



(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)



1-0045081

(51)^{2019.01} A61K 9/00; A61M 5/158; C12N 15/87; (13) B
C12M 3/06; C12N 13/00; A61M 37/00;
C12M 1/42

(21) 1-2020-01117

(22) 06/08/2018

(86) PCT/US2018/045333 06/08/2018

(87) WO/2019/028450 A1 07/02/2019

(30) 62/541,157 04/08/2017 US

(45) 25/04/2025 445

(43) 25/06/2020 387A

(71) OHIO STATE INNOVATION FOUNDATION (US)

1524 North High Street, Columbus, OH 43201, United States of America

(72) LEE Ly James (US); SHI Junfeng (CN); YANG Zhaogang (CN).

(74) CÔNG TY LUẬT TNHH IP MAX (IPMAX LAW FIRM)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CÁC TÚI NGOẠI BÀO

(57) Các túi ngoại bào (extracellular vesicle - EV) chứa số lượng lớn bản sao của các axit nucleic chức năng và các phân tử sinh học khác được sản xuất ở lượng lớn bằng cách đặt các tế bào cho lên trên bề mặt của chip, bổ sung các plasmit khác nhau, các vector chuyển nhiễm khác và hỗn hợp của chúng vào đệm trên chip này, sử dụng điện trường xung qua các tế bào được đặt phía bên trên của bề mặt chip và dung dịch đệm plasmit/vector phía dưới bề mặt chip này, và thu gom các EV được tiết ra bởi các tế bào được chuyển nhiễm. Bề mặt chip này có chip sinh học xung điện kênh nano (nanochannel electroporation - NEP) ba chiều (3D) được tạo thành trên đó, có khả năng xử lý số lượng lớn các tế bào cho. Đệm này được làm thích ứng để tiếp nhận các plasmit và các vector chuyển nhiễm khác.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất các túi ngoại bào (extracellular vesicle - EV), cụ thể là các exosome (bóng xuất bào), mà chứa các ARN thông tin (mARN) chức năng, microARN (miR), ARN kẹp tóc ngắn (shARN), protein, và các phân tử sinh học khác bằng sự phân phối không nhập bào của các plasmid ADN và các vectơ khác vào trong các tế bào cho bằng sự kích thích mạnh được gây ra bởi các tế bào cho kích hoạt sự phân phối để tạo ra lượng lớn các túi bào bên trong tế bào trong khi sự phân phối không nhập bào của các plasmid ADN/vectơ dẫn đến sự phiên mã nhanh của ARN và sự dịch mã của các protein bên trong tế bào chất, cho phép các phân tử sinh học chức năng này được bao nang trong các túi bào theo cách nội sinh trước khi chúng được tiết ra từ các tế bào cho dưới dạng các EV.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các túi ngoại bào (EV), bao gồm exosome, vi túi bào và các túi bào khác, được tiết bởi nhiều loại tế bào. Trong cơ thể người, có $>10^{12}$ EV trong 1 mL máu và chúng cũng tồn tại ở các dịch cơ thể khác nhau. Exosome là các túi bào nano (40–150 nm), trong khi các vi túi bào có kích thước thay đổi từ <100 nm đến >1 micromet. Chúng chứa cả các ARN mã hóa và không mã hóa và các mảnh của chúng, các mảnh ADN, các protein, và các phân tử sinh học liên quan đến tế bào khác. Các EV và các dung lượng phân tử sinh học của chúng đã được đề xuất làm các chỉ thị sinh học để chẩn đoán bệnh. Ngoài ra, chúng đóng vai trò chính trong sự giao tiếp tế bào - tế bào trong vi môi trường và sự tuần hoàn của khối u.

Các EV được nạp các ARN chức năng và protein cũng đã được gợi ý làm dược chất và các chất mang dược chất cho các ứng dụng trị liệu. Để phân phối các axit nucleic và/hoặc các protein đặc hiệu đến các mô hoặc các loại tế bào đích *in vitro* và *in vivo* đòi hỏi các phương pháp mà có thể sản xuất các EV với các hàng chữ trị liệu nội sinh hoặc ngoại sinh.

Quá trình sau chèn của các plasmid ARN can thiệp nhỏ (siARN) và shARN ngoại bào vào trong các exosome đã có sẵn bằng kỹ thuật xung điện khối (bulk electroporation - BEP) thông thường đã được phát triển trong những năm gần đây. Mặc

dù các chức năng trị liệu của chúng đã được chứng minh một cách thành công ở một số mô hình chuột cho các bệnh ung thư và không phải ung thư, phương pháp này vẫn đối mặt với nhiều hạn chế. Thứ nhất, quá trình sau chèn của các phân tử sinh học lớn như các plasmit ADN, các mARN, và các protein vào trong các exosome kích thước nano là không hiệu quả. Thứ hai, điện trường mạnh được sinh ra bởi BEP sẽ phá vỡ nhiều exosome dẫn đến hiệu suất exosome trị liệu thấp. Hơn nữa, khó và đắt đỏ để tổng hợp ngoại bào nhiều phân tử sinh học lớn như các mARN và protein.

Hiện có nhu cầu phát triển các phương pháp mới, mà có thể chuyển nhiễm các tế bào cho bằng các plasmit ADN hoặc các vector khác để sản xuất lượng lớn các exosome hoặc các EV khác chứa các đích ARN và protein theo cách nội sinh.

Trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 14/282630 của tình trạng kỹ thuật, các tác giả sáng chế đã phát triển chip sinh học xung điện kênh nano (nanochannel electroporation - NEP) mà có thể phân phối các plasmit ADN hoặc các hạt và các phân tử tích điện khác vào trong các tế bào riêng rẽ theo cách không nhập bào có sự kiểm soát liều tốt. Ở đây, các tác giả sáng chế đã chứng minh rằng NEP có thể sản xuất lượng lớn các exosome trị liệu chứa số lượng lớn bản sao của các đích mARN chức năng và microARN, mà không thể đạt được bằng phương pháp sau chèn nêu trên. Ngoài NEP, các phương pháp phân phối không nhập bào khác như súng bắn gen, vi tiêm/tiêm nano, v.v. cũng có thể đạt được hiệu quả tương tự nếu chúng có thể tạo ra sự kích thích tế bào thỏa đáng và sự phân phối plasmit/vector nhanh.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế liên quan đến sự phát triển ý tưởng và phương pháp mới mà các plasmit ADN và các vector khác có thể được phân phối theo cách không nhập bào vào trong các tế bào cho với sự kích thích tế bào mạnh để tạo thành lượng lớn các túi bào và các ARN được phiên mã cũng như các protein được dịch mã bên trong các tế bào được chuyển nhiễm này. Các tế bào sẽ tiết nhiều túi ngoại bào (EV) chứa các đích ARN và protein đặc hiệu có chức năng trị liệu.

Để chứng minh ý tưởng thiết kế nêu trên, chip sinh học NEP ba chiều (3D) được chế tạo, mà có thể chuyển nhiễm nhiều tế bào cho bằng các plasmit ADN đã định trước để tiết EV nhiều hơn từ 10~100 lần, bao gồm các exosome, chứa số lượng lớn bản sao

của các đích mARN và miR nguyên vẹn nhiều hơn lên đến hàng nghìn lần so với các bản sao trong các EV được tiết ra từ các tế bào cho không được chuyển nhiễm.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất lượng lớn các túi ngoại bào (EV) trị liệu chứa số lượng lớn bản sao của các axit nucleic chức năng và các phân tử sinh học khác. Các phương pháp như vậy bao gồm các bước:

đặt các tế bào cho lên trên bề mặt của chip, bề mặt này có chip sinh học xung điện kênh nano (NEP) ba chiều (3D) được tạo thành trên đó;

bổ sung các plasmit khác nhau, các vector chuyển nhiễm khác và hỗn hợp của chúng vào đệm trên chip này;

sử dụng điện trường xung qua các tế bào được đặt bên trên của bề mặt chip và dung dịch đệm plasmit/vector bên dưới bề mặt của chip, tạo ra sự kích thích mạnh các tế bào và sự phân phối các plasmit/vector vào trong các tế bào theo cách không nhập bào; và

thu gom các EV được tiết bởi các tế bào được chuyển nhiễm này.

Theo một số phương pháp này, đường kính của các kênh nano nằm trong khoảng từ 50 đến 900 nm.

Theo một số phương pháp này, trong đó các plasmit và các vector này phiên mã mARN, microARN, shARN, và các ARN khác, và dẫn đến quá trình dịch mã các protein và các phân tử sinh học khác trong tế bào được chuyển nhiễm.

Theo một số phương án về phương pháp này, các EV được tiết bởi các tế bào được chuyển nhiễm chứa mARN, microARN, shARN, và các ARN khác được phiên mã, và các protein và các phân tử sinh học khác được dịch mã.

Theo một số phương án về phương pháp này, trong đó cách để làm tăng sự biểu hiện của các protein sốc nhiệt và các protein khác mà có thể thúc đẩy sự hình thành túi bào và quá trình nhập bào trong các tế bào được chuyển nhiễm được bổ sung vào hệ thống, trong đó cách này bao gồm bước xử lý sốc nhiệt của tế bào, hoặc bổ sung các protein sốc nhiệt vào dịch nuôi cấy tế bào.

Theo một số phương án, cách để làm tăng sự biểu hiện của các protein mà thúc đẩy sự hình thành exosome ở các tế bào được chuyển nhiễm được bổ sung vào hệ thống,

trong đó cách này bao gồm bước đồng chuyển nhiễm plasmit ADN CD63, CD9 và plasmit ADN khác.

Theo một số phương án, nhiều plasmit ADN và các vectơ khác được phân phối vào các tế bào được chuyển nhiễm một cách liên tục để thúc đẩy quá trình cùng khu trú của các đích ARN/protein và quá trình tiết EV.

Theo một số phương án, các phân tử sinh học ngoại sinh như các plasmit ADN, các vectơ chuyển nhiễm khác, các ARN, các protein/peptit, các dược chất phân tử nhỏ được bao nang bên trong các túi bào trong tế bào và được tiết ra dưới dạng các EV trị liệu bởi sự chuyển nhiễm liên tiếp của các tế bào cho bởi NEP. Theo một số trường hợp, ngoài NEP, các phương pháp chuyển nhiễm tế bào khác mà tạo ra kích thích mạnh đối với các tế bào cho để thúc đẩy sự tiết EV và sự phân phối plasmit/vectơ không nhập bào cho sự phiên mã ARN nhanh và sự dịch mã protein được sử dụng để sản xuất các EV trị liệu với hiệu quả tương tự. Theo các phương án khác của các trường hợp này, các phương pháp chuyển nhiễm tế bào khác bao gồm, súng bắn gen, và vi tiêm hoặc tiêm nano.

Theo một số phương án, các plasmit và/hoặc các vectơ khác được gắn trên các hạt vàng kích thước nano hoặc micromet hoặc các hạt rắn khác, và các hạt đó được tiêm vào trong các tế bào cho trong điều kiện lực khí nén bằng cách sử dụng súng bắn gen để gây ra sự kích thích tế bào mạnh và sự phân phối plasmit/vectơ không nhập bào.

Theo một số phương án, các plasmit và/hoặc các vectơ khác được gắn trên dây đầu kích thước nano hoặc micromet, và tế bào cho được đúc ép bởi các đầu này để gây ra sự kích thích tế bào mạnh và sự phân phối các plasmit/vectơ không nhập bào vào trong các tế bào cho.

Theo các khía cạnh khác sáng chế đề xuất thiết bị để sản xuất lượng lớn các túi ngoại bào (EV) trị liệu chứa số lượng lớn bản sao của các axit nucleic chức năng và các phân tử sinh học khác, bao gồm: chip có chip sinh học xung điện kênh nano (NEP) ba chiều (3D) và đệm để tiếp nhận được tạo thành trên đó, đệm này được làm thích hợp để tiếp nhận các plasmit và các vectơ chuyển nhiễm khác.

Theo các khía cạnh khác sáng chế bao gồm các tế bào được chuyển nhiễm bằng phương pháp bất kỳ nêu trên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Nhiều khía cạnh của sáng chế có thể được hiểu rõ hơn với sự tham chiếu đến các hình vẽ sau đây. Các bộ phận trong các hình vẽ này không nhất thiết phải theo tỷ lệ, thay vào đó được sử dụng để minh họa rõ ràng các nguyên lý của sáng chế. Trong các hình vẽ:

Fig. 1 là sơ đồ về chip sinh học xung điện kênh nano (NEP) 3D cho sự chuyển nhiễm tế bào cho;

Fig. 2 thể hiện phép so sánh sự chuyển nhiễm tế bào dựa trên BEP và NEP tại 1 giờ sau chuyển nhiễm bằng cách sử dụng plasmit ADN loại giống phức hợp Achaete-Scute 1 (Achaete-Scute Complex Like-1 - Ascl1) được đánh dấu huỳnh quang Yoyo-1, gen liên quan đến noron;

Fig. 3 thể hiện sự chuyển nhiễm tế bào NEP với hoặc không có plasmit ADN kích thích một cách đáng kể sự tiết EV từ các tế bào nguyên bào sợi phôi chuột (mouse embryonic fibroblast - MEF) được chuyển nhiễm, với hiệu suất tốt hơn nhiều so với sự chuyển nhiễm tế bào dựa trên lipofectamine (Lipo) và BEP. Ctrl là viết tắt cho các tế bào MEF không được chuyển nhiễm; NEP là viết tắt cho sự chuyển nhiễm tế bào NEP với các plasmit ADN; NEP-PBS là viết tắt cho sự chuyển nhiễm tế bào NEP với chỉ đệm PBS. Các plasmit ADN được sử dụng là loại giống phức hợp Achaete-Scute 1 (Ascl1), yếu tố phiên mã 2 lớp nhiễm Pou 3 (Pou3f2 hoặc Brn2) và loại giống yếu tố phiên mã Myelin 1 (Myt1l) ở tỷ lệ khối lượng là 2/1/1. Hỗn hợp của các plasmit ADN này là đã biết để lập trình lại các tế bào cho thành các noron được cảm ứng (induced neuron - iN);

Fig. 4 thể hiện hiệu quả của các chất ức chế protein sốc nhiệt 70 (HSP70) và protein sốc nhiệt 90 (HSP90) đối với sự tiết EV từ các tế bào MEF được chuyển nhiễm bằng NEP. Sau khi chuyển nhiễm bằng NEP, các dịch nuôi cấy tế bào này được thay thế bằng môi trường mới chứa chất ức chế HSP70 (VER 155008, 50 μ M), chất ức chế HSP90 (NVP-HSP990, 1 μ M), hoặc hỗn hợp của chúng. Môi trường được thu gom ở 24 giờ sau chuyển nhiễm, và số lượng EV được phát hiện bằng phép đo góc tán xạ ánh sáng động (dynamic light scattering - DLS);

Fig. 5 thể hiện hiệu quả của sự chuyển nhiễm NEP của plasmit ADN CD63 trên sự tiết EV từ các tế bào MEF. Các tế bào được chuyển nhiễm với hoặc không có

plasmid CD63 bằng NEP. Môi trường nuôi cấy tế bào được thu gom và được thay thế bằng môi trường mới cứ mỗi 4 giờ. Số lượng EV được phát hiện bằng phép đo góc DLS;

Fig. 6 thể hiện sự phân bố kích thước được đo bởi DLS của các EV với hoặc không có NEP được thu hoạch tại 24 giờ sau chuyển nhiễm tế bào;

Fig. 7 chứng tỏ sự biểu hiện EV Ascl1 mRNA được xác định bằng qRT-PCR từ các tế bào MEF được chuyển nhiễm bằng các plasmid ADN Ascl1/Brn2/Myt11 ở tỷ lệ là 2/1/1 bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau tại 24 giờ sau chuyển nhiễm;

Fig. 8 thể hiện sự biểu hiện EV Brn2 mRNA được xác định bằng qRT-PCR từ các tế bào MEF được chuyển nhiễm bởi các plasmid ADN Ascl1/Brn2/Myt11 ở tỷ lệ là 2/1/1 bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau tại 24 giờ sau chuyển nhiễm;

Fig. 9 thể hiện sự biểu hiện EV Myt11 mRNA được xác định bằng qRT-PCR từ các tế bào MEF được chuyển nhiễm bởi các plasmid ADN Ascl1/Brn2/Myt11 tại tỷ lệ là 2/1/1 bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau tại 24 giờ sau chuyển nhiễm;

Fig. 10 thể hiện rằng chỉ các EV thu được bằng NEP chứa mRNA chức năng được xác định bởi sự dịch mã *in vitro*;

Fig. 11 thể hiện rằng các EV-mARN từ NEP được phát hiện trong các exosome, mà không được phát hiện trong các vi túi bào.

