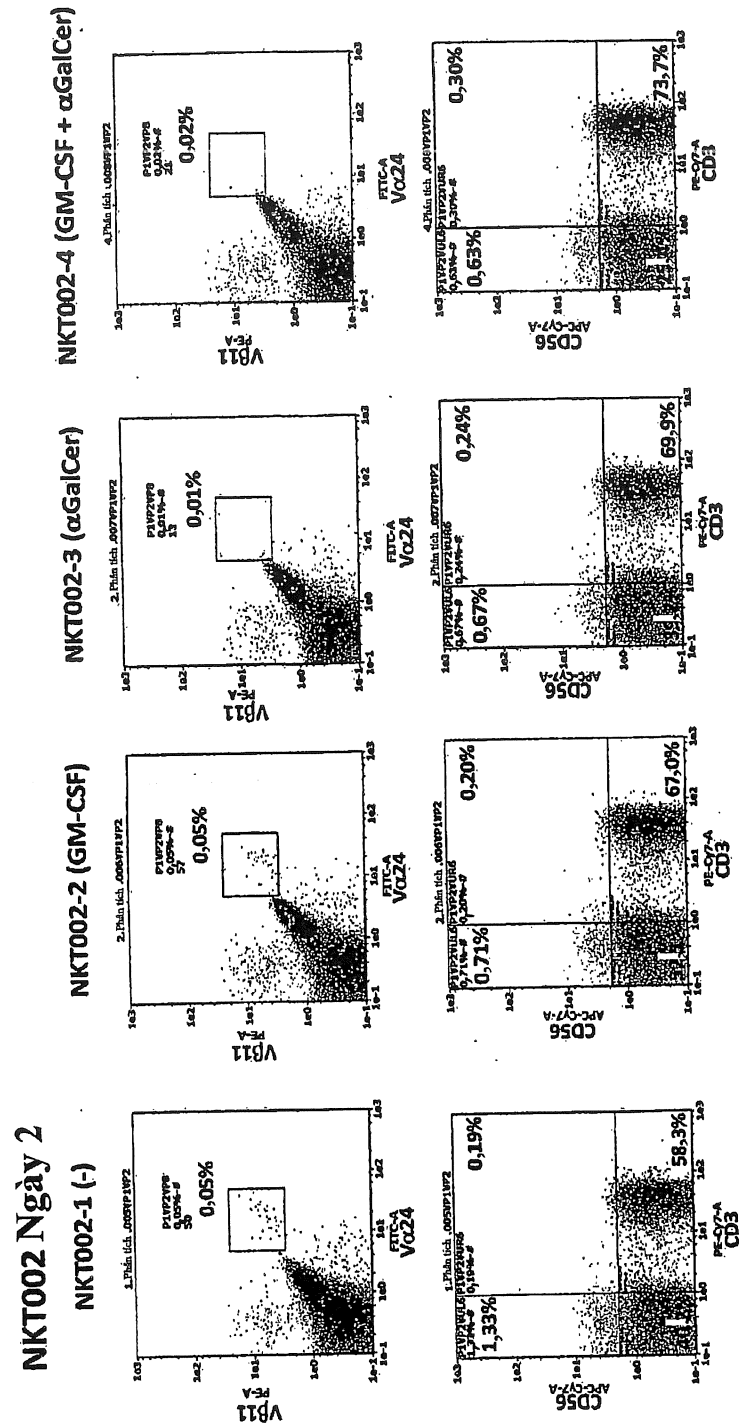
NKT002 Ngày 0

Fig. 11A



13/24

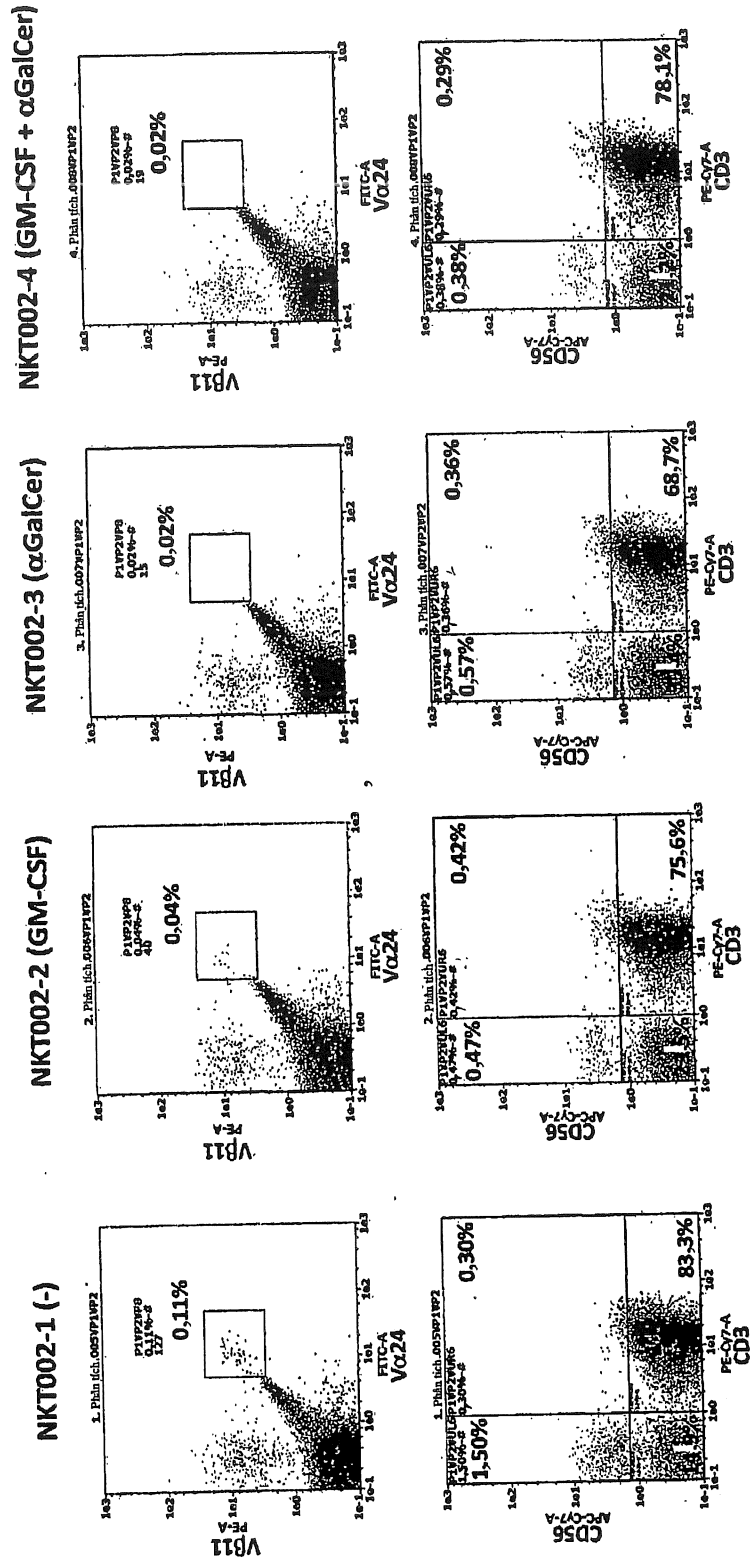
Fig. 11B



14/24

Fig. 11C

NKT002 Ngày 6



