



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)^{2020.01} **G01N 33/50; C12N 5/0775; A61K** (13) **B**
35/28; A61P 17/02



1-0048904

(21) 1-2022-02863 (22) 08/10/2020
(86) PCT/SG2020/050571 08/10/2020 (87) WO 2021/071429 15/04/2021
(30) 62/912,374 08/10/2019 US
(45) 25/07/2025 448 (43) 25/11/2022 416A
(73) CELLRESEARCH CORPORATION PTE. LTD. (SG)
7500A Beach Road, #06-302, The Plaza, Singapore 199591, Singapore
(72) PHAN, Toan Thang (SG).
(74) Công ty TNHH Quốc tế D & N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG LÀM LÀNH VẾT THƯƠNG CỦA
QUẦN THỂ TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ VÀ CÁC PHƯƠNG PHÁP LIÊN QUAN
ĐỂ CHỌN LỌC TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ VÀ NHẬN DIỆN MÔ LÀM VẬT
LIỆU BAN ĐẦU ĐỂ SẢN XUẤT QUẦN THỂ TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ

(21) 1-2022-02863

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp đánh giá khả năng làm lành vết thương của quần thể tế bào gốc trung mô. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp chọn lọc quần thể tế bào gốc trung mô để sản xuất quần thể tế bào gốc theo các điều kiện cGMP và phương pháp chọn lọc quần thể tế bào gốc trung mô để sản xuất quần thể tế bào gốc để sử dụng trong dược phẩm tiếp theo. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp chọn lọc quần thể tế bào gốc trung mô để tạo ra ngân hàng tế bào đầu dòng và phương pháp nhận diện mô phù hợp làm vật liệu ban đầu để sản xuất quần thể tế bào gốc trung mô để sử dụng trong dược phẩm.

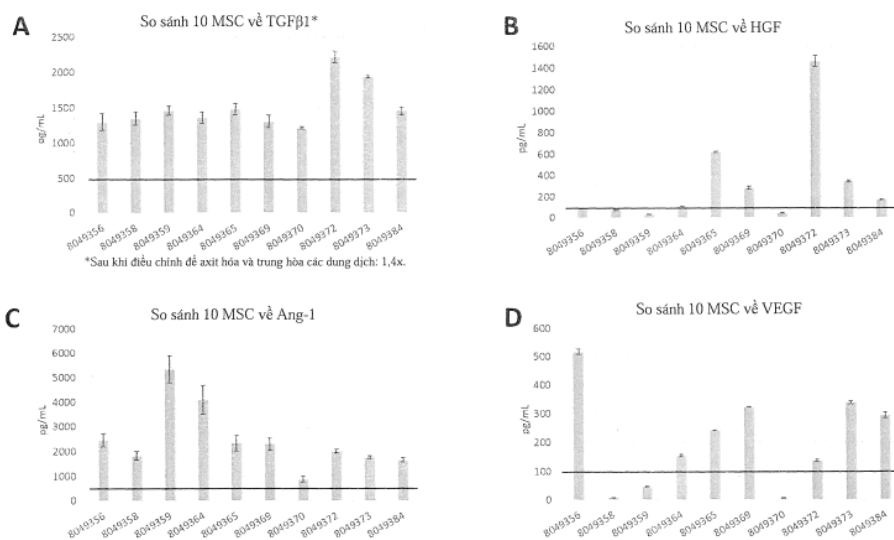


FIG. 2

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp đánh giá khả năng làm lành vết thương của quần thể tế bào gốc trung mô. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp chọn lọc quần thể tế bào gốc trung mô để sản xuất quần thể tế bào gốc theo các điều kiện cGMP và phương pháp chọn lọc quần thể tế bào gốc trung mô để sản xuất quần thể tế bào gốc để sử dụng trong dược phẩm tiếp theo. Hơn nữa, sáng chế còn đề cập đến phương pháp chọn lọc quần thể tế bào gốc trung mô để tạo ra ngân hàng tế bào đầu dòng (master cell bank) và phương pháp nhận diện mô phù hợp làm vật liệu ban đầu để sản xuất quần thể tế bào gốc trung mô để sử dụng trong dược phẩm. Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng ít nhất một protein để đánh giá khả năng làm lành vết thương của quần thể tế bào gốc trung mô. Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng ít nhất một protein để lựa chọn quần thể tế bào gốc trung mô để sản xuất quần thể tế bào gốc theo các điều kiện cGMP. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến việc sử dụng ít nhất một protein để lựa chọn quần thể tế bào gốc trung mô để lựa chọn quần thể tế bào gốc trung mô để sản xuất quần thể tế bào gốc để sử dụng trong dược phẩm tiếp theo. Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng ít nhất một protein để lựa chọn quần thể tế bào gốc trung mô để lựa chọn quần thể tế bào gốc trung mô để tạo ra ngân hàng tế bào đầu dòng (master cell bank) và việc sử dụng ít nhất một protein để lựa chọn quần thể tế bào gốc trung mô để lựa chọn quần thể tế bào gốc trung mô để nhận diện mô phù hợp làm vật liệu ban đầu để sản xuất quần thể tế bào gốc trung mô để sử dụng trong dược phẩm. Hơn nữa, sáng chế còn đề cập đến phương pháp nhận diện môi trường phù hợp để gây ra hoặc cải thiện các đặc tính làm lành vết thương của quần thể tế bào gốc trung mô.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tế bào gốc trung mô (Mesenchymal stem cell - MSC) có khả năng tự tái sinh và biệt hóa đa dòng. Do đó, các tế bào này là công cụ hấp dẫn và đầy triển vọng cho y học tái tạo. MSC có thể được phân lập từ nhiều mô khác nhau chẳng hạn mô đệm tủy xương, mô mỡ, hạ bì, nhau thai, máu cuống rốn hoặc các mô dây rốn khác bao gồm thạch Wharton, lớp dưới nội mô của tĩnh mạch dây rốn, hoặc mô màng ối của dây rốn

(Mitchell, K.E. et al. (2003) *Stem Cells* 21, 50-60; patent Mỹ 5,919,702; đơn sáng chế Mỹ 2004/0136967; Romanov, Y.A. et al. (2003) *Stem Cells* 21, 105-110; Covas, D.T. et al. (2003) *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36, 1179-1183; US2006/0078993). Tế bào gốc trung mô phân lập từ màng ối của dây rốn đã được báo cáo lần đầu trong đơn sáng chế Mỹ 2006/0078993 (đã được cấp các patent Mỹ số 9,085,755, 9,737,568 và 9,844,571) và đơn sáng chế quốc tế tương ứng WO2006/019357. Ngoài ra, quần thể tế bào gốc trung mô từ màng ối của dây rốn này gần đây đã được mô tả trong đơn sáng chế Mỹ 20181/27721 hoặc đơn sáng chế quốc tế tương ứng WO 2018/067071.

Quần thể tế bào gốc trung mô được mô tả trong đơn sáng chế Mỹ 20181/27721 hoặc đơn sáng chế quốc tế tương ứng WO 2018/067071 có lợi thế là 99% hoặc nhiều hơn tế bào gốc của quần thể này biểu hiện ba dấu chuẩn MSC CD73, CD90 trong khi không biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR. Do đó, quần thể tế bào được xác định rõ và cực kỳ đồng nhất này là một ứng viên lý tưởng cho các thử nghiệm lâm sàng và các liệu pháp điều trị trên cơ sở tế bào vì nó, ví dụ, hoàn toàn đáp ứng các tiêu chuẩn được chấp nhận chung cho MSC của người để sử dụng cho liệu pháp tế bào như được xác định, ví dụ bởi Dominici et al, “Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement”, *Cytotherapy* (2006) tập 8, số 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, hoặc Kundrotas *Acta Medica Lituanica*. 2012. tập 19. số 2 trang 75–79. Như được mô tả trong đơn sáng chế quốc tế WO 2018/067071, quần thể tế bào gốc trung mô này có thể, ví dụ, được sử dụng ở trạng thái chưa được biệt hóa của nó cho mục đích làm lành vết thương chẳng hạn điều trị các vết bỏng hoặc các vết thương do bệnh đái tháo đường mạn tính. Theo cách khác, quần thể tế bào gốc trung mô này có thể được biệt hóa, ví dụ, thành tế bào đảo β sản sinh insulin mà sau đó có thể được sử dụng, ví dụ bằng cách cấy vào người bệnh bị thiếu hụt insulin như bệnh đái tháo đường (cũng xem đơn sáng chế quốc tế WO2007/046775 về vấn đề này).

Quy trình sản xuất quần thể tế bào gốc trung mô này cũng được mô tả trong đơn sáng chế quốc tế WO 2018/067071 là phù hợp để được thực hiện theo các điều kiện thực hành sản xuất tốt (Good Manufacturing Practice - GMP), như được yêu cầu đối với các

liệu pháp điều trị trên cơ sở tế bào dị thân. Tuy nhiên, việc sản xuất theo GMP đòi hỏi việc kiểm soát chất lượng của sản phẩm thuốc được sản xuất, bất kể việc sản phẩm thuốc này là một phân tử hữu cơ nhỏ, một phân tử sinh học hay thậm chí là một quần thể tế bào như trong trường hợp quần thể tế bào gốc trung mô của đơn sáng chế quốc tế WO 2018/067071. Do đó, mong muốn là có được thử nghiệm kiểm soát chất lượng đối với việc sản xuất theo GMP quần thể tế bào gốc trung mô của đơn sáng chế quốc tế WO 2018/067071.

Trong ngữ cảnh này, biết rằng tế bào gốc trung mô, giống như bất kỳ vật liệu sinh học khác, có khả năng biến đổi nội tại. Ví dụ, các nghiên cứu trong sinh học tế bào về tế bào gốc trung mô đã nhận diện nhiều yếu tố khác nhau có tác động đến tuổi thọ và khả năng mở rộng của chúng. Các mô như nguồn mô của người cho, độ tuổi của người cho, nền tảng môi trường, và phương pháp phân lập đã được mô tả là có tác động lên chất lượng tổng thể của tế bào gốc trung mô (xem Paladino, et al. “Comparison between isolation protocols highlights intrinsic variability of human umbilical cord mesenchymal cells,” *Cell and Tissue Banking*, tập 17, số 1, trang 123–136, (2016), <https://doi.org/10.1007/s10561-015-9525-6>). Ngoài ra, Paladino, et al. trên đây, 2016 đã đề cập đến tính biến đổi cá thể ở các tế bào gốc trung mô bằng cách so sánh ba phương pháp phân lập khác nhau đối với MSC từ dây rốn cho mục đích lập ngân hàng tế bào và để xác định xem liệu có những ưu điểm nào về khả năng tồn tại của tế bào, tuổi thọ trong nuôi cấy, tiềm năng mở rộng và khả năng biệt hóa. Các tác giả báo cáo rằng vì các mẫu giống nhau được xử lý với ít nhất hai trong số ba quy trình được nghiên cứu và trong các điều kiện thử nghiệm được kiểm soát cao, kết quả của họ cho thấy rằng một phần của tính biến đổi quan sát được rõ ràng là nội tại đối với mỗi người cho với dữ liệu tăng gấp đôi thời gian và tuổi thọ. Trong một nghiên cứu tiếp theo, Paladino et al. (2017) “Intrinsic Variability Present in Wharton’s Jelly Mesenchymal Stem Cells and T Cell Responses May Impact Cell Therapy”. *Hindawi, Stem Cells International Volume 2017*, mã số bài báo 8492797, 12 trang, <https://doi.org/10.1155/2017/8492797> cho thấy rằng sự biểu hiện gen của các phân tử điều biến miễn dịch khác nhau giữa các mẫu của tế bào gốc trung mô thạch Wharton (WJ-MS) mà không có kiểu mẫu cụ thể nào. Trong nuôi cấy, tất cả các WJ-MS đều có khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào T CD3 + được hoạt hóa bởi mitogen, mặc dù ở các mức độ khác nhau, và mỗi PBMC phản ứng với một mức độ ức chế khác nhau. Các tác giả gợi ý rằng mỗi WJ-MS thể hiện hành vi độc đáo, khác nhau

về các kiểu biểu hiện mRNA xytokin và khả năng điều biến miễn dịch. Các tác giả cũng giả định rằng sự biến đổi giữa các mẫu có thể đóng vai trò trong tính hiệu quả của WJ- MSC được sử dụng trong điều trị.

Dựa trên những kết quả này, có khả năng MSC từ màng ối của dây rốn cũng có khả năng biến đổi nội tại liên quan đến việc sản xuất các phân tử cụ thể, do đó có thể ảnh hưởng đến sự phù hợp của chúng đối với các ứng dụng điều trị như làm lành vết thương hoặc bệnh tiểu đường. Vì vậy, sẽ là lợi thế nếu có trong tay phương pháp nhận diện một quần thể MSC hoặc mô của người cho chứa MSC là phù hợp để được sử dụng cho mục đích làm lành vết thương, chẳng hạn. Phương pháp như vậy cũng sẽ hữu dụng lý tưởng để tạo ra ngân hàng tế bào đầu dòng (master cell bank) (cần thiết để tạo ra sản phẩm thuốc điều trị tế bào) hoặc để sản xuất quần thể tế bào gốc theo các điều kiện cGMP để sử dụng trong dược phẩm tiếp theo.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp mà có thể, chẳng hạn được dùng để, nhận diện người cho mô chứa MSC hoặc tiếp theo là đối với quần thể MSC là phù hợp cho các ứng dụng điều trị như làm lành vết thương.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích này đạt được nhờ các phương pháp và sử dụng có các dấu hiệu của các điểm yêu cầu bảo hộ độc lập.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp đánh giá khả năng chữa lành vết thương của quần thể tế bào gốc trung mô, trong đó phương pháp này bao gồm bước xác định trong môi trường mức của ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) được tiết vào môi trường bởi quần thể tế bào gốc trung mô.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất phương pháp chọn lọc quần thể tế bào gốc trung mô để sản xuất quần thể tế bào gốc theo các điều kiện cGMP, trong đó phương pháp này bao gồm bước xác định trong môi trường mức của ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) được tiết vào môi trường bởi quần thể tế bào gốc trung mô.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất phương pháp chọn lọc quần thể tế bào gốc trung mô để sản xuất quần thể tế bào gốc để sử dụng trong dược phẩm tiếp theo, trong đó phương pháp này bao gồm bước xác định trong môi trường mức của ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) được tiết vào môi trường bởi quần thể tế bào gốc trung mô.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất phương pháp chọn lọc quần thể tế bào gốc trung mô để tạo ra ngân hàng tế bào đầu dòng (master cell bank), trong đó phương pháp này bao gồm bước xác định trong môi trường mức của ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) được tiết vào môi trường bởi quần thể tế bào gốc trung mô.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất phương pháp nhận diện mô phù hợp làm vật liệu ban đầu để sản xuất quần thể tế bào gốc trung mô để sử dụng trong dược phẩm, trong đó phương pháp này bao gồm xác định mức của ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) được tiết vào môi trường bởi mẫu mô hoặc tế bào phân lập được từ mô.

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề xuất việc sử dụng ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) protein để đánh giá khả năng làm lành vết thương của quần thể tế bào gốc trung mô.

Theo khía cạnh thứ bảy, sáng chế đề xuất việc sử dụng ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) protein để lựa chọn quần thể tế bào gốc trung mô để sản xuất quần thể tế bào gốc theo các điều kiện cGMP.

Theo khía cạnh thứ tám, sáng chế đề xuất việc sử dụng ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan

(HGF) protein để lựa chọn quần thể tế bào gốc trung mô để sản xuất quần thể tế bào gốc để sử dụng trong dược phẩm tiếp theo.

Theo khía cạnh thứ chín, sáng chế đề xuất việc sử dụng ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) protein để lựa chọn quần thể tế bào gốc trung mô để tạo ra ngân hàng tế bào đầu dòng (master cell bank).

Theo khía cạnh thứ mười, sáng chế đề xuất việc sử dụng ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) protein để nhận diện mô phù hợp làm vật liệu ban đầu để sản xuất quần thể tế bào gốc trung mô để sử dụng trong dược phẩm.

Theo khía cạnh thứ mười một, sáng chế đề xuất phương pháp nhận diện môi trường phù hợp để gây ra hoặc cải thiện các đặc tính làm lành vết thương của quần thể tế bào gốc trung mô, trong đó phương pháp này bao gồm bước xác định trong môi trường mức của ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) được tiết vào môi trường bởi quần thể tế bào gốc trung mô.

Theo khía cạnh thứ mười hai, sáng chế đề xuất việc sử dụng ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) protein để nhận diện môi trường phù hợp để gây ra hoặc cải thiện các đặc tính làm lành vết thương của quần thể tế bào gốc trung mô.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

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

Fig.1 là lưu đồ dưới dạng giản đồ thể hiện các bước thử nghiệm của một ví dụ minh họa về phương pháp sản xuất chế phẩm điều trị chứa quần thể MSC có khả năng làm lành vết thương thích hợp. Phương pháp này bao gồm bước nhận diện mô phù hợp

làm vật liệu ban đầu để sản xuất quần thể MSC, đánh giá khả năng làm lành vết thương của quần thể MSC, chọn lọc quần thể MSC để tạo ra ngân hàng tế bào đầu dòng và chọn lọc quần thể MSC để sử dụng trong dược phẩm. Tế bào gốc được sử dụng trong ví dụ này được phân lập từ màng ối của dây rốn – còn được gọi ở đây là tế bào gốc màng lót dây rốn (cord lining stem cells - CLSC). Ví dụ này bắt đầu bằng việc tạo lập ngân hàng mô chứa mô dây rốn, có thể được sử dụng làm vật liệu ban đầu để nuôi cấy MSC. Vì mục đích này, có thể nhận được sự đồng ý của người hiến tặng cho việc hiến tặng mô (giai đoạn 1). Hơn nữa, các mẫu máu của trẻ sơ sinh và người mẹ được sàng lọc các bệnh nhiễm trùng và dây rốn được kiểm tra tình trạng nhiễm khuẩn. Ví dụ, có đến 100 mẫu dây rốn được thu thập trong ngân hàng mô như vậy. Mô được phát hiện là không nghiêm trọng về sự nhiễm khuẩn hoặc bệnh lây nhiễm ở cửa được sử dụng để phát triển các mẫu cấy mà được sử dụng để tạo ra các dòng MSC thuần khiết (giai đoạn 2). Cho mục đích này, sản phẩm từ khoảng 10 màng ối riêng lẻ của dây rốn được nuôi cấy trong 0 đến 2 lần cấy truyền để nhân giống. Các MSC từ lần cấy truyền 2 (P2) được đánh giá bằng phương pháp trắc lưu tế bào đối với các dấu chuẩn MSC, và các phân dịch nổi được đánh giá về sự sản sinh xytokin. Các tiêu chí được đưa ra trong quá trình đối với các MSC ở giai đoạn 2 bao gồm >95% dương tính đối với CD73, CD90, CD105, và <5% dương tính đối với CD34, CD45 và HLA-DR, với sự sản sinh *in vitro* >500 pg/mL của Angiopoietin-1 và TGF- β , và >100 pg/mL của VEGF và HGF và độ vô trùng âm tính. Các dòng tế bào mà đáp ứng các tiêu chí cho phép lấy ra khỏi quy trình ở giai đoạn 2 sau đó được nhân giống tiếp trong bình phản ứng sinh học Terumo Quantum cho giai đoạn 3 của quá trình sản xuất. Các tiêu chí cho phép lấy ra khỏi quy trình đối với các MSC ở giai đoạn 3 bao gồm >95% dương tính đối với CD73, CD90, CD105, và <5% dương tính đối với CD34, CD45 và HLA-DR, được xét nghiệm về độ vô trùng, nội độc tố, mycoplasma, virus gây bệnh cho người và virus tự sinh. Các dòng tế bào (quần thể) trung mô mà vượt qua các xét nghiệm được tạo ngân hàng dưới dạng ngân hàng tế bào đầu dòng (master cell bank) (giai đoạn 3). Ngân hàng tế bào đầu dòng được làm tan băng và được cấy thành các mẫu cấy và các tiêu chí đưa ra là độ vô trùng, mycoplasma và nội độc tố và cuối cùng là $1x$, $3x$ và $5x 10^6$ MSC mà vượt qua các xét nghiệm được đóng chai trong môi trường mang chẳng hạn 1mL Hypothermosol® và bảo quản ở 2-8°C trước khi sử dụng làm dược phẩm (giai đoạn 4).

Fig.2 thể hiện kết quả của phân tích mức tiết ra của Ang-1, VEGF, HGF và TGF- β (ở đây là TGF- β 1) trong 10 quần thể MSC riêng biệt thu được từ 10 người cho dây rốn khác nhau được nuôi cấy như được mô tả đối với Fig.1 sau-giai đoạn 2. Fig.2A thể hiện mức tiết ra của yếu tố tăng trưởng chuyên dạng beta (TGF- β) đối với các quần thể MSC riêng biệt 8049356, 8049358, 8049359, 8049364, 8049365, 8049369, 8049370, 8049372, 8049373 và 8049384. Mức tiết ra của cả 10 quần thể vượt quá giá trị ngưỡng đối với TGF- β , là khoảng 500pg/mL và được thể hiện bởi đường màu đỏ. Fig.2B thể hiện mức tiết ra của yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) đối với các quần thể MSC riêng biệt 8049356, 8049358, 8049359, 8049364, 8049365, 8049369, 8049370, 8049372, 8049373 và 8049384. Mức tiết ra của 8049365, 8049369, 8049372, 8049373 và 8049384 vượt quá giá trị ngưỡng đối với HGF, là khoảng 100pg/mL và được thể hiện bởi đường màu đỏ. Fig.2C thể hiện mức tiết ra của Angiopoietin 1 (Ang-1) đối với các quần thể MSC riêng biệt 8049356, 8049358, 8049359, 8049364, 8049365, 8049369, 8049370, 8049372, 8049373 và 8049384. Mức tiết ra của cả 10 quần thể vượt quá giá trị ngưỡng đối với Ang-1, là khoảng 500pg/mL và được thể hiện bởi đường màu đỏ. Fig.2D thể hiện mức tiết ra của yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) đối với các quần thể MSC riêng biệt 8049356, 8049358, 8049359, 8049364, 8049365, 8049369, 8049370, 8049372, 8049373 và 8049384. Ngoại trừ 8049358, 8049359 và 8049370, mức tiết ra của tất cả các quần thể đều vượt quá giá trị ngưỡng đối với VEGF, là khoảng 100pg/mL và được thể hiện bởi đường màu đỏ.