Fig. 12 thể hiện rằng các mRNA ở exosome, không phải các ARN ở vi túi bào, từ sự chuyển nhiễm tế bào NEP có thể dịch mã các protein.

Fig. 13 thể hiện các đặc tính tiết EV-mARN từ các tế bào MEF được chuyển nhiễm bằng NEP;

Fig. 14 mô tả sự phát hiện điện thế xung lực bởi kỹ thuật kẹp ráp nối thể hiện rằng các tế bào MEF được chuyển nhiễm cách ngày với mRNA của Ascl1/Brn2/Myt11 chứa các EV thu được từ NEP có thể được lập trình lại thành các neuron được cảm ứng (iNs) hoạt động sau 24 ngày.

Fig. 15 thể hiện sự biểu hiện EV miR-128 được xác định bằng qRT-PCR từ các tế bào MEF được chuyển nhiễm bởi plasmid ADN miR-128 bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau tại 24 giờ sau chuyển nhiễm;

Fig. 16 là phép so sánh các EV được tiết chứa miR-128 bằng sự chuyển nhiễm NEP của plasmid ADN vào các tế bào MEF so với các EV hiện có được nạp miR-128 được thu gom trước bởi quá trình sau chèn BEP;

Fig. 17 là phép so sánh các EV được tiết chứa Brn2 mRNA bằng sự chuyển nhiễm NEP của plasmid ADN vào các tế bào MEF so với các EV hiện có được nạp bằng Brn2 mRNA được thu gom trước bởi quá trình sau chèn BEP; và

Fig. 18 thể hiện sự cùng khu trú mRNA tăng trong cùng EV bằng kỹ thuật NEP liên tiếp. Đối với sự chuyển nhiễm NEP, các plasmid Ascl1, Brn2 và Myt11 được chuyển nhiễm đồng thời như được mô tả trước đó. Đối với NEP liên tiếp, plasmid Myt11 được chuyển nhiễm đầu tiên, plasmid Brn2 được chuyển nhiễm 4 giờ sau đó, trong khi plasmid Ascl1 được chuyển nhiễm 4 giờ sau khi chuyển nhiễm Brn2. Ở 24 giờ sau chuyển nhiễm Myt11, môi trường nuôi cấy được thu gom để phân tích TLN. Lượng bằng nhau của các MB của FAM-Ascl1, Cy3-Brn2, và Cy5-Myt11 được bao nang trong các hạt nano lipoplex được gắn kết để phát hiện EV-mRNA. Mũi tên màu vàng: các EV chứa 3 mRNA; Mũi tên màu xanh dương: các EV chứa 2 mRNA; và Mũi tên màu hồng: các EV chứa 1 mRNA.

Mô tả chi tiết sáng chế

Ví dụ 1- Sơ đồ về chip sinh học 3D NEP và phép so sánh sự tiết EV và hàm lượng EV mRNA bằng cách sử dụng các phương pháp chuyển nhiễm khác nhau.

Fig. 1 thể hiện sơ đồ về chip sinh học 3D NEP có đơn lớp các tế bào cho được đặt trên bề mặt của chip này. Sau khi ủ tế bào qua đêm, các plasmid ADN được tải nạp trước trong đệm PBS được tiêm vào trong các tế bào cho riêng rẽ qua các kênh nano bằng cách sử dụng điện trường 220 vôn qua các kênh nano này. Các điều kiện xung điện khác nhau như mức điện áp, số lượng xung và chiều dài xung có thể được chọn.

Bằng cách sử dụng plasmid ADN loại giống phức hợp Achaete-Scute-1 (Ascl1) được đánh dấu bằng chất nhuộm huỳnh quang Yoyo-1, Fig. 2 thể hiện các tế bào được chuyển nhiễm được chụp hình bằng cách sử dụng kính hiển vi huỳnh quang 1 giờ sau khi chuyển nhiễm bằng BEP hoặc NEP ở bước sóng là 488 nm. Cường độ huỳnh quang được tính bằng phần mềm NIS. Sự so sánh cường độ huỳnh quang ở hai nhóm này được đưa ra dưới dạng các biểu đồ cột. Các kết quả này thể hiện rằng BEP ở các điều kiện tốt nhất được khuyến cáo bởi nhà sản xuất có thể phân phối các plasmid nhiều hơn

gấp gần 3 lần so với NEP ở 220 vôn với năm xung 10-ms vào các tế bào MEF. Tuy nhiên, hầu hết các plasmit vẫn gần bề mặt tế bào 1 giờ sau sự chuyển nhiễm BEP, trong khi các plasmit được tiêm bởi NEP đã được khuếch tán đồng đều bên trong tế bào chất tại cùng thời điểm. Điều này ngụ ý rằng sự chuyển nhiễm tế bào dựa trên BEP chủ yếu dựa vào sự nhập bào do xung điện gây ra, trong khi sự chuyển nhiễm tế bào dựa trên NEP không nhập bào.

Fig. 3 so sánh các số lượng EV được tiết ra từ cùng số lượng các tế bào MEF (các tế bào 5E6) được chuyển nhiễm với cùng các plasmit ADN Ascl1, Brn2 và Myt11 ở tỷ lệ khối lượng là 2/1/1 bằng lipofectamine (Lipo), BEP hoặc NEP. Tất cả các EV được thu gom từ môi trường nuôi cấy tế bào tại 24 giờ sau chuyển nhiễm và tổng số lượng EV được xác định bằng NanoSight™. Đối với BEP, điện áp chuyển nhiễm là 1250 v với một xung 30-ms. Đối với NEP, điện áp chuyển nhiễm là 220 với năm xung 10 ms. Nồng độ của plasmit được sử dụng là Ascl1/Brn2/Myt11=200/100/100 ng/ μ l. Đối với sự chuyển nhiễm lipofectamine, 5 μ g hỗn hợp plasmit (Ascl1/Brn2/Myt11=2/1/1) được sử dụng theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Các EV được thu gom từ môi trường nuôi cấy tế bào bằng cách ly tâm đơn giản tại 1500 g trong 10 phút. Các kết quả này thể hiện rằng sự chuyển nhiễm tế bào dựa trên lipofectamine (Lipo) không thay đổi sự tiết EV. Nồng độ EV là xung quanh $2E9$ /ml với hoặc không có sự chuyển nhiễm. Dường như, quy trình nhập bào plasmit chậm bởi chất mang hạt nano sẽ không kích thích các tế bào đã chuyển nhiễm nhiều và, kết quả là, hầu như không có sự thay đổi nào ở sự tiết EV. Trong sự so sánh, sự chuyển nhiễm tế bào dựa trên BEP dẫn đến sự tiết EV nhiều hơn đến $\sim 6E9$ /ml. Sự tăng rất cao việc tiết EV đến $>1,3E11$ /ml được quan sát thấy bởi sự chuyển nhiễm tế bào NEP với hoặc không có sự bổ sung plasmit. Điều này ngụ ý rằng các tế bào được chuyển nhiễm được kích thích một chút bởi BEP, nhưng được kích thích mạnh bởi NEP dẫn đến sự tăng rất đáng kể các EV ở trường hợp sau được chuyển nhiễm bằng NEP.

Trong quá trình xung điện, sự nung thuần trở gây ra bởi điện trường được sử dụng có thể làm tăng một cách tạm thời nhiệt độ tế bào để gây ra sự sốc nhiệt đối với các tế bào được chuyển nhiễm. Được biết rằng sự sốc nhiệt có thể làm tăng sự tiết tế bào của tự thực bào được trung gian bởi chaperone gây ra bởi sự tăng các protein sốc nhiệt trong các tế bào (8-10). Thực vậy, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng NEP có thể làm tăng đáng kể sự biểu hiện của cả protein sốc nhiệt 70 (HSP70) bằng 13,8 lần

và protein sốc nhiệt 90 (HSP90) bằng 4,2 lần ở các tế bào MEF được chuyển nhiễm so với các tế bào MEF không được chuyển nhiễm (Ctrl). Khi các chất ức chế HSP được bổ sung trong môi trường nuôi cấy tế bào sau khi xung điện, sự tiết EV có thể bị ức chế. Fig. 4 thể hiện sự giảm 50%, 40% và 70% sự tiết EV của các tế bào MEF được chuyển nhiễm bằng NEP với lần lượt là chất ức chế HSP 70 (VER 155008, , 50 μ M), chất ức chế HSP90 (NVP-HSP990, 1 μ M), và hỗn hợp của chúng. Ở đây, dịch nuôi cấy tế bào được thay thế bằng môi trường mới chứa chất ức chế HSP70 (VER 155008), chất ức chế HSP90 (NVP-HSP990), hoặc hỗn hợp của chúng ngay sau khi chuyển nhiễm bằng NEP. Môi trường được thu gom tại 24 giờ sau chuyển nhiễm và số lượng EV được phát hiện bằng phép đo góc tán xạ ánh sáng động (DLS). Các kết quả này ngụ ý rằng sự kích thích tế bào bất kỳ mà có thể làm tăng sự biểu hiện của các protein sốc nhiệt sẽ tăng cường sự tiết EV.

Tương tự, sự tăng các protein mà cần cho sự hình thành thể đa túi bào (multivesicular body - MVB) endosome muộn trong tế bào có thể cũng tăng cường sự tiết exosome. Fig. 5 thể hiện hiệu quả của sự chuyển nhiễm NEP của plasmit ADN CD63 trên sự tiết EV từ các tế bào MEF. Các tế bào được chuyển nhiễm với hoặc không có plasmit ADN CD63 bằng NEP. Môi trường nuôi cấy tế bào này được thu gom và được thay thế bằng môi trường mới mỗi 4 giờ. Số lượng EV được phát hiện bằng phép đo góc DLS. Các kết quả này thể hiện đặc tính tiết EV tương tự trong 16 giờ đầu sau sự chuyển nhiễm NEP ở cả hai trường hợp. Tuy nhiên, nhiều EV hơn được tiết trong khoảng từ 16 đến 44 giờ sau sự chuyển nhiễm NEP với plasmit ADN CD63. Protein CD63 là cần thiết cho sự tái cấu trúc màng endosome thành các vi miền được làm giàu tetraspanin, tiền chất của sự tiết exosome.

Fig. 6 thể hiện sự phân bố kích thước EV được đo bằng phép đo góc DLS đối với các MEF (ctrl) và các MEF được chuyển nhiễm bằng NEP. Sự kích thích NEP không làm thay đổi sự phân bố EV lớn hơn (phần lớn là các vi túi bào) nhiều lắm, nhưng làm tăng đáng kể sự tiết các exosome có kích thước nằm trong khoảng từ 40 đến 110 nm.

Fig. 8 và 9 thể hiện là các EV được tiết từ sự chuyển nhiễm tế bào NEP của các plasmit ADN Ascl1, Brn2 và Myt1l chứa lượng lớn các mARN của Ascl1, Brn2 và Myt1l tương ứng hoặc các mảnh của chúng như được xác định bằng kỹ thuật phản ứng chuỗi polymeraza phiên mã ngược định lượng (qRT-PCR). Giống như số lượng EV, sự chuyển nhiễm tế bào dựa trên lipofectamine (Lipo) không làm thay đổi sự biểu hiện

mARN nhiều lần, trong khi sự chuyển nhiễm tế bào dựa trên BEP có thể làm tăng sự biểu hiện của mARN lên vài lần. Trong sự so sánh, sự chuyển nhiễm tế bào dựa trên NEP dẫn đến sự tăng lên hàng nghìn lần các mARN đích. Ở đây, thu được cùng lượng ARN tổng số và sự phiên mã ngược được thực hiện bằng qRT-PCR theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Fig. 10 thể hiện rằng một số các EV mARN là nguyên vẹn và hoạt động chức năng vì chúng có thể dịch mã protein Ascl1, Brn2 và Myt11. Ở đây, cùng lượng ARN tổng số (1 µg) từ mỗi phương pháp chuyển nhiễm được sử dụng để dịch mã protein *in vitro* bằng cách sử dụng Hệ chất dung giải hồng cầu lưới của thỏ (Rabbit Reticulocyte Lysate System) (Promega) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các mẫu được tách bằng SDS-PAGE và các protein được phát hiện bằng các kháng thể khác nhau như được thể hiện trong biểu đồ thâm tách Western.

Đối với tổng số các EV được thu gom, các vi túi bào lớn hơn được phân loại bằng sự siêu ly tâm tại 10.000 g trong 30 phút. Dịch nổi được ly tâm thêm tại 100.000 g trong 2 giờ để thu gom các exosome nhỏ hơn. Các ARN tổng số được thu gom từ hai phần này như được mô tả trên đây. Nồng độ mARN tổng số được đo bằng Nanodrop™, trong khi sự biểu hiện ABM của các mARN của Ascl1, Brn2 và Myt11 được đo bằng qRT-PCR. Fig. 11 thể hiện rằng có nhiều hơn hai lần ARN trong các exosome so với trong các vi túi bào, nhưng hầu hết các mARN của Ascl1, Brn2 và Myt11 chỉ có mặt trong các exosome. Fig. 12 thể hiện rằng các mARN chức năng của Ascl1, Brn2 và Myt11 cũng có mặt trong các exosome và các exosome này mang các chỉ thị protein exosome đặc trưng, CD9, CD63 và Tsg101. Trong sự so sánh, các vi túi bào lớn hơn mang chỉ thị protein đặc trưng, Arf6.

Fig. 13 thể hiện sự tiết EV và các đặc tính hàm lượng dưới dạng hàm theo thời gian sau khi chuyển nhiễm NEP với các plasmit ADN Ascl1, Brn2 và Myt11. Plasmit Ascl1 là plasmit nhỏ nhất (7k bp) trong số ba plasmit này, trong khi plasmit Myt11 là lớn nhất (9k bp) với plasmit Brn2 ở giữa (8k bp). Các EV trong môi trường nuôi cấy tế bào được thu gom tại các thời điểm được chỉ định, và môi trường nuôi cấy được thay thế bằng môi trường mới. Số lượng EV được phát hiện bằng phép đo góc DLS, trong khi sự biểu hiện EV mARN được phát hiện bằng qRT-PCR như được mô tả trên đây. Các kết quả này thể hiện sự tăng nhanh việc tiết EV trong vòng 4 giờ sau sự chuyển nhiễm, và đạt đỉnh tại 8 giờ với sự tiết EV liên tục trong nhiều hơn 24 giờ. Các EV chứa

các mARN của Ascl1 và Brn2 cũng xuất hiện trong vòng 4 giờ sau khi chuyển nhiễm với các đặc tính rất phù hợp với các đặc tính của sự tiết EV. Các EV chứa Myt11 mARN xuất hiện ở thời gian muộn hơn, nhưng vẫn trong vòng 24 giờ. Điều này ngụ ý rằng thời gian tiết EV và thời gian phiên mã mARN cần được làm phù hợp trong tế bào, mà có thể đạt được bởi sự chuyển nhiễm tế bào dựa trên NEP.

Để chứng tỏ rằng các EV được sản xuất bởi NEP chứa các mARN nội sinh có các chức năng trị liệu, các tác giả sáng chế đã xử lý tế bào MEF bằng các EV này cứ mỗi cách ngày tại tổng nồng độ EV ARN là 1 μ g trên mỗi 100.000 tế bào. Sau vài ngày, các tế bào MEF đã xử lý bắt đầu bộc lộ kiểu hình giống neuron và tại 24 ngày, các tế bào được xử lý thể hiện hoạt tính điện sinh lý như được chứng tỏ bởi khả năng của chúng trải qua các điện thế xung lực được cảm ứng như được thể hiện trong Fig. 14. Trong sự so sánh, các tế bào MEF được chuyển nhiễm bằng NEP cũng thể hiện hoạt tính điện sinh lý tương tự vào Ngày 21. Các tế bào thể hiện các dòng công điện áp cần thiết để loại bỏ các điện thế xung lực. Cả các dòng đi vào tạm thời và các dòng đi ra duy trì liên tục đều được quan sát thấy trong sự đáp ứng với các mô phỏng điện áp khử cực. Sự đáp ứng điển hình với sự phóng dòng 20 pA được minh họa trong Fig. 14 và chỉ ra rằng các tế bào đã loại bỏ điện thế xung lực trong sự đáp ứng với dòng khử cực.