15/24

NKT003 Ngày 0

Fig 12A

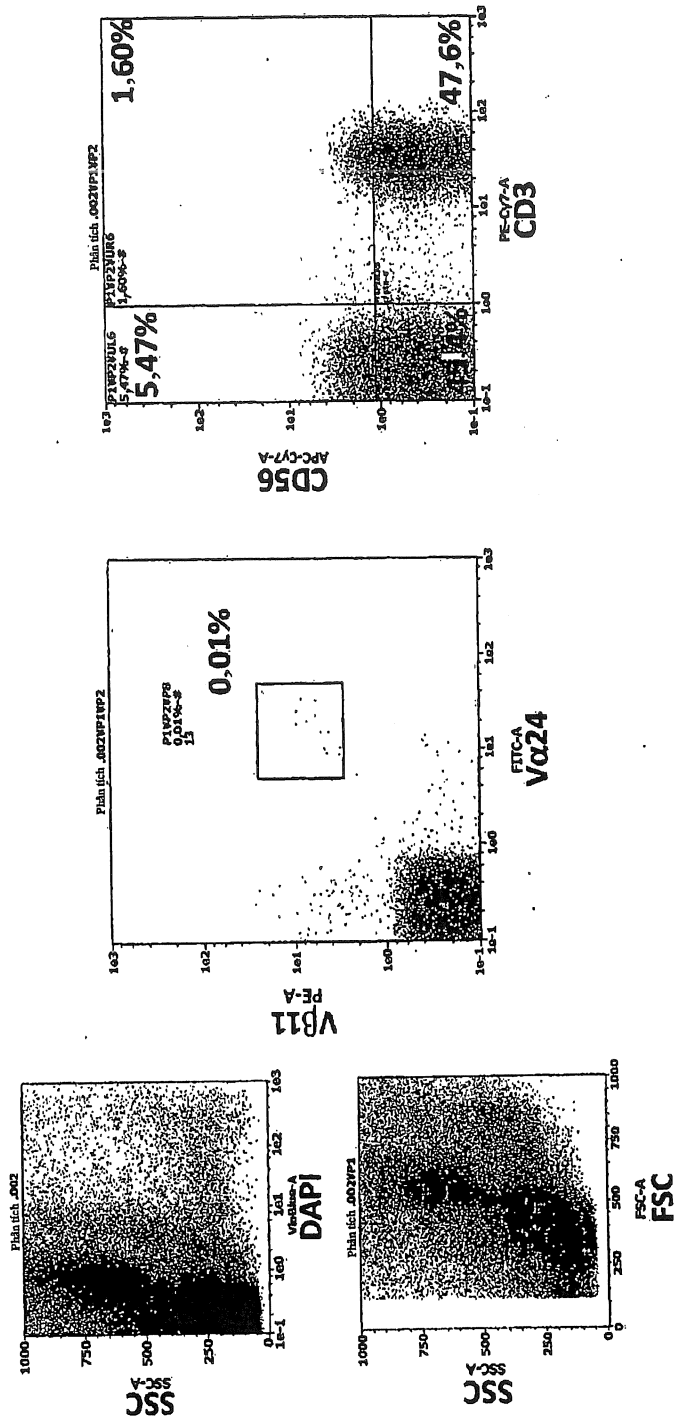
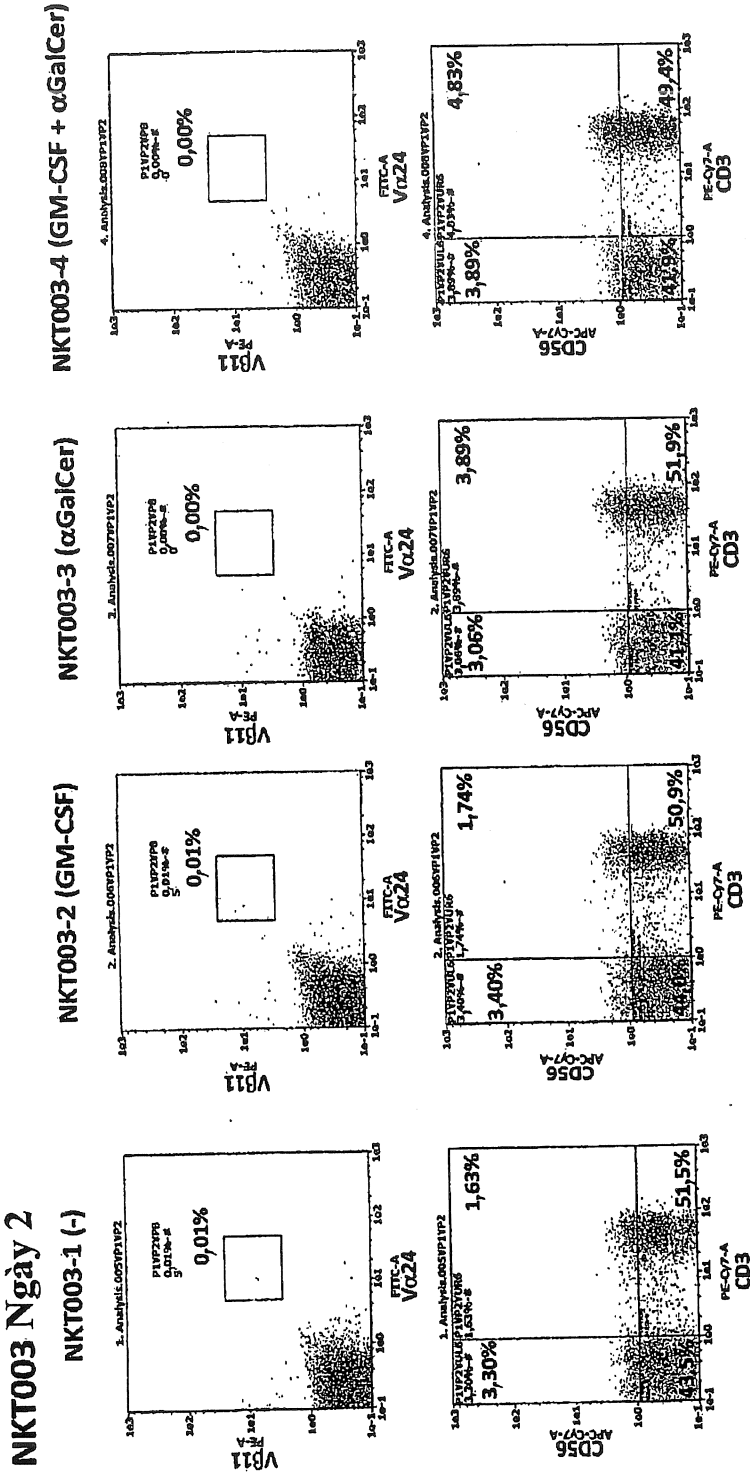


Fig 12B

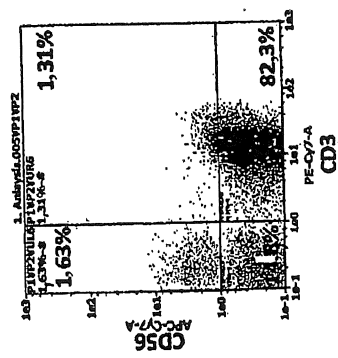
