(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) **2-0004251**

(51) 2023.01 **A61K 35/28**; C12N 5/02; C12N 5/0775; A61K 35/51

(13) **Y**

(21) 2-2025-00264

(22) 28/11/2019

(62) 1-2019-06709

(45) 25/08/2025 449

(43)

(73) Viện nghiên cứu tế bào gốc và công nghệ gen Vinmec (VN)
458 Minh Khai, phường Vĩnh Tuy, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thanh Liêm (VN); Thân Thị Trang Uyên (VN).

(74) Công ty Luật TNHH Ambys Hà Nội (AMBYS HANOI)

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT EXOSOM CHỨA CHẤT TIẾT CHỨA YẾU TỐ TĂNG TRƯỞNG TẾ BÀO TỪ TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ DÂY RỐN

(21) 2-2025-00264

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất exosom chứa chất tiết chứa yếu tố tăng trưởng tế bào từ tế bào gốc trung mô dây rốn theo tiêu chuẩn GMP không bổ sung huyết thanh nhau thai bò (FBS) và kháng sinh, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) nuôi cấy tăng sinh tạo nguồn tế bào; b) kích thích tế bào tiết nhiều chất tiết ra môi trường nuôi cấy; c) thu dịch nuôi tế bào có chứa chất tiết; và d) thu chất tiết tế bào. Quy trình theo giải pháp hữu ích sử dụng kỹ thuật nuôi cấy tế bào không bổ sung FBS, không sử dụng kháng sinh và không thay môi trường nuôi cấy tạo áp lực cho tế bào tiết chất tiết. Tế bào gốc trung mô dây rốn sơ cấp đang ở lần cấy chuyển thứ năm (P5) đang trong giai đoạn phát triển bình thường tiết chất tăng trưởng tế bào phản ánh tính gốc và khả năng tăng trưởng của tế bào gốc trung mô dây rốn sơ cấp ở giai đoạn còn trẻ. Sản phẩm chất tiết từ tế bào gốc trung mô dây rốn chứa hàm lượng vượt trội chất tăng trưởng tế bào PDGF-BB, VEGF-A, HFG, FGF-2, và TGF-β có hiệu quả trong phục hồi và duy trì sự khoẻ mạnh và tươi trẻ của làn da.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến lĩnh vực công nghệ sinh học, y sinh học và công nghệ tế bào ứng dụng trong y sinh học. Cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chất tiết chứa yếu tố tăng trưởng tế bào từ nuôi cấy tế bào gốc trung mô dây rốn, trong đó tế bào gốc trung mô dây rốn được nuôi theo tiêu chuẩn thực hành lâm sàng tốt (Good Manufacture Practice - GMP) và được kích thích tiết chất tăng trưởng tế bào có vai trò quan trọng trong trẻ hoá da.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Hiện tượng lão hoá da gây ra do vấn đề tuổi tác hoặc tác động từ các yếu tố môi trường bên ngoài. Bản chất lão hoá da là do sự giảm số lượng tế bào da, giảm hoạt động chức năng của tế bào da trong việc tổng hợp các protein như collagen, elastin và axit hyaluronic. Việc mất collagen, protein đàn hồi elastin và phân tử axit hyaluronic giữ ẩm có trong các lớp bì gây ra sự phá vỡ khả năng phục hồi và độ dày của da theo thời gian và sẽ dẫn đến hình thành nếp nhăn và gây ra tình trạng khô da (Fisher et al., 2002). Các biện pháp can thiệp phẫu thuật phổ biến nhất hiện có để điều trị nếp nhăn trên khuôn mặt bao gồm nâng cơ mặt, phẫu thuật, lột da và các liệu pháp tiêm chất làm đầy như BOTOX®. Tuy nhiên, phương pháp phẫu thuật có thể dẫn đến nhiều bất lợi và phản ứng phụ. Các biện pháp không xâm lấn bao gồm các công thức dưỡng chất bôi ngoài da; tuy nhiên, không có phương pháp nào trong số các phương pháp này loại bỏ hoàn toàn nếp nhăn và đòi hỏi phải áp dụng điều trị thường xuyên. Một số công thức bôi tại chỗ có thể gây kích ứng cho da và/hoặc có thể hỗ trợ các phản ứng chữa lành vết thương, nhưng không bổ sung thành công cho làn da mỏng với các protein đầy đủ để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các khuyết điểm của da do già hoá liên quan đến tuổi hoặc tác động từ môi trường độc hại bên ngoài. Hiện nay, chưa có cách chữa trị cho lão hoá ở cấp độ tế bào mà chỉ điều trị tạm thời hiện tượng da nhăn và cách điều trị này có thể gây nhiều nhược điểm và tác dụng phụ.

Các yếu tố tăng trưởng tế bào thường là peptite với tác dụng sinh học đa dạng. Một số loại yếu tố tăng trưởng đã được xác định là hữu ích trong việc chữa lành vết thương và/hoặc tái tạo lớp bì và biểu bì da, bao gồm: yếu tố tăng trưởng cảm ứng chuyển đổi beta

(transforming growth factor β - TGF- β), yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc tiểu cầu (Platelet-derived growth factor - PDGF), yếu tố tăng trưởng tế bào gan (Hepatocyte growth factor - HGF), yếu tố tăng trưởng tế bào nội mô thành mạch (Vascular endothelial growth factor – VEGF), và yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (Fibroblast growth factor - FGF). Một số yếu tố này đã được phát hiện có trong thể tiết từ tế bào, như trong các sáng chế của Sun và cộng sự và Sil và cộng sự (Sun *et al.*, 2017; Sil *et al.*, 2015). Tuy nhiên, ảnh hưởng của thể tiết từ tế bào đến trẻ hóa da không chỉ dựa vào các nhóm chất tăng trưởng, mà còn phụ thuộc vào cả các nhóm protein khác, ví như như các protein điều hòa. Các sáng chế nêu trên của nhóm tác giả Sun và Sil không xác định được hàm protein tổng số phản ánh sự có mặt của các nhóm protein khác bên cạnh các chất tăng trưởng. Hơn nữa, không xác định được phân nhóm dưới của chất tăng trưởng, ví dụ chỉ phát hiện được FGF chứ không định dạng được FGF2 hay FGF1. Do vậy, không thể chỉ rõ thể tiết mang chất tăng trưởng có thể tác động đến tín hiệu sinh học nào của tế bào nhận.

Các tế bào sống được nuôi cấy *in vitro* tiết ra các protein ngoại bào bao gồm các yếu tố tăng trưởng được tiết vào môi trường dinh dưỡng mà chúng được nuôi cấy. Trong nuôi cấy tế bào, có nhiều protein và yếu tố tăng trưởng tế bào hiện diện trong dịch nuôi cấy tế bào, các chất này bao gồm cả các chất tổng hợp nhân tạo được bổ sung vào môi trường dinh dưỡng nuôi tế bào và chất do tế bào tiết ra. Do không thể phân tách được chất tổng hợp bổ sung vào trong môi trường và chất do tế bào tiết ra, các chất tăng trưởng trong dịch nuôi không được tinh sạch này không thể được chấp nhận về mặt thương mại.

Bên cạnh đó, việc nuôi cấy tế bào thường được bổ sung kháng sinh nhằm tránh sự nhiễm khuẩn có thể xảy ra trong quá trình nuôi cấy. Tuy nhiên, việc bổ sung kháng sinh thì rất nguy hiểm khi sản phẩm của quá trình nuôi cấy được sử dụng trên người. Các nghiên cứu thường chỉ rõ việc có bổ sung kháng sinh hoặc không, nhưng các sáng chế không đề cập đến việc bổ sung kháng sinh vào môi trường nuôi cấy (Liping *et al.*, 2019; Jianbin *et al.*, 2018, Sun *et al.*, 2017; Sil *et al.*, 2015). Điều này rất không rõ ràng làm cho sản phẩm sáng chế từ những nuôi cấy này khó đạt tiêu chuẩn thương mại hóa, hoặc nếu có thì có thể gây các rủi ro như dị ứng, sốc phản vệ cho người sử dụng. Do vậy, các nghiên cứu cần phải chỉ rõ việc sử dụng kháng sinh hay không.

Hầu hết các loại tế bào tiết ra thể tiết (exosom) có đóng gói các thành phần sinh học phân tử bên trong. Thể tiết được tìm thấy trong dịch nuôi cấy tế bào và nhiều loại dịch cơ

thể như huyết tương, nước tiểu, nước bọt, dịch ối và sữa mẹ (Hao, Bai, Yuan, Qureshi, & Xiang, 2006; Harn et al., 2013; Keller et al., 2007; Lasser et al., 2011; Michael et al., 2010; Zonneveld et al., 2014). Trước đây, các thể tiết này được coi là rác thải từ tế bào. Tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng các thể tiết có vai trò quan trọng trong các quá trình sinh lý học của cơ thể do chúng có chứa các chất tiết quan trọng từ tế bào và có thể tác động đến chính nhóm tế bào tiết ra chúng (autocrine) hoặc tác động đến các tế bào khác ở môi trường xung quanh (paracrine). Sử dụng cả kỹ thuật truyền thống và hiện đại, rất nhiều protein, lipit và microRNA được phát hiện do tế bào tiết ra và đóng gói trong thể tiết. Theo thống kê, hiện có 219.082 protein, 26.903 microRNA và 5.146 lipit đã đăng tải trên cơ sở dữ liệu Vesiclepedia để tham khảo (http://microvesicles.org/, truy cập 10/5/2018). Thông tin là các vật chất sinh học phân tử có trong exosom có thể ảnh hưởng hoặc thậm chí định hướng số phận của tế bào đích, ví dụ bằng cách kích hoạt tế bào đích di chuyển, tăng trưởng, biệt hóa hoặc thúc đẩy tế bào đi vào cơ chế chết theo chương trình (apoptosis). Như vậy, thể tiết exosom có thể chứa nhiều loại phân tử có hoạt tính sinh học và các yếu tố tiết tăng trưởng tế bào hỗ trợ chữa lành vết thương và/hoặc tái tạo biểu mô. Tuy nhiên, những thành phần chất tiết này là khác biệt tùy thuộc vào bản chất sinh lý của tế bào tiết cũng như điều kiện tiết của tế bào.

