



(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)



1-0048816

(51)<sup>2023.01</sup> C12N 5/0775; A61K 35/51

(13) B

(21) 1-2023-06804

(22) 05/10/2017

(62) 1-2019-02074

(86) PCT/SG2017/050500 05/10/2017

(87) WO 2018/067071 A1 12/04/2018

(30) 62/404,582 05/10/2016 US

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/04/2024 433

(73) CELLRESEARCH CORPORATION PTE. LTD. (SG)

7500A Beach Road, #06-302 The Plaza Singapore 199591

(72) PHAN, Toan Thang (SG).

(74) Công ty TNHH Quốc tế D &N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP QUẦN THỂ TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỬ MÀNG  
ÓI DÂY RÓN, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY ĐỂ  
PHÂN LẬP QUẦN THỂ TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỬ MÀNG ÓI DÂY RÓN  
VÀ MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY TẾ BÀO

(21) 1-2023-06804

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập quần thể tế bào gốc trung mô từ màng ối dây rốn, phương pháp này có bước nuôi mô dây rốn trong môi trường nuôi cấy chứa DMEM (môi trường eagle được cải biến bởi Dulbecco), F12 (môi trường Ham's F12), M171 (môi trường 171) và huyết thanh bào thai bò (Fetal Bovine Serum - FBS). Sáng chế còn đề cập đến quần thể tế bào gốc trung mô phân lập từ màng ối dây rốn, trong đó có ít nhất khoảng 90% hoặc nhiều hơn tế bào thuộc quần thể tế bào gốc này biểu hiện mỗi gen trong số gen đánh dấu sau: CD73, CD90 và CD105 và không biểu hiện các gen đánh dấu sau: CD34, CD45 và HLA-DR. Sáng chế còn đề cập đến môi trường nuôi cấy tế bào gốc trung mô và phương pháp sản xuất môi trường nuôi cấy này.

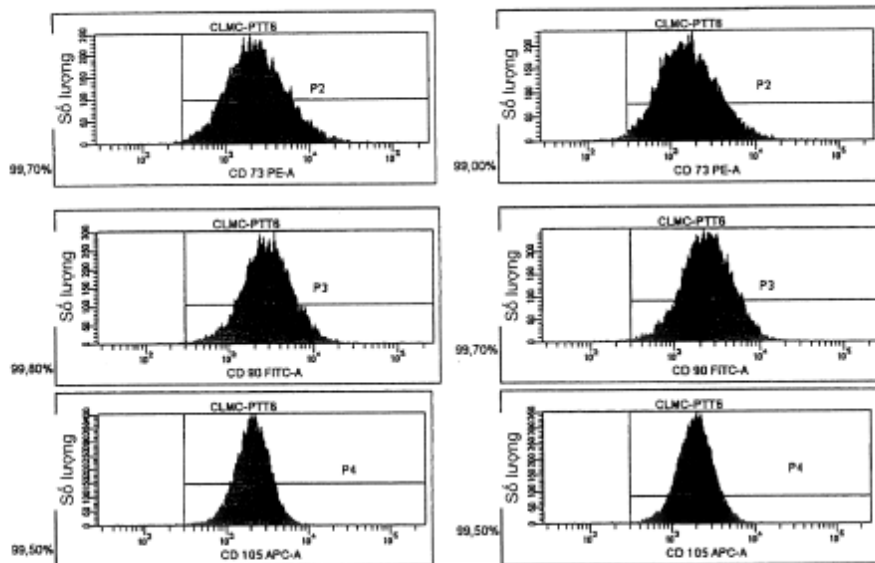


Fig. 6c

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập tế bào gốc trung mô (hoặc phân lập một quần thể tế bào gốc từ màng ối cuống rốn), cũng như đề cập đến quần thể tế bào gốc trung mô được phân lập từ màng ối dây rốn này. Sáng chế này còn đề cập đến môi trường nuôi cấy tế bào dùng để phân lập tế bào gốc trung mô từ màng ối dây rốn. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm và việc sử dụng quần thể tế bào gốc trung mô phân lập được. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp điều trị bệnh hay rối loạn bao gồm sử dụng quần thể tế bào gốc trung mô hoặc sử dụng dược phẩm chứa quần thể tế bào gốc trung mô này trên cá thể cần điều trị.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Tế bào gốc trung mô được phân lập từ màng ối dây rốn được công bố lần đầu trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2006/0078993 (đã được cấp các patent Mỹ US 9,085,755 và 9,737,568) và đơn yêu cầu cấp patent quốc tế có số công bố WO2006/019357. Từ đó đến nay, mô dây rốn được coi trọng làm nguồn cung các tế bào đa năng; nhờ khả năng sẵn có dồi dào, dây rốn, cụ thể là tế bào gốc được phân lập từ màng ối dây rốn (còn gọi là “tế bào gốc màng dây rốn”) đã được coi là nguồn cung tế bào khác tuyệt vời cho ngành y học tái tạo. Xem các tài liệu sau: Jeschke et al. Umbilical Cord Lining Membrane and Wharton’s Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: The Similarities and Differences; *The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal*, 2011, 4, 21-27.

Nghiên cứu sau này so sánh kiểu hình phenotyp, tốc độ tăng sinh, sự di động, khả năng sinh miễn dịch, và khả năng điều tiết miễn dịch của các tế bào gốc trung mô người (MSCs) được phân lập từ màng ối dây rốn (màng dây rốn (CL-MSCs), máu dây rốn (CB-MSCs), nhau thai (P-MSCs), và chất đông Wharton (WJ-MSCs) (Xem: Stubbendorf et al, Immunological Properties of Extraembryonic Human Mesenchymal Stromal Cells Derived from Gestational Tissue, *STEM CELLS AND DEVELOPMENT* Volume 22, Number 19, 2013, 2619-2629. Stubbendorf và cộng sự đã kết luận rằng quần thể tế bào MSC được lấy từ mô thai ngoài phôi có khả năng thay đổi để lẫn tránh được các đáp ứng miễn dịch cũng như tạo ra các tác dụng điều tiết miễn dịch. Các tác giả này còn phát hiện ra tế bào CL-MSC có tiềm năng tốt nhất cho các liệu pháp dựa trên tế bào, cũng như các tế bào này có khả năng

sinh miễn dịch thấp, nhưng các tế bào này cũng có khả năng tăng sinh và khả năng di động cao khiến cho các nghiên cứu trong tương lai đều tập trung vào các mô hình bệnh tốt nhất trong đó các tế bào CL-MSC có thể được sử dụng.

Trong khi có thể dễ dàng thu được tế bào gốc trung mô từ màng ối theo quy trình được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ 2006/0078993 và đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số công bố WO2006/019357, các thử nghiệm lâm sàng với các tế bào MSC màng dây rốn sẽ thuận lợi hơn khi có phương pháp phân lập được quần thể các tế bào MSC màng dây rốn này vốn dĩ có tính đồng nhất cao và vì vậy có thể được sử dụng cho các thử nghiệm lâm sàng.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp phân lập quần thể tế bào gốc trung mô từ màng ối dây rốn để phục vụ nhu cầu nêu trên. Mục đích nữa của sáng chế là đề xuất quần thể tế bào gốc trung mô có tính đồng nhất cao được phân lập từ màng ối dây rốn.

Mục đích này được thực hiện bởi các phương pháp, quần thể tế bào gốc trung mô, được phẩm tương ứng và môi trường nuôi cấy tế bào có các dấu hiệu nêu trong các điểm yêu cầu bảo hộ độc lập.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp phân lập quần thể tế bào gốc trung mô từ màng ối dây rốn, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy mô dây rốn trong môi trường nuôi cấy chứa DMEM (Môi trường eagle được cải biến bởi Dulbecco), F12 (Môi trường Ham's F12), M171 (Môi trường 171) và huyết thanh bào thai bò (Fetal Bovine Serum - FBS).

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất quần thể tế bào gốc trung mô được phân lập của màng ối dây rốn, trong đó có ít nhất 90% số tế bào của quần thể tế bào gốc này hoặc nhiều hơn biểu hiện của một trong số các gen đánh dấu sau: CD73, CD90 và CD105. Tốt hơn khi quần thể tế bào gốc trung mô được phân lập này không biểu hiện của các gen đánh dấu sau: CD34, CD45 và HLA-DR. Theo các phương án của khía cạnh này, quần thể tế bào gốc trung mô được phân lập này có ít nhất khoảng 91% tế bào hoặc nhiều hơn, khoảng 92% tế bào hoặc nhiều hơn, khoảng 93% tế bào hoặc nhiều hơn, khoảng 94% tế bào hoặc nhiều hơn, khoảng 95% tế bào hoặc nhiều hơn, khoảng 96% tế bào hoặc nhiều hơn, khoảng 97% tế bào hoặc nhiều hơn, khoảng 98% tế bào hoặc nhiều hơn khoảng 99% tế bào hoặc nhiều hơn biểu hiện một trong số các gen: CD73, CD90 và CD105. Ngoài ra, theo các phương án này

của khía cạnh thứ hai, tốt hơn là quần thể tế bào gốc trung mô được phân lập này có ít nhất khoảng 91% số tế bào hoặc nhiều hơn, khoảng 92% số tế bào hoặc nhiều hơn, khoảng 93% số tế bào hoặc nhiều hơn, khoảng 94% số tế bào hoặc nhiều hơn, khoảng 95% số tế bào hoặc nhiều hơn, khoảng 96% số tế bào hoặc nhiều hơn, khoảng 97% số tế bào hoặc nhiều hơn, khoảng 98% số tế bào hoặc nhiều hơn khoảng 99% số tế bào hoặc nhiều hơn không biểu hiện các gen đánh dấu CD34, CD45 và HLA-DR. Có thể thu nhận quần thể tế bào gốc trung mô này bằng phương pháp phân lập quần thể tế bào gốc trung mô được mô tả theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất được phẩm chứa tế bào động vật có vú (theo khía cạnh thứ hai) theo sáng chế.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế môi trường nuôi cấy để phân lập, phương pháp này có bước trộn các thành phần dưới đây để thu được thể tích cuối là 500 ml môi trường nuôi cấy:

i. 250ml DMEM

ii. 118ml M171

iii. 118ml DMEM/F12

iv. 12,5ml huyết thanh bào thai bò (FBS) để thu được nồng độ cuối là 2,5% (thể tích/thể tích).

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy tế bào thu được bằng phương pháp theo khía cạnh thứ tư nêu trên.

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề xuất phương pháp phân lập tế bào gốc trung mô từ màng ối dây rốn, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy mô màng ối trong môi trường nuôi cấy được điều chế theo phương pháp theo khía cạnh thứ tư nêu trên.

Theo khía cạnh thứ bảy, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy tế bào có các thành phần:

- DMEM với nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 55 đến 65% (thể tích/thể tích),
- F12 với nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 5 đến 15% (thể tích/thể tích),
- M171 với nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 15 đến 30% (thể tích/thể tích) và
- FBS với nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 1 đến 8% (thể tích/thể tích).

Theo khía cạnh thứ tám, sáng chế đề xuất việc sử dụng môi trường nuôi cấy tế bào theo khía cạnh thứ bảy nêu trên để phân lập tế bào gốc trung mô từ màng ối dây rốn.

Theo khía cạnh thứ chín, sáng chế đề xuất việc sử dụng môi trường nuôi cấy tế bào theo khía cạnh thứ bảy nêu trên để nuôi cấy tế bào gốc trung mô lấy từ màng ối dây rốn.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Sáng chế này sẽ được hiểu rõ hơn với sự tham chiếu đến phần mô tả chi tiết khi được xem xét kết hợp với các ví dụ không làm giới hạn sáng chế và các hình vẽ, trong đó:

Fig.1 là bảng thông tin kỹ thuật về môi trường D'MEM (Dulbecco's modified eagle medium) do hãng Lonza cung cấp, bao gồm cả số catalô của D'MEM được sử dụng để làm ví dụ minh họa môi trường theo sáng chế (PTT-6) trong phần thử nghiệm;

Fig.2 là bảng thông tin kỹ thuật của hãng Lonza về môi trường Ham's F12;

Fig.3 là bảng thông tin kỹ thuật của hãng Lonza về môi trường DMEM:F12 (1:1), bao gồm cả số catalô của DMEM:F12 (1:1) được sử dụng để làm ví dụ minh họa môi trường theo sáng chế (PTT-6) trong phần thử nghiệm;

Fig.4 là bảng thông tin kỹ thuật do Life Technologies Corporation cung cấp về môi trường M171 bao gồm cả số catalô của môi trường M171 được sử dụng để làm ví dụ minh họa môi trường theo sáng chế (PTT-6) trong phần thử nghiệm;

Fig.5 là danh sách các thành phần môi trường, bao gồm cả tên các nhà cung cấp và số catalô được sử dụng trong phần thử nghiệm để điều chế môi trường PTT-6.

Fig.6 là kết quả các thử nghiệm phân tích tế bào theo dòng chảy trong đó tế bào gốc trung mô được phân lập từ dây rốn được phân tích sự biểu hiện các gen đánh dấu tế bào gốc trung mô CD73, CD90 và CD105. Đối với các thử nghiệm này, tế bào gốc trung mô được phân lập từ mô dây rốn bằng cách nuôi cấy mô dây rốn trong ba môi trường nuôi cấy khác nhau, sau đó cấy chuyển tế bào gốc trung mô vào môi trường tương ứng. Ba môi trường nuôi cấy sau được sử dụng trong các thử nghiệm này: a) môi trường 90% (thể tích/thể tích) DMEM được bổ sung thêm 10% (thể tích/thể tích) FBS, b) môi trường nuôi cấy PTT-4 được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2006/0078993 và đơn yêu cầu cấp patent quốc tế tương ứng có số công bố WO2006/019357 gồm 90% (thể tích/thể tích) CMRL1066, và 10% (thể tích/thể tích) FBS (xem đoạn số [0183] trong tài liệu WO2006/019357 và c) môi trường nuôi cấy PPT-6 theo sáng chế với thành phần được mô tả trong tài liệu này. Trong

phân tích tế bào theo dòng chảy này, hai mẫu tế bào gốc trung mô màng dây rốn (CLMC) khác nhau được đem phân tích trên mỗi trong số ba môi trường nuôi cấy được sử dụng. Kết quả thể hiện trên Fig.6a đến Fig.6c. Cụ thể, Fig.6a là tỷ lệ phần trăm số tế bào gốc màng dây rốn trung mô được phân lập biểu hiện các gen đánh dấu tế bào gốc CD73, CD90 và CD105 sau khi phân lập từ mô dây rốn và nuôi cấy trong DMEM/10% FBS, Fig.6b là tỷ lệ phần trăm số tế bào gốc màng dây rốn được phân lập biểu hiện các gen đánh dấu tế bào gốc CD73, CD90 và CD105 sau khi phân lập từ mô dây rốn và nuôi cấy trong PTT-4 và Fig.6c là tỷ lệ phần trăm số tế bào gốc màng dây rốn trung mô được phân lập biểu hiện các gen đánh dấu tế bào gốc CD73, CD90 và CD105 sau khi phân lập từ mô dây rốn và nuôi cấy trong PTT-6.

Fig.7 là kết quả các phân tích tế bào theo dòng chảy trong đó tế bào gốc trung mô được phân lập từ dây rốn được phân tích sự biểu hiện các gen đánh dấu tế bào gốc (CD73, CD90 và CD105, CD34, CD45 và HLA-DR (kháng nguyên bạch cầu người (Human Leukocyte Antigen) – kháng nguyên D (antigen D Related)) vốn được sử dụng để xác định khả năng tương thích của tế bào gốc trung mô người đa năng cho các liệu pháp dùng tế bào và so sánh với biểu hiện các gen đánh dấu này trên tế bào gốc trung mô tủy xương. Để thực hiện phân tích này, tế bào gốc trung mô màng ôi dây rốn được phân lập từ mô dây rốn bằng cách nuôi cấy mô dây rốn trong môi trường nuôi cấy PPT-6 theo sáng chế trong khi tế bào gốc trung mô tủy xương được phân lập từ tủy xương người bằng cách sử dụng quy trình tiêu chuẩn. Fig.7a là tỷ lệ phần trăm số tế bào gốc màng dây rốn trung mô biểu hiện các gen đánh dấu tế bào gốc CD73, CD90 và CD105 và không biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR sau khi phân lập từ mô dây rốn và nuôi cấy trong môi trường PTT-6 còn Fig.7b là tỷ lệ phần trăm số tế bào gốc trung mô tủy xương được phân lập biểu hiện CD73, CD90 và CD105 và không biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Như được giải thích ở trên, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp phân lập quần thể tế bào gốc trung mô từ màng ôi dây rốn, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy mô dây rốn trong môi trường nuôi cấy chứa DMEM (Dulbecco's modified eagle medium), F12 (Ham's F12 Medium), M171 (Medium 171) và FBS (Fetal Bovine Serum). Bất ngờ được phát hiện trong sáng chế này là khi sử dụng môi trường như trên để phân lập quần thể tế bào gốc trung mô từ màng ôi dây rốn là có hơn 90% hoặc thậm chí 99% hoặc nhiều hơn số tế bào dương tính đối với ba gen đánh dấu tế bào gốc trung mô CD73, CD90

và CD105 đồng thời cũng với cùng tỷ lệ tế bào gốc này không biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR (xem phần thử nghiệm), có nghĩa là 99% hoặc nhiều hơn số tế bào trong quần thể này biểu hiện các gen đánh dấu tế bào gốc CD73, CD90 và CD105 đồng thời không biểu hiện các gen đánh dấu CD34, CD45 và HLA-DR. Quần thể tế bào có tính đồng nhất cực cao và được xác định rõ này là ứng cử viên lý tưởng của các thử nghiệm lâm sàng và các liệu pháp dựa trên tế bào vì, các ứng cử viên này, đáp ứng hoàn toàn các tiêu chí thường được chấp nhận cho tế bào gốc trung mô người được sử dụng cho liệu pháp tế bào, chẳng hạn, theo các tiêu chí được xác định trong tài liệu: Dominici et al, “Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement”, *Cytotherapy* (2006) Vol. 8, No. 4, 315-317, Sensebe et al., “Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review”, *Stem Cell Research & Therapy* 2013, 4:66), Vonk et al., *Stem Cell Research & Therapy* (2015) 6:94, or Kundrotas *Acta Medica Lituanica*. 2012. Vol. 19. No. 2. P. 75–79. Ngoài ra bằng cách sử dụng thiết bị phản ứng sinh học như Quantum Cell Expansion System, có thể thu nhận được số lượng lớn tế bào gốc trung mô như từ 300 đến 700 triệu tế bào gốc trung mô cho một lần chạy thiết bị (cũng xem phần thử nghiệm). Vì vậy, giải pháp của sáng chế có thể cung cấp được số lượng tế bào gốc cần thiết cho các ứng dụng trị liệu như sử dụng trong làm lành vết thương với chi phí hiệu quả. Ngoài ra, mọi thành phần được sử dụng để điều chế môi trường nuôi cấy của sáng chế là có sẵn trên thị trường với chuẩn chất lượng GMP. Như vậy, giải pháp của sáng chế mở ra con đường sản xuất quần thể tế bào gốc trung mô có tính đồng nhất cao này từ màng ối dây rốn theo tiêu chuẩn GMP.

