



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
1-0051457
(51)^{2020.01} C12N 5/09; C12R 1/91; C12Q 1/02; (13) B
A61K 49/00
-

- (21) 1-2020-06606 (22) 19/03/2019
(86) PCT/CN2019/078703 19/03/2019 (87) WO 2019/196606 17/10/2019
(30) PCT/CN2018/083110 13/04/2018 CN
(45) 25/09/2025 450 (43) 26/04/2021 397A
(73) Shanghai LIDE Biotech Co., Ltd. (CN)
Room 302, Bldg 77-78, 887 Zuchongzhi RD, (Shanghai) Free Trade Zone, Shanghai
201203, China
(72) WEN, Danyi (CN).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)
-

- (54) PHƯƠNG PHÁP THU MÔ HÌNH ĐỘNG VẬT ĐỂ SÀNG LỌC THUỐC KHÁNG
KHỐI U

(21) 1-2020-06606

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp thu mô hình động vật từ các tế bào khối u được lập trình lại có điều kiện để sàng lọc thuốc kháng khối u và phương pháp sàng lọc thuốc kháng khối u bằng cách sử dụng mô hình động vật này.

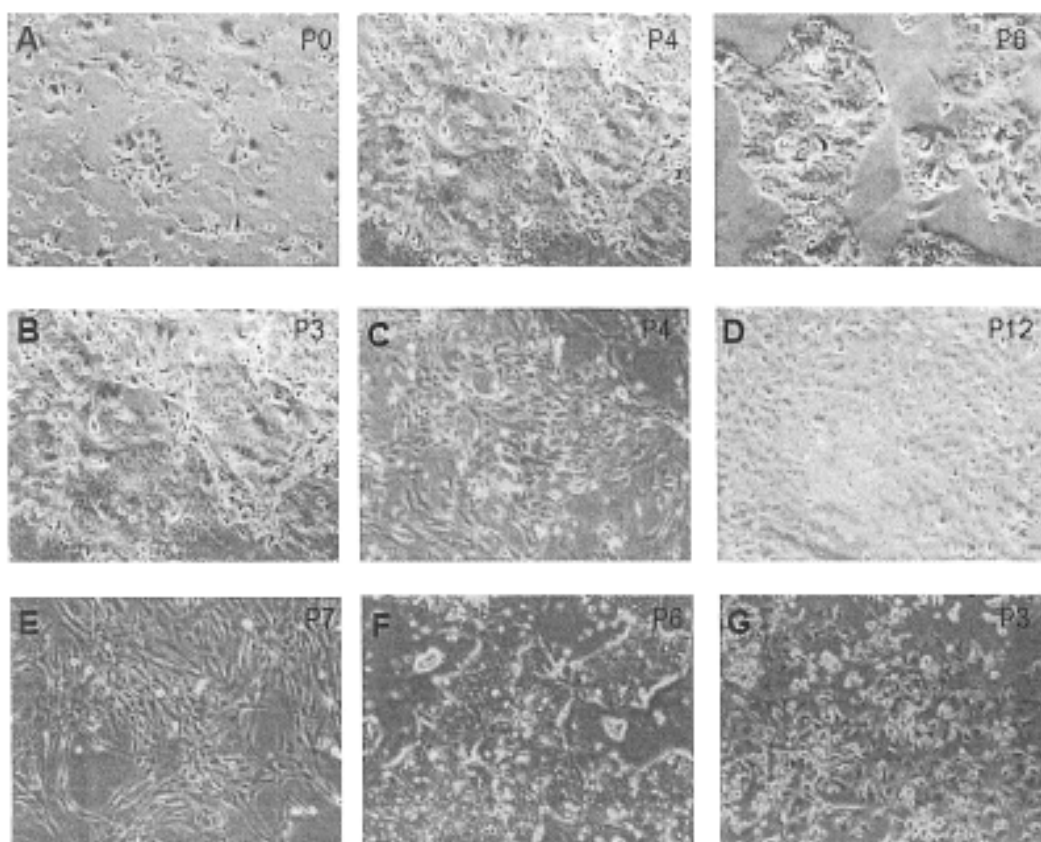


Fig.1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm để nhân giống tế bào khối u nguyên phát thu được từ mẫu sinh thiết khối u của bệnh nhân ở cả điều kiện *in vitro* và *in vivo*, phương pháp nhân giống tế bào khối u nguyên phát thu được ở chế phẩm, phương pháp thu mô hình động vật để sàng lọc hiệu quả của thuốc kháng khối u sử dụng mô hình động vật.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Lập trình lại có điều kiện (Conditional reprogramming - CR) là kỹ thuật nuôi cấy tế bào mà có thể được sử dụng để thiết lập nhanh chóng và hiệu quả việc nuôi cấy tế bào gồm cả tế bào bình thường và tế bào có bệnh lấy từ bệnh nhân, bao gồm các tế bào khối u. Thuận lợi lớn nhất của CR là mở rộng nhanh chóng và hiệu quả việc nuôi cấy tế bào từ các mẫu mô của bệnh nhân. Việc này cho phép các nhà nghiên cứu sàng lọc khối u nhạy với thuốc kháng bệnh ung thư hoặc các liệu pháp miễn dịch đủ nhanh để đưa ra thông tin cho việc sử dụng lâm sàng.

Thử nghiệm thuốc kháng khối u trong mô hình động vật về hiệu quả của thuốc là quan trọng khi mô hình động vật là quan trọng đối với việc sàng lọc thuốc kháng khối u. Mô hình động vật này sẽ giả làm môi trường *in vivo* của bệnh nhân, phản ánh đáp ứng của bệnh nhân và nhờ đó hiệu quả hơn. Để thiết lập các mô hình động vật, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này thường cần thu được số lượng tế bào khối u đủ lớn. Tuy nhiên, các mẫu khối u thu được từ bệnh nhân có thể chứa lượng tế bào khối u rất nhỏ hoặc thậm chí ở lượng vết phụ thuộc vào việc thu được chúng bằng cách nào. Ví dụ, mẫu khối u thu được từ sinh thiết kim có thể chứa lượng tế bào khối u rất nhỏ và do đó rất khó để người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sử dụng chúng để thiết lập mô hình động vật mong muốn để sàng lọc thuốc kháng khối u.

Sự bất tử của tế bào khối u thông qua việc lập trình lại có điều kiện là

công cụ vô giá để tạo ra việc nhân giống các tế bào khối u để chẩn đoán dựa vào tế bào, thử nghiệm nhạy với thuốc và ngân hàng sinh học (bio-banking) *in vitro*. Tuy nhiên, làm cách nào để nuôi cấy hiệu quả và thành công các tế bào khối u nguyên phát thu được từ bệnh nhân, đặc biệt là lượng mẫu tế bào thấp hoặc ở lượng vết từ, ví dụ, sinh thiết kim, vẫn còn là thách thức.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để giải quyết vấn đề nêu trên, tác giả sáng chế đã lập trình lại có điều kiện một cách thành công các tế bào khối u nguyên phát từ một số dạng khối u hướng đến sự bất tử và sử dụng các tế bào khối u được lập trình lại có điều kiện để thiết lập mô hình động vật để thử nghiệm thuốc kháng khối u. Các tế bào khối u nguyên phát thu được từ các phẫu thuật mô, các mẫu sinh thiết hoặc mẫu sinh thiết kim. Các tế bào khối u nguyên phát được lập trình lại có điều kiện thu được theo sáng chế bộc lộ sự phát triển cụm khuẩn điển hình, mà được duy trì tốt khi đông lạnh. Trong một số trường hợp, các tế bào có thể được đi qua nhiều lần và trở thành các dòng tế bào hữu dụng. Giống như các tế bào khối u nguyên phát, các tế bào khối u được lập trình lại có điều kiện là đáng tin để thử nghiệm độ nhạy của thuốc *in vitro*. Tác giả sáng chế đã cấy thành công các tế bào khối u được lập trình lại có điều kiện (CRC) vào mô hình động vật để thử nghiệm hiệu quả của thuốc, và sàng lọc thuốc kháng khối u sử dụng mô hình động vật. Sáng chế còn bộc lộ việc sử dụng các tế bào khối u được lập trình lại có điều kiện trong các thử nghiệm về hiệu quả của thuốc.

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất phương pháp thu mô hình động vật để sàng lọc thuốc kháng khối u, bao gồm:

(1) nuôi cấy tế bào khối u nguyên phát thu được từ mẫu sinh thiết khối u của bệnh nhân trong chế phẩm bao gồm:

- a) 0,01-1,0 mg/L Hydrocortison;
- b) 1,0 -10,0 mg/L Inulin;
- c) 1,0-20,0 µg/L độc tố tả;
- d) 2,0-50,0 mg/L Adenin;

- e) 1,0-30,0 $\mu\text{g/L}$ EGF;
- f) 1,0-30,0 $\mu\text{mol/L}$ Y- 27632;
- g) Pen/Strep;
- h) 2-20% FBS;
- i) môi trường F12
- j) DMEM với glucoza cao, và tùy ý
- k) Dung dịch axit amin không thiết yếu;
- l) GlutaMAX bổ sung;

(2) cấy tế bào khối u nguyên phát thu được từ bước (1) vào động vật. Theo các phương án, chế phẩm ở bước (1) của phương pháp theo sáng chế bao gồm các bước:

- a) 0,3-0,5 mg/L, tốt hơn là 0,4 mg/L Hydrocortison;
- b) 4-6 mg/L, tốt hơn là 5 mg/L Inulin;
- c) 7-9 $\mu\text{g/L}$, tốt hơn là 8,3 $\mu\text{g/L}$ độc tố tả;
- d) 20-30 mg/L, tốt hơn là 24,2 mg/L Adenin;
- e) 8-12 $\mu\text{g/L}$, tốt hơn là 10 $\mu\text{g/L}$ EGF;
- f) 8-12 $\mu\text{mol/L}$, tốt hơn là 10 $\mu\text{mol/L}$ Y- 27632;
- g) Pen/Strep;
- h) 8-12%, tốt hơn là 10% FBS;
- i) môi trường F12
- j) DMEM với glucoza cao, và tùy ý
- k) Dung dịch axit amin không thiết yếu;
- l) GlutaMAX bổ sung.

Theo các phương án, mẫu sinh thiết khối u là mẫu sinh thiết kim. Theo các phương án, nồng độ của các tế bào khối u nguyên phát trong mẫu thu được từ sinh thiết kim nhỏ hơn khoảng 2mol/L, nhỏ hơn khoảng 1,9mol/L, nhỏ hơn

khoảng 1,8mol/L, nhỏ hơn khoảng 1,7mol/L, nhỏ hơn khoảng 1,6mol/L, nhỏ hơn khoảng 1,5mol/L, nhỏ hơn khoảng 1,4 mol/L, nhỏ hơn khoảng 1,3 mol/L, nhỏ hơn khoảng 1,2 mol/L, nhỏ hơn khoảng 1,1 mol/L, nhỏ hơn khoảng 1,0 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,9 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,8 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,7 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,6 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,5 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,4 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,3 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,2 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,1 mol/L hoặc nhỏ hơn, như nhỏ hơn khoảng 2 mol/L, nhỏ hơn khoảng 1,7 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,8 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,64 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,59 mol/L. Theo các phương án, tế bào khối u nguyên phát được nuôi cấy bằng tế bào nuôi trong chế phẩm của bước (1), đặc biệt là tế bào nuôi là tế bào nguyên bào sợi từ phôi của chuột nhắt (MEF). Theo các phương án, các tế bào MEF đã được điều trị bằng mitomycin C.