Hiện nay, việc sử dụng các yếu tố tăng trưởng để điều trị da lão hóa đang được các chuyên gia chăm sóc da ưu ái nhằm ngăn ngừa tổn thương da, nếp nhăn và các khuyết tật khác gây ra bởi các yếu tố lão hóa và môi trường độc hại. Trong đó, có các công thức ngăn ngừa lão hoá và trẻ hoá da bao gồm dịch nuôi tế bào có chứa các yếu tố tăng trưởng và/hoặc các thành phần cơ chất ngoại bào (extracellular matrix - ECM) được sản xuất bằng các phương pháp nuôi cấy tế bào.

Tế bào gốc trung mô hiện đang là loại tế bào gốc được sử dụng rộng rãi nhất trong điều trị lâm sàng. Hiệu quả trị liệu của tế bào gốc thường được cho là có khả năng biệt hoá thành các loại tế bào cần thay thế, nhưng chỉ như vậy thì dường như chưa đủ. Các nghiên cứu gần đây cho thấy hiệu quả trị liệu của tế bào gốc trung mô chủ yếu thông qua các chất tiết hơn là cơ chế biệt hoá trực tiếp của chúng (Lai et al., 2010; Phinney & Prockop, 2007; Turturici, Tinnirello, Sconzo, & Geraci, 2014). Do vậy, chất tiết tế bào gốc đóng gói trong thể tiết exosom đang đặc biệt được quan tâm nghiên cứu cho các ứng dụng nhằm mục đích chẩn đoán hay phát triển thành liệu pháp tiên tiến điều trị. Giả thiết rằng, tế bào gốc trung

mô sơ cấp từ dây rốn là loại tế bào gốc trẻ hơn các loại tế bào gốc trung mô từ nguồn khác, như mô mỡ hay tuỷ xương, trong đó exosom tiết ra từ tế bào gốc trung mô dây rốn sẽ mang nhiều thành phần sinh học phân tử có hoạt tính sinh học tái tạo hơn. Bên cạnh đó, để đạt được một lượng lớn chất tiết hơn bình thường, cần phải có yếu tố tác động tới tế bào trong quá trình nuôi cấy.

Do đó, cần có quy trình sản xuất sản phẩm chất tiết tế bào giàu chất tăng trưởng tế bào nhằm tái tạo lớp bì và biểu bì da thông qua sự phục hồi tế bào da và hỗ trợ hoạt động chức năng của tế bào da mà khắc phục được các vấn đề còn tồn tại sau:

- Chất tiết tế bào từ nuôi cấy tế bào gốc trung mô thông thường có bổ sung huyết thanh nhau thai bò (FBS) là sản phẩm có nguồn gốc động vật.

- Quá trình nuôi cấy tế bào gốc trung mô thông thường để tiết chất tiết thông qua exosom thường bổ sung kháng sinh, do đó sản phẩm thu được không đủ điều kiện sử dụng trong lâm sàng (sử dụng trên người).

- Hiệu quả tiết chất tiết thông qua exosom không cao thể hiện qua hàm lượng protein tổng số trong chất tiết thấp.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên. Do vậy, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất exosom chứa chất tiết chứa yếu tố tăng trưởng tế bào từ môi trường nuôi cấy tế bào gốc trung mô dây rốn theo tiêu chuẩn GMP, không bổ sung thêm huyết thanh nhau thai bò (FBS) và kháng sinh để đảm bảo sản phẩm chất tiết không bị lẫn các yếu tố có nguồn gốc động vật và đủ điều kiện áp dụng trong lâm sàng trẻ hoá da. Quy trình theo giải pháp dựa trên việc tối ưu hóa quy trình nuôi cấy để kích thích tế bào tiết chất tiết theo tiêu chuẩn GMP gồm có hàm lượng protein tổng số và chất tăng trưởng tế bào có hiệu quả trẻ hóa da cao hơn điều kiện thông thường. Các chất tăng trưởng tế bào này tham gia vào quá trình sinh học phục hồi chức năng và sự phát triển tế bào da, tái tạo biểu mô và duy trì vẻ ngoài tươi trẻ của làn da.

Theo đó quy trình theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

(i) nuôi cấy tăng sinh tạo nguồn tế bào;

(ii) nuôi cấy kích thích tế bào tiết chất tiết;

(iii) thu dịch nuôi tế bào;

(iv) thu chất tiết tế bào;

Theo giải pháp hữu ích, sản phẩm chất tiết tế bào thu hoạch được gồm exosom có chứa nhiều loại protein khác nhau, thể hiện qua hàm lượng protein tổng số cao, trong đó có chứa hàm lượng cao các yếu tố tăng trưởng tế bào quan trọng có chức năng điều hoà các quá trình sinh lý học tế bào và cho sự phát triển khoẻ mạnh tế bào da, bao gồm tế bào gốc da, tế bào sợi (fibroblast), tế bào biểu bì (keratinocyte) và tế bào sắc tố (melanocyte). Quá trình lão hoá da làm giảm số lượng tế bào da và giảm hoạt động chức năng tế bào da. Do vậy, sản phẩm chất tiết tế bào gốc trung mô dây rốn có chứa các protein là chất tăng trưởng tế bào này sẽ phục hồi số lượng tế bào da cũng như hỗ trợ các tế bào thực hiện chức năng tổng hợp protein cấu trúc khi da đi vào tình trạng lão hóa.

Theo giải pháp hữu ích, chất tiết tế bào có chứa PDGF-BB (PDGF chứa 2 tiểu phần B) với hàm lượng vượt trội so với nuôi cấy tế bào thông thường. PDGF-BB là chất tăng trưởng tế bào điều khiển sự di cư, biệt hóa và hoạt động chức năng của một số loại tế bào gốc trung mô và nhiều loại tế chuyên hóa khác trong cơ thể ở cả giai đoạn phát triển và trưởng thành (Friedlaender, Lin, Solchaga, Snel, & Lynch, 2013; Heldin, 1992). Đặc biệt PDGF-BB có vai trò trong cảm ứng và kích thích một số loại tế bào tăng sinh ở mô liên kết trong đó có mô da. Trong mô da, PDGF-BB kích thích tế bào da phân chia, tăng sinh bù đắp lại số lượng tế bào già hoá chết đi. Bên cạnh bù đắp số lượng, PDGF-BB cũng kích thích tăng sinh tế bào nội mô thành mạch (endothelical cells) giúp cho hình thành mạch máu mới, cung cấp chất dinh dưỡng cho da.

Theo giải pháp hữu ích, chất tiết tế bào chứa VEGF-A với hàm lượng vượt trội so với nuôi cấy thông thường. VEGF-A là một loại protein thuộc họ PDGF, có vai trò rất quan trọng cho quá trình liền vết thương ở mô da. VEGF-A kích thích tế bào nội mô phát triển, di chuyển và chống tế bào chết theo chương trình. Trong da, VEGF-A kích thích hình thành mạch máu mới để cung cấp dưỡng chất cho da. Do vậy, các tế bào da được dinh dưỡng đầy đủ, phát triển khoẻ mạnh và hoạt động chức năng tốt, như tăng tổng hợp protein cấu trúc da, giúp da khoẻ mạnh.

Theo giải pháp hữu ích, chất tiết tế bào chứa HGF với hàm lượng vượt trội so với nuôi cấy thông thường. HGF đóng vai trò rất quan trọng cho sự trẻ hoá da do chất tăng trưởng này kích thích tế bào da tăng sinh cả về số lượng và tăng tổng hợp collagen.

Collagen là protein cấu trúc da chịu trách nhiệm cho sự săn chắc và nâng đỡ mô da. Bên cạnh đó, HGF cũng kích thích hình thành mạch máu mới cung cấp dưỡng chất cho các tế bào da. Do vậy, dưới tác động của HGF, chất tiết từ tế bào gốc sẽ hiệu quả trong giảm vết nhăn, trùng nhão da và làm trẻ hoá da.

Theo giải pháp hữu ích, chất tiết tế bào chứa FGF-2 với hàm lượng vượt trội so với nuôi cấy thông thường. Vai trò chủ yếu của FGF-2 là kích thích các quá trình sinh lý học tế bào trong quá trình phục hồi vết thương. Bên cạnh đó, FGF-2 còn kích thích sự tăng sinh tế bào cũng như tăng tổng hợp collagen và hyalyronic acid là các chất chịu trách nhiệm chính cho sự săn chắc và giữ độ ẩm cho da.

Theo giải pháp hữu ích, chất tiết tế bào chứa TGF-β với hàm lượng vượt trội so với nuôi cấy thông thường. TGF-β trong da là chất điều hoà sinh tổng hợp cơ chất nền, thúc đẩy tế bào sợi phân chia và tổng hợp các loại protein collagen và laminin V là protein cơ chất nền của da. Đồng thời TGF-β ức chế tổng hợp các chất phá huỷ cơ chất nền như các enzym phân huỷ matrix metalloproteinase. Do vậy, TGF-β là rất cần thiết để duy trì ổn định trạng thái khoẻ mạnh của da và hỗ trợ thực hiện chức năng tổng thể giúp da để duy trình vẻ ngoài trẻ trung.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là ảnh chụp tế bào gốc trung mô dây rốn tại thời điểm thu hoạch dịch nuôi tế bào chứa chất tiết tế bào. Tế bào có hình dạng nguyên bào sợi là dạng đặc trưng của tế bào gốc trung mô. Mật độ tế bào chiếm khoảng 80 % diện tích bề mặt chai nuôi cấy.

Hình 2 là hình ảnh phân tích chất chỉ thị của tế bào gốc trung mô dây rốn tại thời điểm thu hoạch dịch nuôi tế bào chứa chất tiết tế bào. Hình ảnh phân tích biểu hiện chất chỉ thị dương tính và âm tính bằng flowcytometry. Theo đó, các chất chỉ thị dương tính gồm CD90, CD105 và CD73 đều có biểu hiện > 90 %, và biểu hiện chất chỉ thị âm tính khoảng 1 %.

