



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0052872

(51)^{2020.01} A01N 1/02; A61K 35/51; A61P 17/02; (13) B
A61K 35/28

(21) 1-2022-02824

(22) 08/10/2020

(86) PCT/SG2020/050572 08/10/2020

(87) WO 2021/071430 15/04/2021

(30) 62/912,368 08/10/2019 US

(45) 27/10/2025 451

(43) 25/10/2022 415A

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

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

2. THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF COLORADO, A BODY
CORPORATE (US)

1800 Grant Street, 8th Floor, Denver, Colorado 80203, United States of America

(72) PHAN, Toan Thang (SG); FREED, Brian M. (US).

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

(54) DẠNG BÀO CHẾ BẢO QUẢN VÀ VẬN CHUYỂN TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ
VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ DẠNG BÀO CHẾ NÀY

(21) 1-2022-02824

(57) Sáng chế đề cập đến dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô, phương pháp điều chế dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô. Sáng chế còn đề xuất dạng liều đơn vị của các tế bào gốc trung mô.

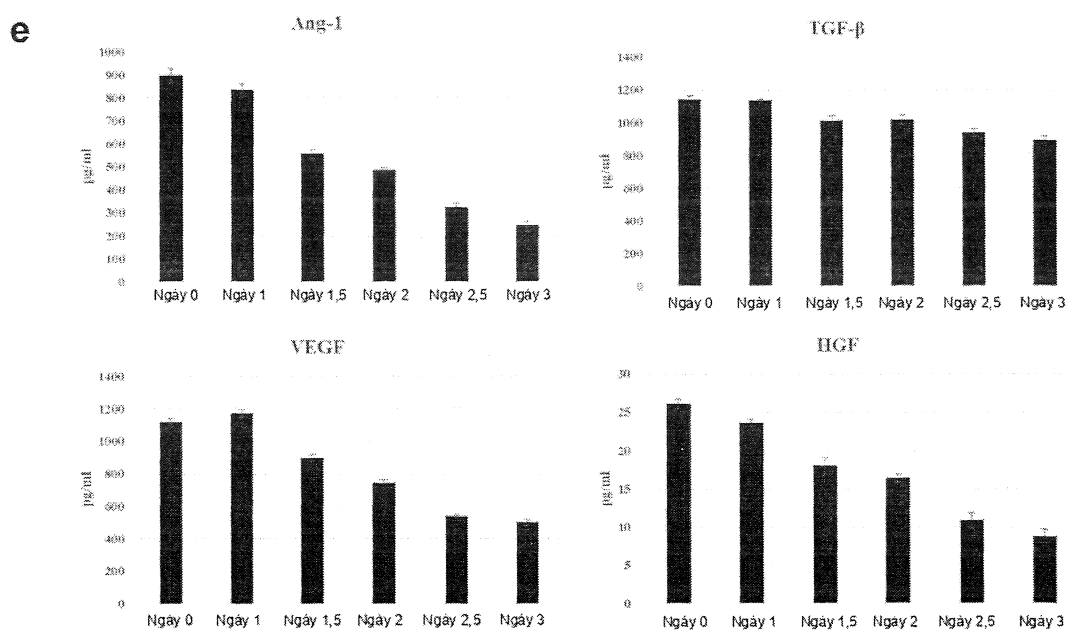


FIG. 33

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô, phương pháp điều chế dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô cũng như đề cập đến các phương pháp sử dụng dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô. Các phương pháp này bao gồm phương pháp vận chuyển tế bào gốc trung mô trong dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển này cũng như phương pháp điều trị cho đối tượng mắc bệnh, phương pháp bao gồm việc dùng khu trú tế bào gốc trung mô mà đã được bảo quản hoặc vận chuyển trong dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển này. Sáng chế còn đề xuất dạng liều đơn vị của các tế bào gốc trung mô.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các tế bào gốc trung mô được phân lập từ màng ối của dây rốn và đặc tính làm lành vết thương của chúng lần đầu được thông báo trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2006/0078993 (dẫn đến patent Mỹ số 9,085,755, 9,737,568 và 9,844,571) và đơn patent quốc tế đồng dạng số WO2006/019357. Kể từ đó, mô dây rốn đã được chú ý làm nguồn tế bào đa năng; do lợi ích rộng rãi của nó, dây rốn và cụ thể là các tế bào gốc được phân lập từ màng ối của dây rốn (còn được gọi là “các tế bào gốc màng lót dây rốn”) đã được xem là nguồn tế bào thay thế tuyệt vời cho y học tái sinh. Xem, Jeschke et al. Umbilical Cord Lining Membrane and Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: the Similarities and Differences; The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal, 2011, 4, 21-27. Đồng thời, quần thể các tế bào gốc trung mô từ màng ối của dây rốn đã được mô tả trong đơn Mỹ số 20181/27721 hoặc đơn quốc tế đồng dạng số WO 2018/067071.

Quần thể tế bào gốc trung mô được mô tả trong đơn Mỹ 2018/127721 hoặc đơn quốc tế đồng dạng WO 2018/067071 có lợi thế là 99% tế bào gốc hoặc nhiều hơn của quần thể này biểu hiện ba gen đánh dấu MSC là CD73, CD90 và CD 105 trong khi không biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR. Quần thể tế bào được xác định rõ và cực kỳ đồng nhất này là ứng viên lý tưởng cho các thử nghiệm lâm sàng và các liệu pháp dựa trên tế bào vì nó, chẳng hạn, đáp ứng đầy đủ các tiêu chuẩn được chấp nhận thông thường cho các MSC của người để sử dụng cho liệu pháp tế bào như được định nghĩa bởi tài liệu, chẳng hạn, Dominici et al, “Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement”, *Cytotherapy* (2006) Vol. 8, No. 4, 315-317, Sensebe et al., “Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review”, *Stem Cell Research & Therapy* 2013, 4:66), Vonk et al., *Stem Cell Research & Therapy* (2015) 6:94, hoặc Kundrotas *Acta Medica Lituanica*. 2012 Vol. 19. No. 2. P. 75–79. Như được mô tả trong đơn quốc tế số WO 2018/067071, quần thể tế bào gốc trung mô này có thể, chẳng hạn, được sử dụng ở trạng thái không được biệt hóa của chúng cho các mục đích làm lành vết thương như điều trị bỏng.

Tuy nhiên, các tế bào gốc như các tế bào gốc trung mô như được mô tả ở trên thường không dùng được cho người bệnh ngay tại địa điểm chúng được sản xuất. Thường là phải mất một khoảng thời gian đáng kể từ lúc thu gom tế bào đến khi sử dụng chúng sau đó. Do đó có nhu cầu tạo ra các dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển mà giữ cho các tế bào sống và khỏe mạnh trong một khoảng thời gian thường dùng để vận chuyển hoặc bảo quản tế bào.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất dạng bào chế thích hợp để bảo quản và/hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô, đáp ứng nhu cầu này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích này của sáng chế được hoàn thành bởi các phương pháp, dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô và dạng liều đơn vị có các dấu hiệu của các điểm yêu cầu bảo hộ độc lập.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô, trong đó dạng bào chế này chứa khoảng 0,5 đến khoảng 10 triệu tế bào gốc trung mô, phương pháp này bao gồm các bước:

- a) tạo huyền phù tế bào gốc trung mô trong một thể tích định trước của dung dịch tinh thể, trong đó dung dịch tinh thể chứa khoảng 0,5% hoặc khoảng 1% đến khoảng 5% (trọng lượng/thể tích) albumin huyết thanh, nhờ đó thu được dịch huyền phù tế bào thứ nhất,
- b) xác định nồng độ của tế bào gốc trung mô trong dịch huyền phù tế bào thứ nhất, và xác định thể tích của dịch huyền phù tế bào thứ nhất cần để điều chế dạng bào chế chứa khoảng 0,5 đến khoảng 10 triệu tế bào gốc trung mô,
- c) trộn thể tích xác định của dịch huyền phù tế bào thứ nhất với thể tích của chất mang lỏng, trong đó chất mang lỏng này chứa khoảng 0,5% hoặc khoảng 1% đến khoảng 5% (trọng lượng/thể tích) albumin huyết thanh cũng như

- i) Trolox;
- ii) Na^+ ;
- iii) K^+ ;
- iv) Ca^{2+} ;
- v) Mg^{2+} ;
- vi) Cl^- ;
- vii) H_2PO_4^- ;
- viii) HEPES;
- ix) Lactobionat;
- x) Sucroza;
- xi) Manitol;
- xii) Glucoza;
- xiii) Dextran-40;
- xiv) Adenosin, và
- xv) Glutathion,

nhờ đó thu được dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô chứa khoảng 0,5 đến khoảng 10 triệu tế bào gốc trung mô.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô thu được bằng phương pháp như được xác định ở đây.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô có thể thu được bằng phương pháp như được xác định ở đây.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất phương pháp vận chuyển tế bào gốc trung mô, phương pháp này bao gồm vận chuyển các tế bào gốc trung mô trong dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô như được xác định ở đây.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho đối tượng mắc bệnh, phương pháp này bao gồm dùng khu trú tế bào gốc trung mô mà đã được bảo quản hoặc vận chuyển trong dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô như được xác định ở đây.

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề xuất dạng liều đơn vị của tế bào gốc trung mô có thể thu được bằng phương pháp như được xác định ở đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

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

Fig.1 thể hiện bảng thông tin kỹ thuật của Lonza cho môi trường eagle được biến đổi bởi Dulbecco, bao gồm số catalog của DMEM được sử dụng để tạo các ví dụ minh họa về môi trường theo sáng chế (PTT-6) trong Phần thử nghiệm;

Fig.2 thể hiện bảng thông tin kỹ thuật của Lonza cho môi trường Ham's F12;

Fig.3 thể hiện bảng thông tin kỹ thuật của Lonza cho môi trường DMEM:F12 (1:1), bao gồm số catalog của môi trường DMEM:F12 (1:1) được sử dụng để tạo ví dụ minh họa về môi trường theo sáng chế (PTT-6) trong Phần thử nghiệm;

Fig.4 thể hiện bảng thông tin kỹ thuật của Life Technologies Corporation cho môi trường M171, bao gồm số catalog của môi trường M171 được sử dụng để tạo ví dụ minh họa về môi trường theo sáng chế (PTT-6) trong Phần thử nghiệm;

Fig.5 thể hiện danh mục các thành phần, bao gồm các nhà cung cấp thương mại và số catalog của chúng được sử dụng trong Phần thử nghiệm để tạo môi trường PTT-6. Trong trường hợp môi trường PTT-6 cần được sử dụng trong sản xuất GMP, nó không chứa các thuốc thử kháng sinh để phù hợp với các hướng sản xuất của FDA Mỹ đối với sinh vật học.

Fig.6 thể hiện các kết quả của các thử nghiệm trắc lưu tế bào (flow cytometry) ở đó tế bào gốc trung mô được phân lập từ dây rốn được phân tích về sự biểu hiện của các gen đánh dấu tế bào gốc trung mô là CD73, CD90 và CD105. Đối với các thử nghiệm này, tế bào gốc trung mô được phân lập từ mô dây rốn bằng cách nuôi cấy mô dây rốn trong ba môi trường nuôi cấy khác nhau, sau đó cấy chuyển các tế bào gốc trung mô trong môi trường tương ứng. Ba môi trường nuôi cấy sau được sử dụng trong các thử nghiệm này: a) 90% (thể tích/thể tích/DMEM được bổ sung 10% FBS (thể tích/thể tích), b) môi trường nuôi cấy PTT-4 mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ 2006/0078993 và đơn sáng chế quốc tế đồng dạng WO2006/019357, gồm có 90% (thể tích/thể tích) CMRL1066, và 10% (thể tích/thể tích) FBS (xem đoạn [0183] của WO2006/019357 và c) môi trường nuôi cấy theo sáng chế PTT-6, thành phần của nó được mô tả ở đây. Trong phân tích trắc lưu tế bào này, hai mẫu khác nhau của quần thể tế bào gốc trung mô của màng lót dây rốn (cord lining mesenchymal stem cell - CLMC) được phân tích đối với mỗi trong số ba môi trường nuôi cấy được sử dụng. Các kết quả được thể hiện trên các hình vẽ **Fig.6a** đến **Fig.6c**. Chi tiết hơn, **Fig.6a** thể hiện phần trăm các tế bào gốc trung mô màng lót dây rốn được phân lập biểu hiện các gen đánh dấu tế bào gốc CD73, CD90 và CD105 sau khi phân lập từ mô dây rốn và nuôi cấy trong DMEM/10% FBS, **Fig.6b** thể hiện phần trăm của các tế bào gốc trung mô màng lót dây rốn được phân lập biểu hiện các gen đánh dấu tế bào gốc CD73, CD90 và CD105 sau khi phân lập từ mô dây rốn và nuôi cấy trong PTT-4 và **Fig.6c** thể hiện phần trăm các tế bào gốc trung mô màng lót dây rốn được phân lập biểu hiện các

gen đánh dấu tế bào gốc CD73, CD90 và CD105 sau khi phân lập từ mô dây rốn và nuôi cấy trong PTT-6.

Fig.7 thể hiện các kết quả của các thử nghiệm trắc lưu tế bào (flow cytometry) ở đó tế bào gốc trung mô được phân lập từ dây rốn được phân tích về sự biểu hiện của các gen đánh dấu tế bào gốc của chúng (CD73, CD90 và CD105, CD34, CD45 và HLA-DR (kháng nguyên bạch cầu người – liên quan đến kháng nguyên D) được sử dụng để xác định sự thích hợp của tế bào gốc trung mô đa năng của người cho liệu pháp tế bào và so sánh với sự biểu hiện của các gen đánh dấu này bởi tế bào gốc trung mô tủy xương. Đối với thử nghiệm này, các tế bào gốc trung mô của màng ối của dây rốn được phân lập từ mô dây rốn bằng cách nuôi cấy mô dây rốn trong môi trường nuôi cấy theo sáng chế PTT-6 trong khi tế bào gốc trung mô tủy xương được phân lập từ tủy xương của người sử dụng giao thức chuẩn.

Fig.7a thể hiện phần trăm của các tế bào gốc trung mô màng ối dây rốn được phân lập mà biểu hiện các gen đánh dấu tế bào gốc CD73, CD90 và CD105 và không có sự biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR sau khi phân lập từ mô dây rốn và nuôi cấy trong môi trường PTT-6 trong khi **Fig.7b** thể hiện phần trăm của các tế bào gốc trung mô tủy xương được phân lập biểu hiện CD73, CD90 và CD105 và không có sự biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR.

Fig.8 thể hiện thiết lập thử nghiệm để so sánh các chất mang khác nhau. Quần thể tế bào gốc trung mô thứ nhất như được mô tả ở đây được phát triển ra trong các bình thót cổ nuôi cấy tế bào. Lượng tế bào gốc trung mô sống được đếm và sau đó 2 triệu tế bào/lọ được bảo quản trong các khoảng thời gian khác nhau trong PlasmaLyte-A hoặc HypoThermosol™-FRS. Sau khi bảo quản, các tế bào được đếm trong mẫu $\leq 50\mu\text{l}$ hàng ngày trong ngày 1-5 (rút tổng thể tích chất lỏng $250\mu\text{l}$) và được kiểm tra về khả năng sống bằng cách nhuộm các tế bào bằng xanh Trypan. Hơn nữa, vào ngày 1, 3 và 5, lấy mẫu $\leq 80\mu\text{l}$ và phân tích. Sau ngày 1, 3 và 5 bảo quản, 100.000 MSC từ mỗi thời điểm sau đó được nuôi cấy trong môi trường PTT-6 trong 48 giờ và thu các phần nổi cho các thử nghiệm xytokin: PDGF-AA, PDGF-BB, VEGF, IL-10, Ang-1, HGF và TGF β 1 được đo bằng hệ thống FLEXMAP 3D.

Fig.9 tóm tắt dữ liệu về khả năng sống. Như có thể thấy từ biểu đồ bên tay trái, 73% tổng số lượng tế bào (khoảng 95%) khi bắt đầu bảo quản là vẫn còn sống vào 7 ngày sau khi bảo quản trong HypoThermosol™. Trái lại, sau 7 ngày bảo quản trong PlasmaLyte-A chỉ 42% tổng số lượng tế bào (khoảng 94%) khi bắt đầu bảo quản là vẫn còn sống. Tất cả số đếm được dựa trên các số đọc được thực hiện hai lần mà nằm trong 10% của nhau (theo SOP CR D2.600.1). Trong quá trình đếm, các tế bào được bảo quản trong HypoThermosol™ nhỏ hơn một cách đáng chú ý với các cạnh nhẵn và được định rõ. Trái lại, các tế bào trong Plasmalyte-A cho thấy có khoảng kích thước khác nhau. HypoThermosol™ hỗ trợ một cách đáng chú ý sự tích hợp màng và sự sống sót có thể đoán chừng trong thời gian 6 ngày. Các kết quả tương tự cũng được thể hiện trên biểu đồ bên phía tay phải.

Fig.10 thể hiện các kết quả thu được khi đo đường kính tế bào của các tế bào. Quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây khi được giữ trong HypoThermosol™ có khoảng đường kính hẹp hơn khi so với tế bào được giữ trong PlasmaLyteA. Việc so sánh được thực hiện sau 3 ngày bảo quản.

Fig.11 thể hiện nồng độ TGFβ1 trong phần nổi từ quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây được bảo quản trong HypoThermosol™ hoặc PlasmaLyte-A sau 48 giờ bảo quản. Như có thể thấy từ biểu đồ bên phía tay phải, tế bào tiết nhiều TGFβ1 khi được bảo quản trong HypoThermosol™ như khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A. Nhìn chung, theo thời gian, lượng TGFβ1 tiết ra giảm (biểu đồ bên phía tay phải).

Các Fig. 12 và 13 thể hiện các thử nghiệm đối chứng. Ở đây, các nồng độ PDGF-BB và IL-10 được đo trong phần nổi từ quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây được bảo quản trong HypoThermosol™ hoặc PlasmaLyte-A trong 48 giờ. Vì PDGF-BB hoặc IL-10 không được tiết ra một cách bình thường bởi quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây, không phát hiện có PDGF-BB hoặc IL-10 trong mẫu bất kỳ.

Fig.14 thể hiện nồng độ VEGF trong phần nổi từ các quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây được bảo quản trong HypoThermosol™ hoặc PlasmaLyte-A trong 48 giờ. Như có thể thấy từ biểu đồ bên phía tay phải, tế bào tiết nhiều VEGF khi được bảo quản trong HypoThermosol™ hoặc PlasmaLyte-A

vào ngày 0. Vào ngày 1 và 5 tế bào tiết nhiều VEGF khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A. Lưu ý, khi được bảo quản trong 3 ngày, tế bào tiết nhiều VEGF khi được bảo quản trong HypoThermosol™ hơn khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A. Do đó, HypoThermosol™ làm tốt hơn PlasmaLyte-A qua ngày 3 bảo quản. VEGF phát hiện được càng nhiều, chủng cấy càng khỏe mạnh. Do đó, nhờ tiết nhiều VEGF hơn sau 3 ngày bảo quản trong HypoThermosol™ so với khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A, tế bào khỏe mạnh hơn trong HypoThermosol™ so với trong PlasmaLyte-A. Từ 5 ngày, việc bảo quản trong PlasmaLyte có vẻ tốt hơn, vì ở thời điểm này tế bào được bảo quản trong PlasmaLyte-A tiết nhiều VEGF hơn. Nhìn chung, theo thời gian lượng VEGF được tiết giảm (biểu đồ bên tay phải).