Việc ghi nhận kẹp rập nối tế bào nguyên vẹn được sử dụng để đo tính dễ bị kích thích. Các tế bào được siêu dung hợp liên tục với dung dịch bể ngoại bào chứa 115 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 3 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, và 10 mM Glucoza (pH 7,4). Các điện cực thủy tinh (3-4 M Ω) được nạp đầy dung dịch pipet chứa 115 mM K-gluconat, 10mM axit N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Etansulfonic (HEPES), 4 mM NaCl, 0,5 mM axit etylen glycol tetraaxetic(EGTA), 1,5 mM $MgCl_2$, (pH 7,3). Các tế bào có điện trở rập nối là >100 MOhm sau khi sự xâm nhập tế bào nguyên vẹn tăng, và điện trở nối tiếp được bù là 40-50%. Số liệu được thu thập bằng cách sử dụng máy khuếch đại Axopatch 200B, thiết bị số hóa Digidata 1322A, và phần mềm Clampex 9 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Để phân tích các dòng công điện áp, điện thế duy trì cơ sở là -70 mV và các tế bào được tăng theo bậc trong 400 ms ở các gia lượng 10 mV từ -120 mV đến 80 mV. Các dòng đi vào tạm thời, do hoạt tính của các kênh natri công điện áp, được tách khỏi phép đo biên độ cực đại. Các dòng ổn định được duy trì liên tục, sự phản chiếu các dòng kali công điện áp, được đo dưới dạng trung bình của 50ms cuối của bước điện áp ở pha ổn định của dòng này. Sự cảm ứng điện thế xung lực

được đo bằng cách sử dụng kẹp dòng. Dòng được giữ tại 0 pA và sau đó được tăng theo bậc ở các quãng 20 pA trong 1 giây.

Ví dụ 2- Hàm lượng EV MicroARN sử dụng các phương pháp chuyển nhiễm khác nhau.

Để chứng tỏ khả năng áp dụng trong trị liệu rộng hơn, các tác giả sáng chế cũng chuyển nhiễm các tế bào MEF với plasmit ADN mã sẽ phiên mã các đích microARN trong các tế bào. Fig. 15 thể hiện sự biểu hiện EV miR-128 đối với các EV được thu hoạch từ môi trường nuôi cấy tế bào tại 24 giờ sau chuyển nhiễm (plasmit miR-128) bằng các kỹ thuật khác nhau. Các ARN tổng số thu được theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sử dụng cùng lượng ARN tổng số (30 ng) trong quá trình phát hiện miR-128 bằng qRT-PCR sử dụng các quy trình nêu trên. Lại lần nữa, sự chuyển nhiễm dựa trên NEP có khả năng sản xuất các EV chứa lượng lớn miR-128 (tăng nhiều hơn 4.500 lần), mà không thể đạt được bằng cách chuyển nhiễm tế bào dựa trên BEP hoặc lipofectamine.

Ví dụ 3- So sánh các EV chứa các ARN nội sinh bởi sự chuyển nhiễm NEP của plasmit ADN vào các tế bào MEF so với các EV hiện có được nạp bằng các ARN được thu gom trước bởi quá trình sau chèn BEP.

Ở đây, các tác giả sáng chế so sánh hiệu quả sản xuất các EV trị liệu bằng cách sử dụng sự chuyển nhiễm tế bào dựa trên NEP theo sáng chế và phương pháp sau chèn BEP được sử dụng bởi một số nhà nghiên cứu. Đối với sự chuyển nhiễm bằng NEP, plasmit miR-128 được đồng chuyển nhiễm với plasmit CD63-GFP vào các tế bào MEF bởi NEP để tạo ra các EV chứa miR-128 theo các quy trình nêu trên. Đối với phương pháp sau chèn BEP, các EV trống được thu hoạch đầu tiên từ các tế bào MEF được chuyển nhiễm với plasmit CD63-GFP 24 giờ sau NEP. Song song, miR-128 được thu gom từ các tế bào MEF được chuyển nhiễm với miR-128 24 giờ sau sự chuyển nhiễm bằng NEP. miR-128 được thu gom (1 μ g) được trộn với các EV trống (10^6) và được xung điện bằng BEP (1250 vôn, 30 ms) theo các điều kiện được sử dụng bởi các nhà nghiên cứu khác. Các EV từ hai phương pháp này được kiểm tra bằng cách sử dụng chip sinh học hạt nano lipoplex (TLN) được gắn kết trên kính hiển vi tổng số huỳnh quang phản chiếu bên trong (total internal reflection fluorescence- TIRF). Fig. 16A thể hiện sơ đồ thử nghiệm TLN-TIRF (2, 11). Tóm tắt, tín hiệu phân tử (molecular beacon - MB) đối với đích ARN được thiết kế và được bao nang trong các hạt nano liposome

cation. Các hạt nano lipoplex cation này được gắn kết trên lam kính, mà có khả năng bắt các EV tích điện âm bởi sự tương tác tĩnh điện để tạo thành phức hợp quy mô nano lớn hơn. Sự dung hợp lipoplex-EV này dẫn đến sự hỗn trộn của các ARN và các MB bên trong vật bao quy mô nano gần mặt phân cách chip sinh học này. Kính hiển vi TIRF có khả năng phát hiện phân tử sinh học đơn và nó đo các tín hiệu <300 nm gần mặt phân cách, mà tại đó các hạt nano liposome được gắn kết khu trú.

Fig. 16B thể hiện các hình ảnh TLN-TIRF tiêu biểu của các EV được bắt giữ. Huỳnh quang xanh lá cây là từ các EV chứa CD63-GFP, trong khi huỳnh quang đỏ là từ sự lai hóa của các phân tử miR-128 và các Cy5-miR128 MB ở các EV được bắt giữ. Rõ ràng là phương pháp NEP theo sáng chế có khả năng tạo ra nhiều EV chứa số lượng lớn bản sao của miR-128 hơn phương pháp sau chèn BEP. Fig. 16C đến 16E thể hiện phép so sánh định lượng hai phương pháp này. Mặc dù cả hai phương pháp này đều có khả năng tạo ra các EV chứa miR-128 (~80% tổng số các EV được bắt giữ), nồng độ EV miR-128 trong các EV (~3 lần cường độ huỳnh quang MB) là cao hơn nhiều ở sự chuyển nhiễm tế bào trực tiếp dựa trên NEP so với ở phương pháp sau chèn microARN dựa trên BEP. Hơn nữa, phương pháp sau chèn BEP có xu hướng phá vỡ gần như một nửa các EV trống dẫn đến hiệu suất của các EV trị liệu rất thấp.

Phép so sánh tương tự cũng được thực hiện đối với ARN, Brn2 mRNA lớn hơn nhiều (6272 bazơ đối với Brn2 mRNA so với 21 bazơ đối với miR-128) sử dụng cùng cách như đối với miR-128. Fig. 17 thể hiện là phương pháp NEP theo sáng chế có thể tạo ra >70% số các EV chứa Brn2 mRNA, trong khi chỉ rất ít các EV hiện có có thể được nạp với cùng mRNA bằng phương pháp sau chèn BEP. Nồng độ của Brn2 mRNA trong NEP sản xuất các EV là cao, trong khi nồng độ trong phương pháp sau chèn BEP rất kém.

Ví dụ 4- Cải thiện nhiều mRNA được đồng khu trú trong cùng các EV được tiết bằng sự chuyển nhiễm NEP liên tiếp của các plasmit ADN vào các tế bào MEF.

Fig. 13 ngụ ý rằng các đích mRNA khác nhau có thể được phiên mã tại các thời gian và tốc độ khác nhau ở các tế bào được chuyển nhiễm, mặc dù nhiều plasmit ADN được phân phối đến các tế bào đồng thời, do sự khác nhau về kích thước của các plasmit hoặc các lý do khác. Điều này có thể dẫn đến các EV riêng rẽ chỉ chứa một hoặc một vài đích mRNA. Đối với hiệu quả trị liệu tốt hơn, sẽ có giá trị nếu nhiều hơn

hoặc tất cả các đích mRNA có thể được bao nang trong cùng các EV được tiết. Bằng cách phân phối liên tiếp mỗi plasmid ADN vào trong các tế bào MEF bằng cách sử dụng NEP được dựa trên thời gian phiên mã của nó, Fig. 18 thể hiện rằng các tác giả sáng chế có thể làm tăng một cách đáng kể các EV được tiết chứa cả ba mRNA, Ascl1, Brn2 và Myt11 (>50% so với <25%), cần để lập trình lại iN. Đối với sự chuyển nhiễm NEP, các plasmid Ascl1, Brn2 và Myt11 được chuyển nhiễm đồng thời như được mô tả trước đó. Đối với NEP liên tiếp, plasmid Myt11 được chuyển nhiễm đầu tiên, plasmid Brn2 được chuyển nhiễm 4 giờ sau đó, trong khi plasmid Ascl1 được chuyển nhiễm 4 giờ sau khi chuyển nhiễm Brn2. Ở 24 giờ sau chuyển nhiễm Myt11, môi trường nuôi cấy được thu gom để phân tích TLN. Lượng bằng nhau của các MB của FAM-Ascl1, Cy3-Brn2, và Cy5-Myt11 được bao nang trong các hạt nano lipoplex được gắn kết để phát hiện EV-mRNA. Trong hình này, mũi tên màu vàng nghĩa là các EV chứa cả 3 mRNA, mũi tên màu xanh dương nghĩa là các EV chứa 2 mRNA, trong khi mũi tên màu hồng nghĩa là các EV chỉ chứa 1 mRNA.

Trong khi sáng chế đã được giải thích có liên quan đến các phương án được ưu tiên của nó, được hiểu rằng các cải biến khác nhau của nó sẽ trở nên rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật dựa vào việc đọc bản mô tả này. Do đó, cần hiểu rằng sáng chế được bộc lộ ở đây được nhằm để bao phủ các cải biến như vậy là nằm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất các túi ngoại bào (extracellular vesicle - EV) bao gồm ít nhất một ARN được phiên mã từ ADN, bao gồm các bước:

(a) cung cấp chip sinh học xung điện, chip sinh học xung điện bao gồm: (i) các tế bào cho tiếp xúc với bề mặt thứ nhất của chip sinh học xung điện và tiết ra lượng cơ bản các túi ngoại bào (EV) được tiết ra; (ii) đệm bao gồm ADN, trong đó đệm bao gồm ADN tiếp xúc với bề mặt thứ hai của chip sinh học xung điện; và (iii) nhiều kênh kết nối bề mặt thứ nhất của chip sinh học xung điện, trong đó nhiều kênh được định vị sao cho các kênh riêng lẻ trong số nhiều kênh tiếp xúc với các tế bào cho riêng lẻ trong số các tế bào cho tiếp xúc với bề mặt thứ nhất của chip sinh học xung điện;

(b) áp dụng điện trường xung vào chip sinh học xung điện trong đó điện trường xung được áp dụng dưới dạng nhiều xung trong đó mỗi xung có độ dài ít nhất một mili giây và sao cho điện trường xung phân phối ADN đến các tế bào cho để tiết ra lượng túi ngoại bào (EV) nhiều hơn 10 lần đến 100 lần so với lượng cơ bản của các túi ngoại bào (EV) được tiết ra và trong đó các tế bào cho được chuyển nhiễm giải phóng các túi ngoại bào (EV) bao gồm ít nhất một ARN được phiên mã từ ADN; và

thu gom các túi ngoại bào EV bao gồm ít nhất một ARN được phiên mã từ ADN.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó đệm bao gồm ADN bao gồm plasmit ADN, vector ADN, hoặc hỗn hợp của chúng và các tế bào cho được chuyển nhiễm chứa ADN plasmit, vector ADN, hoặc hỗn hợp của chúng.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó các túi ngoại bào (EV) bao gồm ít nhất một ARN được phiên mã từ plasmit ADN, vector ADN, hoặc hỗn hợp của chúng.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ít nhất một ARN được phiên mã từ ADN, là ít nhất một ARN được chọn từ nhóm bao gồm: ARN thông tin (mARN), ARN không mã hóa, microARN (miARN), ARN kẹp tóc ngắn (shARN), và bất kỳ hỗn hợp nào của chúng.

5. Phương pháp theo điểm 1 trong đó ít nhất một ARN được phiên mã từ ADN bao gồm ARN thông tin (mARN).

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó plasmit ADN hoặc vectơ ADN mã hóa CD63, CD9, hoặc hỗn hợp của chúng, được phân phối vào các tế bào cho được chuyển nhiễm.
7. Phương pháp theo điểm 1, còn bao gồm sự phân phối phân tử sinh học hoặc được chất trị liệu đến các tế bào cho được chuyển nhiễm bằng phương pháp chuyển nhiễm bổ sung.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó phương pháp chuyển nhiễm bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm: súng bắn gen, vi tiêm, và tiêm nano.
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó phương pháp chuyển nhiễm bổ sung là vi tiêm hoặc tiêm nano, và phân tử sinh học hoặc được chất trị liệu được gắn kết trên dây đầu có kích thước nano hoặc micromet.
10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó các tế bào cho có mặt trong một lớp duy nhất trên bề mặt thứ nhất của chip sinh học xung điện.
11. Phương pháp theo điểm 1, trong đó một phần túi ngoại bào (EV) bao gồm ARN thông tin (mARN) được phiên mã từ ADN.
12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó ít nhất 70% túi ngoại bào (EV) bao gồm ARN thông tin (mARN) được phiên mã từ ADN.
13. Phương pháp theo điểm 11, trong đó ít nhất 25% túi ngoại bào ARN thông tin (mARN) được phiên mã từ ADN.
14. Phương pháp theo điểm 1, trong đó các túi ngoại bào (EV) bao gồm các exosome.
15. Phương pháp theo điểm 14, trong đó các exosome bao gồm chất chỉ thị protein CD9, chất chỉ thị protein CD63, chất chỉ thị protein Tsg101, hoặc hỗn hợp của chúng.
16. Phương pháp theo điểm 1, còn bao gồm việc nuôi cấy tế bào cho trên bề mặt thứ nhất của chip sinh học xung điện trong một khoảng thời gian trước bước (b).
17. Phương pháp theo điểm 16, trong đó thời gian nuôi cấy là qua đêm.
18. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ít nhất một ARN được phiên mã từ ADN bao gồm ít nhất một mARN có ít nhất 21 bazơ và lên đến 7144 bazơ.

19. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ít nhất một ARN được phiên mã từ ADN bao gồm từ 21 đến 6272 bazơ.
20. Phương pháp theo điểm 1, trong đó các túi ngoại bào (EV) được thu thập ít nhất từ 4 giờ đến 24 giờ sau bước (b).
21. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ít nhất một ARN được phiên mã từ ADN còn nguyên vẹn và có khả năng được dịch mã thành một hoặc nhiều peptit trong ống nghiệm (in vitro).
22. Phương pháp theo điểm 1, trong đó các tế bào cho được chuyển nhiễm giải phóng các túi ngoại bào (EV) với lượng cao gấp ba lần so với nồng độ của các túi ngoại bào (EV) được giải phóng nếu các tế bào cho được chuyển nhiễm được chuyển nhiễm sử dụng lipofectamine.
23. Phương pháp theo điểm 1, trong đó các tế bào cho được đặt trong ngăn thứ nhất bao gồm bề mặt thứ nhất của chip sinh học xung điện.
24. Phương pháp theo điểm 23, trong đó ngăn chứa thứ nhất mà bao gồm bề mặt thứ nhất của chip sinh học xung điện nằm trong ngăn thứ hai mà bao gồm chất đệm bao gồm ADN.
25. Phương pháp theo điểm 23, trong đó ngăn thứ nhất được kết nối lỏng với ngăn thứ hai thông qua nhiều kênh.
26. Phương pháp theo điểm 1, trong đó các túi ngoại bào (EV) được thu thập tối đa 24 giờ sau bước (b).