Fig.3 thể hiện đánh giá tính ổn định của sự tiết xytokin ở quần thể MSC (8049372). Vì mục đích này, mức tiết ra của TGF- β , HGF, Ang-1 và VEGF, mỗi loại được xác định và so sánh trong hai mẫu riêng biệt của cùng một tập hợp sau-giai đoạn 4. Fig.3A thể hiện mức tiết ra của TGF- β trong hai mẫu riêng biệt cho thấy sự tiết protein ổn định là khoảng 2230 pg/mL và 2419 pg/mL sau-giai đoạn 4, tương ứng. Fig.3B thể hiện mức tiết ra của HGF trong hai mẫu riêng biệt cho thấy sự tiết protein ổn định là khoảng 933 pg/mL và 985 pg/mL sau-giai đoạn 4, tương ứng. Fig.3C thể hiện mức tiết ra của Ang-1 trong hai mẫu riêng biệt cho thấy sự tiết protein ổn định là khoảng 1800 pg/mL và 1854 pg/mL sau-giai đoạn 4, tương ứng. Fig.3D thể hiện mức tiết ra của VEGF trong hai mẫu riêng biệt cho thấy sự tiết protein ổn định là khoảng 210 pg/mL và 219 pg/mL sau-giai đoạn 4, tương ứng.

Fig.4 thể hiện các kết quả phân tích để nhận diện môi trường phù hợp để gây ra hoặc cải thiện các đặc tính làm lành vết thương của quần thể tế bào gốc trung mô. MSC thu được từ nhau thai, thạch Wharton (WJ- MSC) và màng ối của dây rốn, còn được gọi là MSC màng lót dây rốn (CL- MSC), được nuôi cấy trong môi trường khác thích hợp để nuôi cấy MSC (PTT4, PTT6 và DMEM/F12). Tiến hành phát hiện protein trong dịch nổi MSC và thực hiện phân tích nhờ sử dụng phần mềm Luminex 200 và Xponent. Fig.4A tóm tắt phép đo Ang-1. S1 thể hiện chuẩn cao nhất được dùng trong thử nghiệm. Bất kỳ mẫu nào ở trên được xem là ngoại suy (quá đặc). Đồ thị thể hiện rằng tất cả CL- MSC, WJ- MSC và MSC nhau thai tạo ra mức Ang-1 cao hơn nhiều khi được nuôi cấy trong PTT6 so với khi MSC được nuôi cấy trong PTT4 hoặc DMEM/F12. Fig.4B tóm tắt phép đo VEGF trong dịch nổi được phân tích của CL- MSC, WJ- MSC và MSC nhau thai được nuôi cấy trong PTT6, PTT4 hoặc DMEM/F12. S1 thể hiện chuẩn cao nhất được dùng trong thử nghiệm. Bất kỳ mẫu nào ở trên được xem là ngoại suy (quá đặc). Như có thể được thấy từ đồ thị, tất cả CL- MSC, WJ- MSC và MSC nhau thai tạo ra mức VEGF cao hơn nhiều khi được nuôi cấy trong PTT6 so với khi MSC được nuôi cấy trong PTT4 hoặc DMEM/F12. Fig.4C tóm tắt phép đo HGF. Đồ thị thể hiện rằng tất cả CL- MSC, WJ- MSC và MSC nhau thai tạo ra mức Ang-1 cao hơn nhiều khi được nuôi cấy trong PTT6 so với khi MSC được nuôi cấy trong PTT4 hoặc DMEM/F12. Fig.4D thể hiện phép đo singleplex (đo một protein đích) TGF- β 1. Như có thể được thấy từ đồ thị, tất cả CL- MSC, WJ- MSC và MSC nhau thai tạo ra nhiều TGF- β 1 hơn khi được nuôi cấy trong PTT6 so với khi được nuôi cấy trong DMEM/F12.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến một số phương pháp mà hoàn toàn phù hợp để xác nhận và/hoặc kiểm soát chất lượng cho các giai đoạn khác nhau của quy trình sản xuất theo GMP quần thể tế bào gốc trung mô cho mục đích sử dụng trong điều trị. Tất cả các phương pháp này sử dụng việc xác định trong môi trường mức của ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF được tiết vào môi trường bởi quần thể tế bào gốc trung mô.

Do đó, ngạc nhiên phát hiện ra rằng việc xác định mức tiết ra của Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF trong môi trường của quần thể MSC là tiêu chuẩn phù hợp cho một số khía cạnh trong quy trình sản xuất theo GMP quần thể MSC. Việc xác định mức tiết ra

của Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF trong môi trường trong đó quần thể MSC được nuôi cấy hoặc bảo quản, có thể được sử dụng để đánh giá khả năng làm lành vết thương của quần thể MSC, để nhận diện mô (của người cho) phù hợp làm vật liệu ban đầu để sản xuất quần thể MSC có khả năng làm lành vết thương thích hợp, để lựa chọn quần thể MSC để sản xuất cGMP, hoặc để lựa chọn quần thể MSC để sử dụng trong dược phẩm tiếp theo hoặc để tạo ra ngân hàng tế bào đầu dòng. Ngoài ra, việc xác định mức tiết ra của Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF có thể được dùng để nhận diện môi trường phù hợp để gây ra hoặc cải thiện các đặc tính làm lành vết thương của quần thể tế bào gốc trung mô.

Ở đây cần lưu ý rằng sự tham gia của Ang-1, TGF- β 1, VEGF và HGF trong quá trình làm lành vết thương là đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Đối với sự tham gia của Ang-1 (SEQ ID NO: 1) trong quá trình làm lành vết thương, xem, ví dụ, Li et al. *Stem Cell Research & Therapy* 2013, 4:113 “Mesenchymal stem cells modified with angiopoietin-1 gene promote wound healing” hoặc Bitto et al, “Angiopoietin-1 gene transfer improves the impaired wound healing of the genetically diabetic mice without increasing VEGF expression”, *Clinical Science* 14 tháng 5 năm 2008, 114 (12) 707-718. Trong nghiên cứu của Li et al, gen Ang-1 được chèn vào tế bào gốc trung mô của tủy xương và kết quả thể hiện là “*Ang1-MSc thúc đẩy đáng kể sự làm lành vết thương nhờ làm tăng sự tái tạo biểu bì và da, và tăng cường sự tạo mạch so với MSC, Ad-Ang1 hoặc xử lý giả.*” Đáng chú ý là, các tác giả Li và cộng sự nói rằng chỉ riêng MSC không tạo ra đủ Ang-1 và vì lý do này, các tác giả đã chèn gen Ang-1 vào MSC để tạo ra tế bào biến đổi gen.

Đối với sự tham gia của yếu tố tăng trưởng chuyên dạng Beta, bao gồm TGF- β 1 (SEQ ID NO: 2, TGF- β 2, và TGF- β 3, trong quá trình làm lành vết thương, cụ thể là làm lành vết thương mạn tính/không lành, xem, ví dụ, Ramirez et al. “The Role of TGF β Signaling in Wound Epithelialization” *Advances In Wound Care*, tập 3, số 7, 2013, 482-491 hoặc Pakyari et al., *Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing*, *Advances In Wound Care*, tập 2, số 5, 2012, 215-224.

Đối với sự tham gia của VEGF (SEQ ID NO: 3) trong quá trình làm lành vết thương, cụ thể là làm lành vết thương mạn tính /không-lành, xem ví dụ Froget et al., *Eur. Cytokine Netw.*, tập 14, tháng 3, 2003, 60–64 hoặc Bao et al., “The Role of Vascular

Endothelial Growth Factor in Wound Healing” J Surg Res. 15 tháng 5 năm 2009, 153(2): 347-358.

Quay lại với HGF (SEQ ID NO: 4) trong quá trình làm lành vết thương, cụ thể là làm lành vết thương mạn tính/không lành, xem ví dụ, Yoshida et al., “Neutralization of Hepatocyte Growth Factor Leads to Retarded Cutaneous Wound Healing Associated with Decreased Neovascularization and Granulation Tissue Formation” J. Invest. Dermatol. 120:335-343, 2003, Li, Jin-Feng et al. “HGF Accelerates Wound Healing by Promoting the Dedifferentiation of Epidermal Cells through β 1-Integrin/ILK Pathway.” BioMed Research International 2013 (2013): 470418 hoặc Conway et al, “Hepatocyte growth factor regulation: An integral part of why wounds become chronic”. Wound Rep Reg (2007) 15 683–692.

Khả năng làm lành vết thương có thể mô tả tiềm lực, khả năng, năng lực hoặc hiệu lực để tạo điều kiện hoặc đẩy nhanh quá trình làm lành vết thương. Theo sáng chế, quần thể MSC được xem là có đủ khả năng làm lành vết thương, ví dụ, hoặc mô được xem là phù hợp để phù hợp làm vật liệu ban đầu để sản xuất quần thể MSC phù hợp làm dược phẩm, nếu mức tiết ra (còn được gọi là nồng độ) của một, hai, ba hoặc cả bốn Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF là bằng hoặc cao hơn ngưỡng cụ thể đối với mỗi trong số các protein này như được xác định ở đây (cũng xem ví dụ 2). Do đó, việc đánh giá sự làm lành vết thương bao gồm xác định mức tiết ra của Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF và tiếp theo xác định liệu các giá trị ngưỡng cụ thể có đạt được hay bị vượt quá không. Việc đánh giá khả năng làm lành vết thương của quần thể MSC có thể được thực hiện trong các giai đoạn khác nhau của quá trình nuôi cấy MSC. Khả năng làm lành vết thương có thể được đánh giá trên mô một cách trực tiếp trước khi nuôi cấy MSC để nhận diện mô phù hợp làm vật liệu ban đầu để sản xuất quần thể MSC có khả năng làm lành vết thương và do đó có thể là phù hợp cho việc sử dụng làm dược phẩm tiếp theo. Để phù hợp cho ứng dụng dược phẩm, quần thể MSC có thể phải được sản xuất trong các điều kiện thực hành sản xuất tốt hiện tại (current Good Manufacturing Practice - cGMP). Do đó, việc xác định mức tiết ra của Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF trước khi sản xuất quần thể MSC có thể là phù hợp để chọn lọc quần thể MSC để sản xuất quần thể MSC trong các điều kiện cGMP. Hơn nữa, quần thể MSC có thể được lựa chọn để sử dụng trong dược phẩm tiếp theo bằng cách sử dụng các phương pháp mô tả ở đây.

Quần thể MSC được chọn theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để tạo ra ngân hàng tế bào đầu dòng (master cell bank). Trong ngữ cảnh này, quần thể MSC được chọn có thể còn được xác định đặc điểm thêm và kiểm tra tính toàn vẹn và chất gây nhiễm như vi khuẩn, nấm, mycoplasmas và virus trước khi bảo quản lạnh. Sau khi được tạo lập, ngân hàng tế bào đầu dòng MSC có thể cho phép mở rộng quần thể MSC cụ thể để tạo ra các mẫu cấy cho các quy trình sản xuất hoặc nghiên cứu sâu hơn bất cứ khi nào cần. Ví dụ, ngân hàng tế bào đầu dòng MSC bao gồm MSC có đặc tính làm lành vết thương có thể cho phép mở rộng quần thể MSC cụ thể có thể tiết lượng Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF lý tưởng để làm lành vết thương.

Mức tiết ra của Ang-1, TGF- β , VEGF và/r HGF được sử dụng làm tiêu chí chọn lọc trong phương pháp mô tả ở đây. Mức tiết ra bằng hoặc vượt quá ngưỡng có thể, ví dụ, cho biết (i) khả năng làm lành vết thương của quần thể MSC hoặc (ii) mô hoặc quần thể tế bào phân lập được là phù hợp làm vật liệu ban đầu để sản xuất quần thể MSC. Theo sáng chế, ngưỡng đối với Ang-1 có thể là khoảng 100 pg/mL, khoảng 200 pg/mL, khoảng 300 pg/mL, khoảng 400 pg/mL, khoảng 500 pg/mL, khoảng 600 pg/mL, khoảng 700 pg/mL, khoảng 800 pg/mL, khoảng 900 pg/mL hoặc khoảng 1000 pg/mL. Tốt hơn là, đối với Ang-1 ngưỡng là khoảng 500 pg/mL. Ngưỡng đối với TGF- β có thể là khoảng 100 pg/mL, khoảng 200 pg/mL, khoảng 300 pg/mL, khoảng 400 pg/mL, khoảng 500 pg/mL, khoảng 600 pg/mL, khoảng 700 pg/mL, khoảng 800 pg/mL, khoảng 900 pg/mL hoặc khoảng 1000 pg/mL. Tốt hơn là, đối với TGF- β ngưỡng là khoảng 500 pg/mL. Đối với VEGF, ngưỡng có thể là khoảng 80 pg/mL, khoảng 100 pg/mL, khoảng 120 pg/mL, khoảng 140 pg/mL, khoảng 160 pg/mL, khoảng 180 pg/mL hoặc khoảng 200 pg/mL, trong đó ngưỡng đối với VEGF tốt hơn là khoảng 100 pg/mL. Đối với HGF ngưỡng có thể là khoảng 80 pg/mL, khoảng 100 pg/mL, khoảng 120 pg/mL, khoảng 140 pg/mL, khoảng 160 pg/mL, khoảng 180 pg/mL hoặc khoảng 200 pg/mL. Tốt hơn là, đối với HGF ngưỡng là khoảng 100 pg/mL.

Trong một ví dụ của sáng chế, các (giá trị) mức ngưỡng sau được sử dụng:

- ngưỡng là khoảng 400 pg/mL đối với Angiopoietin 1 (Ang-1)
- ngưỡng là khoảng 400 pg/mL đối với yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β)

- ngưỡng là khoảng 80 pg/mL đối với yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF)
- ngưỡng là khoảng 80 pg/mL đối với yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF).

Trong một ví dụ khác của sáng chế, các (giá trị) mức ngưỡng sau được sử dụng:

- ngưỡng là khoảng 500 pg/mL đối với Angiopoietin 1 (Ang-1)
- ngưỡng là khoảng 500 pg/mL đối với yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β)
- ngưỡng là khoảng 100 pg/mL đối với yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF)
- ngưỡng là khoảng 100 pg/mL đối với yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF).

Trong hai ví dụ này, mức tiết ra của cả bốn protein bằng hoặc vượt quá giá trị ngưỡng tương ứng của chúng về mức tiết ra/nồng độ (xem ví dụ 2) để, ví dụ, coi quần thể MSC có các đặc tính làm lành vết thương phù hợp hay để coi mô là vật liệu ban đầu phù hợp để sản xuất quần thể MSC phù hợp cho dược phẩm. Ở đây cần lưu ý là các nồng độ được xác định theo sáng chế và do đó các mức ngưỡng tốt hơn là các nồng độ tuyệt đối.

Quần thể MSC phù hợp trong dược phẩm bất kỳ có thể được sử dụng theo sáng chế. Do đó, quần thể MSC có thể thu được từ bất kỳ mô hoặc ngăn/bộ phận cơ thể của động vật có vú đã biết có chứa MSC. Trong các ví dụ minh họa, quần thể MSC có thể là quần thể MSC của dây rốn, quần thể MSC của nhau thai, quần thể MSC của chỗ nối dây rốn - nhau thai, quần thể MSC của máu cuống rốn, MSC của tủy xương, hoặc quần thể MSC thu được từ mô mỡ. Quần thể MSC của dây rốn có thể thu được từ bất kỳ khoang của mô dây rốn mà chứa MSC như màng ối, quần thể MSC quanh mạch, quần thể MSC của thạch Wharton, quần thể MSC của màng ối của dây rốn mà cả quần thể MSC trộn lẫn của dây rốn, có nghĩa là quần thể MSC mà bao gồm tế bào gốc của hai hoặc nhiều trong số các khoang này. MSC của các khoang này và việc phân lập chúng từ đó là đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực và được mô tả, ví dụ, bởi Subramanian et al “Comparative Characterization of Cells from the Various Compartments of the Human Umbilical Cord Shows that the Wharton’s Jelly Compartment Provides the Best Source of Clinically Utilizable Mesenchymal Stem Cells”, PLoS ONE 10(6): e0127992, 2015 và

các tài liệu được trích dẫn trong đó, Van Pham et al. "Isolation and proliferation of umbilical cord tissue derived mesenchymal stem cells for clinical applications", Cell Tissue Bank (2016) 17:289-302, 2016. Quần thể MSC trộn lẫn của dây rốn có thể, ví dụ, thu được bằng cách loại bỏ các động mạch và tĩnh mạch ra khỏi mô dây rốn, cắt phần mô còn lại và thạch Wharton thành các miếng nhỏ và nuôi cấy mô dây rốn (bằng cách nuôi cấy mô bên ngoài) trong môi trường nuôi cấy theo sáng chế. Quần thể MSC trộn lẫn của dây rốn cũng có thể thu được bằng cách nuôi cấy toàn bộ mô dây rốn có các mạch rốn còn nguyên vẹn làm các mẫu cấy mô trong các điều kiện (nuôi cấy trong DMEM có bổ sung huyết thanh- với 10% huyết thanh bào thai bò, 10% huyết thanh ngựa, và 1% Penicillin/Streptomycin) như được mô tả bởi Schugar et al. "High harvest yield, high expansion, and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue. Journal of biomedicine & biotechnology. 2009; 2009:789526". Trong ngữ cảnh này, cần lưu ý rằng quần thể MSC của chỗ nối dây rốn - nhau thai có thể được phân lập như được mô tả bởi Beeravolu et al. "Isolation and Characterization of Mesenchymal Stromal Cells from Human Umbilical Cord and Fetal Placenta." J Vis Exp. 2017; (122): 55224. Trong các ví dụ của sáng chế, quần thể MSC nếu thu được từ dây rốn hoặc màng ối của dây rốn (xem ví dụ 1-4). Quần thể MSC của màng ối của dây rốn có thể được xác định ở mức độ cao và đồng nhất. Do đó, theo một phương án của sáng chế, quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả trong đơn sáng chế quốc tế WO 2018/067071 được sử dụng. Do đó, trong các ví dụ điển hình về phương pháp này, 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 MSC biểu hiện các dấu chuẩn sau đây: CD73 (SEQ ID NO. 5), CD90 (SEQ ID NO. 6) và CD105 (SEQ ID NO. 7). Ngoài ra, trong các ví dụ này 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 MSC có thể không biểu hiện các dấu chuẩn sau đây: CD34 (SEQ ID NO. 8), CD45 (SEQ ID NO. 9) và HLA-DR (SEQ ID NO. 10). Trong các ví dụ cụ thể, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn, hoặc khoảng 99% hoặc nhiều hơn của quần thể MSC biểu hiện CD73,

CD90 và CD105 trong khi không biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR. Trong các ví dụ ưu tiên, 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% hoặc nhiều hơn tế bào của quần thể MSC biểu hiện mỗi trong số CD73, CD90 và CD105 trong khi 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 của MSC có thể không biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR. Trong các ví dụ cụ thể, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn, hoặc khoảng 99% hoặc nhiều hơn của quần thể MSC biểu hiện CD73, CD90 và CD105 trong khi không biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR.

Theo sáng chế, mức của Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF thường được xác định trong dịch nổi của môi trường mà trong đó quần thể MSC được bảo quản, được vận chuyển hoặc được nuôi cấy. Quần thể MSC có thể được bảo quản trong một khoảng thời gian dài hoặc ngắn. Các ví dụ về môi trường bảo quản trong thời gian dài bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở glyxerol và trehaloza, cho phép bảo quản ở nhiệt độ khoảng -80°C , hoặc chất bảo vệ đông lạnh như dimethylsulfoxit (DMSO), cho phép bảo quản ở nhiệt độ khoảng -195°C . Việc bảo quản trong thời gian ngắn có thể bao gồm vận chuyển vị trí sử dụng (chẳng hạn phòng khám của bác sĩ hoặc bệnh viện) và/hoặc bảo quản trong thời gian cho đến khi quần thể MSC sẽ được sử dụng cho đối tượng. Tá được HypoThermosol® là một ví dụ minh họa cho môi trường bảo quản trong thời gian ngắn. Môi trường bảo quản này là phù hợp cho việc vận chuyển, cho phép bảo quản MSC ở nhiệt độ trong khoảng 2 đến 8°C . Một ví dụ khác về môi trường thích hợp cho việc vận chuyển là Plasmalyt. Các ví dụ về môi trường phù hợp cho việc nuôi cấy MSC có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở môi trường có bán sẵn trên thị trường như CTS StemPro MSC SFM, môi trường MesenPRO RS, StemPro MSC SFM XenoFree. Trong một ví dụ của sáng chế, môi trường nuôi cấy tế bào MSC có thể là môi trường nuôi cấy PTT6 được mô tả trong đơn sáng chế quốc tế WO 2018/067071. Theo bản mô tả của đơn sáng chế quốc tế WO 2018/067071, môi trường nuôi cấy tế bào MSC do đó có thể bao gồm môi trường eagle do Dulbecco cải tiến (Dulbecco's modified eagle medium - DMEM), môi trường F12 của Ham (F12), môi trường cơ bản không chứa huyết thanh

như M171 và huyết thanh bào thai bò (FBS). Do đó, trong một ví dụ, môi trường có thể bao gồm DMEM ở nồng độ cuối là khoảng 55 đến 65% (thể tích/thể tích), F12 ở nồng độ cuối là khoảng 5 đến 15% (thể tích/thể tích), M171 ở nồng độ cuối là khoảng 15 đến 30% (thể tích/thể tích) và FBS ở nồng độ cuối là khoảng 1 đến 8% (thể tích/thể tích). Giá trị “% (thể tích/thể tích)” như được sử dụng ở đây chỉ thể tích của từng thành phần đơn lẻ so với thể tích cuối của môi trường. Điều này có nghĩa là, nếu DMEM, ví dụ, có mặt trong môi trường, thì nồng độ cuối là khoảng 55 đến 65% (thể tích/thể tích), 1 lít môi trường chứa khoảng 550 đến 650 mL DMEM. Trong các ví dụ khác, môi trường có thể chứa DMEM ở nồng độ cuối là khoảng 57,5 đến 62,5% (thể tích/thể tích), F12 ở nồng độ cuối là khoảng 7,5 đến 12,5% (thể tích/thể tích), M171 ở nồng độ cuối là khoảng 17,5 đến 25,0% (thể tích/thể tích) và FBS ở nồng độ cuối là khoảng 1,75 đến 3,5% (thể tích/thể tích). Trong các ví dụ khác, môi trường có thể chứa DMEM ở nồng độ cuối là khoảng 61,8% (thể tích/thể tích), F12 ở nồng độ cuối là khoảng 11,8% (thể tích/thể tích), M171 ở nồng độ cuối là khoảng 23,6% (thể tích/thể tích) và FBS ở nồng độ cuối là khoảng 2,5% (thể tích/thể tích). Ngoài các thành phần được đề cập trên đây, môi trường có thể chứa các chất bổ sung mà có lợi cho việc nuôi cấy MSC. Theo sáng chế, môi trường nuôi cấy MSC có thể, ví dụ, bao gồm yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF). Nếu có, EGF có thể có mặt trong môi trường nuôi cấy ở nồng độ cuối là khoảng 1 ng/mL đến khoảng 20 ng/mL. Trong một số trong các ví dụ này, môi trường nuôi cấy có thể bao gồm EGF ở nồng độ cuối là khoảng 10ng/mL. Môi trường nuôi cấy theo sáng chế có thể còn bao gồm insulin. Nếu có, insulin có thể có mặt ở nồng độ cuối là khoảng 1 μ g/mL đến 10 μ g/mL. Trong một số trong các ví dụ này, môi trường nuôi cấy có thể bao gồm Insulin ở nồng độ cuối là khoảng 5 μ g/mL. Môi trường nuôi cấy có thể còn bao gồm ít nhất một trong số các chất bổ sung sau: adenin, hydrocortison, và muối natri của 3,3',5-Triiodo-L-thyronin (T3). Trong các ví dụ này, môi trường nuôi cấy có thể bao gồm cả ba loại adenin, hydrocortison, và muối natri của 3,3',5-Triiodo-L-thyronin (T3). Trong các ví dụ này, môi trường nuôi cấy có thể bao gồm adenin ở nồng độ cuối là khoảng 0,05 đến khoảng 0,1 μ g/mL adenin, hydrocortison ở nồng độ cuối là khoảng 1 đến khoảng 10 μ g/mL hydrocortison và/hoặc muối natri của 3,3',5-Triiodo-L-thyronin (T3) ở nồng độ cuối là khoảng 0,5 đến khoảng 5 ng/mL. Trong ngữ cảnh này, cần lưu ý rằng bằng cách nuôi cấy quần thể MSC trong môi trường như được mô tả ở đây, việc biểu hiện và/hoặc

tiết ra của ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF có thể được gia tăng.