Fig.15 thể hiện nồng độ PDGF-AA trong phần nổi từ quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây được bảo quản trong HypoThermosol™ hoặc PlasmaLyte-A trong 48 giờ. Như có thể thấy từ biểu đồ bên phía tay phải, tế bào tiết nhiều PDGF-AA khi được bảo quản trong HypoThermosol™ như khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A vào ngày 0. Vào ngày 1 và 5, tế bào tiết nhiều PDGF-AA khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A. Lưu ý, khi được bảo quản trong 3 ngày, tế bào tiết nhiều PDGF-AA hơn khi được bảo quản trong HypoThermosol™ so với khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A. Do đó, tế bào được bảo quản trong HypoThermosol™ khỏe mạnh hơn tế bào được bảo quản trong PlasmaLyte-A sau 3 ngày bảo quản. Từ 5 ngày bảo quản trở đi, PlasmaLyte có vẻ trở thành chất mang tốt hơn, vì ở thời điểm này tế bào được bảo quản trong PlasmaLyte-A tiết nhiều PDGF-AA hơn. Nhìn chung, theo thời gian lượng PDGF-AA được tiết giảm (biểu đồ bên tay phải).

Fig.16 thể hiện nồng độ Ang-1 trong phần nổi từ quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây được bảo quản trong HypoThermosol™ hoặc PlasmaLyte-A trong 48 giờ. Như có thể thấy từ biểu đồ bên phía tay phải, tế bào tiết nhiều Ang-1 khi được bảo quản trong HypoThermosol™ hoặc PlasmaLyte-A vào ngày 0 và 3. Vào ngày 5, tế bào tiết nhiều Ang-1 khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A. Lưu ý là khi được bảo quản trong 1 ngày, tế bào tiết nhiều Ang-1 khi được bảo quản trong HypoThermosol™ hơn khi được bảo quản trong

PlasmaLyte-A. Do đó, tế bào được bảo quản trong HypoThermosol™ có vẻ khỏe mạnh hơn khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A trong ít nhất 48 giờ cho đến ngày 3 bảo quản. Từ ngày 5, PlasmaLyte có vẻ trở thành chất mang tốt hơn, vì ở thời điểm này tế bào được bảo quản trong PlasmaLyte-A tiết nhiều Ang-1 hơn. Nhìn chung, theo thời gian lượng Ang-1 được tiết giảm (biểu đồ bên tay phải).

Fig.17 thể hiện nồng độ HGF trong phần nổi từ quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây được bảo quản trong HypoThermosol™ hoặc PlasmaLyte-A sau 48 giờ bảo quản. Như có thể thấy từ biểu đồ bên phía tay phải, tế bào tiết nhiều HGF hơn khi được bảo quản trong HypoThermosol™ so với khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A vào ngày 0. Vào ngày 3 và 5, tế bào tiết nhiều HGF khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A. Lưu ý khi được bảo quản trong 1 ngày, tế bào tiết nhiều HGF khi được bảo quản trong HypoThermosol™ hơn khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A. Do đó, tế bào được bảo quản trong HypoThermosol™ có vẻ khỏe mạnh hơn tế bào được bảo quản trong PlasmaLyte-A giữa ít nhất 1 ngày (48 giờ) đến 3 ngày bảo quản. Từ 3 ngày trở đi, PlasmaLyte-A có vẻ trở thành chất mang tốt hơn, vì ở các thời điểm 3 và 5 ngày, tế bào được bảo quản trong PlasmaLyte-A tiết nhiều HGF hơn. Nhìn chung, theo thời gian lượng HGF được tiết giảm (biểu đồ bên tay phải).

Fig.18 là các ảnh chụp thu được từ nghiên cứu tiền lâm sàng với quần thể tế bào gốc trung mô theo sáng chế ở lợn. Các con lợn được làm cho mắc bệnh đái tháo đường bằng 120 mg/kg streptozotocin và để phục hồi trong 45 ngày trước khi tạo sáu vết thương có độ dày đủ 5 cm x 5 cm trên lưng chúng. Các con lợn ($n = 2$) được điều trị hai lần một tuần bằng 10^5 quần thể tế bào gốc trung mô của người như được mô tả ở đây trên mỗi cm^2 trong 4 tuần. Hai con lợn đối chứng được điều trị bằng PBS. Các vết thương được chụp ảnh vào ngày hậu phẫu 0 (ngày PO 0) và bảy ngày một lần cho đến ngày hậu phẫu 35. Các vết thương được phân tích kích thước diện tích bề mặt bằng ImageJ. Vào Ngày 35, việc thêm quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây dẫn đến việc đóng miệng 10 trong số 12 vết thương do bệnh đái tháo đường (83%), so với chỉ 3 trong số 12 (25%) của các vết thương đối chứng được điều trị bằng PBS. Tốc độ lành vết thương là $0,8 \text{ cm}^2/\text{ngày}$

với quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây so với 0,6 cm²/ngày ở các con vật đối chứng, mức cải thiện 33%.

Fig.19 là bảng dữ liệu về Trolox có sẵn từ Tocris.

Fig.20 thể hiện bảng dữ liệu về NaCl có sẵn từ Sigma Aldrich.

Fig.21 thể hiện bảng dữ liệu của KH₂PO₄ có sẵn từ Sigma Aldrich.

Fig.22 thể hiện bảng dữ liệu về HEPES từ Sigma Aldrich.

Fig.23 thể hiện bảng thông tin sản phẩm cho natri lactobionat từ COMBI-BLOCKS.

Fig.24 thể hiện bảng thông tin sản phẩm cho sucroza từ Sigma Aldrich.

Fig.25 thể hiện bảng thông tin sản phẩm cho manitol từ avantor.

Fig.26 thể hiện bảng thông tin sản phẩm cho glucoza từ Sigma Aldrich.

Fig.27 thể hiện bảng thông tin sản phẩm cho Dextran-40 từ Sigma Aldrich.

Fig.28 thể hiện bảng thông tin sản phẩm cho adenosin từ Sigma Aldrich.

Fig.29 thể hiện bảng thông tin sản phẩm cho glutathion từ Sigma Aldrich.

Fig.30 thể hiện bảng thông tin sản phẩm cho HypoThermosol™-FRS (HTS-FRS) từ STEMCELL Technologies.

Fig.31 thể hiện bảng thông tin sản phẩm cho CaCl từ Sigma Aldrich.

Fig.32 thể hiện bảng thông tin sản phẩm cho MgCl từ Sigma Aldrich.

Fig.33 thể hiện các kết quả của thử nghiệm tính ổn định được thực hiện trên quần thể tế bào gốc trung mô màng lót dây rốn như được mô tả ở đây được cấy trong dạng bào chế theo sáng chế (Plasmalyte/HSA/HypoThermosol) trong lên đến 3 ngày. **Fig. 33a** thể hiện các kết quả của thử nghiệm khả năng sống của MSC sau khi được bảo quản ở dạng bào chế theo sáng chế. Các MSC được bảo quản ở 2 đến 8°C trong 1 đến 3 ngày để mô phỏng quá trình vận chuyển và bảo quản sản phẩm trước khi sử dụng lên các vết thương. Các kết quả thể hiện rằng các tế bào không thể hiện sự mất khả năng sống đáng kể lên đến 3 ngày trong các điều kiện này. **Fig. 33b** thể hiện hình thái học MSC sau khi được bảo quản ở dạng bào chế theo sáng chế ở 2-8°C. Các MSC được chụp ảnh sau khi lấy ra từ các lọ kín từ Aseptic Technologies (AT-Closed Vial) và được nuôi cấy trong 24 giờ ở 37°C. Như có thể thấy, các tế bào được thu nhận lên đến 2 ngày trong bảo quản lạnh có khả năng bám dính vào đĩa nuôi cấy mô và tạo cấu trúc thai điển hình. Sau khi bảo quản

trong 2,5 ngày ở 2-8°C, các tế bào có hình dáng giống hình cầu ngày càng tăng, gợi ý về các tế bào sắp chết. **Fig. 33c** thể hiện sự tăng sinh và chuyển hóa của MSC sau khi được bảo quản ở dạng bào chế theo sáng chế. Các MSC từ cùng mẹ nuôi cấy được phân tích trên **Fig.33a** được thử nghiệm về sự sản xuất lactat là phép đo cho quá trình chuyển hóa và tăng trưởng, trong khoảng thời gian 48 giờ nuôi cấy ở 37°C. Lactat là sản phẩm của quá trình chuyển hóa glucoza, mà tác giả sáng chế công nhận là tương quan trực tiếp với tốc độ tăng trưởng của tế bào MSC. Các tế bào được bảo quản trong 24 giờ ở 2-8°C là tương đương về chuyển hóa và tăng trưởng với các tế bào được bảo quản trong 0 giờ, và tế bào được bảo quản trong 36 giờ thể hiện đạt 86% mức sản xuất lactat đối chứng. Sau 72 giờ ở 2-8°C, các tế bào thể hiện sự chuyển hóa chỉ 46% khi được nuôi cấy sau đó. **Fig. 33d** thể hiện mức sản xuất lactat bởi các MSC được bảo quản trong 0, 1, 1,5, 2, 2,5 hoặc 3 ngày ở dạng bào chế theo sáng chế, và sau đó được đo sau 24 giờ và 48 giờ nuôi cấy. Có thể thấy rằng mức sản xuất lactat ở 24 giờ và 48 giờ bởi các MSC được bảo quản ở dạng bào chế theo sáng chế trong 24 giờ (Ngày 1) là bằng với các MSC chưa được bảo quản (Ngày 0). Vào Ngày 3, mức sản xuất lactat giảm xuống 40-45%. **Fig. 33e** thể hiện mức sản xuất xytokin đo được từ cùng mẹ nuôi cấy được phân tích trên **Fig. 33c** vào 24 giờ ở 37°C. Khi căn chỉnh với dữ liệu chuyển hóa, khả năng của các MSC sản xuất Angiopoietin 1 (Ang-1), Yếu tố tăng trưởng biến đổi dạng beta (Transforming Growth Factor beta - TGF- β), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF) và yếu tố tăng trưởng tế bào gan (Hepatocyte Growth Factor - HGF) là trong vòng 10-20% của các đối chứng (Ngày 0) khi các tế bào được bảo quản trong dạng bào chế theo sáng chế ở 2-8°C trong 24 giờ. **Fig. 33f** thể hiện mức sản xuất xytokin đo được từ một mẹ cấy khác sau 24h. Các kết quả thể hiện rằng khả năng của MSC sản xuất VEGF, Angiopoietin-1, TGF- β và HGF được duy trì khi các tế bào được bảo quản trong dạng bào chế theo sáng chế ở 2 đến 8°C trong 24 giờ, nhưng bị giảm ở mức xấp xỉ 50% khi được bảo quản trong >2 ngày.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được giải thích ở trên, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô, trong đó dạng bào chế này chứa khoảng 0,5 đến khoảng 10 triệu tế bào gốc trung mô, phương pháp này bao gồm:

- a) tạo huyền phù tế bào gốc trung mô trong thể tích định trước của dung dịch tinh thể, trong đó dung dịch tinh thể chứa khoảng 0,5 đến khoảng 5% (trọng lượng/thể tích) albumin huyết thanh, nhờ đó thu được dịch huyền phù tế bào thứ nhất,
- b) xác định nồng độ của các tế bào gốc trung mô trong dịch huyền phù tế bào thứ nhất, và xác định thể tích của dịch huyền phù tế bào thứ nhất cần để điều chế dạng bào chế chứa khoảng 0,5 đến khoảng 10 triệu tế bào gốc trung mô,
- c) trộn thể tích xác định của dịch huyền phù tế bào thứ nhất với thể tích của chất mang lỏng, trong đó chất mang lỏng này chứa khoảng 0,5 đến khoảng 5% (trọng lượng/thể tích) albumin huyết thanh cũng như

- i) Trolox;
- ii) Na^+ ;
- iii) K^+ ;
- iv) Ca^{2+} ;
- v) Mg^{2+} ;
- vi) Cl^- ;
- vii) H_2PO_4^- ;
- viii) HEPES;
- ix) Lactobionat;
- x) Sucroza;
- xi) Manitol;
- xii) Glucoza;
- xiii) Dextran-40;
- xiv) Adenosin, và
- xv) Glutathion.

nhờ đó thu được dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô chứa khoảng 0,5 đến khoảng 10 triệu tế bào gốc trung mô.

Ngạc nhiên khi phát hiện rằng theo sáng chế sử dụng dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây làm ổn định quá trình tăng sinh và chuyển hóa của MSC trong quá trình bảo quản/vận chuyển dẫn đến tăng khả năng sống của MSC trong thời gian lên đến 72 giờ. Chẳng hạn, sau 3 ngày bảo quản tế bào gốc trung mô ở dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô theo sáng chế, khoảng 90% các tế bào vẫn sống (được xác nhận ở **Fig. 33a**). Trái lại, sau 3 ngày bảo quản trong PlasmaLyte® chỉ khoảng 66% các tế bào vẫn sống (Xem phần Ví dụ thực hiện sáng chế, khi được đo bằng huyết cầu kế và **Fig. 9**). Do đó, việc sử dụng dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây cho phép việc vận chuyển/bảo quản các tế bào gốc trong một khoảng thời gian mà không làm giảm đáng kể khả năng sống của các tế bào. Cụ thể, việc bảo quản ở dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô theo sáng chế trong khoảng thời gian ngắn hơn là 3 ngày hoặc ít hơn có vẻ đặc biệt có lợi, vì các tế bào gốc nhìn chung là tiết ra nhiều chất hơn so với sau khi bảo quản trong PlasmaLyte-A như được mô tả chi tiết trong Phần thử nghiệm. Hơn nữa, ngạc nhiên khi phát hiện rằng việc sử dụng dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây cho phép phục hồi nhiều hơn 95% các MSC từ bình bảo quản/vận chuyển, nhờ đó bảo đảm rằng có thể dùng liệu tế bào mong muốn cho người bệnh.

Khi được sử dụng ở đây thuật ngữ ‘vận chuyển’ hoặc ‘việc vận chuyển’ nghĩa là việc vận chuyển bất kỳ. Việc vận chuyển này có thể được thực hiện bằng phương tiện giao thông bất kỳ, như ô tô, tàu và máy bay hoặc bởi người mang/vận chuyển vật chứa mà chứa các tế bào gốc được tiếp xúc với chất mang lỏng từ nơi này đến nơi khác. Theo một phương án, việc vận chuyển được tiến hành từ nơi sản xuất các tế bào gốc trung mô (hoặc quần thể tế bào gốc trung mô vì cả hai thuật ngữ được sử dụng ở đây thay thế được cho nhau) quan tâm đến nơi sử dụng tế bào gốc (chẳng hạn, cơ sở GMP ở đó các tế bào gốc, tương ứng là quần thể tế bào gốc quan tâm được sản xuất đến địa điểm sử dụng các tế bào gốc hoặc quần thể tế bào gốc, chẳng hạn, bệnh viện hoặc phòng mạch). Tuy nhiên, cũng dự tính rằng thuật ngữ ‘vận chuyển’ đề cập đến việc bảo quản các tế bào tại chỗ trong một khoảng thời gian. Chẳng hạn, các tế bào gốc có thể được bảo quản sau khi thu gom cho

đến khi dùng chúng cho đối tượng tại một địa điểm. Vật chứa ở đó các tế bào gốc có thể được bảo quản hoặc vận chuyển có thể là vật chứa bất kỳ thích hợp cho phương pháp theo sáng chế.

Việc điều chế dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô bao gồm việc tạo huyền phù lại các MSC trong thể tích định trước của dung dịch tinh thể. Theo sáng chế, thể tích bất kỳ của dung dịch tinh thể thích hợp đủ để tạo huyền phù lại các MSC có thể được sử dụng làm thể tích định-h trước. Chẳng hạn, thể tích định-h trước có thể nằm trong khoảng 0,5 ml đến khoảng 15 ml. Theo một ví dụ, thể tích định-h trước có thể nằm trong khoảng 1 ml đến khoảng 10 ml. Theo ví dụ minh họa, thể tích định trước của dung dịch tinh thể có thể là khoảng 1 ml, khoảng 2 ml, khoảng 3 ml, khoảng 4 ml hoặc khoảng 5 ml. Bằng cách tạo huyền phù lại các MSC trong thể tích định trước của dung dịch tinh thể, dịch huyền phù tế bào thứ nhất được tạo ra. Việc tạo huyền phù lại thường được tiến hành sau khi các tế bào gốc trung mô/quần thể tế bào gốc trung mô được thu gom sau khi được nuôi cấy để được sử dụng cho mục đích y được.

Sau khi xác định nồng độ của các MSC trong dịch huyền phù tế bào thứ nhất và xác định thể tích của dịch huyền phù tế bào thứ nhất cần để điều chế dạng bào chế chứa khoảng 0,5 đến khoảng 10 triệu tế bào gốc trung mô, dịch huyền phù tế bào thứ nhất được trộn với thể tích của chất mang lỏng. Thể tích của dịch huyền phù tế bào thứ nhất được trộn với chất mang lỏng có thể là khoảng 0,5 ml đến khoảng 10 ml. Theo ví dụ minh họa, thể tích xác định của dịch huyền phù tế bào thứ nhất với thể tích của chất mang lỏng, tổng thể tích của dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô là khoảng 1 ml. Lượng 0,5 đến khoảng 10 triệu tế bào gốc trung mô được chọn để điều chế dạng liều đơn vị mà chứa 0,5 đến khoảng 10 triệu tế bào gốc trung mô tốt hơn là ở thể tích định trước như 1 ml, 2 ml, v.v.. Theo sáng chế, thể tích định trước của dung dịch tinh thể chứa khoảng 0,1 đến khoảng 15 triệu MSC sống. Theo một ví dụ, thể tích định trước của dung dịch tinh thể chứa khoảng 0,5 đến khoảng 10 triệu MSC. Theo ví dụ minh họa, dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô chứa khoảng 1 triệu MSC, khoảng 2 triệu MSC, khoảng 3 triệu MSC, khoảng 4 triệu MSC, khoảng 5 triệu MSC hoặc khoảng 6 triệu MSC. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “khoảng” liên

quan đến số lượng của tế bào gốc trung mô có thể nghĩa là giá trị số có thể thay đổi ở phần trăm cụ thể. Chẳng hạn, “khoảng” có thể nghĩa là độ biến thiên/độ lệch số là $\pm 1\%$ đến khoảng $\pm 15\%$. Do đó, “khoảng” cũng có thể nghĩa là $\pm 1\%$, $\pm 2\%$, $\pm 3\%$, $\pm 4\%$, $\pm 5\%$, $\pm 6\%$, $\pm 7\%$, $\pm 8\%$, $\pm 9\%$ hoặc $\pm 10\%$. Hiển nhiên với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này rằng thường có các biến thiên như vậy, cụ thể là nếu dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô được điều chế thủ công (mà vẫn là phương pháp thông dụng để điều chế các dạng bào chế có thành phần là tế bào sống) để bảo quản và/hoặc vận chuyển sau đó của dạng bào chế đến địa điểm sử dụng như bệnh viện hoặc phòng khám chữa vết thương.