Hình 3 là hình ảnh phân tích hàm lượng protein tổng số thu được từ chất tiết phản ánh khả năng tiết của tế bào. Trung bình cứ mỗi 1 triệu tế bào gốc trung mô dây rốn, dưới điều kiện kích thích theo giải pháp hữu ích tiết ra 292,346 µg protein trong chất tiết chứa exosom.

Hình 4 là hình ảnh phân tích sự hàm lượng thành phần chất tăng trưởng tế bào trong sản phẩm chất tiết tế bào gốc trung mô dây rốn thu hoạch được. Trung bình cứ mỗi 1 triệu tế bào, dưới điều kiện kích thích theo giải pháp hữu ích tiết ra 139,084 pg HGF, 127,006 pg FGF-2, 12,595 pg VEGF-A, 6,336 pg PDGF-BB, và 4,924 pg TGF-β.

Hình 5 mô tả xếp hạng thứ tự hàm lượng chất tăng trưởng tế bào được tiết ra theo giải pháp hữu ích. Theo đó thứ tự lần lượt từ cao tới thấp là HGF, FGF-2, VEGF-A, PDGF-BB và TGF-β.

Hình 6 mô tả số liệu so sánh hàm hàm lượng chất tăng trưởng tế bào HGF, FGF-2, VEGF-A, PDGF-BB và TGF-β) được tiết ra theo giải pháp hữu ích và nhóm đối chứng cùng loại tế bào được nuôi trong điều kiện môi trường khác.

Hình 7 mô tả quy trình các bước thực hiện nuôi cấy tế bào và điều chế sản phẩm chất tiết tế bào gốc trung mô dây rốn theo giải pháp hữu ích.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết với các phương án và các ví dụ cụ thể. Tuy nhiên, các phương án và các ví dụ cụ thể này chỉ nhằm minh họa để hiểu rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích giới hạn giải pháp hữu ích.

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất exosom chứa chất tiết chứa yếu tố tăng trưởng tế bào từ tế bào gốc trung mô dây rốn, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(i) nuôi cấy tăng sinh tạo nguồn tế bào, bao gồm:

tạo lớp cơ chất phủ bề mặt chai nuôi cấy bằng cách phủ dung dịch chất nền hỗ trợ tế bào gốc bám dính CELLstart đã pha loãng 300 lần theo thể tích trong đệm muối phosphat (phosphat buffer salin - PBS) lên bề mặt chai nuôi cấy với thể tích bằng khoảng 1/2 thể tích môi trường nuôi cấy dự định; ủ trong 30 phút ở 37°C, hút bỏ dung dịch khỏi chai nuôi cấy và tráng bề mặt chai nuôi cấy 2 lần bằng PBS; ủ môi trường nuôi cấy tế bào gốc StemMACS MSC Expansion Media, ở 37°C trong thời gian từ 30 phút đến 1 giờ hoặc ở nhiệt độ phòng từ 20°C – 25°C trong 2 giờ; chuẩn bị dung dịch tế bào gốc trung mô dây rốn có nồng độ 375.000 tế bào/mL; cấy tế bào với nồng độ 375.000 tế bào/mL vào chai nuôi cấy chứa môi trường nuôi cấy tế bào gốc StemMACS MSC Expansion Media đã làm ấm theo tỉ lệ dung dịch tế bào : môi trường nuôi cấy là 1 : 9 theo thể tích, nuôi ở 37°C và

5% CO_2, thay môi trường nuôi cấy tế bào gốc có thể tích tương đương sau mỗi 2 ngày cho tới khi tế bào phát triển đạt 80% diện tích bề mặt chai nuôi cấy; cấy chuyển tế bào sang chai chứa môi trường nuôi cấy tế bào gốc mới bao gồm bước: hút loại bỏ dịch nuôi tế bào khỏi chai nuôi cấy, rửa chai nuôi cấy bằng PBS sao cho dịch PBS phủ toàn bộ bề mặt chai nuôi cấy, loại bỏ PBS và bổ sung vào chai nuôi tế bào dung dịch enzym phân tách tế bào Gibco TrypLE Select 1X theo tỷ lệ dung dịch enzym : dịch nuôi tế bào là 1 : 4 theo thể tích, ủ ở 37°C trong 5 phút để phân tách tế bào khỏi bề mặt chai nuôi cấy, bổ sung 5mL môi trường nuôi cấy ấm vào 1 chai T75 hoặc 15 mL môi trường nuôi cấy tế bào gốc StemMACS MSC Expansion Media ấm vào chai nuôi cấy để bất hoạt enzym, hút toàn bộ dịch huyền phù chứa tế bào vào ống ly tâm falcon và ly tâm với tốc độ 300 x g (tương đương 1137 vòng/phút) trong 5 phút, loại bỏ dịch nổi và đánh tan cặn tế bào trong 5 mL môi trường nuôi cấy tế bào gốc StemMACS MSC Expansion Media, pha loãng để thu được dung dịch tế bào gốc trung mô dây rốn ở lần cấy chuyển thứ nhất (P1) có nồng độ 350.000 tế bào/mL để thực hiện bước nuôi cấy tăng sinh tiếp theo; trong đó, bước (i) nuôi cấy tăng sinh được lặp lại 4 lần để thu được tế bào gốc ở lần cấy chuyển thứ 4 (P4) có nồng độ 350.000 tế bào/mL;

(ii) nuôi cấy kích thích tế bào tiết chất tiết, bao gồm:

cấy chuyển tế bào gốc trung mô ở P4 thu được ở bước (i) sang chai nuôi cấy chứa môi trường nuôi cấy tế bào gốc StemMACS MSC Expansion Media như nêu trong bước (i); lắc nhẹ để tế bào phân bố đều bề mặt chai nuôi cấy; ủ ở 37°C và 5% CO_2 cho tới khi tế bào gốc đạt 80 – 90 % diện tích bề mặt chai nuôi cấy để thu được tế bào gốc trung mô ở P5, trong đó không thay môi trường nuôi cấy tế bào gốc để kích thích tế bào tiết chất tiết;

(iii) thu dịch nuôi tế bào, bao gồm:

hút dịch nuôi tế bào gốc trung mô ở P5 thu được từ bước (ii) vào các ống ly tâm và hạ nhiệt độ về 4°C trong thời gian tối đa 48 giờ trước khi thực hiện ly tâm thu exosom chứa chất tiết;

(iv) thu chất tiết tế bào, bao gồm:

ly tâm dịch nuôi tế bào gốc trung mô ở P5 thu được ở bước (iii) ở tốc độ 300 x g (tương đương 1137 vòng/phút) trong 10 phút ở 4°C để loại bỏ cặn là tạp chất tế bào gồm xác tế bào chết và mảnh vỡ tế bào, thu dịch nổi; tiếp tục ly tâm dịch nổi ở tốc độ 2.000 x

g (tương đương 3427 vòng/phút) trong thời gian 10 phút ở 4°C để loại bỏ sản phẩm tế bào chết theo chương trình là thể apoptotic, thu dịch nổi chứa chất tiết tế bào gồm microvesicle (vi thể) và exosom, loại bỏ cặn; siêu ly tâm dịch nổi chứa microvesicle và exosom ở tốc độ 10.000 x g (tương đương 7.662 vòng/phút) trong thời gian 30 phút, nhiệt độ: 4°C để thu được dịch nổi chứa exosom; siêu ly tâm dịch nổi chứa exosom ở tốc độ 100.000 x g (tương đương 237.440 vòng/phút) trong thời gian 70 phút, nhiệt độ: 4°C để thu phần cặn chứa exosom chứa chất tiết tế bào, đánh tan cặn thu được trong PBS để thu được dung dịch PBS chứa exosom có thể tích 12 mL; và siêu ly tâm dung dịch PBS chứa exosom ở tốc độ 100.000 x g (tương đương 237.440 vòng/phút) trong 10 phút ở 4°C, thu cặn là exosom chứa các chất tiết giàu chất tăng trưởng tế bào sạch.

Theo giải pháp hữu ích, sản phẩm chất tiết được sản xuất theo quy trình là các thể exosom có chứa nhiều yếu tố tăng trưởng tế bào. Exosom là cấu trúc túi đóng kín nhỏ, được tiết ra môi trường ngoại bào bởi nhiều loại tế bào khác nhau. Chúng có chứa nhiều thành phần sinh học phân tử có chức năng bên trong như protein, ARN và lipit. Bên cạnh các phân tử sinh học phổ biến trong exosom tiết từ các nguồn tế bào khác, chất tiết theo quy trình giải pháp hữu ích chứa hàm lượng vượt trội các yếu tố tăng trưởng tế bào có vai trò trong tái tạo lớp bì và biểu bì da. Các yếu tố tăng trưởng tế bào này kích thích tế bào da phát triển khoẻ mạnh và hỗ trợ hoạt động chức năng tế bào da. Do vậy, các tế bào da tại khu vực đang ở giai đoạn đang già hoá được kích thích phát triển khoẻ mạnh, hoạt động chức năng tốt, tăng tổng hợp thành phần protein cấu trúc da như collagen, elastin, và axit hyaluronic. Các protein quan trọng này giúp cho làn da săn chắc, có độ đàn hồi cao và giữ ẩm tốt, do đó ngăn ngừa tình trạng già hoá da và duy trì trạng thái khoẻ mạnh và vẻ ngoài trẻ trung của làn da.

Trong bước nuôi cấy tăng sinh tế bào, tế bào gốc trung mô dây rốn được cấy ở bất cứ giai đoạn nào, từ P1 (lần cấy chuyển thứ 1), P2 (lần cấy chuyển thứ 2), P3 (lần cấy chuyển thứ 3) hoặc P4 (lần cấy chuyển thứ 4), nhằm tăng sinh số lượng tế bào. Tế bào được nuôi trong môi trường nuôi cấy tế bào gốc StemMACS MSC Expansion Media (Myltenyi, Germany)) được sản xuất theo tiêu chuẩn GMP, không bổ sung thêm FBS và kháng sinh trong quá trình nuôi cấy. Tế bào sau khi đạt 80 % diện tích bề mặt chai nuôi cấy được cấy chuyển tiếp lên các lần nuôi tiếp theo hoặc bảo quản tạo nguồn dự trữ tế bào.