Theo các phương án, động vật theo sáng chế là chuột nhắt hoặc chuột cống, đặc biệt là chuột nhắt thiếu hụt miễn dịch, như chuột nhắt trụi lông. Theo các phương án, tế bào khối u nguyên phát thu được ở bước (1) được cấy vào động vật trong sợi rỗng. Theo các phương án, sợi rỗng được làm từ polyvinyliden florua biến đổi, đặc biệt hơn là sợi rỗng được làm từ polyvinyliden florua biến đổi và có giá trị ngưỡng là 500000 Dalton.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất mô hình động vật để sàng lọc thuốc kháng khối u thu được bằng phương pháp theo sáng chế. Theo các phương án, động vật theo sáng chế là chuột nhắt hoặc chuột cống, đặc biệt là chuột nhắt thiếu hụt miễn dịch, như chuột nhắt trụi lông.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sàng lọc thuốc kháng khối u sử dụng mô hình động vật theo sáng chế, phương pháp này bao gồm bước dùng thuốc ứng viên cho mô hình động vật theo sáng chế. Theo các phương án, phương pháp nêu trên còn bao gồm bước đo sự phát triển của khối u trong mô hình động vật theo sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện hình thái của các tế bào được lập trình lại có điều kiện trong sự phát triển các cụm khuẩn từ các mẫu khối u khác nhau. A, việc đi qua

P0, P4 và P6 của các tế bào nguyên phát được lập trình lại có điều kiện có nguồn gốc từ mẫu phẫu thuật của bệnh nhân ung thư phổi; B, các tế bào được lập trình lại có điều kiện P3 có nguồn gốc từ mẫu sinh thiết của bệnh nhân ung thư phổi; C, các tế bào được lập trình lại có điều kiện P4 có nguồn gốc từ mẫu sinh thiết kim của bệnh nhân ung thư biểu mô bọc dạng tuyến; D, tế bào P12 có nguồn gốc từ mẫu sinh thiết kim của bệnh nhân u trung biểu mô màng bụng; E, tế bào P7 có nguồn gốc từ mẫu phẫu thuật của bệnh nhân u nguyên bào đệm; F, tế bào P6 có nguồn gốc từ mẫu sinh thiết của bệnh nhân ung thư đại trực tràng; G, tế bào P3 có nguồn gốc từ mẫu phẫu thuật của bệnh nhân ung thư biểu mô túi mật.

Fig. 2 A, kết quả của hiệu quả kháng khối u của thuốc thử nghiệm ở các mô hình Mini-PDX MDX079; B, kết quả của hiệu quả kháng khối u của thuốc thử nghiệm ở các mô hình Mini-PDX MDX083; C, kết quả của hiệu quả kháng khối u của thuốc thử nghiệm ở các mô hình Mini-PDX MDX095; D, kết quả của hiệu quả kháng khối u của thuốc thử nghiệm ở các mô hình Mini-PDX MDX107; E, kết quả của hiệu quả kháng khối u của thuốc thử nghiệm ở các mô hình Mini-PDX MDX123.

Fig. 3 A, kết quả của hiệu quả kháng khối u của thuốc thử nghiệm ở các mô hình Mini-PDX MDX133; B, kết quả của hiệu quả kháng khối u của thuốc thử nghiệm ở các mô hình Mini-PDX MDX154; C, kết quả của hiệu quả kháng khối u của thuốc thử nghiệm ở các mô hình Mini-PDX MDX164; D, kết quả của hiệu quả kháng khối u của thuốc thử nghiệm ở các mô hình Mini-PDX MDX165; E, kết quả của hiệu quả kháng khối u của thuốc thử nghiệm ở các mô hình Mini-PDX MDX168. F, kết quả của hiệu quả kháng khối u của thuốc thử nghiệm ở các mô hình Mini-PDX MDX169; G, kết quả của hiệu quả kháng khối u của thuốc thử nghiệm ở các mô hình Mini-PDX MDX174; H, kết quả của hiệu quả kháng khối u của thuốc thử nghiệm ở các mô hình Mini-PDX MDX186; I, kết quả của hiệu quả kháng khối u của thuốc thử nghiệm ở các mô hình Mini-PDX MDX189; J, kết quả của hiệu quả kháng khối u của thuốc thử nghiệm ở các mô hình Mini-PDX MDX203.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp thu mô hình động vật để sàng lọc thuốc kháng khối u, phương pháp này bao gồm các bước (1) nuôi cấy tế bào khối u nguyên phát thu được từ mẫu sinh thiết khối u của bệnh nhân trong chế phẩm bao gồm:

- a) 0,01-1,0 mg/L Hydrocortison;
- b) 1,0 -10,0 mg/L Inulin;
- c) 1,0-20,0 $\mu\text{g/L}$ độc tố tả;
- d) 2,0-50,0 mg/L Adenin;
- e) 1,0-30,0 $\mu\text{g/L}$ EGF;
- f) 1,0-30,0 $\mu\text{mol/L}$ Y- 27632;
- g) Pen/Strep;
- h) 2-20% FBS;
- i) môi trường F12
- j) DMEM với glucoza cao, và tùy ý
- k) Dung dịch axit amin không thiết yếu;
- l) GlutaMAX bổ sung; và

(2) cấy tế bào khối u nguyên phát thu được từ bước (1) vào động vật. Theo các phương án, mẫu sinh thiết khối u là mẫu sinh thiết kim. Theo các phương án, nồng độ của các tế bào khối u trong mẫu thu được từ sinh thiết kim nhỏ hơn khoảng 2mol/L.

Nồng độ của hydrocortison trong chế phẩm của bước (1) có thể là 0,01-1,0 mg/L, đặc biệt là khoảng 0,05-1,0 mg/L, khoảng 0,1-1,0 mg/L, khoảng 0,1-0,9 mg/L, khoảng 0,2-0,8 mg/L, khoảng 0,2-0,7 mg/L, khoảng 0,25-0,65mg/L, khoảng 0,25-0,6mg/L, khoảng 0,3-0,5mg/L, khoảng 0,35-0,55mg/L, khoảng 0,35-0,4mg/L, khoảng 0,4-0,45mg/L, khoảng 0,35-0,45mg/L, khoảng 0,45-0,55mg/L, khoảng 0,05 mg/L, khoảng 0,1 mg/L, khoảng 0,2 mg/L, khoảng 0,3 mg/L, khoảng 0,31 mg/L, khoảng 0,32 mg/L, khoảng 0,33 mg/L, khoảng 0,34 mg/L, khoảng 0,35 mg/L, khoảng 0,36 mg/L,

khoảng 0,37 mg/L, khoảng 0,38 mg/L, khoảng 0,39 mg/L, khoảng 0,4 mg/L, khoảng 0,41 mg/L, khoảng 0,42 mg/L, khoảng 0,43 mg/L, khoảng 0,44 mg/L, khoảng 0,45 mg/L, khoảng 0,46 mg/L, khoảng 0,47 mg/L, khoảng 0,48 mg/L, khoảng 0,49 mg/L, khoảng 0,5 mg/L, khoảng 0,6 mg/L, khoảng 0,7 mg/L, khoảng 0,8 mg/L, khoảng 0,9 mg/L, khoảng 1,0 mg/L.

Nồng độ của insulin trong chế phẩm của bước (1) có thể là 1,0-10 mg/L, đặc biệt là khoảng 1-10 mg/L, khoảng 2-9 mg/L, khoảng 3-8 mg/L, khoảng 3-7 mg/L, khoảng 4,5-6,5 mg/L, khoảng 4-6 mg/L, khoảng 1 mg/L, khoảng 2 mg/L, khoảng 3 mg/L, khoảng 4 mg/L, khoảng 5 mg/L, khoảng 6 mg/L, khoảng 7 mg/L, khoảng 8 mg/L, khoảng 9 mg/L, khoảng 10 mg/L.

Nồng độ của độc tố tả trong chế phẩm của bước (1) có thể là 1-20 $\mu\text{g/L}$, đặc biệt là khoảng 2-20 $\mu\text{g/L}$, khoảng 3-18 $\mu\text{g/L}$, khoảng 4-15 $\mu\text{g/L}$, khoảng 5-10 $\mu\text{g/L}$, khoảng 6-10 $\mu\text{g/L}$, khoảng 7-9 $\mu\text{g/L}$, khoảng 7,5-8,5 $\mu\text{g/L}$, khoảng 1 $\mu\text{g/L}$, khoảng 2 $\mu\text{g/L}$, khoảng 3 $\mu\text{g/L}$, khoảng 4 $\mu\text{g/L}$, khoảng 5 $\mu\text{g/L}$, khoảng 6 $\mu\text{g/L}$, khoảng 7 $\mu\text{g/L}$, khoảng 8 $\mu\text{g/L}$, khoảng 8,1 $\mu\text{g/L}$, khoảng 8,2 $\mu\text{g/L}$, khoảng 8,3 $\mu\text{g/L}$, khoảng 8,4 $\mu\text{g/L}$, khoảng 8,5 $\mu\text{g/L}$, khoảng 8,6 $\mu\text{g/L}$, khoảng 8,7 $\mu\text{g/L}$, khoảng 8,8 $\mu\text{g/L}$, khoảng 8,9 $\mu\text{g/L}$, khoảng 9 $\mu\text{g/L}$, khoảng 10 $\mu\text{g/L}$, khoảng 11 $\mu\text{g/L}$, khoảng 12 $\mu\text{g/L}$, khoảng 13 $\mu\text{g/L}$, khoảng 14 $\mu\text{g/L}$, khoảng 15 $\mu\text{g/L}$, khoảng 16 $\mu\text{g/L}$, khoảng 17 $\mu\text{g/L}$, khoảng 18 $\mu\text{g/L}$, khoảng 19 $\mu\text{g/L}$, khoảng 20 $\mu\text{g/L}$.

Nồng độ của adenin trong chế phẩm của bước (1) có thể là 2-50 mg/L, đặc biệt là khoảng 5-40 mg/L, khoảng 10-30 mg/L, khoảng 15-30 mg/L, khoảng 20-30 mg/L, khoảng 22-27 mg/L, khoảng 23-26 mg/L, khoảng 24-25 mg/L, khoảng 2 mg/L, khoảng 6 mg/L, khoảng 8 mg/L, khoảng 10 mg/L, khoảng 12 mg/L, khoảng 14 mg/L, khoảng 16 mg/L, khoảng 18 mg/L, khoảng 20 mg/L, khoảng 21 mg/L, khoảng 22 mg/L, khoảng 23 mg/L, khoảng 24 mg/L, khoảng 24,1 mg/L, khoảng 24,2 mg/L, khoảng 24,3 mg/L, khoảng 24,4 mg/L, khoảng 24,5 mg/L, khoảng 24,6 mg/L, khoảng 24,7 mg/L, khoảng 24,8 mg/L, khoảng 24,9 mg/L, khoảng 25 mg/L, khoảng 26 mg/L, khoảng 27 mg/L, khoảng 28 mg/L, khoảng 29 mg/L, khoảng 30 mg/L, khoảng 35 mg/L, khoảng 40 mg/L.