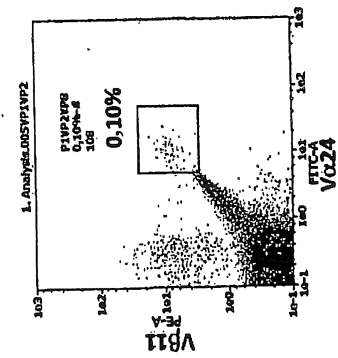


17/24

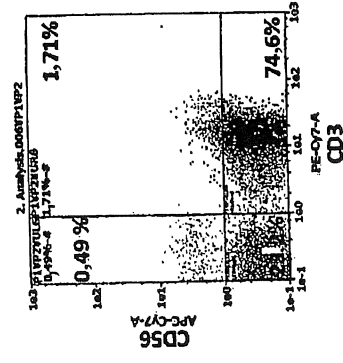
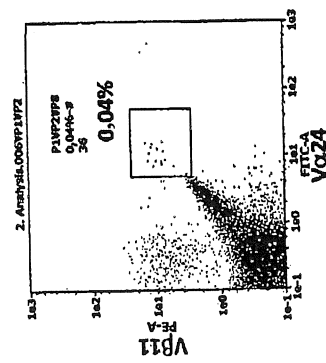
Fig 12C