Trong bước nuôi kích thích tế bào tiết chất tiết, kỹ thuật nuôi cấy tế bào được thực hiện tương tự với bước cấy tăng sinh tạo nguồn tế bào. Những khác biệt được mô tả như sau:

- Chỉ sử dụng loại chai nuôi cấy T225 để kích thích tế bào tiết chất tiết vào dịch nuôi cấy.

- Tế bào ở giai đoạn P5 được cấy với mật độ 1.125.000 tế bào/1 chai T225/30 mL môi trường nuôi cấy.

- Môi trường không bổ sung FBS và không bổ sung kháng sinh.

- Tế bào được nuôi ở nhiệt độ 37°C và 5 % CO_2 cho tới khi phát triển đạt 80 – 90 % diện tích bề mặt chai nuôi cấy.

- Trong quá trình nuôi tế bào không thay môi trường nuôi cấy nhằm tạo áp lực nghèo dinh dưỡng để tế bào tiết chất tiết nhiều hơn.

Các tế bào gốc trung mô dây rốn ở giai đoạn P5 thu thập tại thời điểm thu dịch nuôi tế bào chứa chất tiết được kiểm tra biểu hiện chất chỉ thị dương tính gồm có CD73, CD90 và CD105 và các chất chỉ thị âm tính gồm có CD34, CD45, CD11b hoặc CD14, CD19 hoặc CD79α và HLA-DR bằng bộ kit thương mại Human MSC Analysis Kit (562245, BD Biosciences). Quy trình thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Theo các phương pháp nuôi cấy thông thường, cứ mỗi 02 ngày môi trường nuôi cấy được thay mới nhằm cung cấp đầy đủ chất dinh dưỡng cho tế bào phát triển tốt nhất. Các tác giả giải pháp hữu ích này đã phát hiện ra rằng, không thay môi trường nuôi cấy sẽ làm tế bào phát triển chậm hơn và tạo áp lực để tế bào tiết nhiều chất tiết hơn. Do vậy, theo quy trình giải pháp hữu ích sẽ không thay môi trường nuôi cấy cho tới khi tế bào phát triển đạt 80 – 90 % bề mặt chai nuôi cấy. Khi tế bào phát triển càng nhiều, càng cần nhiều dinh dưỡng. Việc không thay môi trường mới sẽ hạn chế nguồn dinh dưỡng dồi dào nuôi tế bào và sẽ ảnh hưởng đến khả năng và tốc độ tăng sinh và phát triển của tế bào so với các tế bào được nuôi cấy trong điều kiện thông thường. Việc tạo áp lực dinh dưỡng sẽ kích thích tế bào tiết nhiều chất tiết hơn ra môi trường xung quanh như một đáp ứng với điều kiện sống.

Tại các bước nuôi cấy tế bào, tế bào chỉ được phép cho phát triển đến khoảng 80 % diện tích bề mặt chai nuôi cấy. Khi tế bào phát triển đến 80 % bề mặt chai nuôi cấy sẽ đảm

bảo cả hai hiệu quả là tế bào đạt số lượng lớn và vẫn có không gian cho tế bào phát triển để đảm bảo tế bào đang ở giai đoạn phát triển bình thường. Nếu để tế bào phát triển đến 100 % diện tích bề mặt chai nuôi cấy hoặc nhiều hơn, tức là không còn không gian cho tế bào phát triển bình thường, do vậy sẽ dẫn đến sự tự biến đổi tế bào để thích nghi với việc thiếu không gian sống. Sự biến đổi này làm thay đổi chức năng tế bào và sẽ không kiểm soát được sự biệt hoá tế bào. Do vậy, chất tiết tế bào cũng bị thay đổi theo do sự biến đổi trạng thái sinh lý tế bào.

Các sản phẩm thương mại sử dụng trong quy trình theo giải pháp hữu ích như sau:

Chất nền CELLstart (CELLstartTM Humanized Substrate for Cell Culture, Catalogue number: A10142-01 (của hãng Gibco, Mỹ)).

Môi trường nuôi cấy StemMACS của hãng Myltenyi, Germany) tên gọi cụ thể là StemMACSTM MSC Expansion Media Kit XF gồm 2 hóa chất:

+ StemMACSTM MSC Expansion Media XF, basal media, Catalogue number: 130 – 101 – 375

+ StemMACSTM MSC Expansion Media XF, Supplement, Catalogue number: 130 – 101 – 37

Enzym phân tách tế bào TrypLee: CTSTM TrypleTM Select, Catalogue number: A12859 của hãng Thermo Fisher Scientific, Mỹ.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Nuôi cấy tăng sinh tạo nguồn tế bào gốc trung mô dây rốn

Tiến hành tạo lớp cơ chất phủ bề mặt chai nuôi cấy bằng cách phủ 5 mL dung dịch chất nền hỗ trợ tế bào gốc bám dính CELLstart đã pha loãng 300 lần theo thể tích trong đệm PBS lên bề mặt chai nuôi cấy tế bào T75 (Nunc™ EasYFlask 75cm^2 Cell Culture Flask, ThermoFisher Scientific, USA) hoặc 10 mL dung dịch chất nền đã pha loãng vào chai nuôi cấy tế bào T225 (Nunc™ EasYFlask 225cm^2 Cell Culture Flask, ThermoFisher Scientific, USA). Dung dịch xử lý bề mặt chai được ủ ở 37^{o}C trong thời gian 30 phút trước khi rửa hai lần bằng PBS.

Bổ sung 9 mL hoặc 27 mL môi trường nuôi cấy StemMACS MSC Expansion Media vào chai nuôi cấy tế bào T75 hoặc T225. Môi trường nuôi cấy được ủ trong tủ ấm ở 37 ^{o}C

trong thời gian từ 30 phút đến 1 giờ hoặc để ở nhiệt độ phòng (20 °C – 25 °C) trong vòng 2 giờ trước khi sử dụng.

Tế bào gốc trung mô ở bất cứ giai đoạn nào từ P1 đến P4 được rã đông trong bể ổn nhiệt 37°C cho tới khi rã hết cục đông (khoảng 2 đến 3 phút) được hút sang ống ly tâm falcon chứa sẵn 10 mL môi trường nuôi cấy đã làm ấm. Dịch chứa tế bào được ly tâm 300 x g (tương đương 1137 vòng/phút) trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi và đánh tan cặn tế bào trong 5 mL môi trường nuôi cấy. Đếm tế bào sau đó pha loãng tế bào đến nồng độ 375.000 tế bào/mL.

Sử dụng kỹ thuật đảo trộn bằng pipet để trộn đều dịch tế bào, hút 1 mL dịch tế bào vào chai T75 hoặc 3 mL dịch tế bào vào chai T225 sao cho mỗi chai nuôi cấy T75 chứa 375.000 tế bào và chai T225 chứa 1.125.000 tế bào. Nuôi tế bào ở nhiệt độ 37°C và 5 % CO_2. Không bổ sung vào môi trường nuôi cấy FBS và kháng sinh. Nguồn tế bào có thể từ rã đông hoặc trực tiếp từ cấy chuyển tế bào. Tế bào được ủ tiếp ở nhiệt độ 37 °C và 5 % CO_2 trong thời gian 4 ngày để tế bào phát triển.

Tại ngày thứ 2, hút bỏ môi trường nuôi cấy bằng pipet. Bổ sung môi trường nuôi cấy mới StemMACS với thể tích tương đương (10 mL/T75 hoặc 30 mL/T225).

Vào ngày thứ 4, khi tế bào đạt khoảng 80 % diện tích bề mặt chai nuôi cấy, thu tế bào bảo quản hoặc cấy chuyển tế bào. Nếu tế bào không đạt 80 % diện tích bề mặt chai nuôi cấy vào ngày thứ 4, tiếp tục thay môi trường mới cho đến khi tế bào phát triển đạt 80 % diện tích bề mặt chai.

Ví dụ 2: Kích thích tế bào tiết chất tiết vào dịch nuôi cấy

Tiến hành tạo lớp cơ chất phủ bề mặt chai nuôi cấy bằng cách phủ 10 mL dung dịch chất nền hỗ trợ tế bào gốc bám dính CELLstart đã pha loãng 300 lần theo thể tích trong đệm PBS lên bề mặt chai nuôi cấy tế bào T225 (Nunc™ EasYFlask 225cm^2 Cell Culture Flask, ThermoFisher Scientific, USA). Dung dịch xử lý bề mặt chai được ủ ở 37 °C trong thời gian 30 phút trước khi rửa hai lần bằng PBS.

Tiếp theo, hút 27 mL môi trường nuôi cấy StemMACS MSC Expansion Media đã ủ ấm vào chai nuôi cấy tế bào T225. Không bổ sung vào môi trường nuôi cấy FBS và kháng sinh.

Sử dụng kỹ thuật đảo trộn bằng pipet để trộn đều dịch tế bào ở lần cấy chuyển thứ 4 (P4) thu được từ ví dụ 1, hút 3 mL dịch chứa 1.125.000 tế bào tế bào gốc trung mô dây rốn P4 vào chai T225. Tổng thể tích trong 01 chai nuôi cấy là 30 mL môi trường StemMACS MSC Expansion Media chứa 1.125.000 tế bào gốc trung mô dây rốn P5. Tế bào được ủ tiếp ở nhiệt độ 37 °C và 5 % CO_2 trong thời gian 4 – 5 ngày để tế bào phát triển đạt 80 – 90 % bề mặt chai nuôi cấy.

Tại ngày thứ 2 và bất cứ ngày nào trước khi tế bào đạt 80 – 90 % bề mặt chai nuôi cấy, không thay môi trường nuôi cấy mới để kích thích tiết nhiều chất tiết hơn.