Theo phương pháp của sáng chế, có thể cần đưa môi trường vào ly tâm để xác định nồng độ của Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF trong môi trường mà chứa MSC, thường là sau một khoảng thời gian thích hợp. Trong ngữ cảnh này, khoảng thời gian thích hợp có thể là khoảng thời gian ủ bất kỳ (nếu quần thể tế bào, ví dụ được bảo quản, hoặc được vận chuyển trong môi trường bảo quản hoặc vận chuyển chẳng hạn Hypothermosol) hoặc khoảng thời gian nuôi cấy (nếu quần thể tế bào được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy) là phù hợp để quần thể MSC tiết ra các protein với lượng có thể xác định được. Trong một ví dụ minh họa, khoảng thời gian phù hợp có thể là khoảng thời gian ủ hoặc nuôi cấy là khoảng 6 giờ, khoảng 12 giờ, khoảng 18 giờ, khoảng 24 giờ, khoảng 30 giờ, khoảng 36 giờ, khoảng 42 giờ, khoảng 46 giờ, khoảng 48 giờ, khoảng 50 giờ hoặc khoảng 54 giờ. Sau khi ly tâm, phần dịch nổi của môi trường đã ly tâm có thể được đưa vào thử nghiệm miễn dịch để xác định mức/nồng độ của các protein được tiết ra. Thử nghiệm miễn dịch bất kỳ phù hợp để phát hiện một hoặc nhiều protein được tiết ra trong môi trường có thể được áp dụng trong sáng chế. Các ví dụ minh họa về các thử nghiệm miễn dịch phù hợp để phát hiện protein trong môi trường là thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết với enzym (Enzyme-linked Immunosorbent Assay - ELISA) hoặc thử nghiệm singleplex (thử nghiệm phát hiện một protein đích). Các thử nghiệm singleplex (có bán sẵn trên thị trường, ví dụ, của hãng BioVendor, Brno, Czech Republic với tên thương mại Q-Plex hoặc của hãng R&D Systems Inc, Minneapolis, USA) có thể được thực hiện bằng cách đặt hai đốm chứa các kháng thể bắt giữ trong một dãy xác định vào đáy của mỗi giếng của đĩa ELISA 96 giếng (ngoài đốm thử nghiệm, đốm thứ hai là đốm đối chứng dương để đảm bảo quy trình thử nghiệm đúng). Một ví dụ về thử nghiệm thích hợp mà phát hiện nhiều protein trong môi trường là thử nghiệm multiplex. Trong thử nghiệm multiplex, nhiều chất phân tích có thể được cố định trên một bề mặt rắn chẳng hạn đĩa ELISA, mà tách biệt các chất phân tích về mặt không gian. Theo cách khác, thử nghiệm multiplex cũng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các chất phân tích mà đã được cố định trên các hạt (bead) hoặc hạt (particle). Trong trường hợp như vậy, các thử nghiệm đối với mỗi chất phân tích sử dụng các hạt/hạt khác nhau. Trong các ví dụ minh họa, thử nghiệm multiplex trên cơ sở hạt có thể được sử dụng để phát hiện Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF được tiết ra trong môi trường (xem ví dụ 1 và ví dụ 4). Các hệ thống thử nghiệm

multiplex để phát hiện và định lượng đồng thời nhiều chất phân tích đích trong các mẫu phức tạp chẳng hạn môi trường nuôi cấy tế bào có bán sẵn trên thị trường, ví dụ, của hãng R&D Systems Inc, Minneapolis, USA là Luminex® Assays và Luminex® High Performance Assays.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF để đánh giá khả năng làm lành vết thương của quần thể MSC. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất việc sử dụng ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF để chọn lọc quần thể MSC để sản xuất quần thể tế bào gốc theo các điều kiện cGMP. Do đó, sáng chế đề xuất việc sử dụng ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF để chọn lọc quần thể MSC để sản xuất quần thể tế bào gốc để sử dụng trong dược phẩm tiếp theo. Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF để chọn lọc quần thể MSC để tạo ra ngân hàng tế bào đầu dòng (master cell bank).

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất việc sử dụng ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF để chọn lọc quần thể MSC để nhận diện mô phù hợp làm vật liệu ban đầu để sản xuất quần thể MSC để sử dụng trong dược phẩm. Theo sáng chế, mô này có thể là mô hoặc khoang/bộ phận cơ thể bất kỳ của động vật có vú đã biết là chứa MSC. Ví dụ về các mô này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở tủy xương, mô mỡ, mô nhau thai, mô của chỗ nối dây rốn - nhau thai, mô dây rốn như thạch Wharton, màng ối của dây rốn, chỉ một số mô được kể tên ở đây được biết là nguồn cung cấp mô cho MSC. Trong một ví dụ, mô là dây rốn hoặc màng ối của dây rốn và quần thể MSC được tạo ra từ đó có thể là quần thể MSC của màng ối của dây rốn.

Để xác định xem một mô, ví dụ, từ một người cho cụ thể là phù hợp làm vật liệu ban đầu để sản xuất quần thể MSC để sử dụng trong dược phẩm hay không, mô này có thể, ví dụ, được nuôi cấy trực tiếp làm các mẫu mô cấy. Đối với mẫu mô cấy này, một mẫu của mô tương ứng (ví dụ, thạch Wharton, màng ối nhau thai hoặc màng ối của dây rốn) có thể được đặt trong đĩa nuôi cấy mô và được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy/sinh trưởng phù hợp như được mô tả ở đây (cũng xem patent Mỹ 9,085,755, hoặc 9,737,568 về vấn đề này). Sau đó, sẽ xuất hiện sự phát triển của tế bào từ mô này (sự di chuyển của các MSC ra bên ngoài mô lên bề mặt của đĩa nuôi cấy) sau một khoảng thời

gian nuôi cấy phù hợp và sau đó môi trường nuôi cấy có thể được phân tích về sự tiết ra của Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF. Theo cách khác, trước tiên, quần thể MSC có thể được phân lập từ mô đã chọn bằng cách sử dụng phương pháp phân lập đã biết và quần thể MSC được phân lập sau đó có thể được nuôi cấy trong môi trường phù hợp và được kiểm tra về sự tiết ra của Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF. Độc lập với mô, việc sử dụng Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF cho các phương pháp được mô tả ở đây có thể bao gồm bước xác định trong môi trường ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba hoặc cả bốn protein được tiết vào môi trường bởi quần thể MSC hoặc bởi mẫu mô hoặc bởi tế bào được phân lập từ mẫu mô.

Sáng chế còn đề xuất đến phương pháp nhận diện môi trường phù hợp để gây ra hoặc cải thiện các đặc tính làm lành vết thương của quần thể tế bào gốc trung mô. Phương pháp này còn bao gồm việc xác định mức của ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF được tiết vào môi trường nuôi cấy tế bào bởi quần thể MSC. Do đó, sáng chế còn đề xuất việc sử dụng ít nhất một protein để nhận diện môi trường phù hợp để gây ra hoặc cải thiện các đặc tính làm lành vết thương của tế bào gốc trung mô. Việc sử dụng này có thể bao gồm xác định trong môi trường nuôi cấy tế bào mức của ít nhất hai, ít nhất ba hoặc cả bốn protein được chọn từ nhóm bao gồm Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF được tiết vào môi trường nuôi cấy tế bào bởi quần thể tế bào gốc trung mô.

Sáng chế sẽ được minh họa chi tiết hơn nhờ các ví dụ thử nghiệm không giới hạn sau đây.

Các trình tự polypeptit được bộc lộ ở đây được mô tả trong bảng 1.

SE Q ID NO	Polypeptit	Trình tự

SE Q ID NO	Polypeptit	Trình tự
1	Ang-1 của người Số Uniprot: Q15389 Phiên bản số 2 từ ngày 1 tháng 1 năm 1998	MTVFLSFAFLAAILTHIGCSNQRRSPENSGRRYNRIQHGCQA YTFILPEHDGNCRESTTDQYNTNALQRDAPHVEPDFSSQKLQ HLEHVMENYTQWLQKLENYIVENMKSEMAQIQQNAVQNH TATMLEIGTSLLSQTAEQTRKLTDVETQVLNQTSRLEIQLLN SLSTYKLEKQLLQQTNEILKIHEKNSLLEHKILEMEGKHKEEL DTLKEEKENLQGLVTRQTYIIQELEKQLNRATTNNSVLQKQQ LELMDTVHNLVNLCTKEGVLLKGGKREEEKPFRCADVYQ AGFNKSGIYTIYINNMPEPKKVFCNMDVNGGGWTVIQHRED GSLDFQRGWKEYKMGFGNPSGEYWLGNFIFAITSQRQYML RIELMDWEGNRAYSQYDRFHIGNEKQNYRLYLKGTGTAG KQSSLILHGADFSTKDADNDNCMCKCALMLTGGWWFDAC GPSNLNGMFYTAGQNHGKLNLIKWHYFKGPSYSRSTTMMI RPLDF
2	TGFbeta1 của người Số Uniprot: P36897 Phiên bản số 1 từ ngày 1 tháng 6 năm 1994	MEAAVAAPRPRLLLLVLAAAAAALLPGATALQCFCHL CTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRP FVCAPSSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPVE LAAVIAGPVCFVCISLMLMVYICHNRTVIHHRVPNEEDPSLD RPFISEGTTLKDLIYDMTTSGSGSGLPLLVQRTIARTIVLQESI GKGRFGEVWRGKWRGEEVAVKIFSSREERSWFREAIEYQTV MLRHENILGFIAADNKDNGTWTQLWLVSDYHEHGSFLDYL NRYTVTVEGMIKLALSTASGLAHLHMEIVGTQGGKPAIAHRD LKSKNILVKKNGTCCADLGLAVRHDSATDTIDIAPNHRVGT KRYMAPEVLDDSDINMKHFESFKRADIYAMGLVFWEIARRCSI GGIHEDYQLPYDDLVPSPSVEEMRKVVCEQKLRPNIPNRW QSCEALRVMKIMRECWYANGAARLTALRIKKTLSQLSQQE GIKM

SE Q ID NO	Polypeptit	Trình tự
3	VEGFA của người Số Uniprot: P15692 Phiên bản số 2 từ ngày 19 tháng 11 năm 2001	MNFLLSVHWSLALLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHE VVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYYPDEIEYIFKPSCVPLMR CGGCCNDEGLECVPTTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQ HNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKKGKQKRKRKKSRYKSW SVYVGARCCCLMPWSLPGPHPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKC SCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR
4	HGF của người Số Uniprot: P14210 Phiên bản số 2 từ ngày 1 tháng 8 năm 1991	MWVTKLLPALLLQHVLHLLLPIAIPYAEGQRKRNTIHEF KKSATTLIKIDPALKIKTKKVNTADQCANRCTRNKGLPFTC KAFVFDKARKQCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDLYENKDYI RNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRG KDLQENYCRNPRGEEGPPWCFTSNPEVRYEVC DIPQCSEVE CMTNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQTTPHRHKFLPERYP DKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADN TMNDTDVPLETTECIQGQGEYRGTVNTIWNIGIPCQRWDSQ YPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPDGSESPWCFTTDPNIR VGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNNGKNYMGNLSQTRSGLTCS MWDKNMEDLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPPWC YTG NPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVNLDHPVISCAKTKQLRV VNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFP SRDLKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPESG DLVLMKLARPAVLDDFVSTIDLPNYGC TPIPEKTSCSVYGGW YTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNESEICA GAEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHKMRMVLGVIVPGRGCAIP NRPGIFVRVAYYAKWIHKIILTYKVPQS

SE Q ID NO	Polypeptit	Trình tự
5	CD73 số nhận dạng P21589 của Uniprot, phiên bản số 1 từ ngày 1 tháng 5 năm 1991:	MCPRAARAPATLLLALGAVLWPAAGA WELTILHTNDVHSR LEQTSSEDSSKCVNASRCMGGVARLFTKVQQIRRAEPNVLLL DAGDQYQGTWFTVYKGAEV AHFMNALRYDAMALGNHEF DNGVEGLIEPLLKEAKFPILSANIKAKGPLASQISGLYLPYKV LPVGDEVVGVGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEITALQPEVDK LKTLNVNKIIALGHSGFEMDKLIAQKVRGVDVVVGGHSNTF LYTGNPPSKEVPAGKYPFIVTSDDGRRKVPVVQAYAFGKYL YLKIEFDERGNVISSHGNPILLNSSIPEDPSIKADINKWRIKLD NYSTQELGKTIVYLDGSSQSCRFRECNMGNLICDAMINNNLR HTDEMFWNHVSMCILNGGGIRSPIDERNNGTITWENLAAVL PFGGTFDLVQLKGSTLKKAFEHSVHRYGQSTGEFLQVGGIH VVYDLSRKPGDRVVKLDVLCTKCRVPSYDPLKMDEVYKVVIL PNFLANGGDGFQMIKDELLRHDSGDQDINVVSTYISKMKVIY PAVEGRIKFSTGSHCHGSFSLIFLSLWAVIFVLYQ
6	CD90 số nhận dạng P04216 của Uniprot, phiên bản số 2 từ ngày 2 tháng 5 năm 2002:	MNLAISIALLLTVLQVSRGQKVTSLTACLVDQSLRLDCRHN TSSSPIQYEFSLTRETKKHVLFGTVGVPEHTYRSRTNFTSKYN MKVLYLSAFTSKDEGTYTCALHHS GHSPPISSQNVTVLRDKL VKCEGISLLAQNTSWLLLLLLSLSLLQATDFMSL
7	CD105 số nhận dạng P17813 của Uniprot, phiên bản số	MDRGTLPLAVALLASC SLSP TSAETVHCDLQPVGPERGEV TYTTSQVSKGCVAQAPNAILEVHVLFLEFPTGPSQLELTLQA SKQNGTWPREVLLVLSVNSSVFLHLQALGIPLHLAYNSSLVT FQEPPGVNTELPSPKTOILEWAAERGPITSA AELNDPQSILL RLGQAQGSLSFCMLEASQDMGRTLEWRPRTPALVRGCHLE

SE Q ID NO	Polypeptit	Trình tự
	2 từ ngày 15 tháng 7 năm 1998:	GVAGHKEAHILRVLPGHSAGPRTVTVKVELSCAPGDLDVAVL ILQGPPYVSWLIDANHNMQIWTTGEYSFKIFPEKNIRGFKLPD TPQGLLGEARMLNASIVASFVELPLASIVSLHASSCGGRLQTS PAPIQTTPPKDTCPELLMSLIQTKCADDAMTLVLKKELVAH LKCTTTGLTFWDPSCEAEDRGDKFVLRSAISSCGMQVSASMI SNEAVVNILSSSSPQRKKVHCLNMDLSFQLGLYLSPHFLQA SNTIEPGQQSFVQVRVSPSVSEFLLQLDSCHLDLGPEGGTVEL IQGRAAKGNCVSLLSPEGDPRFSFLLHFYTVPIPKTGTLSCT VALRPKTGSQDQEVHRTVFMRLNIISPDLSGCTSKGLVLPVAV LGITFGAFLIGALLTAALWYTYSHTRSPSKREPVVAVAAPASS ESSSTNHSIGSTQSTPCSTSSMA
8	CD34 số nhận dạng P28906 của Uniprot, phiên bản số 2 từ ngày 15 tháng 7 năm 1998:	MLVRRGARAGPRMPRGWTALCLLSLLPSGFMSLDNNGTAT PELPTQGTFNSVSTNVSQYQETTTTPSTLGSTSLHPVVSQHGNEAT TNITETTVKFTSTSVITSVYGNTNSSVQSQTSVISTVFTTPANV STPETTLKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATSPTKPYTSSSPILSDIK AEIKCSGIREVKLTQGICLEQNKTSSCAEFKKDRGEGLARVL CGEEQADADAGAQVCSLLLAQSEVRPQCLLVLANRTEISSK LQLMKKHQSCLKKLGILDFTEQDVASHQSYSQKTLIALVTSG ALLAVLGITGYFLMNRRSWSPTGERLGEDPYYTENGGGQGY SSGPGTSPEAQGKASVNRGAQENGTGQATSRNGHSARQHV VADTEL
9	CD45 số nhận dạng P08575 của Uniprot, phiên bản số 2 từ ngày 19	MYLWLKLLAFGFAFLDTEVFVTGQSPTSPSTGLTTAKMPSVP LSSDPLPHTTAFSPASTFERENDFSETTTSLSPDNTSTQVSPD SLDNASAFNTTGVSSVQTPHLPHTHADSQTPSAGTDTQTFSGS AANAALNPTPGSNAISDVPGERSTASTFPTDPVSPLTTTSLA HHSSAALPARTSNTTITANTSDAYLNASETTTSLSPSGSAVIST TTIATTPSKPTCDEKYANITVDYLYNKETKLFTAKLNVNENV

SE Q ID NO	Polypeptit	Trình tự
	tháng 7 năm 2003:	<p>ECGNNTCTNNEVHNLTECKNASVSISHNSCTAPDKTLILDVP PGVEKFQLHDCTQVEKADTTICLKWKNIETFTCDTQNITYRF QCGNMIFDNKEIKLENLEPEHEYKCDSEILYNNHKFTNASKII KTDFGSPGEPQIIFCRSEAAHQGVITWNPPQRSFHNFTLCYIK ETEKDCLNLDKNLIKYDLQNLKPYTKYVLSLHAYIIAKVQRN GSAAMCHFTTKSAPPSQVWNMTVSMTSDNSMHVKCRPPRD RNGPHERYHLEVEAGNTLVRNESHKNCDFRVKDLQYSTDY TFKAYFHNGDYPGEPFILHHSTSYNKALIAFLAFLIIVTSIAL LVVLYKIYDLHKKRSCNLDEQQELVERDDEKQLMNVEPIHA DILLETYKRKIADEGRLFLAEFQSIPRVFSKFPIKEARKPFNQN KNRYVDILPYDYNRVELSEINGDAGSNYINASYIDGFKEPRK YIAAQGPRDETVDDFWRMIWEQKATVIVMVTRCEEGRNK CAEYWPSMEEGTRAFGDVVVKINQHKRCPDYIIQKLNIVNK KEKATGREVTHIQFTSWPDHGVPEDPHLLLKLRRRVNAFSNF FSGPIVVHCSAGVGRTGTYYIGIDAMLEGLEAENKVDVYGYV VKLRRQRCLMVQVEAQYILIHQALVEYNQFGETEVNLSELH PYLHNMKKRDPPEPSPLEAEFQRLPSYRSWRTQHIGNQEEN KSKNRNSNVIPYDYNRVPLKHELEMSKESEHDSDESSDDDS DSEEPSKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMIF QRKVKVIVMLTELKHGDQEICAQYWGEKQTYGDIEVDLK DTDKSSTYTLRVFELRHSKRKDSRTVYQYQYTNWSVEQLPA EPKELISMIQVVKQKLPQKNSSEGNKHHKSTPLLIHCRDGSQ QTGIFCALLNLLESAETEEVVDIFQVVKALRKARPGMVSTFE QYQFLYDVIASSTYPAQNGQVKKNNHQEDKIEFDNEVDKVK QDANCVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSVNGP ASPALNQGS</p>
10	HLA-DR số	MAISGVPVLGFFIIAVLMSAQESWAIKEEHVIIQAEFYLNPDQ

SE Q ID NO	Polypeptit	Trình tự
	nhận dạng P01903 của Uniprot, phiên bản số 1 từ ngày 21 tháng 7 năm 1986:	SGEFMFDFDGD E I F H V D M A K K E T V W R L E E F G R F A S F E A Q G A L A N I A V D K A N L E I M T K R S N Y T P I T N V P P E V T V L T N S P V E L R E P N V L I C F I D K F T P P V V N V T W L R N G K P V T T G V S E T V F L P R E D H L F R K F H Y L P F L P S T E D V Y D C R V E H W G L D E P L L K H W E F D A P S P L P E T T E N V V C A L G L T V G L V G I I G T I F I I K G V R K S N A A E R R G P L

Bảng 1

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Nhận diện dây rốn chứa MSC phù hợp, đánh giá và chọn lọc quần thể MSC thu được từ dây rốn để tạo ra được phẩm phù hợp để làm lành vết thương.

MSC có nguồn gốc từ mô dây rốn tươi được thu gom tại bệnh viện của Trường đại học Colorado (University of Colorado Hospital).