NKT003 Ngày 6

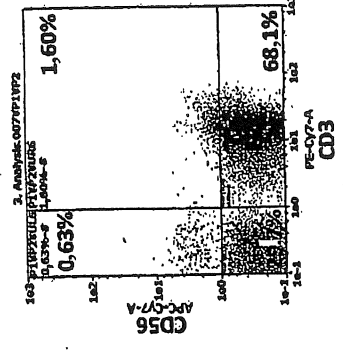
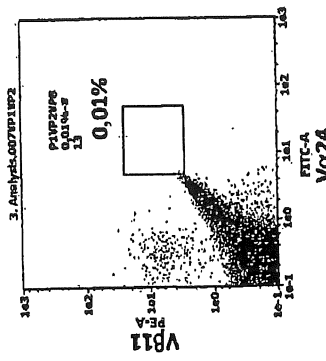
NKT003-1 (-)



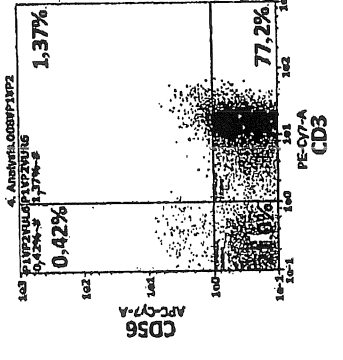
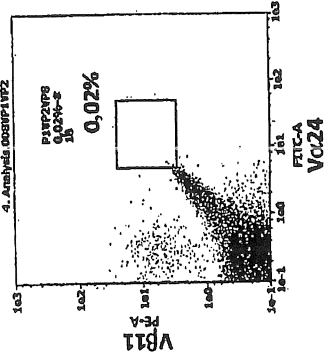
NKT003-2 (GM-CSF)



NKT003-3 (αGalCer)



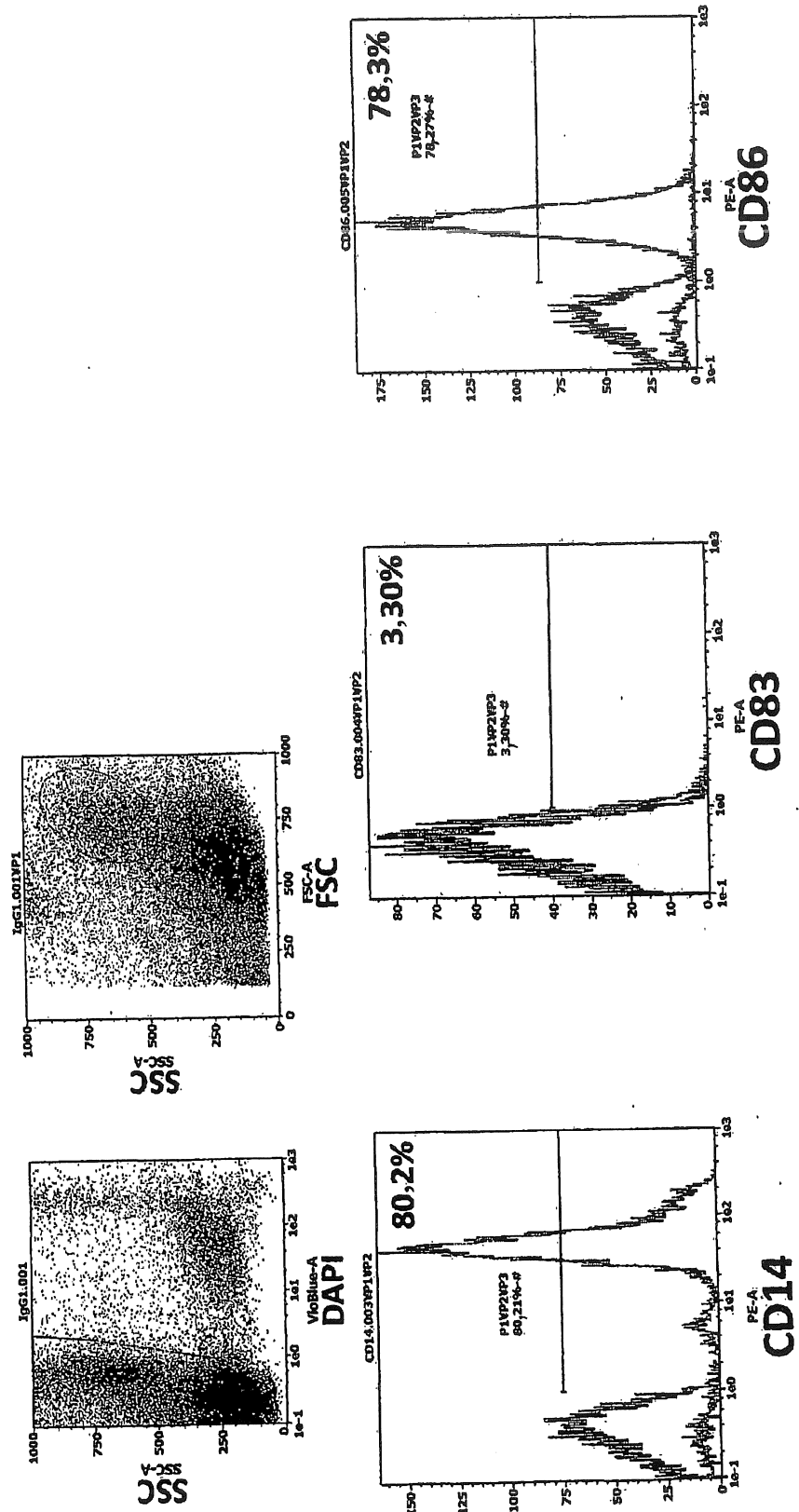
NKT003-4 (GM-CSF + αGalCer)