Vào ngày thứ 4 hoặc thứ 5, khi tế bào đạt khoảng 80 - 90 % diện tích bề mặt chai nuôi cấy, thu dịch nuôi tế bào. Nếu tế bào không đạt 80 – 90 % diện tích bề mặt chai nuôi cấy, tiếp tục ủ tế bào ở 37 °C và 5 % CO_2 cho đến khi tế bào phát triển đạt 80 - 90 % diện tích bề mặt chai nuôi cấy.

Dịch nuôi tế bào khi tế bào phát triển đạt 80 - 90 % diện tích bề mặt chai nuôi cấy được hút và chia vào 02 ống ly tâm 50 mL (Corning, USA) và bảo quản ở 4 °C trong thời gian tối đa 24 giờ.

Sau khi thu dịch nuôi tế bào, tế bào gốc trung mô ở P5 được thu thập bằng enzym phân tách tế bào thương mại (TrypLe™ Select Enzym, Thermo Fisher Scientific, USA). Rửa bề mặt chai có tế bào gốc trung mô dây rốn đang bám dính bằng 10 mL PBS. Loại bỏ PBS và bổ sung 10 mL enzym và ủ ở 37 °C. Sau 5 phút, lấy chai chứa tế bào ra và vỗ nhẹ vào cạnh bên của chai nuôi cấy sao cho tế bào tách rời hoàn toàn khỏi bề mặt chai. Thu dịch chứa tế bào vào ống ly tâm và bổ sung môi trường nuôi cấy với thể tích tương đương thể tích enzym để trung hoà hoạt tính của enzym.

Các tế bào gốc trung mô dây rốn thu thập tại thời điểm thu dịch nuôi tế bào chứa chất tiết được kiểm tra biểu hiện chất chỉ thị dương tính gồm có CD73, CD90 và CD105 và các chất chỉ thị âm tính gồm có CD34, CD45, CD11b hoặc CD14, CD19 hoặc CD79α và HLA-DR bằng bộ kit thương mại Human MSC Analysis Kit (562245, BD Biosciences). Ly tâm dịch huyền phù tế bào với lực 300 x g/5 phút để thu cặn tế bào. Tiếp theo, hoà tan cặn tế bào trong PBS sao cho đạt nồng độ 1 x 10^6 tế bào/1 mL. Nhuộm marker kiểm tra đặc điểm chất chỉ thị tế bào và phân tích bằng hệ thống phân tích tế bào theo dòng chảy (Flow Cytometry).

Ví dụ 3: Thu thập chất tiết từ tế bào gốc trung mô dây rốn

Hai ống dịch nuôi tế bào chứa chất tiết tế bào gốc thu được tại ví dụ 2 được chuyển vào trong ống ly tâm Falcon 50 mL và ly tâm với lực 300 x g (tương đương 1137 vòng/phút) trong 10 phút ở nhiệt độ phòng để loại bỏ cặn tế bào chết và mảnh vỡ tế bào. Phần cặn là xác tế bào chết và các mảnh vỡ tế bào được loại bỏ, thu dịch nổi.

Dịch nổi tiếp tục được chuyển vào ống ly tâm 50 mL và ly tâm với lực 2.000 x g (tương đương 3427 vòng/phút) trong thời gian 10 phút ở 4 °C để loại bỏ sản phẩm tế bào chết theo chương trình là thể apoptotic, thu dịch nổi chứa microvesicles và exosom có chứa chất tiết tế bào.

Sau khi thu dịch nổi giàu microvesicles và exosom, dịch nổi được cho vào ống siêu ly tâm thiết kế đặc biệt cho các bộ Rotor để chuẩn bị cho loại bỏ microvesicels và thu exosom giàu chất tiết tế bào.

Vệ sinh bộ rotor SW 32Ti bằng ethanol 70% và để ở 4°C qua đêm để làm lạnh trước khi sử dụng. Khử trùng các ống ly tâm Thinwall UltraClear 38,5 mL (Beckman Coulter) bằng etanol 70% và để khô tự nhiên trong tủ an toàn sinh học trước khi tiến hành ly tâm.

Dịch nổi chứa microvesicles và exosom được chuyển vào ống ly tâm Thinwall UltraClear 38,5 mL sao cho đạt tối thiểu 2/3 thể tích ống hoặc tối đa 35 mL. Cân bằng ống đối trọng bằng cân phân tích, sự sai lệch giữa các ống đối trọng không quá 0,1 mg. Mở nguồn điện của máy ly tâm và vệ sinh máy bằng etanol 70 °C và giấy không bụi Kimwipes trước khi đặt rotor vào máy ly tâm và đóng chặt cửa máy. Sau đó lựa chọn chương trình chạy: loại rotor văng SW 32Ti, loại ống Thinwall UltraClear 38,2 mL (Beckman Coulter), lực ly tâm: 10.000 x g (tương đương 7.662 vòng/phút), thời gian: 30 phút, nhiệt độ: 4 °C.

Tiếp theo, vệ sinh bộ rotor SW 40Ti của hãng Beckman và các bộ adaptor tương ứng bằng etanol 70% và để ở 4°C qua đêm để làm lạnh trước khi sử dụng. Khử trùng các ống ly tâm Thinwall UltraClear 13,2 mL (Beckman Coulter) bằng etanol 70% và để khô tự nhiên trong tủ an toàn sinh học trước khi tiến hành ly tâm.

Loại bỏ cặn microvesicles và hút dịch nổi giàu exosom chuyển sang ống ly tâm Thinwall UltraClear 13,2 mL (Beckman Coulter) đã khử trùng sao cho thể tích đạt tối thiểu 2/3 ống hoặc tối đa 12 mL. Cân bằng ống đối trọng bằng cân phân tích, sự sai lệch giữa các ống đối trọng không quá 0,1 mg. Mở nguồn điện của máy ly tâm và vệ sinh máy trước

khi đặt rotor vào máy ly tâm (Optima™ XPN 100K, Beckman Coulter) và đóng chặt cửa máy. Sau đó chọn chương trình chạy: loại rotor SW 40Ti, loại ống Thinwall UltraClear 13,2 mL (Beckman Coulter), lực ly tâm: 100.000 x g (tương đương 7.662 vòng/phút), thời gian: 70 phút, nhiệt độ: 4°C.

Khi kết thúc chu kỳ ly tâm, lấy ống ly tâm có chứa dịch nổi ly tâm ra giá đỡ và hút bỏ dịch nổi, thu phần cặn exosom cùng chất tiết tế bào. Pha loãng cặn exosom cùng chất tiết tế bào trong PBS.

Tiếp theo, cặn exosom được rửa trong PBS để loại bỏ các thành phần tạp nhiễm bám dính lên bề mặt thể tiết exosom. Sử dụng kỹ thuật đảo trộn bằng pipet để phân tán đều thể exosom trong dung dịch và tạo lực tác động tách các phân tử tạp nhiễm có thể bám dính vào thể exosom.

Hút dịch PBS có exosom và chuyển sang ống ly tâm Thinwall UltraClear 13,2 mL (Beckman Coulter) đã khử trùng sao cho thể tích đạt tối thiểu 2/3 ống hoặc tối đa 12 mL. Cân bằng ống đối trọng bằng cân phân tích, sự sai lệch giữa các ống đối trọng không quá 0,1 mg. Mở nguồn điện của máy ly tâm và vệ sinh máy trước khi đặt rotor vào máy ly tâm (Optima™ XPN 100K, Beckman Coulter) và đóng chặt cửa máy. Sau đó chọn chương trình chạy: loại rotor SW 40Ti, loại ống Thinwall UltraClear 13,2 mL (Beckman Coulter), lực ly tâm: 100.000 x g (tương đương 237.440 vòng/phút), thời gian: 70 phút, nhiệt độ: 4°C.

Khi kết thúc chu kỳ ly tâm, thu cặn ly tâm là exosom chứa chất tiết từ tế bào gốc trung mô dây rốn. Đánh tan cặn trong PBS 1X với tỷ lệ 90 mL dịch nuôi tế bào tương ứng với 2 mL dung dịch chất tiết.

Dung dịch chất tiết từ tế bào gốc trung mô dây rốn thu được theo quy trình là thể exosom chứa chất tiết tế bào gồm nhiều loại protein, trong đó hàm lượng protein tổng số thu được từ mỗi một triệu tế bào (10^6 tế bào) là 292,364 µg. Protein tổng số được đánh giá bằng Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

Dung dịch chất tiết từ tế bào gốc trung mô dây rốn thu được theo quy trình là thể exosom chứa chất tiết tế bào, gồm nhiều yếu tố tăng trưởng tế bào.

Chất tiết sẽ được bảo quản ở - 80°C cho tới khi sử dụng.

Ví dụ 4. Kiểm tra hàm lượng chất tăng trưởng tế bào trong chất tiết

Để kiểm tra hàm lượng các chất tăng trưởng tế bào đóng vai trò quan trọng cho sự phát triển khoẻ mạnh và hoạt động chức năng của tế bào da, sản phẩm chất tiết thu được từ ví dụ 3 sẽ được tiến hành kiểm tra bằng kỹ thuật Luminex.

Bộ kit phát hiện và định lượng chất tăng trưởng tế bào được đặt hàng thiết kế riêng để phát hiện PDGF-BB, VEGF, HFG, FGF-2 và TGFβ. Phương pháp thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể, các chất tăng trưởng FGF-2, HGF, PDGF-BB, và VEGF sẽ được tiến hành định lượng sử dụng bộ kit Human Custom ProcartaPlex 4 – plex Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ), và TGF – beta sẽ đươc tiến hành định lượng sử dụng bộ kit ProcartaPlex Human TGF beta 1 Simplex Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

Kết quả hàm lượng các chất tăng trưởng tế bào được thể hiện trên hình 4. Cụ thể:

Cứ một một triệu tế bào (10^6 tế bào) tiết ra 139,084 pg HGF.

Cứ một một triệu tế bào (10^6 tế bào) tiết ra 127,006 pg FGF.

Cứ một một triệu tế bào (10^6 tế bào) tiết ra 12,595 pg VEGF.