1/19

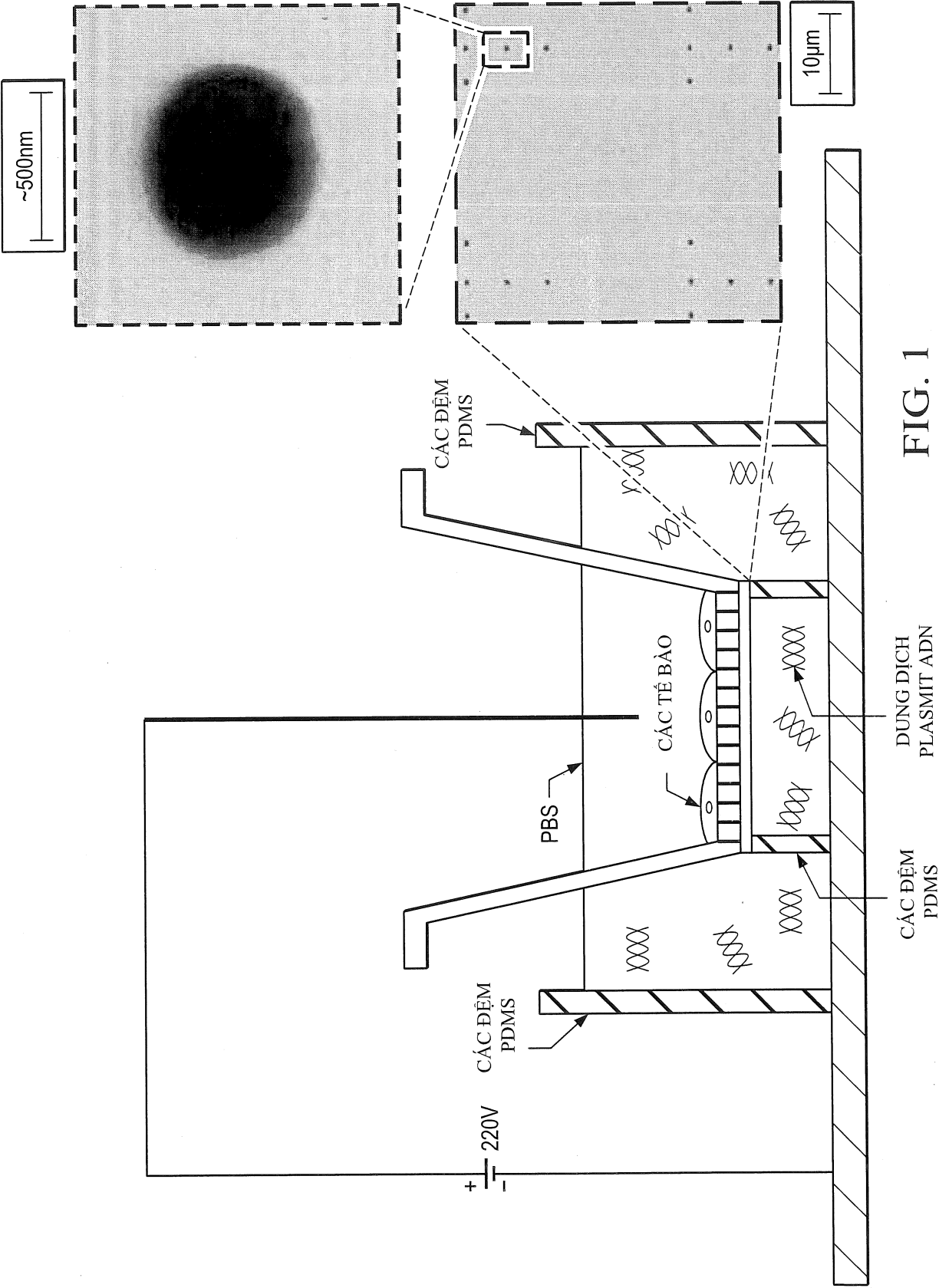


FIG. 1

2/19

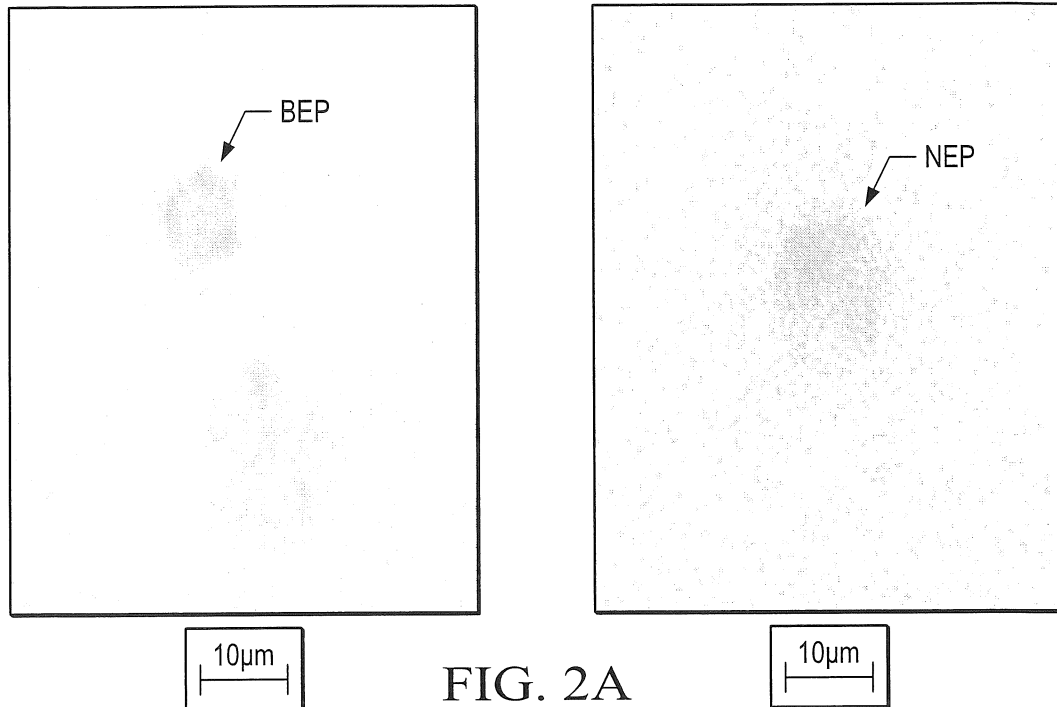


FIG. 2A

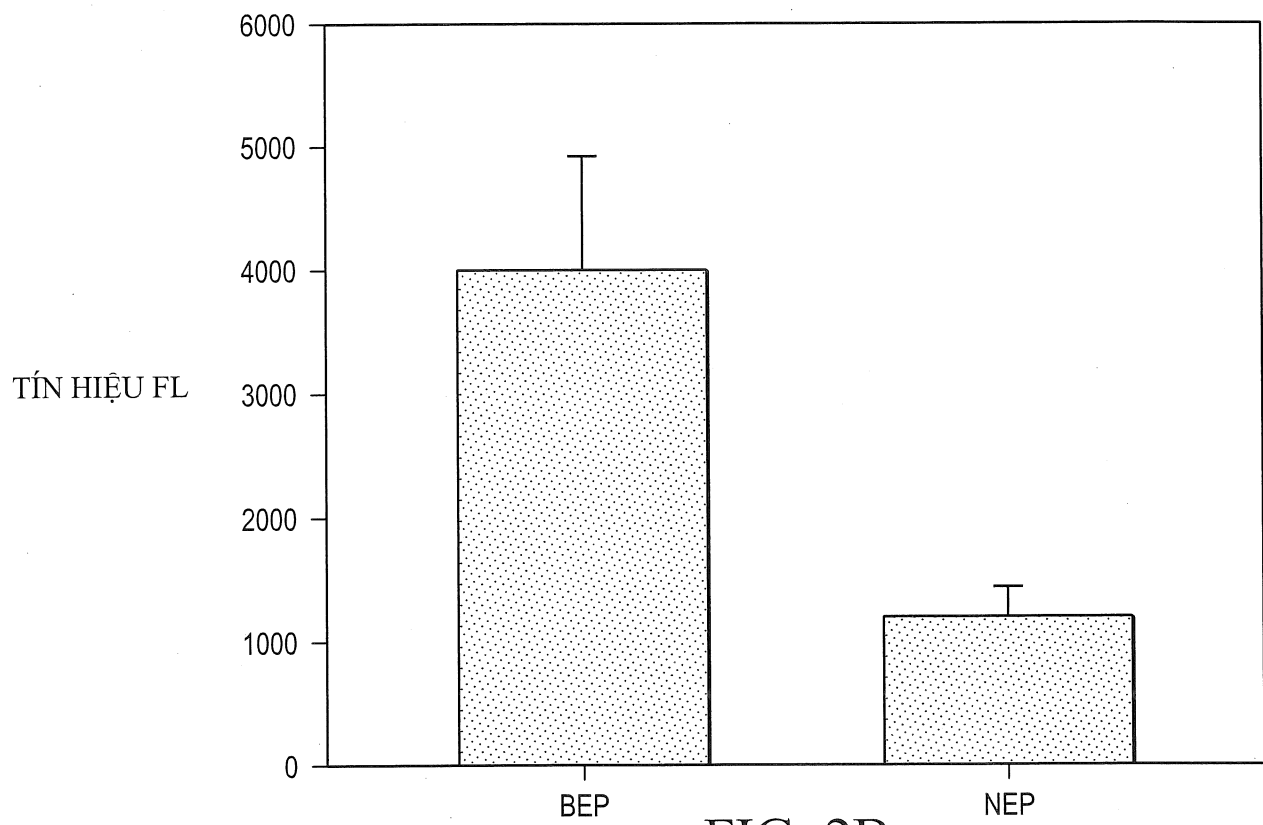
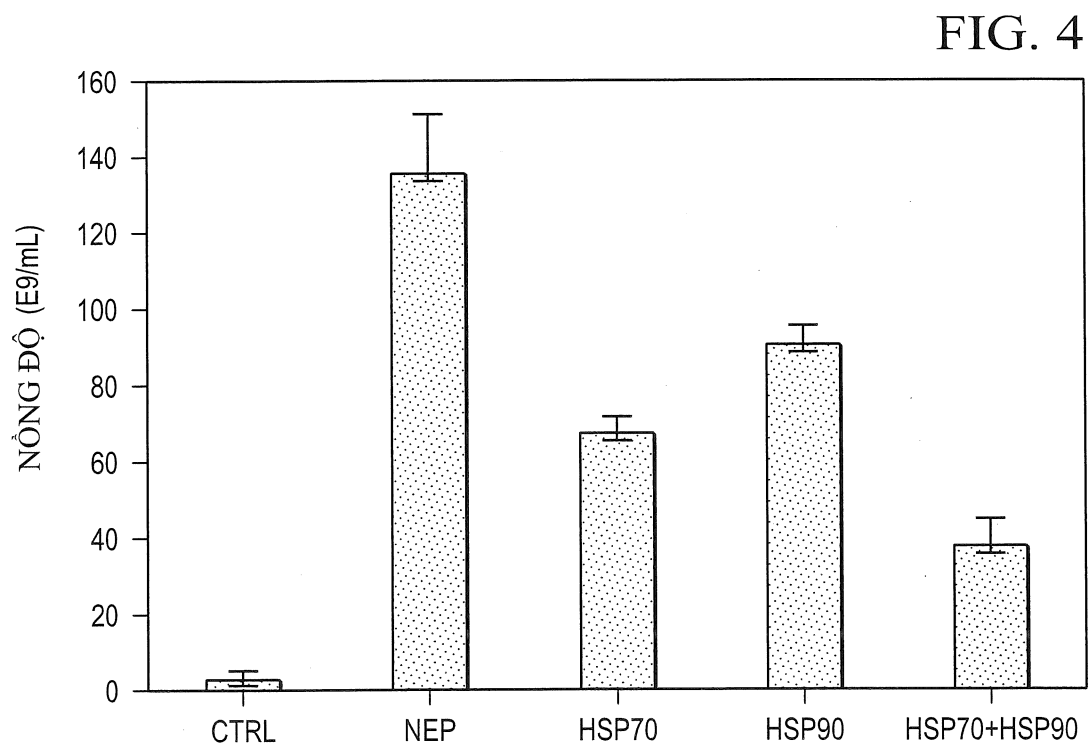
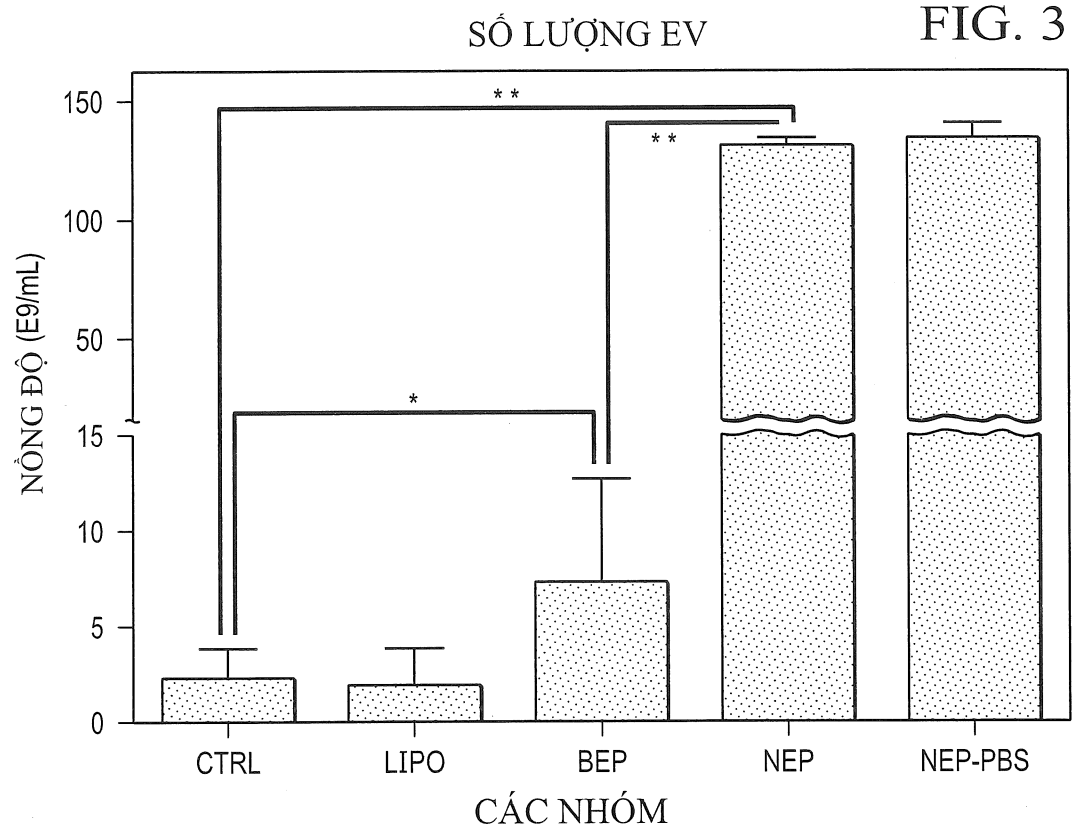