Liên quan đến khía cạnh này, lưu ý là môi trường nuôi cấy của sáng chế cho phép phân lập quần thể tế bào gốc trung mô (còn gọi tắt là “tế bào gốc trung mô”) từ màng ối trong điều kiện cho phép tăng sinh tế bào gốc trung mô/tế bào đầu dòng mà không xảy ra quá trình biệt hóa các tế bào gốc trung mô/đầu dòng này. Vì vậy, sau khi phân lập tế bào gốc trung mô từ màng ối như được mô tả thì quần thể tế bào gốc trung mô/đầu dòng được phân lập này có khả năng biệt hóa thành nhiều dạng tế bào như được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ 2006/0078993, patent Mỹ số 9,085,755, đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số công bố WO2006/019357, patent Mỹ số 8,287,854 hoặc tài liệu công bố WO2007/046775, chẳng hạn. Ví dụ, đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2006/0078993 mô tả tế bào gốc trung mô của màng ối dây rốn có dạng hình con quay, biểu hiện các gen sau: POU5f1, Bmi-1, yếu tố ức chế bệnh bạch cầu (leukemia inhibitory factor - LIF), và tiết ra Activin A và Follistatin. Tế bào gốc trung mô được phân lập theo sáng chế có thể biệt hóa được thành dạng tế bào trung



mô bất kỳ như, nhưng không bị giới hạn ở, tế bào mỡ, nguyên bào sợi da, tế bào sụn, tế bào tạo xương, tế bào gân, nguyên bào sợi dây chằng, tế bào cơ tim, tế bào cơ trơn, tế bào cơ xương, tế bào mỡ, tế bào sản xuất mucin, tế bào có nguồn gốc từ tuyến nội tiết như tế bào sản xuất insulin (ví dụ, tế bào đảo  $\beta$  ( $\beta$ -islet)) hay tế bào ngoại bì thần kinh. Những tế bào gốc được phân lập theo sáng chế có thể được cho biệt hóa *in vitro* để sử dụng tiếp những tế bào biệt hóa này trong y học. Một ví dụ minh họa cách làm này là biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào đảo  $\beta$  sản xuất insulin vốn có thể được sử dụng sau này, chẳng hạn bằng cách cấy vào người bệnh bị chứng thiếu hụt insulin như bệnh đái tháo đường (xem thêm tài liệu WO2007/046775 về việc này). Giải pháp khác là tế bào gốc trung mô của sáng chế có thể được sử dụng ở trạng thái chưa biệt hóa trong liệu pháp dựa trên tế bào, ví dụ để làm lành vết thương như điều trị bỏng hay điều trị vết thương do đái tháo đường mãn tính. Trong các ứng dụng trị liệu này, tế bào gốc trung mô của sáng chế có thể được dùng để thúc đẩy quá trình làm lành vết thương bằng cách tương tác với mô bị bệnh bao quanh hoặc cũng có thể được biệt hóa thành tế bào da tương ứng (xem lại tài liệu WO2007/046775, chẳng hạn).

Theo đó cần lưu ý là quần thể tế bào gốc trung mô được mô tả ở đây có thể được phân lập và nuôi cấy (có nghĩa là có nguồn gốc) từ mô dây rốn bất kỳ miễn là mô dây rốn này có màng ối (còn được gọi là “màng lót dây rốn”). Vì vậy, quần thể tế bào gốc trung mô có thể được phân lập từ (các mẫu) toàn bộ dây rốn như mô tả trong phần thử nghiệm của sáng chế. Mô dây rốn này vì vậy có thể chứa, ngoài màng ối, mô khác/thành phần dây rốn khác bất kỳ. Ví dụ, Fig.16 trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2006/0078993 hay đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số WO2006/019357 cho thấy màng ối dây rốn là phần ngoài cùng của dây rốn, bao phủ dây rốn này. Ngoài ra, dây rốn chứa một tĩnh mạch (mang máu giàu dinh dưỡng và oxy đến bào thai) và hai động mạch (mang máu đã hết oxy, cạn kiệt dinh dưỡng từ bào thai). Để bảo vệ và hỗ trợ cơ học, ba mạch máu này được bao bọc trong chất nhầy Wharton, là chất dạng gelatin có thành phần chủ yếu là mucopolysaccharit. Như vậy, mô dây rốn được sử dụng trong sáng chế cũng có thể gồm một tĩnh mạch, hai động mạch và chất nhầy Wharton. Việc sử dụng toàn bộ (nguyên vẹn) một đoạn dây rốn có ưu điểm là không cần tách màng ối ra khỏi các thành phần khác của dây rốn. Cách làm này giảm bớt các thao tác phân lập và vì vậy làm cho phương pháp của sáng chế đơn giản hơn, nhanh hơn, ít lỗi hơn và có hiệu quả kinh tế hơn – tất cả các ưu điểm này là các khía cạnh quan trọng trong sản xuất GMP cần thiết cho ứng dụng trị liệu của tế bào gốc trung mô. Vì vậy có thể khởi đầu phân lập tế bào gốc trung mô bằng cấy mô bên ngoài, tiếp theo có thể là bước cấy chuyên (nuôi cấy) tế bào gốc trung mô được phân lập nếu muốn có lượng tế bào gốc trung

mô lớn hơn, chẳng hạn để sử dụng trong thử nghiệm lâm sàng. Cách khác là có thể tách trước tiên màng ối từ các thành phần khác của dây rốn và phân lập tế bào gốc màng dây rốn trung mô từ màng ối bằng cách cấy màng ối trong môi trường nuôi cấy của sáng chế. Có thể thực hiện việc nuôi cấy này bằng cấy mô bên ngoài, tùy chọn sau đó là cấy chuyên tế bào gốc trung mô được phân lập. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “cấy mô bên ngoài” hoặc “phương pháp cấy mô bên ngoài” được hiểu theo nghĩa thường trong lĩnh vực này là để chỉ phương pháp trong đó mô, sau khi được thu nhận, hay một mảnh của mô này được đặt trong đĩa nuôi cấy tế bào có chứa môi trường nuôi cấy (sinh trưởng) và nhờ môi trường này mà theo thời gian các tế bào gốc dịch chuyển từ mô đi lên bề mặt đĩa nuôi cấy này. Sau đó, những tế bào gốc sơ cấp này được cho sinh trưởng mở rộng và chuyển tiếp vào đĩa nuôi cấy mới thông qua kỹ thuật vi nhân giống (cấy chuyên) như được đề cập ở đây. Theo đó, lưu ý là để sản xuất tế bào cho mục đích trị liệu, trong bước đầu tiên phân lập tế bào gốc trung mô màng ối từ dây rốn sẽ thu nhận được ngân hàng tế bào đầu dòng của các tế bào gốc trung mô được phân lập, còn bước cấy chuyên tiếp theo sẽ thu nhận được ngân hàng tế bào làm việc. Nếu quần thể tế bào gốc trung mô của sáng chế (cụ thể là quần thể tế bào gốc trung mô trong đó ít nhất khoảng 98% hoặc 99% biểu hiện mỗi trong các gen đánh dấu CD73, CD90 và CD105 và không biểu hiện các gen đánh dấu: CD34, CD45 và HLA-DR) được sử dụng cho các thử nghiệm lâm sàng hoặc làm liệu pháp được phê chuẩn, thì quần thể tế bào của ngân hàng tế bào làm việc thường sẽ được sử dụng cho mục đích này. Cả quần thể tế bào gốc trong bước phân lập (có thể tạo nên ngân hàng tế bào đầu dòng) và quần thể tế bào gốc của bước cấy chuyên (có thể tạo nên ngân hàng tế bào làm việc) đều có thể được bảo quản ở dạng được bảo quản đông lạnh, chẳng hạn.

Như đã đề cập, phương pháp phân lập tế bào gốc trung mô từ màng ối dây rốn có ưu điểm là mọi thành phần sử dụng của môi trường nuôi cấy theo sáng chế là có bán sẵn theo tiêu chuẩn GMP và như vậy cho phép phân lập tế bào gốc trung mô trong điều kiện thực hành chuẩn GMP để sử dụng cho trị liệu sau này.

“DMEM” là từ viết tắt của Dulbecco’s modified eagle medium là môi trường nuôi cấy được phát triển từ năm 1969 và là sự cải biến của môi trường eagle cơ bản (BME) (xem Fig.1 thể hiện số liệu về DMEM do Lonza cung cấp). Công thức DMEM gốc chứa 1000 mg/L glucoza và được công bố lần đầu khi dùng nuôi cấy tế bào phôi chuột. Từ đó DMEM đã trở thành môi trường chuẩn để nuôi cấy tế bào và có bán sẵn trên thị trường từ nhiều nguồn khác nhau như ThermoFisher Scientific (số catalô sản phẩm 11965-084), Sigma

Aldrich (số catalô sản phẩm D5546) hoặc Lonza, là một số trong nhiều nhà cung cấp. Vì vậy, có thể sử dụng DMEM bất kỳ có bán trên thị trường cho sáng chế này. Theo phương án được ưu tiên, DMEM được sử dụng ở đây là DMEM mua của Lonza có số catalô sản phẩm là 12-604F. Đây là môi trường DMEM được bổ sung thêm 4,5g/L glucoza và L-glutamin). Phương án được ưu tiên khác là DMEM của Sigma Aldrich có số catalô sản phẩm D5546, môi trường này chứa 1000mg/L glucoza, và natri bicacbonat nhưng không có L-glutamin.

Môi trường “F12” có nghĩa là môi trường Ham’s F12. Đây cũng là môi trường nuôi cấy tế bào chuẩn và là hỗn hợp chất dinh dưỡng được thiết kế ban đầu để nuôi cấy các loại tế bào thể lai và động vật có vú khác nhau khi được sử dụng với huyết thanh kết hợp với các hormon và transferrin (xem Fig.2, là bảng số liệu môi trường Ham’s F12 do Lonza cung cấp). Có thể sử dụng môi trường Ham’s F12 bất kỳ có sẵn (như của ThermoFisher Scientific (số catalô 11765-054), Sigma Aldrich (số catalô N4888) hoặc Lonza, là một vài trong vô số các nhà cung cấp) cho sáng chế này. Theo một phương án ưu tiên, môi trường Ham’s F12 của Lonza được sử dụng.

“DMEM/F12” hoặc “DMEM:F12” là hỗn hợp giữa DMEM và môi trường nuôi cấy Ham’s F12 theo tỷ lệ 1:1 (xem Fig.3 là bảng số liệu môi trường DMEM: F12 (1:1) của Lonza). Môi trường DMEM/F12 (1:1) cũng được sử dụng rộng rãi làm môi trường cơ bản hỗ trợ sinh trưởng cho nhiều tế bào động vật có vú khác nhau và có sẵn từ nhiều nhà cung cấp như ThermoFisher Scientific (số catalô sản phẩm 11330057), Sigma Aldrich (số catalô sản phẩm D6421) hoặc Lonza. Có thể sử dụng môi trường DMEM:F12 bất kỳ trên thị trường cho sáng chế này. Theo phương án ưu tiên, môi trường DMEM:F12 được sử dụng ở đây là DMEM/F12 (1:1) mua của Lonza với số catalô sản phẩm 12-719F (là DMEM: F12 có L-glutamin, 15mM HEPES, và 3,151g/L glucoza).

“M171” là môi trường nuôi cấy 171, được phát triển làm môi trường cơ bản để nuôi cấy hoặc phát triển tế bào biểu mô vú người bình thường (xem Fig.4 là bảng số liệu môi trường M171 do Life Technologies Corporation cung cấp). Môi trường cơ bản này cũng được sử dụng rộng rãi và có sẵn trên thị trường từ nhiều nhà cung cấp như ThermoFisher Scientific hay Life Technologies Corporation (số catalô sản phẩm M171500). Có thể sử dụng môi trường M171 bất kỳ có bán trên thị trường trong sáng chế này. Theo phương án ưu tiên, môi trường M171 được sử dụng ở đây là M171 do Life Technologies Corporation cung cấp với số catalô sản phẩm M171500.

“FBS” có nghĩa là huyết thanh thai bò (còn gọi là “huyết thanh thai bê”), nghĩa là phần máu còn lại sau quá trình đông máu tự nhiên, sau đó ly tâm để loại bỏ tế bào hồng cầu bất kỳ còn lại. Huyết thanh thai bò là nguồn cung huyết thanh được sử dụng nhiều nhất cho nuôi cấy *in vitro* các tế bào có nhân điển hình vì nó có lượng kháng thể rất thấp và chứa nhiều yếu tố tăng trưởng hơn, điều này cho phép linh hoạt trong nhiều ứng dụng nuôi cấy tế bào khác nhau. FBS tốt hơn nên do thành viên thuộc tổ chức International Serum Industry Association (ISIA) cung cấp vì tổ chức này chịu trách nhiệm về an toàn và cách sử dụng huyết thanh an toàn và các sản phẩm nguồn gốc động vật có truy xuất nguồn gốc phù hợp, có uy tín trong đánh dấu sản phẩm, và thiết lập các tiêu chuẩn phù hợp. Một số nhà cung cấp FBS là thành viên của ISIA có thể kể đến là Abattoir Basics Company, Animal Technologies Inc., Biomin Biotechnologia LTDA, GE Healthcare, Gibco by Thermo Fisher Scientific và Life Science Production. Theo phương án được ưu tiên, FBS này do GE Healthcare cung cấp với số catalô sản phẩm A15-151.

Giờ quay trở lại môi trường nuôi cấy theo sáng chế, môi trường nuôi cấy này có thể chứa, để phân lập hoặc nuôi cấy tế bào gốc lớp lót dây rốn trung mô, DMEM ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 55 đến 65% (thể tích/thể tích), F12 ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 5 đến 15% (thể tích/thể tích), M171 ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 15 đến 30% (thể tích/thể tích) và FBS ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 1 đến 8% (thể tích/thể tích). Trị số “% (thể tích/thể tích)” được sử dụng trong bản mô tả này chỉ thể tích của từng thành phần so với tổng thể tích của môi trường nuôi cấy. Chẳng hạn là DMEM có trong môi trường nuôi cấy ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 55 đến 65% (thể tích/thể tích), thì 1 lít môi trường nuôi cấy sẽ chứa khoảng 550 đến 650ml DMEM.

Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy này có thể chứa DMEM ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 57,5 đến 62,5% (thể tích/thể tích), F12 ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 7,5 đến 12,5% (thể tích/thể tích), M171 ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 17,5 đến 25,0% (thể tích/thể tích) và FBS ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 1,75 đến 3,5% (thể tích/thể tích). Theo phương án khác nữa, môi trường nuôi cấy này có thể chứa DMEM ở nồng độ cuối khoảng 61,8% (thể tích/thể tích), F12 ở nồng độ cuối khoảng 11,8% (thể tích/thể tích), M171 ở nồng độ cuối khoảng 23,6% (thể tích/thể tích) và FBS ở nồng độ cuối khoảng 2,5% (thể tích/thể tích).

Ngoài những thành phần nêu trên, môi trường nuôi cấy này có thể chứa các chất bổ trợ có lợi cho nuôi cấy tế bào gốc màng dây rốn trung mô. Môi trường nuôi cấy của sáng chế

có thể chứa yếu tố tăng trưởng biểu mô (EGF), chẳng hạn. Nếu có mặt thì EGF có thể hiện diện trong môi trường nuôi cấy ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 1ng/ml đến 20ng/ml. Theo một phương án, môi trường nuôi cấy này có thể chứa EGF ở nồng độ cuối khoảng 10ng/ml.

Môi trường nuôi cấy của sáng chế cũng có thể chứa insulin. Nếu có mặt, insulin có thể có mặt ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 1 $\mu$ g/ml đến 10 $\mu$ g/ml. Theo một phương án, môi trường nuôi cấy có thể chứa insulin ở nồng độ cuối khoảng 5 $\mu$ g/ml.

Môi trường nuôi cấy này có thể chứa thêm ít nhất một trong các chất bổ trợ sau: adenin, hydrocortison, và muối 3,3',5-Triiodo-L-thyronin natri (T3). Theo phương án này, môi trường nuôi cấy này có thể chứa cả ba chất bổ trợ adenin, hydrocortison, và muối 3,3',5-Triiodo-L-thyronin natri (T3). Theo đó, môi trường nuôi cấy này có thể chứa adenin ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,1 $\mu$ g/ml adenin, hydrocortison ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 1 đến 10 $\mu$ g/ml hydrocortison và/hoặc muối 3,3',5-Triiodo-L-thyronin natri (T3) ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5ng/ml.

Theo phương pháp của sáng chế, mô dây rốn có thể được nuôi cấy đến khi có được số lượng phù hợp của tế bào gốc màng dây rốn trung mô (sơ cấp) tăng sinh từ mô này. Theo phương án điển hình, mô dây rốn này được nuôi cấy cho đến khi tế bào phát triển từ tế bào gốc trung mô màng ối đạt đến mức hợp dòng khoảng từ 70 đến 80%. Thuật ngữ “hợp dòng” trong bản mô tả này có nghĩa thông thường trong lĩnh vực nuôi cấy tế bào và để chỉ mức độ ước tính/chỉ thị số lượng tế bào bám dính vào đĩa nuôi cấy hay bình nuôi, thuật ngữ này để chỉ tỷ lệ bề mặt được bao phủ bởi các tế bào. Ví dụ, mức hợp dòng 50% có nghĩa là gần một nửa bề mặt được bao phủ và vẫn còn chỗ cho tế bào sinh trưởng. Hợp dòng 100% có nghĩa là toàn bộ bề mặt đã bị tế bào bao phủ, và không còn chỗ cho tế bào sinh trưởng dưới dạng đơn lớp.