Nồng độ của EGF trong chế phẩm của bước (1) có thể là 1-30 $\mu\text{g/L}$, đặc

biệt là khoảng 2-20 $\mu\text{g/L}$, khoảng 4-18 $\mu\text{g/L}$, khoảng 6-16 $\mu\text{g/L}$, khoảng 8-12 $\mu\text{g/L}$, khoảng 9-11 $\mu\text{g/L}$, khoảng 9,5-10,5 $\mu\text{g/L}$, khoảng 2 $\mu\text{g/L}$, khoảng 4 $\mu\text{g/L}$, khoảng 6 $\mu\text{g/L}$, khoảng 7 $\mu\text{g/L}$, khoảng 8 $\mu\text{g/L}$, khoảng 9 $\mu\text{g/L}$ about 10 $\mu\text{g/L}$, khoảng 11 $\mu\text{g/L}$, khoảng 12 $\mu\text{g/L}$, khoảng 14 $\mu\text{g/L}$, khoảng 16 $\mu\text{g/L}$, khoảng 18 $\mu\text{g/L}$, khoảng 20 $\mu\text{g/L}$, khoảng 25 $\mu\text{g/L}$, khoảng 30 $\mu\text{g/L}$.

Nồng độ của Y-27632 trong chế phẩm của bước (1) có thể là 1-30 $\mu\text{mol/L}$, đặc biệt là khoảng 2-20 $\mu\text{mol/L}$, khoảng 4-18 $\mu\text{mol/L}$, khoảng 6-16 $\mu\text{mol/L}$, khoảng 8-12 $\mu\text{mol/L}$, khoảng 9-11 $\mu\text{mol/L}$, khoảng 9,5-10,5 $\mu\text{mol/L}$, khoảng 2 $\mu\text{mol/L}$, khoảng 4 $\mu\text{mol/L}$, khoảng 6 $\mu\text{mol/L}$, khoảng 7 $\mu\text{mol/L}$, khoảng 8 $\mu\text{mol/L}$, khoảng 9 $\mu\text{mol/L}$, khoảng 10 $\mu\text{mol/L}$, khoảng 11 $\mu\text{mol/L}$, khoảng 12 $\mu\text{mol/L}$, khoảng 14 $\mu\text{mol/L}$, khoảng 16 $\mu\text{mol/L}$, khoảng 18 $\mu\text{mol/L}$, khoảng 20 $\mu\text{mol/L}$, khoảng 25 $\mu\text{mol/L}$, khoảng 30 $\mu\text{mol/L}$.

Nồng độ của FBS trong chế phẩm của bước (1) có thể là 2-20%, đặc biệt là khoảng 4-15%, khoảng 5-18%, khoảng 6-16%, khoảng 7-14%, khoảng 8-12%, khoảng 9-11%, khoảng 9,5-10,5%, khoảng 2%, khoảng 4%, khoảng 6%, khoảng 7%, khoảng 8%, khoảng 9%, khoảng 10%, khoảng 11%, khoảng 12%, khoảng 14%, khoảng 16%, khoảng 18%, khoảng 20%.

Theo các phương án, sáng chế đề xuất phương pháp thu mô hình động vật để sàng lọc thuốc kháng khối u, phương pháp này bao gồm bước (1) nuôi cấy tế bào khối u nguyên phát thu được từ mẫu sinh thiết khối u của bệnh nhân trong chế phẩm bao gồm:

- a) 0,3-0,5 mg/L, tốt hơn là 0,4 mg/L Hydrocortison;
- b) 4-6 mg/L, tốt hơn là 5 mg/L Inulin;
- c) 7-9 $\mu\text{g/L}$, tốt hơn là 8,3 $\mu\text{g/L}$ độc tố tả;
- d) 20-30 mg/L, tốt hơn là 24,2 mg/L Adenin;
- e) 8-12 $\mu\text{g/L}$, tốt hơn là 10 $\mu\text{g/L}$ EGF;
- f) 8-12 $\mu\text{mol/L}$, tốt hơn là 10 $\mu\text{mol/L}$ Y- 27632;
- g) Pen/Strep;
- h) 8-12%, tốt hơn là 10% FBS;

- i) môi trường F12
- j) DMEM với glucoza cao, và tùy ý
- k) Dung dịch axit amin không thiết yếu;
- l) GlutaMAX bổ sung; và

(2) cấy tế bào khối u nguyên phát thu được từ bước (1) vào động vật. Theo các phương án, mẫu sinh thiết khối u là mẫu sinh thiết kim. Theo các phương án, nồng độ của các tế bào khối u nguyên phát trong mẫu thu được từ sinh thiết kim nhỏ hơn khoảng 2mol/L, nhỏ hơn khoảng 1,9mol/L, nhỏ hơn khoảng 1,8mol/L, nhỏ hơn khoảng 1,7mol/L, nhỏ hơn khoảng 1,6mol/L, nhỏ hơn khoảng 1,5mol/L, nhỏ hơn khoảng 1,4 mol/L, nhỏ hơn khoảng 1,3 mol/L, nhỏ hơn khoảng 1,2 mol/L, nhỏ hơn khoảng 1,1 mol/L, nhỏ hơn khoảng 1,0 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,9 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,8 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,7 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,6 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,5 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,4 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,3 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,2 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,1 mol/L hoặc nhỏ hơn, như nhỏ hơn khoảng 2 mol/L, nhỏ hơn khoảng 1,7 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,8 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,64 mol/L, nhỏ hơn khoảng 0,59 mol/L. Theo các phương án, tế bào khối u nguyên phát được nuôi cấy bằng tế bào nuôi trong chế phẩm của bước (1), đặc biệt là tế bào nuôi là tế bào nguyên bào sợi từ phôi của chuột nhắt (MEF). Theo các phương án, các tế bào MEF đã được điều trị bằng mitomycin C.

Theo các phương án, động vật trong phương pháp theo sáng chế là chuột nhắt hoặc chuột cống, đặc biệt là chuột nhắt thiếu hụt miễn dịch, như chuột nhắt trụi lông. Theo các phương án, tế bào khối u nguyên phát thu được ở bước (1) được cấy vào động vật trong sợi rỗng. Theo các phương án, sợi rỗng được làm từ polyvinyliden florua biến đổi, đặc biệt hơn là sợi rỗng được làm từ polyvinyliden florua biến đổi và có giá trị ngưỡng là 500000 Dalton.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất mô hình động vật để sàng lọc thuốc kháng khối u thu được bằng phương pháp theo sáng chế. Theo các phương án, động vật theo sáng chế là chuột nhắt hoặc chuột cống, đặc biệt là chuột nhắt thiếu hụt miễn dịch, như chuột nhắt trụi lông.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sàng lọc thuốc kháng khối u sử dụng mô hình động vật theo sáng chế, phương pháp này bao gồm bước dùng thuốc ứng viên cho mô hình động vật theo sáng chế. Theo các phương án, phương pháp nêu trên còn bao gồm bước đo sự phát triển của khối u trong mô hình động vật theo sáng chế.

Các tế bào khối u có thể thu được từ nhiều loại khối u khác nhau, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở các khối u ở đại tiêu hóa (như dạ dày, ruột, tá tràng, ruột kết, tuyến tụy, v.v.), vú, phổi, gan, và tuyến nội tiết (như tuyến thượng thận, tuyến cận giáp, tuyến yên, tinh hoàn, buồng trứng, và tuyến ức, tuyến giáp), hệ tiết niệu và sinh sản (như thận, bàng quang, buồng trứng, tinh hoàn, tuyến tiền liệt, v.v.), hệ cơ xương (như xương, cơ trơn, cơ vân, v.v.), da, và v.v.. Ví dụ, các tế bào khối u có thể có nguồn gốc từ bệnh ung thư dạ dày, mẫu sinh thiết của mười hai mẫu ung thư kết trực tràng và ung thư phổi.

Các tế bào khối u nguyên phát được lập trình lại có điều kiện có thể được cấy vào động vật thông qua ống tiêm hoặc các phương pháp hoặc thiết bị khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo các phương án, các tế bào khối u nguyên phát được lập trình lại có điều kiện được cấy vào động vật bằng phương pháp tạo ra mô hình PDX để phát triển khối u *in vivo*. Xem trong tài liệu, ví dụ, “Melanoma patient-derived xenografts accurately model the disease and develop fast enough to guide treatment decisions”, *Oncotarget*, Vol. 5, No. 20, Berglind O. Einarsdottir et.al., công bố ngày 8 tháng 9 năm 2014, “Personalizing Cancer Treatment in the Age of Global Genomic Analyses: PALB2 Gene Mutations and the Response to DNA Damaging Agents in Pancreatic Cancer”, *Molecular Cancer Therapies*, công bố ngày 6 tháng 12 năm 2010; DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0893, Maria C. Villarroel. Theo các phương án, các tế bào khối u nguyên phát được lập trình lại có điều kiện được chuyển vào ống sợi rỗng, mà sau đó được cấy vào động vật. Sợi rỗng này có thể được làm từ polyvinyliden florua biến đổi và có giá trị ngưỡng là 500000 Dalton. Theo sáng chế, thiết bị mini-PDX khi liên quan đến sợi rỗng có thể được làm từ polyvinyliden florua biến đổi và có giá trị ngưỡng là 500000 Dalton, mà có thể chứa các tế bào khối u nguyên phát thu được từ bệnh nhân và

được cấy vào động vật ứng viên, ví dụ, được cấy vào dưới da động vật ứng viên. Theo sáng chế, mô hình mini-PDX liên quan đến động vật đã được cấy thiết bị mini-PDX theo sáng chế. Mô hình động vật có mini-PDX có thể được sử dụng trong các phương pháp/thử nghiệm được mô tả trong sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cập đến phương pháp sàng lọc thuốc kháng khối u sử dụng mô hình động vật theo sáng chế, bao gồm bước cho mô hình động vật theo sáng chế dùng thuốc ứng viên. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước đo sự sinh trưởng của các tế bào khối u được mô hình động vật theo sáng chế mang trước và sau khi dùng như nêu trên. Theo một số phương án, kích thước của khối u được đo trước và trong khoảng từ 5 đến 14 ngày, đặc biệt là 5 đến 7 ngày sau khi cho mô hình động vật theo sáng chế dùng thuốc đó. Theo một số phương án, mức độ chết rụng tế bào khối u được đo trước và trong khoảng từ 5 đến 14 ngày, đặc biệt là 5 đến 7 ngày sau khi cho mô hình động vật theo sáng chế dùng thuốc đó. Theo một số phương án, mức độ biệt hóa tế bào khối u được đo trước và trong khoảng từ 5 đến 14 ngày, đặc biệt là 5 đến 7 ngày sau khi cho mô hình động vật theo sáng chế dùng thuốc đó. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ chọn phương pháp thích hợp để đo mức độ sinh trưởng của các tế bào khối u mà mô hình động vật theo sáng chế mang trước và sau khi dùng như nêu trên.

Thuốc này có thể được dùng thông qua đường thích hợp bất kỳ, qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa. Ví dụ, thuốc ứng viên được dùng cho mô hình động vật theo sáng chế bằng cách dùng qua đường miệng hoặc tiêm trong cơ (như bằng cách truyền trong cơ, dưới da hoặc trong tĩnh mạch), dùng khu trú, xông hít, và phân phối qua da như cao dán trên da, mô cấy, thuốc đạn, v.v.. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ chọn đường dùng thích hợp theo nhu cầu của họ.

Thuốc ứng viên cần được sàng lọc theo sáng chế có thể là thuốc kháng khối u đã biết hoặc tổ hợp của nó, thuốc kháng khối u mới hoặc tổ hợp, hoặc tổ hợp mới của các thuốc kháng khối u đã biết. Trong phương pháp theo sáng chế, thuốc cần được sàng lọc có thể được sử dụng ở dạng rắn, dạng bán rắn hoặc dạng lỏng.

Các động vật ứng viên có thể được cho dùng thuốc bằng cách dùng qua đường miệng hoặc tiêm trong cơ (như bằng cách truyền trong cơ, dưới da hoặc trong tĩnh mạch), dùng khu trú, xông hít, và phân phối qua da như cao dán trên da, mô cấy, thuốc đạn, v.v. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ chọn đường dùng thích hợp theo nhu cầu của họ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả rõ hơn dưới đây dựa vào các hình vẽ đi kèm.