Giai đoạn 1: Ngân hàng mô

Trong bước thứ nhất, dây rốn được thu gom, thường là sau khi nhận được sự đồng ý của Hội đồng đạo đức (Institutional Review Board - IRB) từ người hiến mô. Dây rốn tươi sau khi được thu gom được cắt thành các phần 1 đến 2 mm³, được làm đông lạnh ở tốc độ có kiểm soát trong các lọ nhỏ chứa 4 đến 5 mảnh và được bảo quản cách ly ở pha hơi của nitơ lỏng (liquid nitrogen - LN₂) ở -196°C (xem Fig.1). Các mẫu máu của người mẹ, được thu gom trong vòng 7 ngày sau khi sinh, được sàng lọc về các bệnh lây nhiễm và các mô được kiểm tra về sự nhiễm khuẩn. Các tiêu chí được đưa ra trong quy trình cho giai đoạn 1 bao gồm bệnh lây nhiễm âm tính ở tất cả các xét nghiệm ngoại trừ CMV, âm tính về độ vô trùng, và bảng câu hỏi của người mẹ được chấp nhận. Mặc dù các dây rốn thường bị nhiễm tự nhiên hệ vi khuẩn âm đạo trong quá trình sinh nở, việc thu gom trong các chất kháng sinh sẽ làm cho một phần trong chúng vô trùng. Có đến 100 mẫu dây rốn

có thể được thu gom trong một ngân hàng mô như vậy. Các mô vô trùng sẽ được sử dụng trong giai đoạn 2.

Giai đoạn 2: Phát triển các mẫu nuôi cấy

Các mẫu cấy phát triển là các sản phẩm mọc lên từ các mô rốn được sử dụng để tạo ra các dòng MSC thuần khiết. 10 miếng mô được đặt riêng biệt trong đĩa 6 giếng và được nhân giống trong khoảng 10-20 ngày để tạo ra các tế bào ở lần cấy truyền thứ 0 (Passage 0 - P0). Các tế bào P0 được cấy trong bình 175 cm² và được nuôi cấy để thu được tế bào cấy truyền lần 1 (P1). Các tế bào P1 được đóng băng ở $1-3 \times 10^6$ tế bào/ lọ nhỏ trong CryoStor 5 hoặc được cấy giống để nuôi cấy. Các tế bào cấy truyền lần 1 được cấy giống ở $2-3 \times 10^5$ tế bào/bình 175 cm². Trong quá trình cấy truyền, ghi lại hình thái tế bào. Tế bào từ lần cấy truyền 2 (P2) được đánh giá bằng phương pháp trắc lưu tế bào về các dấu chuẩn MSC, và các dịch nổi được đánh giá về sự sản sinh xytokin. Chi tiết hơn, các tế bào P2 được đưa vào phân tích multiplex (R&D Systems/Bio-technie catalô # LXSAHM) với các chất phân tích sau Ang-1, VEGF, HGF và tiến hành thử nghiệm singleplex với TGF- β . Thử nghiệm này được thực hiện như sau:

Thử nghiệm Multiplex:

(i) Mẫu chuẩn được chuẩn bị bằng cách kết hợp 100 μ L mỗi mẫu chuẩn vào một ống vi ly tâm đã chứa sẵn một thể tích thích hợp của môi trường đầy đủ PTT6 để tạo ra tổng thể tích đến 1000 μ L. Mẫu chuẩn S1 chứa tất cả các mẫu chuẩn multiplex được kết hợp với nhau trong một lọ nhỏ. Để tạo ra độ pha loãng 3 lần của S1, 200 μ L của môi trường PTT6 đầy đủ được hút bằng pipet vào mỗi trong năm ống polypropylen 1,5mL được gắn nhãn S2-S6. Sau đó, 100 μ L được chuyển từ S1 sang S2. Sau khi xoáy trộn, 100 μ L được chuyển từ S2 sang S3. Quy trình này được tiếp tục cho đến S6. Môi trường PTT6 đầy đủ được dùng là mẫu trắng.

(ii) Chuẩn bị các hạt bằng cách xoáy trộn nhẹ nhàng để tạo huyền phù lại. Quan trọng là phải cẩn thận để không đảo ngược lọ. Nếu sử dụng toàn bộ đĩa, 500 μ L hạt được kết hợp với 5,0mL RD2-1 pha loãng. Nếu sử dụng ít giếng hơn, điều chỉnh các thể tích cho phù hợp. Lọ hoặc các giếng được bảo vệ khỏi ánh sáng.

(iii) Nếu cần: chuẩn bị mẫu. Tất cả các mẫu được sử dụng không được pha loãng trừ khi nồng độ mẫu vượt quá giá trị mẫu chuẩn cao nhất (S1). Trong trường hợp như

vậy, thử nghiệm được lặp lại với mẫu được pha loãng thích hợp. Để pha loãng PTT6 được sử dụng. Tất cả các mẫu được đo ba lần.

(iv) Các hạt được xoay trộn nhẹ nhàng trước khi thêm 50 μ L vào mỗi giếng bằng cách sử dụng pipet nhiều kênh và đồ chứa.

(v) 50 μ L mẫu chuẩn hoặc mẫu được thêm vào mỗi giếng. Sau đó, bọc đĩa bằng màng bọc đĩa và ủ tránh ánh sáng trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng (room temperature - RT) trên máy lắc quỹ đạo ở tốc độ 800 vòng/phút.

(vi) Trong quá trình ủ mẫu, dung dịch hỗn hợp biotin và kháng thể (Biotin Antibody Cocktail) được chuẩn bị bằng cách xoay trộn nhẹ nhàng lọ để tạo huyền phù -lại. Quan trọng là phải cẩn thận để không đảo ngược lọ. Sau đó, 500 μ L Biotin Antibody Cocktail được kết hợp với 5,0mL RD2-1 pha loãng. Dung dịch được trộn đều.

(vii) Streptavidin phycoerythrin (PE) được chuẩn bị bằng cách xoay trộn nhẹ nhàng lọ để tạo huyền phù- lại (một cách cẩn thận để không đảo ngược lọ). Sau đó, 200 μ L Streptavidin-PE cô đặc được kết hợp với 5,35mL dung dịch đệm rửa. Dung dịch được trộn đều và được bảo vệ khỏi ánh sáng.

(Viii) Rửa đĩa như sau: Đĩa được gắn vào nam châm và để yên trong ít nhất một phút. Trong khi đĩa được gắn vào nam châm, đĩa được lật ngược nhanh chóng để gạn đĩa vào bồn rửa, sau đó chuyển động hướng xuống tương đối mạnh (1-2 lần) để làm rộng giếng. Loại bỏ hoàn toàn chất lỏng bằng cách úp ngược là cần thiết nhưng không làm bắn đĩa. Tháo nam châm ra và nạp vào các giếng 100 μ L dung dịch đệm rửa bằng cách sử dụng pipet nhiều kênh. Sau khi rửa, nam châm được gắn- lại và để yên trong một phút trước khi tiến hành gạn như mô tả trước. Lặp lại bước rửa với tổng số 3 lần rửa.

(ix) 50 μ L hỗn hợp Biotin kháng thể được pha loãng được thêm vào mỗi giếng bằng cách sử dụng pipet nhiều kênh. Đĩa được bọc kín và ủ trong 1 giờ ở RT trên máy lắc đặt ở tốc độ 800 vòng/phút. Sau đó, rửa đĩa 3 lần như trước.

(x) Thêm 50 μ L Streptavidin-PE pha loãng vào mỗi giếng. Bọc đĩa và ủ trong 30 phút ở RT trên máy lắc như trước. Sau đó, rửa đĩa 3 lần như trước.

(xi) Thêm 100 μ L dung dịch đệm rửa vào mỗi giếng và ủ đĩa trong 2 phút ở RT trên máy lắc như trước. Sau đó, các chất ở trong giếng được chuyển ngay vào đĩa Costar 6509 96-giếng bằng cách sử dụng pipet nhiều kênh được đặt ở 120 μ L. Sau đó đĩa này được đặt vào khuôn phù hợp trong máy quét Luminex 3D.

(xii) Đĩa này được đọc và phân tích nhờ sử dụng phần mềm Luminex 3D và Xponent.

TGF- β 1 singleplex:

(i) Mẫu chuẩn được chuẩn bị bằng cách sử dụng ống polypropylen 1,5mL để tạo các độ pha loãng. Cho mục đích này, 500 μ L mẫu chuẩn S1 được hút bằng pipet vào ống S1. Vào các ống S2-S6, 200 μ L môi trường PTT6 đầy đủ được thêm vào. Bằng cách chuyển 100 μ L tuần tự từ một S1 cho đến S7 và đảm bảo trộn đều, mẫu chuẩn được pha loãng theo tỷ lệ 1:3.

(ii) Chuẩn bị các hạt bằng cách xoáy trộn nhẹ nhàng để tạo huyền phù lại. Quan trọng là phải cẩn thận để không đảo ngược lọ. Nếu dùng toàn bộ đĩa, 50 μ L hạt được kết hợp với 5,0mL vi hạt RD2-1 pha loãng. Nếu sử dụng ít giếng hơn, điều chỉnh các thể tích cho phù hợp. Lọ hoặc các giếng được bảo vệ khỏi ánh sáng.

(iii) Để khiến TGF- β 1 phản ứng miễn dịch (chỉ các mẫu, không phải mẫu chuẩn), 30 μ L chất phản ứng hoạt hóa được thêm vào 150 μ L dịch nổi. Trộn đều dung dịch và ủ trong 10 phút ở RT. Tất cả các mẫu được sử dụng không được pha loãng trừ khi nồng độ mẫu vượt quá giá trị mẫu chuẩn cao nhất (S1). Trong trường hợp như vậy, thử nghiệm được lặp lại với mẫu được pha loãng thích hợp. Để pha loãng PTT6 được sử dụng. Tất cả các mẫu được đo ba lần.

(iv) Các hạt được xoáy trộn nhẹ nhàng trước khi thêm 50 μ L vào mỗi giếng bằng cách sử dụng pipet nhiều kênh và đồ chứa.

(v) 50 μ L mẫu chuẩn hoặc mẫu được thêm vào mỗi giếng. Sau đó, bọc đĩa bằng màng bọc đĩa và ủ tránh ánh sáng trong 2 giờ ở RT trên máy lắc quỹ đạo ở tốc độ 800 vòng/phút.

(vi) Trong quá trình ủ mẫu, dung dịch hỗn hợp biotin và kháng thể (Biotin Antibody Cocktail) được chuẩn bị bằng cách xoáy trộn nhẹ nhàng lọ để tạo huyền phù lại. Quan trọng là phải cẩn thận để không đảo ngược lọ. Sau đó, 50 μ L Biotin kháng thể cô đặc được kết hợp với 5,0mL Biotin kháng thể pha loãng. Dung dịch được trộn đều.

(vii) Streptavidin phycoerythrin (PE) được chuẩn bị bằng cách xoáy trộn nhẹ nhàng lọ để tạo huyền phù lại (một cách cẩn thận để không đảo ngược lọ). Sau đó, 55 μ L Streptavidin-PE 100x cô đặc được kết hợp với 5,35mL dung dịch đệm rửa. Dung dịch được trộn đều và được bảo vệ khỏi ánh sáng.

(Viii) Rửa đĩa như sau: Đĩa được gắn vào nam châm và để yên trong ít nhất một phút. Trong khi đĩa được gắn vào nam châm, đĩa được lật ngược nhanh chóng để gạn đĩa vào bồn rửa, sau đó chuyển động hướng xuống tương đối mạnh (1-2 lần) để làm rộng giếng. Loại bỏ hoàn toàn chất lỏng bằng cách úp ngược là cần thiết nhưng không làm bắn đĩa. Tháo nam châm ra và nạp vào các giếng 100 μ L dung dịch đệm rửa bằng cách sử dụng pipet nhiều kênh. Sau khi rửa, nam châm được gắn- lại và để yên trong một phút trước khi tiến hành gạn như mô tả trước. Lặp lại bước rửa với tổng số 3 lần rửa.

(ix) 50 μ L hỗn hợp Biotin kháng thể được pha loãng được thêm vào mỗi giếng bằng cách sử dụng pipet nhiều kênh. Đĩa được bọc kín và ủ trong 1 giờ ở RT trên máy lắc đặt ở tốc độ 800 vòng/phút. Sau đó, rửa đĩa 3 lần như trước.

(x) Thêm 50 μ L Streptavidin-PE pha loãng vào mỗi giếng. Bọc đĩa và ủ trong 30 phút ở RT trên máy lắc như trước. Sau đó, rửa đĩa 3 lần như trước.

(xi) Thêm 100 μ L dung dịch đệm rửa vào mỗi giếng và ủ đĩa trong 2 phút ở RT trên máy lắc như trước. Sau đó, các chất ở trong giếng được chuyển ngay vào đĩa Costar 6509 96-giếng bằng cách sử dụng pipet nhiều kênh được đặt ở 120 μ L. Sau đó đĩa này được đặt vào khuôn phù hợp trong máy quét Luminex 3D.

(xii) Đĩa này được đọc và phân tích nhờ sử dụng phần mềm Luminex 3D và Xponent.

Giai đoạn 3: Ngân hàng tế bào đầu dòng

3 dòng tế bào đáp ứng các tiêu chí cho phép lấy ra khỏi quy trình ở giai đoạn 2 sau đó được cấy giống trong bình phản ứng sinh học Terumo Quantum ở 20 - 40 x 10⁶ tế bào sống được và được cấy truyền trong khoảng 7-14 ngày. Các tế bào sau Quantum được kiểm tra về độ vô trùng, nội độc tố, mycoplasma, virus gây bệnh cho người và kiểm tra virus tự sinh. Các tế bào được bảo quản đông lạnh ở 9 đến 10 x 10⁶ tế bào/lọ (50-70 lọ mỗi mẻ). MSC được cấy truyền trong các bình và trong Terumo Quantum trong môi trường PTT6, được bào chế như sau cho 1000 mL (500mL môi trường cơ bản PTT6, 236mL M171, 236mL DMEM F12, 25mL huyết thanh bào thai bò, 0,1mL yếu tố tăng trưởng biểu bì 0,1 mg/mL [nồng độ cuối 10 ng/mL]), 0,35mL insulin (nồng độ cuối 5 μ g/mL) và được ủ ở 37°C trong 5% CO₂.

Giai đoạn 4: Các mẫu cấy điều trị

1x, 3x và 5x 10^6 MSC mà đã được kiểm tra dương tính đối với Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF được đóng chai trong Hypothermosol® và được bảo quản ở 2-8°C trước khi sử dụng trong dược phẩm.

Ví dụ 2: Phân tích mức tiết ra của protein để nhận diện dây rốn của người cho phù hợp

Để phân tích, 10 dây rốn được thu gom từ những người cho khác nhau. Những dây rốn này được sử dụng để tạo ra 10 quần thể MSC riêng biệt từ màng ối của dây rốn.

Mục đích của thử nghiệm này là để xác định mức tiết ra của Ang-1, VEGF, HGF và TGF- β 1 để rút ra kết luận về sự thay đổi trong thông số tiết ra của các quần thể MSC riêng lẻ và để nhận diện quần thể MSC có mức tiết ra đủ của Ang-1, VEGF, HGF và TGF- β 1.

Do đó, các quần thể MSC riêng lẻ được nuôi cấy theo sáng chế và mức tiết ra ở sau giai đoạn 2 của Ang-1, VEGF, HGF và TGF- β (ở đây là TGF- β 1) được xác định đối với mỗi quần thể MSC như được mô tả trong ví dụ 1. Các kết quả của phân tích mức tiết ra được thể hiện trên Fig.2, trong đó ngưỡng cụ thể của protein (500 pg/mL đối với Ang-1 và TGF- β , tương ứng, và 100 pg/mL đối với VEGF và HGF, tương ứng) được thể hiện bằng đường kẻ ngang màu đen.

Như có thể được thấy từ kết quả này, mức tiết ra của TGF- β 1 cao hơn gấp hai lần so với giá trị ngưỡng ở tất cả 10 quần thể MSC riêng lẻ. Do đó, giá trị ngưỡng là 500 pg/mL đối với TGF- β 1 được vượt quá đối với tất cả các quần thể MSC riêng lẻ. Các mức tiết ra của HGF được vẽ biểu đồ cho thấy rằng 5 trong số 10 mẫu vượt quá giá trị ngưỡng là 100 pg/mL, cụ thể là quần thể MSC 8049365 thể hiện mức tiết ra là khoảng 600 pg/mL, quần thể MSC 8049369 thể hiện mức tiết ra là khoảng 300 pg/mL, quần thể MSC 8049372 thể hiện mức tiết ra là khoảng 1450 pg/mL, quần thể MSC 8049373 thể hiện mức tiết ra là khoảng 380 pg/mL và quần thể MSC 8049384 thể hiện mức tiết ra là khoảng 190 pg/mL. Các mức tiết ra của Ang-1 được vẽ biểu đồ cho thấy rằng tất cả các quần thể MSC riêng lẻ đều vượt quá giá trị ngưỡng là 500 pg/mL. Các mức tiết ra của VEGF cho thấy rằng giá trị ngưỡng là 100 pg/mL được vượt quá đối với tất cả các mẫu ngoại trừ 8049358, 8049359 và 8049370. Trong ngữ cảnh này, chỉ có mức tiết ra của 8049359 là khoảng 50 pg/mL, trong khi đó các mức 8049358 và 8049359 gần bằng không.

Các kết quả này cho thấy rằng mức tiết ra protein của các quần thể MSC riêng lẻ khác nhau là khác nhau, khẳng định rằng các MSC có thông số tiết ra riêng. Để nhận diện một quần thể MSC có mức tiết ra đủ của Ang-1, VEGF, HGF và TGF- β 1, mức tiết ra của các protein này được phân tích.

Trong ngữ cảnh này, MSC thể hiện mức tiết ra đủ của Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF nếu các mức của protein này vượt quá giá trị ngưỡng tương ứng của chúng. Do đó, quần thể MSC 8049365, 8049369, 8049372, 8049373 và 8049384 (mỗi quần thể được lấy từ dây rốn của một người cho khác nhau) thể hiện mức tiết ra đủ của Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF bởi vì đây là những quần thể MSC duy nhất vượt quá các giá trị ngưỡng đã cho đối với mỗi trong số bốn protein được chọn. Đối với các thử nghiệm tiếp theo (thiết lập ngân hàng tế bào đầu dòng và sản xuất tế bào cho mục đích được phẩm, quần thể MSC 8049372 được chọn ở đây.

Ví dụ 3: Phân tích độ ổn định của mức tiết ra

Quần thể MSC 8049372 cho thấy mức tiết ra đủ của các protein Ang-1, TGF- β , VEGF và HGF trong ví dụ 2 được dùng để phân tích độ ổn định của mức tiết ra protein. Do đó, quần thể MSC tiếp tục được nuôi cấy cho đến khi tế bào được cấy truyền lần thứ bốn. Sau đó, hai mẫu của quần thể MSC sau- giai đoạn 4 (MSC của giếng 1 và MSC của giếng 2) được phân tích về mức tiết ra của Ang-1, VEGF, HGF và TGF- β (ở đây là TGF- β 1) như được mô tả trong ví dụ 1. Các mức tiết ra protein của quần thể MSC 8049372 được xác định trong thử nghiệm này (sau-giai đoạn 4) sau đó được so sánh với các mức tiết ra của quần thể MSC 8049372 được xác định trong ví dụ 2 (sau-giai đoạn 2). Bằng cách này, những thay đổi về mức tiết ra trong các thời điểm khác nhau có thể được bộc lộ. Nhờ đó, có thể rút ra kết luận về tính ổn định của mức tiết protein và do đó là tính đủ của mức tiết protein theo thời gian. Các kết quả được thể hiện trên Fig.3.

Sau-giai đoạn 2, quần thể MSC 8049372 thể hiện mức tiết ra là khoảng 2200 pg/mL đối với TGF- β 1. Sau khi cấy truyền tế bào hai lần nữa, sau-giai đoạn 4, quần thể MSC 8049372 thể hiện trung bình khoảng 2345 pg/mL TGF- β 1. Do đó, mức tiết ra của quần thể MSC 8049372 tăng lên khoảng 7% sau khi cấy truyền tế bào thêm hai lần nữa. Mức tiết ra của HGF giảm khoảng 33% sau khi cấy truyền tế bào thêm hai lần nữa từ khoảng 1450 pg/mL sau-giai đoạn 2 xuống khoảng 959 pg/mL trung bình sau-giai đoạn 4. Sau-giai đoạn 4, quần thể MSC 8049372 thể hiện trung bình khoảng 1827 pg/mL

Ang-1, mức này giảm khoảng 9% so với 2000 pg/mL Ang-1 sau-giai đoạn 2. Mức tiết ra của VEGF tăng lên khoảng 43% sau khi cấy truyền tế bào thêm hai lần nữa từ khoảng 150 pg/mL sau-giai đoạn 2 lên khoảng 215 pg/mL trung bình sau-giai đoạn 4.

Các kết quả này thể hiện, rằng mức tiết ra của các protein Ang-1, VEGF, HGF và TGF- β (ở đây là TGF- β 1) cũng thay đổi sau khi cấy truyền tế bào thêm hai lần nữa. Tuy nhiên, các giá trị ngưỡng tương ứng như được chọn ở đây vẫn bị vượt quá đối với tất cả các protein được phân tích sau khi cấy truyền tế bào thêm hai lần nữa. Do đó, các kết quả của thử nghiệm này cho thấy rằng quần thể MSC 8049372 duy trì tính ổn định của mức tiết protein tương đối và do đó duy trì khả năng làm lành vết thương của chúng. Vì vậy, các kết quả này cho thấy rằng khả năng làm lành vết thương của quần thể MSC có thể ổn định trong một khoảng thời gian nhất định. Dựa vào kết quả này, quần thể MSC 8049372 là ứng viên phù hợp làm nguyên liệu ban đầu để tạo ra ngân hàng tế bào đầu dòng (master cell bank) hoặc để sản xuất dược phẩm để dùng cho đối tượng sau này.

Ví dụ 4: Nhận diện môi trường phù hợp để gây ra hoặc cải thiện các đặc tính làm lành vết thương của tế bào gốc trung mô

Đối với thử nghiệm này, các quần thể MSC phân lập khác nhau của màng ối của dây rốn được nuôi cấy trong PTT4, PTT6 hoặc DMEM/F12 như được mô tả trong đơn sáng chế quốc tế WO 2018/067071 và sau đó được phân tích về sự tiết ra của các protein đầu chuẩn làm lành vết thương để so sánh.