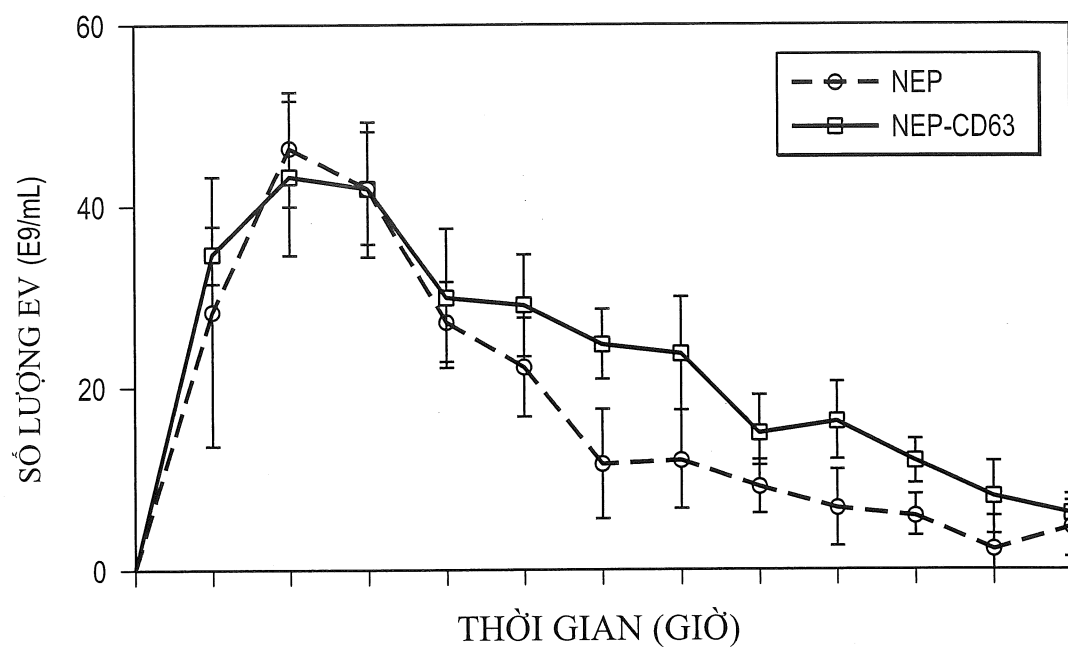
FIG. 2B

3/19



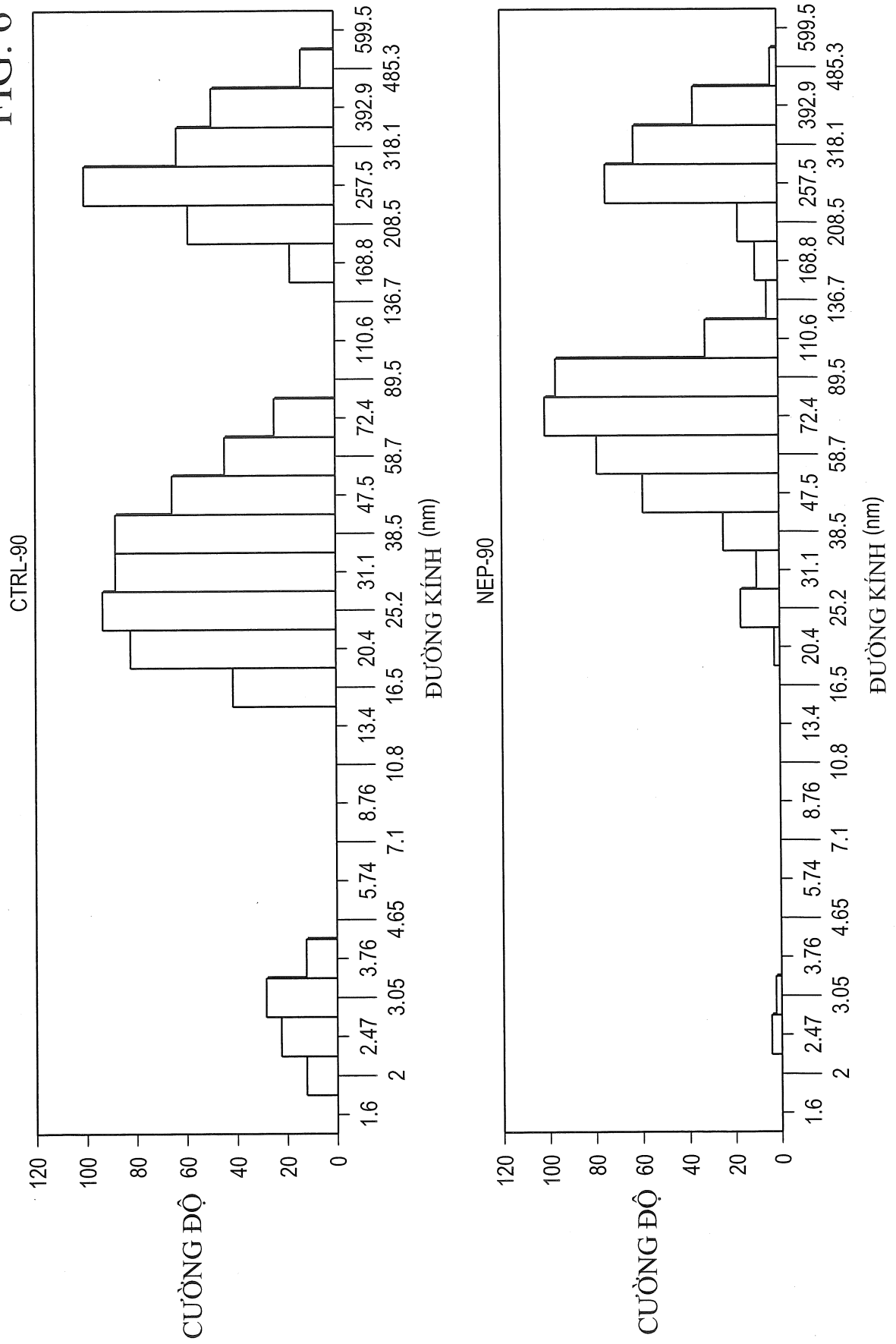
4/19

FIG. 5



5/19

FIG. 6



6/19

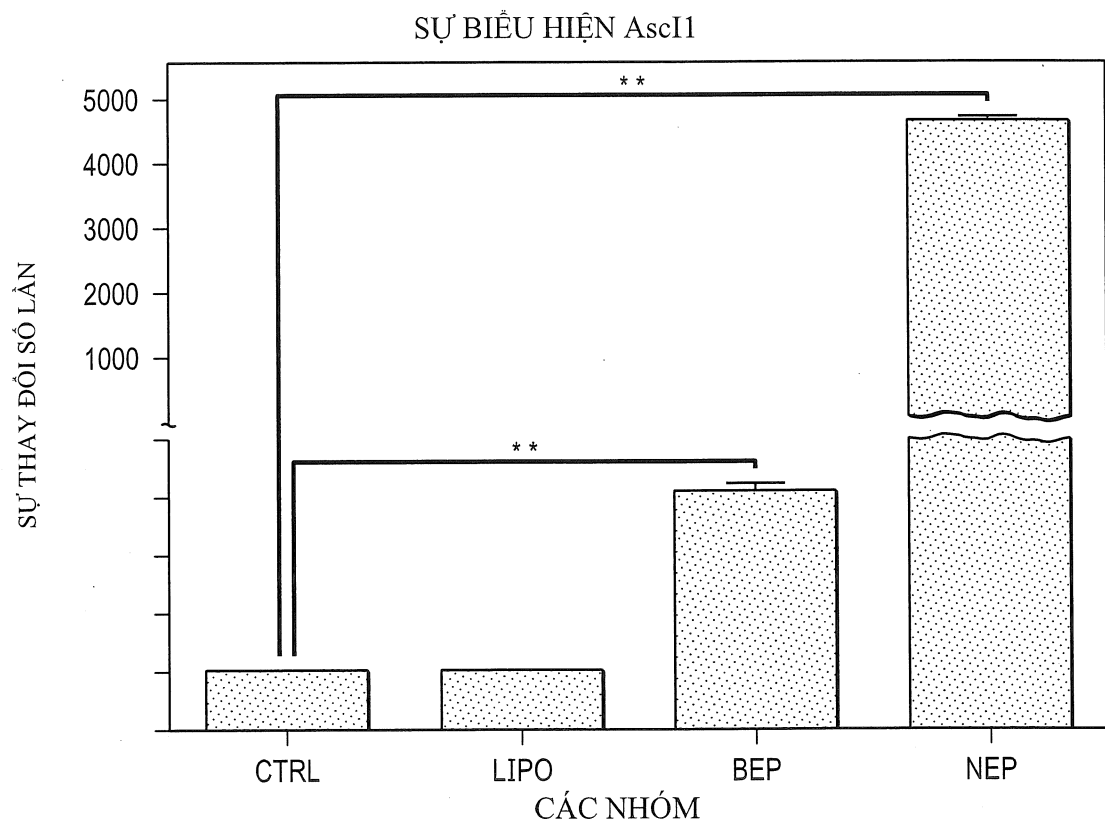
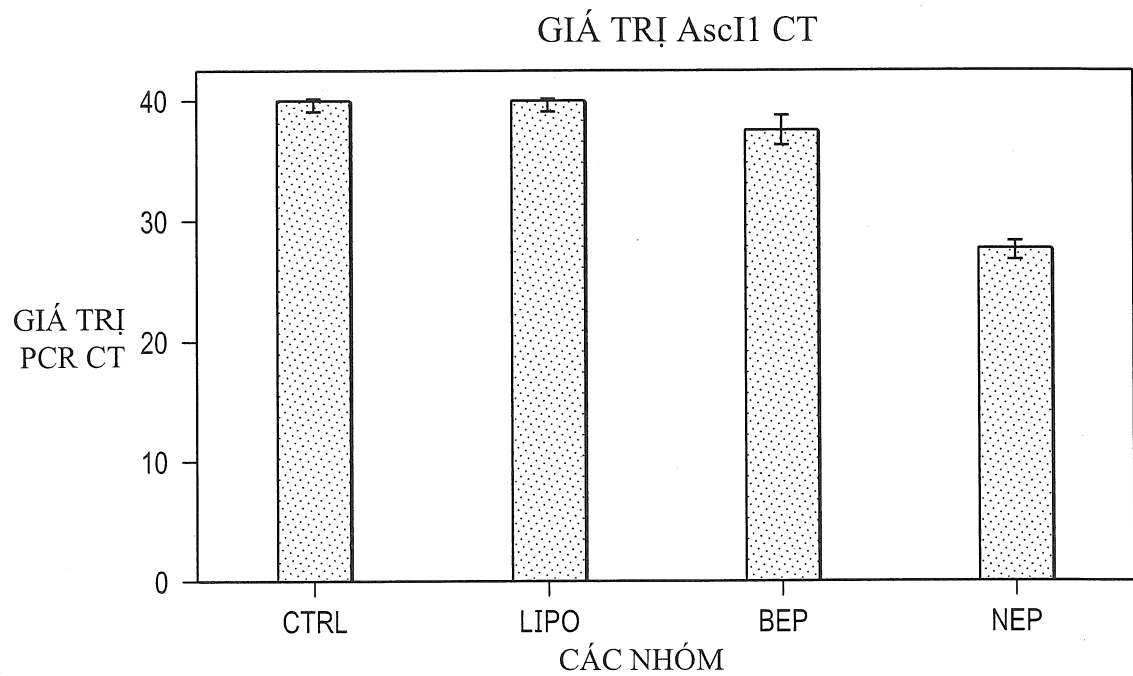


FIG. 7

7/19

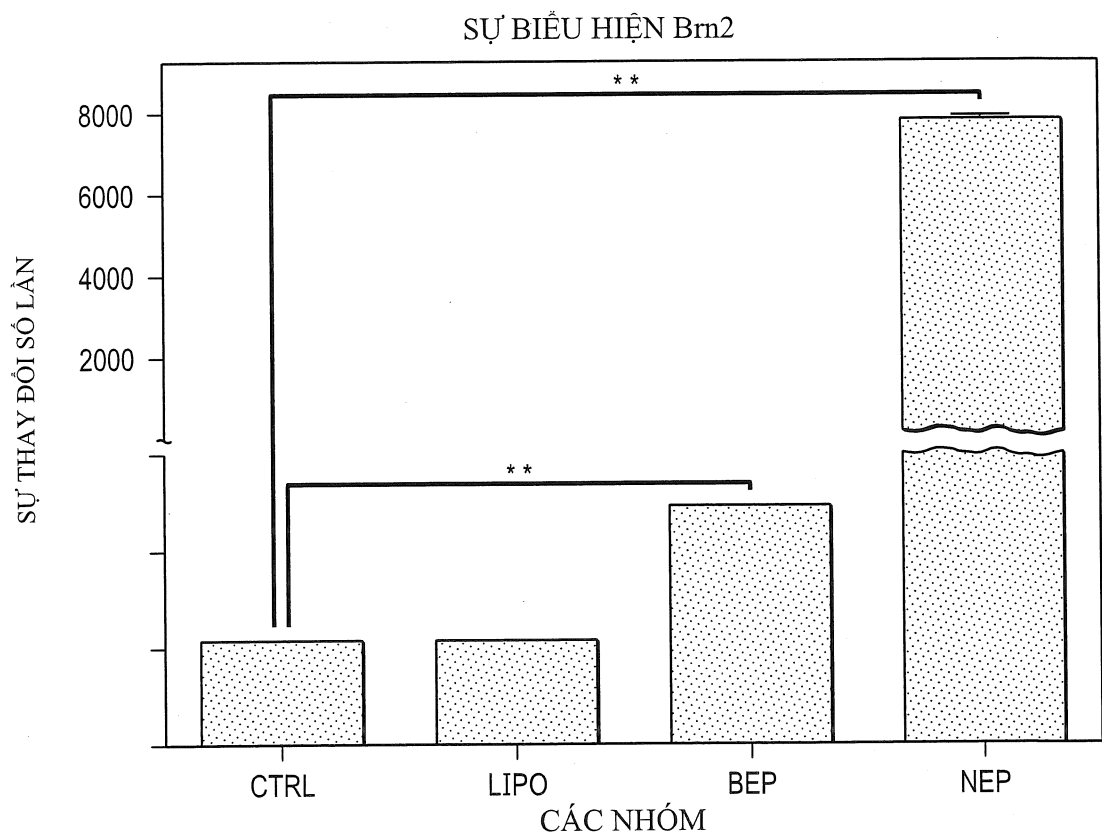
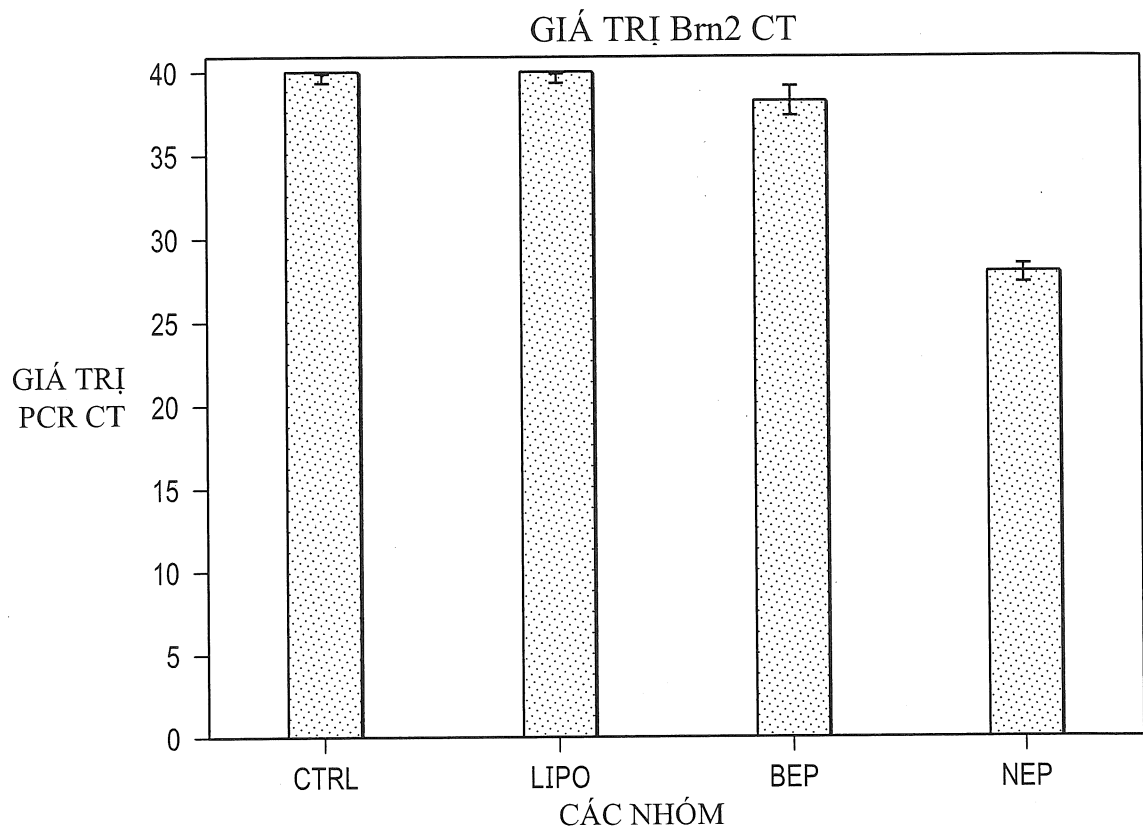