Theo sáng chế, các MSC có thể được thu gom trực tiếp từ mô nuôi cấy mô chứa các MSC hoặc từ mô nuôi cấy của MSC hoặc quần thể MSC được phân lập trước khi được huyền phù lại trong dung dịch tinh thể. Theo một cách khác, việc nuôi cấy các MSC có thể được tiến hành trong bình nuôi cấy tế bào. Do đó, các MSC được sử dụng theo sáng chế có thể được thu gom từ bình nuôi cấy tế bào trước khi tạo huyền phù lại các MSC trong thể tích định trước của dung dịch tinh thể.

Cả dung dịch tinh thể và chất mang lỏng theo sáng chế đều được bổ sung albumin huyết thanh. Dù không muốn bị giới hạn bởi lý thuộc nào, tin rằng albumin huyết thanh cải thiện khả năng sống của các tế bào gốc trung mô/quần thể tế bào gốc trung mô và có thể còn cải thiện việc thu hồi các tế bào gốc từ bình ở đó chúng được bảo quản để vận chuyển các tế bào gốc đến địa điểm sử dụng. Nồng độ của albumin huyết thanh có thể giống hoặc khác nhau trong dung dịch tinh thể và chất mang lỏng. Tốt hơn là, nồng độ của albumin huyết thanh là giống nhau ở cả dung dịch tinh thể và chất mang lỏng. Trong ngữ cảnh này, nồng độ bất kỳ của albumin huyết thanh thích hợp để, chẳng hạn, cải thiện khả năng sống của MSC có thể được sử dụng. Chẳng hạn, mỗi dung dịch tinh thể và chất mang lỏng có thể chứa khoảng 0,5% (trọng lượng/thể tích), khoảng 0,6% (trọng lượng/thể tích), khoảng 0,7% (trọng lượng/thể tích), khoảng 0,8 (trọng lượng/thể tích), khoảng 0,9% (trọng lượng/thể tích), hoặc khoảng 1,0% (trọng lượng/thể tích) đến khoảng 5% (trọng lượng/thể tích) albumin huyết thanh. Theo một ví dụ, dung dịch tinh thể và chất mang lỏng có thể chứa khoảng 1% (trọng lượng/thể tích) đến khoảng

3% (trọng lượng/thể tích) albumin huyết thanh. Theo ví dụ minh họa, mỗi dung dịch tinh thể và chất mang lỏng chứa khoảng 1% (trọng lượng/thể tích) albumin huyết thanh. Albumin huyết thanh được dùng bất kỳ, chẳng hạn, albumin huyết thanh bò hoặc người có thể được sử dụng ở đây. Theo ví dụ minh họa, dung dịch tinh thể và chất mang lỏng có thể đều chứa albumin huyết thanh người (human serum albumin - HSA). Albumin huyết thanh được sử dụng ở đây lý tưởng là được thu được ở chất lượng được dụng. Ví dụ về albumin huyết thanh loại được dụng này là dung dịch 25% (trọng lượng/thể tích) của albumin huyết thanh người có bán trên thị trường dưới tên thương mại Plasbumin® từ Grifols Therapeutics LLC, Clayton, North Carolina, Mỹ.

Dung dịch tinh thể cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều thành phần thích hợp để hỗ trợ sự tăng trưởng và/hoặc tăng sinh của các MSC. Thành phần này có thể là chất khoáng như natri, kali, sắt, magie, kẽm, selen, clorua hoặc tổ hợp của chúng. Theo một ví dụ, dung dịch tinh thể chứa natri, kali, magie và clorua. Dung dịch tinh thể có thể là dung dịch có bán trên thị trường bao gồm thành phần khác thích hợp để hỗ trợ sự tăng trưởng và/hoặc tăng sinh của các MSC. Theo một ví dụ, dung dịch tinh thể có thể là PlasmaLyte hoặc lactat Ringer. Trong dạng bào chế theo sáng chế, tổng lượng dung dịch tinh thể có thể được giới hạn ở phần trăm cụ thể. Chẳng hạn, dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô có thể chứa không nhiều hơn khoảng 50%, không nhiều hơn khoảng 40%, không nhiều hơn khoảng 30%, không nhiều hơn khoảng 20%, không nhiều hơn khoảng 10% hoặc không nhiều hơn khoảng 5% dung dịch tinh thể. Theo ví dụ minh họa, dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô có thể chứa không nhiều hơn khoảng 30% hoặc khoảng 20% hoặc khoảng 10% PlasmaLyte.

Việc vận chuyển/bảo quản có thể được thực hiện trong khoảng thời gian bất kỳ. Chẳng hạn, việc vận chuyển/bảo quản có thể được thực hiện trong khoảng 7 ngày hoặc ít hơn. Cũng có thể hình dung rằng việc vận chuyển/bảo quản có thể được thực hiện trong khoảng 6, 5, 4, 3, 2, 1, ngày hoặc ít hơn. Do đó, có thể là việc vận chuyển/bảo quản được thực hiện trong khoảng 48 giờ hoặc khoảng 24 giờ hoặc ít hơn.

Cũng dự tính rằng việc vận chuyển/bảo quản được thực hiện ở nhiệt độ bất kỳ thích hợp cho phương pháp theo sáng chế. Chẳng hạn, việc vận chuyển/bảo quản có thể được thực hiện ở nhiệt độ khoảng -5°C đến khoảng 15°C . Do đó, cũng dự tính rằng, việc vận chuyển/bảo quản có thể được thực hiện ở nhiệt độ khoảng 2°C đến khoảng 8°C . Vận chuyển cũng có thể được tiến hành ở nhiệt độ cao hơn khoảng -5°C , cao hơn khoảng -10°C , cao hơn khoảng -15°C , hoặc nhiều hơn khoảng -20°C . Hơn nữa dự tính rằng vận chuyển/bảo quản có thể được thực hiện ở nhiệt độ dưới 20°C , dưới 18°C , dưới 15°C , dưới 12°C hoặc dưới 10°C .

Phương pháp theo sáng chế cũng dự tính rằng quần thể tế bào gốc (hoặc các tế bào gốc trung mô) được bảo quản hoặc vận chuyển ở nồng độ thích hợp bất kỳ. Như lưu ý ở trên, các thuật ngữ “tế bào gốc trung mô” và “quần thể tế bào gốc trung mô” có thể được sử dụng thay thế cho nhau. Cũng có thể là, nếu bản mô tả nói đến “các tế bào gốc trung mô” nghĩa là các tế bào gốc này thuộc cùng quần thể tế bào gốc trung mô. Chẳng hạn, tất cả các tế bào gốc trung mô có thể đều thuộc quần thể tế bào gốc trung mô mà khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn, hoặc khoảng 99% hoặc nhiều hơn của các tế bào của quần thể này biểu hiện CD73, CD90 và CD105 trong khi không biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR. Lưu ý rằng nếu thuật ngữ “chất mang” hoặc “chất mang lỏng” có thể được sử dụng trong ngữ cảnh dung dịch chứa các MSC, PlasmaLyte, HSA và Hyothermosol, nó cũng có thể có nghĩa là dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô theo sáng chế. Do đó, các thuật ngữ “chất mang” hoặc “chất mang lỏng” và “dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc” cũng có thể được sử dụng thay thế cho nhau nếu dung dịch này chứa các MSC, PlasmaLyte, HSA và Hyothermosol. Quần thể tế bào gốc như được sử dụng ở đây có thể, chẳng hạn, được vận chuyển/bảo quản ở nồng độ khoảng 70 triệu tế bào trên 1 ml chất mang, khoảng 60 triệu tế bào trên 1 ml chất mang, khoảng 50 triệu tế bào trên 1 ml chất mang, khoảng 40 triệu tế bào trên 1 ml chất mang, khoảng 30 triệu tế bào trên 1 ml chất mang, khoảng 20 triệu tế bào trên 1 ml chất mang, khoảng 10 triệu tế bào trên 1 ml chất mang, khoảng 5 triệu tế bào trên 1 ml chất mang, khoảng 4 triệu tế bào trên 1 ml chất mang, khoảng 3 triệu tế bào trên 1 ml chất mang, khoảng 2 triệu tế bào trên 1 ml chất mang, khoảng 1 triệu tế bào trên 1 ml chất

mang, khoảng 0,5 triệu tế bào trên 1 ml chất mang, khoảng 0,1 triệu tế bào trên 1 ml chất mang hoặc ít hơn 0,1 triệu tế bào trên 1 ml chất mang. Vì vậy, quần thể tế bào gốc có thể được vận chuyển/bảo quản ở nồng độ khoảng 10 triệu tế bào trên ml chất mang đến khoảng 1 triệu tế bào trên 1 ml chất mang.

Phương pháp theo sáng chế liên quan đến việc vận chuyển/bảo quản của các tế bào gốc. Về nguyên tắc, tế bào gốc bất kỳ có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế. Một đặc điểm đặc trưng của các tế bào gốc là khả năng tự làm mới của chúng. 'Tự làm mới' là khả năng tế bào trải qua nhiều chu kỳ phân chia tế bào trong khi vẫn duy trì được trạng thái không biệt hóa. Các phương pháp kiểm tra xem tế bào có khả năng tự làm mới hay không đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Chẳng hạn, tự làm mới có thể được kiểm tra bằng cách cho các tế bào trải qua nhiều hơn 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 lần cấy chuyển hoặc nhiều hơn. Việc cấy chuyển bao gồm việc chia tách các tế bào trước khi cấy trải lại chúng dưới dạng thể vẫn một tế bào. Một đặc trưng khác của các tế bào gốc là tính đa năng hoặc vạn năng của chúng như sẽ được mô tả đầu đó trong bản mô tả này. Về nguyên tắc, tính đa năng hoặc vạn năng có thể được kiểm định bằng cách biệt hóa các tế bào gốc thành nhiều dòng khác nhau.

Cụ thể, quần thể tế bào gốc được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế có thể là quần thể tế bào gốc phôi thai, quần thể tế bào gốc người lớn, quần thể tế bào gốc trung mô hoặc quần thể tế bào gốc vạn năng được cảm ứng.

Như được sử dụng ở đây "quần thể tế bào gốc phôi thai" là "quần thể tế bào gốc vạn năng". Tế bào vạn năng khi được nói đến trong bản mô tả này đề cập đến loại tế bào có khả năng tự làm mới, và tiềm năng biệt hóa thành các loại tế bào khác nhau. Các tế bào gốc vạn năng có thể biệt hóa gần như thành tất cả các loại tế bào, tức là các tế bào có nguồn gốc từ bất kỳ trong số ba lớp mầm chính: ngoại bì, nội bì, và trung bì. Thuật ngữ tế bào gốc vạn năng còn bao gồm các tế bào gốc có nguồn gốc từ khối tế bào bên trong của phôi giai đoạn sớm được gọi là túi phôi. Lưu ý, các tiến bộ gần đây ở nghiên cứu tế bào gốc phôi thai đã dẫn đến khả năng tạo ra các dòng tế bào gốc phôi mới mà không cần phá hủy phôi, chẳng hạn bằng cách sử dụng kỹ thuật dựa trên sinh thiết phôi bào, mà không ảnh hưởng đến khả

năng phát triển của phôi thai (Klimanskaya (2006) “Embryonic stem cells from blastomeres maintaining embryo viability.” *Semin Reprod Med.* 2013 Jan;31(1):49-55. Hơn thế nữa, số lượng lớn các dòng tế bào gốc phôi thai được thiết lập đã có sẵn trong lĩnh vực này. Do đó, có thể làm việc với các tế bào gốc phôi thai mà không cần phá hủy phôi. Các tế bào gốc vạn năng có thể là các tế bào gốc phôi thai, mà không được thu nhận thông qua việc phá hủy phôi thai người. Do đó, các tế bào gốc vạn năng là các tế bào gốc phôi thai thu được từ phôi, mà không phá hủy phôi.

Như được sử dụng ở đây "quần thể tế bào gốc người trưởng thành" là quần thể tế bào gốc đa năng. Quần thể tế bào gốc đa năng có thể tạo ra số lượng giới hạn của loại tế bào, do đó chúng bị giới hạn ở số phận tế bào soma. Chẳng hạn, tế bào gốc thần kinh có thể tạo ra cả tế bào thần kinh và thần kinh đệm. Các tế bào gốc người trưởng thành có khả năng tự làm mới và có thể thu được từ nguồn thích hợp bất kỳ. Chẳng hạn, các tế bào gốc người trưởng thành có thể được thu được từ tủy xương, máu ngoại vi, não, tủy sống, tủy răng, mạch máu, cơ xương, biểu mô của da và hệ tiêu hóa, giác mạc, võng mạc, gan, hoặc tuyến tụy.

Quần thể tế bào gốc được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế cũng có thể là quần thể tế bào gốc trung mô. Trong ngữ cảnh này, lưu ý rằng môi trường nuôi cấy được mô tả ở đây (ví dụ PTT-6) cho phép phân lập quần thể tế bào gốc trung mô (còn được gọi là “tế bào gốc trung mô”) từ màng ối trong các điều kiện mà cho phép sự tăng sinh tế bào của các tế bào tổ tiên/gốc trung mô mà không biệt hóa các tế bào tổ tiên/gốc trung mô này. Do đó, sau khi phân lập các tế bào gốc trung mô từ màng ối như được mô tả ở đây, quần thể tế bào tổ tiên/gốc trung mô phân lập được có khả năng biệt hóa thành nhiều loại tế bào như được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ 2006/0078993, patent Mỹ 9,085,755, đơn sáng chế quốc tế WO2006/019357, patent Mỹ 8,287,854 hoặc WO2007/046775, chẳng hạn. Như được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ 2006/0078993, chẳng hạn, các tế bào gốc trung mô của màng ối của dây rốn có dạng hình thoi, biểu hiện các gen sau: POU5f1, Bmi-1, yếu tố kìm hãm bạch cầu (leukemia inhibitory factor - LIF), và tiết ra Activin A và Follistatin. Tế bào gốc trung mô được phân lập theo sáng chế có thể, chẳng hạn, được biệt hóa thành loại tế bào trung mô bất kỳ như, nhưng

không chỉ giới hạn ở, tế bào tạo mỡ, nguyên bào sợi của da, tế bào sụn, nguyên bào xương, tế bào gân, nguyên bào sợi dây chằng, tế bào cơ tim, tế bào cơ trơn, tế bào cơ xương, tế bào tạo mucin, tế bào có nguồn gốc từ tuyến nội tiết như tế bào sản xuất insulin (chẳng hạn, tế bào β tiểu đảo tụy) hoặc tế bào ngoại bì thần kinh. Các tế bào gốc được phân lập theo phương pháp được mô tả ở đây có thể được biệt hóa *in vitro* để sử dụng sau đó tế bào được biệt hóa cho các mục đích y học. Một ví dụ minh họa về phương pháp này là biệt hóa các tế bào gốc trung mô thành tế bào β tiểu đảo tụy sản xuất insulin mà sau đó có thể được dùng, chẳng hạn bằng cách cấy ghép, cho người bệnh mắc chứng thiếu hụt insulin như bệnh đái tháo đường (xem WO2007/046775 về vấn đề này). Theo cách khác, các tế bào gốc trung mô được mô tả ở đây có thể được sử dụng ở trạng thái không được biệt hóa của chúng cho liệu pháp dựa trên tế bào, chẳng hạn, cho mục đích làm lành vết thương như điều trị bỏng hoặc vết thương do bệnh đái tháo đường mạn tính. Trong các ứng dụng điều trị này, các tế bào gốc trung mô theo sáng chế có thể giúp đẩy nhanh việc làm lành vết thương bằng cách tương tác với các mô bệnh xung quanh hoặc cũng có thể biệt hóa thành tế bào da tương ứng (xem WO2007/046775, chẳng hạn).

Trong ngữ cảnh này, lưu ý rằng các MSC có thể có nguồn gốc từ mô động vật có vú bất kỳ hoặc khoang/phần cơ thể bất kỳ được biết là chứa các MSC. Trong các ví dụ minh họa, các MSC có thể là các MSC của dây rốn, các MSC nhau thai, các MSC điểm nối dây rốn-nhau thai, các MSC của máu dây rốn, các MSC của tủy xương, hoặc các MSC có nguồn gốc từ mô mỡ động vật. Các MSC của dây rốn có thể (có nguồn gốc) từ ngăn bất kỳ của mô dây rốn mà chứa các MSC như các MSC màng ối, quanh mạch, các MSC của chất nhầy sệt Wharton, các MSC của màng ối của dây rốn mà cũng có thể là các MSC trộn lẫn của dây rốn, nghĩa là các MSC bao gồm các tế bào gốc của hai hoặc nhiều trong số các ngăn này. Quần thể tế bào gốc trung mô được mô tả ở đây có thể được phân lập và nuôi cấy (tức là có nguồn gốc) từ mô dây rốn bất kỳ miễn là mô dây rốn chứa màng ối (mà còn được gọi là “màng lót dây rốn”). Do đó, quần thể tế bào gốc trung mô có thể được phân lập từ (các mẫu của) toàn bộ dây rốn như được mô tả trong Phần thử nghiệm của sáng chế. Do đó, mô dây rốn này có thể chứa, ngoài màng ối, các mô/thành phần khác của dây rốn. Như được thể hiện, chẳng hạn, trên