Quy trình nuôi cấy để nuôi cấy các MSC phân lập

- 5 triệu MSC được cấy trải trên đĩa nuôi cấy mô 100 mm trong DMEM/F12/10%FCS trong 24 giờ.
- Loại bỏ môi trường và thêm PTT4, PTT6 / DMEM/F12 để nuôi cấy trong 24 giờ.
- Loại bỏ môi trường và rửa tế bào bằng PBS.
- Thêm 10 ml DMEM để nuôi cấy trong 24 giờ.
- Loại bỏ môi trường và thêm 5 mL DMEM để nuôi cấy.
- Sau 24 giờ nuôi cấy, môi trường có điều kiện được thu lại, ly tâm để loại bỏ mảnh vỡ tế bào, phần dịch nổi được chia thành các phần phân ước vào các

ống để bảo quản ở -80°C và sau đó phân tích mức tiết ra của protein đầu chuẩn bằng các thử nghiệm xytokin

Phân tích mức tiết ra trên các dịch nổi môi trường PTT4, PTT6 so với DMEM/F12

Thực hiện phân tích mức tiết ra trong các dịch nổi của MSC. Tiến hành các phép đo và phân tích nhờ sử dụng phần mềm Luminex 200 và Xponent.

Mỗi mẫu được kiểm tra ba lần ngoại trừ các mẫu dịch nổi của nhau thai. Mục đích của thử nghiệm này là để tạo ra thông số xytokin của các MSC được nuôi cấy trong PTT4 hoặc PTT6 và để so sánh các thông số của MSC từ các nguồn gốc mô khác nhau (MSC từ màng lót dây rốn với thạch Wharton với nhau thai). Tiến hành các phép đo xytokin như được mô tả dưới đây. Thông số này sẽ làm sáng tỏ quần thể tế bào gốc nào được nuôi cấy trong môi trường nào sẽ tiết ra nhiều xytokin quan tâm hơn, có nghĩa là môi trường nào là phù hợp để gây ra hoặc thúc đẩy các đặc tính làm lành vết thương của các MSC.

Phân tích multiplex (phân tích phát hiện nhiều protein đích)

Thông tin multiplex:

R&D Systems/Bio-technique catalô # LXSAHM. Kit này là lô # L123680, hết hạn ngày 08/28/18, với các chất phân tích sau:

- Ang-1, angiopoietin
- VEGF, yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu
- HGF, yếu tố tăng trưởng tế bào gan

Thông tin singleplex TGF β 1: R&D Systems/Bio-technique:

- Kit cơ bản, catalô # LTGM00, lô # P156217, nhận được ngày 02/27/18, hết hạn ngày 08/30/18.
- Thành phần TGF β 1, catalô # LTGM100, lô # P161760, nhận được ngày 02/27/18, hết hạn ngày 11/27/19.

Thông tin multiplex:

R&D Systems/Bio-technique catalô # LXSAHM. Kit này là lô # L123999, hết hạn ngày 09/25/18, với các chất phân tích sau:

- Ang-1, angiopoietin
- VEGF, yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu
- HGF, yếu tố tăng trưởng tế bào gan
- Dữ liệu vào

Đầu vào dữ liệu thô là ở định dạng PDF và Excel. Dữ liệu ở định dạng Excel được sử dụng để xử lý dữ liệu.

Quy trình

Việc phát hiện protein trong các dịch nổi MSC được thực hiện theo thông tin chi tiết của quy trình chuẩn. Là một phần của thử nghiệm này, quy trình chuẩn có một sửa đổi duy nhất: Std. 8 trong kit Multiplex không còn được sử dụng. Lý do không tiếp tục dùng Std. 8 là bởi vì chính bản thân quy trình chuẩn của R&D Systems chỉ sử dụng các mẫu chuẩn 1 đến 6. Hơn nữa, Std. 8 đã được xác nhận đối với chỉ hai trong số chất phân tích mà bao gồm Multiplex: HGF. Trong trường hợp của HGF, chất phân tích nằm ở vùng giữa của đường cong chuẩn. Vì các mẫu chuẩn được hoàn nguyên nhờ sử dụng môi trường nuôi cấy, các đường cong chuẩn được dựng với cả PTT4 và PTT6. Các mẫu thử nghiệm được nuôi cấy trong PTT4 hoặc PTT6 được ngoại suy từ các đường cong chuẩn tương ứng. Các kết quả được phần mềm Luminex ngoại suy từ đường cong chuẩn dành riêng cho chất phân tích mà được tạo ra bởi cùng một phần mềm: thuật toán phân tích được đặt ở Logistic 5P Weighted với phân tích có trọng số, sử dụng 1/2 để tính trọng số.

Mẫu

1. Môi trường DMEM/F12 và PTT6 và PTT4 (không được tiếp xúc với MSC)
2. Phần dịch nổi của MSC cần được kiểm tra
3. Tùy ý: các phân dịch nổi từ những người cho khác nhau; CR001A, C, D, và G.

Kết quả đối với Ang-1 được thể hiện trên Fig.4A và cho thấy rằng MSC của màng ối của dây rốn tạo ra Ang-1 nhiều hơn khi được nuôi cấy trong PTT6 so với khi được nuôi cấy trong DMEM/F12 hoặc PTT4. Các kết quả đối với VEGF được thể hiện trên Fig.4B và cho thấy rằng MSC của màng ối của dây rốn tạo ra VEGF nhiều hơn khi được nuôi cấy trong PTT6 so với khi được nuôi cấy trong DMEM/F12 hoặc PTT4. Các kết quả

đối với HGF được thể hiện trên Fig.4C và cho thấy rằng MSC của màng ối của dây rốn tạo ra HGF nhiều hơn khi được nuôi cấy trong PTT6 so với khi được nuôi cấy trong DMEM/F12 hoặc PTT4. Cuối cùng, các kết quả đối với TGF- β 1 được thể hiện trên Fig.4D và cho thấy rằng MSC của màng ối của dây rốn tạo ra TGF- β 1 nhiều hơn khi được nuôi cấy trong PTT6 so với khi được nuôi cấy trong DMEM/F12 hoặc PTT4.

Từ các thử nghiệm mô tả trên đây, có thể thu được các kết luận sau đây. Khi MSC được nuôi cấy trong môi trường PTT6, sự tiết ra Ang-1, TGF- β 1, VEGF, và HGF bởi quần thể MSC được tăng lên đáng kể so với mức tiết ra của chúng trong môi trường PTT4 hoặc môi trường nuôi cấy có bán sẵn trên thị trường chẳng hạn DMEM/F12. Môi trường PTT6 có khả năng cao nhất trong việc gây ra hoặc cải thiện các đặc tính làm lành vết thương của quần thể MSC bằng cách đẩy mạnh sự tiết ra của cả bốn loại Ang-1, TGF- β 1, VEGF, và HGF (mà sự tham gia của chúng trong quá trình làm lành vết thương là đã biết, như bàn luận ở đây) trong quần thể MSC. Do đó, việc xác định mức tiết ra của Ang-1, TGF- β 1, VEGF, và HGF có thể được dùng để nhận diện môi trường phù hợp để gây ra hoặc cải thiện các đặc tính làm lành vết thương của quần thể tế bào gốc trung mô.

Sẽ là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này rằng các thay thế và cải biến khác nhau có thể được tạo ra đối với sáng chế được bộc lộ ở đây mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế.

Tất cả các bằng sáng chế và công bố được đề cập trong bản mô tả là biểu thị các cấp độ kỹ năng của những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế có liên quan đến. Tất cả các bằng sáng chế và công bố được đưa vào đây bằng cách viện dẫn ở mức độ như thể mỗi công bố được chỉ ra một cách cụ thể và riêng biệt là được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Sáng chế được mô tả theo cách minh họa ở đây có thể được thực hiện một cách phù hợp khi không có bất kỳ yếu tố hoặc các yếu tố, giới hạn hoặc các giới hạn, không được bộc lộ cụ thể ở đây. Do đó, ví dụ, các thuật ngữ “chứa”, “bao gồm,” “gồm có”, v.v. sẽ được hiểu một cách rộng rãi và không có giới hạn. Ngoài ra, các thuật ngữ và dạng thể hiện được sử dụng ở đây đã được sử dụng như các thuật ngữ mô tả và không phải giới hạn, và việc sử dụng các thuật ngữ và dạng thể hiện đó không có ý định loại trừ dạng tương đương bất kỳ của các dấu hiệu được thể hiện và mô tả hoặc các phần của chúng, nhưng thừa nhận rằng có thể thực hiện các sửa đổi khác nhau trong phạm vi sáng chế

được yêu cầu bảo hộ. Do đó, cần hiểu rằng mặc dù sáng chế được bộc lộ cụ thể bằng các phương án ví dụ và các dấu hiệu tùy chọn, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể thực hiện các cải biến và thay đổi của sáng chế được bao gồm trong đó được bộc lộ ở đây, và các cải biến và thay đổi này được coi là nằm trong phạm vi của sáng chế. Sáng chế được mô tả một cách rộng rãi và khái quát ở đây. Mỗi trong số các phân nhóm loài hẹp hơn và phân nhóm giống phụ đều nằm trong phần mô tả chung cũng tạo thành một phần của sáng chế. Điều này bao gồm phần mô tả chung của sáng chế với điều kiện hoặc giới hạn phủ định loại bỏ đối tượng bất kỳ ra khỏi một giống, bất kể nguyên liệu đã được loại bỏ có được đề cập cụ thể ở đây hay không. Ngoài ra, khi các dấu hiệu hoặc khía cạnh của sáng chế được mô tả theo các nhóm Markush, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận ra rằng sáng chế nhờ đó cũng được mô tả theo thành viên hoặc nhóm phụ bất kỳ gồm các thành viên của nhóm Markush. Các phương án khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng từ các điểm yêu cầu bảo hộ sau đây.

Sáng chế còn được đặc trưng bởi các mục sau:

1. Phương pháp đánh giá khả năng chữa lành vết thương của quần thể tế bào gốc trung mô, trong đó phương pháp này bao gồm bước xác định trong môi trường mức của ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) được tiết vào môi trường bởi quần thể tế bào gốc trung mô.

2. Phương pháp nhận diện mô phù hợp làm vật liệu ban đầu để sản xuất quần thể tế bào gốc trung mô để sử dụng trong dược phẩm, trong đó phương pháp này bao gồm bước xác định trong môi trường mức của ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) được tiết vào môi trường bởi mẫu mô hoặc tế bào phân lập được từ mô.

3. Phương pháp chọn lọc quần thể tế bào gốc trung mô để sản xuất quần thể tế bào gốc theo các điều kiện cGMP, trong đó phương pháp này bao gồm bước xác định trong môi trường mức của ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng

trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) được tiết vào môi trường bởi quần thể tế bào gốc trung mô.

4. Phương pháp chọn lọc quần thể tế bào gốc trung mô để sản xuất quần thể tế bào gốc để sử dụng trong dược phẩm tiếp theo, trong đó phương pháp này bao gồm bước xác định trong môi trường mức của ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) được tiết vào môi trường bởi quần thể tế bào gốc trung mô.

5. Phương pháp chọn lọc quần thể tế bào gốc trung mô để tạo ra ngân hàng tế bào đầu dòng (master cell bank), trong đó phương pháp này bao gồm bước xác định trong môi trường mức của ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) được tiết vào môi trường bởi quần thể tế bào gốc trung mô.

6. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 5, trong đó phương pháp này bao gồm xác định trong môi trường mức của ít nhất hai, ít nhất ba hoặc cả bốn protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) được tiết vào môi trường bởi quần thể tế bào gốc trung mô.

7. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 6, trong đó mức tiết ra bằng hoặc vượt quá giá trị ngưỡng cho biết

- (i) khả năng làm lành vết thương của quần thể tế bào gốc trung mô; hoặc
- (ii) mô hoặc tế bào phân lập được phù hợp làm vật liệu ban đầu để sản xuất quần thể tế bào gốc trung mô.

8. Phương pháp theo mục 7, trong đó đối với Angiopoietin 1 (Ang-1) giá trị ngưỡng là khoảng 400 pg/mL hoặc khoảng 500 pg/mL.

9. Phương pháp theo các mục 7 hoặc 8, trong đó đối với yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β) giá trị ngưỡng là khoảng 400 pg/mL hoặc khoảng 500 pg/mL.

10. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 7 đến 9, trong đó đối với yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) giá trị ngưỡng là khoảng 80 ng/mL hoặc khoảng 100 pg/mL.

11. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 7 đến 10, trong đó đối với yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) giá trị ngưỡng là khoảng 80 pg/mL hoặc khoảng 100 pg/mL.

12. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 8 đến 11, trong đó mức tiết ra của cả bốn protein bằng hoặc vượt quá giá trị ngưỡng tương ứng của chúng, và trong đó giá trị ngưỡng là

- giá trị ngưỡng là khoảng 400 pg/mL đối với Angiopoietin 1 (Ang-1),
- giá trị ngưỡng là khoảng 400 pg/mL đối với yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β),
- giá trị ngưỡng là khoảng 80 pg/mL đối với yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF), và
- giá trị ngưỡng là khoảng 80 pg/mL đối với yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF).

13. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 8 đến 11, trong đó mức tiết ra của cả bốn protein bằng hoặc vượt quá giá trị ngưỡng tương ứng của chúng, và trong đó giá trị ngưỡng là

- giá trị ngưỡng là khoảng 500 pg/mL đối với Angiopoietin 1 (Ang-1),
- giá trị ngưỡng là khoảng 500 pg/mL đối với yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β),
- giá trị ngưỡng là khoảng 100 pg/mL đối với yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF), và
- giá trị ngưỡng là khoảng 100 pg/mL đối với yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF).

14. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 13, trong đó quần thể tế bào gốc trung mô được chọn từ nhóm bao gồm quần thể tế bào gốc trung mô của dây rốn, quần thể tế bào gốc trung mô nhau thai, quần thể tế bào gốc trung mô của chỗ

nối dây rốn - nhau thai, quần thể tế bào gốc trung mô của máu cuống rốn, quần thể tế bào gốc trung mô của tủy xương, và quần thể tế bào gốc trung mô thu được từ mô mỡ.

15. Phương pháp theo mục 14, trong đó quần thể tế bào gốc trung mô của dây rốn được chọn từ nhóm bao gồm quần thể tế bào gốc trung mô của màng ối (AM), quần thể tế bào gốc trung mô quanh mạch (perivascular - PV), quần thể tế bào gốc trung mô của thạch Wharton (Wharton's jelly - WJ), quần thể tế bào gốc trung mô của màng ối của dây rốn và quần thể tế bào gốc trung mô trộn lẫn của dây rốn (MC).

16. Phương pháp theo mục 2, trong đó mô là dây rốn hoặc màng ối của dây rốn và quần thể tế bào gốc trung mô là quần thể tế bào gốc của màng ối của dây rốn.

17. Phương pháp theo các mục 15 hoặc 16, trong đó quần thể tế bào gốc trung mô của màng ối của dây rốn là quần thể tế bào gốc trung mô, trong đó ít nhất khoảng 90% hoặc nhiều hơn tế bào của quần thể tế bào gốc biểu hiện mỗi trong các dấu chuẩn sau đây: CD73, CD90 và CD105.

18. Phương pháp theo mục 17, trong đó ít nhất khoảng 90% hoặc nhiều hơn tế bào của quần thể tế bào gốc trung mô không biểu hiện các dấu chuẩn sau đây: CD34, CD45 và HLA-DR.

19. Phương pháp theo các mục 17 hoặc 18, trong đó 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% hoặc nhiều hơn tế bào của quần thể tế bào gốc trung mô biểu hiện mỗi trong số CD73, CD90 và CD105 và không biểu hiện mỗi trong số CD34, CD45 và HLA-DR.

20. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó môi trường là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc môi trường lưu trữ.

21. Phương pháp theo mục 20, trong đó môi trường lưu trữ là Hypothermosol hoặc Plasmalyte.

22. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 19, trong đó môi trường bao gồm môi trường Eagle do Dulbecco cải tiến (DMEM) ở nồng độ cuối là khoảng 55 đến 65% (thể tích/thể tích), môi trường F12 của Ham (F12) ở nồng độ cuối là khoảng 5 đến 15% (thể tích/thể tích), môi trường cơ bản không chứa huyết thanh ở nồng

độ cuối là khoảng 15 đến 30% (thể tích/thể tích) và huyết thanh bào thai bò (FBS) ở nồng độ cuối là khoảng 1 đến 8% (thể tích/thể tích).

23. Phương pháp theo mục 22, trong đó môi trường bao gồm môi trường Eagle do Dulbecco cải tiến (DMEM) ở nồng độ cuối là khoảng 57,5 đến 62,5% (thể tích/thể tích), môi trường F12 của Ham (F12) ở nồng độ cuối là khoảng 7,5 đến 12,5% (thể tích/thể tích), môi trường cơ bản không chứa huyết thanh ở nồng độ cuối là khoảng 17,5 đến 25,0% (thể tích/thể tích) và huyết thanh bào thai bò (FBS) ở nồng độ cuối là khoảng 1,75 đến 3,5% (thể tích/thể tích).

24. Phương pháp theo mục 23, trong đó môi trường bao gồm môi trường Eagle do Dulbecco cải tiến (DMEM) ở nồng độ cuối là khoảng 61,8% (thể tích/thể tích), môi trường F12 của Ham (F12) ở nồng độ cuối là khoảng 11,8% (thể tích/thể tích), môi trường cơ bản không chứa huyết thanh ở nồng độ cuối là khoảng 23,6% (thể tích/thể tích) và huyết thanh bào thai bò (FBS) ở nồng độ cuối là khoảng 2,5% (thể tích/thể tích).

25. Phương pháp theo các mục 23 hoặc 24, trong đó môi trường cơ bản không chứa huyết thanh là M171.

26. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 22 đến 25, trong đó môi trường còn bao gồm yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF) ở nồng độ cuối là khoảng 1 ng/mL đến khoảng 20 ng/mL.

27. Phương pháp theo mục 26, trong đó môi trường bao gồm yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF) ở nồng độ cuối là khoảng 10ng/mL.

28. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 22 đến 27, trong đó môi trường bao gồm Insulin ở nồng độ cuối là khoảng 1 μ g/mL đến 10 μ g/mL.

29. Phương pháp theo mục 28, trong đó môi trường bao gồm Insulin ở nồng độ cuối là khoảng 5 μ g/mL.

30. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 22 đến 29, trong đó môi trường còn bao gồm ít nhất một trong số các chất bổ sung sau: adenin, hydrocortison, và muối natri 3,3',5-Triiodo-L-thyronin (T3).

31. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 22 đến 30, trong đó môi trường bao gồm cả ba loại là adenin, hydrocortison, và 3,3',5-Triiodo-L-thyronin sodium salt (T3).

32. Phương pháp theo mục 30 hoặc 31, trong đó môi trường bao gồm adenin ở nồng độ cuối là khoảng 0,01 đến khoảng 0,1 $\mu\text{g/mL}$ adenin, hydrocortison ở nồng độ cuối là khoảng 0,1 đến khoảng 10 $\mu\text{g/mL}$ hydrocortison và/hoặc muối natri 3, 3', 5-Triiodo-L-thyronin (T3) ở nồng độ cuối là khoảng 0,5 đến khoảng 5 ng/mL .

33. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 32, trong đó bước nuôi cấy quần thể tế bào gốc trung mô trong môi trường như được xác định theo mục bất kỳ trong số các mục từ 22 đến 32 dẫn đến sự gia tăng biểu hiện và/hoặc tiết ra của ít nhất một trong số các protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiotensin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β ; cụ thể là TGF- β 1), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) bởi quần thể tế bào gốc trung mô so với môi trường tham chiếu mà không chứa cả DMEM (môi trường eagle do Dulbecco cải tiến), F12 (môi trường F12 của Ham), M171 (môi trường 171) và FBS (huyết thanh bào thai bò).

34. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 33, trong đó môi trường tế bào được đưa vào ly tâm sau khi nuôi cấy trong một khoảng thời gian thích hợp.

35. Phương pháp theo mục 34, trong đó khoảng thời gian nuôi cấy phù hợp bao gồm khoảng 12 giờ, khoảng 24 giờ, khoảng 36 giờ, khoảng 46 giờ, khoảng 48 giờ hoặc khoảng 50 giờ; tốt hơn là khoảng 48 giờ.

36. Phương pháp theo các mục 34 hoặc 35, trong đó phần dịch nổi của môi trường nuôi cấy tế bào đã ly tâm được đưa vào thử nghiệm đa hợp.

37. Phương pháp theo mục 36, trong đó thử nghiệm đa hợp là dựa vào hạt.

38. Sử dụng ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiotensin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) để đánh giá khả năng làm lành vết thương của quần thể tế bào gốc trung mô.

39. Sử dụng ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiotensin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) để lựa chọn quần thể tế bào gốc trung mô để sản xuất quần thể tế bào gốc theo các điều kiện cGMP.

40. Sử dụng ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) để lựa chọn quần thể tế bào gốc trung mô để sản xuất quần thể tế bào gốc để sử dụng trong dược phẩm tiếp theo.

41. Sử dụng ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) để lựa chọn quần thể tế bào gốc trung mô để tạo ra ngân hàng tế bào đầu dòng (master cell bank).

42. Sử dụng ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) để nhận diện mô phù hợp làm vật liệu ban đầu để sản xuất quần thể tế bào gốc trung mô để sử dụng trong dược phẩm.

43. Sử dụng theo mục 42, trong đó mô là dây rốn hoặc màng ối của dây rốn và quần thể tế bào gốc trung mô là quần thể tế bào gốc của màng ối của dây rốn.

44. Sử dụng theo mục bất kỳ trong số các mục từ 38 đến 41, trong đó việc sử dụng này bao gồm xác định trong môi trường nuôi cấy tế bào mức của ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) được tiết vào môi trường nuôi cấy tế bào bởi quần thể tế bào gốc trung mô.

45. Sử dụng theo mục 42 hoặc 43, trong đó việc sử dụng này bao gồm xác định trong môi trường nuôi cấy tế bào mức của ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang 1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) được tiết vào dịch nuôi cấy tế bào bởi mẫu mô hoặc tế bào phân lập được từ mô.

46. Sử dụng theo mục bất kỳ trong số các mục từ 38 đến 44, trong đó việc sử dụng này bao gồm xác định trong môi trường nuôi cấy tế bào mức của ít nhất hai, ít nhất ba hoặc cả bốn protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) được tiết vào môi trường nuôi cấy tế bào bởi quần thể tế bào gốc trung mô.

47. Phương pháp nhận diện môi trường phù hợp để gây ra hoặc cải thiện các đặc tính làm lành vết thương của quần thể tế bào gốc trung mô, trong đó phương pháp này bao gồm xác định mức của ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) được tiết vào môi trường bởi quần thể tế bào gốc trung mô.

48. Sử dụng ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) để nhận diện môi trường phù hợp để gây ra hoặc cải thiện các đặc tính làm lành vết thương của quần thể tế bào gốc trung mô.