Khi đã thu được số lượng phù hợp tế bào sơ cấp (tế bào gốc màng dây rốn trung mô) từ mô màng dây rốn bằng phương pháp cấy mô, tách tế bào gốc trung mô ra khỏi vật chứa nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy. Nhờ vậy thu được ngân hàng tế bào đầu dòng (sơ cấp) chứa các tế bào gốc trung mô được phân lập của màng ối. Thông thường, vì tế bào gốc trung mô là các tế bào dính liền nhau, việc bóc tách được thực hiện nhờ phương pháp xử lý bằng enzym chuẩn. Ví dụ, phương pháp xử lý bằng enzym này có thể gồm bước trypsin hóa như được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2006/0078993, đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số công bố WO2006/019357 hoặc đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số công bố

WO2007/046775, có nghĩa là những tế bào phát triển có thể được thu gom bằng cách trypsin hóa (0,125% trypsin/0,05% EDTA) để cho quá trình mở rộng thêm. Nếu tế bào gốc trung mô thu gom được sử dụng để tạo ngân hàng tế bào đầu dòng, thì những tế bào này được bảo quản đông lạnh và lưu giữ để sử dụng tiếp như được mô tả dưới đây.

Khi thu gom xong, có thể chuyển tế bào gốc trung mô vào vật chứa nuôi cấy để cấy chuyển. Có thể bắt đầu cấy chuyển từ những tế bào sơ cấp đông lạnh, nghĩa là từ ngân hàng tế bào đầu dòng. Để cấy chuyển có thể gieo mầm lượng tế bào phù hợp bất kỳ trong dụng cụ nuôi cấy như đĩa nuôi tế bào. Nhằm thực hiện mục đích này, tế bào trung mô có thể được tạo huyền phù trong môi trường phù hợp (tốt nhất là môi trường nuôi cấy của sáng chế) để cấy chuyển ở nồng độ, chẳng hạn, trong khoảng  $0,5 \times 10^6$  tế bào/ml đến  $5,0 \times 10^6$  tế bào/ml. Theo một phương án, những tế bào này được tạo huyền phù để cấy chuyển ở nồng độ khoảng  $1,0 \times 10^6$  tế bào/ml. Có thể thực hiện cấy chuyển bằng cách nuôi cấy trong bình nuôi cấy đơn giản nhưng cũng có thể nuôi cấy tế bào trong các hệ đa lớp như CellStacks (Corning, Corning, NY, Mỹ) hoặc Cellfactory (Nunc, part of Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Mỹ) vốn được xếp chồng lên nhau trong các thiết bị ủ. Theo cách khác, có thể thực hiện cấy chuyển trong các hệ thống đóng kín như thiết bị phản ứng sinh học. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ biết có nhiều kiểu thiết kế khác nhau cho thiết bị phản ứng sinh học, ví dụ dạng đĩa song song, dạng sợi rỗng, hay thiết bị phản ứng sinh học dạng kênh dẫn vi lưu. Có thể xem tài liệu: Sensebe et al “Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review”, ở trên. Ví dụ về thiết bị phản ứng sinh học dạng sợi rỗng có bán sẵn là Quantum® Cell Expansion System (Terumo BCT, Inc). Thiết bị này được sử dụng để mở rộng sinh trưởng tế bào gốc trung mô tủy xương dùng cho các thử nghiệm lâm sàng (xem tài liệu: Hanley et al, Efficient Manufacturing of Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells Using the Quantum Cell Expansion System, *Cytotherapy*. 2014 August; 16(8): 1048–1058). Ví dụ khác về thiết bị phản ứng sinh học trên thị trường có thể sử dụng được cho cấy chuyển quần thể tế bào gốc trung mô của sáng chế là Xuri Cell Expansion System do GE Healthcare cung cấp. Nuôi cấy quần thể tế bào gốc trung mô trong các hệ thống tự động như Quantum® Cell Expansion System là đặc biệt có lợi nếu ngân hàng tế bào làm việc dùng cho ứng dụng trị liệu được tạo ra trong điều kiện GMP và cần số lượng lớn tế bào.

Cấy chuyển tế bào gốc màng dây rốn trung mô được thực hiện trong môi trường nuôi cấy của sáng chế. Theo đó, môi trường nuôi cấy của sáng chế có thể được sử dụng cho cả

việc phân lập tế bào gốc trung mô từ màng ối lần việc cấy chuyển sau đó các tế bào sơ cấp được phân lập này. Để cấy chuyển, tế bào gốc trung mô có thể được nuôi cấy đến khi đạt được số lượng tế bào sinh trưởng phù hợp. Theo phương án minh họa, tế bào gốc trung mô được cấy chuyển đến khi tế bào gốc trung mô đạt được mức hợp dòng khoảng từ 70 đến 80%.

Phân lập/nuôi cấy quần thể tế bào gốc màng dây rốn trung mô có thể được thực hiện trong điều kiện chuẩn dùng để nuôi cấy tế bào động vật có vú. Thông thường, phương pháp của sáng chế phân lập quần thể tế bào gốc màng dây rốn trung mô được thực hiện trong điều kiện (nhiệt độ, áp suất) thường được sử dụng để nuôi cấy tế bào thuộc các loài mà các tế bào này có nguồn gốc từ đó. Ví dụ, mô dây rốn và tế bào gốc màng lót dây rốn trung mô người, lần lượt, thường được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong môi trường có 5% CO<sub>2</sub>. Trong ngữ cảnh này, cần lưu ý trong sáng chế này là tế bào trung mô có thể được lấy từ loài có vú bất kỳ, như chuột nhắt, chuột cống, chuột lang, thỏ, dê, ngựa, chó, mèo, cừu, khỉ hoặc người, trong đó ưu tiên tế bào gốc trung mô lấy từ người.

Khi đã nhận được số lượng phù hợp/mong muốn của tế bào gốc màng lót dây rốn trung mô từ mẹ cấy chuyển, tiến hành thu gom tế bào gốc trung mô bằng cách lấy chúng ra khỏi dụng cụ nuôi cấy được sử dụng để cấy chuyển. Việc thu hoạch tế bào gốc trung mô thường lại được thực hiện bằng xử lý enzym, có bước trypsin hóa các tế bào này. Sau đó thu gom tế bào gốc trung mô được phân lập và được sử dụng trực tiếp hoặc bảo quản để sử dụng sau. Thông thường, bảo quản bằng phương pháp bảo quản đông lạnh. Thuật ngữ “bảo quản đông lạnh” có nghĩa thông thường để chỉ quá trình ở đó tế bào gốc trung mô được bảo quản bằng cách làm lạnh đến nhiệt độ dưới 0, như (thông thường) -80°C hay -196°C (điểm sôi của nitơ lỏng). Bảo quản đông lạnh là phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực và có thể gồm việc sử dụng các chất bảo quản đông lạnh như dimethylsulfoxit (DMSO) hay glyxerol, là các chất làm chậm quá trình hình thành tinh thể băng trong tế bào dây rốn.

Quần thể tế bào gốc màng lót dây rốn trung mô được phân lập theo phương pháp của sáng chế có tính đồng nhất cao và được xác định rõ ràng. Theo các phương án điển hình của phương pháp theo sáng chế ít nhất khoảng 90% hoặc nhiều hơn, khoảng 91% hoặc nhiều hơn, khoảng 92% hoặc nhiều hơn, khoảng 93% hoặc nhiều hơn, khoảng 94% hoặc nhiều hơn, khoảng 95% hoặc nhiều hơn, khoảng 96% hoặc nhiều hơn, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn, khoảng 99% hoặc nhiều hơn tế bào gốc trung mô được

phân lập biểu hiện các gen đánh dấu sau: CD73, CD90 và CD105. Ngoài ra, theo các phương án này có ít nhất khoảng 90% hoặc nhiều hơn, khoảng 91% hoặc nhiều hơn, khoảng 92% hoặc nhiều hơn, khoảng 93% hoặc nhiều hơn, khoảng 94% hoặc nhiều hơn, khoảng 95% hoặc nhiều hơn, khoảng 96% hoặc nhiều hơn, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn, khoảng 99% hoặc nhiều hơn tế bào gốc trung mô được phân lập có thể không biểu hiện các gen đánh dấu sau: CD34, CD45 và HLA-DR. Cụ thể hơn là khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn, hoặc khoảng 99% hoặc nhiều hơn quần thể tế bào gốc trung mô đã phân lập biểu hiện CD73, CD90 và CD105 đồng thời không biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR.

Vì vậy, liên quan đến phân mô tả ở trên sáng chế cũng đề cập đến quần thể tế bào gốc trung mô phân lập từ màng ối dây rốn, trong đó có ít nhất khoảng 90% tế bào trong quần thể tế bào gốc hoặc nhiều hơn biểu hiện một trong số các gen đánh dấu sau: CD73, CD90 và CD105. Theo phương án ưu tiên có ít nhất khoảng 91% hoặc nhiều hơn, khoảng 92% hoặc nhiều hơn, khoảng 93% hoặc nhiều hơn, khoảng 94% hoặc nhiều hơn, khoảng 95% hoặc nhiều hơn, khoảng 96% hoặc nhiều hơn, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn, khoảng 99% tế bào hoặc nhiều hơn trong quần thể tế bào gốc trung mô được phân lập là CD73+, CD90+ và CD105+, là phần trăm quần thể tế bào phân lập biểu hiện một trong số CD73, CD90 và CD105 (xem phần Ví dụ thực hiện dưới đây). Ngoài ra, có ít nhất khoảng 90% , khoảng 91% hoặc nhiều hơn, khoảng 92% hoặc nhiều hơn, khoảng 93% hoặc nhiều hơn, khoảng 94% hoặc nhiều hơn, khoảng 95% hoặc nhiều hơn, khoảng 96% hoặc nhiều hơn, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn, khoảng 99% hoặc nhiều hơn tế bào trong quần thể tế bào gốc trung mô được phân lập có thể không biểu hiện các gen đánh dấu sau *CD34*, *CD45* và *HLA-DR*. Cụ thể hơn có khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn, hay khoảng 99% hoặc nhiều hơn quần thể tế bào gốc trung mô được phân lập biểu hiện CD73, CD90 và CD105 đồng thời không biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR. Lần đầu tiên một quần thể tế bào gốc trung mô có tính đồng nhất cao như vậy được lấy từ màng ối dây rốn được sáng chế này công bố và quần thể này hoàn toàn đáp ứng các tiêu chí dành cho tế bào gốc trung mô được sử dụng trong liệu pháp tế bào (xem thêm phần thử nghiệm, và ví dụ, tài liệu Sensebe et al. “Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review”). Lưu ý là trong ngữ cảnh này, quần thể tế bào gốc trung mô này có thể được thu nhận không chỉ bằng phương pháp phân lập của sáng chế mà có thể bằng phương pháp khác như tuyển chọn tế bào, nếu muốn.



Vì vậy, sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa quần thể tế bào gốc trung mô được phân lập từ màng ối của dây rốn, trong đó ít nhất khoảng 90% hoặc nhiều hơn tế bào của quần thể tế bào gốc này biểu hiện một trong số các gen đánh dấu sau: CD73, CD90 và CD105 và tùy chọn là không biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR. Dược phẩm này có thể chứa tá dược dược dụng bất kỳ và có thể được bào chế cho đường dùng bất kỳ mong muốn. Dược phẩm này, ví dụ, có thể được bào chế thích ứng cho dùng toàn thân hay khu trú.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp điều chế môi trường nuôi cấy để phân lập, phương pháp này bao gồm bước trộn để đạt được thể tích cuối là 500ml môi trường nuôi cấy:

i. 250ml DMEM

ii. 118ml M171

iii. 118ml DMEM/F12

iv. 12,5ml huyết thanh bào thai bò (FBS) để đạt đến nồng độ cuối là 2,5% (thể tích/thể tích).

Như được giải thích trên đây, môi trường DMEM/F12 là hỗn hợp có tỷ lệ 1:1 giữa DMEM và Ham's F12. Vì vậy, 118ml môi trường DMEM/F12 chứa 59ml DMEM và 59ml F12. Theo đó, khi sử dụng phương pháp này điều chế môi trường nuôi cấy, nồng độ cuối (thể tích/thể tích) trên tổng thể tích 500ml là như sau:

DMEM:  $250 \text{ ml} + 59 \text{ ml} = 309 \text{ ml}$ , tương ứng với  $309/500 = 61,8\%$  (thể tích/thể tích)

M171: 118 ml, tương ứng với  $118/500 = 23,6\%$  (thể tích/thể tích)

F12: 59 ml, tương ứng với  $59/500 = 11,8\%$  (thể tích/thể tích).

Các phương án về phương pháp điều chế môi trường nuôi cấy này còn bao gồm bước bổ sung thêm các thành phần

v. 1ml dung dịch gốc EGF ( $5\mu\text{g/ml}$ ) để đạt được nồng độ EGF cuối là  $10\text{ng/ml}$ , và

vi. 0,175ml dung dịch gốc insulin ( $14,28\text{mg/ml}$ ) để đạt được nồng độ insulin cuối là  $5\mu\text{g/ml}$ .

Lưu ý là theo các phương án này, thể tích của các thành phần i. đến vi nêu trên là để tạo ra thể tích cuối là 499,675ml môi trường nuôi cấy. Nếu không bổ sung thêm thành phần nào nữa vào môi trường nuôi cấy, phần còn lại là 0,325 ml (được bổ sung thêm để đạt thể tích 500ml) có thể là, ví dụ, thành phần bất kỳ trong số các thành phần từ i. đến iv, nghĩa là

một trong số DMEM, M171, DMEM/F12 hoặc FBS. Theo cách khác, nồng độ dung dịch gốc EGF hay Insulin có thể được điều chỉnh sao cho tổng thể tích môi trường nuôi cấy là 500ml. Ngoài ra, cần lưu ý là các thành phần từ i. đến iv. không nhất thiết phải được bổ sung thêm theo đúng trình tự như liệt kê mà có thể bổ sung theo trình tự bất kỳ để trộn các thành phần này nhằm tạo ra được môi trường nuôi cấy của sáng chế. Nghĩa là, ví dụ, có thể trộn M171 và DMEM/F12 với nhau và sau đó với DMEM và FBS để đạt đến nồng độ cuối như đã nói ở trên, nghĩa là nồng độ cuối của DMEM là khoảng từ 55 đến 65% (thể tích/thể tích), nồng độ cuối của F12 là khoảng từ 5 đến 15% (thể tích/thể tích), nồng độ cuối của M171 là khoảng từ 15 đến 30% (thể tích/thể tích) và nồng độ cuối của FBS là khoảng từ 1 đến 8% (thể tích/thể tích).

Theo phương án khác, phương pháp này còn bao gồm bước bổ sung thể tích 0,325ml của một hoặc nhiều chất bổ trợ sau: adenin, hydrocortison, muối 3,3',5-Triiodo-L-thyronin natri (T3) vào DMEM, nhờ vậy đạt tới tổng thể tích 500ml môi trường nuôi cấy. Theo phương án này, nồng độ cuối của các chất bổ trợ này trong DMEM có thể như sau:

khoảng từ 0,05 đến 0,1 $\mu$ g/ml adenin, ví dụ khoảng 0,025 $\mu$ g/ml adenin,

khoảng từ 1 đến 10 $\mu$ g/ml hydrocortison,

khoảng từ 0,5 đến 5ng/ml muối 3,3',5-Triiodo-L-thyronin natri (T3), ví dụ là 1,36ng/ml muối 3,3',5-Triiodo-L-thyronin natri (T3).

Liên quan đến phần mô tả nêu trên, sáng chế còn đề cập đến môi trường nuôi cấy tế bào có thể nhận được hoặc được thu nhận bằng phương pháp điều chế môi trường như được mô tả.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp phân lập tế bào gốc trung mô từ màng ối của dây rốn, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy mô màng ối trong môi trường nuôi cấy được điều chế bằng phương pháp được đề cập.

Vì vậy, sáng chế còn đề cập đến môi trường nuôi cấy tế bào chứa:

- DMEM ở nồng độ cuối khoảng từ 55 đến 65% (thể tích/thể tích),
- F12 ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 5 đến 15% (thể tích/thể tích),
- M171 ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 15 đến 30% (thể tích/thể tích) và
- FBS ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 1 đến 8% (thể tích/thể tích).

Theo một số phương án của môi trường nuôi cấy được đề cập ở đây, môi trường này chứa DMEM ở nồng độ cuối khoảng từ 57,5 đến 62,5% (thể tích/thể tích), F12 ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 7,5 đến 12,5% (thể tích/thể tích), M171 ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 17,5 đến 25,0% (thể tích/thể tích) và FBS ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 1,75 đến 3,5% (thể tích/thể tích). Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy này có thể chứa DMEM ở nồng độ cuối nằm khoảng 61,8% (thể tích/thể tích), F12 ở nồng độ cuối khoảng 11,8% (thể tích/thể tích), M171 ở nồng độ cuối khoảng 23,6% (thể tích/thể tích) và FBS ở nồng độ cuối khoảng 2,5% (thể tích/thể tích).

Ngoài ra, môi trường nuôi cấy này có thể chứa thêm yếu tố tăng trưởng biểu bì (Epidermal Growth Factor - EGF) ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 1ng/ml đến 20ng/ml. Theo một phương án, môi trường nuôi cấy này chứa EGF ở nồng độ cuối khoảng 10ng/ml. Môi trường nuôi cấy có thể còn chứa Insulin ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 1 $\mu$ g/ml đến 10 $\mu$ g/ml. Theo đó, môi trường nuôi cấy này có thể chứa Insulin ở nồng độ cuối khoảng 5 $\mu$ g/ml.