Fig.16 của đơn yêu cầu cấp patent Mỹ 2006/0078993 hoặc đơn sáng chế quốc tế WO2006/019357, màng ối của dây rốn là phần ngoài cùng của dây rốn, bao phủ dây rốn. Ngoài ra, dây rốn chứa một tĩnh mạch (mà mang máu oxy hóa, giàu dinh dưỡng đến bào thai) và hai động mạch (mà mang máu được khử oxy, rút hết dinh dưỡng ra khỏi bào thai). Để bảo vệ và hỗ trợ cơ học, ba mạch máu này được chìm trong chất nhầy sệt Wharton, chất gel chứa phần lớn là mucopolysacarit. Do đó, mô dây rốn được sử dụng ở đây cũng có thể chứa một tĩnh mạch, hai động mạch và chất nhầy sệt Wharton này. Việc sử dụng toàn bộ (nguyên) đoạn của dây rốn có lợi thế là màng ối không cần phải được tách ra khỏi các thành phần còn lại của dây rốn. Điều này làm giảm các bước phân lập và do đó giúp cho phương pháp được mô tả ở đây đơn giản hơn, nhanh hơn, ít dễ mắc lỗi hơn và kinh tế hơn – đây đều là các khía cạnh quan trọng của quá trình sản xuất theo tiêu chuẩn GMP cần thiết cho ứng dụng chữa bệnh của các tế bào gốc trung mô. Do đó, việc phân lập các tế bào gốc trung mô có thể bắt đầu bằng cách cấy mô sang (tissue explant), có thể được theo sau bởi việc cấy chuyển (nuôi cấy) tế bào gốc trung mô được phân lập nếu cần các lượng lớn hơn của các tế bào gốc trung mô, chẳng hạn, để sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng. Theo cách khác, cũng có thể đầu tiên là tách màng ối khỏi các thành phần còn lại của dây rốn và phân lập các tế bào gốc trung mô của màng lót dây rốn từ màng ối bằng cách nuôi cấy màng ối trong môi trường nuôi cấy ví dụ PTT-6. Việc nuôi cấy này cũng có thể được tiến hành bằng cách cấy mô sang, tùy ý theo sau bởi việc cấy chuyển tế bào gốc trung mô được phân lập. Trong ngữ cảnh này, thuật ngữ “cấy mô sang” hoặc “phương pháp cấy mô sang” được sử dụng theo nghĩa thông thường của nó trong lĩnh vực này là chỉ phương pháp ở đó mô, khi được thu gom, hoặc mẫu mô được đặt trong đĩa nuôi cấy tế bào chứa môi trường nuôi cấy (tăng trưởng) và nhờ đó theo thời gian, các tế bào gốc di chuyển ra khỏi mô lên bề mặt của đĩa nuôi cấy. Các tế bào gốc sơ cấp này sau đó có thể còn được nhân lên thêm và chuyển sang đĩa mới thông qua quá trình vi nhân giống (cấy chuyển) như được mô tả ở đây. Trong ngữ cảnh này, lưu ý rằng về mặt sản xuất các tế bào cho mục đích chữa bệnh, trong bước thứ nhất là phân lập tế bào gốc trung mô màng ối từ dây rốn, thu được ngân hàng tế bào đầu dòng của tế bào gốc trung mô được phân lập, trong khi với việc cấy chuyển sau đó, có thể thu được

ngân hàng tế bào làm việc. Theo các phương án cụ thể, do đó quần thể tế bào gốc là quần thể tế bào gốc trung mô. Quần thể tế bào gốc trung mô có thể được phân lập từ màng ối của dây rốn bằng phương pháp bao gồm việc nuôi cấy mô dây rốn trong môi trường nuôi cấy chứa DMEM (môi trường eagle được biến đổi của Dulbecco), F12 (môi trường Ham's F12), M171 (môi trường 171) và FBS (huyết thanh bào thai bò). Việc sử dụng môi trường này mang lại sự phân lập quần thể tế bào gốc trung mô từ màng ối của dây rốn nhiều hơn 90%, hoặc thậm chí 99% tế bào hoặc nhiều hơn của quần thể này là dương tính với ba gen đánh dấu tế bào gốc trung mô CD73, CD90 và CD105 trong khi cũng ở các tế bào gốc này lại không có sự biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR (xem Phần thử nghiệm), nghĩa là 99% tế bào hoặc thậm chí nhiều hơn của quần thể này biểu hiện các gen đánh dấu tế bào gốc CD73, CD90 và CD105 nhưng không biểu hiện các gen đánh dấu CD34, CD45 và HLA-DR. Quần thể tế bào được xác định rõ và có tính đồng nhất cực kỳ cao này đã được thông báo lần đầu trong đơn Mỹ số 15/725,913, nộp ngày 5 tháng 10 năm 2018 (số công bố là US 2018/127721) yêu cầu hưởng quyền ưu tiên từ đơn tạm thời Mỹ số 62/404,582 nộp ngày 5 tháng 10 năm 2017, nội dung của cả hai được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ) và cũng như ở đơn PCT PCT/SG2017/050500 (số công bố là WO 2018/067071) cũng được nộp ngày 5 tháng 10 năm 2018 yêu cầu hưởng quyền ưu tiên từ đơn tạm thời Mỹ số 62/404,582 nộp ngày 5 tháng 10 năm 2017 và là ứng viên lý tưởng cho các thử nghiệm lâm sàng và các liệu pháp dựa trên tế bào vì, quần thể tế bào gốc này chẳng hạn, đáp ứng đầy đủ các tiêu chuẩn thường được chấp nhận cho tế bào gốc trung mô của người để được sử dụng cho liệu pháp tế bào như đã xác định, chẳng hạn, bởi bài liệu Dominici et al, "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement", *Cytotherapy* (2006) Vol. 8, No. 4, 315-317, Sensebe et al., "Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review", *Stem Cell Research & Therapy* 2013, 4:66), Vonk et al., *Stem Cell Research & Therapy* (2015) 6:94, hoặc Kundrotas *Acta Medica Lituanica*. 2012 Vol. 19. No. 2. P. 75-79. Ngoài ra, việc sử dụng bình phản ứng sinh học như Hệ thống nhân tế bào Quantum, có thể thu được số lượng

lớn các tế bào gốc trung mô như 300 đến 700 triệu tế bào gốc trung mô mỗi lượt chạy (xem Phần thử nghiệm). Do đó, sáng chế cho phép vận chuyển/bảo quản số lượng của các tế bào gốc cần thiết cho các ứng dụng chữa bệnh, như việc sử dụng chúng trong việc làm lành vết thương, theo cách tiết kiệm chi phí. Ngoài ra, tất cả các thành phần được sử dụng để làm môi trường nuôi cấy theo sáng chế là có bán trên thị trường ở chất lượng GMP. Do đó, sáng chế mở ra con đường để vận chuyển/bảo quản quần thể tế bào gốc trung mô từ màng ối của dây rốn có tính đồng nhất cao và được sản xuất theo GMP.

Do đó, theo một số phương án, quần thể tế bào gốc trung mô là quần thể tế bào gốc trung mô phân lập được của màng ối của dây rốn. Còn dự tính rằng ít nhất khoảng 90% tế bào hoặc nhiều hơn của quần thể tế bào gốc trung mô phân lập được biểu hiện mỗi trong số các gen đánh dấu sau: CD73, CD90 và CD105. Chẳng hạn, ít nhất khoảng 91% hoặc nhiều hơn, khoảng 92% hoặc nhiều hơn, khoảng 93% hoặc nhiều hơn, khoảng 94% hoặc nhiều hơn, khoảng 95% hoặc nhiều hơn, khoảng 96% hoặc nhiều hơn, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn khoảng 99% tế bào hoặc nhiều hơn của quần thể tế bào gốc trung mô phân lập được biểu hiện mỗi trong số CD73, CD90 và CD105. Ngoài ra hoặc theo cách khác, ít nhất khoảng 90% hoặc nhiều hơn, khoảng 91% hoặc nhiều hơn, khoảng 92% hoặc nhiều hơn, khoảng 93% hoặc nhiều hơn, khoảng 94% hoặc nhiều hơn, khoảng 95% hoặc nhiều hơn, khoảng 96% hoặc nhiều hơn, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn khoảng 99% hoặc nhiều hơn của tế bào gốc trung mô được phân lập không có sự biểu hiện gen đánh dấu sau: CD34, CD45 và HLA-DR (Human Leukocyte Antigen – antigen D Related). Theo các ví dụ khác, ít nhất khoảng 91% hoặc nhiều hơn, khoảng 92% hoặc nhiều hơn, khoảng 93% hoặc nhiều hơn, khoảng 94% hoặc nhiều hơn, khoảng 95% hoặc nhiều hơn, khoảng 96% hoặc nhiều hơn, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn khoảng 99% tế bào hoặc nhiều hơn của các MSC biểu hiện mỗi trong số CD73, CD90 và CD105 trong khi ít nhất khoảng 90% hoặc nhiều hơn, khoảng 91% hoặc nhiều hơn, khoảng 92% hoặc nhiều hơn, khoảng 93% hoặc nhiều hơn, khoảng 94% hoặc nhiều hơn, khoảng 95% hoặc nhiều hơn, khoảng 96% hoặc nhiều hơn, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn

khoảng 99% hoặc nhiều hơn của các MSC có thể không có sự biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR. Theo các ví dụ cụ thể, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn, hoặc khoảng 99% hoặc nhiều hơn của các MSC biểu hiện CD73, CD90 và CD105 trong khi không có sự biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR.

Gen đánh dấu CD73 đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Về mặt này, CD73 chỉ cụm biệt hóa 73 còn được gọi là 5'-nucleotidaza (5'-NT) hoặc ecto-5'-nucleotidaza. Trình tự của protein CD73 của người có thể có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1. Gen đánh dấu CD90 đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Về mặt này, CD90 chỉ cụm biệt hóa 90 còn được gọi là kháng nguyên biệt hóa tế bào tuyến ức 1 (Thy-1). Trình tự của protein CD90 của người có thể có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2. Gen đánh dấu CD105 đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. CD105 còn được gọi là Endoglin (ENG). Trình tự của protein CD105 của người có thể có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3.

Nếu quần thể tế bào gốc trung mô theo sáng chế (cụ thể là quần thể của các tế bào gốc trung mô mà ít nhất khoảng 98% hoặc 99% hoặc nhiều hơn của chúng biểu hiện mỗi trong số các gen đánh dấu CD73, CD90 và CD105 và không có sự biểu hiện mỗi trong số các gen đánh dấu: CD34, CD45 và HLA-DR) được sử dụng cho các thử nghiệm lâm sàng hoặc làm liệu pháp chữa bệnh được chấp thuận, quần thể tế bào của ngân hàng tế bào làm việc thường được sử dụng cho mục đích này. Như được giải thích, quần thể tế bào gốc trung mô có thể không có sự biểu hiện gen đánh dấu sau: CD34, CD45 và HLA-DR. Trong ngữ cảnh này lưu ý rằng gen đánh dấu CD34, CD45 và HLA-DR đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Protein CD34 của người có thể có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 4. Protein CD45 của người có thể có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5. Protein HLA-DR của người có thể có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 6.

Cả quần thể tế bào gốc của bước phân lập (mà có thể tạo thành ngân hàng tế bào đầu dòng) và quần thể tế bào gốc của bước cấy chuyển (mà có thể tạo thành ngân hàng tế bào làm việc) có thể, chẳng hạn, được bảo quản ở dạng bảo quản lạnh sâu.

Như được đề cập ở trên, phương pháp theo sáng chế phân lập tế bào gốc trung mô từ màng ối của dây rốn có lợi thế là tất cả các thành phần được sử dụng trong môi trường nuôi cấy theo sáng chế đã có sẵn ở chất lượng GMP và do đó mang lại khả năng phân lập các tế bào gốc trung mô trong các điều kiện GMP cho ứng dụng điều trị sau này.

Do đó, quần thể tế bào gốc cũng có thể là quần thể tế bào gốc vạn năng được cảm ứng. "Các tế bào gốc vạn năng được cảm ứng", như được sử dụng ở đây, chỉ các tế bào soma của người trưởng thành đã được lập trình lại về mặt di truyền về trạng thái giống như tế bào gốc phôi thai bằng cách bị bắt buộc biểu hiện các gen và yếu tố quan trọng để duy trì các đặc tính xác định của các tế bào gốc phôi thai. Do đó, các tế bào gốc vạn năng được cảm ứng có thể có nguồn gốc/tạo ra từ tế bào không phải vạn năng.

Các tế bào gốc vạn năng được cảm ứng là bước tiến quan trọng trong nghiên cứu tế bào gốc, vì chúng cho phép thu được các tế bào gốc vạn năng mà không cần sử dụng phôi. Các iPSC của chuột được thông báo lần đầu vào năm 2006 (Takahashi, K; Yamanaka, S (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors". *Cell* 126 (4): 663–76), và các iPSC của người (hiPSC) được thông báo lần đầu vào năm 2007 (Takahashi et al. (2007) "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." *Cell*; 131(5):861-72). Các iPSC của chuột chứng tỏ các đặc tính quan trọng của các tế bào gốc vạn năng, bao gồm sự biểu hiện các gen đánh dấu tế bào gốc, tạo các khối u chứa tế bào từ cả ba lớp mầm, và có thể đóng góp vào nhiều mô khác nhau khi được tiêm vào phôi chuột ở giai đoạn rất sớm trong quá trình phát triển. Các iPSC của người cũng biểu hiện các gen đánh dấu tế bào gốc và có khả năng tạo ra các tế bào có đặc trưng của cả ba lớp mầm. Các gen đánh dấu tế bào gốc này có thể bao gồm Oct3/4, Sox2, Nanog, phosphatase kiềm (ALP) cũng như kháng nguyên đặc hiệu tế bào gốc 3 và 4 (SSEA3/4). Ngoài ra, các kiểu methyl hóa chất nhiễm sắc của iPSC là tương tự với các kiểu methyl hóa của các tế bào gốc phôi thai (Tanabe, Takahashi, Yamanaka (2014) "Induction of pluripotency by defined factors." *Proc. Jpn. Acad.*, 2014, Ser. B 90).

Ngoài ra, các iPSCs có thể tự làm mới *in vitro* và biệt hóa thành cả ba lớp mầm. Tính vạn năng hoặc tiềm năng biệt hóa thành các loại tế bào khác nhau của iPSC có thể được thử nghiệm, ví dụ, bằng cách biệt hóa *in vitro* thành tế bào thần kinh hoặc thần kinh đệm hoặc việc tạo ra các động vật thể khảm dòng mầm thông qua việc tiêm túi phôi.

Các phương pháp để tạo các tế bào gốc vạn năng được cảm ứng của người được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình và chẳng hạn được mô tả trong WO2009115295, WO2009144008 hoặc EP2218778. Do đó, người có hiểu biết trung bình có thể thu được iPSC bằng phương pháp bất kỳ. Về nguyên tắc, các tế bào gốc vạn năng được cảm ứng có thể được thu nhận từ tế bào soma người trưởng thành bất kỳ (của đối tượng). Các tế bào soma làm ví dụ bao gồm tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) từ máu hoặc nguyên bào sợi thu được từ sinh thiết mô da.

Sáng chế *bên cạnh các khía cạnh khác*, đề cập đến dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển MSC thu được bởi phương pháp như được mô tả ở đây cũng như đến dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển MSC có thể thu được bằng phương pháp như được mô tả ở đây. Hơn nữa, sáng chế đề cập đến việc vận chuyển các MSC bao gồm việc vận chuyển các MSC này trong dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô như được xác định ở đây. Trong ngữ cảnh này, sáng chế đề xuất rằng quần thể tế bào gốc như được mô tả ở đây được tiếp xúc với chất mang lỏng. Dự tính rằng trong phương pháp theo sáng chế, quần thể tế bào gốc như được mô tả ở đây được cho tiếp xúc với chất mang trước khi vận chuyển/bảo quản. Ngoài ra hoặc theo cách khác, quần thể tế bào gốc được cho tiếp xúc với chất mang sau khi thu gom. Cách thu gom có thể được thực hiện như thế nào được mô tả chi tiết ở đâu đó trong bản mô tả này cũng như trong Phần thử nghiệm. Chẳng hạn, quần thể tế bào gốc có thể được tiếp xúc với chất mang khoảng 0 phút, khoảng 1 phút, khoảng 5 phút, khoảng 10 phút, khoảng 30 phút, khoảng 45 phút, khoảng 60 phút hoặc thời gian lâu hơn sau khi thu gom.

Việc thu gom có thể bao gồm việc tách quần thể tế bào gốc từ môi trường nuôi cấy ví dụ từ PTT-6. Các kỹ thuật thích hợp để tách đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Chẳng hạn, việc tách có thể được thực hiện

bằng cách ly tâm các tế bào gốc trong môi trường nuôi cấy và lắng gạn môi trường nuôi cấy.

Quần thể tế bào gốc được tiếp xúc với chất mang lỏng, trong đó chất mang lỏng chứa

- i) Trolox;
- ii) Na^+ ;
- iii) K^+ ;
- iv) Ca^{2+} ;
- v) Mg^{2+} ;
- vi) Cl^- ;
- vii) H_2PO_4^- ;
- viii) HEPES;
- ix) Lactobionat;
- x) Sucroza;
- xi) Manitol;
- xii) Glucoza;
- xiii) Dextran-40;
- xiv) Adenosin, và
- xv) Glutathion.

“Trolox” nghĩa là axit 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic có số CAS 53188-07-1. Chất này là chất tương tự vitamin E tan được trong nước và được đề xuất để làm giảm áp lực oxy hóa hoặc hư hỏng. Fig.19 thể hiện bảng dữ liệu của Trolox có sẵn từ Tocris. Chất này cũng có bán trên thị trường từ Sigma Aldrich (số sản phẩm: 238813).

Cả Na^+ và Cl^- là các ion đã biết. Người có hiểu biết trung bình biết cách thu được các chất này. Chẳng hạn, các ion này có thể được bổ sung vào chất mang dưới dạng muối NaCl . NaCl ở chất lượng GMP có thể thu được từ Sigma Aldrich. Fig.20 thể hiện bảng dữ liệu của NaCl có sẵn từ Sigma Aldrich.

Ca^{2+} và Mg^{2+} cũng là các ion đã biết. Người có hiểu biết trung bình biết cách thu được các chất này. Các ion này có thể, chẳng hạn, được bổ sung vào chất mang dưới dạng muối CaCl_2 hoặc MgCl_2 . Fig.31 thể hiện bảng dữ liệu của CaCl_2

có sẵn từ Sigma Aldrich và Fig.32 thể hiện bảng dữ liệu của MgCl_2 có sẵn từ Sigma Aldrich.

K^+ và H_2PO_4^- (dihydro phosphat) cũng được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình. Nó có thể được sử dụng ví dụ dưới dạng KH_2PO_4 có thể thu được từ SigmaAldrich. Fig.21 thể hiện bảng dữ liệu của KH_2PO_4 có sẵn từ Sigma Aldrich.

HEPES còn được gọi là axit 4-(2-Hydroxyetyl)piperazin-1-etansulfonic (số CAS 7365-45-9) thường được sử dụng dưới dạng chất đệm hóa học hữu cơ ion lưỡng tính. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết phải mua HEPES ở đâu, mà có bán trên thị trường. Chẳng hạn, họ có thể mua nó từ Sigma Aldrich; bảng dữ liệu tương ứng được thể hiện trên Fig.22.

Lactobionat là anion carboxylat của axit lactobionic. Axit lactobionic (axit 4-O- β -galactopyranosyl-D-gluconic) là axit đường. Lactobionat có thể được sử dụng theo các cách khác nhau. Khi được sử dụng dưới dạng kali lactobionat, nó có thể, ví dụ, tạo ra sự hỗ trợ thẩm thấu và ngăn chặn sự trương phồng tế bào và khi được kết hợp với natri, nó có thể có chức năng bảo quản. Theo cách khác, các muối khoáng của axit lactobionic có thể được sử dụng để bổ sung khoáng. Đối với ứng dụng dược lý, thường là kháng sinh erythromyxin có thể được sử dụng, bên cạnh các kháng sinh khác làm muối erythromyxin lactobionat. Người có hiểu biết trung bình sẽ biết phải mua lactobionat ở đâu, ví dụ natri lactobionat (số Cas: 27297-39-8), cụ thể là từ ví dụ COMBI-BLOCKS, xem bảng thông tin sản phẩm trên Fig.23.

Sucroza, còn được gọi là D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru, α -D-glucopyranosyl β -D-fructofuranosit, β -D-fructofuranosyl- α -D-glucopyranosit, D(+)-sacaroza hoặc đường (số CAS 57-50-1) có thể được mua trên thị trường dưới dạng các chất khác và người có hiểu biết trung bình cũng sẽ biết mua nó ở đâu. Tờ thông tin sản phẩm tương ứng cho sucroza từ Sigma Aldrich được thể hiện trên Fig.24.