Môi trường lập trình lại có điều kiện

Môi trường chứa các thành phần sau:

- 375mL môi trường F12 (bán trên thị trường), 125mL DMEM với nồng độ glucoza cao (bán trên thị trường), 25mL FBS 10% (bán trên thị trường), 5mL hydrocortison, 5mL insulin, 5mL độc tố tả, 5mL adenin, 5mL Pen/Strep (bán trên thị trường), 5mL EGF, 1mL Y-27632.
- Các thành phần tùy ý: dung dịch axit amin không thiết yếu (bán trên thị trường); và GlutaMAX bổ sung (bán trên thị trường).

Điều chế:

Các thành phần dưới đây được điều chế:

- Hydrocortison: hòa tan 25mg hydrocortison bán trên thị trường trong 5mL etanol lạnh 100% để tạo ra dung dịch 5mg/mL. Bổ sung 0,8mL dung dịch 5mg/mL vào 100mL HBES chứa huyết thanh bào thai bò (FBS) 5%. Lọc vô trùng và bảo quản ở nhiệt độ -20°C trong các phần phân ước 10mL. Nồng độ cuối cùng của hydrocortison là 0,4mg/L.
- Độc tố tả: bổ sung 1,2mL nước vô trùng vào ống chứa 1mg độc tố tả (bán trên thị trường), thu được 10 μM dung dịch. Pha loãng 50 μL dung dịch 10 μM vào 50mL HBES chứa albumin huyết thanh bò 0,1%. Lọc vô trùng và bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong các phần phân ước 10mL. Nồng độ cuối cùng của độc tố tả là 8,3 $\mu\text{g/L}$.

- Insulin: hòa tan 12,5mg insulin bán trên thị trường trong 25mL HCL 0,005M. Lọc vô trùng bằng bộ lọc dạng ống tiêm được thấm ướt FBS từ trước. Nồng độ cuối cùng của insulin là 5 mg/L.
- Adenin: hòa tan 121mg adenin bán trên thị trường trong 50mL HCl 0,05M bằng cách khuấy trong 1 giờ. Lọc vô trùng và bảo quản ở nhiệt độ -20°C trong các phần phân ước 10mL. Nồng độ cuối cùng của adenin là 24,2 mg/L.
- Yếu tố sinh trưởng biểu bì (Epidermal growth factor-EGF): hòa tan 100 μg EGF bán trên thị trường trong 10mL nước vô trùng. Bổ sung 90mL HBES chứa albumin huyết thanh bò 0,1%. Lọc vô trùng và bảo quản ở nhiệt độ -20°C trong các phần phân ước 10mL. Nồng độ cuối cùng của EGF là 10 $\mu\text{g/L}$.
- Y- 27632; 10 μmol trong DMSO. Bán trên thị trường.

Sau đó môi trường này được giữ một cách thích hợp ở nơi lạnh để sử dụng.

Chuẩn bị tế bào nuôi:

Các tế bào nguyên bào sợi phôi chuột nhắt MEF (mouse embryonic fibroblast) được phân lập từ các phôi e13.5 của chuột nhắt C57 và được cho sinh trưởng trong DMEM có bổ sung FBS 10%. Các tế bào MEF đã phân lập trong 3 đến 5 lần cấy chuyển được xử lý bằng mitomycin C (10 $\mu\text{g/ml}$) trong 2 giờ và được rửa bằng PBS. MEF đã xử lý được gom và được bảo quản khô lạnh dưới dạng tế bào nuôi.

Ví dụ 1

1. Nguyên liệu

1.1 Khối u dùng để lập trình lại có điều kiện

Các tế bào lập trình lại có điều kiện từ MDX079, MDX083, MDX095, MDX107, MDX123 được gom một cách riêng rẽ. MDX079 có nguồn gốc từ bệnh nhân nữ mắc ung thư phổi, mô hình MDX083 có nguồn gốc từ bệnh nhân nam 27 tuổi mắc ung thư biểu mô bọc dạng tuyến, mô hình MDX095 có nguồn gốc từ bệnh nhân nam 54 tuổi mắc u trung biểu mô màng bụng ác tính, mô hình MDX107 có nguồn gốc từ bệnh nhân nam 54 tuổi mắc u nguyên bào đệm, mô

hình MDX123 có nguồn gốc từ bệnh nhân nam 53 tuổi mắc ung thư đại trực tràng.

1.2 Động vật

1.2.1 Balb/c trụi lông, cái, được mua từ Trung tâm động vật thí nghiệm Thượng Hải (Lingchang, Thượng Hải, Trung Quốc, SCXK(SH)2013-0018).

Độ tuổi: 6-8 tuần

Giới tính: cái

Thể trọng: 18-22 g

1.2.2 Điều kiện nuôi giữ

Chuột nhất được giữ trong phòng SPF ở nhiệt độ và độ ẩm không đổi với 3 con trong mỗi lồng.

- Nhiệt độ: 20~26°C.

- Độ ẩm: 40~70%.

- Chu kỳ ánh sáng: 12 giờ sáng và 12 giờ tối.

Lồng: Được làm từ polycarbonat. Kích thước là 325mm x 210mm x 180mm. Vật liệu lót ổ là lõi ngô, được thay hai lần một tuần.

Chế độ ăn: các con vật được tự do tiếp cận thức ăn dạng hạt khô được vô trùng nhờ chiếu xạ trong toàn bộ giai đoạn nghiên cứu.

Nước: Các con vật được tự do tiếp cận nước uống vô trùng.

Nhận dạng lồng: các nhãn dán nhận dạng cho mỗi lồng chứa thông tin sau: số lượng con, giới tính, chủng, ngày tiếp nhận, điều trị, số hiệu nghiên cứu, số hiệu nhóm, và ngày bắt đầu điều trị. Định danh động vật: Các con được đánh dấu bằng cách viết mã lên tai.

1.3 Thiết bị

Kính hiển vi đảo ngược DMIL, LEICA. Balance ALC-310.3, Acclulab. Microbalance BSA224S, Sartorius. Centrifuge 5810R, Eppendorf.

Thiết bị mini-PDX: sợi rồng được làm từ polyvinyliden florua biến đổi có giá trị ngưỡng là 500000 Dalton, đường kính trong 1-2mm. Cắt thành độ dài mong muốn.

2. Quy trình và phương pháp

2.1 Nuôi cấy tế bào

2.1.1

Rửa mẫu mô khối u bằng dung dịch đệm và loại bỏ mô không phải khối u và mô khối u hoại tử trong tủ an toàn sinh học. Cắt khối u thành các mảnh $1\sim 3\text{mm}^3$, tạo huyền phù viên bằng dung dịch collagenaza 1X và ủ ở nhiệt độ 37°C trong từ 1 đến 2 giờ. Gom các tế bào đơn lẻ thông qua thiết bị lọc 70uM, đếm số lượng tế bào để tính nồng độ tế bào khối u (Xem 9. Nồng độ tế bào khối u thu được từ quá trình phẫu thuật và sinh thiết/sinh thiết kim). Nuôi cấy các tế bào bằng môi trường lập trình lại có điều kiện, và sau khi các tế bào khối u tăng sinh, thì thu các tế bào lập trình lại có điều kiện đó.

2.1.2

Tạo huyền phù các mô khối u thu được từ sinh thiết/sinh thiết kim trong dung dịch collagenaza 1X và ủ ở nhiệt độ 37°C trong từ 1 đến 2 giờ. Gom các tế bào đơn lẻ thông qua thiết bị lọc 70uM, đếm số lượng tế bào để tính nồng độ tế bào khối u (Xem 9. Nồng độ tế bào khối u thu được từ phẫu thuật và sinh thiết/sinh thiết kim). Nuôi cấy các tế bào bằng môi trường lập trình lại có điều kiện và sau khi các tế bào khối u tăng sinh thu các tế bào lập trình lại có điều kiện.

2.2 Cấy ghép thiết bị mini-PDX

Huyền phù chứa các tế bào được làm đầy vào thiết bị mini-PDX và các thiết bị này được cấy ghép dưới da vào cả hai bên sườn của các con chuột nhắt trụi lông Nu/Nu, để thiết lập mô hình mini-PDX. Ngày cấy ghép được xác định

là ngày 0. Chuột nhất được chia ngẫu nhiên vào các nhóm theo thể trọng và việc điều trị được bắt đầu vào ngày 0. Việc dùng vật phẩm thử nghiệm và số thiết bị mini-PDX trong mỗi nhóm nghiên cứu được thể hiện trong các bảng thiết kế thí nghiệm sau đây.

Bảng 1 Nhóm MDX079 và điều trị

Nhóm	N	Điều trị	Liều (mg/kg)	Đường dùng liều	Lịch trình
1	5	Chất dẫn thuốc	0	<i>i.p.</i>	qd*5
2	6	Gemxitabin+Carboplatin	60+50	<i>i.p.</i>	q4d*2+qw
3	6	Doxetaxel+Carboplatin	20+50	<i>i.p.</i>	q4d*2+qw
4	6	Pemetrexed+Carboplatin	200+50	<i>i.p.</i>	qd*5+qw
5	6	Pemetrexed+Carboplatin+ Bevacizumab	200+50+1 0	<i>i.p.</i>	qd*5+qw+q4d*2
6	6	Etoposit+Carboplatin	20+50	<i>i.p.</i>	q4d*2+qw

Lưu ý: N: số lượng thiết bị mini-PDX;

i.p.: tiêm trong màng bụng;

qd: một lần mỗi ngày;

q4d: 4 ngày/lần;

qw: một lần mỗi tuần;

Bảng 2 Nhóm MDX083 và điều trị

Nhóm	N	Điều trị	Liều (mg/kg)	Đường dùng liều	Lịch trình
1	6	Chất dẫn thuốc	0	<i>i.p.</i>	qd*5
2	6	Paclitaxel+Cisplatin	20+5	<i>i.p.</i>	q4d*2+qw

3	6	Gemxitamin+Cisplatin	60+5	<i>i.p.</i>	q4d*2+qw
4	6	Doxetaxel+Carboplatin	20+50	<i>i.p.</i>	q4d*2+qw
5	6	5-Fu+Cisplatin	25+5	<i>i.p.</i>	qd*5+qw
6	6	Epirubixin+5-Fu+Cisplatin	5+25+5	<i>i.p.</i>	qw+qd*5+qw

Lưu ý: N: số lượng thiết bị mini-PDX;

i.p.: tiêm trong màng bụng;

qd: một lần mỗi ngày;

q4d: 4 ngày/lần;

qw: một lần mỗi tuần;

Bảng 3 Nhóm MDX095 và điều trị

Nhóm	N	Điều trị	Liều (mg/kg)	Đường dùng liều	Lịch trình
1	6	Chất dẫn thuốc	0	<i>i.p.</i>	qd*5
2	4	Gemxitamin+Cisplatin	60+5	<i>i.p.</i>	q4d*2+qw
3	6	5-Fu	25	<i>i.p.</i>	qd*5
4	6	Cisplatin	5	<i>i.p.</i>	q4d*2
5	6	Paclitaxel	20	<i>i.p.</i>	q4d*2
6	6	Epirubixin	10	<i>i.p.</i>	q4d*2
7	6	Etoposit	20	<i>i.p.</i>	q4d*2

Lưu ý: N: số lượng thiết bị mini-PDX;

i.p.: tiêm trong màng bụng;

qd: một lần mỗi ngày;

q4d: 4 ngày/lần;

qw: một lần mỗi tuần;