18/24

NKT001 Ngày 0

Fig. 13A



19/24

NKT001 Ngày 6

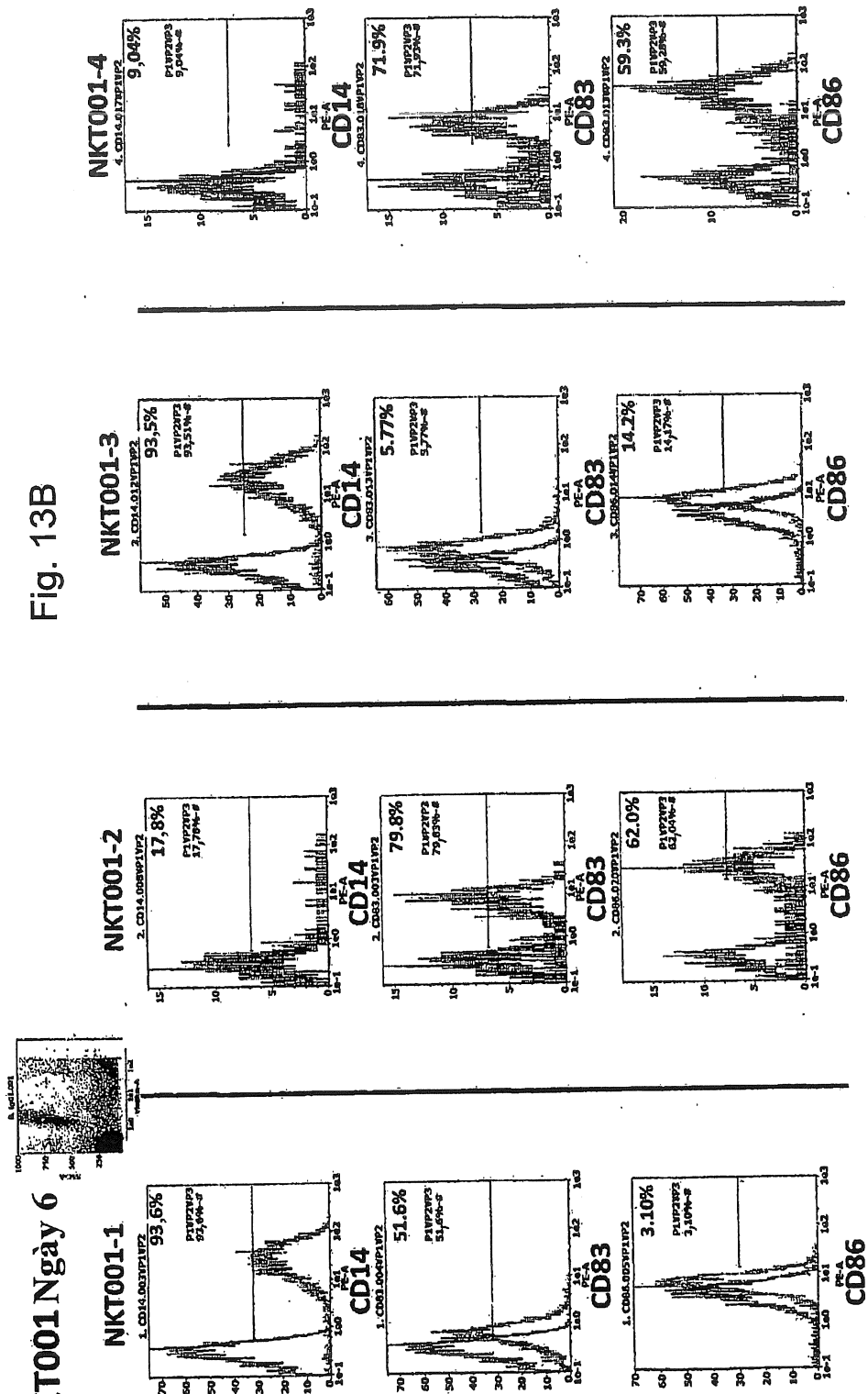
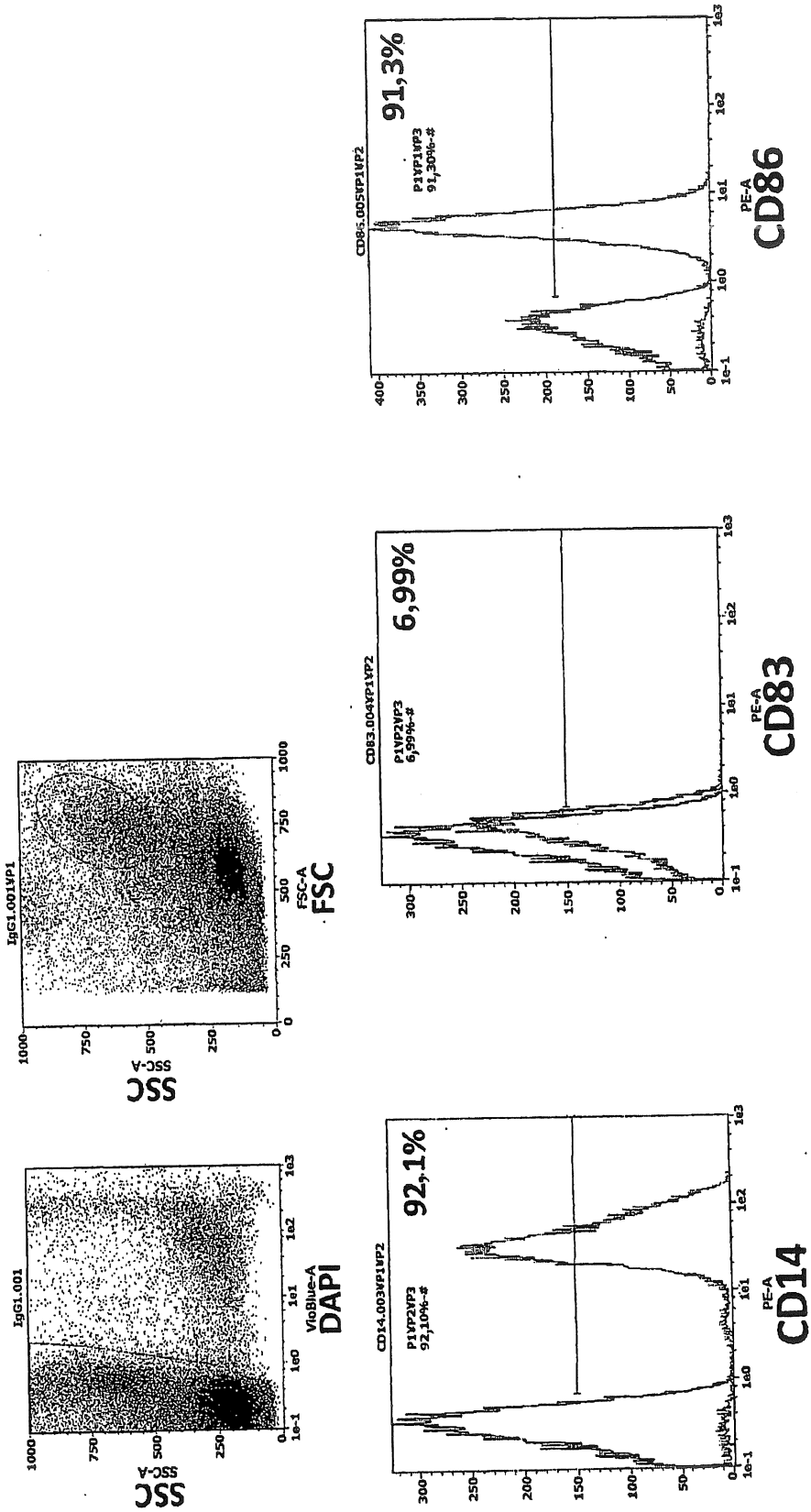