Môi trường nuôi cấy tế bào theo sáng chế có thể còn chứa thêm ít nhất một trong số các chất bổ trợ sau: adenin, hydrocortison, và muối 3,3',5-Triiodo-L-thyronin natri (T3). Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy này chứa cả ba thành phần là adenin, hydrocortison, và muối 3,3',5-Triiodo-L-thyronin natri (T3). Nếu có mặt, môi trường nuôi cấy này có thể chứa adenin ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,1 $\mu$ g/ml adenin hoặc từ 0,05 đến 0,1 $\mu$ g/ml adenin, hydrocortison ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10 $\mu$ g/ml hydrocortison hoặc từ 1 đến 10 $\mu$ g/ml hydrocortison và/hoặc muối 3,3',5-Triiodo-L-thyronin natri (T3) ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5ng/ml.

Theo các phương án về môi trường nuôi cấy tế bào, 500ml môi trường nuôi cấy tế bào theo sáng chế này chứa:

- i. 250ml DMEM
- ii. 118ml M171
- iii. 118ml DMEM/F12
- iv. 12,5ml huyết thanh bào thai bò (FBS) (nồng độ cuối 2,5%)

Phương án nữa là môi trường nuôi cấy tế bào này có thể còn chứa thêm:

- v. EGF ở nồng độ cuối là 10ng/ml, và

vi. Insulin ở nồng độ cuối là 5 $\mu$ g/ml.

Cả insulin và EGF đều có thể được thêm vào môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng dung dịch gốc được chọn sao cho tổng thể tích môi trường nuôi cấy không vượt quá 500ml.

Ví dụ, các thành phần từ i. đến vi. của môi trường nuôi cấy theo sáng chế là các thành phần nêu trên Fig.5, nghĩa là các thành phần này thu được từ các nhà sản xuất tương ứng theo số catalô được chỉ ra trên Fig.5. Môi trường được thu nhận bằng cách trộn các thành phần từ i. đến vi. như trên Fig.5 được gọi là là “PTT-6”. Một lần nữa lưu ý là các thành phần từ i. đến vi. cũng như các thành phần khác bất kỳ như kháng sinh mua từ nhà cung cấp bất kỳ đều có thể được sử dụng để điều chế môi trường theo sáng chế.

Ngoài ra, môi trường nuôi cấy tế bào của sáng chế có thể chứa adenin ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,1 $\mu$ g/ml adenin hoặc trong khoảng từ 0,05 đến 0,1 $\mu$ g/ml adenin, hydrocortison ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10 $\mu$ g/ml, từ 0,5 đến 10 $\mu$ g/ml, hoặc trong khoảng từ 1 đến 10 $\mu$ g/ml hydrocortison và/hoặc muối 3,3',5-Triiodo-L-thyronin natri (T3) ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,1 đến 5ng/ml hoặc trong khoảng từ 0,5 đến 5ng/ml.

Cuối cùng, sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị cho người mắc bệnh, phương pháp này bao gồm bước cho người bệnh dùng tế bào gốc màng lót của dây rốn trung mô hoặc dược phẩm chứa tế bào gốc đã nêu. Bệnh được điều trị có thể là bệnh lý bất kỳ đã nêu. Để điều trị, có thể dùng quần thể tế bào gốc trung mô theo sáng chế theo cách phù hợp bất kỳ, ví dụ, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, dùng khu trú, cấy hoặc tiêm. Quần thể tế bào gốc này có thể, ví dụ, được đặt trực tiếp vào vết thương như vết bỏng hay vết thương do tiểu đường (xem đơn yêu cầu cấp patent quốc tế có số công bố WO2007/046775). Theo cách khác, có thể cấy quần thể tế bào gốc này dưới da, ví dụ trực tiếp dưới da, trong mỡ cơ thể hay màng bụng.

Sáng chế được minh họa rõ hơn trong phần Ví dụ thực hiện không giới hạn sáng chế dưới đây.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

#### **1. Bảo quản đông lạnh mô dây rốn trước khi phân lập tế bào gốc trung mô**

Mô dây rốn (dây rốn được hiến tặng với sự đồng ý được thông báo của người mẹ) được xử lý để sau đó phân lập tế bào gốc trung mô từ màng ối của dây rốn như sau.

### 1.1 Rửa mẫu mô dây rốn:

- a. Lấy dao mổ ra khỏi túi bảo vệ.
- b. Giữ chặt dây rốn bằng kẹp và cắt dây rốn thành các đoạn dài 10cm nhờ dao mổ. Đặt lại phần dây rốn chưa dùng vào cốc chứa mô ban đầu.
- c. Chuyển mẫu dây rốn dài 10cm này vào đĩa nuôi cấy mới loại 150mm. Có thể sử dụng đĩa nuôi loại 150mm này thay cho dùng cốc.
- d. Dùng màng bọc đĩa nuôi loại 150mm này làm chỗ để kẹp và dao mổ.
- e. Lấy 25ml Plasmalyte A (Baxter, Catalog # 2B2543Q) bằng xy lanh loại 30ml. Giữ xy lanh này ở góc 45° bằng một tay và phân phối Plasmalyte A trực tiếp lên mô dây rốn.
- f. Giữ đĩa nuôi hơi nghiêng để lấy Plasmalyte A ra bằng xy lanh loại 30ml và dùng kim đầu tù.
- g. Gom Plasmalyte A đã sử dụng vào túi trung chuyên loại 300ml được dùng làm đồ chứa chất thải và để vào thùng đựng chất thải sinh học nguy hại.
- h. Lặp lại công đoạn rửa, nếu cần bằng cách sử dụng đĩa nuôi mới cho mỗi lần rửa. Đảm bảo mọi cục máu trên bề mặt đã được lấy hết. Có thể sử dụng thêm Plasmalyte A, nếu cần, để làm sạch mô.
- i. Đặt mô này vào đĩa nuôi mới có đánh dấu để tiếp tục cắt mô. Cho 20ml Plasmalyte A vào đĩa này để mô không bị khô trong quá trình cắt.
- j. Cắt dây rốn thành các đoạn bằng nhau khoảng 1cm để có được 10 đoạn tất cả.
- k. Cắt tiếp các đoạn 1cm này thành các mẫu nhỏ hơn với kích thước trong khoảng từ 0,3cm x 0,3cm đến 0,5cm x 0,5cm mỗi mẫu.
- l. Loại bỏ tồn dư Plasmalyte A còn trong đĩa.
- m. Hút 25ml Plasmalyte A bằng xy lanh loại 30ml từ túi đựng Plasmalyte A gốc và phun trực tiếp lên các mẫu mô dây rốn này.
- n. Giữ đĩa nuôi cấy hơi nghiêng về một phía để lấy hết Plasmalyte A đã sử dụng cho rửa mô và hút ra bằng xy lanh dùng kim đầu tù.
- o. Rửa lại thêm một lần. Lần này không được để lại bất kỳ cục máu đông nào.

Lưu ý: Nếu dây rôn không được giữ đông lạnh, mô dây rôn này nên được giữ trong Plasmalyte A cho đến khi sẵn sàng để đông lạnh.

### 1.2 Bảo quản đông lạnh mô dây rôn:

a. Chuẩn bị dung dịch bảo quản đông lạnh:

i. Điều chế 50ml dung dịch đông lạnh gồm 60% Plasmalyte A, 30% Albumin huyết thanh người 5%, và 10% dimetyl sulfoxit (DMSO).

ii. Dán nhãn “dung dịch đông lạnh mô” cho túi trung chuyển 150ml và gắn bộ dụng cụ truyền huyết tương vào miệng túi này bằng kỹ thuật vô trùng.

iii. Lấy 30ml Plasmalyte A bằng xy lanh loại 30ml từ túi gốc chứa Plasmalyte A và truyền vào túi dán nhãn “dung dịch đông lạnh mô” và ghi rõ ngày giờ thực hiện.

iv. Lấy 15ml albumin huyết thanh người 5% bằng xi lanh loại 20ml và truyền vào túi trung chuyển được dán nhãn nêu trên.

v. Cho thêm 5ml DMSO vào túi trung chuyển này.

vi. Lắc kỹ và ghi lại thời gian lắc dung dịch đông lạnh

b. Loại Plasmalyte A ra khỏi mô trước khi bổ sung dung dịch đông lạnh.

c. Dùng xy lanh loại 60ml để hút 50ml dung dịch đông lạnh và bơm khoảng 30ml dung dịch đông lạnh này lên đĩa nuôi tế bào loại 150mm có chứa mô dây rôn. Giữ kim đầu tù trên xy lanh để đảm bảo vô trùng.

d. Lắc từng phút đĩa nuôi chứa mô và dung dịch đông lạnh trong 10 phút.

e. Dùng kẹp, chọn ngẫu nhiên 8 đoạn và đặt vào mỗi lọ trong số bốn ống bảo quản đông lạnh loại 4ml. Chọn ngẫu nhiên 4 đoạn đã chọn nêu trên và đặt vào một ống bảo quản đông lạnh loại 1,8ml. Các đoạn này phải đảm bảo sạch các cục máu.

f. Đổ phần dung dịch đông lạnh còn lại vào mỗi ống bảo quản đông lạnh chứa mô dây rôn đến vạch 3,6ml cho các ống loại 4ml và đến vạch 1,8ml cho các ống Nunc loại 1,8ml.

g. Dán nhãn Bactec Lytic/10 - Anaerobic/F và Bactec Plus Aerobic/F trên ống đựng với mã mô ghi kèm.

h. Lấy 20ml dung dịch đông lạnh ra khỏi đĩa nuôi bằng xy lanh hút dùng kim đầu tù, sau khi vệ sinh các ống Bactec bằng gạc thấm alcohol, thay kim đầu tù bằng kim loại 18g và cấy vi khuẩn yếm khí và ưa khí vào các ống dán nhãn Bactec mỗi ống 10ml.

i. Ấn nút chạy thiết bị đông lạnh với tốc độ được kiểm soát.

j. Sau khi hoàn thành quá trình đông lạnh đặt các ống đựng trong các tủ đông lạnh bằng nitơ lỏng được theo dõi nhiệt độ liên tục để sử dụng tiếp.

## 2. Phân lập tế bào gốc màng lót dây rốn trung mô từ mô dây rốn

### 2.1. Điều chế môi trường xử lý MSC lấy từ mô dây rốn:

a. Để điều chế 500ml PTT6 (môi trường nuôi/sinh trưởng) cho các thành phần theo thứ tự dưới đây:

i. DMEM, 250ml

ii. M171 118ml

iii. DMEM F12 118ml

iv. FBS 12,5ml (nồng độ cuối 2,5%)

v. EGF 1ml (nồng độ cuối 10ng/ml)

vi. Insulin 0,175ml (nồng độ cuối 5 $\mu$ g/ml)

Thể tích nêu trên của các thành phần từ i. đến vi tạo ra tổng thể tích 499,675ml môi trường nuôi cấy. Nếu không thêm các thành phần nào khác vào môi trường nuôi cấy, 0,325ml còn lại (để đạt tổng thể tích 500ml) có thể là, ví dụ, thành phần bất kỳ trong số từ i. đến iv, nghĩa là một trong số DMEM, M171, DMEM/F12 hoặc FBS. Theo cách khác, nồng độ dung dịch gốc EGF hoặc Insulin có thể được điều chỉnh sao cho tổng thể tích môi trường nuôi cấy là 500ml. Theo cách khác, dung dịch gốc của kháng sinh như Penicillin-Streptomycin-Amphotericin có thể được thêm vào để có được thể tích cuối là 500 ml. Cũng có thể thêm vào môi trường nuôi cấy 0,325ml của một hoặc nhiều chất bổ trợ sau đây: adenin, hydrocortison, muối 3,3',5-Triiodo-L-thyronin natri (T3), nhờ đó đạt tổng thể tích là 500ml môi trường nuôi cấy.

vii. Dán nhãn ống đựng “PTT6” có ghi ngày tạo môi trường, tên viết tắt của người thực hiện, và cụm từ “hết hạn” sau ngày hết hạn sử dụng. Ngày hết hạn sử dụng là ngày hết hạn sử dụng sớm nhất của thành phần bất kỳ hoặc tính là 01 tháng kể từ ngày điều chế, tùy theo ngày nào đến trước.

b. Để điều chế môi trường rửa (dung dịch nước muối đệm Hank- Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) không có Canxi hay Magie và chứa FBS 5%), thêm 2,5ml FBS vào

47,5ml HBSS trong ống ly tâm loại 50ml. Ống này được dán nhãn là “Môi trường rửa” có ghi chữ viết tắt tên người thực hiện và ngày điều chế môi trường.

c. Tất cả các môi trường được kiểm nghiệm tính vô trùng bằng thiết bị Bactec Lytic/10 – Anaerobic/F (Becton Dickinson & Company) và Bactec Pluc + Aerobic/F (Becton Dickinson & Company). Bơm 20ml môi trường được điều chế vào mỗi lọ đựng.

### 2.2 Rã đông mô dây rốn để thu gom MSC:

a. Bắt đầu rã đông khi người thực hiện chuẩn bị xử lý mẫu trong phòng sạch. Không rã đông hơn 1 lọ tại cùng một thời điểm trừ khi các lọ này có chung nguồn gốc người cho.

b. Làm sạch chậu nước bằng chất diệt trùng sau đó bằng isopropanol 70% và đổ đầy lọ này 1 lít nước vô trùng. Đun nóng chậu này đến 36-38°C.

c. Điều chế 10ml môi trường rửa gồm từ 70% đến 90% PlasmaLyte A trong phòng sạch tại buồng an toàn sinh học. Lọc vô trùng dung dịch này bằng màng lọc 0,2µm gắn với xy lạnh loại 10ml và bảo quản lạnh dung dịch này cho đến khi cần sử dụng.

d. Dán nhãn đang xử lý lên bình đựng hình nón 50ml.

e. Đảm bảo nhiệt độ trong chậu nước là 36-38°C.

f. Lấy lọ đựng mô ra khỏi thùng bảo quản bằng nitơ lỏng và rã đông nhanh trong chậu nước 37°C đã đổ sẵn 01 lít nước vô trùng. Giá đựng lọ dùng cho hộp đựng đông lạnh hiệu Mr. Frosty Nalgene Cryo ở 1°C giúp cho các lọ đứng trong hộp đựng này và có thể sử dụng làm giá đỡ nổi khi rã đông mẫu.

g. Lấy lọ đựng ra khỏi chậu nước và xịt vào lọ này dung dịch Isopropanol 70%. Thời điểm tốt để lấy lọ đựng ra khỏi chậu nước là khi nhìn thấy các cục đá nhỏ nổi trong lọ – nghĩa là nhiệt độ bên trong lọ dưới 37°C.

h. Đặt lọ vào tủ đựng kín có khóa chuyên để vận chuyển vật liệu thí nghiệm và thông báo cho các kỹ thuật viên xử lý phòng sạch.

### 2.3 Chuẩn bị xử lý mô:

a. Việc xử lý mô dây rốn nên được thực hiện trong phòng sạch được theo dõi môi trường (EM): Tại thời điểm kết thúc mỗi ca làm việc, thực hiện vệ sinh toàn bộ phòng và tủ hút.

b. Chuẩn bị/vệ sinh làm sạch buồng an toàn sinh học.



c. Thực hiện đếm các phần tử sống khi làm việc trong buồng an toàn sinh học.

d. Tập hợp tất cả dụng cụ cần thiết trong buồng an toàn sinh học để kiểm tra ngày hết hạn và bao bì đóng gói có bị hư hỏng không. Khi cầm nắm xy lanh, pipet, kẹp vô trùng, dao mổ, đĩa đựng mô, và kim tiêm, đảm bảo không cho bề mặt bất kỳ tiếp xúc với sản phẩm đã vô trùng này. Chỉ có mặt ngoài của ống xy lanh, ống dẫn, đầu pít tông và/hoặc nắp chụp kim tiêm hoặc vỏ bọc có thể được cầm nắm an toàn. Vứt bỏ dụng cụ nếu có bề mặt đã bị tiếp xúc hoặc đã tiếp xúc với bề mặt không vô trùng.

e. Ghi lại số lô sản phẩm và ngày hết hạn (nếu có) của tất cả các chất phản ứng và các dụng cụ được sử dụng.

f. Nhận lọ rửa đông bằng cách làm sạch lọ này bằng miếng chùi không có xơ vải đã tẩm cồn 70% trước khi chuyển vào buồng an toàn sinh học.

g. Sử dụng kim hút cùng xy lanh, hút chất lỏng khỏi lọ càng nhiều càng tốt. Tránh hút mô.

h. Sử dụng kẹp vô trùng, chuyển mô vào đĩa petri 100mm vô trùng.

i. Thêm phân ước 5ml môi trường rửa vào các đoạn mô.

j. Lắc các thành phần này trong 15-30 giây, sau đó lấy môi trường rửa ra bằng pipet hoặc xy lanh gắn kim hút. Lặp lại quá trình rửa này hai lần.

k. Thêm 2ml môi trường rửa vào mô để tránh khô mô.