Cứ một một triệu tế bào (10^6 tế bào) tiết ra 6,336 pg PGPDGF-BB.

Cứ một một triệu tế bào (10^6 tế bào) tiết ra 4,924 pg TGFβ.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích cho phép sản xuất chất tiết từ tế bào gốc trung mô dây rốn nuôi theo tiêu chuẩn GMP. Môi trường nuôi tế bào theo chuẩn GMP mô tả trong giải pháp hữu ích là môi trường nuôi cấy tế bào gốc có sẵn trên thị trường (StemMACS), không bổ sung thêm huyết thanh nhau thai bò (FBS) và bổ sung kháng sinh trong quá trình nuôi cấy như nuôi cấy thông thường. Tế bào gốc trung mô dây rốn sơ cấp ở giai đoạn P5 được sử dụng để nuôi kích thích tế bào tiết chất tiết. Tế bào được kích thích tiết chất tiết nhiều hơn khi tạo áp lực với tế bào bằng cách không thay môi trường nuôi cấy. Quy trình cho phép sản xuất được chất tiết tế bào gốc giàu chất tăng trưởng tế bào hiệu quả cho tái tạo tế bào da.

Quy trình sản xuất theo giải pháp hữu ích áp dụng điều kiện nuôi tế bào bằng môi trường được sản xuất theo tiêu chuẩn GMP đủ điều kiện nuôi tế bào. Việc nuôi cấy theo tiêu chuẩn GMP không sử dụng thành phần có nguồn gốc động vật đảm bảo việc sản phẩm chất tiết của giải pháp hữu ích không bị lây nhiễm các tác nhân từ động vật và do đó đủ điều kiện sử dụng trên người.

Quy trình sản xuất theo giải pháp hữu ích áp dụng không thay môi trường nuôi cấy tại lần nuôi cấy thu chất tiết tế bào. Càng về các ngày sau, lượng tế bào càng lớn và nhu cầu sử dụng nhiều chất dinh dưỡng hơn nữa. Khi không thay môi trường mới giàu dinh dưỡng, các tế bào sẽ cạnh tranh nhau sử dụng chất dinh dưỡng trong môi trường nuôi. Việc cạnh tranh sử dụng dinh dưỡng và thiếu dinh dưỡng tạo áp lực tế bào phát tín hiệu ra môi trường xung quanh thông qua chất tiết.

Quy trình sản xuất theo giải pháp hữu ích nuôi tế bào không bổ sung FBS và không bổ sung kháng sinh. FBS là nguồn bổ sung chất tăng trưởng cho các nuôi cấy tăng trưởng tế bào thông thường. Chất tăng trưởng trong FBS sẽ hỗ trợ khả năng sống sót và tăng sinh của tế bào. Giải pháp hữu ích không sử dụng FBS cũng là một yếu tố kích thích tế bào thích nghi với điều kiện sống và tăng tiết chất tăng trưởng tế bào để hỗ trợ chính sự phát triển của tế bào. Kháng sinh thông thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhằm ngăn chặn sự nhiễm khuẩn trong quá trình nuôi cấy. Tuy nhiên khi bổ sung kháng sinh cũng sẽ làm ảnh hưởng đến các quá trình sinh lý học tế bào. Giải pháp hữu ích không sử dụng kháng sinh nhằm không để các yếu tố này làm ảnh hưởng đến hàm lượng các chất tiết từ tế bào gốc trung mô dây rốn và sản phẩm chất tiết đủ điều kiện áp dụng trong lâm sàng.

Quy trình sản xuất theo giải pháp hữu ích áp dụng giai đoạn tế bào được nuôi để thu chất tiết là tế bào gốc trung mô dây rốn sơ cấp ở giai đoạn P5. Tại giai đoạn P5 này, tế bào gốc trung mô dây rốn sơ cấp vẫn đang trong quá trình phát triển bình thường và còn biểu hiện đặc điểm chất chỉ thị của tế bào gốc trung mô. Khả năng tăng sinh cao cùng tiềm năng tính gốc của tế bào gốc trung mô dây rốn cho phép tế bào tiết sản phẩm tiết mang nhiều yếu tố tăng trưởng hơn. Việc tế bào trong giai đoạn còn tính gốc và đang phát triển tốt rất quan trọng đối với sản phẩm tiết do các chất tiết từ tế bào phản ánh nguồn gốc, bản chất và tình trạng sinh lý khoẻ mạnh của tế bào tại thời điểm tiết.

Quy trình theo giải pháp hữu ích, trong đó chất tiết thu được chứa nhiều loại protein khác nhau và thể hiện qua hàm lượng protein tổng số rất cao trong sản phẩm chất tiết. Trong chất tiết, không chỉ có chứa các loại chất tăng trưởng mà còn có chứa các loại protein điều hòa khác. Các protein điều hòa có tác động điều chỉnh thúc đẩy hoặc kìm hãm các tín hiệu tế bào nhằm ngăn chặn hiện tượng quá liều hoặc dưới liều. Do vậy, sự có mặt các loại protein khác trong sản phẩm chất tiết bên cạnh các chất tăng trưởng tế bào là rất

quan trọng trong việc quyết định hiệu quả của sản phẩm chất tiết và điều hòa các quá trình sinh học khác của tế bào nhận.

Quy trình theo giải pháp hữu ích, chất tiết thu được gồm có exosom có chứa hàm lượng rất cao chất tăng trưởng tế bào bên trong chúng. Các chất tăng trưởng bao gồm PDGF-BB, VEGF-A, HFG, FGF-2, và TGF-β. Các chất tăng trưởng này có vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng và phát triển và tái tạo, trong trường hợp này là tế bào da và mô da. Do vậy, sản phẩm chất tiết từ giải pháp hữu ích này có tác dụng trong phục hồi sự phát triển khoẻ mạnh và hoạt động chức năng của tế bào da, giúp tế bào da tăng sinh về mặt số lượng và tăng tổng hợp protein cấu trúc da, giúp cho duy trì làn da khoẻ mạnh và tươi trẻ.

Tài liệu trích dẫn

Bian, S. Y., Liu, H. B., Liu, H. W., & Zhu, Q. W. (2018). Mesenchymal Stem Cells Stimulated by Growth Factors Release Exosom with Potent Proangiogenic Activity. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi (Article in Chinese), 26*(5), 1538-1542. doi:10.7534/j.issn.1009-2137.2018.05.046

Fisher, G. J., Kang, S., Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wan, Y., Datta, S., & Voorhees, J. J. (2002). Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol, 138*(11), 1462-1470. doi:10.1001/archderm.138.11.1462

Friedlaender, G. E., Lin, S., Solchaga, L. A., Snel, L. B., & Lynch, S. E. (2013). The role of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) in orthopaedic bone repair and regeneration. *Curr Pharm Des, 19*(19), 3384-3390. doi:10.2174/1381612811319190005

Hao, S., Bai, O., Yuan, J., Qureshi, M., & Xiang, J. (2006). Dendritic cell-derived exosom stimulate stronger CD8+ CTL responses and antitumor immunity than tumor cell-derived exosom. *Cellular & molecular immunology, 3*(3), 205-211.

Harn, H. J., Huang, M. H., Huang, C. T., Lin, P. C., Yen, S. Y., Chou, Y. W., . . . Lin, S. Z. (2013). Rejuvenation of aged pig facial skin by transplanting allogeneic granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cells from a young pig. *Cell Transplant, 22*(4), 755-765. doi:10.3727/096368912x661436

Heldin, C. H. (1992). Structural and functional studies on platelet-derived growth factor. *Embo j, 11*(12), 4251-4259.

Jianbin, Z., Jiahao, J., Meidi, H., Chifeng, C., Jinhui, W., Li, Y. (2018). Method for preparing mesenchymal stem cell exosom and application thereof. CN109097326 (A) - 2018-12-28.

Keller, S., Altevogt, P., Rupp, C., Stoeck, A., Runz, S., Fogel, M., . . . Gutwein, P. (2007). CD24 is a marker of exosom secreted into urine and amniotic fluid. *Kidney International, 72*(9), 1095-1102. doi:10.1038/sj.ki.5002486

Lai, R. C., Arslan, F., Lee, M. M., Sze, N. S., Choo, A., Chen, T. S., . . . Lim, S. K. (2010). Exosom secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res, 4*(3), 214-222. doi:10.1016/j.scr.2009.12.003

Lasser, C., Valadi, H., Alikhani, V. S., Ekstrom, K., Eldh, M., Paredes, P. T., . . . Lotvall, J. (2011). Human saliva, plasma and breast milk exosom contain RNA: uptake by macrophages. *Journal Of Translational Medicine, 9*(1), 9-9. doi:10.1186/1479-5876-9-9

Liping, S., Juan, Z., Xumei, L., Fangfang, P., Zexin, Z., Juan, H., Keqin, W., Yan, Y., Chun, X., Huozhen, H., Hong, Xue. H. (2019). Preparation method and application of regeneration factor. CN109172605 (A) - 2019-01-11

Michael, A., Bajracharya, S. D., Yuen, P. S. T., Zhou, H., Star, R. A., Illei, G. G., & Alevizos, I. (2010). Exosom from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral diseases, 16*(1), 34-38. doi:10.1111/j.1601-0825.2009.01604.x

Phinney, D. G., & Prockop, D. J. (2007). Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells, 25*(11), 2896-2902. doi:10.1634/stemcells.2007-0637

Sil, C.Y., Soon, P.W., Kyung, S.D., Yoon, A.S. (2015). Method for enhanced producing of stem cell-derivd exosom using thrombin. KR20150069555 (A) - 2015-06-23.