FIG. 8

8/19

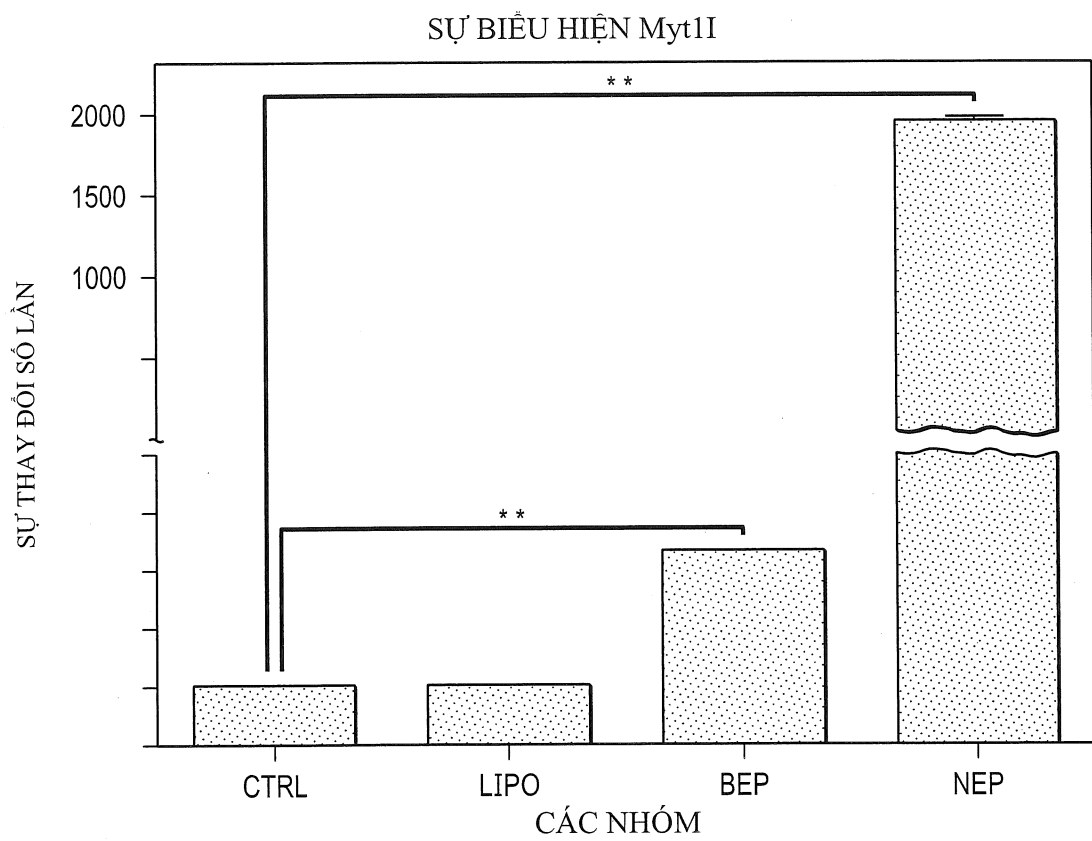
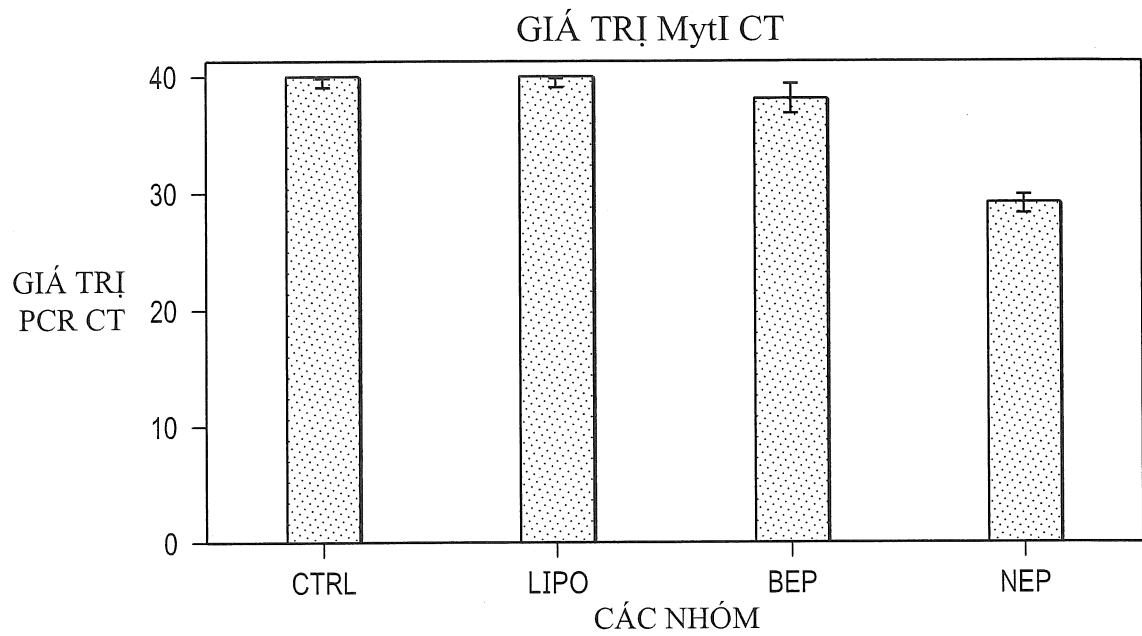


FIG. 9

9/19

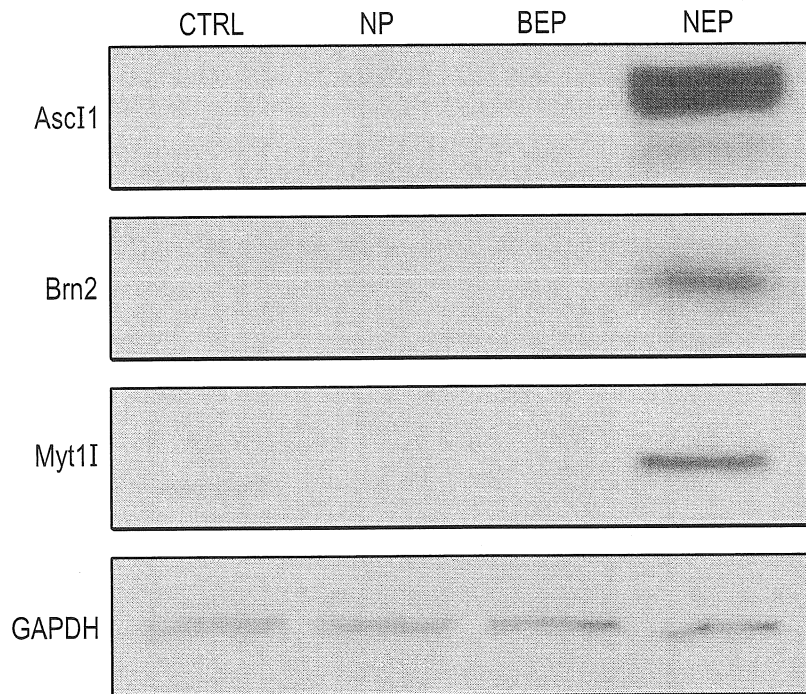


FIG. 10

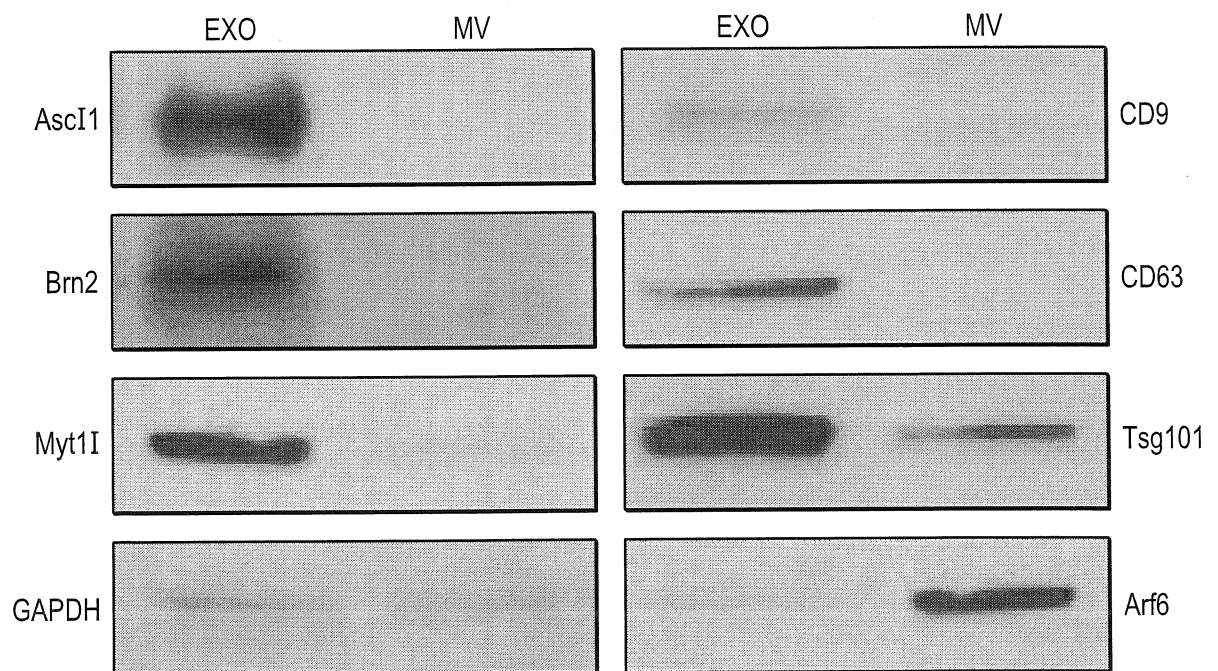
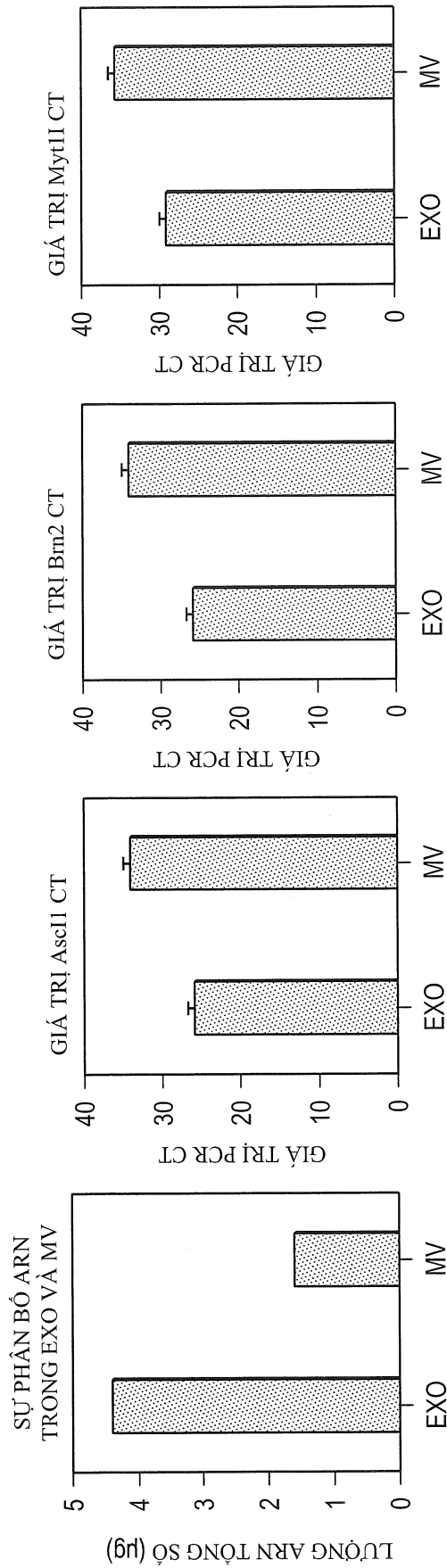


FIG. 12



10/19

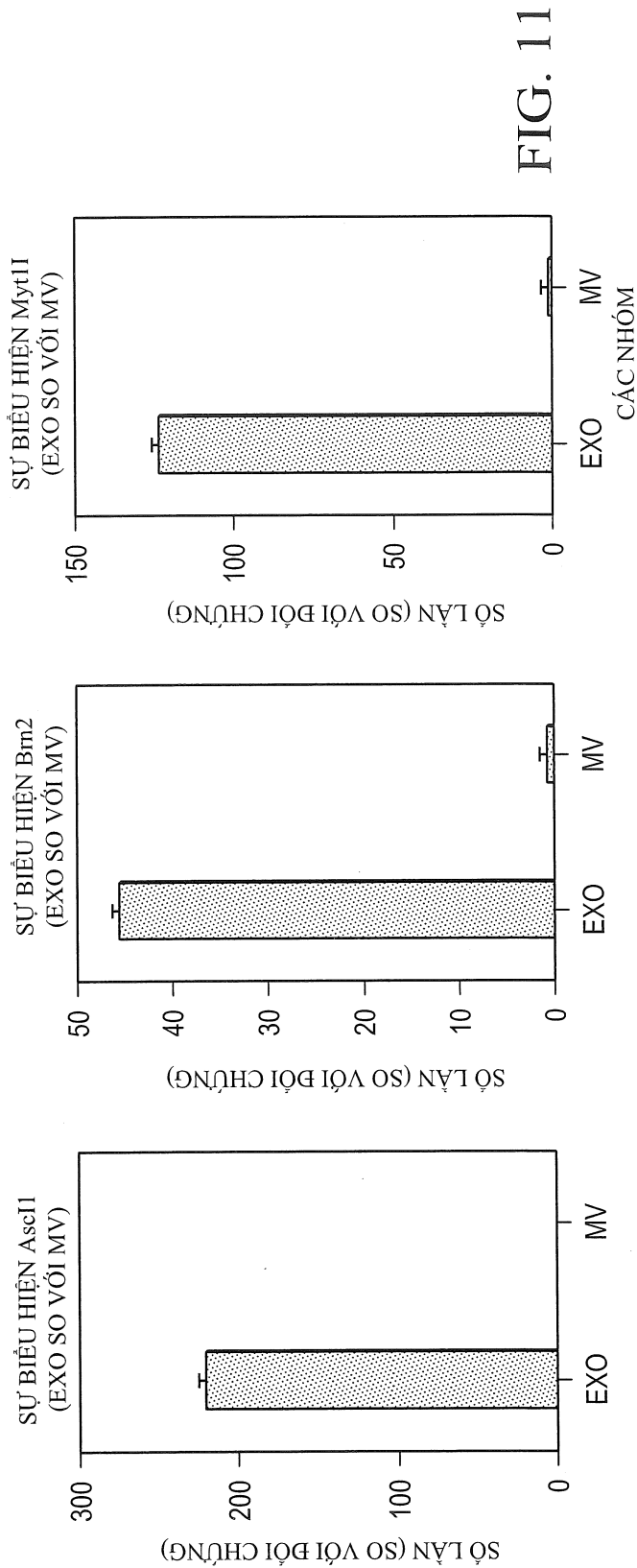
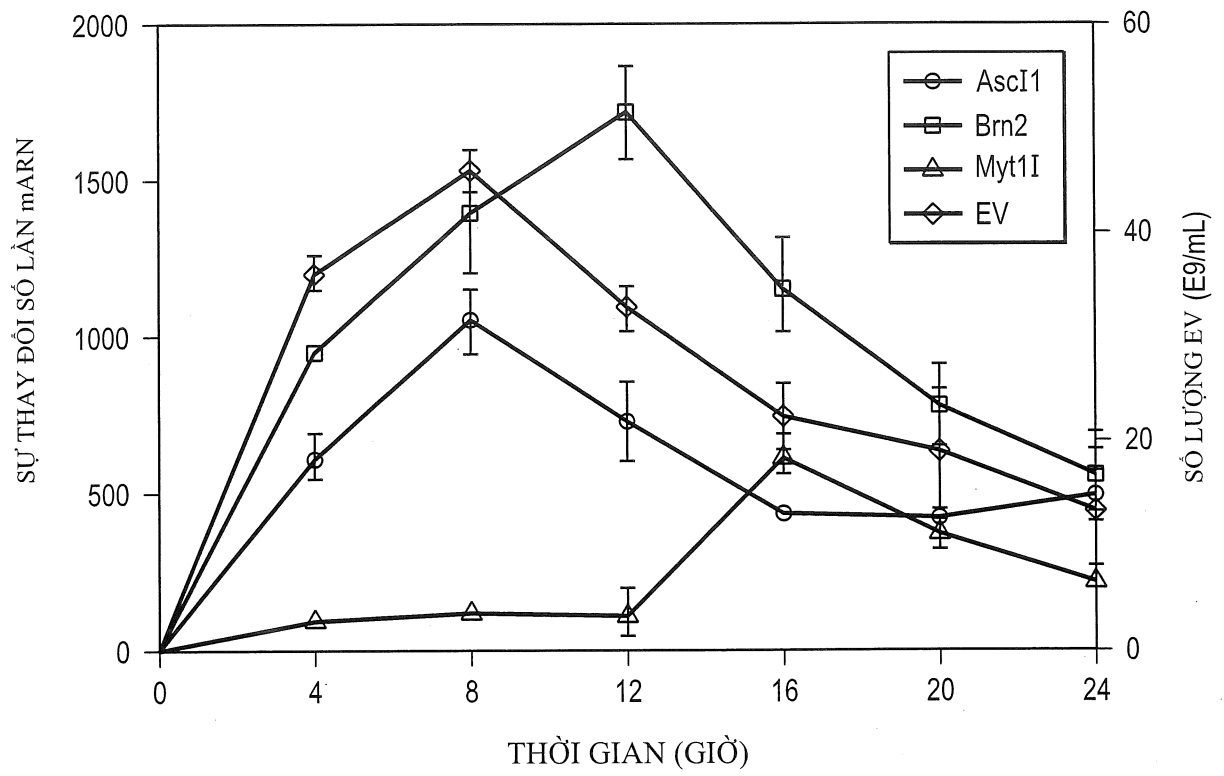
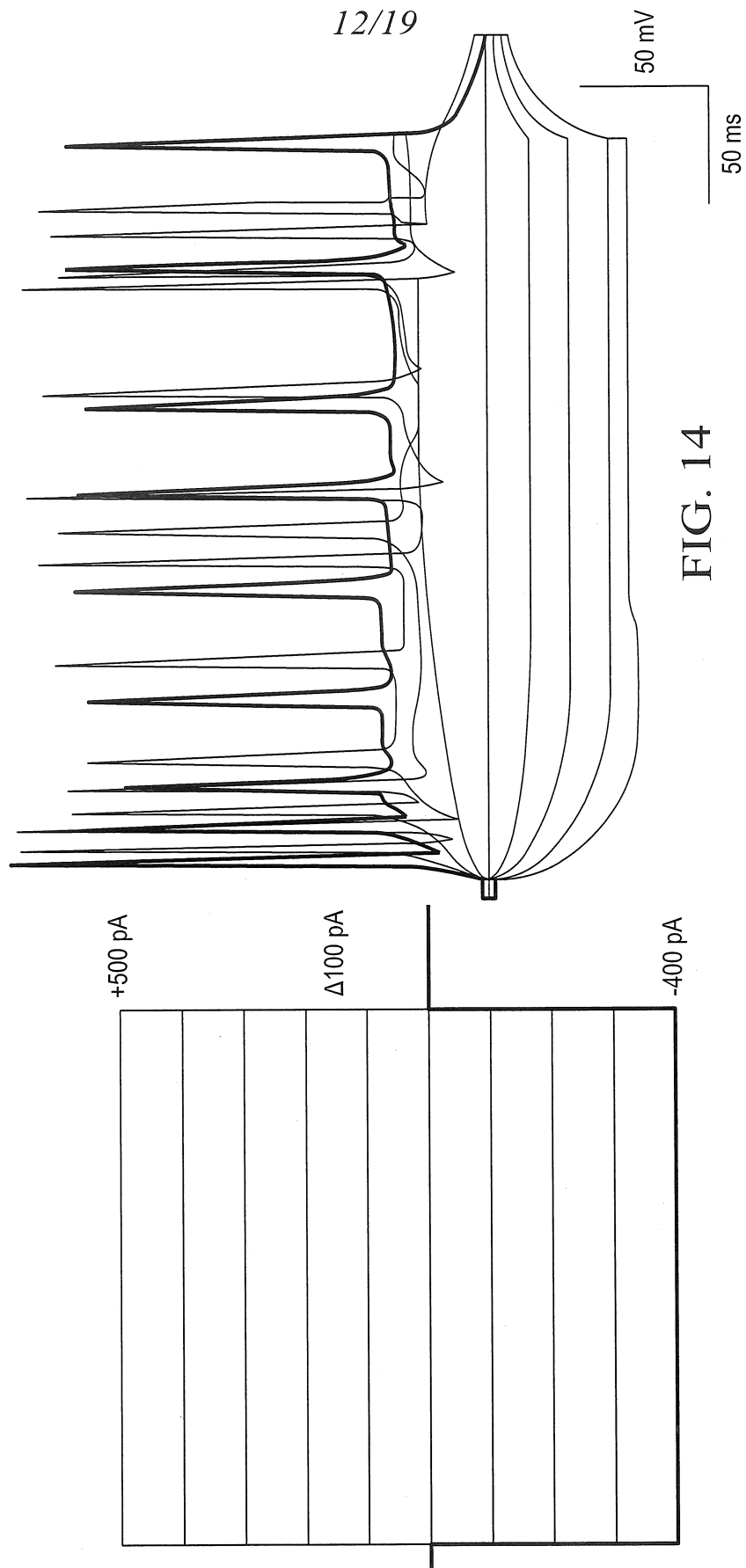