#### 2.4. Bắt đầu quá trình sinh trưởng MSC từ mô:

a. Dán nhãn “Outgrowth 1” vào đáy đĩa loại 6 lỗ giếng có ghi số lô MSC hoặc mã mô dây rốn và ngày bắt đầu sinh trưởng. Nếu sử dụng đĩa nuôi cấy 60mm, chia đĩa này làm bốn phần bằng cách vẽ đường phân chia ở đáy đĩa này.

b. Sử dụng kẹp vô trùng, dùng một lần, đặt một mẫu mô kích thước từ 3 x 3mm đến 5 x 5mm vào mỗi lỗ giếng. Nếu sử dụng đĩa nuôi cấy 60mm, đặt mô vào giữa mỗi góc phần tư để phân cách các mẫu mô (cách nhau hơn 1cm).

c. Đổ 3ml PTT6 vào mỗi lỗ giếng.

d. Sử dụng kim hút lắp trên xy lanh loại 30ml, hút đủ môi trường để phủ vừa đủ mô. Không làm nghiêng đĩa. Không cho kim hút chạm vào phần đáy lỗ giếng.

e. Sử dụng kính hiển vi đảo ngược, quan sát sinh trưởng tế bào hàng ngày ( $24 \pm 6$  giờ). Có thể sử dụng hệ thống chụp ảnh nuôi cấy tế bào theo thời gian thực thay cho kính hiển vi quang học.

f. Thay môi trường hàng ngày. Đảm bảo môi trường này cân bằng với nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.

i. Hút hết môi trường.

ii. Cho 3ml PTT6 vào.

iii. Hút cho đến khi mô vừa ngập trong môi trường.

g. Khi quan sát thấy sinh trưởng tế bào từ mô, cấy chuyển mô này sang đĩa mới loại 6 lỗ giếng theo quy trình giống như từ 4.a đến 4.e nêu trên chỉ khác là ghi nhãn dán đĩa này là “Outgrowth 2”. Duy trì sự sinh trưởng tế bào ở đĩa “Outgrowth 1” bằng cách cho thêm 2ml PTT6 vào mỗi lỗ giếng. Quan sát sự hợp dòng hàng ngày. Cứ 2-3 ngày thay môi trường một lần (đảm bảo cân bằng môi trường với nhiệt độ phòng trước khi sử dụng).

h. Khi quan sát thấy sự sinh trưởng tế bào trong đĩa “Outgrowth 2”, lặp lại bước 4.a đến 4.e chỉ khác là đĩa được dán nhãn ghi “Outgrowth 3.” Duy trì sự sinh trưởng tế bào trong đĩa “Outgrowth 2” bằng cách cho thêm 2ml PTT6 vào mỗi lỗ giếng. Quan sát sự hợp dòng hàng ngày. Cứ 2-3 ngày lại thay môi trường một lần (đảm bảo cân bằng môi trường với nhiệt độ phòng trước khi sử dụng).

i. Khi quan sát thấy sự sinh trưởng tế bào trong đĩa “Outgrowth 3”, loại bỏ mô. Nếu mô quá nhỏ và không gây ảnh hưởng đến sinh trưởng tế bào, bỏ mô khi cấy chuyển.

j. Khi tế bào đạt mức hợp dòng 40-50%, quan sát tế bào hàng ngày để ngăn sự lan rộng quá mức.

k. Khi tế bào đạt mức hợp dòng 70-80%, cấy chuyển tế bào. Không để tế bào lan rộng trên mức hợp dòng 80%.

Với kích thước các mô cấy từ khoảng 1 đến 3mm, và việc nuôi cấy mô/tế bào được thực hiện trong đĩa nuôi hình chữ vuông loại 175mm, số tế bào gốc trung mô trung bình được thu gom từ mô cấy thường khoảng từ 4.000 đến 6.000 tế bào/mô cấy. Theo đó, khi tế bào gốc trung mô được sinh trưởng đồng thời từ 48 mô cấy thì thu gom được khoảng 300.000 tế bào. 300.000 tế bào gốc trung mô này gom từ các mô cấy sau đó có thể được sử dụng để cấy chuyển bằng cách gieo mầm trong các bình nuôi tế bào có diện tích  $175\text{cm}^2$

bằng 300.000 tế bào như mô tả trong Ví dụ 2.5 (có thể được gọi là Lần 1). Tế bào gốc trung mô thu được từ Lần 1 này có thể được sử dụng để gieo mầm lại trong các bình 175cm<sup>2</sup> (Lần 2) và cho tế bào mở rộng sinh trưởng như mô tả trong Ví dụ 2.5 dưới đây. Tế bào thu nhận từ cả Lần 1 và Lần 2 có thể được “lập thành ngân hàng” bằng cách bảo quản đông lạnh, với tế bào gốc trung mô thu được từ Lần 2 được coi là đại diện ngân hàng tế bào đầu dòng (Master Cell Bank) mà sẽ để dùng cho sự lan rộng tiếp của tế bào gốc trung mô, ví dụ, trong thiết bị phản ứng sinh học như trong Ví dụ 2.7 dưới đây.

### 2.5. Cây chuyên MSC trong đĩa nuôi tế bào

a. Thực hiện đếm phần tử sống khi làm việc trong buồng an toàn sinh học. Cân bằng tất cả các môi trường với nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.

b. Khi tế bào sinh trưởng đạt mức hợp dòng 70-80%, cấy chuyển các tế bào.

i. Loại PTT6 khỏi đĩa petri.

ii. Rửa bằng HBSS không có canxi hoặc Magie.

iii. Thêm 0,2ml TrypLE-EDTA 1X và lắc trong 1-2 phút.

iv. Để nghiêng đĩa 30-45° để tế bào trôi xuống theo trọng lực. Đập nhẹ vào cạnh đĩa để đẩy nhanh quá trình tách ra.

v. Thêm 1ml PTT6. Dùng pipet hút nhẹ lên và xuống sau đó chuyển tế bào vào ống ly tâm 15ml. Sử dụng đầu pipet sạch cho mỗi lỗ giếng. Tế bào từ tất cả 6 lỗ có thể được gom vào một ống 15ml.

vi. Ly tâm trong 10 phút ở 1200 rpm (vòng/phút).

vii. Loại bỏ phần nổi và tạo huyền phù lại tế bào bằng 5ml PTT6.

c. Cấy chuyển MSC

i. Lấy phân ước 50µl huyền phù tế bào và thử nghiệm đối với TNC và khả năng sống được bằng thử nghiệm loại trừ xanh Trypan (Trypan Blue Exclusion).

ii. Đếm tế bào bằng máy đếm tế bào máu. Dự liệu đếm được 20-100 tế bào/ô vuông. Nếu số đếm cao hơn 100, pha loãng mẫu gốc theo tỷ lệ 1:5 và lặp lại phương pháp repeat Trypan Blue bằng cách sử dụng máy đếm tế bào máu.

iii. Tính số tế bào sống được/ml và tổng số tế bào sống được:

1. Số tế bào sống được/ml = số tế bào sống được x hệ số pha loãng x 10<sup>4</sup>

2. Tổng số tế bào sống được = số tế bào sống được x hệ số pha loãng x tổng thể tích x  $10^4$

iv. Tính % khả năng sống được:

1. % khả năng sống được = số tế bào sống được x 100 / (số tế bào sống được + số tế bào chết)

v. Pha loãng huyền phù tế bào đến mật độ  $1,0 \times 10^6$  tế bào/ml:

1. “X” thể tích = tổng số tế bào sống được /  $10^6$  tế bào/ml

2. Ví dụ, nếu tổng số tế bào sống được là  $1,0 \times 10^7$ ;

3. “X” =  $10^7/10^6$  tế bào/ml hoặc = 10ml, tức là điều chỉnh tổng thể tích tế bào lên đến 10ml bằng cách thêm 5ml vào huyền phù tế bào (vốn có thể tích 5 ml).

vi. Nếu huyền phù tế bào ít hơn  $10^6$ /ml, xác định thể tích cần thiết để gieo mầm  $2 \times 10^6$  tế bào cho mỗi đĩa petri loại 150mm hoặc bình 175cm<sup>2</sup>.

1. Thể tích cho  $2 \times 10^6$  tế bào =  $2 \times 10^6$  tế bào ÷ số tế bào sống được/ml

2. Ví dụ, nếu số tế bào sống được/ml là  $8 \times 10^5$  tế bào/ml,  $2 \times 10^6$  tế bào ÷  $8 \times 10^5$  tế bào/ml hoặc 2,5ml cần có.

vii. Để riêng 0,5ml cho phân tích đánh dấu MSC.

viii. Gieo mầm  $2 \times 10^6$  tế bào vào mỗi đĩa petri loại 150mm hoặc bình 175cm<sup>2</sup> với 30ml PTT6.

ix. Quan sát hiện tượng dính tế bào, hình thành khuẩn lạc, và sự hợp dòng ba ngày một lần. Khi tế bào đạt mức hợp dòng 40-50%, quan sát tế bào một hoặc hai ngày một lần để ngăn chặn sự lan rộng quá mức. Không để tế bào lan rộng quá mức hợp dòng 80%. Có thể sử dụng hệ thống theo dõi nuôi cấy thời gian thực thay cho kính hiển vi quang học.

x. Cứ 2-3 ngày lại thay môi trường một lần.

## 2.6 Bảo quản đông lạnh tế bào MSC

a. Đếm tế bào sống được trong buồng an toàn sinh học.

b. Khi tế bào đạt mức hợp dòng 70-80%, chống dính tế bào bằng 2ml TrypLE-EDTA 1X cho mỗi đĩa petri loại 150mm hoặc bình đựng loại 175cm<sup>2</sup>.

i. Loại PTT6 ra khỏi đĩa petri.

- ii. Rửa bằng 5ml HBSS hoặc PBS không có canxi hoặc magie.
  - iii. Thêm 2ml TrypLE-EDTA 1X và lắc trong 1-2 phút.
  - iv. Để đĩa nghiêng một góc 30-45° cho tế bào chảy xuống dưới theo trọng lực. Gõ nhẹ vào cạnh đĩa petri này để đẩy nhanh quá trình tách ra.
  - v. Thêm 10ml PTT6 để bất hoạt TrypLE. Trộn kỹ để phân ly các cục tế bào.
  - vi. Chuyển tế bào vào ống ly tâm loại 15ml bằng pipet Pasteur.
  - vii. Ly tâm trong 10 phút ở 1200 vòng/phút.
  - viii. Hút môi trường ra và tạo lại huyền phù bằng 10ml PTT6.
  - ix. Lấy 50µl mẫu và xác định tổng số tế bào sống được và% khả năng sống được theo mô tả ở trên. Thực hiện đếm tế bào trong 15 phút vì tế bào có thể bắt đầu đông cục.
- c. Chuẩn bị tế bào cho bảo quản đông lạnh

i. Chuẩn bị môi trường huyền phù tế bào và môi trường bảo quản đông lạnh và đông lạnh tế bào

## 2.7. Cây chuyền (lan rộng) MSC trong thiết bị phản ứng sinh học Quantum (Terumo BTC, Inc.)

Cũng có thể sử dụng thiết bị phản ứng sinh học Quantum để lan rộng MSC. Số tế bào khởi đầu cho quá trình mở rộng sinh trưởng trong thiết bị Quantum này nên nằm trong khoảng từ 20 đến 30 triệu cho một lượt chạy. Hiệu suất điển hình cho một lượt chạy là từ 300 đến 700 triệu MSC khi thu gom. Thiết bị phản ứng sinh học này được vận hành theo quy trình của nhà sản xuất. Tế bào gốc trung mô thu được từ máy này thường được bảo quản đông lạnh (xem dưới đây) và dùng làm ngân hàng tế bào làm việc (Working Cell Bank).

Vật liệu/Hóa chất:

1. Bộ dụng cụ cho sinh trưởng mở rộng Quantum
2. Túi đựng chất thải Quantum
3. Túi đựng môi trường Quantum
4. Quantum Inlet Bag
5. PTT6
6. PBS

7. Fibronectin
8. TrypLE
9. Xy lạnh loại 3ml
10. Miếng thử Glucoza
11. Miếng thử Lactat
12. Đĩa nuôi tế bào 60ml hoặc loại tương đương
13. Hỗn hợp khí y tế 5% CO<sub>2</sub>
14. 50ml Combi-tip

Thiết bị:

1. Buồng an toàn sinh học
2. Máy đo Glucoza (Bayer Healthcare/Ascensia Contour Blood Glucose Meter)
3. Lactate Plus (Nova Biomedical)
4. Bơm Peristaltic có trang bị đầu chụp
5. Máy ly tâm Eppendorf 5810
6. Bộ nối ống vô trùng
7. Máy hút M4 Repeat Pipettor
8. Bộ gắn kín - RF Sealer

Quy trình:

1. Chuẩn bị lò phản ứng sinh học Quantum
  - a) Môi lò phản ứng sinh học Quantum
  - b) Phủ lò phản ứng sinh học:

1) Điều chế dung dịch fibronectin trong buồng an toàn sinh học.

- 1) Để fibronectin đông khô thích nghi với nhiệt độ phòng ( $\geq 15$  phút ở nhiệt độ phòng)
- 2) Thêm 5ml nước cất vô trùng; không lắc hoặc khuấy
- 3) Để fibronectin chuyển sang trạng thái dung dịch trong 30 phút.

- 4) Sử dụng xy lanh 10ml gắn kim 18g, chuyển dung dịch fibronectin này vào túi nạp tế bào chứa 95ml PBS.
  - 2) Gắn túi này vào hàng “hóa chất”
  - 3) Kiểm tra bong bóng khí (có thể loại bong bóng bằng thiết bị “Remove IC Air” hoặc “Remove EC Air” và sử dụng “Wash” làm nguồn cấp.
  - 4) Mở hoặc thiết lập chương trình phủ lò phản ứng sinh học (Fig.1. Các bước 3-5).
  - 5) Chạy chương trình
  - 6) Trong khi chương trình đang chạy để phủ bề mặt lò phản ứng sinh học, chuẩn bị túi môi trường chứa 4 lít PTT6.
  - 7) Treo túi môi trường này vào hàng IC Media bằng cách sử dụng bộ nối ống vô trùng.
  - 8) Khi các bước phủ bề mặt lò phản ứng sinh học đã hoàn thành, tháo túi nạp tế bào đã sử dụng cho dung dịch fibronectin bằng cách sử dụng bộ gắn kín RF.
- c) Rửa sạch lượng fibronectin dư
- d) Chuẩn hóa lò phản ứng sinh học bằng môi trường
2. Nuôi cấy tế bào trong lò phản ứng sinh học Quantum
- a) Nạp và gắn tế bào bằng huyền phù đồng nhất:
  - b) Nuôi và nuôi cấy tế bào
    - 1) Chọn tốc độ dòng chảy môi trường để nuôi tế bào.
    - 2) Lấy mẫu lactat và glucoza hàng ngày.
    - 3) Điều chỉnh tốc độ dòng chảy của môi trường khi nồng độ lactat gia tăng. Nồng độ lactat cho phép tối đa thực được xác định bởi mẻ nuôi cấy trong bình nuôi cấy mà tế bào có nguồn gốc từ đó. Xác định xem môi trường PTT6 trong túi môi trường có đủ không. Nếu cần, thay túi môi trường PTT6 bằng túi môi trường PTT6 mới.
    - 4) Khi tốc độ dòng đạt giá trị mong muốn, đo nồng độ lactat 8-12 giờ một lần. Nếu nồng độ lactat không giảm hoặc nồng độ lactat tiếp tục tăng, thu gom tế bào.

3. Thu gom tế bào từ lò phản ứng sinh học Quantum
  - a) Khi nồng độ lactat không giảm, thu gom tế bào sau khi lấy mẫu lactat và glucoza lần cuối.
    - b) Thu gom tế bào:
      - 1) Gắn túi nạp tế bào đã nạp đầy 100ml TrypLE vào hàng “Hóa chất” bằng cách sử dụng bộ nối ống vô trùng.
      - 2) Xác định PBS trong túi đựng PBS đã đủ chưa. Nếu chưa, gắn túi mới có ít nhất 1,7 lít PBS vào hàng “Wash” bằng cách sử dụng bộ nối ống vô trùng.
      - 3) Chạy chương trình thu gom
  4. Bảo quản đông lạnh tế bào
    - 1) Khi đã thu gom xong tế bào, chuyển tế bào vào ống ly tâm 50ml để tạo viên tế bào.
      - 2) Tạo lại huyền phù bằng 25ml dung dịch huyền phù tế bào lạnh. Đếm tế bào bằng máy đếm Sysmex hoặc Biorad Cell. Gắn bản ghi số đếm tế bào vào hồ sơ mẻ xử lý Quantum tương ứng.
        - 3) Điều chỉnh nồng độ tế bào đến  $2 \times 10^7$ /ml
        - 4) Thêm vào lượng thể tích tương đương của dung dịch bảo quản đông lạnh và trộn kỹ (không lắc hoặc tạo xoáy)
        - 5) Sử dụng pipet lặp lại, thêm 1ml huyền phù tế bào trong chất bảo quản đông lạnh vào mỗi lọ loại 1,8ml. Bảo quản đông lạnh sử dụng chương trình CRF như được mô tả trong bảo quản đông lạnh SOP D6.100 CB bằng cách sử dụng thiết bị đông lạnh có điều chỉnh tốc độ
          - 6) Bảo quản các lọ này trong không gian bảo quản nitơ lỏng được chỉ định.
          - 7) Gắn báo cáo chạy bằng CRF vào hồ sơ xử lý mẻ MSC P3-Quantum tương ứng.

3. Phân tích biểu hiện gen đánh dấu tế bào gốc trong quần thể tế bào gốc màng lót dây rốn trung mô phân lập từ mô dây rốn, có sử dụng các môi trường nuôi khác nhau

Thực hiện các thử nghiệm tế bào theo dòng chảy để phân tích tế bào gốc trung mô được phân lập từ dây rốn xem có biểu hiện của các gen đánh dấu tế bào gốc trung mô CD73, CD90 và CD105 hay không.



Để thực hiện các thử nghiệm này, tế bào gốc trung mô được phân lập từ mô dây rốn bằng cách nuôi mô dây rốn trong ba môi trường nuôi khác nhau, sau đó cấy chuyển tế bào gốc trung mô trong môi trường tương ứng như nêu trong Ví dụ 2.

Ba môi trường nuôi sau được sử dụng trong các thử nghiệm này: a) 90% (thể tích/thể tích) DMEM có bổ sung 10% FBS (thể tích/thể tích), b) môi trường nuôi cấy PTT-4 như mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2006/0078993 và đơn yêu cầu cấp patent quốc tế tương ứng số công bố WO2006/019357 gồm 90% (thể tích/thể tích) CMRL1066, và 10% (thể tích/thể tích) FBS (xem đoạn [0183] trong tài liệu WO2006/019357 và c) môi trường nuôi cấy PPT-6 theo sáng chế có thành phần được mô tả ở đây. Trong phân tích tế bào theo dòng chảy này, phân tích hai mẫu quần thể tế bào gốc trung mô dây rốn (CLMC) khác nhau đối với mỗi môi trường nuôi trong số ba môi trường nuôi cấy được sử dụng.

Sử dụng quy trình dưới đây để phân tích tế bào theo dòng chảy.