Manitol là một loại rượu đường (số đăng ký CAS: 69-65-8). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết cách thu được manitol. Chẳng hạn, nó có thể được mua từ Avantor. Tờ thông tin sản phẩm tương ứng được thể hiện trên Fig.25.

Glucosa (số CAS: 50-99-7) cũng được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình và có bán trên thị trường. Tờ thông tin sản phẩm tương ứng từ Sigma Aldrich được thể hiện trên Fig.26.

Dextran là glucan phân nhánh gồm có các đơn vị glucosa được liên kết α tuyến tính ($1 \rightarrow 6$) và các nhánh bắt đầu từ liên kết α ($1 \rightarrow 3$). Dextran có kích thước nằm trong khoảng từ 10.000 đến 150.000 Kd. Dextran được sử dụng trong nhiều ứng dụng làm chất mở rộng thể tích, chất làm ổn định, thành phần nền, nền liên kết, chất làm mờ và các thành phần cấu trúc vật lý. Dextran 40 (số CAS: 9004-54-0) như được sử dụng trong chất mang được mô tả ở đây thường được sử dụng trong việc tạo ra các dung dịch bảo quản cải tiến mới cho việc cấy ghép cơ quan. Dextran 40 có thể được sử dụng để xác định độ kín khít của tế bào và thông số thông lượng qua các lớp tế bào. Dextran 40 cũng có thể được sử dụng làm chất mở rộng thể tích dạng keo plasma. Dextran-40 có bán trên thị trường và có thể, bên cạnh các loại khác, thu được từ Sigma Aldrich (tờ thông tin sản phẩm thể hiện trên Fig.27).

Adenosin (số CAS 58-61-7) là purin nucleosit gồm có phân tử adenin gắn vào gốc phân tử đường riboza (ribofuranosa) qua liên kết β -N₉-glycosidic. Adenosin có bán trên thị trường, bên cạnh các loại khác, từ Sigma-Aldrich (tờ thông tin sản phẩm tương ứng được thể hiện trên Fig.28).

Glutathion còn được gọi là axit (2S)-2-Amino-4-{[(1R)-1-[(carboxymethyl)carbamoyl]-2-sulfanylethyl]carbamoyl}butanoic. Thành phần này có bán trên thị trường và có thể, bên cạnh các loại khác, thu được từ Sigma Aldrich (tờ thông tin sản phẩm tương ứng được thể hiện trên Fig.29).

Về nguyên tắc, chất mang lỏng bất kỳ chứa các chất như được liệt kê trong các mục i)-xv) ở trên có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế. Chất mang là chất mang lỏng. Do đó, có thể là các chất như được liệt kê trong các mục i)-xv) được hòa tan trong chất lỏng để tạo ra dung dịch/dịch huyền phù. Chất lỏng có thể là chất lỏng thích hợp bất kỳ. Chẳng hạn, chất lỏng có thể là môi trường nuôi cấy, nước, chất đệm hoặc tương tự.

Chất mang ngoài ra có thể chứa thêm các chất đệm pH, cơ chất năng lượng, các chất khử gốc tự do, và chất ổn định thẩm thấu/oncotic – tất cả đều được biết rõ

bởi người có hiểu biết trung bình. Hơn thế nữa, chất mang lỏng có thể là không chứa huyết thanh và/hoặc không chứa protein. Chất mang lỏng có thể không chứa dung môi không proton hai cực như chẳng hạn DMSO. Cụ thể, chất mang lỏng có thể là chất mang như được mô tả trong WO 2010/064054. Chất mang có thể là HypoThermosol™ hoặc HypoThermosol™-FRS (HTS-FRS). HypoThermosol™-FRS (HTS-FRS) có thể được mua từ STEMCELL Technologies (theo bảng thông tin sản phẩm tương ứng thể hiện trên Fig.30).

Còn dự tính rằng chất mang là môi trường vận chuyển/bảo quản hoặc tá dược. Môi trường vận chuyển/bảo quản, có thể là môi trường tự nhiên, chỉ gồm có các dịch sinh học có trong tự nhiên, chứa thêm các chất như liệt kê trong các mục i)-xv) như được mô tả ở đây. Môi trường cũng có thể là môi trường chứa các chất được liệt kê trong các mục i)-xv) như được mô tả ở đây và việc bổ sung (thêm) các chất dinh dưỡng (cả hữu cơ và vô cơ), vitamin, muối, các pha khí O₂ và CO₂, protein huyết thanh, carbohydrat, và/hoặc các đồng yếu tố. Theo các phương án cụ thể, môi trường là không chứa huyết thanh và/hoặc protein.

Chất mang cũng có thể là tá dược. “Tá dược” là chất được đưa vào công thức cùng với thành phần hoạt tính của dược phẩm. Theo phương pháp theo sáng chế, thành phần hoạt tính là quần thể tế bào gốc.

Chất mang có thể còn chứa các giàn tương hợp sinh học hoặc vi chất mang. Các giàn hoặc vi chất mang có thể, chẳng hạn, là các chất polyme thoái biến sinh học, tốt nhất là poly(axit D,L lactic-co-glycolic) (PLGA)). Theo cách khác, các giàn hoặc vi chất mang có thể là các cấu trúc nhẵn, độ xốp lớn hoặc vi xốp chứa các chất bao gồm poly-L-lactit (PLLA), collagen, fibronectin, glycosaminoglycan (GAG), fibrin, tinh bột, xenluloza arabinogalactan (gôm gỗ thông), axit alginic, aga, caragenan, chitin, axit hyaluronic, dextran, gôm gelan, pululan, hydroxyapatit, polyhydroxyalkanoat (PHA), hydrogel hoặc các vật liệu tự ghép nối khác như các giàn sợi có cấu trúc nano có thành phần chính là peptit.

Về nguyên tắc lượng bất kỳ của các tế bào gốc có thể được cho tiếp xúc với lượng bất kỳ của chất mang lỏng. Về mặt này, việc tiếp xúc có thể được thực hiện bằng cách tạo huyền phù quần thể tế bào gốc ở mật độ khoảng 70 triệu/ml, khoảng 60 triệu/ml, khoảng 50 triệu/ml, khoảng 40 triệu/ml, khoảng 30 triệu/ml, khoảng

20 triệu/ml, khoảng 10 triệu/ml, khoảng 5 triệu/ml, khoảng 4 triệu/ml, khoảng 3 triệu/ml, khoảng 2 triệu/ml, khoảng 1 triệu/ml, khoảng 0,5 triệu/ml, khoảng 0,1 triệu/ml hoặc ít hơn 0,1 triệu tế bào trong 1 ml chất mang. Theo một số phương án, việc tiếp xúc được thực hiện bằng cách tạo huyền phù quần thể tế bào gốc ở mật độ khoảng 10 triệu/1 ml chất mang.

Sau khi tiếp xúc quần thể tế bào gốc với dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô, các tế bào gốc được tiếp xúc với dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô có thể được chia nhỏ vào các lọ có thể tích khoảng 50 ml, khoảng 20 ml, khoảng 10 ml, khoảng 5 ml, khoảng 4 ml, khoảng 3 ml, khoảng 2 ml, khoảng 1 ml, khoảng 0,5 ml, khoảng 0,25 ml hoặc ít hơn 0,25 ml dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô. Chẳng hạn, các tế bào gốc mà đã được tiếp xúc với dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô có thể được chia nhỏ vào các lọ có thể tích khoảng 1 ml.

Còn dự tính rằng phương pháp theo sáng chế không bao gồm bước rã đông hoặc đông lạnh. Điều này có thể bao gồm là sau khi thu gom, quần thể tế bào gốc được vận chuyển/bảo quản mà không cần đông lạnh và rã đông quần thể tế bào gốc này.

Chất mang được sử dụng trong phương pháp vận chuyển/bảo quản quần thể tế bào gốc như được mô tả ở đây là đặc biệt thích hợp cho mục đích này. Một ưu điểm của chất mang này là gần như tất cả các tế bào gốc vận chuyển/bảo quản trong đó vẫn sống. “Tế bào sống” là tế bào có khả năng sống được. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết cách phát hiện tế bào sống. Một phương pháp là nhuộm các tế bào bằng thuốc nhuộm xanh Trypan. Các tế bào sống không nhuộm dương tính với xanh Trypan.

Về mặt này, trong phương pháp theo sáng chế, nhiều nhất là khoảng 50%, khoảng 40%, khoảng 30%, khoảng 20%, khoảng 10% hoặc ít hơn than khoảng 10% tế bào gốc của quần thể này có thể chết trong quá trình vận chuyển/bảo quản so với số lượng/lượng các tế bào gốc sống trước khi vận chuyển/ bảo quản.

Phương pháp theo sáng chế còn đề xuất rằng quần thể tế bào gốc có đường kính tế bào bất kỳ sau khi vận chuyển/bảo quản. Người có hiểu biết trung bình

trong lĩnh vực này biết cách đo đường kính tế bào. Chẳng hạn, đường kính/kích thước tế bào có thể được xác định bằng cách chụp ảnh hiển vi và sử dụng phần mềm thứ cấp để đo đường kính tế bào. Hầu hết các tế bào gốc trong quần thể tế bào gốc do đó có thể có đường kính tế bào nằm giữa khoảng 9 μm và khoảng 20 μm sau khi vận chuyển/bảo quản. Cũng có thể hình dung rằng hầu hết các tế bào gốc trong quần thể tế bào gốc có đường kính tế bào giữa khoảng 12 μm và khoảng 16 μm sau khi vận chuyển.

Các tế bào gốc được vận chuyển/bảo quản trong chất mang như được mô tả ở đây tiết ra cùng protein/ yếu tố như các tế bào gốc sống được. Chẳng hạn, phương pháp theo sáng chế đề xuất rằng sau khi vận chuyển/bảo quản, quần thể tế bào gốc (trung mô) có thể tiết ra nhiều TGFbeta 1 như trước khi vận chuyển/bảo quản. TGFbeta 1 (yếu tố tăng trưởng biến đổi dạng beta - Transforming growth factor beta, TGF- β 1) đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và có thể có trình tự như thể hiện trong SEQ ID NO. 7. Ngoài ra hoặc theo cách khác, sau khi vận chuyển/bảo quản quần thể tế bào gốc (trung mô) có thể tiết nhiều VEGF (yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu - Vascular endothelial growth factor), PDGF-AA (Tiểu đơn vị yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu - Platelet-derived growth factor subunit AA), Ang-1 (Angiogenin-1), và/hoặc HGF (yếu tố tăng trưởng tế bào gan - Hepatocyte growth factor) như trước khi vận chuyển/bảo quản. Tất cả VEGF, PDGF-AA, Ang-1, và/hoặc HGF đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này vì đóng góp của chúng trong việc làm lành vết thương. Cụ thể, VEGF có thể có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO. 8, PDGF-AA có thể có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO. 9, Ang-1 có thể có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO. 10 trong khi HGF có thể có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO. 11. Ngoài ra hoặc theo cách khác, về cơ bản không có PDGF-BB và/hoặc IL-10 được phát hiện trước khi và/hoặc sau khi vận chuyển. Cả PDGF-BB (Tiểu đơn vị yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu BB) và/hoặc IL-10 (interleukin-10) đều được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình. PDGF-BB có thể có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO. 12 trong khi IL-10 có thể có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 13. Sự tiết các yếu tố này có thể được xác định bằng phương pháp thích hợp

bất kỳ, chẳng hạn, bằng cách đo lượng protein (tức là, chẳng hạn, PDGF-AA, PDGF-BB, VEGF, IL-10, Ang-1, HGF hoặc TGF β 1) mà các tế bào gốc tiết vào chất mang. Lượng protein có thể được đo bằng kháng thể có bán trên thị trường/thử nghiệm miễn dịch theo cách tự động hóa, nhờ sử dụng, chẳng hạn hệ như hệ FLEXMAP 3D (Luminex Corporation, Austin, Texas, Mỹ). Trong ngữ cảnh này, lưu ý rằng sự đóng góp của các protein Angiopoietin 1 (Ang-1), TGF- β 1, VEGF, và HGF trong quá trình làm lành vết thương được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Đối với sự đóng góp của Angiopoietin 1 trong việc làm lành vết thương, xem, chẳng hạn, Li et al. Stem Cell Research & Therapy 2013, 4:113 “Mesenchymal stem cells modified with angiopoietin-1 gene promote wound healing”. Đối với sự đóng góp của yếu tố tăng trưởng tế bào gan (Hepatocyte Growth Factor - HGF) trong việc làm lành vết thương, cụ thể là làm lành các vết thương mạn tính/không lành, xem, chẳng hạn, Yoshida et al., “Neutralization of Hepatocyte Growth Factor Leads to Retarded Cutaneous Wound Healing Associated with Decreased Neovascularization and Granulation Tissue Formation. J. Invest. Dermatol. 120:335-343, 2003, Li, Jin-Feng et al. “HGF Accelerates Wound Healing by Promoting the Dedifferentiation of Epidermal Cells through β 1-Integrin/ILK Pathway.” BioMed Research International 2013 (2013): 470418 hoặc Conway et al, “Hepatocyte growth factor regulation: An integral part of why wounds become chronic”. Wound Rep Reg (2007) 15 683–692. Đối với sự đóng góp của yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF) trong việc làm lành vết thương, cụ thể là làm lành các vết thương mạn tính/không lành, xem, chẳng hạn Froget et al., Eur. Cytokine Netw., Vol. 14, March 2003, 60–64 hoặc Bao et al., “The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing” J Surg Res. 2009 May 15; 153(2): 347-358.

Đối với sự đóng góp của yếu tố tăng trưởng biến đổi dạng beta (Transforming Growth Factor Beta) (bao gồm TGF- β 1, TGF- β 2, và TGF- β 3) trong việc làm lành vết thương, cụ thể là làm lành các vết thương mạn tính/không lành, xem, chẳng hạn, Ramirez et al. “The Role of TGF β Signaling in Wound Epithelialization” Advances In Wound Care, Volume 3, Number 7, 2013, 482-491

hoặc Pakyari et al., Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing, *Advances In Wound Care*, Volume 2, Number 5, 2012, 215-224.

Đối với môi trường nuôi cấy được sử dụng theo sáng chế, môi trường nuôi cấy có thể chứa, để phân lập hoặc nuôi cấy các tế bào gốc trung mô của màng lót dây rốn, DMEM ở nồng độ cuối là khoảng 55 đến 65% (thể tích/thể tích), F12 ở nồng độ cuối là khoảng 5 đến 15% (thể tích/thể tích), M171 ở nồng độ cuối là khoảng 15 đến 30% (thể tích/thể tích) và FBS ở nồng độ cuối là khoảng 1 đến 8% (thể tích/thể tích). Giá trị “% (thể tích/thể tích)” như được sử dụng ở đây chỉ thể tích của thành phần riêng rẽ so với thể tích cuối của môi trường nuôi cấy. Điều này nghĩa là, nếu DMEM, chẳng hạn, có mặt trong môi trường nuôi cấy ở nồng độ cuối là khoảng 55 đến 65% (thể tích/thể tích), thì 1 lít môi trường nuôi cấy chứa khoảng 550 đến 650 ml DMEM.

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

Ngoài các thành phần nêu trên, môi trường nuôi cấy có thể chứa các chất bổ sung mà có lợi cho việc nuôi cấy các tế bào gốc trung mô của màng lót dây rốn. Môi trường nuôi cấy theo sáng chế có thể, chẳng hạn, chứa yếu tố tăng trưởng biểu bì (Epidermal Growth Factor - EGF). Nếu có mặt, EGF có thể có mặt trong môi trường nuôi cấy ở nồng độ cuối là khoảng 1 ng/ml đến khoảng 20 ng/ml. Theo một số trong các phương án này, môi trường nuôi cấy có thể chứa EGF ở nồng độ cuối là khoảng 10ng/ml.

Môi trường nuôi cấy cũng có thể bao gồm insulin. Nếu có mặt, insulin có thể có mặt ở nồng độ cuối là khoảng 1 µg/ml đến 10 µg/ml. Theo một số trong các

phương án này, môi trường nuôi cấy có thể chứa insulin ở nồng độ cuối là khoảng 5 µg/ml.

Môi trường nuôi cấy có thể còn chứa ít nhất một trong số các chất bổ sung sau: adenin, hydrocortison, và muối 3,3',5-Triiodo-L-thyronin natri (T3). Theo các phương án này, môi trường nuôi cấy có thể chứa tất cả ba trong số adenin, hydrocortison, và muối 3,3',5-Triiodo-L-thyronin natri (T3). Theo các phương án này, môi trường nuôi cấy có thể chứa adenin ở nồng độ cuối là khoảng 0,05 đến khoảng 0,1 µg/ml, hydrocortison ở nồng độ cuối là khoảng 1 đến khoảng 10 µg/ml và/hoặc muối 3,3',5-Triiodo-L-thyronin natri (T3) ở nồng độ cuối là khoảng 0,5 đến khoảng 5 ng/ml.

Theo một phương án, các tế bào gốc trung mô được nuôi cấy trong môi trường PTT6 để thu được quần thể tế bào gốc trung mô được tinh sạch cao được mô tả và được sử dụng ở đây. Trong ngữ cảnh này lưu ý rằng môi trường PTT6 như được mô tả ở đây thu được bởi bằng cách trộn để thu được thể tích cuối là 500 ml môi trường nuôi cấy:

- i. 250 ml DMEM
- ii. 118 ml M171
- iii. 118 ml DMEM/F12
- iv. 12,5 ml huyết thanh bào thai bò (FBS) để đạt nồng độ cuối là 2,5% (thể tích/thể tích)
- v. EGF ở nồng độ cuối là 10ng/ml
- vi. Insulin ở nồng độ cuối là 5µg/ml.
- vii. Insulin 0,175 ml (nồng độ cuối là 5µg/ml)

“DMEM” nghĩa là môi trường eagle được biến đổi của Dulbecco được tạo ra năm 1969 và là cải biến của môi trường eagle cơ bản (basal medium eagle - BME) (xem Fig.1 thể hiện bảng dữ liệu của DMEM có sẵn từ Lonza). Công thức DMEM gốc chứa 1000 mg/L glucoza và được thông báo lần đầu để nuôi cấy tế bào phôi thai chuột. Kể từ đó, DMEM trở thành môi trường chuẩn để nuôi cấy tế bào mà có bán trên thị trường từ các nguồn khác nhau như ThermoFisher Scientific (số catalog 11965-084), Sigma Aldrich (số catalog D5546) hoặc Lonza, chỉ là vài nhà cung cấp được chỉ ra. Do đó, DMEM có bán trên thị trường bất kỳ

có thể được sử dụng theo sáng chế. Theo các phương án ưu tiên, DMEM được sử dụng ở đây là môi trường DMEM có sẵn từ Lonza có số catalog 12-604F. Môi trường này là DMEM được bổ sung 4,5 g/L glucoza và L-glutamin. Theo một phương án ưu tiên, DMEM được sử dụng ở đây là môi trường DMEM của Sigma Aldrich số catalog D5546 mà chứa 1000 mg/L glucoza, và natri bicarbonat mà không chứa L-glutamin.