Bảng 4 Nhóm MDX107 và điều trị

Nhóm	N	Điều trị	Liều (mg/kg)	Đường dùng liều	Lịch trình
1	6	Chất dẫn thuốc	0	<i>p.o.</i>	qd*5
2	6	Temozolomit	50	<i>p.o.</i>	qd*5

Lưu ý: N: số lượng thiết bị mini-PDX;

p.o.: dùng qua đường miệng;

qd: một lần mỗi ngày;

Bảng 5 nhóm MDX123 và điều trị

Nhóm	N	Điều trị	Liều (mg/kg)	Đường dùng liều	Lịch trình
1	6	Chất dẫn thuốc	0	<i>i.p.</i>	qd*5
2	6	5-Fu	25	<i>i.p.</i>	qd*5
3	6	Oxaliplatin	5	<i>i.p.</i>	q4d*2
4	6	Irinotecan	50	<i>i.p.</i>	q4d*2
5	6	Raltitrexed	30	<i>i.p.</i>	q4d*2
6	6	Bevacizumab	10	<i>i.p.</i>	q4d*2
7	6	Cetuximab	30	<i>i.p.</i>	q4d*2

Lưu ý: N: số lượng thiết bị mini-PDX;

i.p.: tiêm trong màng bụng;

qd: một lần mỗi ngày;

q4d: 4 ngày/lần;

2.3 Quan sát

Phương pháp và (các) sửa đổi bất kỳ hoặc quy trình liên quan đến việc chăm sóc và sử dụng động vật trong nghiên cứu này được xem xét và phê duyệt bởi Ủy ban Chăm sóc và Sử dụng Động vật (Institutional Animal Care and Use Committee - IACUC) của Shanghai LIDE trước khi thực hiện. Trong nghiên cứu này, việc chăm sóc và sử dụng động vật được thực hiện theo các nguyên tắc của Tổ chức Đánh giá và Cấp phép Chăm sóc Động vật Thí nghiệm (the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care - AAALAC). Sau khi tiêm truyền, các con vật được kiểm tra hằng ngày về tỷ lệ mắc và tỷ lệ tử vong. Tại thời điểm theo dõi chu trình, các con vật được kiểm tra về tác động bất kỳ của việc phát triển khối u và việc điều trị đến trạng thái bình thường như độ linh hoạt, sự tiêu thụ thức ăn và nước, tăng/giảm thể trọng (thể trọng được đo hai lần mỗi tuần hoặc một lần cách ngày), mắt/lông xỉn màu và tác động bất thường khác bất kỳ. Sự chết và các dấu hiệu lâm sàng quan sát được được ghi lại trên cơ sở số lượng con vật trong từng tập hợp con.

2.4 Điểm cuối

2.4.1 Thể trọng được đo hằng ngày, giai đoạn điều trị của các nghiên cứu này là 7 ngày, khi kết thúc, tất cả các con chuột nhất được trợ tử và thiết bị mini-PDX được loại bỏ đối với thử nghiệm CTG (khả năng sống của tế bào). Tốc độ tăng sinh khối u tương đối (%) là chỉ báo cho hoạt tính kháng khối u.

2.4.2 Khi $V_{Cd7} - V_{d0} > 0$, thì tốc độ tăng sinh khối u tương đối (%) = $(V_{Td7} - V_{d0}) / (V_{Cd7} - V_{d0}) \times 100\%$; khi $V_{Cd7} - V_{d0} < 0$, thì tốc độ tăng sinh khối u tương đối (%) = $V_{Td7} / V_{Cd7} \times 100\%$ (V_{Td7} : khả năng sống của tế bào vào ngày 7 của nhóm điều trị; V_{Cd7} : khả năng sống của tế bào vào ngày 7 của nhóm đối chứng; V_{d0} : khả năng sống của tế bào vào ngày 0).

3. Kết quả (xem Fig. 2)

4. Tóm tắt và bàn luận

Trong mô hình mini-PDX MDX079, việc điều trị kết hợp bằng Doxetaxel và Carboplatin (T/C%=-21%) có thể dẫn đến việc làm giảm đáng kể khả năng sống của tế bào khối u; việc điều trị kết hợp bằng Gemxitabin và Carboplatin (T/C%=55%) cũng cho thấy hoạt tính kháng khối u; việc điều trị kết hợp bằng Pemetrexed và Carboplatin (T/C%=103%), việc điều trị kết hợp bằng Pemetrexed, Carboplatin và Bevacizumab (T/C%=119%), việc điều trị kết hợp bằng Etoposid và Carboplatin (T/C%=114%) không cho thấy hoạt tính kháng khối u.

Trong mô hình mini-PDX MDX083, tất cả nhóm điều trị bao gồm điều trị kết hợp bằng Paclitaxel và Cisplatin (T/C%=44%), điều trị kết hợp bằng Gemxitabin và Cisplatin (T/C%=41%), điều trị kết hợp bằng Doxetaxel và Carboplatin (T/C%=50%), điều trị kết hợp bằng 5-Fu và Cisplatin (T/C%=45%), điều trị kết hợp bằng Epirubicin, 5-Fu và Cisplatin (T/C%=45%) có thể dẫn đến việc giảm khả năng sống của tế bào khối u.

Trong mô hình mini-PDX MDX095, việc điều trị bằng 5-Fu (T/C%=80%), điều trị bằng Paclitaxel (T/C%=79%) dẫn đến sự giảm nhẹ khả năng sống của tế bào khối u; điều trị kết hợp bằng Gemxitabin và Cisplatin (T/C%=119%) không cho thấy hoạt tính kháng khối u, điều trị bằng Cisplatin (T/C%=128%), điều trị bằng Epirubicin (T/C%=120%), điều trị bằng Etoposid (T/C%=109%) không cho thấy hoạt tính kháng khối u.

Trong mô hình mini-PDX MDX107, việc điều trị bằng Temozolomit không cho thấy hoạt tính kháng khối u.

Trong mô hình mini-PDX MDX123, việc điều trị bằng 5-Fu (T/C%=75%), điều trị bằng Oxaliplatin (T/C%=61%), điều trị bằng Irinotecan (T/C%=68%), điều trị bằng Bevacizumab (T/C%=76%) có thể dẫn đến việc giảm khả năng sống của tế bào khối u; điều trị bằng Raltitrexed (T/C%=92%), điều trị bằng Bevacizumab (T/C%=101%) không cho thấy hoạt tính kháng khối u.

Ví dụ 2

5. Nguyên liệu

5.1 Khối u dùng cho lập trình lại có điều kiện

Các tế bào lập trình lại có điều kiện từ MDX133, MDX154, MDX164, MDX165, MDX168, MDX169, MDX174, MDX186, MDX189, MDX203 được gom một cách riêng rẽ. MDX133 có nguồn gốc từ bệnh nhân nam 45 tuổi mắc ung thư dạ dày, mô hình MDX154 có nguồn gốc từ bệnh nhân nữ mắc ung thư biểu mô túi mật, mô hình MDX164 có nguồn gốc từ bệnh nhân nam 43 tuổi mắc u nguyên bào đệm, mô hình MDX165 có nguồn gốc từ bệnh nhân nam 64 tuổi mắc u nguyên bào đệm, mô hình MDX168 có nguồn gốc từ bệnh nhân nữ 66 tuổi mắc ung thư biểu mô túi mật, mô hình MDX169 có nguồn gốc từ bệnh nhân nam 52 tuổi mắc ung thư phổi, mô hình MDX174 có nguồn gốc từ bệnh nhân nam 59 tuổi mắc ung thư phổi, mô hình MDX186 có nguồn gốc từ bệnh nhân nữ 54 tuổi mắc ung thư tụy, mô hình MDX189 có nguồn gốc từ bệnh nhân nam 44 tuổi mắc ung thư thực quản, mô hình MDX203 có nguồn gốc từ bệnh nhân nam 61 tuổi mắc ung thư biểu mô túi mật.

5.2 Động vật

5.2.1 Balb/c trụi lông, cái, được mua từ Trung tâm động vật thí nghiệm Thượng hải (Lingchang, Thượng Hải, Trung Quốc, SCXK(SH)2013-0018).

Độ tuổi: 6-8 tuần

Giới tính: cái

Thể trọng: 18-22 g

5.2.2 Điều kiện nuôi giữ

Chuột nhắt được giữ trong phòng SPF ở nhiệt độ và độ ẩm không đổi với 3 con trong mỗi lồng.

- Nhiệt độ: 20~26°C.

- Độ ẩm: 40~70%.

- Chu kỳ ánh sáng: 12 giờ sáng và 12 giờ tối.

Lồng: Được làm từ polycarbonat. Kích thước là 325mm x 210mm x 180mm. Vật liệu lót ổ là lõi ngô, được thay hai lần một tuần.

Chế độ ăn: Các con vật được tự do tiếp cận thức ăn dạng hạt khô được vô trùng nhờ chiếu xạ trong toàn bộ giai đoạn nghiên cứu.

Nước: Các con vật được tự do tiếp cận nước uống vô trùng.

Nhận dạng lồng: các nhãn dán nhận dạng cho mỗi lồng chứa thông tin sau: số lượng con, giới tính, chủng, ngày tiếp nhận, điều trị, số hiệu nghiên cứu, số hiệu nhóm, và ngày bắt đầu điều trị. Định danh động vật: Các con được đánh dấu bằng cách viết mã lên tai.

5.3 Thiết bị

Kính hiển vi đảo ngược DMIL, LEICA. Balance ALC-310.3, Acclulab. Microbalance BSA224S, Sartorius. Centrifuge 5810R, Eppendorf.

Thiết bị mini-PDX: sợi rỗng được làm từ polyvinyliden florua biến đổi có giá trị ngưỡng là 500000 Dalton, đường kính trong 1-2mm. Cắt thành độ dài mong muốn.

6. Quy trình và phương pháp

6.1 Nuôi cấy tế bào

6.1.1

Rửa mẫu mô khối u bằng dung dịch đệm và loại bỏ mô không phải khối u và mô khối u hoại tử trong tủ an toàn sinh học. Cắt khối u thành các mảnh 1~3mm³, tạo huyền phù viên bằng dung dịch collagenaza 1X và ủ ở nhiệt độ 37°C trong từ 1 đến 2 giờ. Gom các tế bào đơn lẻ thông qua thiết bị lọc 70uM, đếm số lượng tế bào để tính nồng độ tế bào khối u (Xem 9. Nồng độ tế bào khối u thu được từ phẫu thuật và sinh thiết/sinh thiết kim). Nuôi cấy các tế bào bằng môi trường lập trình lại có điều kiện, sau khi các tế bào khối u tăng sinh, và thu các tế bào lập trình lại có điều kiện đó.

6.1.2

Tạo huyền phù các mô khối u thu được từ sinh thiết/sinh thiết kim trong dung dịch collagenaza 1X và ủ ở nhiệt độ 37°C trong từ 1 đến 2 giờ. Gom các tế bào đơn lẻ thông qua thiết bị lọc 70µM, đếm số lượng tế bào để tính nồng độ tế bào khối u (Xem 9. Nồng độ tế bào khối u thu được từ phẫu thuật và sinh thiết/sinh thiết kim). Nuôi cấy các tế bào bằng môi trường lập trình lại có điều kiện, sau khi các tế bào khối u tăng sinh, và thu các tế bào lập trình lại có điều kiện đó.