#### Vật liệu và Phương pháp

Tên dụng cụ	Tên hãng sản xuất	Số sản phẩm
BD FACS CANDO	BD	V07300367
Inverted Microscope, CKX41SF	Olympus	4K40846
Centrifuge, Micro spin Tabletop	Biosan	010213-1201-0003

Danh sách chất phản ứng	Tên hãng sản xuất	Số catalô sản phẩm
10 X Trypsin	Biowest	X0930-100
10 X PBS	Lonza	17-517Q
DMEM	Lonza	12-604F
huyết thanh bào thai bò	GE healthcare	A11-151

Danh sách kháng thể	Tên hãng sản xuất	Số catalô sản phẩm
Kháng thể CD73 của người được tinh sạch AD2 0,1mg	BD	550256
Kháng thể CD90 của	BD	550402

người được tinh sạch 5E10 1mL		
Kháng thể CD105 của người được tinh sạch 266 0,1mg	BD	555690
IgG của dê kháng chuột Alexa Fluor 647 (H+L) *2 mg/mL*	BD	A21235

Tên chất phản ứng	Thành phần
1 X PBS (1L)	100ml PBS 10X + 900ml nước cất vô trùng
1x PBA (50ml)	49,5ml PBS 1X + 0,5ml FBS

### Quy trình

#### *a) Phân lập tế bào và nuôi từ màng lót dây rốn*

1. Ủ các mẫu mô trong đĩa nuôi tế bào và ngâm trong môi trường tương ứng, sau đó giữ trong tủ ủ CO<sub>2</sub> ở 37°C như mô tả trong Ví dụ 2.
2. Cứ ba ngày thay môi trường một lần.
3. Tế bào sinh trưởng từ các mô nuôi cấy này được theo dõi dưới kính hiển vi quang học.
4. Khi mức hợp dòng khoảng 70%, bóc tế bào ra khỏi đĩa bằng cách trypsin hóa (0,0125% trypsin/0,05% EDTA) và sử dụng cho các phân tích tế bào theo dòng chảy.

#### *b) Trypsin hóa tế bào để dùng cho các thử nghiệm*

1. Lấy môi trường ra khỏi đĩa nuôi cấy
2. Rửa nhẹ bằng PBS 1X vô trùng để loại bỏ các dấu vết FBS vì FBS sẽ cản trở tác dụng enzyme của trypsin.
3. Thêm trypsin 1X vào đĩa nuôi cấy tế bào và ủ trong 3-5 phút ở 37°C.

4. Quan sát tế bào dưới kính hiển vi để đảm bảo chúng đã rời ra. Trung hòa trypsin bằng cách thêm môi trường toàn vẹn chứa FBS (DMEM với FBS 10%).
5. Sử dụng pipet phá vỡ các cục tế bào bằng cách đẩy chúng vào thành đĩa nuôi. Gom và chuyển huyền phù tế bào vào các ống ly tâm loại 50ml
6. Thêm PBS 1X vô trùng vào đĩa và rửa nó, gom huyền phù tế bào vào ống ly tâm nêu trên.
7. Ly tâm ở 1800 rpm (vòng/phút) trong 10 phút.
8. Gạn bỏ phần nổi và tạo lại huyền phù thể viên tế bào bằng môi trường PBA.

*c) Đếm tế bào*

1. Đảm bảo máy đếm tế bào máu và nắp che sạch sẽ và khô ráo, tốt hơn là rửa dụng cụ bằng etanol 70% và để dụng cụ khô trước khi lau bằng miếng lau Kim (giấy không có xơ vải).
2. Lấy mẫu lượng nhỏ tế bào trong huyền phù và cho vào ống vi ly tâm và đưa ra khỏi tủ hút BSC.
3. Nhuộm màu tế bào trong huyền phù với lượng thể tích ngang bằng của Trypan Blue, ví dụ 500 $\mu$ l huyền phù được bổ sung thêm 500 $\mu$ l Trypan Blue (hệ số pha loãng = 2X, tạo ra dung dịch Trypan Blue 0,2%).
4. Không để tế bào tiếp xúc Trypan Blue quá 30 phút vì Trypan Blue là chất độc và sẽ dẫn đến gia tăng tế bào chết, dẫn đến kết quả đếm giả.
5. Thêm 20 $\mu$ l hỗn hợp huyền phù tế bào vào mỗi khoang của máy đếm tế bào máu và xem dưới kính hiển vi quang học.

- a. Đếm số tế bào sống được (tế bào sáng; tế bào chết đã hấp thu Trypan Blue và vì vậy màu sẫm) ở mỗi ngăn phần tư của máy đếm tế bào máu trong tổng số 8 ngăn phần tư ở khoang trên và khoang dưới.

Số đếm tế bào toàn phần được biểu diễn là (số tế bào trung bình/ngăn phần tư) x  $10^4$  tế bào/ml.

*d) Nhuộm tế bào*

- i. Chuẩn bị trước khi nhuộm tế bào

- Lấy mẫu huyền phù tế bào cho vào 3 ống (CD73, CD90, CD105 ) mỗi ống này có hai bản sao như nhau và 2 ống (đối chứng âm), mỗi ống chứa 50.000 tế bào.

ii. Nhuộm bằng kháng thể (Ab) sơ cấp

- Thêm 1 $\mu$ l [0,5mg/ml Ab] kháng thể sơ cấp vào 100ul huyền phù tế bào. Ủ ở 4°C trong 45 phút.
- Đổ đến 1ml bằng PBA.
- Ly tâm ở 8000 rpm ở 4°C trong 5 phút.
- Gạn bỏ chất nổi bề mặt.
- Thêm 1ml PBA và tạo lại huyền phù cho viên tế bào
- Ly tâm 8000 rpm ở 4°C trong 5 phút.
- Gạn bỏ chất nổi bề mặt.
- Tạo lại huyền phù trong 100ul PBA.

iii. Nhuộm bằng Ab thứ cấp – trong bóng tối

- Thêm 1ul [0,5mg/ml ab] kháng thể thứ cấp vào 100ul huyền phù tế bào. Ủ ở 4°C trong 30 phút.
- Đổ đầy đến 1ml bằng PBA.
- Ly tâm 8000 rpm ở 4°C trong 5 phút.
- Gạn bỏ chất nổi bề mặt.
- Thêm 1ml PBA và tạo lại huyền phù cho viên kết tế bào
- Ly tâm 8000 rpm ở 4°C trong 5 phút.
- Gạn bỏ chất nổi bề mặt
- Tạo lại huyền phù trong 200-300ul PBA để phân tích tế bào theo dòng chảy
- Chuyển tế bào vào ống FACS để đọc trong phân tích tế bào theo dòng chảy BD FACS CANDO.

Kết quả phân tích tế bào theo dòng chảy được thể hiện trên Fig.6a đến Fig.6c. Fig.6a là phần trăm tế bào gốc màng lót dây rốn trung mô biểu hiện các gen đánh dấu tế bào gốc CD73, CD90 và CD105 sau khi được phân lập khỏi mô dây rốn và nuôi trong DMEM/10% FBS, Fig.6b là phần trăm tế bào gốc màng lót dây rốn trung mô được phân lập biểu hiện các gen đánh dấu tế bào gốc CD73, CD90 và CD105 sau phân lập từ mô dây rốn và nuôi trong PTT-4 và Fig.6c là phần trăm tế bào gốc màng lót dây rốn trung mô được phân lập biểu hiện các gen đánh dấu tế bào gốc CD73, CD90 và CD105 sau khi phân lập từ mô dây rốn và nuôi trong PTT-6. Có thể thấy trên Fig.6a, quần thể được phân lập bằng cách sử dụng DMEM/10% FBS làm môi trường nuôi cấy có khoảng 75% tế bào CD73+, 78% tế bào CD90+ và 80% tế bào CD105+ (lấy trung bình của hai phân tích), trong khi sau phân lập/nuôi mô dây rốn bằng PPT-4 là môi trường nuôi cấy (xem Fig.6b) thì số tế bào gốc trung mô dương tính với CD73-, dương tính với CD90 và dương tính với CD105 là khoảng 87% (tế bào CD73+), 93% (tế bào CD90+) và 86% (tế bào CD105+) lấy trung bình của hai phân tích. Độ tinh khiết của quần thể tế bào gốc trung mô thu nhận do nuôi trong môi trường PTT-6 của sáng chế ít nhất là 99,0% so với cả ba gen đánh dấu (CD73, CD90, CD105), nghĩa là độ tinh khiết của quần thể tế bào này cao hơn đáng kể so với khi nuôi bằng môi trường PPT-4 hoặc DMEM/10% FBS. Ngoài ra và quan trọng hơn là quần thể tế bào gốc trung mô thu được bằng cách nuôi trong PTT-6 hầu như tinh khiết 100% và là quần thể toàn tế bào gốc. Điều này làm cho quần thể tế bào gốc của sáng chế là ứng viên lý tưởng cho trị liệu tế bào gốc. Vì vậy, quần thể tế bào gốc màng lót dây rốn trung mô này có thể là tiêu chuẩn vàng cho các liệu pháp dùng tế bào gốc.

Các kết quả trên Fig.6 được khẳng định tiếp bằng kết quả phân tích tế bào theo dòng chảy trên Fig.7a và Fig.7b. Fig.7a là phần trăm tế bào gốc màng lót dây rốn trung mô được phân lập (tế bào gốc trung mô từ màng ối dây rốn) biểu hiện các gen đánh dấu tế bào gốc CD73, CD90 và CD105 và không biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR sau khi phân lập từ mô dây rốn và nuôi cấy trong môi trường PTT-6. Theo Fig.7a, quần thể tế bào gốc trung mô này có 97,5% tế bào sống được trong đó 100% biểu hiện mỗi gen trong số CD73, CD90 và CD105 (xem các dòng chữ “CD73+CD90+” và “CD73+CD105+”) trong khi 99,2% quần thể tế bào gốc này không biểu hiện CD45 và 100% quần thể tế bào gốc này không biểu hiện CD34 và HLA-DR (xem các dòng chữ “CD34-CD45-” và “CD34-HLA-DR-”). Vì vậy, quần thể tế bào gốc trung mô thu nhận được bằng cách nuôi trong PTT-6 tinh khiết gần như 100%

và là quần thể tế bào gốc đáp ứng các tiêu chí cho tế bào gốc trung mô được sử dụng trong các liệu pháp tế bào (95% quần thể tế bào gốc hoặc nhiều hơn biểu hiện CD73, CD90 và CD105, trong khi 98% quần thể tế bào gốc hoặc nhiều hơn không biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR, xem tài liệu: Sensebe et al. "Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review"). Lưu ý là tế bào gốc trung mô từ màng ối dính chặt với nhựa trong điều kiện nuôi tiêu chuẩn và biệt hóa *in vitro* thành tế bào tạo xương, tế bào mỡ và nguyên bào sụn, xem các patent Mỹ số 9,085,755, 8,287,854 hoặc WO2007/046775 và như vậy đáp ứng các tiêu chí chung được chấp thuận khi sử dụng tế bào gốc trung mô trong liệu pháp tế bào.

Fig.7b là phân trăm tế bào gốc trung mô tủy xương được phân lập biểu hiện CD73, CD90 và CD105 và không biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR. Theo Fig.7b, quần thể tế bào gốc trung mô tủy xương có 94,3% tế bào sống được trong đó 100% biểu hiện mỗi trong số CD73, CD90 và CD105 (xem các hàng chữ "CD73+CD90+" và "CD73+CD105+") trong khi chỉ có 62,8% quần thể tế bào gốc tủy xương không biểu hiện CD45 và 99,9% quần thể tế bào gốc này không biểu hiện CD34 và HLA-DR (xem các dòng chữ "CD34-CD45- và "CD34-HLA-DR-). Như vậy, tế bào gốc trung mô tủy xương vốn được xem là tiêu chuẩn vàng của tế bào gốc trung mô là ít đồng nhất/tinh khiết hơn, xét theo gen đánh dấu tế bào gốc, so với quần thể tế bào gốc trung mô (lấy từ màng ối dây rốn) của sáng chế. Phát hiện này cũng cho thấy quần thể tế bào gốc theo sáng chế có thể là ứng cử viên lý tưởng cho các liệu pháp dựa trên tế bào gốc và có thể trở thành tiêu chuẩn vàng cho các liệu pháp dựa trên tế bào gốc.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết được các phương án thay thế và cải biến của sáng chế dựa trên phạm vi và bản chất của sáng chế này.

Mọi tài liệu patent và công bố được viện dẫn ở đây đều có thể được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này thông hiểu và được nêu ra ở đây bằng cách viện dẫn.

Sáng chế được mô tả ở đây cũng có thể được thực hiện khi thiếu dấu hiệu bất kỳ hay khi có các dấu hiệu hay giới hạn không được đề cập chi tiết trong bản mô tả này. Vì vậy, các thuật ngữ như "chứa", "có", "bao gồm", v.v. sẽ được hiểu theo nghĩa rộng và không bị hạn chế phạm vi. Ngoài ra, các thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này là các thuật ngữ mang tính chất mô tả và không nhằm mục đích giới hạn phạm vi, và vì vậy các tác giả không có ý định dùng các thuật ngữ này để loại trừ các dấu hiệu tương đương hay một phần của chúng, và điều cần được thừa nhận là có thể có các phương án cải biến khác vẫn thuộc phạm

vi sáng chế này. Vì vậy, cần hiểu là dù sáng chế được mô tả chi tiết ở đây qua các phương án ưu tiên và dấu hiệu tùy chọn, thì các phương án cải biến khác của sáng chế là trong tầm tay của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và các phương án cải biến này vẫn thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế. Sáng chế này được mô tả trên phạm vi rộng và khái quát. Mỗi một dấu hiệu phân nhóm hẹp hơn trong phạm vi bảo hộ khái quát này cũng sẽ là một phần của sáng chế. Điều này bao gồm phần mô tả khái quát của sáng chế kèm điều kiện hay sự loại trừ dấu hiệu ra khỏi nhóm chung, không tính đến dấu hiệu bị loại trừ có được đề cập hay không. Ngoài ra, khi các dấu hiệu hay khía cạnh thuộc sáng chế được đề cập dưới dạng nhóm các dấu hiệu Markush, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết được sáng chế này cũng được mô tả dưới dạng các dấu hiệu riêng lẻ hay phân nhóm thuộc nhóm Markush. Các phương án khác của sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn qua các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phân lập quần thể tế bào gốc trung mô từ màng ối của dây rốn, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy mô dây rốn trong môi trường nuôi cấy chứa DMEM (môi trường eagle được cải biến bởi Dulbecco), F12 (môi trường Ham's F12), M171 (môi trường 171) và huyết thanh bào thai bò (Fetal Bovine Serum - FBS), trong đó môi trường nuôi cấy bao gồm DMEM ở nồng độ cuối khoảng 55 đến 65% (thể tích/thể tích), F12 ở nồng độ cuối khoảng 5 đến 15% (thể tích/thể tích), M171 ở nồng độ cuối khoảng 15 đến 30% (thể tích/thể tích) và FBS ở nồng độ cuối khoảng 1 đến 8% (thể tích/thể tích).
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó môi trường nuôi cấy chứa DMEM ở nồng độ cuối khoảng 57,5 đến 62,5% (thể tích/thể tích), F12 ở nồng độ cuối khoảng 7,5 đến 12,5% (thể tích/thể tích), M171 ở nồng độ cuối khoảng 17,5 đến 25% (thể tích/thể tích) và FBS ở nồng độ cuối khoảng 1,75 đến 3,5% (thể tích/thể tích).
3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó môi trường nuôi cấy chứa DMEM ở nồng độ cuối khoảng 61,8% (thể tích/thể tích), F12 ở nồng độ cuối khoảng 11,8% (thể tích/thể tích), M171 ở nồng độ cuối khoảng 23,6% (thể tích/thể tích) và FBS ở nồng độ cuối khoảng 2,5% (thể tích/thể tích).
4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó môi trường nuôi cấy còn chứa yếu tố tăng trưởng biểu mô (Epidermal Growth Factor - EGF) ở nồng độ cuối khoảng 1 ng/ml đến khoảng 20 ng/ml.
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó môi trường nuôi cấy chứa insulin ở nồng độ cuối khoảng 1  $\mu$ g/ml đến 10  $\mu$ g/ml.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, bao gồm bước nuôi cấy mô dây rốn cho đến khi sự phát triển tế bào của các tế bào gốc trung mô của màng ối đạt mức hợp dòng khoảng 70% đến 80%.
7. Phương pháp theo điểm 6, bao gồm bước lấy các tế bào gốc trung mô ra khỏi vật chứa nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy.
8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ít nhất khoảng 90% hoặc nhiều hơn, khoảng 91% hoặc nhiều hơn, khoảng 92% hoặc nhiều hơn, khoảng 93% hoặc nhiều hơn, khoảng 94% hoặc nhiều hơn, khoảng 95% hoặc nhiều hơn, khoảng 96% hoặc nhiều hơn, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn, khoảng 99%



hoặc nhiều hơn các tế bào gốc trung mô được phân lập biểu hiện các gen đánh dấu sau: CD73, CD90 và CD105.

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ít nhất khoảng 90% hoặc nhiều hơn, khoảng 91% hoặc nhiều hơn, khoảng 92% hoặc nhiều hơn, khoảng 93% hoặc nhiều hơn, khoảng 94% hoặc nhiều hơn, khoảng 95% hoặc nhiều hơn, khoảng 96% hoặc nhiều hơn, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn, khoảng 99% hoặc nhiều hơn các tế bào gốc trung mô được phân lập không có sự biểu hiện của các gen đánh dấu sau: CD34, CD45 và HLA-DR (kháng nguyên bạch cầu người (Human Leukocyte Antigen) – kháng nguyên D (antigen D Related)).

10. Phương pháp theo điểm 8 hoặc 9, trong đó khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn khoảng 99% hoặc nhiều hơn các tế bào gốc trung mô được phân lập biểu hiện CD73, CD90 và CD105 và không có sự biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR.

11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, còn bao gồm bước bảo quản các tế bào gốc/đầu dòng được phân lập để sử dụng sau này, trong đó bước bảo quản được thực hiện bằng cách bảo quản đông lạnh.

12. Phương pháp sản xuất môi trường nuôi cấy phù hợp để phân lập quần thể tế bào gốc trung mô từ màng ối của dây rốn, phương pháp bao gồm bước trộn để thu được thể tích cuối là 500 ml môi trường nuôi cấy:

i. 250 ml DMEM

ii. 118 ml M171

iii. 118 ml DMEM/F12

iv. 12,5 ml huyết thanh bào thai bò (FBS) (nồng độ cuối là 2,5%)

13. Phương pháp theo điểm 12, còn bao gồm bước bổ sung

v. 1 ml dung dịch gốc EGF (5  $\mu\text{g/ml}$ ) để đạt nồng độ cuối là 10ng/ml

vi. 0,175 ml dung dịch gốc insulin (14,28 mg/ml) để đạt nồng độ cuối là 5 $\mu\text{g/ml}$ .