Môi trường “F12” nghĩa là môi trường Ham’s F12. Môi trường này cũng là môi trường nuôi cấy tế bào chuẩn và là hỗn hợp dinh dưỡng được thiết kế ban đầu để nuôi cấy nhiều loại tế bào động vật có vú và tế bào hybridoma khi được sử dụng với huyết thanh kết hợp với các hormon và transferrin (xem Fig.2, thể hiện bảng dữ liệu của môi trường Ham’s F12 từ Lonza). Môi trường Ham’s F12 có bán trên thị trường bất kỳ (chẳng hạn, từ ThermoFisher Scientific (số catalog 11765-054), Sigma Aldrich (số catalog N4888) hoặc Lonza, chỉ là vài nhà cung cấp được nêu ra) có thể được sử dụng theo sáng chế. Theo các phương án ưu tiên, môi trường Ham’s F12 từ Lonza được sử dụng.

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

“M171” nghĩa là môi trường nuôi cấy 171, mà được tạo ra dưới dạng môi trường cơ bản để nuôi cấy và phát triển tế bào biểu mô vú người (xem Fig.4 thể hiện bảng dữ liệu cho môi trường M171 từ Life Technologies Corporation). Môi trường cơ bản này được sử dụng rộng rãi và có bán trên thị trường từ các nhà cung cấp như ThermoFisher Scientific hoặc Life Technologies Corporation (số catalog M171500), chẳng hạn. Môi trường M171 có bán trên thị trường bất kỳ có thể được

sử dụng theo sáng chế. Theo các phương án ưu tiên, môi trường M171 được sử dụng ở đây là môi trường M171 có sẵn từ Life Technologies Corporation có số catalog M171500.

“FBS” nghĩa là huyết thanh bào thai bò (còn được gọi là “huyết thanh bào thai bê”), tức là phần máu còn lại sau khi máu đông kết tự nhiên, sau đó ly tâm để loại bỏ phần tế bào hồng cầu còn lại bất kỳ. Huyết thanh bào thai bò là dạng bổ sung huyết thanh được sử dụng rộng rãi nhất để nuôi cấy tế bào *in vitro* cho tế bào nhân thật vì môi trường này có lượng kháng thể rất thấp và chứa nhiều yếu tố tăng trưởng hơn, cho phép sự linh hoạt trong nhiều ứng dụng nuôi cấy tế bào khác nhau. FBS tốt hơn là thu được từ thành viên của Hiệp hội Công nghiệp Huyết thanh Quốc tế (International Serum Industry Association - ISIA) mà tập trung chủ yếu vào độ an toàn và việc sử dụng huyết thanh an toàn và các sản phẩm có nguồn gốc từ động vật thông qua khả năng truy xuất nguồn gốc, sự thật in trong nhãn và tiêu chuẩn và giám sát thích hợp. Các nhà cung cấp FBS là các thành viên của ISIA bao gồm Abattoir Basics Company, Animal Technologies Inc., Biomin Biotechnologia LTDA, GE Healthcare, Gibco bởi Thermo Fisher Scientific and Life Science Production, chỉ là vài nhà cung cấp được nêu ra. Theo các phương án ưu tiên hiện tại, FBS thu được từ GE Healthcare có số catalog A15-151.

Như đề cập ở trên, phương pháp tạo môi trường nuôi cấy để phân lập quần thể tế bào gốc trung mô được sử dụng theo sáng chế bao gồm việc trộn để thu được thể tích cuối là 500 ml môi trường nuôi cấy:

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

Như được giải thích ở trên, môi trường DMEM/F12 là hỗn hợp 1:1 của DMEM và môi trường Ham's F12. Do đó, 118 ml môi trường DMEM/F12 chứa 59 ml DMEM và 59 ml F12. Do đó, khi sử dụng phương pháp tạo môi trường nuôi cấy này, các nồng độ cuối (thể tích/thể tích) với 500 ml thể tích tổng là như sau:

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

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

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

Các phương án của phương pháp tạo môi trường nuôi cấy này còn bao gồm bước bổ sung

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

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

Lưu ý rằng theo các phương án này, các thể tích nêu trên của các thành phần i. đến vi. này sẽ dẫn đến thể tích cuối là $499,675\text{ ml}$ môi trường nuôi cấy. Nếu không có thêm thành phần nào nữa vào môi trường nuôi cấy, $0,325\text{ ml}$ còn lại (để thêm vào cho đủ 500 ml) có thể, chẳng hạn, là thành phần bất kỳ trong số i. đến iv., nghĩa là DMEM, M171, DMEM/F12 hoặc FBS. Theo cách khác, nồng độ của của dung dịch gốc EGF hoặc Insulin dĩ nhiên có thể được điều chỉnh sao cho tổng thể tích của môi trường nuôi cấy là 500 ml . Ngoài ra, còn lưu ý rằng các thành phần i. đến iv. không cần phải được bổ sung theo thứ tự được liệt kê mà dĩ nhiên là có thể sử dụng thứ tự bất kỳ để trộn các thành phần này để thu được môi trường nuôi cấy theo sáng chế. Điều này nghĩa là, chẳng hạn, M171 và DMEM/F12 có thể được trộn với nhau và sau đó kết hợp với DMEM và FBS để đạt nồng độ cuối như được mô tả ở đây, tức là nồng độ cuối của DMEM là khoảng 55 đến 65% (thể tích/thể tích), nồng độ cuối là F12 là khoảng 5 đến 15% (thể tích/thể tích), nồng độ cuối là M171 là khoảng 15 đến 30% (thể tích/thể tích) và nồng độ cuối là FBS là khoảng 1 đến 8% (thể tích/thể tích).

Theo các phương án khác, phương pháp còn bao gồm việc bổ sung vào DMEM thể tích $0,325\text{ ml}$ của một hoặc nhiều trong số các chất bổ sung sau: adenin, hydrocortison, muối 3,3',5-Triiodo-L-thyronin natri (T3), nhờ đó đạt được thể tích cuối là 500 ml môi trường nuôi cấy. Theo phương án này, nồng độ cuối của các chất bổ sung này trong DMEM có thể là như sau:

khoảng $0,05$ đến $0,1\text{ }\mu\text{g/ml}$ adenin, chẳng hạn khoảng $0,025\text{ }\mu\text{g/ml}$ adenin,

khoảng 1 đến 10 $\mu\text{g/ml}$ hydrocortison,
khoảng 0,5 đến 5 ng/ml muối 3,3',5-Triiodo-L-thyronin natri (T3), chẳng hạn 1,36
 ng/ml muối 3,3',5-Triiodo-L-thyronin natri (T3).

Theo mô tả ở trên, môi trường nuôi cấy tế bào được sử dụng ở đây có thể
thu được hoặc được thu được bằng phương pháp tạo môi trường như được mô tả ở
đây.

Ngoài ra, phương pháp phân lập tế bào gốc trung mô từ màng ối của dây
rốn, trong đó phương pháp này bao gồm việc nuôi cấy mô màng ối trong môi
trường nuôi cấy được điều chế bởi phương pháp được mô tả ở đây.

Do đó, sáng chế còn đề xuất (việc sử dụng) môi trường nuôi cấy tế bào
chứa:

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

Theo các phương án nhất định về môi trường nuôi cấy được mô tả ở đây,
môi trường chứa DMEM ở nồng độ cuối là khoảng 57,5 đến 62,5% (thể tích/thể
tích), F12 ở nồng độ cuối là khoảng 7,5 đến 12,5% (thể tích/thể tích), M171 ở
nồng độ cuối là khoảng 17,5 đến 25,0% (thể tích/thể tích) và FBS ở nồng độ cuối
là khoảng 1,75 đến 3,5% (thể tích/thể tích). Theo các phương án khác môi trường
nuôi cấy có thể chứa DMEM ở nồng độ cuối là khoảng 61,8% (thể tích/thể tích),
F12 ở nồng độ cuối là khoảng 11,8% (thể tích/thể tích), M171 ở nồng độ cuối là
khoảng 23,6% (thể tích/thể tích) và FBS ở nồng độ cuối là khoảng 2,5% (thể
tích/thể tích).

Ngoài ra, môi trường nuôi cấy có thể còn chứa yếu tố tăng trưởng biểu bì
(Epidermal Growth Factor - EGF) ở nồng độ cuối là khoảng 1 ng/ml đến khoảng
20 ng/ml . Theo các phương án nhất định, môi trường nuôi cấy chứa EGF ở nồng
độ cuối là khoảng 10 ng/ml . Môi trường nuôi cấy được mô tả ở đây có thể còn chứa
Insulin ở nồng độ cuối là khoảng 1 $\mu\text{g/ml}$ đến 10 $\mu\text{g/ml}$. Theo các phương án này
môi trường nuôi cấy có thể chứa Insulin ở nồng độ cuối là khoảng 5 $\mu\text{g/ml}$.

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

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

- i. 250 ml DMEM
 - ii. 118 ml M171
 - iii. 118 ml DMEM/F12
 - iv. 12,5 ml huyết thanh bào thai bò (FBS) (nồng độ cuối là 2,5%)
- Theo các phương án khác nữa, môi trường nuôi cấy tế bào có thể còn chứa:
- v. EGF ở nồng độ cuối là 10 ng/ml , và
 - vi. Insulin ở nồng độ cuối là 5 $\mu\text{g/ml}$.

Cả insulin và EGF có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhờ sử dụng dung dịch gốc được chọn, sao cho tổng thể tích của môi trường nuôi cấy không vượt quá 500 ml.

Theo ví dụ cụ thể, các thành phần i. đến vi. của môi trường nuôi cấy được sử dụng theo sáng chế là các thành phần được chỉ ra trên Fig.5, nghĩa là chúng thu được từ các nhà sản xuất tương ứng sử dụng số catalog được chỉ ra trên Fig.5. Môi trường mà thu được từ việc trộn các thành phần i. đến vi. như được chỉ ra trên Fig.5 còn được gọi là “PTT-6”. Cần lưu ý lại rằng, trong ngữ cảnh này, các thành phần i. đến vi. cũng như thành phần khác bất kỳ như kháng sinh của nhà cung cấp thương mại khác bất kỳ có thể được sử dụng để tạo môi trường theo sáng chế.

Ngoài ra, môi trường nuôi cấy tế bào theo sáng chế có thể chứa adenin ở nồng độ cuối là khoảng 0,01 đến khoảng 0,1 $\mu\text{g/ml}$ adenin hoặc khoảng 0,05 đến khoảng 0,1 $\mu\text{g/ml}$ adenin, hydrocortison ở nồng độ cuối là khoảng 0,1 đến 10

$\mu\text{g/ml}$, khoảng 0,5 đến khoảng $10\mu\text{g/ml}$, hoặc khoảng 1 đến khoảng $10\mu\text{g/ml}$ hydrocortison và/hoặc muối 3,3',5-Triiodo-L-thyronin natri (T3) ở nồng độ cuối là khoảng 0,1 đến khoảng 5 ng/ml hoặc khoảng 0,5 đến khoảng 5 ng/ml .

Để thu được quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây, mô dây rốn có thể được nuôi cấy cho đến khi số lượng thích hợp các tế bào trung mô màng lót dây rốn (sơ cấp) phát triển ra từ mô. Theo các phương án điển hình, mô dây rốn được nuôi cấy cho đến khi sự phát triển ra của các tế bào gốc trung mô của màng ối đạt khoảng 70 đến khoảng 80% hợp lưu. Lưu ý rằng thuật ngữ “hợp lưu” được sử dụng theo nghĩa thông thường trong lĩnh vực nuôi cấy tế bào và nghĩa là ước lượng/chỉ báo về số lượng các tế bào bám chặt vào đĩa nuôi cấy hoặc bình thót cổ, chỉ tỷ lệ phần trăm bề mặt của đĩa nuôi cấy mà được bao phủ bởi các tế bào. Chẳng hạn, 50 phần trăm hợp lưu là khoảng chừng một nửa bề mặt được bao phủ và vẫn còn khoảng trống để tế bào phát triển. 100 phần trăm hợp lưu nghĩa là toàn bộ bề mặt được bao phủ bởi các tế bào, và không còn chỗ để các tế bào phát triển dưới dạng lớp đơn.

Khi số lượng thích hợp của các tế bào sơ cấp (các tế bào gốc màng lót dây rốn) thu được từ mô màng lót dây rốn bằng cách cấy mô sang, các tế bào gốc trung mô được lấy ra khỏi vật chứa nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy. Nhờ làm như vậy, có thể thu được ngân hàng tế bào đầu dòng chứa tế bào gốc trung mô được phân lập (sơ cấp) của màng ối. Điển hình là, tế bào gốc trung mô là các tế bào bám dính, việc lấy ra được tiến hành nhờ sử dụng phương pháp xử lý enzym chuẩn. Chẳng hạn, xử lý enzym có thể bao gồm bước trypsin hóa như được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ 2006/0078993, đơn sáng chế quốc tế WO2006/019357 hoặc đơn sáng chế quốc tế WO2007/046775, nghĩa là các tế bào phát triển ra ngoài có thể được thu gom bằng cách trypsin hóa (0,125% trypsin/0,05% EDTA) để mở rộng thêm. Nếu các tế bào gốc trung mô thu gom được, chẳng hạn, được sử dụng để tạo ngân hàng tế bào đầu dòng, các tế bào cũng có thể được bảo vệ bằng đông lạnh sâu và được bảo quản để sử dụng sau như được giải thích dưới đây.

Khi được thu gom, các tế bào gốc trung mô có thể được chuyển vào vật chứa nuôi cấy để cấy chuyển. Cấy chuyển cũng có thể bắt đầu từ tế bào sơ cấp được đông lạnh, tức là từ ngân hàng tế bào đầu dòng. Để cấy chuyển, số lượng tế

bào thích hợp bất kỳ có thể được cấy trong vật chứa nuôi cấy như đĩa nuôi cấy tế bào. Tế bào gốc trung mô có thể, vì mục đích này, được tạo huyền phù trong môi trường thích hợp (thuận tiện nhất là, môi trường nuôi cấy PTT-6) để cấy chuyển ở nồng độ, chẳng hạn, khoảng $0,5 \times 10^6$ tế bào/ml đến khoảng $5,0 \times 10^6$ tế bào/ml. Theo một phương án các tế bào được tạo huyền phù để cấy chuyển ở nồng độ khoảng $1,0 \times 10^6$ tế bào/ml. Việc cấy chuyển có thể được tiến hành bằng cách nuôi cấy trong bình thót cổ nuôi cấy đơn giản, nhưng cũng có thể là, chẳng hạn, trong hệ nhiều lớp như CellStacks (Corning, Corning, NY, Mỹ) hoặc Cellfactory (Nunc, part of Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Mỹ) có thể được xếp chồng trong tủ nuôi cấy. Theo cách khác, việc cấy chuyển cũng có thể được tiến hành trong hệ kín độc lập như bình phản ứng sinh học. Các thiết kế bình phản ứng sinh học khác nhau được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, chẳng hạn, bình phản ứng sinh học kiểu đĩa song song (parallel-plate), sợi rỗng (hollow-fiber), hoặc vi lỏng (micro-fluidic). Xem, chẳng hạn, Sensebe et al. “Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review”, *nêu trên*. Một ví dụ minh họa về bình phản ứng sinh học sợi rỗng có bán trên thị trường là hệ khuếch đại tế bào Quantum® (Terumo BCT, Inc) mà đã, chẳng hạn, được sử dụng để khuếch đại tế bào gốc trung mô tủy xương cho các thử nghiệm lâm sàng (xem, Hanley et al, Efficient Manufacturing of Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells Using the Quantum Cell Expansion System, *Cytotherapy*. 2014 August ; 16(8): 1048-1058). Một ví dụ khác về bình phản ứng sinh học có bán trên thị trường mà có thể được sử dụng để cấy chuyển quần thể tế bào gốc trung mô theo sáng chế là hệ khuếch đại tế bào Xuri có sẵn từ GE Healthcare. Việc nuôi cấy quần thể tế bào gốc trung mô trong hệ tự động hóa như hệ khuếch đại tế bào Quantum® là đặc biệt có lợi nếu ngân hàng tế bào làm việc cho các ứng dụng chữa bệnh sẽ được tạo ra trong các điều kiện GMP và mong muốn có số lượng tế bào lớn.

Việc cấy chuyển các tế bào gốc trung mô màng lót dây rốn được mô tả ở đây diễn ra trong môi trường nuôi cấy được mô tả ở đây như môi trường PTT-6. Do đó, môi trường nuôi cấy như PTT-6 có thể được sử dụng cả để phân lập các tế bào gốc trung mô từ màng ối và việc nuôi cấy sau đó các tế bào sơ cấp được phân

lập này bằng cách cấy chuyên. Cũng đối với việc cấy chuyên, các tế bào gốc trung mô có thể được nuôi cấy cho đến khi phát triển đến số lượng tế bào thích hợp. Theo các phương án minh họa, các tế bào gốc trung mô được cấy chuyên cho đến khi các tế bào gốc trung mô đạt khoảng 70 đến khoảng 80% hợp lưu.

Việc phân lập/nuôi cấy quần thể các tế bào gốc trung mô màng lót dây rốn có thể được tiến hành trong các điều kiện chuẩn để nuôi cấy tế bào động vật có vú. Điển hình, phương pháp theo sáng chế để phân lập quần thể các tế bào gốc trung mô của màng lót dây rốn điển hình là được tiến hành ở các điều kiện (nhiệt độ, áp suất) mà thường được sử dụng để nuôi cấy các tế bào thuộc loài mà các tế bào này có nguồn gốc từ đó. Chẳng hạn, mô dây rốn của người và các tế bào gốc trung mô của màng lót dây rốn lần lượt thường được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong bầu khí quyển không khí với 5% CO₂. Trong ngữ cảnh này, lưu ý rằng các tế bào trung mô có thể có nguồn gốc từ loài động vật có vú bất kỳ, như chuột nhắt, chuột, chuột lang, thỏ, dê, ngựa, chó, mèo, cừu, khỉ hoặc người, với các tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ người được ưu tiên theo một phương án.

Khi số lượng mong muốn/thích hợp của các tế bào gốc trung mô màng lót dây rốn thu được từ cấy chuyên, các tế bào gốc trung mô có thể được thu gom bằng cách lấy chúng ra khỏi vật chứa nuôi cấy được sử dụng để cấy chuyên. Việc thu gom các tế bào gốc trung mô điển hình là được tiến hành bằng xử lý enzym, bao gồm trypsin hóa các tế bào. Các tế bào gốc trung mô được phân lập sau đó được thu gom và được sử dụng trực tiếp hoặc bảo quản để sử dụng sau. Điển hình là, việc bảo quản được tiến hành bằng cách bảo quản đông lạnh. Thuật ngữ “bảo quản đông lạnh” được sử dụng ở đây theo nghĩa thông thường của nó để mô tả quá trình các tế bào gốc trung mô được bảo quản bằng cách làm lạnh đến nhiệt độ thấp dưới không độ, như (điển hình là) -80°C hoặc -196°C (nhiệt độ sôi của nitơ lỏng). Bảo quản đông lạnh có thể được tiến hành như đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và có thể bao gồm việc sử dụng các chất bảo vệ đông lạnh như dimethylsulfoxit (DMSO) hoặc glyxerin, mà làm chậm sự hình thành của các tinh thể đá trong các tế bào của dây rốn.