6.2 Cấy ghép thiết bị mini-PDX

Huyền phù chứa các tế bào được làm đầy vào thiết bị mini-PDX và các thiết bị này được cấy ghép dưới da vào cả hai bên sườn của các con chuột nhắt trụi lông Nu/Nu, để thiết lập mô hình mini-PDX. Ngày cấy ghép được xác định là ngày 0. Chuột nhắt được chia ngẫu nhiên vào các nhóm theo thể trọng và việc điều trị được bắt đầu vào ngày 0. Việc dùng vật phẩm thử nghiệm và số thiết bị mini-PDX trong mỗi nhóm nghiên cứu được thể hiện trong các bảng thiết kế thí nghiệm sau đây.

Bảng 6 Nhóm MDX133 và điều trị

Nhóm	N	Điều trị	Liều (mg/kg)	Đường dùng liều	Lịch trình
1	6	Chất dẫn thuốc	0	<i>i.p.</i>	qd*5
2	6	Oxaliplatin	5	<i>i.p.</i>	q4d*2
3	6	5-Fu	25	<i>i.p.</i>	qd*5
4	6	S-1	10	<i>p.o.</i>	qd*5
5	6	Paclitaxel	20	<i>i.p.</i>	q4d*2
6	6	Irinotecan	50	<i>i.p.</i>	q4d*2

Lưu ý: N: số lượng thiết bị mini-PDX;

i.p.: tiêm trong màng bụng;

p.o.: dùng qua đường miệng;

qd: một lần mỗi ngày;

q4d: 4 ngày/lần;

Bảng 7 Nhóm MDX154 và điều trị

Nhóm	N	Điều trị	Liều (mg/kg)	Đường dùng liều	Lịch trình
1	6	Chất dẫn thuốc	0	<i>i.p.</i>	qd*5
2	6	Gemxitabin	60	<i>i.p.</i>	q4d*2
3	6	Oxaliplatin	5	<i>i.p.</i>	q4d*2
4	6	5-Fu	25	<i>i.p.</i>	qd*5
5	6	Nab-Paclitaxel	20	<i>i.v.</i>	qd*5
6	6	Irinotecan	50	<i>i.p.</i>	q4d*2

Lưu ý: N: số lượng thiết bị mini-PDX;

i.p.: tiêm trong màng bụng;

i.v.: tiêm trong tĩnh mạch;

qd: một lần mỗi ngày;

q4d: 4 ngày/lần;

Bảng 8 Nhóm MDX164 và điều trị

Nhóm	N	Điều trị	Liều (mg/kg)	Đường dùng liều	Lịch trình
1	6	Chất dẫn thuốc	0	<i>p.o.</i>	qd*5
2	6	Temozolomit	50	<i>p.o.</i>	qd*5

Lưu ý: N: số lượng thiết bị mini-PDX;

p.o.: dùng qua đường miệng;

qd: một lần mỗi ngày;

Bảng 9 Nhóm MDX165 và điều trị

Nhóm	N	Điều trị	Liều (mg/kg)	Đường dùng liều	Lịch trình
1	6	Chất dẫn thuốc	0	<i>p.o.</i>	qd*5
2	6	Temozolomit	50	<i>p.o.</i>	qd*5

Lưu ý: N: số lượng thiết bị mini-PDX;

p.o.: dùng qua đường miệng;

qd: một lần mỗi ngày;

Bảng 10 Nhóm MDX168 và điều trị

Nhóm	N	Điều trị	Liều (mg/kg)	Đường dùng liều	Lịch trình
1	6	Chất dẫn thuốc	0	<i>i.p.</i>	qd*5
2	6	Gemxitabin	60	<i>i.p.</i>	q4d*2
3	5	Oxaliplatin	5	<i>i.p.</i>	q4d*2
4	5	5-Fu	25	<i>i.p.</i>	qd*5
5	5	Nab-Paclitaxel	20	<i>i.v.</i>	qd*5
6	6	Irinotecan	50	<i>i.p.</i>	q4d*2

Lưu ý: N: số lượng thiết bị mini-PDX;

i.p.: tiêm trong màng bụng;

i.v.: tiêm trong tĩnh mạch;

qd: một lần mỗi ngày;

q4d: 4 ngày/lần;

Bảng 11 Nhóm MDX169 và điều trị

Nhóm	N	Điều trị	Liều (mg/kg)	Đường dùng liều	Lịch trình
1	6	Chất dẫn thuốc	0	<i>i.p.</i>	qd*5
2	6	Pemetrexed+Carboplatin	200+50	<i>i.p.</i>	qd*5+qw
3	6	Paclitaxel+Carboplatin	20+50	<i>i.p.</i>	q4d*2+qw
4	6	Doxetaxel+Carboplatin	20+50	<i>i.p.</i>	q4d*2+qw
5	6	Gemxitabin+Carboplatin	60+50	<i>i.p.</i>	q4d*2+qw
6	6	Vinorelbin+Carboplatin	5+50	<i>i.p.</i>	q4d*2+qw

Lưu ý: N: số lượng thiết bị mini-PDX;

i.p.: tiêm trong màng bụng;

p.o.: dùng qua đường miệng;

qd: một lần mỗi ngày;

q4d: 4 ngày/lần;

qw: một lần mỗi tuần

Bảng 12 Nhóm MDX174 và điều trị

Nhóm	N	Điều trị	Liều (mg/kg)	Đường dùng liều	Lịch trình
1	6	Chất dẫn thuốc	0	<i>i.p.</i>	qd*5
2	6	Pemetrexed+Carboplatin	200+50	<i>i.p.</i>	qd*5+qw
3	6	Paclitaxel+Carboplatin	20+50	<i>i.p.</i>	q4d*2+qw

4	6	Doxetaxel+Carboplatin	20+50	<i>i.p.</i>	q4d*2+qw
5	6	Gemxitabin+Carboplatin	60+50	<i>i.p.</i>	q4d*2+qw
6	6	Vinorelbin+Carboplatin	5+50	<i>i.p.</i>	q4d*2+qw

Lưu ý: N: số lượng thiết bị mini-PDX;

i.p.: tiêm trong màng bụng;

p.o.: dùng qua đường miệng;

qd: một lần mỗi ngày;

q4d: 4 ngày/lần;

qw: một lần mỗi tuần

Bảng 13 Nhóm MDX186 và điều trị

Nhóm	N	Điều trị	Liều (mg/kg)	Đường dùng liều	Lịch trình
1	5	Chất dẫn thuốc	0	<i>i.p.</i>	qd*5
2	5	Gemxitabin	60+5	<i>i.p.</i>	q4d*2+qw
3	5	Oxaliplatin	5	<i>i.p.</i>	q4d*2
4	5	5-Fu	25	<i>i.p.</i>	qd*5
5	5	Nab-Paclitaxel	20	<i>i.v.</i>	qd*5
6	5	Irinotecan	50	<i>i.p.</i>	q4d*2

Lưu ý: N: số lượng thiết bị mini-PDX;

i.p.: tiêm trong màng bụng;

i.v.: tiêm trong tĩnh mạch;

qd: một lần mỗi ngày;

q4d: 4 ngày/lần;

qw: một lần mỗi tuần;

Bảng 14 Nhóm MDX189 và điều trị

Nhóm	N	Điều trị	Liều (mg/kg)	Đường dùng liều	Lịch trình
1	5	Chất dẫn thuốc	0	<i>i.p.</i>	qd*5
2	5	S-1+Oxaliplatin	10+5	<i>p.o. + i.p.</i>	qd*5+qw
3	5	Doxetaxel+Cisplatin+5-Fu	20+5+5	<i>i.p.</i>	qw+qw+qd*5
4	5	5-Fu+Cisplatin	25+5	<i>i.p.</i>	qd*5+qw

Lưu ý: N: số lượng thiết bị mini-PDX;

i.p.: tiêm trong màng bụng;

p.o.: dùng qua đường miệng;

qd: một lần mỗi ngày;

q4d: 4 ngày/lần;

qw: một lần mỗi tuần;

Bảng 15 Nhóm MDX203 và điều trị

Nhóm	N	Điều trị	Liều (mg/kg)	Đường dùng liều	Lịch trình
1	5	Chất dẫn thuốc	0	<i>i.p.</i>	qd*5
2	5	Gemxitabin	60+5	<i>i.p.</i>	q4d*2+qw
3	5	Oxaliplatin	5	<i>i.p.</i>	q4d*2
4	5	5-Fu	25	<i>i.p.</i>	qd*5

5	5	Nab-Paclitaxel	20	<i>i.v.</i>	qd*5
6	5	Irinotecan	50	<i>i.p.</i>	q4d*2

Lưu ý: N: số lượng thiết bị mini-PDX;

i.p.: tiêm trong màng bụng;

i.v.: tiêm trong tĩnh mạch;

qd: một lần mỗi ngày;

q4d: 4 ngày/lần;

qw: một lần mỗi tuần;

6.3 Quan sát

Phương pháp và (các) sửa đổi bất kỳ hoặc quy trình liên quan đến việc chăm sóc và sử dụng động vật trong nghiên cứu này được xem xét và phê duyệt bởi Ủy ban Chăm sóc và Sử dụng Động vật (IACUC) của Shanghai LIDE trước khi thực hiện. Trong nghiên cứu này, việc chăm sóc và sử dụng động vật được thực hiện theo các nguyên tắc của Tổ chức Đánh giá và Cấp phép Chăm sóc Động vật Thí nghiệm (AAALAC). Sau khi tiêm truyền, các con vật được kiểm tra hàng ngày về tỷ lệ mắc và tỷ lệ tử vong. Tại thời điểm theo dõi chu trình, các con vật được kiểm tra về tác động bất kỳ của việc phát triển khối u và việc điều trị đến trạng thái bình thường như độ linh hoạt, sự tiêu thụ thức ăn và nước, tăng/giảm thể trọng (thể trọng được đo hai lần mỗi tuần hoặc một lần cách ngày), mắt/lông xin màu và tác động bất thường khác bất kỳ. Sự chết và các dấu hiệu lâm sàng quan sát được được ghi lại trên cơ sở số lượng con vật trong từng tập hợp con.

6.4 Điểm cuối

6.4.1 Thể trọng được đo hàng ngày, các giai đoạn điều trị của các nghiên cứu này là 7 ngày, khi kết thúc, tất cả các con chuột nhất được trợ tử và thiết bị mini-PDX được loại bỏ đối với thử nghiệm CTG (khả năng sống của tế bào). Tốc độ tăng sinh khối u tương đối (%) là chỉ báo cho hoạt tính kháng khối u.

6.4.2 Khi $V_{Cd7} - V_{d0} > 0$, thì tốc độ tăng sinh khối u tương đối (%) = $(V_{Td7} - V_{d0}) / (V_{Cd7} - V_{d0}) \times 100\%$; Khi $V_{Cd7} - V_{d0} < 0$, thì tốc độ tăng sinh khối u tương đối (%) = $V_{Td7} / V_{Cd7} \times 100\%$ (V_{Td7} : khả năng sống của tế bào vào ngày 7 của nhóm điều trị; V_{Cd7} : khả năng sống của tế bào vào ngày 7 của nhóm đối chứng; V_{d0} : khả năng sống của tế bào vào ngày 0).

7. Kết quả (Xem Fig. 3)

8. Tóm tắt và bàn luận

Trong mô hình mini-PDX MDX133, việc điều trị bằng Paclitaxel (T/C%=52%) có thể dẫn đến việc giảm khả năng sống của tế bào khối u, điều trị bằng Irinotecan (T/C%=72%), điều trị bằng S-1 (T/C%=86%), điều trị bằng Oxaliplatin (T/C%=89%) cũng cho thấy hoạt tính kháng khối u nhẹ; điều trị bằng 5-Fu (T/C%=103%) không cho thấy hoạt tính kháng khối u.