FIG. 11

11/19

FIG. 13





13/19

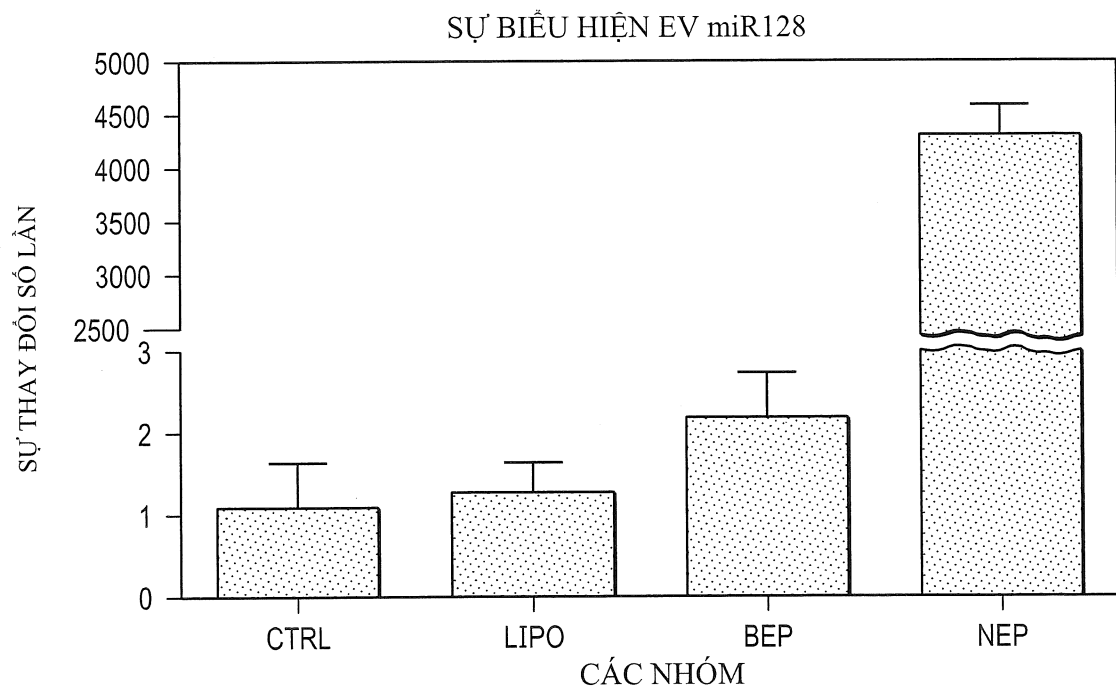
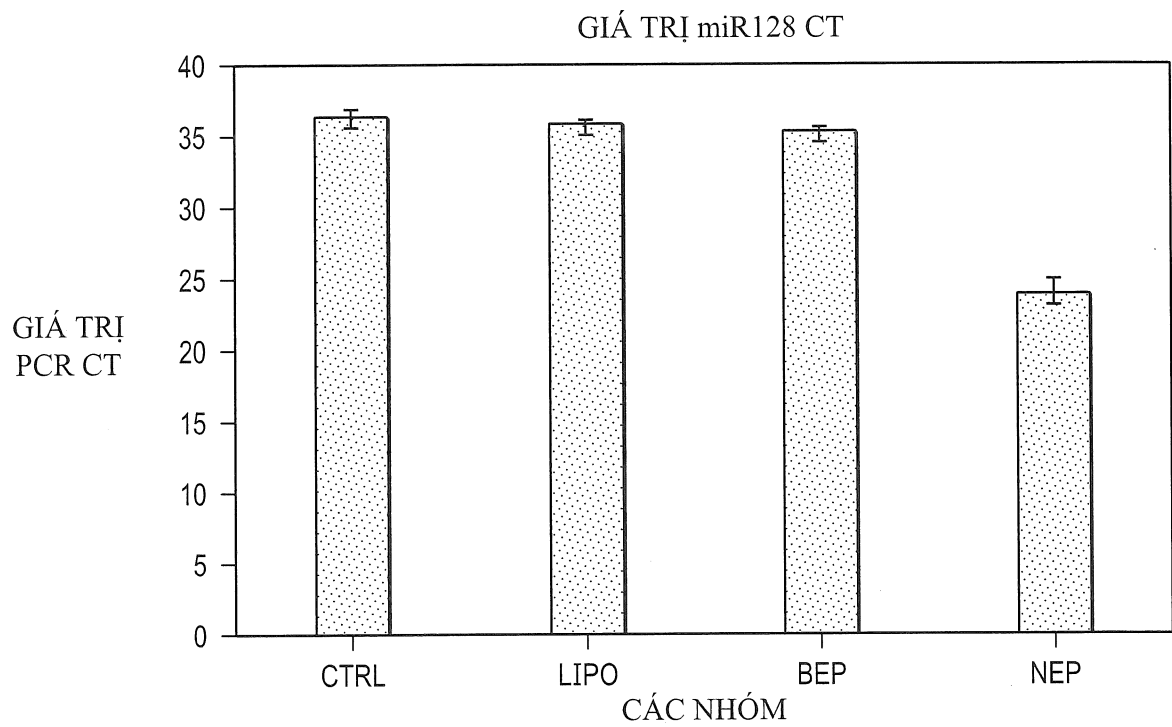