49. Sử dụng theo mục 48, trong đó việc sử dụng này bao gồm xác định trong môi trường mức của ít nhất hai, ít nhất ba hoặc cả bốn protein được tiết vào môi trường bởi quần thể tế bào gốc trung mô.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp đánh giá khả năng chữa lành vết thương của **quần thể** tế bào gốc trung mô, trong đó quần thể tế bào gốc trung mô là quần thể tế bào gốc trung mô của **dây rốn**, trong đó quần thể tế bào gốc trung mô của dây rốn là quần thể tế bào gốc trung mô của màng ối của dây rốn, trong đó phương pháp này bao gồm bước xác định trong môi trường mức của cả bốn protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (Transforming Growth Factor beta - TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (Hepatocyte Growth Factor - HGF) được tiết vào môi trường bởi quần thể tế bào gốc trung mô, và trong đó mức tiết ra của cả bốn protein bằng hoặc vượt quá giá trị ngưỡng cho thấy khả năng làm lành vết thương của quần thể tế bào gốc trung mô.
2. Phương pháp nhận diện mô phù hợp làm vật liệu ban đầu để sản xuất quần thể tế bào gốc trung mô để sử dụng trong dược phẩm, trong đó quần thể tế bào gốc trung mô là quần thể tế bào gốc trung mô của **dây rốn**, trong đó quần thể tế bào gốc trung mô của dây rốn là quần thể tế bào gốc trung mô của màng ối của dây rốn, trong đó phương pháp này bao gồm bước xác định trong môi trường mức của cả bốn protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) được tiết vào môi trường bởi mẫu mô hoặc tế bào phân lập được từ mô, trong đó mô là dây rốn hoặc màng ối của dây rốn, và trong đó mức tiết ra của cả bốn protein bằng hoặc vượt quá giá trị ngưỡng cho thấy rằng mô hoặc tế bào phân lập được là phù hợp để làm vật liệu ban đầu để sản xuất quần thể tế bào gốc trung mô để sử dụng trong dược phẩm.
3. Phương pháp chọn lọc quần thể tế bào gốc trung mô để sản xuất quần thể tế bào gốc theo các điều kiện cGMP, trong đó quần thể tế bào gốc trung mô là quần thể tế bào gốc trung mô của **dây rốn**, trong đó quần thể tế bào gốc trung mô của dây rốn là quần thể tế bào gốc trung mô của màng ối của dây rốn, trong đó phương pháp này bao gồm bước xác định trong môi trường mức của cả bốn protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) được tiết vào môi trường bởi quần thể tế bào gốc trung mô, và trong đó mức tiết ra của cả bốn protein

bằng hoặc vượt quá giá trị ngưỡng cho thấy rằng quần thể tế bào gốc trung mô là phù hợp làm vật liệu ban đầu để sản xuất quần thể tế bào gốc trung mô theo các điều kiện cGMP.

4. Phương pháp chọn lọc quần thể tế bào gốc trung mô để sản xuất quần thể tế bào gốc để sử dụng trong dược phẩm tiếp theo, trong đó quần thể tế bào gốc trung mô là quần thể tế bào gốc trung mô của dây rốn, trong đó quần thể tế bào gốc trung mô của dây rốn là quần thể tế bào gốc trung mô của màng ối của dây rốn, trong đó phương pháp này bao gồm bước xác định trong môi trường mức của cả bốn protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) được tiết vào môi trường bởi quần thể tế bào gốc trung mô, và trong đó mức tiết ra của cả bốn protein bằng hoặc vượt quá giá trị ngưỡng cho thấy rằng quần thể tế bào gốc trung mô là phù hợp làm vật liệu ban đầu để sản xuất quần thể tế bào gốc trung mô để sử dụng trong dược phẩm tiếp theo.

5. Phương pháp chọn lọc quần thể tế bào gốc trung mô để tạo ra ngân hàng tế bào đầu dòng (master cell bank), trong đó quần thể tế bào gốc trung mô là quần thể tế bào gốc trung mô của dây rốn, trong đó quần thể tế bào gốc trung mô của dây rốn là quần thể tế bào gốc trung mô của màng ối của dây rốn, trong đó phương pháp này bao gồm bước xác định trong môi trường mức của cả bốn protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) được tiết vào môi trường bởi quần thể tế bào gốc trung mô, và trong đó mức tiết ra của cả bốn protein bằng hoặc vượt quá giá trị ngưỡng cho thấy rằng quần thể tế bào gốc trung mô là phù hợp để tạo ra ngân hàng tế bào đầu dòng (master cell bank).

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó đối với Angiopoietin 1 (Ang-1) giá trị ngưỡng là khoảng 400 pg/mL hoặc khoảng 500 pg/mL.

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó đối với yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β) giá trị ngưỡng là khoảng 400 pg/mL hoặc khoảng 500 pg/mL.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 7, trong đó đối với yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) giá trị ngưỡng là khoảng 80 ng/mL hoặc khoảng 100 ng/mL.

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 8, trong đó đối với yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) giá trị ngưỡng là khoảng 80 pg/mL hoặc khoảng 100 pg/mL.

10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 9, trong đó mức tiết ra của cả bốn protein bằng hoặc vượt quá giá trị ngưỡng tương ứng của chúng, và trong đó giá trị ngưỡng là

- giá trị ngưỡng là khoảng 400 pg/mL đối với Angiopoietin 1 (Ang-1),
- giá trị ngưỡng là khoảng 400 pg/mL đối với yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β),
- giá trị ngưỡng là khoảng 80 pg/mL đối với yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF), và
- giá trị ngưỡng là khoảng 80 pg/mL đối với yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF).

11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 9, trong đó mức tiết ra của cả bốn protein bằng hoặc vượt quá giá trị ngưỡng tương ứng của chúng, và trong đó giá trị ngưỡng là

- giá trị ngưỡng là khoảng 500 pg/mL đối với Angiopoietin 1 (Ang-1),
- giá trị ngưỡng là khoảng 500 pg/mL đối với yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β),
- giá trị ngưỡng là khoảng 100 pg/mL đối với yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF), và
- giá trị ngưỡng là khoảng 100 pg/mL đối với yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF).

12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó quần thể tế bào gốc trung mô của màng ối của dây rốn là quần thể tế bào gốc trung mô, trong đó ít nhất khoảng 90% hoặc nhiều hơn tế bào của quần thể tế bào gốc biểu hiện mỗi trong các dấu chuẩn sau đây: CD73, CD90 và CD105.

13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó ít nhất khoảng 90% hoặc nhiều hơn tế bào của quần thể tế bào gốc trung mô không biểu hiện các dấu chuẩn sau đây: CD34, CD45 và HLA-DR.

14. Phương pháp theo điểm 12 hoặc 13, trong đó 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% hoặc nhiều hơn tế bào của quần thể tế bào gốc trung mô biểu hiện mỗi trong số CD73, CD90 và CD105 và không biểu hiện mỗi trong số CD34, CD45 và HLA-DR.

15. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó môi trường là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc môi trường lưu trữ.

16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó môi trường lưu trữ là Hypothermosol hoặc Plasmalyte.

17. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó môi trường bao gồm môi trường Eagle do Dulbecco cải tiến (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM) ở nồng độ cuối là khoảng 55 đến 65% (thể tích/thể tích), môi trường F12 của Ham (F12) ở nồng độ cuối là khoảng 5 đến 15% (thể tích/thể tích), môi trường cơ bản không chứa huyết thanh ở nồng độ cuối là khoảng 15 đến 30% (thể tích/thể tích) và huyết thanh bào thai bò (Fetal Bovine Serum - FBS) ở nồng độ cuối là khoảng 1 đến 8% (thể tích/thể tích).

18. Phương pháp theo điểm 17, trong đó môi trường bao gồm môi trường Eagle do Dulbecco cải tiến (DMEM) ở nồng độ cuối là khoảng 57,5 đến 62,5% (thể tích/thể tích), môi trường F12 của Ham (F12) ở nồng độ cuối là khoảng 7,5 đến 12,5% (thể tích/thể tích), môi trường cơ bản không chứa huyết thanh ở nồng độ cuối là khoảng 17,5 đến 25,0% (thể tích/thể tích) và huyết thanh bào thai bò (FBS) ở nồng độ cuối là khoảng 1,75 đến 3,5% (thể tích/thể tích).

19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó môi trường bao gồm môi trường Eagle do Dulbecco cải tiến (DMEM) ở nồng độ cuối là khoảng 61,8% (thể tích/thể tích), môi trường F12 của Ham (F12) ở nồng độ cuối là khoảng 11,8% (thể tích/thể tích), môi trường cơ bản không chứa huyết thanh ở nồng độ cuối là khoảng 23,6% (thể tích/thể tích) và huyết thanh bào thai bò (FBS) ở nồng độ cuối là khoảng 2,5% (thể tích/thể tích).

20. Phương pháp theo điểm 18 hoặc 19, trong đó môi trường cơ bản không chứa huyết thanh là M171.

21. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 18 đến 20, trong đó môi trường còn bao gồm yếu tố tăng trưởng biểu bì (Epidermal Growth Factor - EGF) ở nồng độ cuối là khoảng 1 ng/mL đến khoảng 20 ng/mL.
22. Phương pháp theo điểm 21, trong đó môi trường bao gồm yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF) ở nồng độ cuối là khoảng 10ng/mL.
23. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 17 đến 22, trong đó môi trường bao gồm Insulin ở nồng độ cuối là khoảng 1 μ g/mL đến 10 μ g/mL.
24. Phương pháp theo điểm 23, trong đó môi trường bao gồm Insulin ở nồng độ cuối là khoảng 5 μ g/mL.
25. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 17 đến 24, trong đó môi trường còn bao gồm ít nhất một trong số các chất bổ sung sau: adenin, hydrocortison, và muối natri 3,3',5-Triiodo-L-thyronin (T3).
26. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 25, trong đó bước nuôi cấy quần thể tế bào gốc trung mô trong môi trường như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm 17 đến 25 nêu trên dẫn đến sự gia tăng biểu hiện và/hoặc tiết ra của ít nhất một trong số các protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β ; cụ thể là TGF- β 1), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) bởi quần thể tế bào gốc trung mô so với môi trường tham chiếu mà không bao gồm cả DMEM (môi trường eagle do Dulbecco cải tiến), F12 (môi trường F12 của Ham), M171 (môi trường 171) và FBS (huyết thanh bào thai bò).
27. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 26, trong đó môi trường được đưa vào ly tâm sau khi nuôi cấy trong một khoảng thời gian phù hợp.
28. Phương pháp theo điểm 27, trong đó khoảng thời gian nuôi cấy phù hợp bao gồm khoảng 12 giờ, khoảng 24 giờ, khoảng 36 giờ, khoảng 46 giờ, khoảng 48 giờ hoặc khoảng 50 giờ, tốt hơn là khoảng 48 giờ.
29. Phương pháp theo điểm 27 hoặc 28, trong đó phần dịch nổi của môi trường nuôi cấy tế bào đã ly tâm được đưa vào thử nghiệm đa hợp.

30. Phương pháp theo điểm 29, trong đó thử nghiệm da hợp là dựa vào hạt.

31. Phương pháp nhận diện môi trường phù hợp để gây ra hoặc cải thiện các đặc tính làm lành vết thương của quần thể tế bào gốc trung mô, trong đó phương pháp này bao gồm xác định mức của cả bốn protein được chọn từ nhóm bao gồm Angiopoietin 1 (Ang-1), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) được tiết vào môi trường bởi quần thể tế bào gốc trung mô, trong đó quần thể tế bào gốc trung mô của dây rốn là quần thể tế bào gốc trung mô của màng ối của dây rốn, trong đó việc sử dụng bao gồm xác định trong môi trường mức của cả bốn protein được tiết vào môi trường bởi quần thể tế bào gốc trung mô, và trong đó mức tiết ra của cả bốn protein bằng hoặc vượt quá giá trị ngưỡng cho thấy rằng môi trường là phù hợp để gây ra hoặc cải thiện các đặc tính làm lành vết thương của quần thể tế bào gốc trung mô.

Fig.1

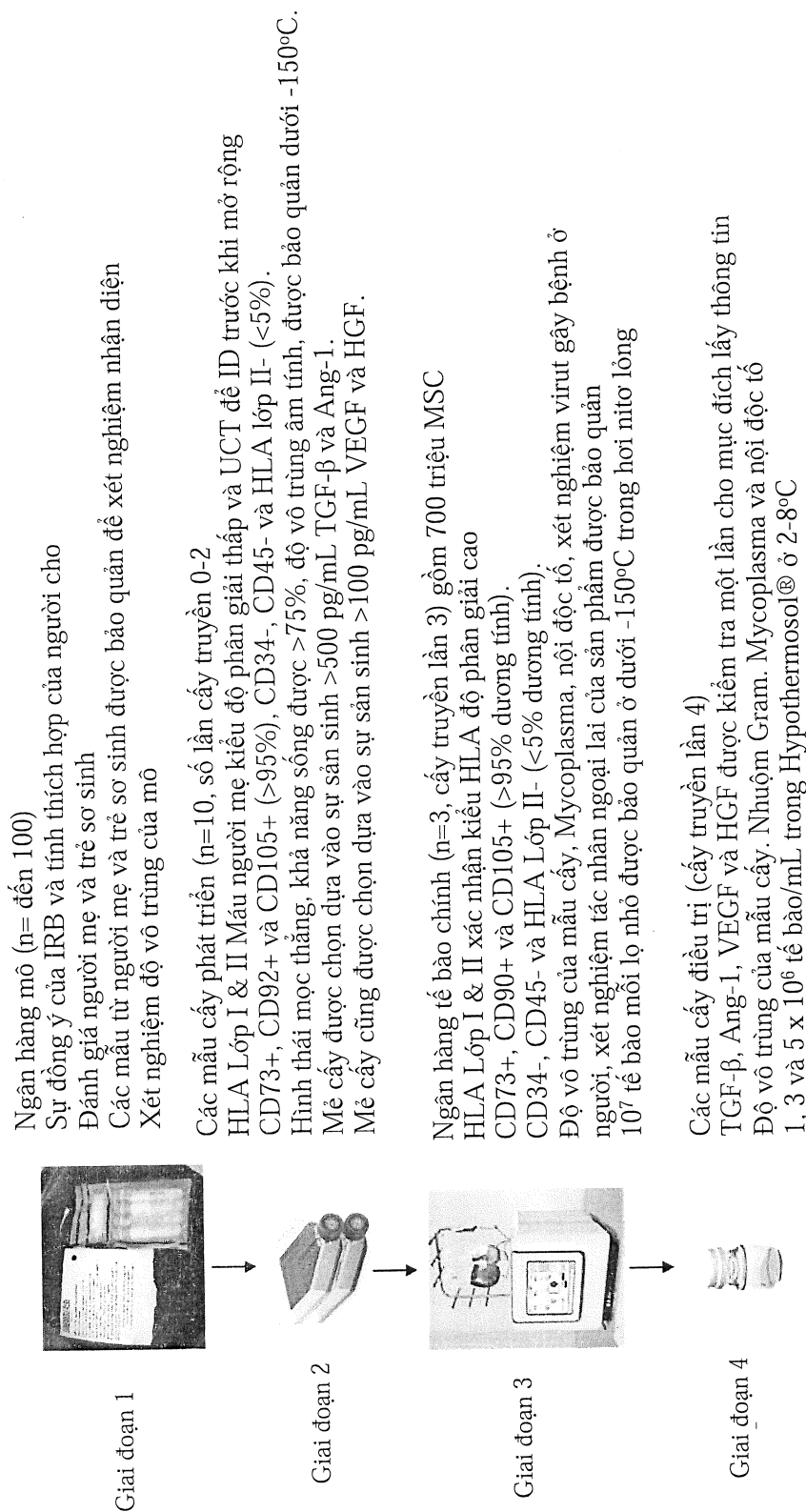


Fig.2

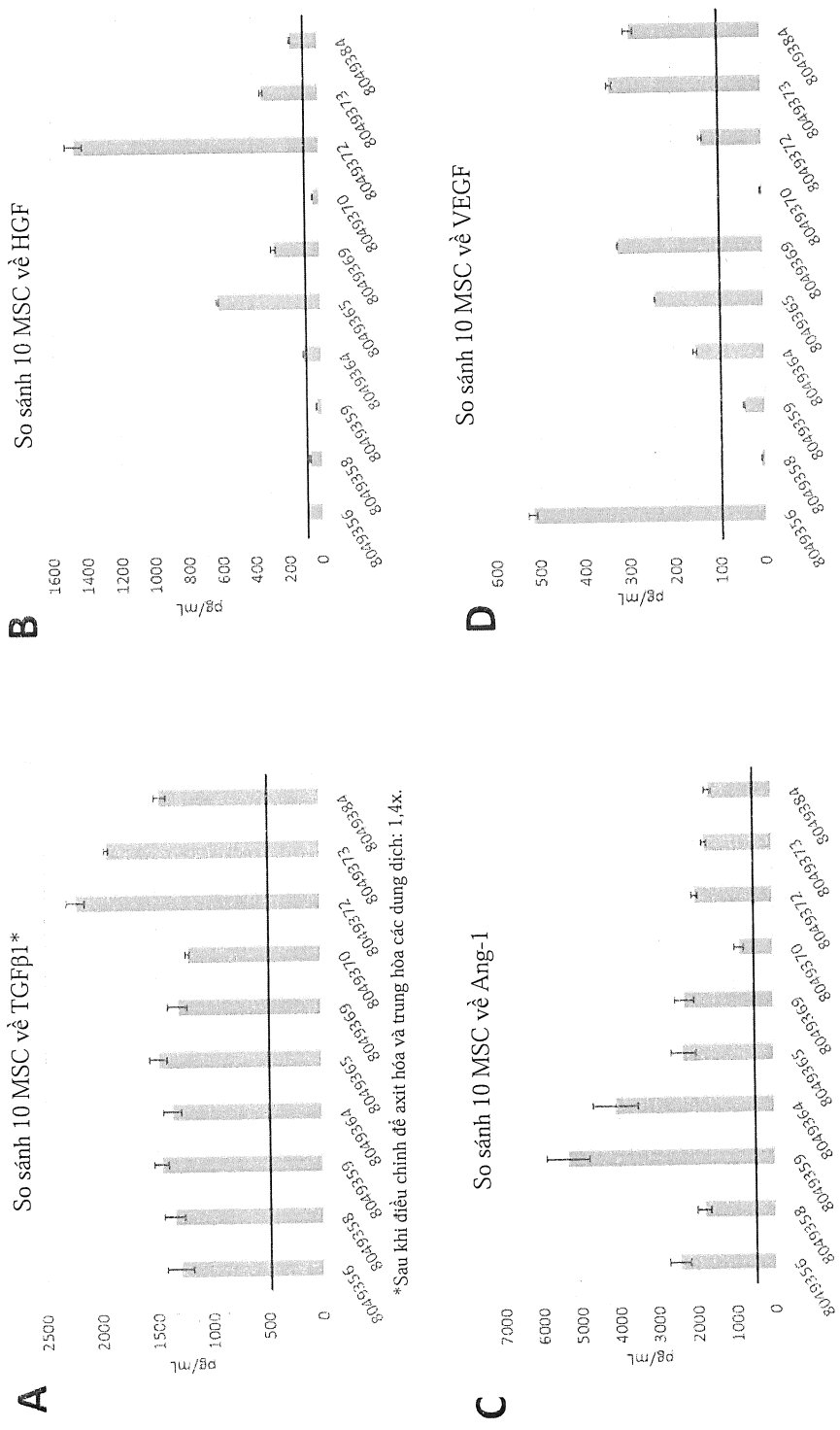
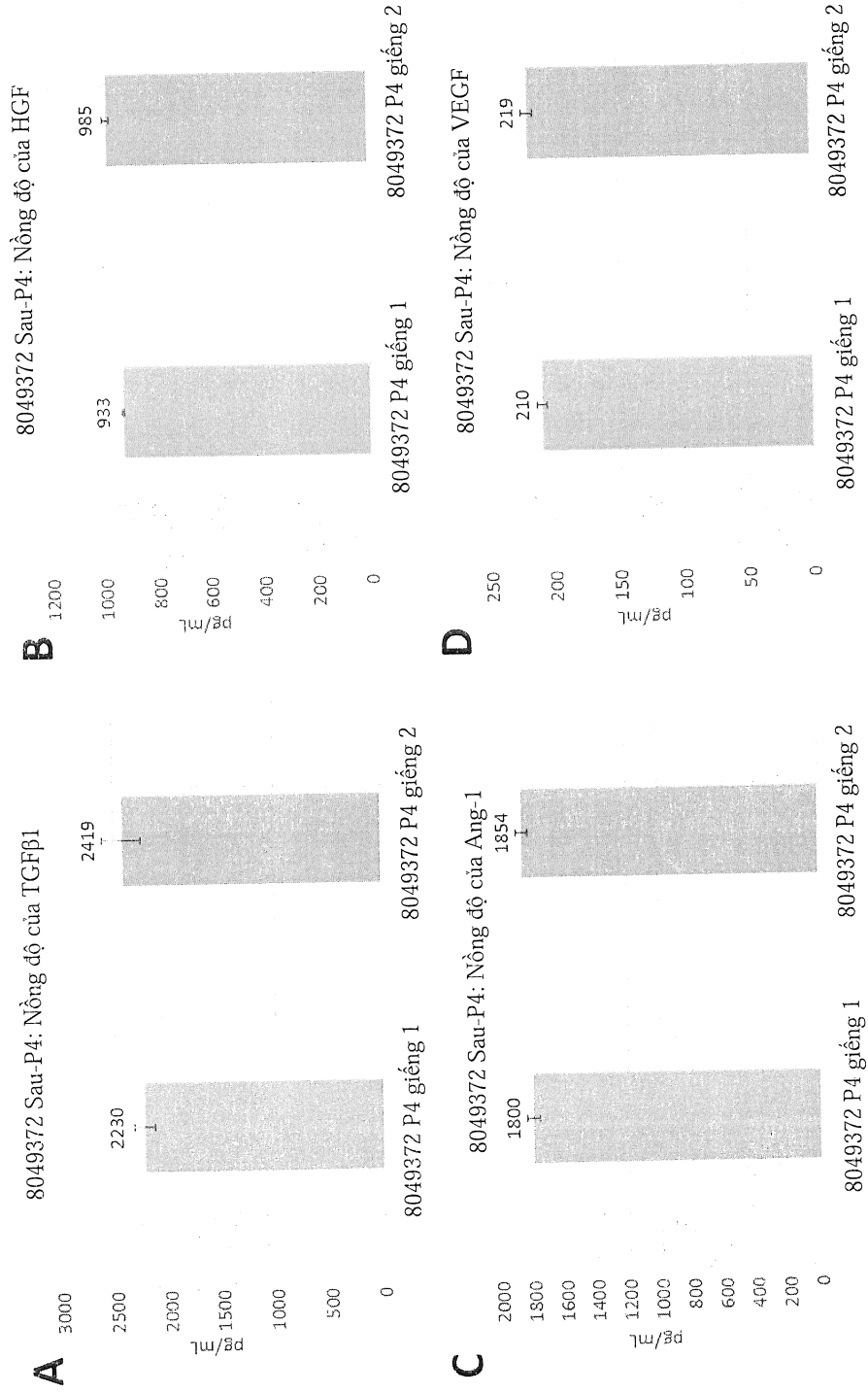
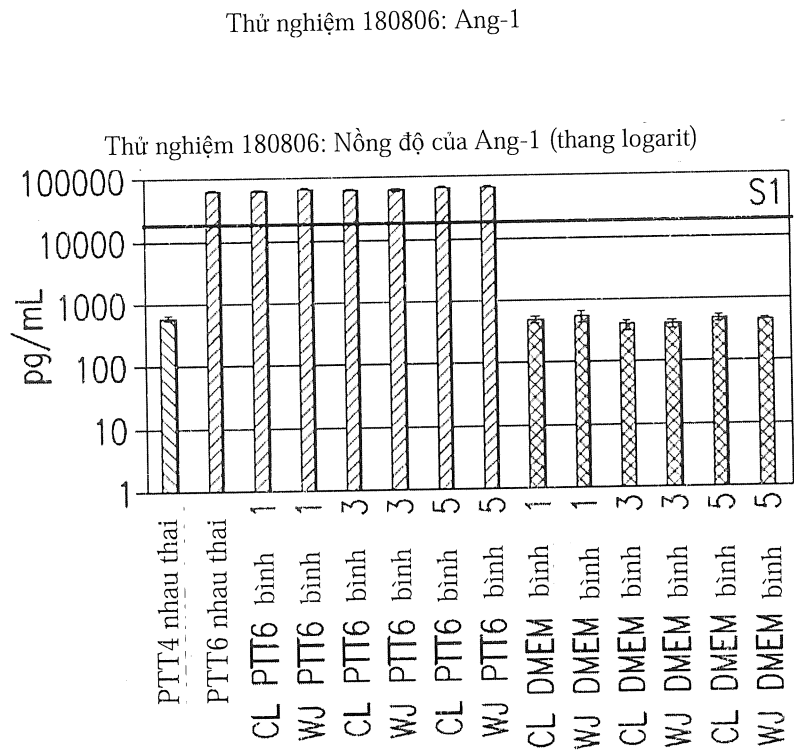