Trong mô hình mini-PDX MDX154, tất cả nhóm điều trị bao gồm điều trị bằng Gemxitabin (T/C%=100%), điều trị bằng Oxaliplatin (T/C%=174%), điều trị bằng 5-Fu (T/C%=111%), điều trị bằng Nab-paclitaxel (T/C%=162%), điều trị bằng Irinotecan (T/C%=227%) không cho thấy hoạt tính kháng khối u.

Trong mô hình mini-PDX MDX164, việc điều trị bằng Temozolomit (T/C%=102%) không cho thấy hoạt tính kháng khối u.

Trong mô hình mini-PDX MDX165, việc điều trị bằng Temozolomit (T/C%=29%) có thể dẫn đến việc giảm khả năng sống của tế bào khối u.

Trong mô hình mini-PDX MDX168, việc điều trị bằng Nab-paclitaxel (T/C%=15%), điều trị bằng Irinotecan (T/C%=12%) có thể dẫn đến việc giảm khả năng sống của tế bào khối u; điều trị bằng Gemxitabin (T/C%=53%), điều trị bằng Oxaliplatin (T/C%=75%) cũng cho thấy hoạt tính kháng khối u nhẹ; điều trị bằng 5-Fu (T/C%=146%) không cho thấy hoạt tính kháng khối u.

Trong mô hình mini-PDX MDX169, việc điều trị kết hợp bằng Doxetaxel và Carboplatin (T/C%=20%), việc điều trị kết hợp bằng Paclitaxel và Carboplatin (T/C%=40%) có thể dẫn đến việc giảm khả năng sống của tế bào khối u; việc điều trị kết hợp bằng Pemetrexed và Carboplatin (T/C%=55%), việc điều trị kết hợp bằng Gemxitabin và Carboplatin

(T/C%=82%), việc điều trị kết hợp bằng Vinorelbin và Carboplatin (T/C%=91%) cũng cho thấy hoạt tính kháng khối u nhẹ.

Trong mô hình mini-PDX MDX174, việc điều trị kết hợp bằng Gemxitabin và Carboplatin (T/C%=86%) cho thấy hoạt tính kháng khối u nhẹ; việc điều trị kết hợp bằng Pemetrexed và Carboplatin (T/C%=104%), việc điều trị kết hợp bằng Paclitaxel và Carboplatin (T/C%=120%), việc điều trị kết hợp bằng Doxetaxel và Carboplatin (T/C%=110%), việc điều trị kết hợp bằng Vinorelbin và Carboplatin (T/C%=134%) không cho thấy hoạt tính kháng khối u.

Trong mô hình mini-PDX MDX186, việc điều trị bằng Nab-paclitaxel (T/C%=0%), điều trị bằng Irinotecan (T/C%=5%) có thể dẫn đến việc làm giảm đáng kể khả năng sống của tế bào khối u; điều trị bằng Oxaliplatin (T/C%=47%) cho thấy hoạt tính kháng khối u; điều trị bằng Gemxitabin (T/C%=83%), điều trị bằng 5-Fu (T/C%=90%) cũng cho thấy hoạt tính kháng khối u nhẹ.

Trong mô hình mini-PDX MDX189, việc điều trị kết hợp bằng S-1 và Oxaliplatin (T/C%=-2%), điều trị kết hợp bằng Doxetaxel, Cisplatin và 5-Fu (T/C%=14%), điều trị kết hợp bằng 5-Fu và Cisplatin (T/C%=19%) có thể dẫn đến việc làm giảm đáng kể khả năng sống của tế bào khối u.

Trong mô hình mini-PDX MDX203, việc điều trị bằng Oxaliplatin (T/C%=43%), điều trị bằng Irinotecan (T/C%=48%), điều trị bằng Nab-paclitaxel (T/C%=52%) có thể dẫn đến việc giảm khả năng sống của tế bào khối u; điều trị bằng Gemxitabin (T/C%=77%), điều trị bằng 5-Fu (T/C%=83%) cũng cho thấy hoạt tính kháng khối u nhẹ.

9. Số lượng tế bào khối u đối với các mẫu thu được từ quá trình phẫu thuật và sinh thiết/sinh thiết kim các mẫu khối u

Số lượng tế bào khối u được đếm bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và sau đó biến đổi thành nồng độ tế bào khối u trong huyền phù. M: mol/L.

	ID mẫu	Nguồn gốc mẫu	Kiểu ung thư	Nồng độ tế bào khối u
1	MDX079	phẫu thuật	bệnh ung thư phổi	-
2	MDX083	sinh thiết kim	ung thư biểu mô bọc dạng tuyến	2M
3	MDX095	sinh thiết kim	u trung biểu mô màng bụng ác tính	1,7M
4	MDX107	phẫu thuật	u nguyên bào đệm	0,87M
5	MDX123	sinh thiết	ung thư đại trực tràng	0,8M
6	MDX133	phẫu thuật	bệnh ung thư dạ dày	6M
7	MDX154	phẫu thuật	ung thư biểu mô túi mật	0,42M
8	MDX164	phẫu thuật	u nguyên bào đệm	7M
9	MDX165	phẫu thuật	u nguyên bào đệm	5,9M
10	MDX168	phẫu thuật	ung thư biểu mô túi mật	4M
11	MDX169	sinh thiết	bệnh ung thư phổi	0,64M
12	MDX174	sinh thiết	bệnh ung thư phổi	0,59M
13	MDX186	phẫu thuật	bệnh ung thư tụy	0,5M
14	MDX189	phẫu thuật	bệnh ung thư thực quản	2,1M
15	MDX203	phẫu thuật	ung thư biểu mô túi mật	3,2M

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp thu mô hình động vật để sàng lọc thuốc kháng khối u, phương pháp này bao gồm các bước:

(1) nuôi cấy tế bào khối u nguyên phát thu được từ mẫu khối u của bệnh nhân trong chế phẩm bao gồm:

- a) 0,4 mg/L Hydrocortison;
- b) 5 mg/L Insulin;
- c) 8,3 μ g/L độc tố tả;
- d) 24,2 mg/L Adenin;
- e) 10 μ g/L EGF;
- f) 10 μ mol/L Y- 27632;
- g) Pen/Strep;
- h) 10% FBS;
- i) môi trường F12
- j) DMEM với glucoza cao
- k) Dung dịch axit amin không thiết yếu;
- l) GlutaMAX bổ sung; và
- m) tế bào nguyên bào sợi từ phôi của chuột nhắt đã được điều trị bằng mitomycin C; và

(2) cấy tế bào khối u nguyên phát thu được từ bước (1) vào động vật, trong đó động vật là chuột nhắt.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó mẫu khối u là mẫu phẫu thuật hoặc mẫu sinh thiết.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nồng độ của các tế bào khối u nguyên phát trong mẫu khối u thu được từ sinh thiết kim nhỏ hơn khoảng 2×10^6 /mL,

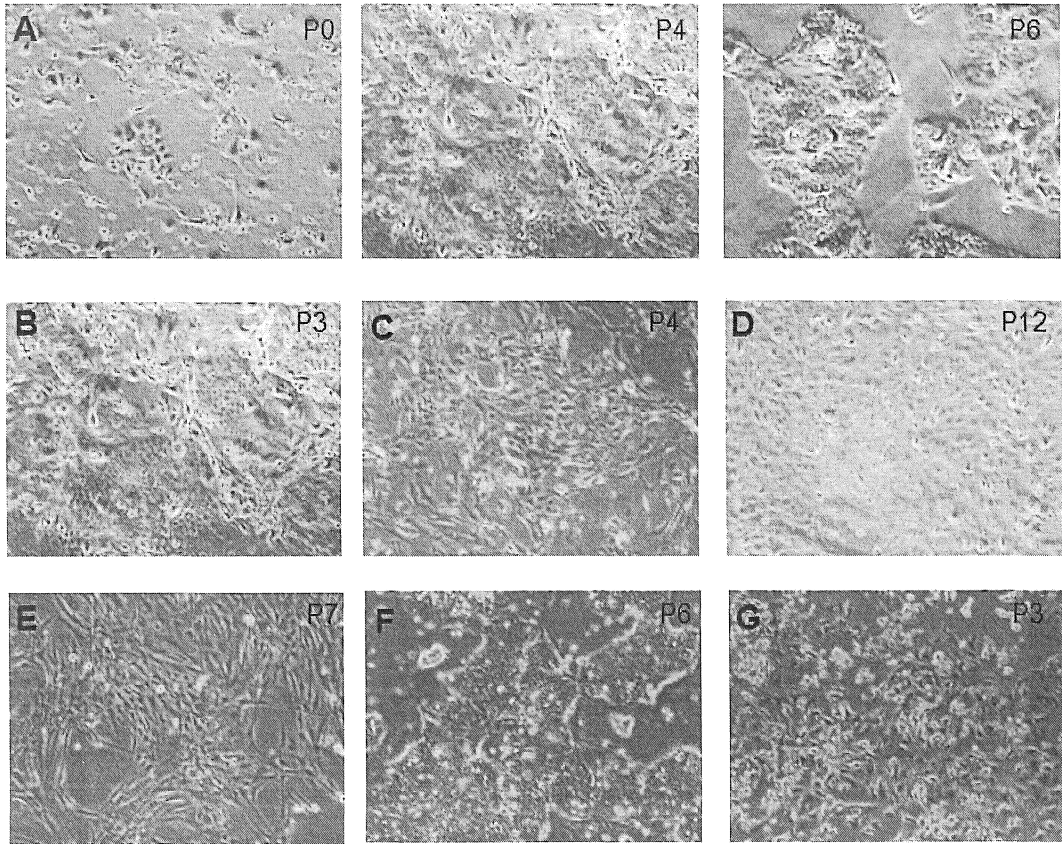
nhỏ hơn khoảng $1,9 \cdot 10^6/\text{mL}$, nhỏ hơn khoảng $1,8 \cdot 10^6/\text{mL}$, nhỏ hơn khoảng $1,7 \cdot 10^6/\text{mL}$, nhỏ hơn khoảng $1,6 \cdot 10^6/\text{mL}$, nhỏ hơn khoảng $1,5 \cdot 10^6/\text{mL}$, nhỏ hơn khoảng $1,4 \cdot 10^6/\text{mL}$, nhỏ hơn khoảng $1,3 \cdot 10^6/\text{mL}$, nhỏ hơn khoảng $1,2 \cdot 10^6/\text{mL}$, nhỏ hơn khoảng $1,1 \cdot 10^6/\text{mL}$, nhỏ hơn khoảng $1,0 \cdot 10^6/\text{mL}$, nhỏ hơn khoảng $0,9 \cdot 10^6/\text{mL}$, nhỏ hơn khoảng $0,8 \cdot 10^6/\text{mL}$, nhỏ hơn khoảng $0,7 \cdot 10^6/\text{mL}$, nhỏ hơn khoảng $0,6 \cdot 10^6/\text{mL}$, nhỏ hơn khoảng $0,5 \cdot 10^6/\text{mL}$, nhỏ hơn khoảng $0,4 \cdot 10^6/\text{mL}$, nhỏ hơn khoảng $0,3 \cdot 10^6/\text{mL}$, nhỏ hơn khoảng $0,2 \cdot 10^6/\text{mL}$, nhỏ hơn khoảng $0,1 \cdot 10^6/\text{mL}$, chẳng hạn như nhỏ hơn khoảng $2 \cdot 10^6/\text{mL}$, nhỏ hơn khoảng $1,7 \cdot 10^6/\text{mL}$, nhỏ hơn khoảng $0,8 \cdot 10^6/\text{mL}$, nhỏ hơn khoảng $0,64 \cdot 10^6/\text{mL}$, nhỏ hơn khoảng $0,59 \cdot 10^6/\text{mL}$.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chuột nhất là chuột nhất thiếu hụt miễn dịch.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tế bào khối u nguyên phát thu được ở bước (1) được cấy vào động vật trong sợi rỗng, đặc biệt là sợi rỗng được làm từ polyvinyliden florua biến đổi, đặc biệt hơn là sợi rỗng được làm từ polyvinyliden florua biến đổi và có giá trị ngưỡng là 500000 Dalton.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sợi rỗng được cấy dưới da chuột nhất.