Fig. 13B

20/24

Fig. 14A

NKT002 Ngày 0



21/24

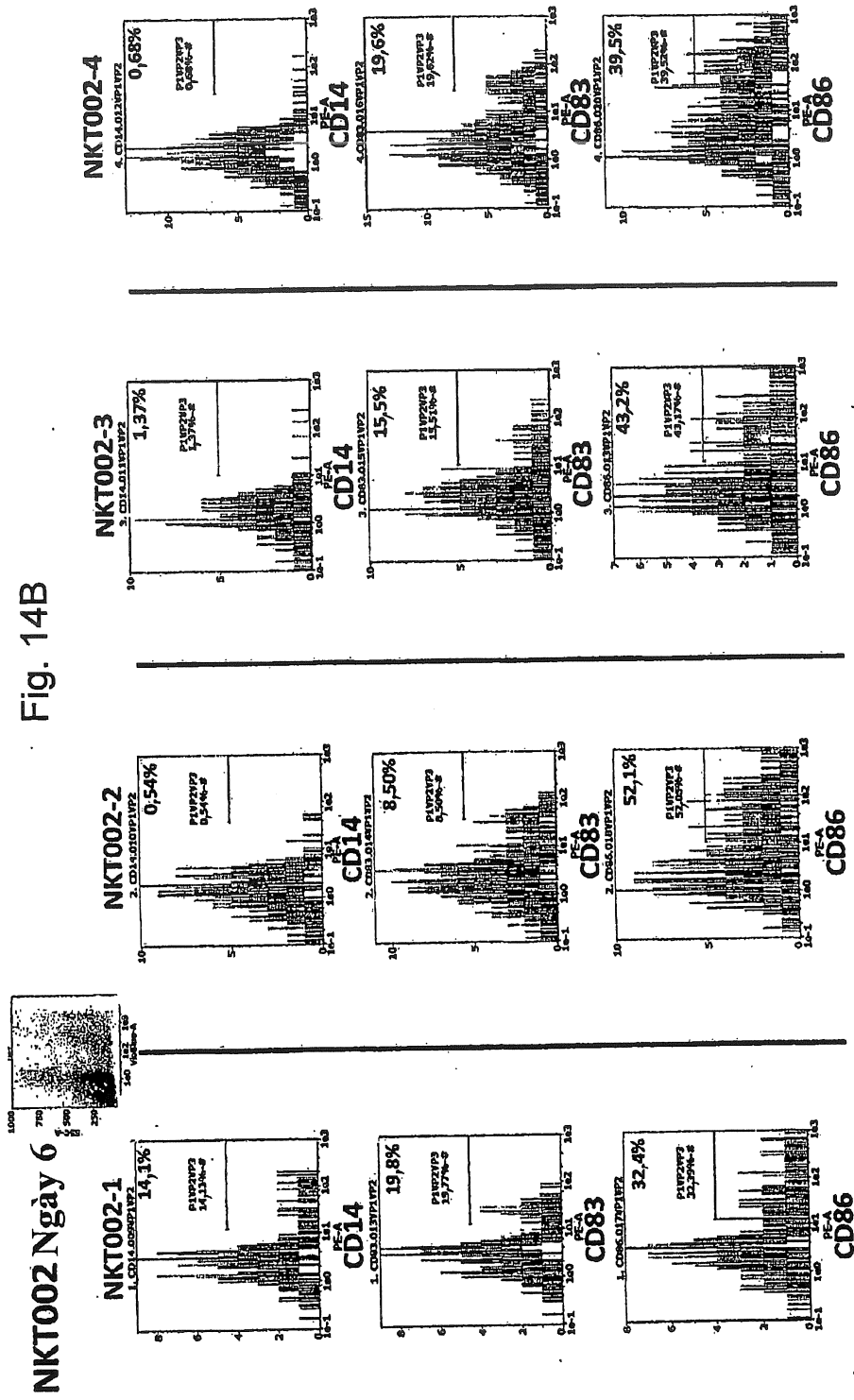
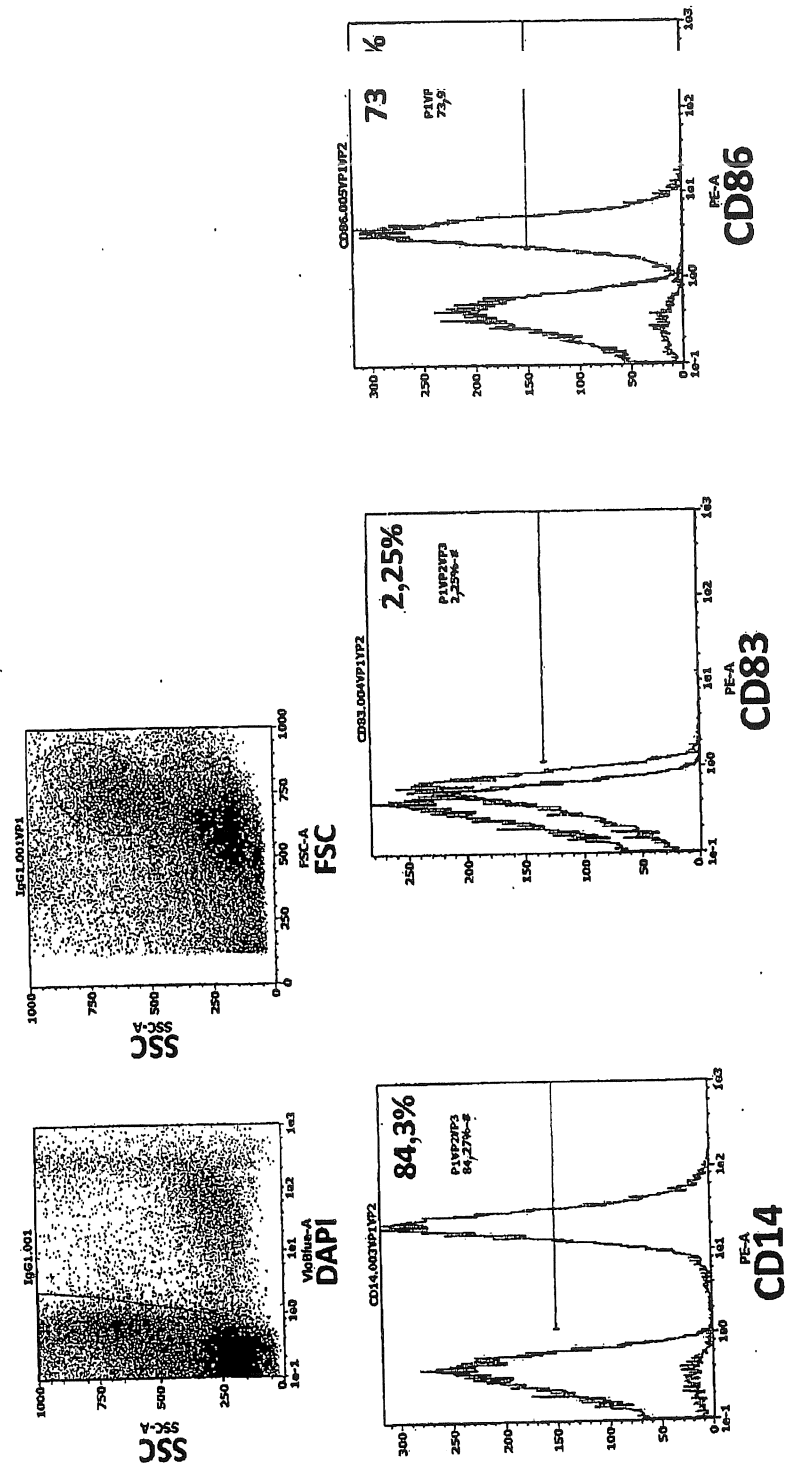