FIG. 15

14/19

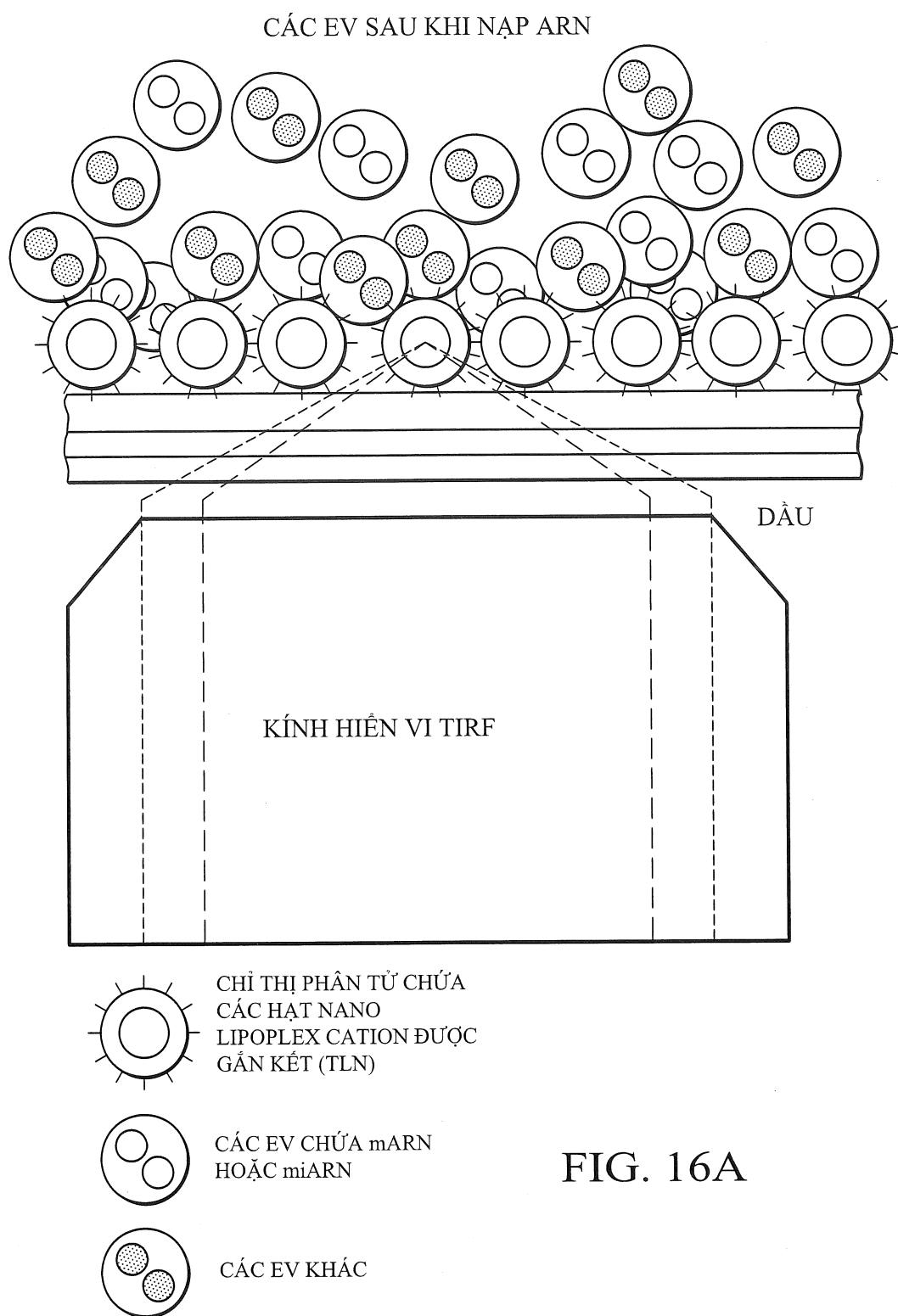


FIG. 16A

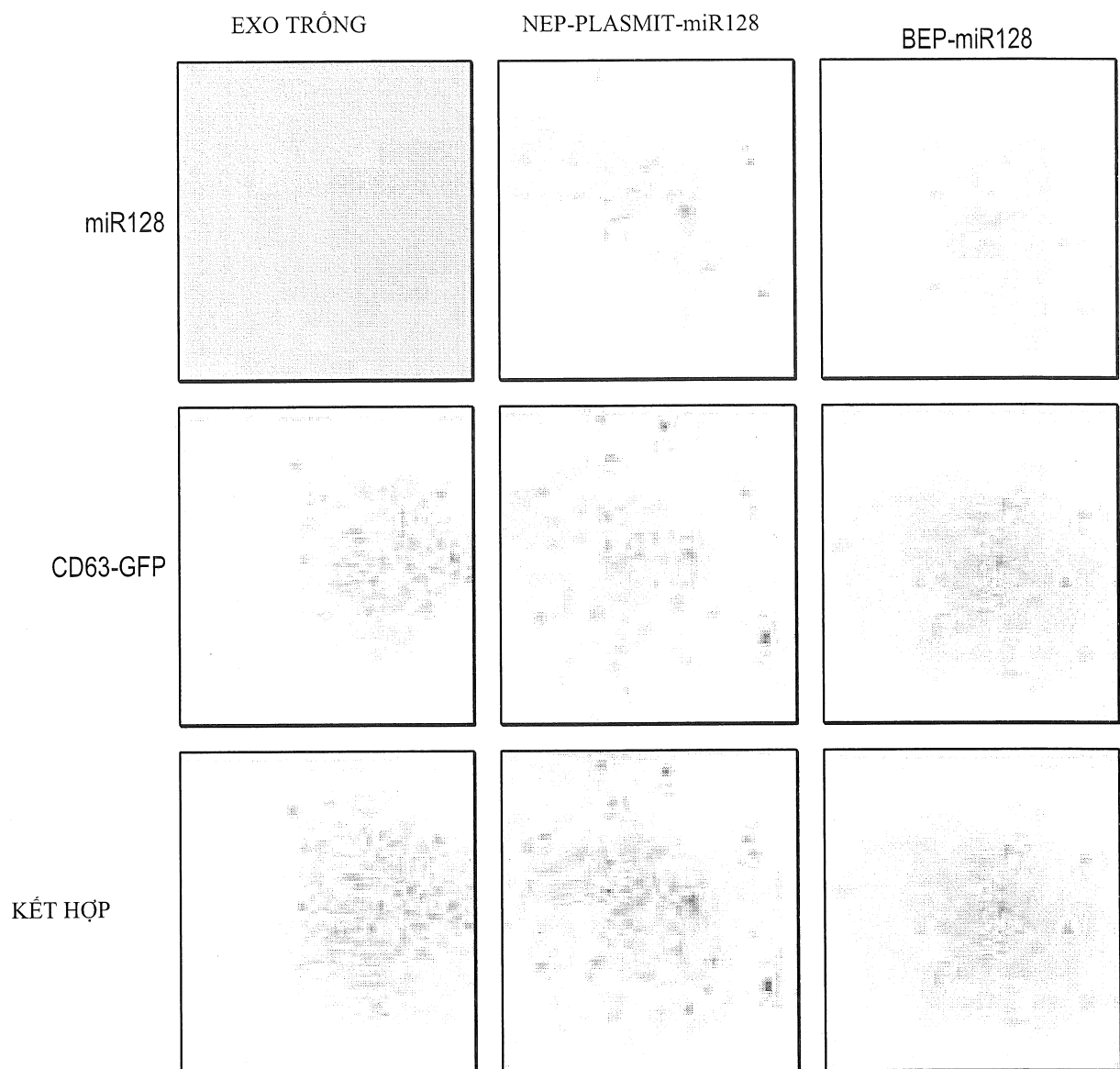
15/19

FIG. 16B

16/19

FIG. 16C

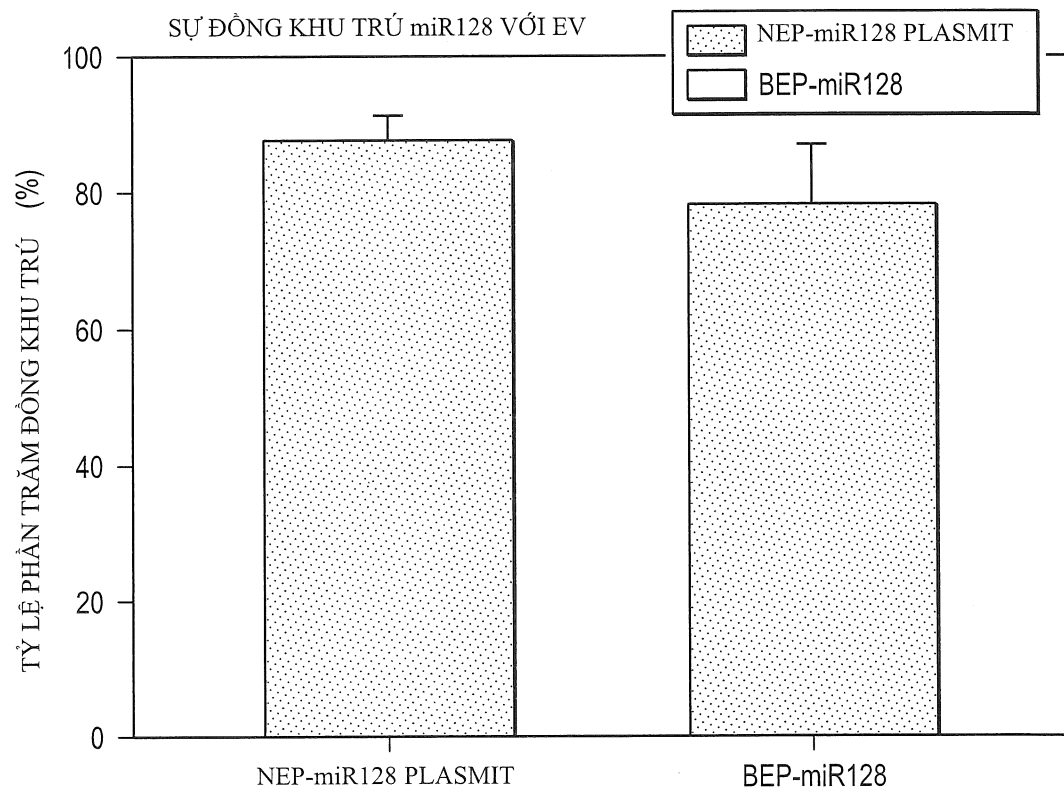
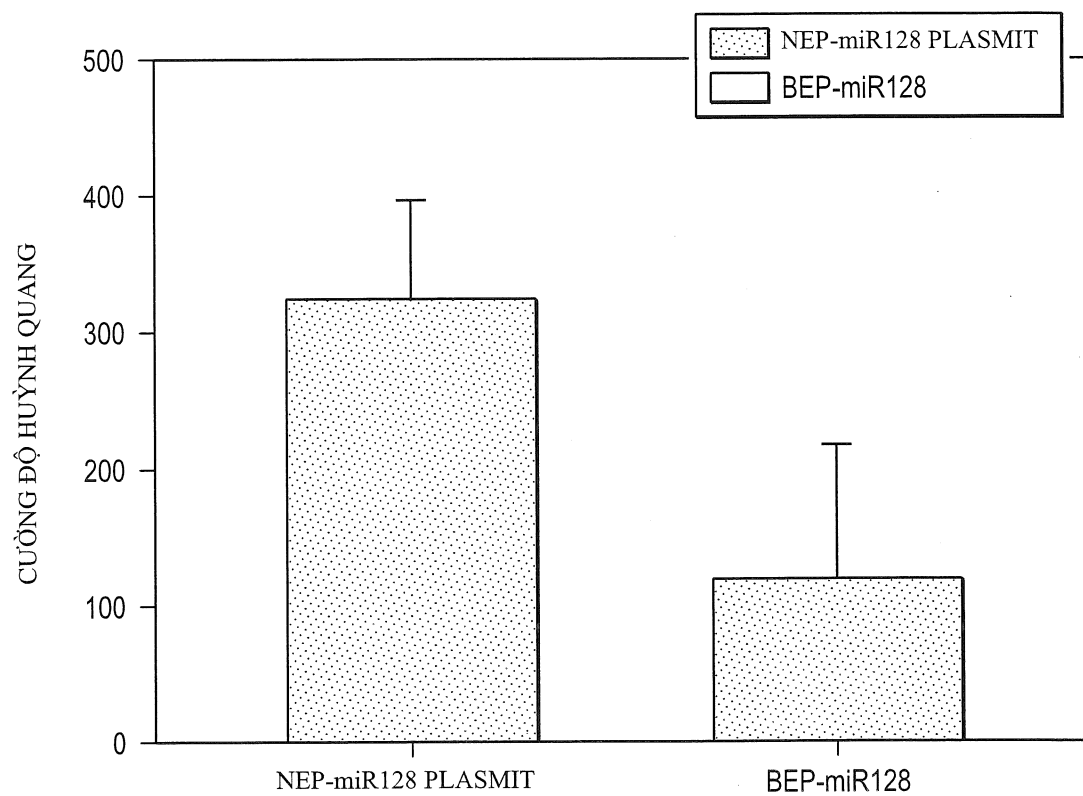
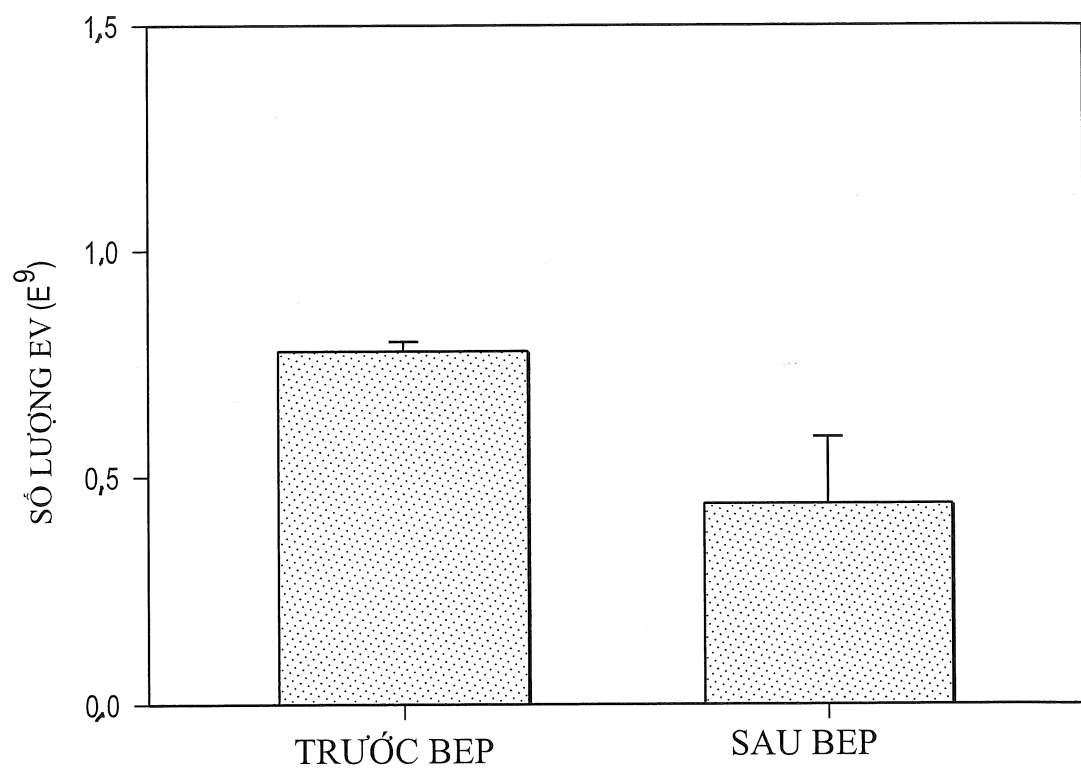


FIG. 16D



17/19

FIG. 16E



18/19

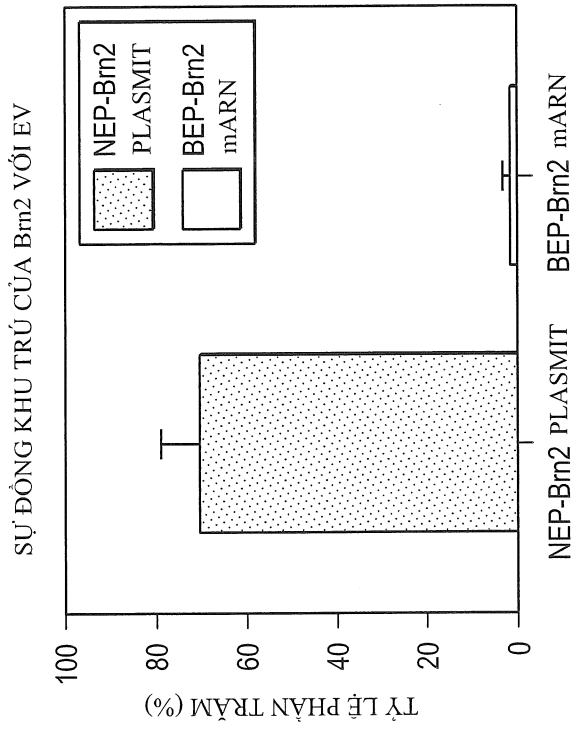


FIG. 17B

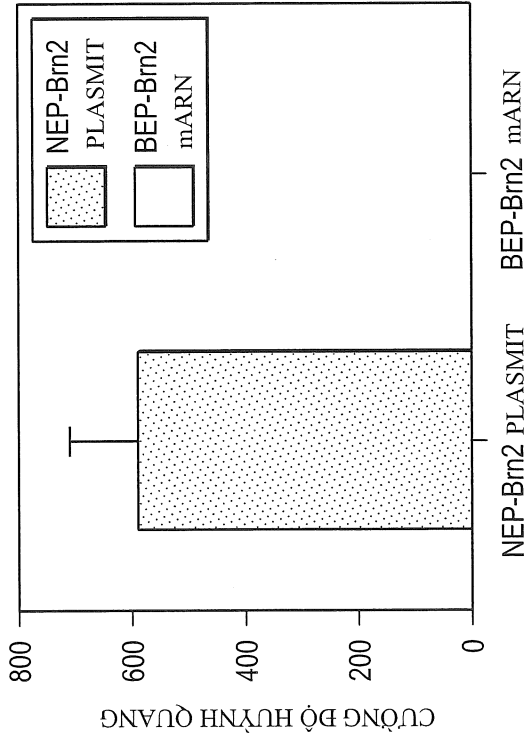


FIG. 17C

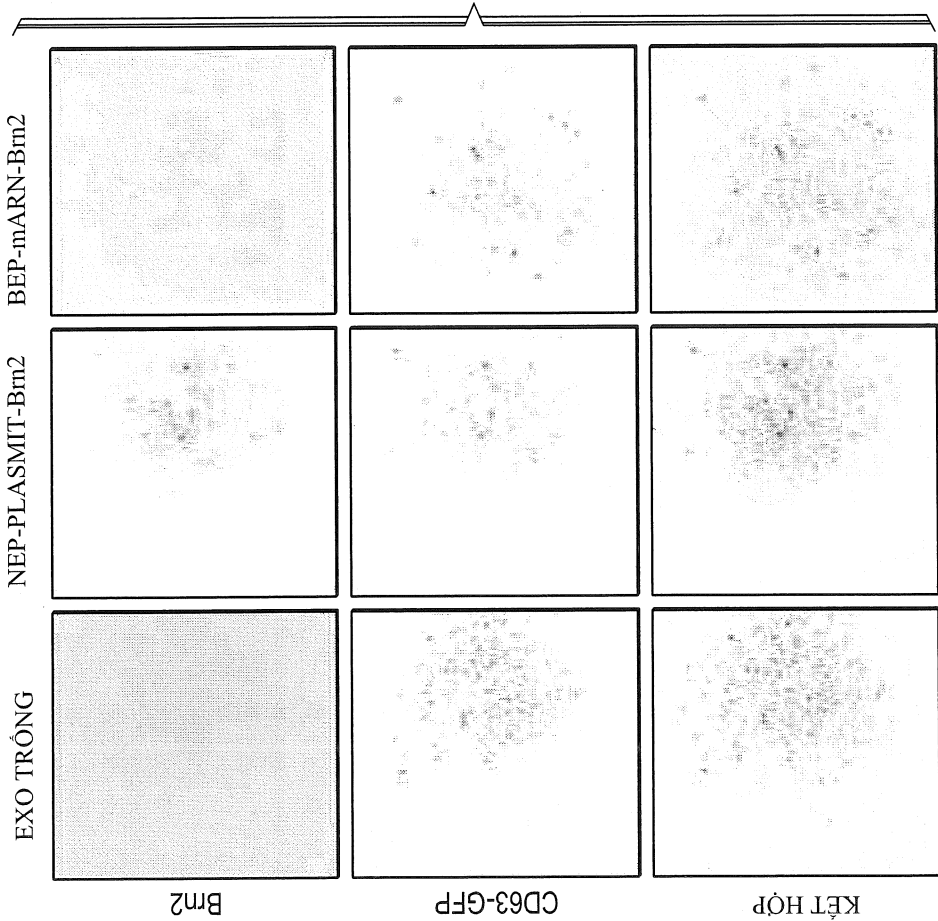


FIG. 17A

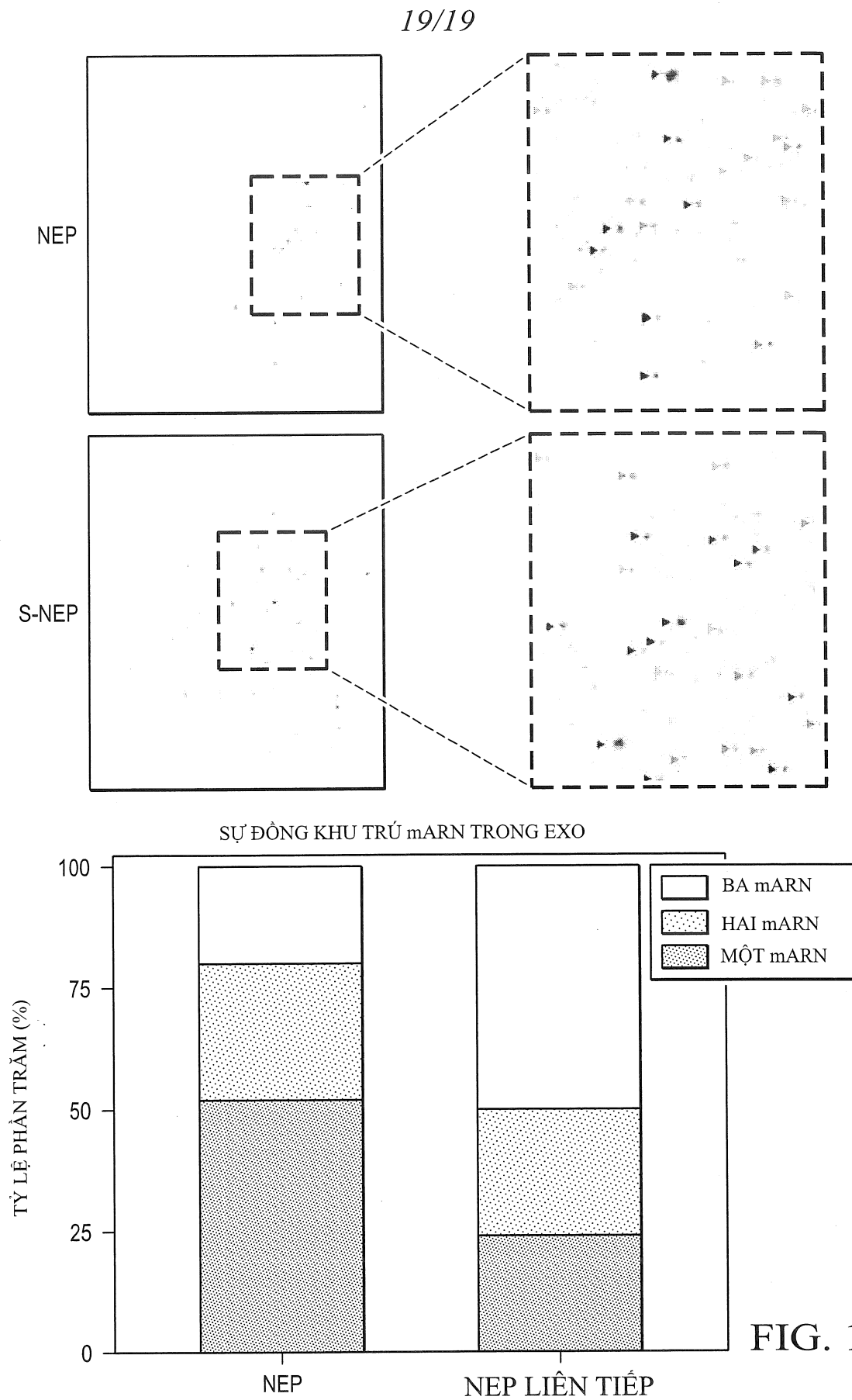


FIG. 18