1 / 4

**Fig.1**

2 / 4

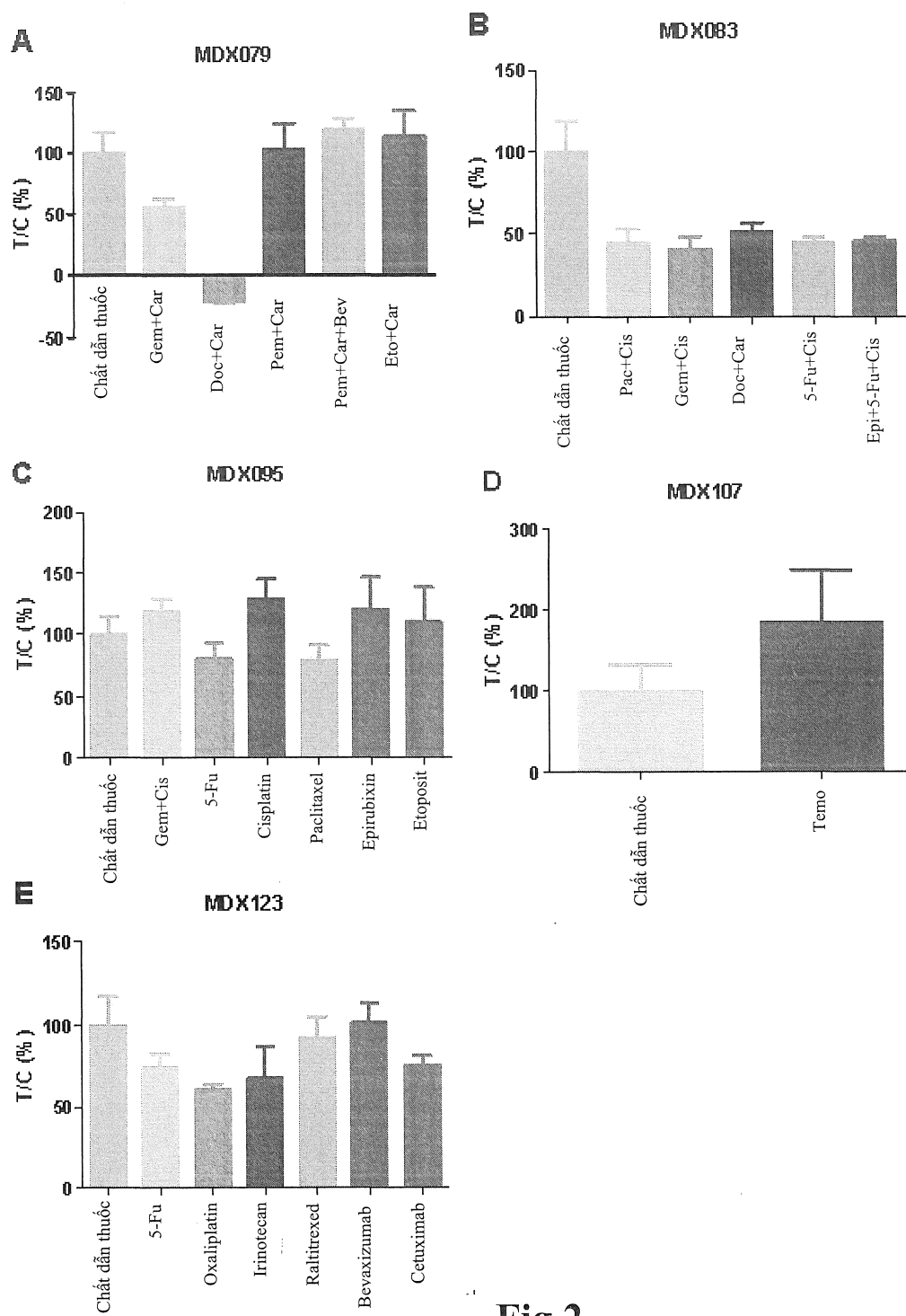


Fig.2

3 / 4

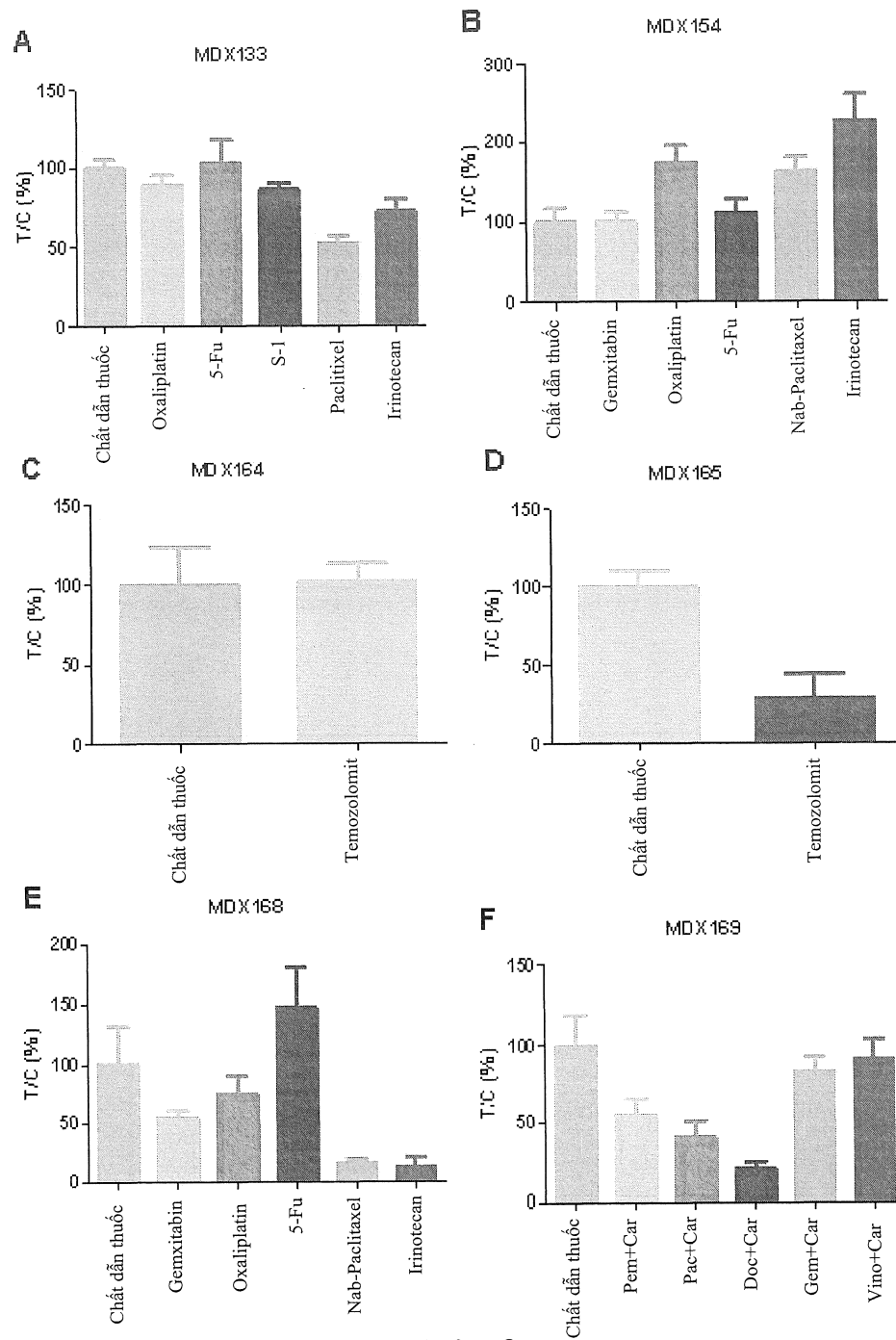


Fig.3

4 / 4

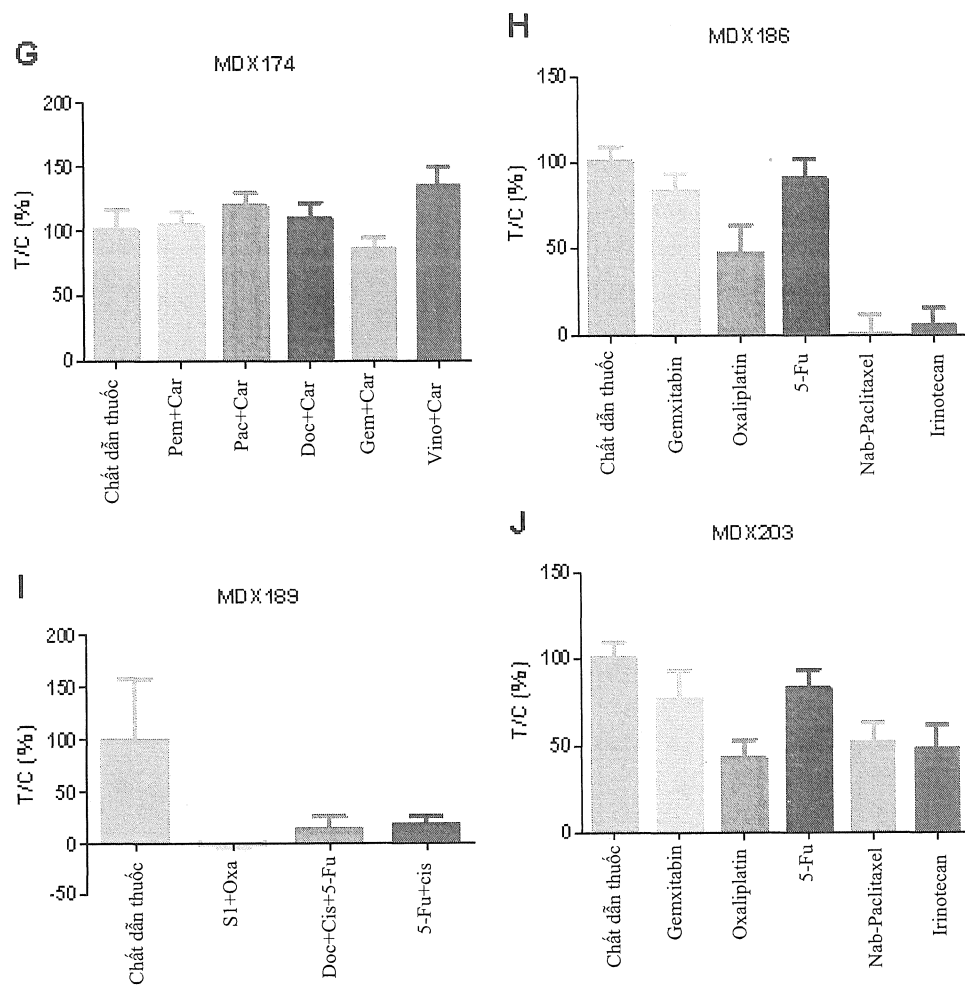


Fig.3 (tiếp)