Quần thể được phân lập của các tế bào gốc trung mô của màng lót dây rốn thu được bởi phương pháp phân lập như được mô tả ở đây là được xác định và

đồng nhất cao. Theo các khía cạnh điển hình của phương pháp, ít nhất khoảng 90% hoặc nhiều hơn, khoảng 91% hoặc nhiều hơn, khoảng 92% hoặc nhiều hơn, khoảng 93% hoặc nhiều hơn, khoảng 94% hoặc nhiều hơn, khoảng 95% hoặc nhiều hơn, khoảng 96% hoặc nhiều hơn, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn khoảng 99% tế bào gốc trung mô được phân lập hoặc nhiều hơn biểu hiện các gen đánh dấu sau: CD73, CD90 và CD105. Ngoài ra, theo các phương án này ít nhất khoảng 90% hoặc nhiều hơn, khoảng 91% hoặc nhiều hơn, khoảng 92% hoặc nhiều hơn, khoảng 93% hoặc nhiều hơn, khoảng 94% hoặc nhiều hơn, khoảng 95% hoặc nhiều hơn, khoảng 96% hoặc nhiều hơn, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn khoảng 99% tế bào gốc trung mô được phân lập hoặc nhiều hơn có thể không có sự biểu hiện gen đánh dấu sau: CD34, CD45 và HLA-DR. Theo các phương án cụ thể, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn, hoặc khoảng 99% hoặc nhiều hơn của quần thể tế bào gốc trung mô phân lập được biểu hiện CD73, CD90 và CD105 trong khi không có sự biểu hiện của CD34, CD45 và HLA-DR.

Do đó, theo phân mô tả trên, quần thể tế bào gốc trung mô được phân lập từ màng ối của dây rốn, trong đó ít nhất khoảng 90% tế bào hoặc nhiều hơn của quần thể tế bào gốc biểu hiện mỗi trong số các gen đánh dấu sau: CD73, CD90 và CD105. Theo các phương án ưu tiên ít nhất khoảng 91% hoặc nhiều hơn, khoảng 92% hoặc nhiều hơn, khoảng 93% hoặc nhiều hơn, khoảng 94% hoặc nhiều hơn, khoảng 95% hoặc nhiều hơn, khoảng 96% hoặc nhiều hơn, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn khoảng 99% tế bào hoặc nhiều hơn của quần thể tế bào gốc trung mô phân lập được là CD73+, CD90+ và CD105+, nghĩa là phần trăm này của quần thể tế bào phân lập biểu hiện mỗi trong số CD73, CD90 và CD105 (xem Phần thử nghiệm của sáng chế) có thể được sử dụng ở đây. Ngoài ra, ít nhất khoảng 90% hoặc nhiều hơn, khoảng 91% hoặc nhiều hơn, khoảng 92% hoặc nhiều hơn, khoảng 93% hoặc nhiều hơn, khoảng 94% hoặc nhiều hơn, khoảng 95% hoặc nhiều hơn, khoảng 96% hoặc nhiều hơn, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn khoảng 99% tế bào gốc trung mô được phân lập hoặc nhiều hơn có thể không có sự biểu hiện gen đánh dấu sau. Theo các phương án cụ thể khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn, hoặc

khoảng 99% tế bào hoặc nhiều hơn của quần thể tế bào gốc trung mô phân lập được biểu hiện CD73, CD90 và CD105 trong khi không có sự biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR. Quần thể đồng nhất cao như vậy của tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ màng ối của dây rốn đã được báo cáo lần đầu trong đơn tạm thời Mỹ số 62/404,582, nộp ngày 5 tháng 10 năm 2016 cũng như đơn Mỹ US số 15/725,913, nộp ngày 5 tháng 10 năm 2017 cũng như đơn PCT số PCT/SG2017/050500, cũng được nộp ngày 5 tháng 10 năm 2017, và đáp ứng tác tiêu chuẩn về tế bào gốc trung mô để được sử dụng cho liệu pháp tế bào (xem Phần thử nghiệm và, chẳng hạn, Sensebe et al. "Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review", nêu trên). Lưu ý trong ngữ cảnh này rằng quần thể tế bào gốc trung mô này có thể thu được bằng phương pháp phân lập theo sáng chế nhưng cũng có thể bằng phương pháp khác như phân loại tế bào, nếu cần.

Phương pháp tạo môi trường nuôi cấy để phân lập tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây có thể bao gồm việc trộn để thu được thể tích cuối là 500 ml môi trường nuôi cấy:

i. 250 ml DMEM

ii. 118 ml M171

iii. 118 ml DMEM/F12

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

Như được giải thích ở trên, môi trường DMEM/F12 là hỗn hợp 1:1 của DMEM và môi trường Ham's F12.

Do đó, 118 ml môi trường DMEM/F12 chứa 59 ml DMEM và 59 ml F12. Do đó, khi sử dụng phương pháp tạo môi trường nuôi cấy này, các nồng độ cuối (thể tích/thể tích) với 500 ml thể tích tổng là như sau:

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

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

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

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị cho đối tượng mắc bệnh, phương pháp này bao gồm việc dùng khu trú tế bào gốc trung mô mà đã được bảo quản hoặc vận chuyển trong dung dịch bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô, hoặc quần thể như được mô tả ở đây cho đối tượng, trong đó các tế bào gốc trung mô hoặc quần thể tế bào gốc được dùng trong vòng khoảng 96 giờ từ thời điểm quần thể tế bào gốc trung mô được thu gom. Phương pháp điều trị cho đối tượng có thể được tiến hành như được mô tả trong đơn quốc tế số WO2019/199229 “A Method Of Transporting Mesenchymal Stem Cells By Means Of A Transporting Solution And A Method Of Administering Stem Cells To Wounds” mà được công bố sau ngày ưu tiên của đơn PCT này và được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn cho cho tất cả mọi mục đích.

Tương tự, sáng chế còn đề xuất quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh cho đối tượng, trong đó quần thể tế bào gốc trung mô được dùng khu trú trong vòng khoảng 96 giờ từ thời điểm quần thể tế bào gốc trung mô được thu gom.

Đối tượng cần điều trị có thể là đối tượng thích hợp bất kỳ. Đối tượng có thể là động vật có xương sống, hoặc tốt hơn là động vật có vú. Động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gia súc gia cầm, động vật thể thao, thú nuôi, động vật linh trưởng, chó, ngựa, chuột nhắt và chuột. Động vật có vú cũng có thể là người, chó, mèo, bò, lợn, chuột nhắt, chuột v.v.. Do đó, theo một phương án, đối tượng là động vật có xương sống. Đối tượng cũng có thể là người. Đối tượng do đó có thể là đối tượng cần điều trị. Như vậy, đối tượng có thể bị đau đớn do bệnh như được mô tả ở đâu đó trong bản mô tả này. Theo một số phương án đối tượng bị đau đớn do bệnh đái tháo đường Typ I hoặc Typ II với các vết loét bàn chân mạn tính. Tốt hơn là, đối tượng âm tính với kháng thể HLA đối với quần thể tế bào gốc trung mô.

Quần thể tế bào gốc trung mô có thể được sử dụng ở dạng liều bất kỳ. Dạng liều có thể có hiệu quả chữa bệnh. “Lượng/dạng liều có hiệu quả chữa bệnh” có thể thay đổi theo các yếu tố bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các hoạt động của các tế bào được sử dụng, tính ổn định của các tế bào trong cơ thể người bệnh, độ trầm trọng của tình trạng bệnh cần được làm thuyên giảm, tuổi và độ nhạy của

người cần điều trị, các phản ứng phụ, và tương tự, mà là hiển nhiên với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Lượng sử dụng có thể được điều chỉnh theo sự thay đổi của các yếu tố khác nhau theo thời gian.

Dạng liều ở đó các tế bào gốc trung mô được dùng cũng có thể là dạng liều đơn vị. Chẳng hạn, quần thể tế bào gốc trung mô có thể được sử dụng ở dạng liều đơn vị khoảng 20 triệu tế bào, khoảng 15 triệu tế bào, khoảng 10 triệu tế bào, khoảng 5 triệu tế bào, khoảng 4 triệu tế bào, khoảng 3 triệu tế bào, khoảng 2 triệu tế bào, khoảng 1 triệu tế bào, khoảng 0,5 triệu tế bào, khoảng 0,25 triệu tế bào hoặc ít hơn 0,25 triệu tế bào. Theo một ví dụ, các tế bào gốc trung mô có thể được sử dụng ở dạng liều khoảng 3, khoảng 5 hoặc khoảng 10 triệu tế bào. Theo phương án cụ thể, quần thể tế bào gốc trung mô được sử dụng ở dạng liều đơn vị khoảng 10 triệu tế bào.

Tế bào gốc trung mô có thể được sử dụng vài lần cho cùng đối tượng. Chẳng hạn, các tế bào gốc được dùng một lần, hai lần, ba lần hoặc nhiều lần một tuần. Về nguyên tắc dạng liều đơn vị bất kỳ của tế bào gốc trung mô có thể được sử dụng với số lần thích hợp để chữa hoặc làm thuyên giảm bệnh. Chẳng hạn, quần thể tế bào gốc trung mô có thể được sử dụng một lần, hai lần, ba lần hoặc nhiều lần một tuần. Quần thể tế bào gốc trung mô cũng có thể được sử dụng trong một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một tuần hoặc nhiều hơn.

Do đó, dạng liều đơn vị khoảng 20 triệu tế bào, khoảng 15 triệu tế bào, khoảng 10 triệu tế bào, khoảng 5 triệu tế bào, khoảng 4 triệu tế bào, khoảng 3 triệu tế bào, khoảng 2 triệu tế bào, khoảng 1 triệu tế bào, khoảng 0,5 triệu tế bào, khoảng 0,25 triệu tế bào hoặc ít hơn 0,25 triệu tế bào được dùng một đến hai lần một tuần. Liều đơn vị khoảng 20 triệu tế bào, khoảng 15 triệu tế bào, khoảng 10 triệu tế bào, khoảng 5 triệu tế bào, khoảng 4 triệu tế bào, khoảng 3 triệu tế bào, khoảng 2 triệu tế bào, khoảng 1 triệu tế bào, khoảng 0,5 triệu tế bào, khoảng 0,25 triệu tế bào hoặc ít hơn 0,25 triệu tế bào cũng có thể được dùng một đến hai lần một tuần trong khoảng thời gian là ba tuần, bốn tuần, hoặc năm tuần hoặc sáu tuần, hoặc bảy tuần, hoặc tám tuần hoặc mười tuần hoặc nhiều tuần hơn.

Cũng bao gồm bởi phương pháp điều trị theo sáng chế là các tế bào gốc trung mô hoặc quần thể tế bào gốc trung mô được sử dụng ở dạng liều khoảng

1000 tế bào/cm² đến khoảng 5 triệu tế bào/cm². Ở đây, sự thể hiện cm² nghĩa là diện tích của vết thương/da mà các tế bào gốc được dùng vào đó. Cũng có thể hình dung rằng quần thể tế bào gốc trung mô được sử dụng ở dạng liều khoảng 100.000 tế bào/cm², 300.000 tế bào/cm² hoặc 500.000 tế bào/cm². Quần thể tế bào gốc trung mô cũng có thể được dùng hai lần một tuần trong khoảng 8 tuần ở dạng liều khoảng 100.000 tế bào/cm², khoảng 300.000 tế bào/cm² hoặc khoảng 500.000 tế bào/cm².

Quần thể tế bào gốc trung mô được dùng trong vòng khoảng 96 giờ từ thời điểm quần thể tế bào gốc trung mô được thu gom. Cách thực hiện việc thu gom được mô tả ở đầu đó trong bản mô tả này. Có thể là các tế bào gốc trung mô hoặc quần thể tế bào gốc trung mô được dùng trong vòng khoảng 72 giờ, khoảng 48 giờ, khoảng 24 giờ, khoảng 12 giờ, khoảng 6 giờ hoặc ít hơn từ thời điểm mà quần thể tế bào gốc trung mô được thu gom. Giữa thời gian thu gom và sử dụng, quần thể tế bào gốc trung mô có thể được vận chuyển hoặc bảo quản ở dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô như được mô tả trong sáng chế. Do đó, các khía cạnh như mô tả để việc vận chuyển/bảo quản ở dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô theo sáng chế đề cập một cách tương đương đến phương pháp điều trị cho đối tượng bao gồm việc dùng các MCS mà đã được bảo quản ở dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô theo sáng chế *với các thay đổi cần thiết*.

Phương pháp điều trị đối tượng theo sáng chế giúp làm thuyên giảm bệnh mà đối tượng mắc phải. Về nguyên tắc, bệnh bao gồm bệnh bất kỳ mà có thể được điều trị bằng quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây. Cụ thể, bệnh có thể là bệnh ngoài da hoặc vết thương. Vết thương có thể được gây ra bởi nguyên nhân bất kỳ ví dụ do bị bỏng, vết cắn, chấn thương, phẫu thuật hoặc bệnh. Vết thương cũng có thể gây ra bởi bệnh đái tháo đường. Vì vậy, vết thương cũng có thể là vết thương bệnh đái tháo đường. Vết thương cũng có thể là vết loét bàn chân do bệnh đái tháo đường. Lưu ý, quần thể tế bào gốc trung mô có thể, chẳng hạn, được đặt trực tiếp lên trên vết thương như vết bỏng hoặc vết thương do bệnh đái tháo đường (xem đơn sáng chế quốc tế WO2007/046775).

Như được mô tả ở đây, giữa thời gian thu gom quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây và sử dụng chúng cho đối tượng, các tế bào có thể được vận chuyển/bảo quản trong chất mang như được xác định ở đây. Vì vậy, phương pháp điều trị đối tượng theo sáng chế cũng có thể bao gồm bước tách quần thể tế bào gốc trung mô khỏi chất mang trước khi dùng quần thể tế bào gốc trung mô cho đối tượng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết cách thực hiện việc tách tế bào khỏi chất mang. Chẳng hạn, việc tách quần thể tế bào gốc trung mô khỏi chất mang có thể bao gồm bước ly tâm. Ngoài ra hoặc theo cách khác, việc tách quần thể tế bào gốc trung mô khỏi chất mang có thể bao gồm việc rút quần thể tế bào từ lọ bằng xylanh.

Sau khi tách các tế bào gốc từ dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô hoặc sau thu gom các tế bào gốc trung mô hoặc sau thu nhận quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây bằng phương pháp khác bất kỳ, các tế bào này được dùng khu trú cho đối tượng. Về nguyên tắc, cách bất kỳ để dùng khu trú được bao gồm trong bản mô tả này. Việc dùng quần thể tế bào gốc trung mô có thể được thực hiện bằng xylanh. Tuy nhiên cũng có thể cho các tế bào gốc trung mô tiếp xúc trong kem, thuốc mỡ, gel, dịch huyền phù hoặc chất thích hợp khác bất kỳ trước khi sử dụng các tế bào gốc trung mô cho đối tượng. Quần thể tế bào gốc trung mô sau khi sử dụng cho đối tượng có thể được giữ tại chỗ bằng màng hoặc băng. Ví dụ về màng hoặc băng như vậy có thể là đồ băng bó như băng gạc Tegaderm® và băng kép để phủ băng gạc Tegaderm®. Để phân bố tế bào đồng đều hơn, vị trí sử dụng có thể được xoa bóp nhẹ nhàng.

Sáng chế còn đề xuất dạng liều đơn vị tế bào gốc trung mô thu được hoặc có thể thu được bằng phương pháp như được mô tả ở đây. Chẳng hạn, dạng liều đơn vị có thể chứa khoảng 20 triệu tế bào, khoảng 15 triệu tế bào, khoảng 10 triệu tế bào, khoảng 5 triệu tế bào, khoảng 4 triệu tế bào, khoảng 3 triệu tế bào, khoảng 2 triệu tế bào, khoảng 1 triệu tế bào, khoảng 0,5 triệu tế bào, khoảng 0,25 triệu tế bào hoặc ít hơn 0,25 triệu tế bào của quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây ở thể tích 1 ml.

Cũng có thể hình dung rằng dạng liều đơn vị chứa khoảng 10, khoảng 9, khoảng 8, khoảng 7, khoảng 6, khoảng 5, khoảng 4, khoảng 3, khoảng 2, khoảng 1,

khoảng 0,5, khoảng 0,25, hoặc khoảng 0,1 triệu tế bào. Theo một ví dụ, dạng liều đơn vị có thể chứa khoảng 1 triệu, khoảng 3 triệu, hoặc khoảng 5 triệu tế bào. Tốt hơn là dạng liều đơn vị chứa khoảng 10 triệu tế bào. Còn dự tính rằng dạng liều đơn vị chứa khoảng 1000 tế bào đến khoảng 5 triệu tế bào. Liều đơn vị có thể được sử dụng ở dạng liều khoảng 100.000 tế bào, 300.000 tế bào hoặc 500.000 tế bào. Như được mô tả ở đây, dạng liều đơn vị có thể được sử dụng khu trú. Chẳng hạn, dạng liều đơn vị có thể được sử dụng khu trú trên cm^2 .

Liều đơn vị có thể được sử dụng một lần, hai lần, ba lần hoặc nhiều lần một tuần. Chẳng hạn, dạng liều đơn vị có thể được sử dụng trong một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một tuần hoặc nhiều hơn. Liều đơn vị chứa khoảng 100.000 tế bào, khoảng 300.000 tế bào hoặc khoảng 500.000 tế bào có thể được sử dụng hai lần một tuần trong 8 tuần, tốt hơn là lên 1 cm^2 .

Liều đơn vị có thể được chứa trong vật chứa thích hợp bất kỳ. Chẳng hạn, dạng liều đơn vị có thể được chứa trong lọ 1 ml. Trong các trường hợp đó, chẳng hạn 0,1 ml của lọ có thể được sử dụng cho đối tượng, tốt hơn là trên mỗi cm^2 . Liều đơn vị có thể theo cách khác được chứa trong xylanh.

Liều đơn vị theo sáng chế, các tế bào có thể tiếp xúc với chất mang lỏng như được xác định ở đây. Nếu vậy thì các tế bào gốc trung mô được tách khỏi chất mang trước khi dùng. Chẳng hạn, các tế bào có thể được ly tâm và được phân lập trước khi dùng cho đối tượng. Chất mang có thể bao gồm hoặc là chất mang bất kỳ như được mô tả ở đây, như HypoThermosolTM hoặc HypothermosolTM-FRS.