Fig. 14B

22/24

Fig. 15A

NKT003 Ngày 0



23/24

Fig. 15B

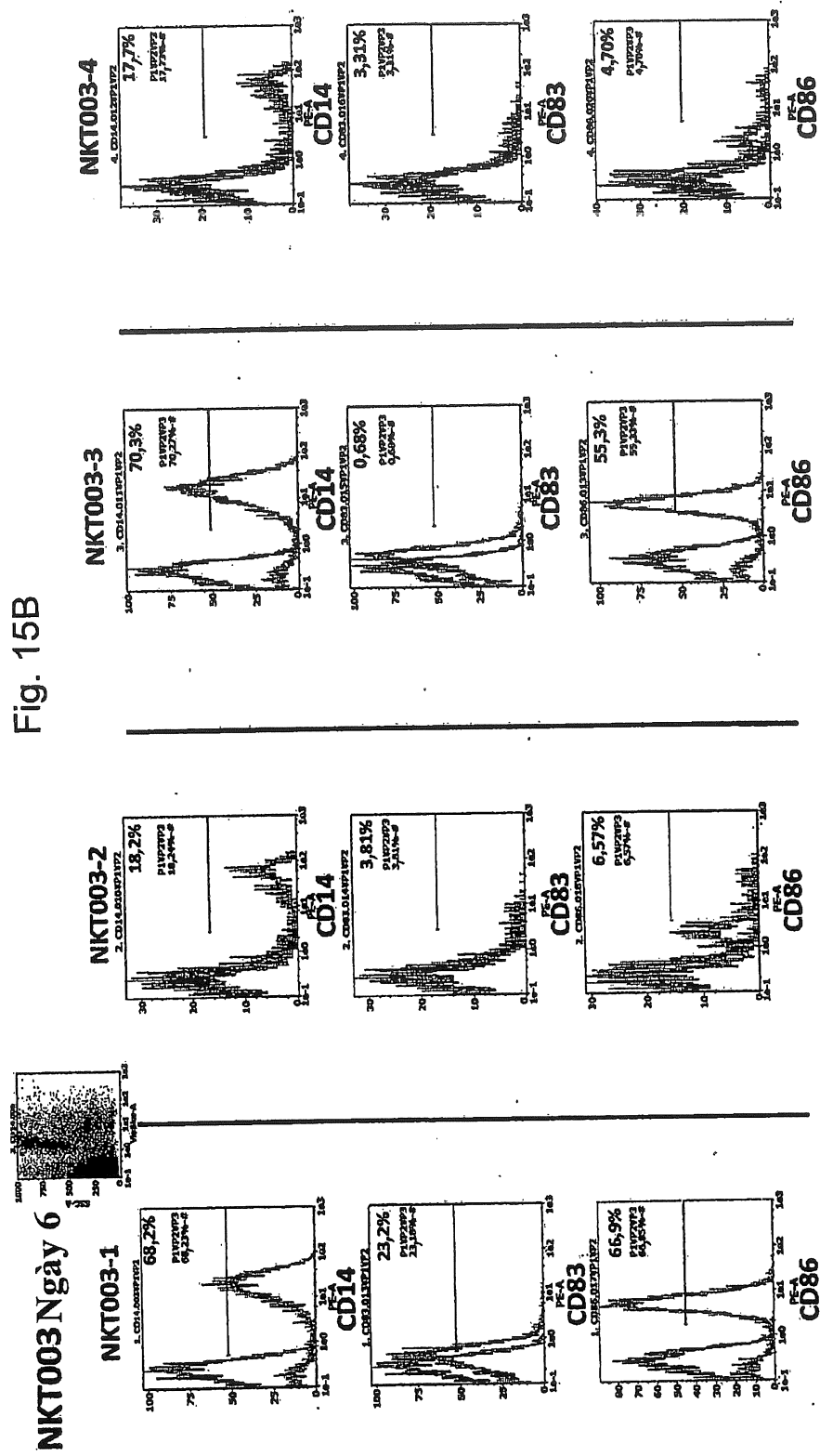


Fig. 16

Tổng số lượng tế bào và tỷ lệ tế bào sống sót (Nuôi cấy ngược)

	Điểm bắt đầu		Điểm kết thúc	
	Tổng số lượng tế bào	Tỷ lệ tế bào sống sót	Tổng số lượng tế bào	Tỷ lệ tế bào sống sót
NKT007	3,17 x 10 ⁹ tế bào	98,5%	2,54 x 10 ⁹ tế bào	98,0%
NKT008	4,21 x 10 ⁹ tế bào	97,9%	3,34 x 10 ⁹ tế bào	97,3%
NKT009	3,45 x 10 ⁹ tế bào	98,7%	2,86 x 10 ⁹ tế bào	96,9%