Fig.3



4 / 7

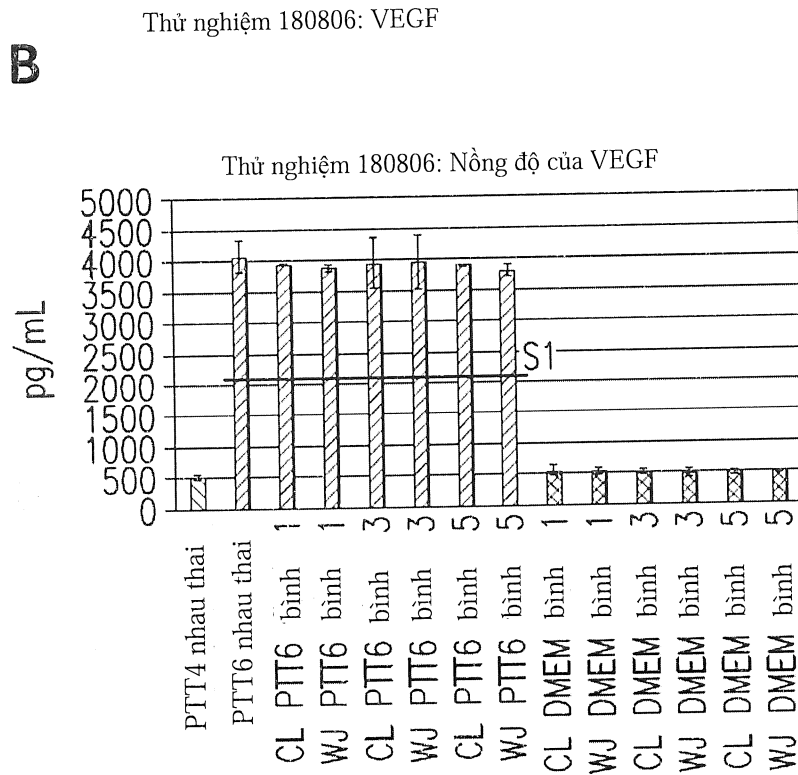
Fig.4

A

S1 biểu thị chuẩn cao nhất được dùng trong thử nghiệm.
 Mẫu bất kỳ mà ở trên được xem là dưới mức ngoại suy (quá đặc)

5 / 7

Fig.4 (tiếp)

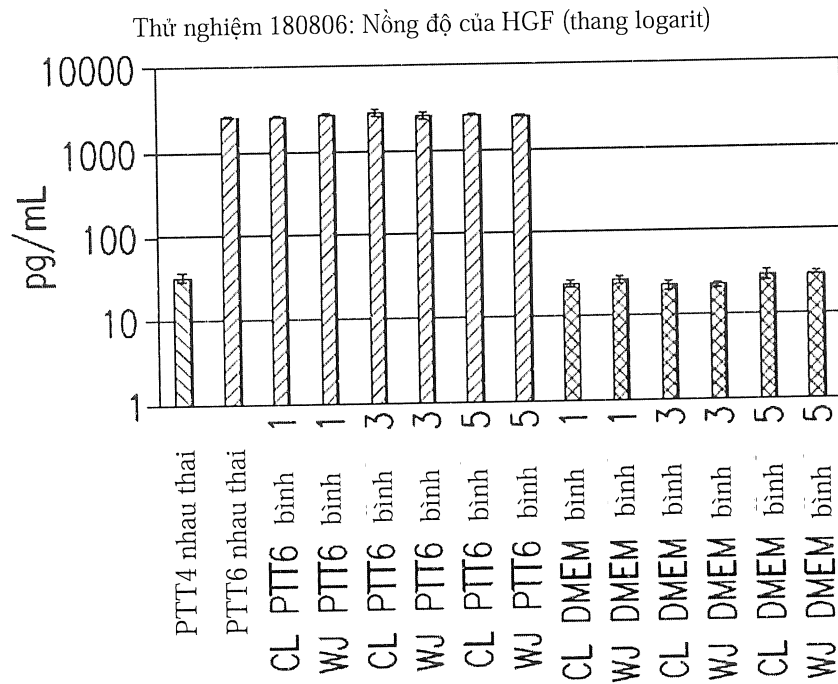


S1 biểu thị chuẩn cao nhất được dùng trong thử nghiệm.
Mẫu bất kỳ mà ở trên được xem là ngoại suy (quá đặc)

Fig.4 (tiếp)

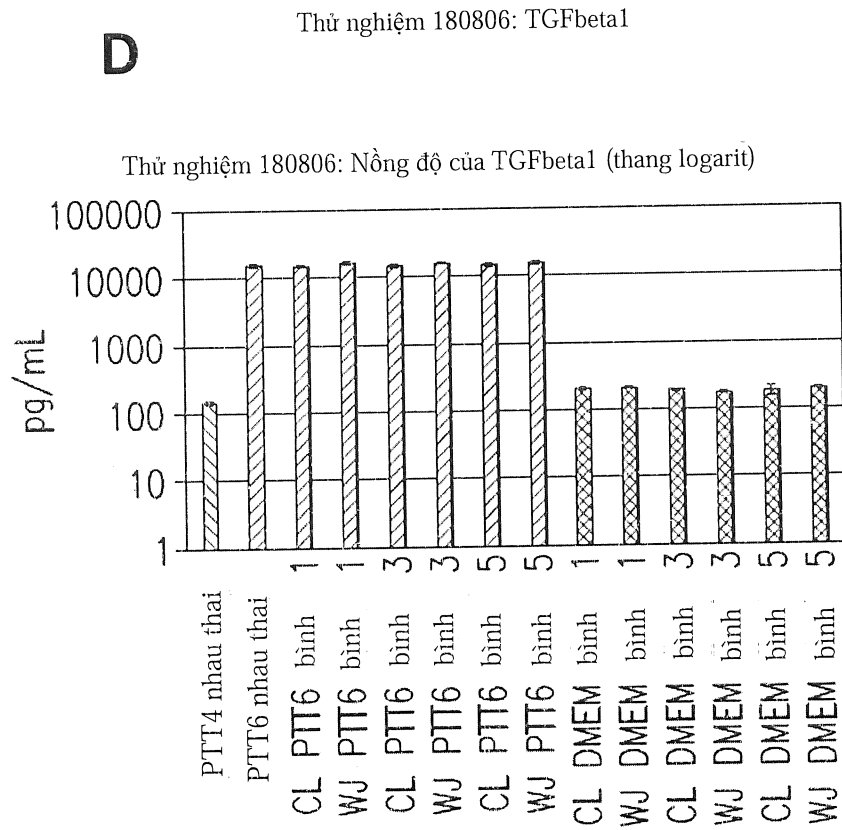
C

Thử nghiệm 180806: HGF



7/7

Fig.4 (tiếp)



* Sau khi điều chỉnh để axit hóa và trung hòa các dung dịch:
1,4x.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CELLRESEARCH CORPORATION PTE LTD

<120> PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG LÀM LÀNH VẾT THƯƠNG CỦA QUẦN THỂ TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ VÀ CÁC PHƯƠNG PHÁP LIÊN QUAN ĐỂ CHỌN LỌC TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ VÀ NHẬN DIỆN MÔ LÀM VẬT LIỆU BAN ĐẦU ĐỂ SẢN XUẤT QUẦN THỂ TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ

<130> SCH-5600-PV

<160> 10

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 498

<212> PRT

<213> người

<400> 1

Met Thr Val Phe Leu Ser Phe Ala Phe Leu Ala Ala Ile Leu Thr His
1 5 10 15

Ile Gly Cys Ser Asn Gln Arg Arg Ser Pro Glu Asn Ser Gly Arg Arg
20 25 30

Tyr Asn Arg Ile Gln His Gly Gln Cys Ala Tyr Thr Phe Ile Leu Pro
35 40 45

Glu His Asp Gly Asn Cys Arg Glu Ser Thr Thr Asp Gln Tyr Asn Thr
50 55 60

Asn Ala Leu Gln Arg Asp Ala Pro His Val Glu Pro Asp Phe Ser Ser
65 70 75 80

Gln Lys Leu Gln His Leu Glu His Val Met Glu Asn Tyr Thr Gln Trp
85 90 95

Leu Gln Lys Leu Glu Asn Tyr Ile Val Glu Asn Met Lys Ser Glu Met
100 105 110

Ala Gln Ile Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn His Thr Ala Thr Met Leu
115 120 125

Glu Ile Gly Thr Ser Leu Leu Ser Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys
130 135 140

Leu Thr Asp Val Glu Thr Gln Val Leu Asn Gln Thr Ser Arg Leu Glu
145 150 155 160

Ile Gln Leu Leu Glu Asn Ser Leu Ser Thr Tyr Lys Leu Glu Lys Gln
165 170 175

Leu Leu Gln Gln Thr Asn Glu Ile Leu Lys Ile His Glu Lys Asn Ser
180 185 190

Leu Leu Glu His Lys Ile Leu Glu Met Glu Gly Lys His Lys Glu Glu
195 200 205

Leu Asp Thr Leu Lys Glu Glu Lys Glu Asn Leu Gln Gly Leu Val Thr
210 215 220

Arg Gln Thr Tyr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Lys Gln Leu Asn Arg Ala
 225 230 235 240

Thr Thr Asn Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln Leu Glu Leu Met Asp
 245 250 255

Thr Val His Asn Leu Val Asn Leu Cys Thr Lys Glu Gly Val Leu Leu
 260 265 270

Lys Gly Gly Lys Arg Glu Glu Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp
 275 280 285

Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile
 290 295 300

Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn
 305 310 315 320

Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp
 325 330 335

Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser
 340 345 350

Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln
 355 360 365

Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg
 370 375 380

Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn
 385 390 395 400

Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser
 405 410 415

Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn
 420 425 430

Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp
 435 440 445

Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala
 450 455 460

Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys
 465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu
 485 490 495

Asp Phe

<210> 2
 <211> 503
 <212> PRT

<213> người

<400> 2

Met Glu Ala Ala Val Ala Ala Pro Arg Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr
 20 25 30
 Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys
 35 40 45
 Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys
 50 55 60
 Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg
 65 70 75 80
 Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr
 85 90 95
 Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro
 100 105 110
 Thr Thr Val Lys Ser Ser Pro Gly Leu Gly Pro Val Glu Leu Ala Ala
 115 120 125
 Val Ile Ala Gly Pro Val Cys Phe Val Cys Ile Ser Leu Met Leu Met
 130 135 140
 Val Tyr Ile Cys His Asn Arg Thr Val Ile His His Arg Val Pro Asn
 145 150 155 160
 Glu Glu Asp Pro Ser Leu Asp Arg Pro Phe Ile Ser Glu Gly Thr Thr
 165 170 175
 Leu Lys Asp Leu Ile Tyr Asp Met Thr Thr Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 180 185 190
 Leu Pro Leu Leu Val Gln Arg Thr Ile Ala Arg Thr Ile Val Leu Gln
 195 200 205
 Glu Ser Ile Gly Lys Gly Arg Phe Gly Glu Val Trp Arg Gly Lys Trp
 210 215 220
 Arg Gly Glu Glu Val Ala Val Lys Ile Phe Ser Ser Arg Glu Glu Arg
 225 230 235 240
 Ser Trp Phe Arg Glu Ala Glu Ile Tyr Gln Thr Val Met Leu Arg His
 245 250 255
 Glu Asn Ile Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Asn Lys Asp Asn Gly Thr
 260 265 270
 Trp Thr Gln Leu Trp Leu Val Ser Asp Tyr His Glu His Gly Ser Leu
 275 280 285
 Phe Asp Tyr Leu Asn Arg Tyr Thr Val Thr Val Glu Gly Met Ile Lys

290 295 300
 Leu Ala Leu Ser Thr Ala Ser Gly Leu Ala His Leu His Met Glu Ile
 305 310 315 320
 Val Gly Thr Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Ser
 325 330 335
 Lys Asn Ile Leu Val Lys Lys Asn Gly Thr Cys Cys Ile Ala Asp Leu
 340 345 350
 Gly Leu Ala Val Arg His Asp Ser Ala Thr Asp Thr Ile Asp Ile Ala
 355 360 365
 Pro Asn His Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu
 370 375 380
 Asp Asp Ser Ile Asn Met Lys His Phe Glu Ser Phe Lys Arg Ala Asp
 385 390 395 400
 Ile Tyr Ala Met Gly Leu Val Phe Trp Glu Ile Ala Arg Arg Cys Ser
 405 410 415
 Ile Gly Gly Ile His Glu Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Tyr Asp Leu Val
 420 425 430
 Pro Ser Asp Pro Ser Val Glu Glu Met Arg Lys Val Val Cys Glu Gln
 435 440 445
 Lys Leu Arg Pro Asn Ile Pro Asn Arg Trp Gln Ser Cys Glu Ala Leu
 450 455 460
 Arg Val Met Ala Lys Ile Met Arg Glu Cys Trp Tyr Ala Asn Gly Ala
 465 470 475 480
 Ala Arg Leu Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Ser Gln Leu Ser
 485 490 495
 Gln Gln Glu Gly Ile Lys Met
 500

 <210> 3
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> người
 <400> 3
 Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
 20 25 30
 Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
 35 40 45
 Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys Ser Val
130 135 140

Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr
145 150 155 160

Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val Gly Ala Arg Cys Cys Leu Met Pro Trp
165 170 175

Ser Leu Pro Gly Pro His Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys
180 185 190

His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn
195 200 205

Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr
210 215 220

Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
225 230

<210> 4

<211> 728

<212> PRT

<213> người

<400> 4

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu
1 5 10 15

Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln
20 25 30

Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr
35 40 45

Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val
50 55 60

Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu
65 70 75 80

Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys
85 90 95

Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe
 100 105 110
 Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys
 115 120 125
 Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys
 130 135 140
 Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
 145 150 155 160
 Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr
 165 170 175
 Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser
 180 185 190
 Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu
 195 200 205
 Val Glu Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp
 210 215 220
 His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro
 225 230 235 240
 His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp
 245 250 255
 Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr
 260 265 270
 Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys
 275 280 285
 Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu
 290 295 300
 Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile
 305 310 315 320
 Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu
 325 330 335
 His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn
 340 345 350
 Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr
 355 360 365
 Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp
 370 375 380
 Met Ser His Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met
 385 390 395 400

Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp
 405 410 415
 Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala
 420 425 430
 Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His
 435 440 445
 Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys
 450 455 460
 Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu
 465 470 475 480
 Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val
 485 490 495
 Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg
 500 505 510
 Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp
 515 520 525
 Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr
 530 535 540
 Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys
 545 550 555 560
 Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly
 565 570 575
 Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp
 580 585 590
 Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu
 595 600 605
 Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn
 610 615 620
 Tyr Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu
 625 630 635 640
 Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu
 645 650 655
 Ile Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp
 660 665 670
 Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu
 675 680 685
 Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly
 690 695 700

Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile
705 710 715 720

Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser
725

<210> 5

<211> 574

<212> PRT

<213> người

<400> 5

Met Cys Pro Arg Ala Ala Arg Ala Pro Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

Gly Ala Val Leu Trp Pro Ala Ala Gly Ala Trp Glu Leu Thr Ile Leu
20 25 30

His Thr Asn Asp Val His Ser Arg Leu Glu Gln Thr Ser Glu Asp Ser
35 40 45

Ser Lys Cys Val Asn Ala Ser Arg Cys Met Gly Gly Val Ala Arg Leu
50 55 60

Phe Thr Lys Val Gln Gln Ile Arg Arg Ala Glu Pro Asn Val Leu Leu
65 70 75 80

Leu Asp Ala Gly Asp Gln Tyr Gln Gly Thr Ile Trp Phe Thr Val Tyr
85 90 95

Lys Gly Ala Glu Val Ala His Phe Met Asn Ala Leu Arg Tyr Asp Ala
100 105 110

Met Ala Leu Gly Asn His Glu Phe Asp Asn Gly Val Glu Gly Leu Ile
115 120 125

Glu Pro Leu Leu Lys Glu Ala Lys Phe Pro Ile Leu Ser Ala Asn Ile
130 135 140

Lys Ala Lys Gly Pro Leu Ala Ser Gln Ile Ser Gly Leu Tyr Leu Pro
145 150 155 160

Tyr Lys Val Leu Pro Val Gly Asp Glu Val Val Gly Ile Val Gly Tyr
165 170 175

Thr Ser Lys Glu Thr Pro Phe Leu Ser Asn Pro Gly Thr Asn Leu Val
180 185 190

Phe Glu Asp Glu Ile Thr Ala Leu Gln Pro Glu Val Asp Lys Leu Lys
195 200 205

Thr Leu Asn Val Asn Lys Ile Ile Ala Leu Gly His Ser Gly Phe Glu
210 215 220

Met Asp Lys Leu Ile Ala Gln Lys Val Arg Gly Val Asp Val Val Val
225 230 235 240

Gly Gly His Ser Asn Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Asn Pro Pro Ser Lys

				245						250						255
Glu	Val	Pro	Ala	Gly	Lys	Tyr	Pro	Phe	Ile	Val	Thr	Ser	Asp	Asp	Gly	
			260					265					270			
Arg	Lys	Val	Pro	Val	Val	Gln	Ala	Tyr	Ala	Phe	Gly	Lys	Tyr	Leu	Gly	
		275					280					285				
Tyr	Leu	Lys	Ile	Glu	Phe	Asp	Glu	Arg	Gly	Asn	Val	Ile	Ser	Ser	His	
	290					295					300					
Gly	Asn	Pro	Ile	Leu	Leu	Asn	Ser	Ser	Ile	Pro	Glu	Asp	Pro	Ser	Ile	
305					310					315					320	
Lys	Ala	Asp	Ile	Asn	Lys	Trp	Arg	Ile	Lys	Leu	Asp	Asn	Tyr	Ser	Thr	
				325					330					335		
Gln	Glu	Leu	Gly	Lys	Thr	Ile	Val	Tyr	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Gln	Ser	
			340					345						350		
Cys	Arg	Phe	Arg	Glu	Cys	Asn	Met	Gly	Asn	Leu	Ile	Cys	Asp	Ala	Met	
		355					360					365				
Ile	Asn	Asn	Asn	Leu	Arg	His	Thr	Asp	Glu	Met	Phe	Trp	Asn	His	Val	
	370					375					380					
Ser	Met	Cys	Ile	Leu	Asn	Gly	Gly	Gly	Ile	Arg	Ser	Pro	Ile	Asp	Glu	
385					390					395					400	
Arg	Asn	Asn	Gly	Thr	Ile	Thr	Trp	Glu	Asn	Leu	Ala	Ala	Val	Leu	Pro	
				405					410					415		
Phe	Gly	Gly	Thr	Phe	Asp	Leu	Val	Gln	Leu	Lys	Gly	Ser	Thr	Leu	Lys	
			420					425					430			
Lys	Ala	Phe	Glu	His	Ser	Val	His	Arg	Tyr	Gly	Gln	Ser	Thr	Gly	Glu	
		435					440					445				
Phe	Leu	Gln	Val	Gly	Gly	Ile	His	Val	Val	Tyr	Asp	Leu	Ser	Arg	Lys	
	450					455					460					
Pro	Gly	Asp	Arg	Val	Val	Lys	Leu	Asp	Val	Leu	Cys	Thr	Lys	Cys	Arg	
465						470				475					480	
Val	Pro	Ser	Tyr	Asp	Pro	Leu	Lys	Met	Asp	Glu	Val	Tyr	Lys	Val	Ile	
				485					490					495		
Leu	Pro	Asn	Phe	Leu	Ala	Asn	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Gln	Met	Ile	Lys	
			500					505					510			
Asp	Glu	Leu	Leu	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Asp	Gln	Asp	Ile	Asn	Val	Val	
		515					520					525				
Ser	Thr	Tyr	Ile	Ser	Lys	Met	Lys	Val	Ile	Tyr	Pro	Ala	Val	Glu	Gly	
	530					535					540					
Arg	Ile	Lys	Phe	Ser	Thr	Gly	Ser	His	Cys	His	Gly	Ser	Phe	Ser	Leu	

545 550 555 560
 Ile Phe Leu Ser Leu Trp Ala Val Ile Phe Val Leu Tyr Gln
 565 570