Sun, K.K., Won, S.K., Lee, K.Y., Jin, K.Y. (2017). Stem cell-derived exosom containing a high amount of growth factors. KR20170085010 (A) - 2017-07-21

Turturici, G., Tinnirello, R., Sconzo, G., & Geraci, F. (2014). Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *Am J Physiol Cell Physiol, 306*(7), C621-633. doi:10.1152/ajpcell.00228.2013

Yuan, O., Lin, C., Wagner, J., Archard, J. A., Deng, P., Halmai, J., . . . Anderson, J. D. (2019). Exosom derived from human primed mesenchymal stem cells induce mitosis and potentiate growth factor secretion. *Stem Cells Dev, 28*(6), 398-409. doi:10.1089/scd.2018.0200

Zonneveld, M. I., Brisson, A. R., van Herwijnen, M. J. C., Tan, S., van de Lest, C. H. A., Redegeld, F. A., . . . Nolte-'t Hoen, E. N. M. (2014). Recovery of extracellular vesicles from human breast milk is influenced by sample collection and vesicle isolation procedures. *Journal Of Extracellular Vesicles, 3*, 1-12. doi:10.3402/jev.v3.24215

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất exosom chứa chất tiết chứa yếu tố tăng trưởng tế bào từ tế bào gốc trung mô dây rốn, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(i) nuôi cấy tăng sinh tạo nguồn tế bào, bao gồm:

tạo lớp cơ chất phủ bề mặt chai nuôi cấy bằng cách phủ dung dịch chất nền hỗ trợ tế bào gốc bám dính CELLstart đã pha loãng 300 lần theo thể tích trong đệm muối phosphat (phosphat buffer salin - PBS) lên bề mặt chai nuôi cấy với thể tích bằng khoảng 1/2 thể tích môi trường nuôi cấy dự định; ủ trong 30 phút ở 37°C, hút bỏ dung dịch khỏi chai nuôi cấy và tráng bề mặt chai nuôi cấy 2 lần bằng PBS;

ủ môi trường nuôi cấy tế bào gốc StemMACS MSC Expansion Media, ở 37°C trong thời gian từ 30 phút đến 1 giờ hoặc ở nhiệt độ phòng từ 20°C – 25°C trong 2 giờ;

chuẩn bị dung dịch tế bào gốc trung mô dây rốn có nồng độ 375.000 tế bào/mL;

cấy tế bào với nồng độ 375.000 tế bào/mL vào chai nuôi cấy chứa môi trường nuôi cấy tế bào gốc StemMACS MSC Expansion Media đã làm ấm theo tỉ lệ dung dịch tế bào : môi trường nuôi cấy là 1 : 9 theo thể tích, nuôi ở 37°C và 5% CO_2, thay môi trường nuôi cấy tế bào gốc có thể tích tương đương sau mỗi 2 ngày cho tới khi tế bào phát triển đạt 80% diện tích bề mặt chai nuôi cấy;

cấy chuyển tế bào sang chai chứa môi trường nuôi cấy tế bào gốc mới bao gồm bước: hút loại bỏ dịch nuôi tế bào khỏi chai nuôi cấy, rửa chai nuôi cấy bằng PBS sao cho dịch PBS phủ toàn bộ bề mặt chai nuôi cấy, loại bỏ PBS và bổ sung vào chai nuôi tế bào dung dịch enzym phân tách tế bào Gibco TrypLE Select 1X theo tỷ lệ dung dịch enzym : dịch nuôi tế bào là 1 : 4 theo thể tích, ủ ở 37°C trong 5 phút để phân tách tế bào khỏi bề mặt chai nuôi cấy, bổ sung 5mL môi trường nuôi cấy ấm vào 1 chai T75 hoặc 15 mL môi trường nuôi cấy tế bào gốc StemMACS MSC Expansion Media ấm vào chai nuôi cấy để bất hoạt enzym, hút toàn bộ dịch huyền phù chứa tế bào vào ống ly tâm falcon và ly tâm với tốc độ 300 x g (tương đương 1137 vòng/phút) trong 5 phút, loại bỏ dịch nổi và đánh tan cặn tế bào trong 5 mL môi trường nuôi cấy tế bào gốc StemMACS MSC Expansion Media, pha loãng để thu được dung dịch tế bào gốc trung mô dây rốn ở lần cấy chuyển thứ nhất (P1) có nồng độ 350.000 tế bào/mL để thực hiện bước nuôi cấy tăng sinh tiếp theo;

trong đó, bước (i) nuôi cấy tăng sinh được lặp lại 4 lần để thu được tế bào gốc ở lần cấy chuyển thứ 4 (P4) có nồng độ 350.000 tế bào/mL;

(ii) nuôi cấy kích thích tế bào tiết chất tiết, bao gồm:

cấy chuyển tế bào gốc trung mô ở P4 thu được ở bước (i) sang chai nuôi cấy chứa môi trường nuôi cấy tế bào gốc StemMACS MSC Expansion Media như nêu trong bước (i); lắc nhẹ để tế bào phân bố đều bề mặt chai nuôi cấy; ủ ở 37°C và 5% CO_2 cho tới khi tế bào gốc đạt 80 – 90 % diện tích bề mặt chai nuôi cấy để thu được tế bào gốc trung mô ở P5, trong đó không thay môi trường nuôi cấy tế bào gốc để kích thích tế bào tiết chất tiết;

(iii) thu dịch nuôi tế bào, bao gồm:

hút dịch nuôi tế bào gốc trung mô ở P5 thu được từ bước (ii) vào các ống ly tâm và hạ nhiệt độ về 4°C trong thời gian tối đa 48 giờ trước khi thực hiện ly tâm thu exosom chứa chất tiết;

(iv) thu chất tiết tế bào, bao gồm:

ly tâm dịch nuôi tế bào gốc trung mô ở P5 thu được ở bước (iii) ở tốc độ 300 x g (tương đương 1137 vòng/phút) trong 10 phút ở 4°C để loại bỏ cặn là tạp chất tế bào gồm xác tế bào chết và mảnh vỡ tế bào, thu dịch nổi;

tiếp tục ly tâm dịch nổi ở tốc độ 2.000 x g (tương đương 3427 vòng/phút) trong thời gian 10 phút ở 4°C để loại bỏ sản phẩm tế bào chết theo chương trình là thể apoptotic, thu dịch nổi chứa chất tiết tế bào gồm microvesicle (vi thể) và exosom, loại bỏ cặn;

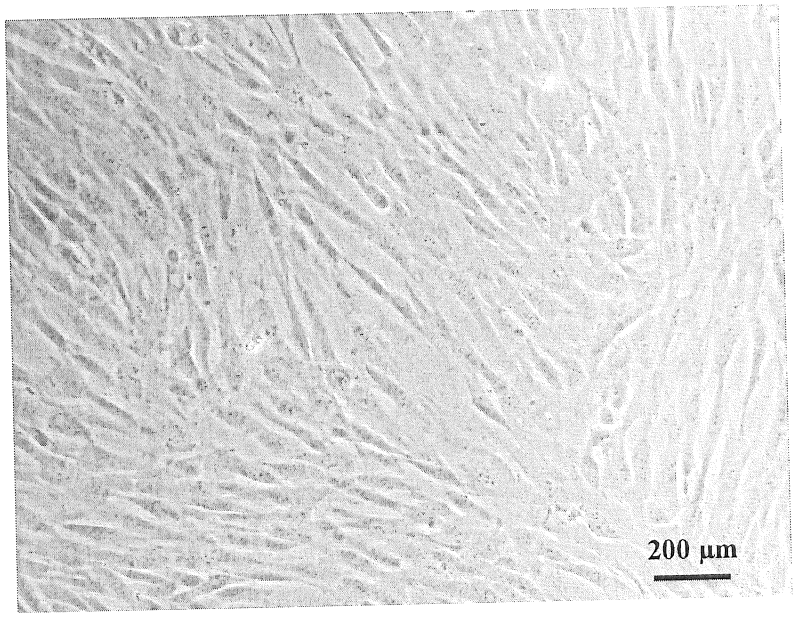
siêu ly tâm dịch nổi chứa microvesicle và exosom ở tốc độ 10.000 x g (tương đương 7.662 vòng/phút) trong thời gian 30 phút, nhiệt độ: 4°C để thu được dịch nổi chứa exosom;

siêu ly tâm dịch nổi chứa exosom ở tốc độ 100.000 x g (tương đương 237.440 vòng/phút) trong thời gian 70 phút, nhiệt độ: 4°C để thu phần cặn chứa exosom chứa chất tiết tế bào, đánh tan cặn thu được trong PBS để thu được dung dịch PBS chứa exosom có thể tích 12 mL; và

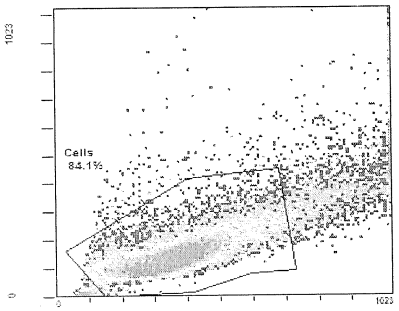
siêu ly tâm dung dịch PBS chứa exosom ở tốc độ 100.000 x g (tương đương 237.440 vòng/phút) trong 10 phút ở 4°C, thu cặn là exosom chứa các chất tiết giàu chất tăng trưởng tế bào sạch;

trong đó bước nuôi cấy tăng sinh và bước nuôi cấy kích thích tế bào tiết chất tiết không sử dụng kháng sinh và không bổ sung thêm huyết thanh nhau thai bò (FBS) vào môi trường nuôi cấy tế bào gốc StemMACS MSC Expansion Media.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó dịch nuôi tế bào thu được sau ở bước (ii) chứa chất tiết tế bào có hàm lượng các yếu tố tăng trưởng tế bào HGF, FGF, VEGF, PGPDGF-BB, và TGFβ tính trên một triệu tế bào lần lượt là 139,084pg, 127,006pg, 12,595pg, 6,336pg và 4,924pg khi đo bằng bộ kit phát hiện và định lượng các yếu tố tăng trưởng tế bào HGF, FGF, VEGF, PGPDGF-BB, và TGFβ Custom ProcartaPlex Multiplex Panel.