14. Phương pháp theo điểm 12 hoặc 13, còn bao gồm bước bổ sung vào DMEM một hoặc nhiều chất bổ sung sau: adenin, hydrocortison, muối 3,3',5-Triiodo-L-thyronin natri (T3), nhờ đó đạt được tổng thể tích là 500 ml môi trường nuôi cấy.

15. Môi trường nuôi cấy tế bào thu được bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 14.

16. Phương pháp phân lập các tế bào gốc trung mô từ màng ối của dây rốn, bao gồm bước nuôi cấy mô màng ối trong môi trường nuôi cấy được điều chế bằng phương pháp như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 14.

17. Môi trường nuôi cấy tế bào chứa:

- DMEM ở nồng độ cuối khoảng 55 đến 65% (thể tích/thể tích),
- F12 ở nồng độ cuối khoảng 5 đến 15% (thể tích/thể tích),
- M171 ở nồng độ cuối khoảng 15 đến 30% (thể tích/thể tích) và
- FBS ở nồng độ cuối khoảng 1 đến 8% (thể tích/thể tích).

18. Môi trường nuôi cấy tế bào theo điểm 17, trong đó môi trường nuôi cấy này chứa DMEM ở nồng độ cuối khoảng 57,5 đến 62,5% (thể tích/thể tích), F12 ở nồng độ cuối khoảng 7,5 đến 12,5% (thể tích/thể tích), M171 ở nồng độ cuối khoảng 17,5 đến 25,0% (thể tích/thể tích) và FBS ở nồng độ cuối khoảng 1,75 đến 3,5% (thể tích/thể tích).

19. Môi trường nuôi cấy tế bào theo điểm 18, trong đó môi trường nuôi cấy này chứa DMEM ở nồng độ cuối khoảng 61,8% (thể tích/thể tích), F12 ở nồng độ cuối khoảng 11,8% (thể tích/thể tích), M171 ở nồng độ cuối khoảng 23,6% (thể tích/thể tích) và FBS ở nồng độ cuối khoảng 2,5% (thể tích/thể tích).

20. Môi trường nuôi cấy tế bào theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 17 đến 19, trong đó môi trường nuôi cấy này còn chứa yếu tố tăng trưởng biểu mô (EGF) ở nồng độ cuối khoảng 1 ng/ml đến khoảng 20 ng/ml.

21. Môi trường nuôi cấy tế bào theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 17 đến 20, trong đó môi trường nuôi cấy này chứa insulin ở nồng độ cuối khoảng 1  $\mu\text{g/ml}$  đến 10  $\mu\text{g/ml}$ .

1/12

**LONZA**[www.lonza.com](http://www.lonza.com)

US. Scientific Support: 800-521-0390

[Scientific.support@lonza.com](mailto:Scientific.support@lonza.com)

EU/ROW Scientific support: +49 221-99199-400

[Scientific.support.eu@lonza.com](mailto:Scientific.support.eu@lonza.com)

Document #TS-12-604-3 08/11

©2011 Lonza Walkersville, Inc

**Môi trường eagle được cải biến bởi Dulbecco (DMEM)****Hướng dẫn sử dụng sản phẩm****Bảng hướng dẫn nhanh**

Môi trường cơ bản Dulbecco cải biến được phát triển từ năm 1969 và là phương án cải biến từ môi trường cơ bản (BME) và khác biệt với BME và MEM bởi các đặc tính sau:

- Lượng vitamin nhiều gấp 4 lần so với MEM. Các vitamin và axit amin lớn hơn so với BME
- Dạng và lượng axit amin lớn hơn nhiều so với MEM và BME
- Có chứa Sắt (nitrat sắt)

**Mô tả**

12-604 Có 4,5g/l glucoza, có L-glutamin  
 12-614 Có 4,5g/l glucoza, không có L-glutamin  
 12-707 Có 1,0g/l glucoza, không có L-glutamin  
 12-708 Có 1,0g/l glucoza, và 25ml dung dịch đệm HEPES, không chứa L-glutamin  
 12-709 Có 4,5g/l glucoza, và 25ml dung dịch đệm HEPES, không chứa L-glutamin  
 12-733 Có 4,5g/l glucoza, không L-glutamin, không natri pyruvat  
 12-741 Có 4,5g/l glucoza, có L-glutamin, không natri pyruvat  
 12-914 Có 4,5g/l glucoza, không L-glutamin, được kiểm tra để hỗ trợ sinh trưởng tế bào lai  
 12-917 Có 4,5g/l glucoza, không L-glutamin hoặc độ phenol  
 15-604 Có 4,5g/l glucoza, có L-Glutamin, không có natri pyruvat, dạng bột  
 15-614 Có 4,5g/l glucoza, không L-glutamin hoặc natri pyruvat, dạng bột  
 (Công thức chế phẩm dạng bột cần bổ sung thêm 49,3 ml/l dung dịch NaHCO<sub>3</sub> nồng độ 7,5% hoặc 3,70g/l bột NaHCO<sub>3</sub>)

	Glucoza	L-glutamin	Độ phenol	Đệm HEPES	Natri Pyruvat
--	---------	------------	-----------	-----------	---------------

12-604	4,5g/l	+	+	-	+
12-614	4,5g/l	-	+	-	+
12-707	1,0g/l	-	+	-	+
12-708	1,0g/l	-	+	+	+
12-709	4,5g/l	-	+	+	+
12-733	4,5g/l	-	+	-	-
12-741	4,5g/l	+	+	-	-
12-914	4,5g/l	-	+	-	+
12-917	4,5g/l	-	-	-	+

Fig.1

2/12

## LONZA

## Mô tả

## Thông tin đặt hàng

	Tính vô sinh	PH	Áp suất thẩm thấu (mOsm)	Thúc đẩy sinh trưởng tế bào (% đối chứng)	Nội độc tố (EU/ml)	Chi số catalo sản phẩm	Mô tả	Thể tích
12-604	Âm tính	7,0-7,4	324-352	≥75%	FIO	12-604F	DMEM với 4,5 g/l glucoza, có L-glutamin	500ml
12-614	Âm tính	7,0-7,4	324-352	≥75%	FIO	12-604Q	DMEM với 4,5 g/l glucoza, có L-glutamin	1L
12-707	Âm tính	7,0-7,4	306-346	≥75%	FIO	12-614F	DMEM với 4,5 g/l glucoza, không có L-glutamin	500ml
12-708	Âm tính	7,03-7,27	300-326	≥75%	FIO	12-614Q	DMEM với 4,5 g/l glucoza, không có L-glutamin	1L
12-709	Âm tính	7,0-7,4	321-351	≥75%	FIO	12-707F	DMEM với 1,0g/l glucoza, không có L-glutamin	500ml
12-733	Âm tính	7,0-7,4	318-360	≥75%	FIO	12-708F	DMEM với 1,0g/l glucoza, và 25mM đệm HEPES, không có L-glutamin	500ml
12-741	Âm tính	7,0-7,4	318-360	≥75%	FIO	12-709F	DMEM với 4,5g/l glucoza, và 25mM đệm HEPES, không có L-glutamin	500ml
12-914	Âm tính	7,0-7,4	324-352	≥85%***	FIO	12-733F	DMEM với 4,5g/l glucoza, không có L-glutamin, không có natri pyruvat	500ml
12-917	Âm tính	7,0-7,4	329-343	≥75%	FIO	12-733Q	DMEM với 4,5g/l glucoza, không có L-glutamin, không có natri pyruvat	1L
15-604***	-	5,5-7,0	235-265	≥75%	≤1,0	12-741F	DMEM với 4,5g/l glucoza, có L-glutamin, không có natri pyruvat	500ml
15-614	-	5,5-7,0	235-265	≥75%	≤1,0	12-914F	DMEM với 4,5g/l glucoza, không có L-glutamin, được kiểm tra để hỗ trợ sinh trưởng tế bào lai	500ml
						12-917F	DMEM với 4,5g/l glucoza, không có L-glutamin hoặc đồ phenol	500ml
						15-604D	DMEM với 4,5g/l glucoza, có L-glutamin, không có natri pyruvat , bột	1x10L
						15-604F	DMEM với 4,5g/l glucoza, không có L-glutamin hoặc natri pyruvat, bột	1x50L
						15-614D	DMEM với 4,5g/l glucoza, không có L-glutamin hoặc natri pyruvat, bột	1x10L

FIO: để tham khảo

\*\* kết quả kiểm tra chức năng

\*\*\* hàm lượng âm #1,0

**Bảo quản**

2°C đến 8°C

**Tuyên bố về sản phẩm:** các sản phẩm này chỉ dùng cho mục đích nghiên cứu. Không được phép sử dụng trên người và động vật hay trong các thử nghiệm lâm sàng hoặc các thí nghiệm *in vitro*.

Fig.1 (tiếp)

3/12

**LONZA**

Lonza Walkersville, Inc  
 www.lonza.com  
[biotechserv@lonza.com](mailto:biotechserv@lonza.com)  
 Techservice: 800-521-0390  
 Document# TS 12-615-211/08  
 Walkersville, MD 21793-0127 USA  
 ©2008 Lonza Walkersville, Inc

**Môi trường Ham's F12****Hướng dẫn sử dụng sản phẩm**

Môi trường Ham's F12 là hỗn hợp các chất dinh dưỡng được thiết kế cho mục đích nuôi cấy nhiều loại tế bào lai và tế bào động vật có vú khi được sử dụng trong huyết thanh phối hợp với các hormon và transferrin

**Mô tả**

Tính vô sinh	pH	Áp suất thẩm thấu (mOsm)
Âm tính	7,07-7,40	286-305
Khả năng sinh trưởng tế bào ≥ 75% đối chứng	Nội độc tố (EU/ml) FIO	

**Tuyên bố về sử dụng sản phẩm**

Các sản phẩm này chỉ dùng cho mục đích nghiên cứu. Không được phép sử dụng trên người hay động vật, không được sử dụng trong các điều trị lâm sàng hoặc thử nghiệm in vitro

**Thông tin đặt hàng**

Chi số catalo sản phẩm	Mô tả	Thể tích
12-615F	Môi trường Ham's F12 với L-glutamin	500ml

Fig.2

4/12

**LONZA**[www.lonza.com](http://www.lonza.com)

US. Scientific Support: 800-521-0390

[Scientific.support@lonza.com](mailto:Scientific.support@lonza.com)

EU/ROW Scientific support: +49 221-99199-400

[Scientific.support.eu@lonza.com](mailto:Scientific.support.eu@lonza.com)

Document #TS-12-604-3 08/11

©2011 Lonza Walkersville, Inc

**Môi trường DMEM:F12 (1:1)**

<b>Hướng dẫn sử dụng sản phẩm</b>				<b>Bảo quản</b>		
DMEM kết hợp với Hams F12 đã được sử dụng rộng rãi để chứng minh tác dụng của các hormon và các yếu tố sinh trưởng khác nhau lên mô đích				2°C đến 8°C		
<b>Mô tả</b>				<b>Tuyên bố về việc sử dụng sản phẩm</b>		
12-719	Có L-glutamin, 15mM HEPES, và 3,151 g/l glucoza			Các sản phẩm này chỉ dùng cho mục đích nghiên cứu. Không được sử dụng trên người hay động vật, không được sử dụng trong điều trị lâm sàng hay thí nghiệm <i>in vitro</i> .		
15-719	Bột-có L-glutamin, 15mM HEPES, và 3,151 g/l glucoza. Môi trường dạng bột này yêu cầu bổ sung thêm 16,0ml/l dung dịch NaHCO <sub>3</sub> 7,5% hoặc 1,2 g/l bột NaHCO <sub>3</sub>					
04-687	Với 3,151 g/l glucoza, có L-glutamin, không có HEPES			<b>Thông tin đặt hàng</b>		
<b>Đặc tính</b>	<b>Tính vô sinh</b>	<b>pH</b>	<b>Áp suất thẩm thấu (mOsm)</b>	<b>Chỉ số catalo sản phẩm</b>	<b>Mô tả</b>	<b>Thể tích</b>
				12-719F	DMEM :F12 có L-glutamin, 15mM HEPES, và 3,151 g/l glucoza	500ml
12-719	âm tính	7,0-7,4	286-356	12-719Q	DMEM :F12 có L-glutamin, 15mM HEPES, và 3,151 g/l glucoza	1 L
15-719*	âm tính	4,5-6,5	260-290	15-719D	Bột DMEM :F12-có L-glutamin, 15mM HEPES, và 3,151g/l glucoza. Môi trường dạng bột cần bổ sung thêm 16,0 ml/l dung dịch NaHCO <sub>3</sub> 7,5% hoặc 1,2g/l bột NaHCO <sub>3</sub>	1 x 10L
04-687	âm tính	FIO	FIO	04-687Q	DMEM :F12 với 3,151g/l glucoza, với L-glutamin, không có HEPES	1L
		<b>Thúc đẩy sinh trưởng tế bào</b>	<b>Nội độc tố (EU/ml)</b>	<b>Độ ẩm</b>		
12-719		≥ 75% đối chứng	FIO	--		
15-719*		≥ 75% đối chứng	≤ 1 EU/ml	≤2%		
04-687		--	FIO	--		

- pH, độ thẩm thấu, nội độc tố và độ ẩm được đo khi không có NaHCO<sub>3</sub>; NaHCO<sub>3</sub> được bổ sung để kiểm tra sự sinh trưởng tế bào

Fig.3

5/12

Cascade Biologics™

GIBCO

Môi trường 171, Môi trường 171PRF, và MEGS

**Môi trường 171**  
M-171-500  
500ml

**Môi trường 171PRF (không có đồ phenol)**  
M-171PRF-500  
500ml

**Mô tả sản phẩm**

Môi trường 171 và môi trường 171PRF là môi trường nuôi cấy mô vô trùng dạng lỏng được sử dụng làm một thành phần trong môi trường nuôi cấy toàn vẹn dùng cho sinh trưởng tế bào biểu mô của người bình thường. Môi trường 171 là môi trường cơ bản chứa các axit amin thiết yếu và không thiết yếu, vitamin, các hợp chất hữu cơ khác, vi khoáng, và các muối vô cơ. Môi trường 171PRF là phiên bản không có phenol đồ của môi trường 171. Các môi trường này không chứa kháng sinh, các chất kháng nấm, hormone, yếu tố sinh trưởng hoặc protein. Các môi trường này là HEPES và được đệm bicarbonat và được thiết kế để sử dụng trong thiết bị ủ khí quyển gồm 5% CO<sub>2</sub>/95% không khí. Để hỗ trợ quá trình tăng sinh dài hạn và phù đều mặt đĩa của tế bào biểu mô người, các môi trường này phải được bổ sung thêm chất bổ trợ sinh trưởng biểu mô động vật có vú (MEGS, cat. No S-015-5)

**Mục đích sử dụng**

Môi trường 171 được sử dụng cho nuôi cấy thông thường tế bào biểu mô người. Môi trường 171PRF được sử dụng bởi các nhà nghiên cứu muốn nuôi cấy tế bào biểu mô người khi không có đồ phenol. Khi được bổ sung thêm MEGS, các môi trường này sẽ hỗ trợ sự tăng sinh và phù đều đĩa nuôi tế bào biểu mô người ở mật độ nằm trong khoảng từ 2,5x10<sup>3</sup> tế bào/cm<sup>2</sup> đến 8x10<sup>4</sup> tế bào/cm<sup>2</sup>. Sản phẩm này chỉ dùng trong nghiên cứu. Không được dùng trên người, động vật, trong chẩn đoán bệnh.

Lưu ý: nếu thao tác không cẩn thận, một số thành phần của sản phẩm có thể gây hại sức khỏe. Chú ý hết sức khi làm việc, phải trang bị đồ bảo vệ mắt và cơ thể khi làm việc. Xả thải đúng nơi quy định

**Bảo quản và Tính ổn định**

Môi trường 171 và 171PRF được bảo quản ở 4°C trong cơ sở sản xuất và vận chuyển ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Khi nhận sản phẩm, các môi trường này phải được bảo quản ở 4°C và không được đóng băng. **Bảo vệ trước ánh sáng.** Một số thành phần của các môi trường nuôi cấy mô này không bền trước ánh sáng và vì vậy khuyến cáo không cho môi trường tiếp xúc ánh sáng trong thời gian dài. Nếu cần làm ấm môi trường trước khi sử dụng, không làm ấm quá 37°C. Khi bảo quản trong bóng tối ở 4°C, sản phẩm ổn định cho đến khi hết hạn sử dụng ghi trên nhãn.

**Điều chế Môi trường 171 có thêm chất bổ trợ**

1. Làm tan băng một lọ đựng MEGS. Lấy một lọ đựng môi trường từ khu bảo quản lạnh. Đảm bảo là các nắp lọ vẫn kín.
2. Lắc nhẹ lọ đựng chất bổ trợ. Không để chất bổ trợ tạo bọt hoặc dính vào nắp lọ.
3. Lau phía ngoài lọ đựng bằng dung dịch diệt trùng như etanol 70% hay isopropanol.
4. Sử dụng kỹ thuật vô trùng trong tủ hút nuôi cấy, chuyển toàn bộ lượng chất trong lọ đựng chất bổ trợ sang lọ đựng môi trường
5. Đậy kín lọ đựng môi trường đã có chất bổ trợ và lắc nhẹ để đảm bảo dung dịch đồng nhất. Tránh tạo bọt

**Bảo quản và tính ổn định của môi trường 171 đã thêm chất bổ trợ**

Khi môi trường 171 hoặc môi trường 171PRF đã được bổ sung thêm MEGS, các môi trường này phải được bảo quản trong bóng tối ở 4°C và không được đóng băng. Khi bảo quản lạnh ở 4°C trong bóng tối, các chất bổ trợ này ổn định trong 01 tháng.