- <210> 6
- <211> 161
- <212> PRT
- <213> người
- <400> 6

Met Asn Leu Ala Ile Ser Ile Ala Leu Leu Leu Thr Val Leu Gln Val
 1 5 10 15

 Ser Arg Gly Gln Lys Val Thr Ser Leu Thr Ala Cys Leu Val Asp Gln
 20 25 30

 Ser Leu Arg Leu Asp Cys Arg His Glu Asn Thr Ser Ser Ser Pro Ile
 35 40 45

 Gln Tyr Glu Phe Ser Leu Thr Arg Glu Thr Lys Lys His Val Leu Phe
 50 55 60

 Gly Thr Val Gly Val Pro Glu His Thr Tyr Arg Ser Arg Thr Asn Phe
 65 70 75 80

 Thr Ser Lys Tyr Asn Met Lys Val Leu Tyr Leu Ser Ala Phe Thr Ser
 85 90 95

 Lys Asp Glu Gly Thr Tyr Thr Cys Ala Leu His His Ser Gly His Ser
 100 105 110

 Pro Pro Ile Ser Ser Gln Asn Val Thr Val Leu Arg Asp Lys Leu Val
 115 120 125

 Lys Cys Glu Gly Ile Ser Leu Leu Ala Gln Asn Thr Ser Trp Leu Leu
 130 135 140

 Leu Leu Leu Leu Ser Leu Ser Leu Leu Gln Ala Thr Asp Phe Met Ser
 145 150 155 160

 Leu

- <210> 7
- <211> 658
- <212> PRT
- <213> người
- <400> 7

Met Asp Arg Gly Thr Leu Pro Leu Ala Val Ala Leu Leu Leu Ala Ser
 1 5 10 15

 Cys Ser Leu Ser Pro Thr Ser Leu Ala Glu Thr Val His Cys Asp Leu
 20 25 30

 Gln Pro Val Gly Pro Glu Arg Gly Glu Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln
 35 40 45

Val Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val
 50 55 60

His Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu
 65 70 75 80

Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu
 85 90 95

Leu Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val Phe Leu His Leu Gln Ala Leu
 100 105 110

Gly Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln
 115 120 125

Glu Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr
 130 135 140

Gln Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala
 145 150 155 160

Glu Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln
 165 170 175

Gly Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg
 180 185 190

Thr Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro Ala Leu Val Arg Gly Cys His
 195 200 205

Leu Glu Gly Val Ala Gly His Lys Glu Ala His Ile Leu Arg Val Leu
 210 215 220

Pro Gly His Ser Ala Gly Pro Arg Thr Val Thr Val Lys Val Glu Leu
 225 230 235 240

Ser Cys Ala Pro Gly Asp Leu Asp Ala Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro
 245 250 255

Pro Tyr Val Ser Trp Leu Ile Asp Ala Asn His Asn Met Gln Ile Trp
 260 265 270

Thr Thr Gly Glu Tyr Ser Phe Lys Ile Phe Pro Glu Lys Asn Ile Arg
 275 280 285

Gly Phe Lys Leu Pro Asp Thr Pro Gln Gly Leu Leu Gly Glu Ala Arg
 290 295 300

Met Leu Asn Ala Ser Ile Val Ala Ser Phe Val Glu Leu Pro Leu Ala
 305 310 315 320

Ser Ile Val Ser Leu His Ala Ser Ser Cys Gly Gly Arg Leu Gln Thr
 325 330 335

Ser Pro Ala Pro Ile Gln Thr Thr Pro Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro
 340 345 350

Glu Leu Leu Met Ser Leu Ile Gln Thr Lys Cys Ala Asp Asp Ala Met
 355 360 365

Thr Leu Val Leu Lys Lys Glu Leu Val Ala His Leu Lys Cys Thr Ile
 370 375 380

Thr Gly Leu Thr Phe Trp Asp Pro Ser Cys Glu Ala Glu Asp Arg Gly
 385 390 395 400

Asp Lys Phe Val Leu Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Cys Gly Met Gln Val
 405 410 415

Ser Ala Ser Met Ile Ser Asn Glu Ala Val Val Asn Ile Leu Ser Ser
 420 425 430

Ser Ser Pro Gln Arg Lys Lys Val His Cys Leu Asn Met Asp Ser Leu
 435 440 445

Ser Phe Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser Pro His Phe Leu Gln Ala Ser
 450 455 460

Asn Thr Ile Glu Pro Gly Gln Gln Ser Phe Val Gln Val Arg Val Ser
 465 470 475 480

Pro Ser Val Ser Glu Phe Leu Leu Gln Leu Asp Ser Cys His Leu Asp
 485 490 495

Leu Gly Pro Glu Gly Gly Thr Val Glu Leu Ile Gln Gly Arg Ala Ala
 500 505 510

Lys Gly Asn Cys Val Ser Leu Leu Ser Pro Ser Pro Glu Gly Asp Pro
 515 520 525

Arg Phe Ser Phe Leu Leu His Phe Tyr Thr Val Pro Ile Pro Lys Thr
 530 535 540

Gly Thr Leu Ser Cys Thr Val Ala Leu Arg Pro Lys Thr Gly Ser Gln
 545 550 555 560

Asp Gln Glu Val His Arg Thr Val Phe Met Arg Leu Asn Ile Ile Ser
 565 570 575

Pro Asp Leu Ser Gly Cys Thr Ser Lys Gly Leu Val Leu Pro Ala Val
 580 585 590

Leu Gly Ile Thr Phe Gly Ala Phe Leu Ile Gly Ala Leu Leu Thr Ala
 595 600 605

Ala Leu Trp Tyr Ile Tyr Ser His Thr Arg Ser Pro Ser Lys Arg Glu
 610 615 620

Pro Val Val Ala Val Ala Ala Pro Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ser Thr
 625 630 635 640

Asn His Ser Ile Gly Ser Thr Gln Ser Thr Pro Cys Ser Thr Ser Ser
 645 650 655

Met Ala

<210> 8

<211> 385

<212> PRT

<213> người

<400> 8

Met Leu Val Arg Arg Gly Ala Arg Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Gly
 1 5 10 15

Trp Thr Ala Leu Cys Leu Leu Ser Leu Leu Pro Ser Gly Phe Met Ser
 20 25 30

Leu Asp Asn Asn Gly Thr Ala Thr Pro Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr
 35 40 45

Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser Tyr Gln Glu Thr Thr Thr Pro
 50 55 60

Ser Thr Leu Gly Ser Thr Ser Leu His Pro Val Ser Gln His Gly Asn
 65 70 75 80

Glu Ala Thr Thr Asn Ile Thr Glu Thr Thr Val Lys Phe Thr Ser Thr
 85 90 95

Ser Val Ile Thr Ser Val Tyr Gly Asn Thr Asn Ser Ser Val Gln Ser
 100 105 110

Gln Thr Ser Val Ile Ser Thr Val Phe Thr Thr Pro Ala Asn Val Ser
 115 120 125

Thr Pro Glu Thr Thr Leu Lys Pro Ser Leu Ser Pro Gly Asn Val Ser
 130 135 140

Asp Leu Ser Thr Thr Ser Thr Ser Leu Ala Thr Ser Pro Thr Lys Pro
 145 150 155 160

Tyr Thr Ser Ser Ser Pro Ile Leu Ser Asp Ile Lys Ala Glu Ile Lys
 165 170 175

Cys Ser Gly Ile Arg Glu Val Lys Leu Thr Gln Gly Ile Cys Leu Glu
 180 185 190

Gln Asn Lys Thr Ser Ser Cys Ala Glu Phe Lys Lys Asp Arg Gly Glu
 195 200 205

Gly Leu Ala Arg Val Leu Cys Gly Glu Glu Gln Ala Asp Ala Asp Ala
 210 215 220

Gly Ala Gln Val Cys Ser Leu Leu Leu Ala Gln Ser Glu Val Arg Pro
 225 230 235 240

Gln Cys Leu Leu Leu Val Leu Ala Asn Arg Thr Glu Ile Ser Ser Lys
 245 250 255

Leu Gln Leu Met Lys Lys His Gln Ser Asp Leu Lys Lys Leu Gly Ile

		260						265						270			
Leu	Asp	Phe	Thr	Glu	Gln	Asp	Val	Ala	Ser	His	Gln	Ser	Tyr	Ser	Gln		
		275					280					285					
Lys	Thr	Leu	Ile	Ala	Leu	Val	Thr	Ser	Gly	Ala	Leu	Leu	Ala	Val	Leu		
	290					295					300						
Gly	Ile	Thr	Gly	Tyr	Phe	Leu	Met	Asn	Arg	Arg	Ser	Trp	Ser	Pro	Thr		
305					310					315					320		
Gly	Glu	Arg	Leu	Gly	Glu	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Thr	Glu	Asn	Gly	Gly	Gly		
				325					330					335			
Gln	Gly	Tyr	Ser	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Ser	Pro	Glu	Ala	Gln	Gly	Lys		
			340					345					350				
Ala	Ser	Val	Asn	Arg	Gly	Ala	Gln	Glu	Asn	Gly	Thr	Gly	Gln	Ala	Thr		
		355					360					365					
Ser	Arg	Asn	Gly	His	Ser	Ala	Arg	Gln	His	Val	Val	Ala	Asp	Thr	Glu		
	370					375					380						
Leu																	
385																	
<210>	9																
<211>	1304																
<212>	PRT																
<213>	người																
<400>	9																
Met	Tyr	Leu	Trp	Leu	Lys	Leu	Leu	Ala	Phe	Gly	Phe	Ala	Phe	Leu	Asp		
1				5					10					15			
Thr	Glu	Val	Phe	Val	Thr	Gly	Gln	Ser	Pro	Thr	Pro	Ser	Pro	Thr	Gly		
			20					25					30				
Leu	Thr	Thr	Ala	Lys	Met	Pro	Ser	Val	Pro	Leu	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu		
		35					40					45					
Pro	Thr	His	Thr	Thr	Ala	Phe	Ser	Pro	Ala	Ser	Thr	Phe	Glu	Arg	Glu		
	50					55					60						
Asn	Asp	Phe	Ser	Glu	Thr	Thr	Thr	Ser	Leu	Ser	Pro	Asp	Asn	Thr	Ser		
65					70					75					80		
Thr	Gln	Val	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Asp	Asn	Ala	Ser	Ala	Phe	Asn	Thr		
				85					90					95			
Thr	Gly	Val	Ser	Ser	Val	Gln	Thr	Pro	His	Leu	Pro	Thr	His	Ala	Asp		
			100					105					110				
Ser	Gln	Thr	Pro	Ser	Ala	Gly	Thr	Asp	Thr	Gln	Thr	Phe	Ser	Gly	Ser		
		115					120					125					
Ala	Ala	Asn	Ala	Lys	Leu	Asn	Pro	Thr	Pro	Gly	Ser	Asn	Ala	Ile	Ser		
	130					135					140						

Asp Val Pro Gly Glu Arg Ser Thr Ala Ser Thr Phe Pro Thr Asp Pro
 145 150 155 160

Val Ser Pro Leu Thr Thr Thr Leu Ser Leu Ala His His Ser Ser Ala
 165 170 175

Ala Leu Pro Ala Arg Thr Ser Asn Thr Thr Ile Thr Ala Asn Thr Ser
 180 185 190

Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Ser Glu Thr Thr Thr Leu Ser Pro Ser Gly
 195 200 205

Ser Ala Val Ile Ser Thr Thr Thr Ile Ala Thr Thr Pro Ser Lys Pro
 210 215 220

Thr Cys Asp Glu Lys Tyr Ala Asn Ile Thr Val Asp Tyr Leu Tyr Asn
 225 230 235 240

Lys Glu Thr Lys Leu Phe Thr Ala Lys Leu Asn Val Asn Glu Asn Val
 245 250 255

Glu Cys Gly Asn Asn Thr Cys Thr Asn Asn Glu Val His Asn Leu Thr
 260 265 270

Glu Cys Lys Asn Ala Ser Val Ser Ile Ser His Asn Ser Cys Thr Ala
 275 280 285

Pro Asp Lys Thr Leu Ile Leu Asp Val Pro Pro Gly Val Glu Lys Phe
 290 295 300

Gln Leu His Asp Cys Thr Gln Val Glu Lys Ala Asp Thr Thr Ile Cys
 305 310 315 320

Leu Lys Trp Lys Asn Ile Glu Thr Phe Thr Cys Asp Thr Gln Asn Ile
 325 330 335

Thr Tyr Arg Phe Gln Cys Gly Asn Met Ile Phe Asp Asn Lys Glu Ile
 340 345 350

Lys Leu Glu Asn Leu Glu Pro Glu His Glu Tyr Lys Cys Asp Ser Glu
 355 360 365

Ile Leu Tyr Asn Asn His Lys Phe Thr Asn Ala Ser Lys Ile Ile Lys
 370 375 380

Thr Asp Phe Gly Ser Pro Gly Glu Pro Gln Ile Ile Phe Cys Arg Ser
 385 390 395 400

Glu Ala Ala His Gln Gly Val Ile Thr Trp Asn Pro Pro Gln Arg Ser
 405 410 415

Phe His Asn Phe Thr Leu Cys Tyr Ile Lys Glu Thr Glu Lys Asp Cys
 420 425 430

Leu Asn Leu Asp Lys Asn Leu Ile Lys Tyr Asp Leu Gln Asn Leu Lys
 435 440 445

Pro Tyr Thr Lys Tyr Val Leu Ser Leu His Ala Tyr Ile Ile Ala Lys
 450 455 460

Val Gln Arg Asn Gly Ser Ala Ala Met Cys His Phe Thr Thr Lys Ser
 465 470 475 480

Ala Pro Pro Ser Gln Val Trp Asn Met Thr Val Ser Met Thr Ser Asp
 485 490 495

Asn Ser Met His Val Lys Cys Arg Pro Pro Arg Asp Arg Asn Gly Pro
 500 505 510

His Glu Arg Tyr His Leu Glu Val Glu Ala Gly Asn Thr Leu Val Arg
 515 520 525

Asn Glu Ser His Lys Asn Cys Asp Phe Arg Val Lys Asp Leu Gln Tyr
 530 535 540

Ser Thr Asp Tyr Thr Phe Lys Ala Tyr Phe His Asn Gly Asp Tyr Pro
 545 550 555 560

Gly Glu Pro Phe Ile Leu His His Ser Thr Ser Tyr Asn Ser Lys Ala
 565 570 575

Leu Ile Ala Phe Leu Ala Phe Leu Ile Ile Val Thr Ser Ile Ala Leu
 580 585 590

Leu Val Val Leu Tyr Lys Ile Tyr Asp Leu His Lys Lys Arg Ser Cys
 595 600 605

Asn Leu Asp Glu Gln Gln Glu Leu Val Glu Arg Asp Asp Glu Lys Gln
 610 615 620

Leu Met Asn Val Glu Pro Ile His Ala Asp Ile Leu Leu Glu Thr Tyr
 625 630 635 640

Lys Arg Lys Ile Ala Asp Glu Gly Arg Leu Phe Leu Ala Glu Phe Gln
 645 650 655

Ser Ile Pro Arg Val Phe Ser Lys Phe Pro Ile Lys Glu Ala Arg Lys
 660 665 670

Pro Phe Asn Gln Asn Lys Asn Arg Tyr Val Asp Ile Leu Pro Tyr Asp
 675 680 685

Tyr Asn Arg Val Glu Leu Ser Glu Ile Asn Gly Asp Ala Gly Ser Asn
 690 695 700

Tyr Ile Asn Ala Ser Tyr Ile Asp Gly Phe Lys Glu Pro Arg Lys Tyr
 705 710 715 720

Ile Ala Ala Gln Gly Pro Arg Asp Glu Thr Val Asp Asp Phe Trp Arg
 725 730 735

Met Ile Trp Glu Gln Lys Ala Thr Val Ile Val Met Val Thr Arg Cys
 740 745 750

Glu Glu Gly Asn Arg Asn Lys Cys Ala Glu Tyr Trp Pro Ser Met Glu
 755 760 765
 Glu Gly Thr Arg Ala Phe Gly Asp Val Val Val Lys Ile Asn Gln His
 770 775 780
 Lys Arg Cys Pro Asp Tyr Ile Ile Gln Lys Leu Asn Ile Val Asn Lys
 785 790 795 800
 Lys Glu Lys Ala Thr Gly Arg Glu Val Thr His Ile Gln Phe Thr Ser
 805 810 815
 Trp Pro Asp His Gly Val Pro Glu Asp Pro His Leu Leu Leu Lys Leu
 820 825 830
 Arg Arg Arg Val Asn Ala Phe Ser Asn Phe Phe Ser Gly Pro Ile Val
 835 840 845
 Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly Thr Tyr Ile Gly Ile
 850 855 860
 Asp Ala Met Leu Glu Gly Leu Glu Ala Glu Asn Lys Val Asp Val Tyr
 865 870 875 880
 Gly Tyr Val Val Lys Leu Arg Arg Gln Arg Cys Leu Met Val Gln Val
 885 890 895
 Glu Ala Gln Tyr Ile Leu Ile His Gln Ala Leu Val Glu Tyr Asn Gln
 900 905 910
 Phe Gly Glu Thr Glu Val Asn Leu Ser Glu Leu His Pro Tyr Leu His
 915 920 925
 Asn Met Lys Lys Arg Asp Pro Pro Ser Glu Pro Ser Pro Leu Glu Ala
 930 935 940
 Glu Phe Gln Arg Leu Pro Ser Tyr Arg Ser Trp Arg Thr Gln His Ile
 945 950 955 960
 Gly Asn Gln Glu Glu Asn Lys Ser Lys Asn Arg Asn Ser Asn Val Ile
 965 970 975
 Pro Tyr Asp Tyr Asn Arg Val Pro Leu Lys His Glu Leu Glu Met Ser
 980 985 990
 Lys Glu Ser Glu His Asp Ser Asp Glu Ser Ser Asp Asp Asp Ser Asp
 995 1000 1005
 Ser Glu Glu Pro Ser Lys Tyr Ile Asn Ala Ser Phe Ile Met Ser
 1010 1015 1020
 Tyr Trp Lys Pro Glu Val Met Ile Ala Ala Gln Gly Pro Leu Lys
 1025 1030 1035
 Glu Thr Ile Gly Asp Phe Trp Gln Met Ile Phe Gln Arg Lys Val
 1040 1045 1050

Lys Val Ile Val Met Leu Thr Glu Leu Lys His Gly Asp Gln Glu
 1055 1060 1065
 Ile Cys Ala Gln Tyr Trp Gly Glu Gly Lys Gln Thr Tyr Gly Asp
 1070 1075 1080
 Ile Glu Val Asp Leu Lys Asp Thr Asp Lys Ser Ser Thr Tyr Thr
 1085 1090 1095
 Leu Arg Val Phe Glu Leu Arg His Ser Lys Arg Lys Asp Ser Arg
 1100 1105 1110
 Thr Val Tyr Gln Tyr Gln Tyr Thr Asn Trp Ser Val Glu Gln Leu
 1115 1120 1125
 Pro Ala Glu Pro Lys Glu Leu Ile Ser Met Ile Gln Val Val Lys
 1130 1135 1140
 Gln Lys Leu Pro Gln Lys Asn Ser Ser Glu Gly Asn Lys His His
 1145 1150 1155
 Lys Ser Thr Pro Leu Leu Ile His Cys Arg Asp Gly Ser Gln Gln
 1160 1165 1170
 Thr Gly Ile Phe Cys Ala Leu Leu Asn Leu Leu Glu Ser Ala Glu
 1175 1180 1185
 Thr Glu Glu Val Val Asp Ile Phe Gln Val Val Lys Ala Leu Arg
 1190 1195 1200
 Lys Ala Arg Pro Gly Met Val Ser Thr Phe Glu Gln Tyr Gln Phe
 1205 1210 1215
 Leu Tyr Asp Val Ile Ala Ser Thr Tyr Pro Ala Gln Asn Gly Gln
 1220 1225 1230
 Val Lys Lys Asn Asn His Gln Glu Asp Lys Ile Glu Phe Asp Asn
 1235 1240 1245
 Glu Val Asp Lys Val Lys Gln Asp Ala Asn Cys Val Asn Pro Leu
 1250 1255 1260
 Gly Ala Pro Glu Lys Leu Pro Glu Ala Lys Glu Gln Ala Glu Gly
 1265 1270 1275
 Ser Glu Pro Thr Ser Gly Thr Glu Gly Pro Glu His Ser Val Asn
 1280 1285 1290
 Gly Pro Ala Ser Pro Ala Leu Asn Gln Gly Ser
 1295 1300

<210> 10
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> người
 <400> 10

Met Ala Ile Ser Gly Val Pro Val Leu Gly Phe Phe Ile Ile Ala Val
 1 5 10 15
 Leu Met Ser Ala Gln Glu Ser Trp Ala Ile Lys Glu Glu His Val Ile
 20 25 30
 Ile Gln Ala Glu Phe Tyr Leu Asn Pro Asp Gln Ser Gly Glu Phe Met
 35 40 45
 Phe Asp Phe Asp Gly Asp Glu Ile Phe His Val Asp Met Ala Lys Lys
 50 55 60
 Glu Thr Val Trp Arg Leu Glu Glu Phe Gly Arg Phe Ala Ser Phe Glu
 65 70 75 80
 Ala Gln Gly Ala Leu Ala Asn Ile Ala Val Asp Lys Ala Asn Leu Glu
 85 90 95
 Ile Met Thr Lys Arg Ser Asn Tyr Thr Pro Ile Thr Asn Val Pro Pro
 100 105 110
 Glu Val Thr Val Leu Thr Asn Ser Pro Val Glu Leu Arg Glu Pro Asn
 115 120 125
 Val Leu Ile Cys Phe Ile Asp Lys Phe Thr Pro Pro Val Val Asn Val
 130 135 140
 Thr Trp Leu Arg Asn Gly Lys Pro Val Thr Thr Gly Val Ser Glu Thr
 145 150 155 160
 Val Phe Leu Pro Arg Glu Asp His Leu Phe Arg Lys Phe His Tyr Leu
 165 170 175
 Pro Phe Leu Pro Ser Thr Glu Asp Val Tyr Asp Cys Arg Val Glu His
 180 185 190
 Trp Gly Leu Asp Glu Pro Leu Leu Lys His Trp Glu Phe Asp Ala Pro
 195 200 205
 Ser Pro Leu Pro Glu Thr Thr Glu Asn Val Val Cys Ala Leu Gly Leu
 210 215 220
 Thr Val Gly Leu Val Gly Ile Ile Ile Gly Thr Ile Phe Ile Ile Lys
 225 230 235 240
 Gly Val Arg Lys Ser Asn Ala Ala Glu Arg Arg Gly Pro Leu
 245 250