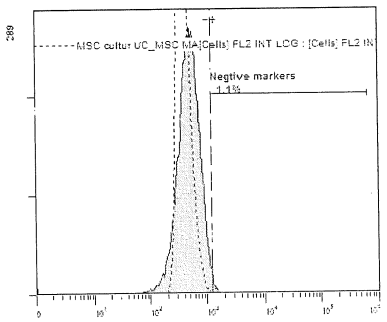


HÌNH 1



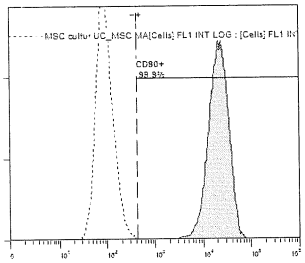
[Ungated] FS INT LIN/SS INT LIN

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	25419	100.00	100.00	424	180
Cells	21374	84.09	84.09	370	148



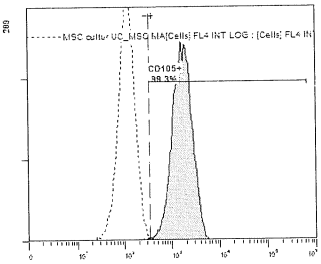
[Cells] FL2 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	21374	84.09	100.00	522.6	###
Negtive markers	229	0.90	1.07	1366	###



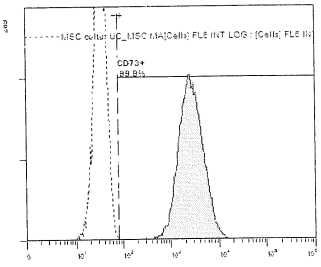
[Cells] FL1 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	21374	84.09	100.00	23080.1	###
CD90+	21361	84.04	99.94	23094	###



[Cells] FL4 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	21374	84.09	100.00	1816.5	###
CD105+	21233	83.53	99.34	1826.9	###



[Cells] FL6 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	21374	84.09	100.00	3147	###
CD73+	21357	84.02	99.92	3149.4	###

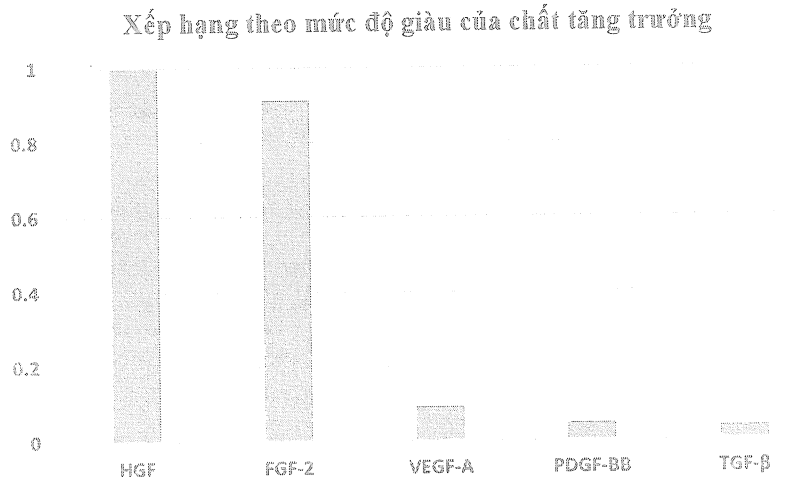
HÌNH 2

Mẫu	Số lượng tế bào (x 10^6)	Tổng số protein thu được (µg)	Lượng protein tổng số tiết/1 x 10^6 tế bào
1	42,5	1.269,157	298,625
2	40,6	1.177,166	289,942
3	39,6	1.204,763	304,233
4	41,4	1.174,406	283,673
5	38,5	1.098,244	285,258
Trung bình: 1 x 10^6 tế bào gốc trung mô dây rốn tiết 292,346 µg protein tổng số			

HÌNH 3

	Khối lượng chất tăng trưởng tế bào (pg)/10^6 tế bào				
Mẫu	VEGF-A	FGF-2	HGF	PDGF-BB	TGF-β
1	20,199	287,720	86,190	22,942	7,981
2	14,758	118,177	340,874	2,639	4,234
3	13,673	72,210	206,063	3,084	4,410
4	7,126	-	30,745	1,571	-
5	7,217	29,918	31,546	1,443	3,072
Trung bình	12,595	127,006	139,084	6,336	4,924

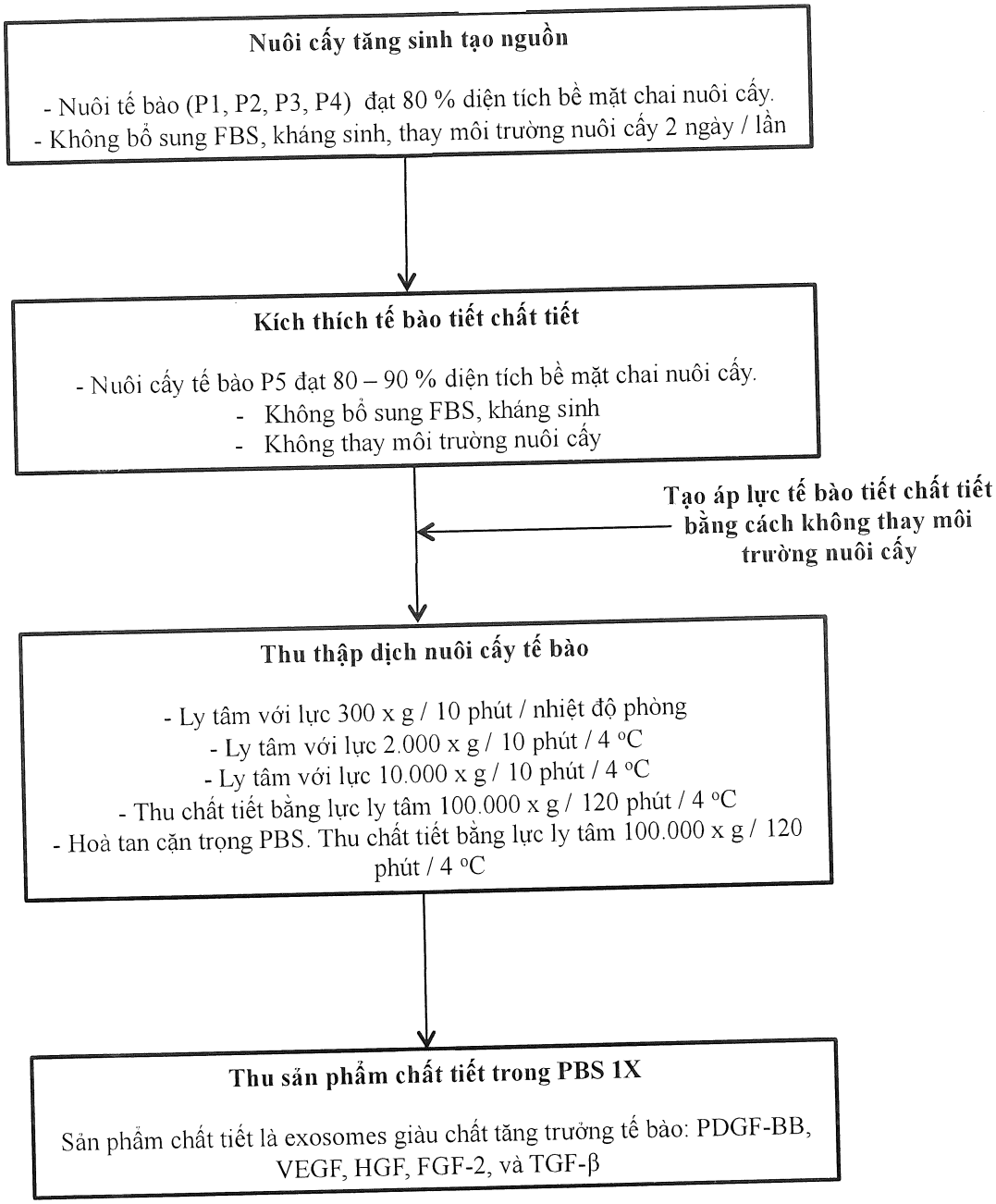
HÌNH 4



HÌNH 5

	VEGF-A	FGF-2	HGF	PDGF-BB	TGF-β
Nhóm A Chất tiết từ tế bào gốc trung mô dây rốn P5 nuôi trong môi trường StemMACS/1 x 10^6 tế bào (theo sáng chế) (pg)	12,595	127,006	139,084	6,336	4,924
Nhóm B Chất tiết từ tế bào gốc trung mô dây rốn P5 nuôi trong môi trường Powerstem/1 x 10^6 tế bào (pg)	9,339	51,064	89,451	2,032	2,659
Tỷ lệ chất tiết theo sáng chế cao hơn nhóm chứng (A/B) (lần)	1,349	2,487	1,555	3,118	1,852

HÌNH 6


Nuôi cấy tăng sinh tạo nguồn
- Nuôi tế bào (P1, P2, P3, P4) đạt 80 % diện tích bề mặt chai nuôi cấy.
- Không bổ sung FBS, kháng sinh, thay môi trường nuôi cấy 2 ngày / lần
Kích thích tế bào tiết chất tiết
- Nuôi cấy tế bào P5 đạt 80 – 90 % diện tích bề mặt chai nuôi cấy.
- Không bổ sung FBS, kháng sinh
- Không thay môi trường nuôi cấy
Tạo áp lực tế bào tiết chất tiết bằng cách không thay môi trường nuôi cấy
Thu thập dịch nuôi cấy tế bào
- Ly tâm với lực 300 x g / 10 phút / nhiệt độ phòng
- Ly tâm với lực 2.000 x g / 10 phút / 4 °C
- Ly tâm với lực 10.000 x g / 10 phút / 4 °C
- Thu chất tiết bằng lực ly tâm 100.000 x g / 120 phút / 4 °C
- Hoà tan cặn trọng PBS. Thu chất tiết bằng lực ly tâm 100.000 x g / 120 phút / 4 °C
Thu sản phẩm chất tiết trong PBS 1X
Sản phẩm chất tiết là exosomes giàu chất tăng trưởng tế bào: PDGF-BB, VEGF, HGF, FGF-2, và TGF-β

Hình 7