**Tài liệu tham khảo**

Công thức Môi trường 171 được dựa trên môi trường MCDB170 với một số cải biến  
Hammond SL, Ham RG, Stampfer MR; PNAS 81:5435-5439, 1984

Fig.4

6/12

Cascade Biologics™

GIBCO

MEGS

Chất bổ trợ sinh trưởng biểu mô động vật có vú

Cat.no.S-015-5

5ml

**Mô tả sản phẩm**

Chất bổ trợ sinh trưởng tế bào biểu mô động vật có vú (MEGS) là dung dịch vô trùng đậm đặc (100X) được dùng làm một thành phần trong môi trường nuôi cấy toàn vẹn cho sinh trưởng tế bào biểu mô người bình thường. Mỗi lọ MEGS loại 5ml đựng tất cả yếu tố sinh trưởng, hormon, và các mảnh mô cần thiết để nuôi tế bào biểu mô người bình thường và đây là lượng chính xác chất bổ trợ cần cho lọ đựng 500ml môi trường 171 hoặc môi trường 171PRF. MEGS là chất bổ trợ đã cân bằng ion có chứa chiết xuất từ tuyến yên bò (BPE), insulin bò, hydrocortisone, và yếu tố sinh trưởng biểu mô người tái tổ hợp. Khi lọ 500ml Môi trường 171 hoặc 171PRF được bổ sung MEGS, nồng độ cuối cùng của các thành phần trong môi trường đã có chất bổ trợ là: BPE 0,4% v/v; insulin bò, 5 µg/ml; hydrocortisone, 0,5µg/ml; và yếu tố sinh trưởng biểu mô người tái tổ hợp, 3ng/ml.

**Mục đích sử dụng**

MEGS được sử dụng cùng với môi trường 171 hoặc 171PRF để nuôi cấy thông thường không có huyết thanh cho tế bào biểu mô vú người thường. Sản phẩm này chỉ dùng trong nghiên cứu. Không được dùng trên người, động vật, trong chẩn đoán bệnh.

**Lưu ý: nếu thao tác không cẩn thận, một số thành phần của sản phẩm có thể gây hại sức khỏe. Chú ý hết sức khi làm việc, phải trang bị đồ bảo vệ mắt và cơ thể khi làm việc. Xả thải đúng nơi quy định**

**Một số hạn chế: Invitrogen Technology**

Người mua sản phẩm này không được chuyển nhượng lại, cụ thể không được phép bán lại cho bên thứ ba sản phẩm này, các thành phần có trong sản phẩm này, hoặc các chất liệu sử dụng sản phẩm này hay các thành phần của nó cho dù người mua là nhà nghiên cứu hay doanh nghiệp kinh doanh. Mọi mục đích khai thác thương mại sản phẩm này hay các thành phần của nó đều bị cấm.

**Bảo quản và Tính ổn định**

MEGS được bảo quản ở -20°C tại cơ sở sản xuất và vận chuyển với đá khô. Khi nhận sản phẩm, sản phẩm phải được bảo quản ở -20°C trong tủ lạnh không tự rã đông. Khi bảo quản ở nhiệt độ này, sản phẩm ổn định đến khi hết hạn sử dụng ghi trên nhãn.

Sau thời gian dài bảo quản ở -20°C, MEGS có thể chứa lượng nhỏ chất kết tủa. Chất kết tủa này được hình thành từ các chất không tan trong điều kiện lạnh có trong thành phần BPE của MEGS và không ảnh hưởng đến tính chất của sản phẩm.

**Làm tan băng**

Để làm tan băng, đặt sản phẩm trong bể nước ấm 37°C hoặc để qua đêm ở 4°C. Nếu làm tan trong bể nước, không để sản phẩm ở 37°C sau khi đã tan hết băng. Hướng dẫn cách thêm MEGS vào môi trường 171 có thể xem trong hướng dẫn đi kèm môi trường cơ bản này.

**Tài liệu tham khảo**

Công thức MEGS được dựa trên các chất bổ trợ đã công bố cho môi trường MCDB170 với một số cải biến. Hammond SL, Ham RG, Stampfer MR; PNAS 81:5435-5439, 1984

Fig.4 (tiếp)



7/12

**Danh sách thành phần môi trường PTT6**

Danh sách thành phần môi trường	Tên công ty	Số Catalô
---------------------------------	-------------	-----------

**Môi trường cơ bản**

DMEM (còn gọi là môi trường gốc PTT6 trong bản mô tả này)	LONZA	12-604F
DMEM/F12	LONZA	12-719F
M171	Life Technologies	M171500

**Huyết thanh**

Huyết thanh thai bò	GE Healthcare	A15-151
---------------------	---------------	---------

**Kháng sinh**

Penixilin-Streptomycin-Amphotericin B	LONZA	17-745E
<b>Chất bổ trợ</b>		
Adênin (tùy chọn)	Sigma	A8626-25G
Hydrocortison (tùy chọn)	Sigma	H-0888
Yếu tố tăng trưởng biểu bì	Millipore	GF-144
T3 (muối 3,3',5-Triiodo-L-thyronin natri)	Sigma	200-223-5
AOF insulin tái tổ hợp người	Life Technologies	A11382I

Fig. 5

8/12

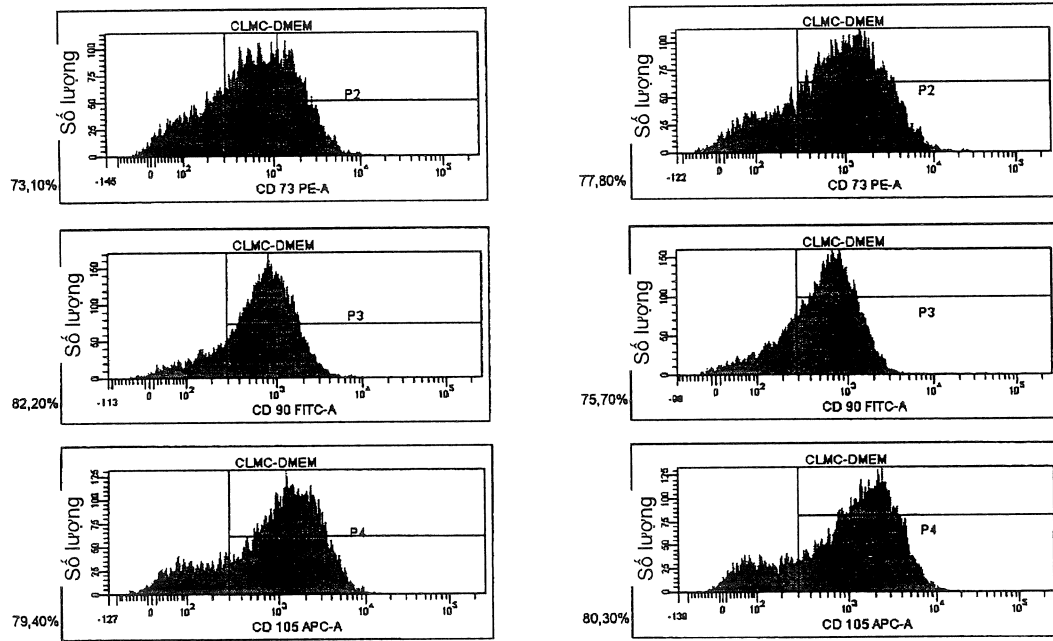


Fig. 6a

9/12

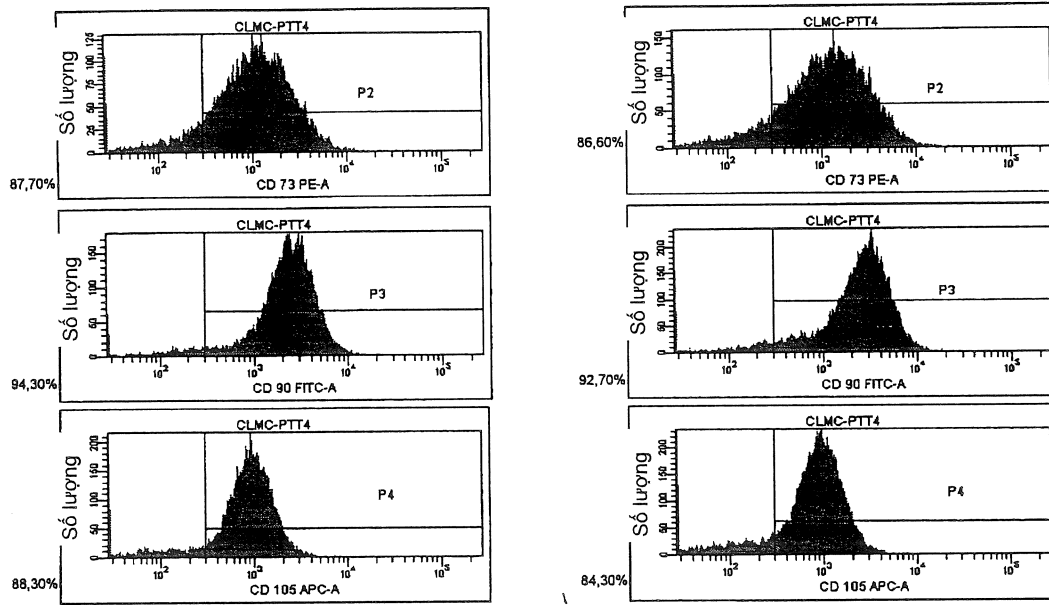


Fig. 6b

10/12

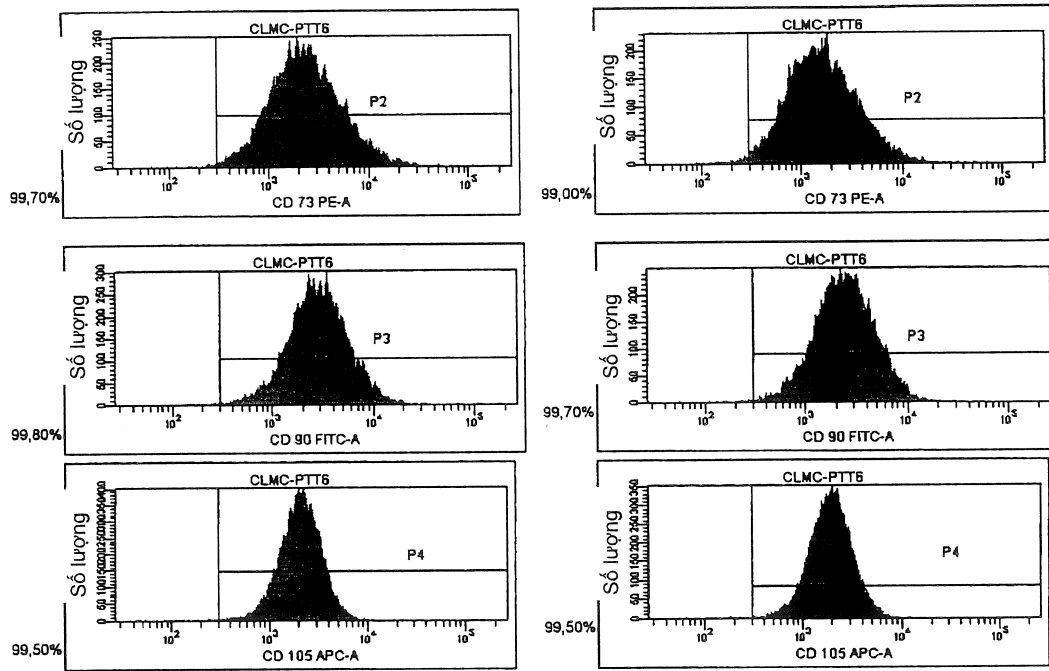
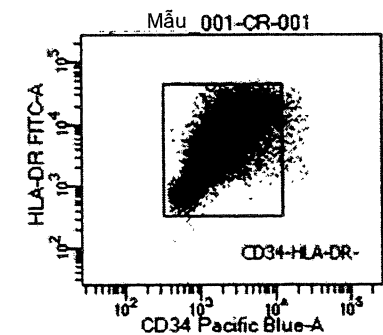
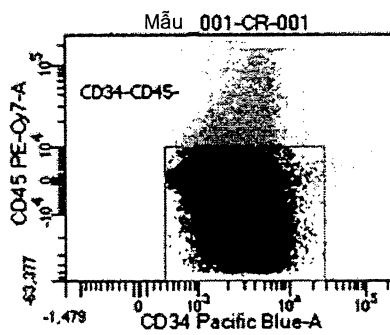
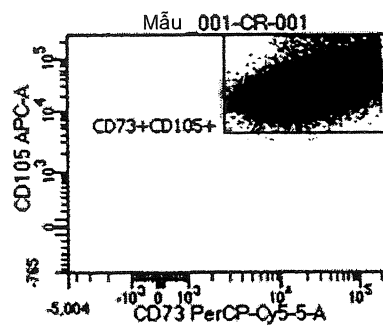
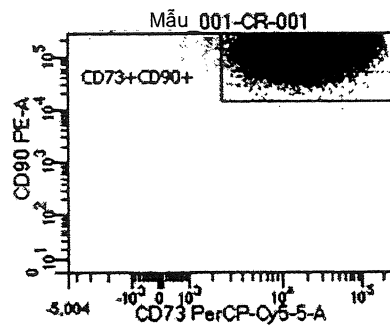
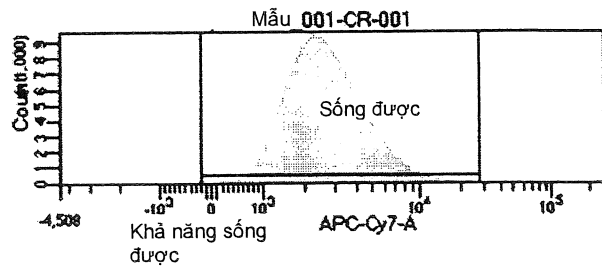
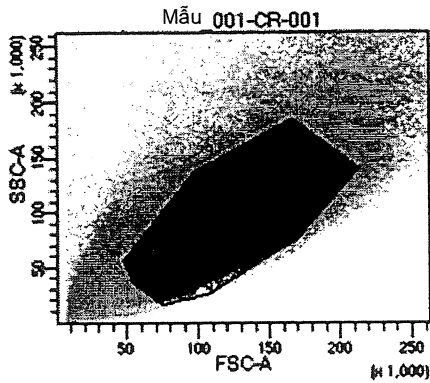


Fig. 6c

11/12

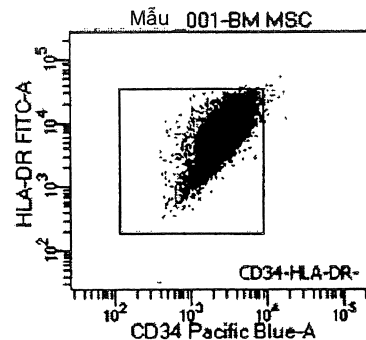
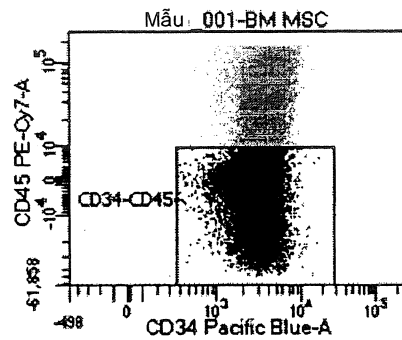
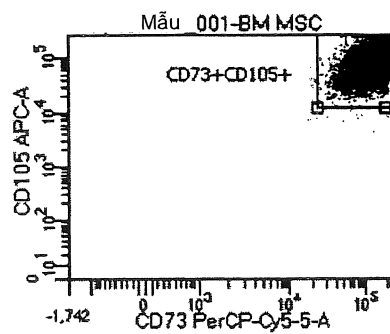
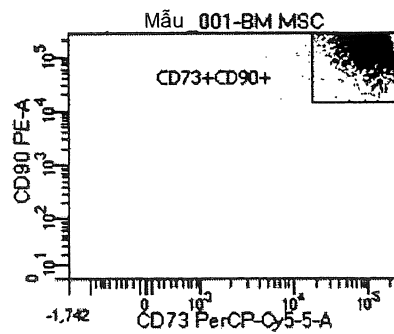
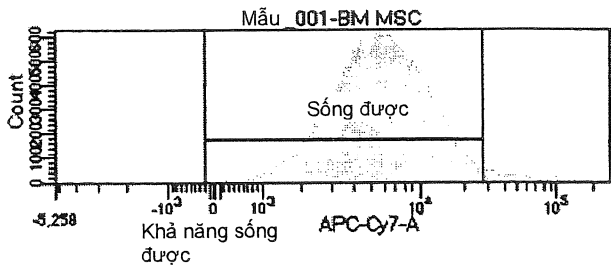
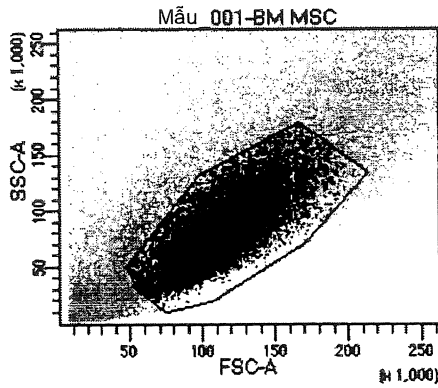
BD FACSDiva 8.0.1



Ống  
nghiệm: CR-001

Quần thể	#sự kiện	%gốc	%Tổng
Tất cả sự kiện	540,988	###	100,0
P1	425,093	78,6	78,6
Sống được	414,643	97,5	76,6
CD73+CD90+	414,554	100,0	76,6
CD73+CD105+	414,490	100,0	76,6
CD34-CD45-	411,206	99,2	76,0
CD34+HLA-DR-	411,061	100,0	76,0

12/12



Tên thử nghiệm:	MSC 062216		
Tên mẫu:	Specimen_001		
Tên ống nghiệm:	BM MSC		
Quần thể	#sự kiện	%gốc	
■ CD34-HLA-DR-	21,128	99,9	
Quần thể	#sự kiện	%gốc	%Tổng
■ Tất cả sự kiện	77,022	###	100,0
■ P1	35,780	46,5	46,5
■ Sống được	33,741	94,3	43,8
■ CD73+CD90+	33,729	100,0	43,8
■ CD73+CD105+	33,710	99,9	43,8
■ CD34-CD45-	21,155	62,8	27,5
■ CD34-HLA-DR-	21,128	99,9	27,4