Liều đơn vị theo sáng chế có thể chứa các MSC của dây rốn. Như được mô tả ở trên, các MSC của dây rốn có thể (có nguồn gốc) từ ngăn bất kỳ của mô dây rốn chứa các MSC. Do đó, dạng liều đơn vị có thể chứa các MSC của màng ối, các MSC quanh mạch, các MSC của chất nhầy sệt Wharton, các MSC của màng ối của dây rốn. Các MSC của màng ối của dây rốn có thể được xác định và đồng nhất cao. Do đó, theo một phương án theo sáng chế, dạng liều đơn vị có thể chứa các MSC như được mô tả trong đơn quốc tế số WO 2018/067071 được sử dụng. Do đó, các ví dụ điển hình của phương pháp dạng liều đơn vị có thể chứa các MSC có ít nhất khoảng 90% hoặc nhiều hơn, khoảng 91% hoặc nhiều hơn, khoảng 92% hoặc nhiều hơn, khoảng 93% hoặc nhiều hơn, khoảng 94% hoặc nhiều hơn,

khoảng 95% hoặc nhiều hơn, khoảng 96% hoặc nhiều hơn, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn khoảng 99% hoặc nhiều hơn của các MSC biểu hiện mỗi trong số các gen đánh dấu sau: CD73, CD90 và CD105. Hơn nữa, dạng liều đơn vị có thể chứa các MSC có ít nhất khoảng 90% hoặc nhiều hơn, khoảng 91% hoặc nhiều hơn, khoảng 92% hoặc nhiều hơn, khoảng 93% hoặc nhiều hơn, khoảng 94% hoặc nhiều hơn, khoảng 95% hoặc nhiều hơn, khoảng 96% hoặc nhiều hơn, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn, khoảng 99% hoặc nhiều hơn của các MSC không có sự biểu hiện của các gen đánh dấu sau: CD34, CD45 và HLA-DR. Theo các ví dụ cụ thể, dạng liều đơn vị chứa khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn, hoặc khoảng 99% hoặc nhiều hơn của các MSC biểu hiện CD73, CD90 và CD105 trong khi không có sự biểu hiện của CD34, CD45 và HLA-DR. Theo các ví dụ khác, ít nhất khoảng 91% hoặc nhiều hơn, khoảng 92% hoặc nhiều hơn, khoảng 93% hoặc nhiều hơn, khoảng 94% hoặc nhiều hơn, khoảng 95% hoặc nhiều hơn, khoảng 96% hoặc nhiều hơn, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn khoảng 99% tế bào hoặc nhiều hơn của các MSC biểu hiện mỗi trong số CD73, CD90 và CD105 trong khi ít nhất khoảng 90% hoặc nhiều hơn, khoảng 91% hoặc nhiều hơn, khoảng 92% hoặc nhiều hơn, khoảng 93% hoặc nhiều hơn, khoảng 94% hoặc nhiều hơn, khoảng 95% hoặc nhiều hơn, khoảng 96% hoặc nhiều hơn, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn khoảng 99% hoặc nhiều hơn của các MSC có thể không có sự biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR. Theo các ví dụ cụ thể, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn, hoặc khoảng 99% hoặc nhiều hơn của các MSC biểu hiện CD73, CD90 và CD105 trong khi không có sự biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR.

Phương pháp điều trị và dạng liều đơn vị theo sáng chế có thể bao gồm việc sử dụng các tế bào sống được. Cách có thể kiểm tra mức độ sống được mô tả ở đâu đó trong bản mô tả này.

Sáng chế sẽ được minh họa thêm bởi các ví dụ thử nghiệm không làm giới hạn sáng chế sau.

Các trình tự như được sử dụng ở đây được minh họa trong bảng 1 bên dưới.

Bảng 1. Các trình tự như được sử dụng ở đây.

SEQ ID NO.	Loại	Trình tự
1	Ký hiệu nhận diện CD73 P21589 của Uniprot, phiên bản số 1 từ ngày 1 tháng 5 năm 1991:	MCPRAARAPATLLALGAVLWPAAGAWELTILHTNDVHSR LEQTSSEDSSKCVNASRCMGGVARLFTKVQQIRRAEPNVLL DAGDQYQGTIWFTVYKGAEVAHFMNALRYDAMALGNHEF DNGVEGLIEPLLKEAKFPILSANIKAKGPLASQISGLYLPYKV LPVGDEVVGIVGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEITALQPEVDK LKTLNVNKKIILGHSGFEMDKLIAQKVRGVDVVVGHSNTF LYTGNPPSKEVPAGKYPFIVTSDDGRKVPVVQAYAFGKYL YLKIEFDERGNVISSHGPNILLNSSIPEDPSIKADINKWRIKLD NYSTQELGKTIVYLDGSSQSCRFRECNMGNLICDAMINNNLR HTDEMFWNHVSMCILNGGGIRSPIDERNNGTITWENLAAVL PFGGTFDLVQLKGSTLKKAFEHSVHRYGQSTGEFLQVGGIH VVYDLRSKPGDRVVKLDVLCTKCRVPSYDPLKMDEVYKVIL PNFLANGGDGFQMIKDELLRHDSGDQDINVVSTYISKMKVIY PAVEGRIKFSTGSHCHGSFSLIFLSLWAVIFVLYQ
2	Ký hiệu nhận diện CD90 P04216 của Uniprot, phiên bản số 2 từ ngày 2 tháng 5 năm 2002:	MNLAISIALLLTVLQVSRGQKVTSLTACLVDQSLRLDCRHEN TSSSPIQYEFSLTRETKKHVLFGTGVPEHTYRSRTNFTSKYN MKVLYLSAFTSKDEGTYTCALHHS GHSPPISSQNVTVLRDKL VKCEGISLLAQNTSWLLLLLLSLSLQATDFMSL
3	Ký hiệu nhận diện CD105 P17813 của Uniprot, phiên bản số 2 từ 15 tháng 7 năm	MDRGTLPLAVALLASCSLSPTSLAETVHCDLQPVGPERGEV TYTTSQVSKGCVAQAPNAILEVHVLFLFPTGPSQLELTLQA SKQNGTWPREVLLVLSVNSSVFLHLQALGIPLHLAYNSSLVT FQEPGVTNTELPSPFKTQILEWAAERGPITSAELNDPQSILL RLGQAQGSLSFCMLEASQDMGRTLEWRPRTPALVRGCHLE GVAGHKEAHILRVLP GHSAGPRTVTVKVELSCAPGDLDV ILQGPPYVSWLIDANHNMQIWTTGEYSFKIFPEKNIRGFKLPD TPQGLLGEARMLNASIVASFVELPLASIVSLHASSCGGRLQTS PAPIQTTPPKDTCSPELLMSLIQTKCADDAMTLVLKKELVAH LKCTITGLTFWDPSCEAEDRGDKFVLRSA YSSCGMQVSASMI SNEAVVNILSSSSPQRKKVHCLNMDLSFQLGLYLSPHFLQA SNTIEPGQQSFVQVRVSPSVSEFLQLD SCHLDLGPEGGTVEL

SEQ ID NO.	Loại	Trình tự
	1998:	IQGRAAKGNCVSLSPSPEGDPFRFSLLHFYTVPIPKTGTLSC VALRPKTGSQDQEVHRTVFMRLNIISPDLSGCTSKGLVLP LGITFGAFLIGALLTAALWYIYSHTRSPSKREPVVAVAAPASS ESSSTNHSIGSTQSTPCSTSSMA
4	Ký hiệu nhận diện CD34 P28906 của Uniprot, phiên bản số 2 từ 15 tháng 7 năm 1998:	MLVRRGARAGPRMPRGWTALCLLSLLPSGFMSLDNNGTAT PELPTQGTFSNVSTNVSYQETTTTPSTLGSTSLHPVSQHGNEAT TNITETTVKFTSTSVITSVYGNTNSSVQSQTSVISTVFTTPANV STPETTLKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATSPTKPYTSSSPILSDIK AEIKCSGIREVKLTQGICLEQNKTSSEAEFKKDRGEGLARVL CGEEQADADAGAQCSCLLLAQSEVRPQCLLLVLANRTEISSK LQLMKKHQSDLKKLGILDFTEQDVASHQSYSQKTLIALVTSG ALLAVLGITGYFLMNRWSPTGERLGEDPYTENGSGGGQGY SSGPGTSPEAQGKASVNRGAQENG TGQATSRNGHSARQHV VADTEL
5	Ký hiệu nhận diện CD45 P08575 của Uniprot, phiên bản số 2 từ 19 tháng 7 năm 2003:	MYLWLKLLAFGFAFLDTEVFVTGQSPTPSPTGLTTAKMPSVP LSSDPLPHTTAFSPASTFERENDFSETTTSLSPDNTSTQVSPD SLDNASAFNTTGVSSVQTPHLPHTHADSQTPSAGTDTQTFSGS AANAKLNPTPGSNAISDVPGERSTASTFPTDPVSPLTTTSLA HHSSAALPARTSNTTITANTSDAYLNASETTTSLSPSGSAVIST TTIATTPSKPTCDEKYANITVDYLYNKETKLFTAKLNVNENV ECGNNTCTNNEVHNLTECKNASVSISHNSCTAPDKTLILDVP PGVEKFQLHDCTQVEKADTTICLKWKNIETFTCDTQNITYRF QCGNMIFDNKEIKLENLEPEHEYKCDSEILYNNHKFTNASKII KTDFGSPGEPQIIFCRSEAAHQGVITWNPPQRSFHNFTLCYIK ETEKDCLNLDKNLIK YDLQNLKPYTKYVLSLHAYIIAKVQRN GSAAMCHFTTKSAPPSQVWNMTVSM TSDNSMHVKCRPPRD RNGPHERYHLEVEAGNTLVRNESHKNCDFRVKDLQYSTDY TFKAYFHNGDYPGEPFILHHSTSYNSKALIAFLAFLIIVTSIAL LVVLYKIYDLHKKRSCNLDEQQELVERDDEKQLMNVEPIHA DILLETYKRKIADEGRLFLAEFQSIPRVFSKFPIKEARKPFNQ KNRYVDILPYDYNRVELSEINGDAGSNYINASYIDGFKEPRK YIAAQGPRDETVD DFWRM IWEQKATVIVMVTRCEEGRNKN CAEYWPSMEEGTRAFGDVVVKINQHKRCPDYIIQKL NIVNK KEKATGREVTHIQFTSWPDHGVPEDPHLLKLRRRVNAFNSF FSGPIVVHCSAGVGRGTGT YIGIDAMLEGLEAENKVDVYGYV VKLRRQRCLMVQVEAQYILIHQALVEYNQFGETEVNLSLH PYLHNMKKRDPPEPSPLEAEFQRLPSYRSWRTQHIGNQEEN KSKNRNSNVIPYDYNRVPLKHELEMSKESEHDSDESSDDDS

SEQ ID NO.	Loại	Trình tự
		DSEEPSKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMIF QRKVKVIVMLTELKHGDQEICAQYWGEKGQTYGDIEVDLK DTDKSSTYTLRVFELRHSSKRKDSRTVYQYQYTNWSVEQLPA EPKELISMIQVVKQKLPQKNSSEGNKHHKSTPLLIHCRDGSQ QTGIFCALLNLLESAETEEVVDIFQVVKALRKARPGMVSTFE QYQFLYDVIASTYPAQNGQVKKNNHQEDKIEFDNEVDKVK QDANCVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSVNGP ASPALNQQS
6	Ký hiệu nhận diện HLA-DR P01903 của Uniprot, phiên bản số 1 từ 21 tháng 7 năm 1986:	MAISGVPVLGFFIIA VLMSAQESWAIKEEHVIIQAEFYLNPDQ SGEFMFDFDGDGEIFHVDMAKKETVWRLEEFGRFASFEAQGA LANIAVDKANLEIMTKRSNYTPITNVPPEVTVLTNSPVELREP NVLICFIDKFTPPVVNVTWLRNGKPVTTGVSETVFLPREDHL FRKFHYLPFLPSTEDVYDCRVEHWGLDEPLLKHWEFDAPSP LPETTENVVCALGLTVGLVGIIIGTIFIIGVRKSNAEAERRGPL
7	TGFbeta 1 của người Uniprot số: P36897 phiên bản số 1 từ 1 tháng 6 năm 1994	MEAAVAAPRPRLLLLVLAAAAAAAAAALLPGATALQCFCHL CTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRP FVCAPSSKTGSVTTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPVE LAAVIAGPVCFVCISLMLMVYICHNRTVIHHRVPNEEDPSLD RPFISEGTTLKDLIYDMTTSGSGSGLPLLQRTIARTIVLQESI GKGRFGEVWRGKWRGEEVAVKIFSSREERSWFREAIEYQTV MLRHENILGFIAADNKDNGTWTQLWLVS DYHEHGS LFDYL NRYTVTVEGMIKLALSTASGLAHLHMEIVGTQGKPAIAHRD LKSKNILVKKNGTCCIADLGLAVRHDSATDTIDIAPNHRVGT KRYMAPEVLDD SINMKHFESFKRADIYAMGLVFWEIARRCSI GGIHEDYQLPY YDLVPSDPSVEEMRKVVCEQKLRPNIPNRW QSCEALRVM AKIMREC WYANGAARLTALRIKKTLSQLSQQE GIKM
8	VEGFA của người Uniprot số: P15692	MNFLLSWVHWSLALLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHE VVKFMDVYQRSYCHPIETLV DIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMR CGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGGHIGEMSFLQ HNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSW SVYVGARCCCLMPWSLPGPHPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKC SCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

SEQ ID NO.	Loại	Trình tự
	phiên bản số 2 từ ngày 16 tháng 11 năm 2001	
9	Thụ thể yếu tố tăng trưởng alpha có nguồn gốc từ tiểu cầu của người Uniprot số: P16234 phiên bản số 1 từ 1 tháng 4 năm 1990	MGTSHPAFLVLGCLLTGLSLILCQLSLPSILPNENKVVQLNS SFSLRCFGESVSWQYPMSEESSDVEIRNEENNSGLFVTVLE VSSASAAHTGLYTCYYNHTQTEENELEGRHIYIYVDPDPAF VPLGMTDYL VIVEDDDSAIIPCRTTDPETPVT LHNSEGVVPAS YDSRQGFNGTFTVGPYICEATVKGKKFQTIPFN VYALKATSE LDLEMEALKTVYKSGETIVVTC AVFNNEVVDLQWTPGEV KGKGITMLEEIKVPSIKLVYTLTVPEATVKDSGDYEC AARQA TREVKEMKKVTISVHEKGFIEIKPTFSQLEAVNLHEVKHFVV EVRAYPPPRISWLKNNLTLIENLTEITTDVEKIQEIRYRSKLKL IRAKEEDSGHYTIVAQNEDAVKSYTFELLTQVPSSILDLVDD HHGSTGGQTVRCTAEGTPLPDIEWMICKDIKKCNNETSWTIL ANNVSNIITEIHSRDRSTVEGRVTF AKVEETIAVRCLAKNLLG AENRELKL VAPTLRSELTVAAAVLVLLVIVIISLIVLVVIWKQ KPRYEIRWRVIESISPDGHEYIYVDPMQLPYDSRWEFPRDGL VLGRVLGSGAFGKVVEGTAYGLSRSQPMKVAVKMLKPTA RSSEKQALMSELKIMTHLGPHLNIVNLLGACTKSGPIYIITEY CFYGDLVNYLHKNRDSFLSHHPEKPKKELDIFGLNPADESTR SYVILSFENNGDYMDMKQADTTQYVPMLERKEVSKYS DIQR SLYDRPAS YKKKSMLDSEVKNLLSDDNSEGLTLLDLLSFTYQ VARGMEFLASKNCVHRDLAARNVLLAQGKIVKICDFGLARD IMHDSNYVSKGSTFLPVKWMAPESIFDNL YTTLSDVWSYGIL LWEIFSLGGTPYPGMMVDSTFYNKIKSGYRMAKPDHATSEV YEIMVKCWNSEPEKRP SFYHLSEIVENLLPGQYKKS YEKIHL DFLKSDHPA VARMRVDS DNAYIGVTYKNEEDKLKD WEGGL DEQRLSADSGYIIPLDIDPVPEEEDLGKRN RHSSQTSEESAIE TGSSSSTFIKREDETIEDIDMMDDIGIDSSDLVEDSFL
10	Ang-1 của người Uniprot số: Q15389 phiên bản số 2 từ ngày	MTVFLSFAFLAAILTHIGCSNQRRSPENSGRRYNRIQHGCCA YTFILPEHDGNCRESTTDQYNTNALQRDAPHVEPDFSSQKLQ HLEHVMENYTQWLQKLENYIVENMKSEMAQIQQNAVQNH ATMLEIGTSLLSQTAEQTRKLT DVETQVLNQT SRLEIQLLENS LSTYKLEKQLLQQTNEILKIHEKNSLLEHKILEMEGKHKEEL DTLKEEKENLQGLVTRQTYIIQELEKQLNRATTNNSVLQKQQ LELMDTVHNLVNLCTKEGVLLKGGKREEEKPF RD CADVYQ AGFNKSGIYTIYINNMPEPKKVFCNMDVNGGGWTVIQHRED GSLDFQRGWKEYKMGFGNPSGEYWLGN EFIFAITSQRQYML

SEQ ID NO.	Loại	Trình tự
	1 tháng 1 năm 1998	RIELMDWEGNRAYSQYDRFHIGNEKQNYRLYLKGHTGTAG KQSSLILHGADFSTKDADNDNCMCKCALMLTGGWWFDAC GPSNLNGMFYTAGQNHGKLNGIKWHYFKGPSYSLRSTTMMI RPLDF
11	HGF của người Uniprot số: P14210 phiên bản số 2 từ ngày 1 tháng 8 năm 1991	MWVTKLLPALLLQHVLHLLLLPIAIPYAEGQRKRRTIHEF KKSATTLIKIDPALKIKTKKVNTADQCANRCTRNKGLPFTC KAFVFDKARKQCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDLYENKDYI RNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRG KDLQENYCRNPRGEEGGPWCFTSNPEVRYEVC DIPQCSEVE CMTCN GESYRGLMDHTESGKICQRWDHQT PHRHKFLPERYP DKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADN TMNDTDVPLETTECIQGQGEYRGTVNTIWN GIPCQRWDSQ YPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPDGSESPWCFTTDPNIR VG YCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCS MWDKNMEDLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPWC YTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVNLDHPVISCAKTKQLRV VNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVL TARQCFP SRDLKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPEGS DLVLMKLARPAVLDDFVSTIDLPNYGCTIPEKTSCSVYGGW YTGLINYDGLLRVAHL YIMGNEKCSQHHRGKVTLNESEICA GAEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHKMRMVLGVIVPGRGCAIP NRPGIFVRVAYYAKWIHKIILTYKVPQS
12	PDGFB của người Uniprot số: P01127 phiên bản số 1 từ 21 tháng 7 năm 1986	MNRCWALFLSLCCYLRLVSAEGDPIPEELYEMLSDHSIRSFD DLQRL LHGDPGEEDGAELDLNMTRSHSGGELESLARGRRSL GSLTIAEPAMIAECKTRTEVF EISRRLIDRTNANFLVWPPCVE VQRCSGCCNNRNVQCRPTQVQLRPVQVRKIEIVRKKPIFKKA TVTLEDHLACKCETVAAARPVTRSPGGSQEQR AKTPQTRVTI RTVRVRRPPKGKHKRKFHHTHDKTALKETLGA
13	IL-10 của người Uniprot số: P22301 phiên	MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNML RDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCA LSEMIQFYLEEVM PQAENQDPDIKAHVNSLGENLKT LRLRLR RCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFIN YIEAYMTMKIRN

SEQ ID NO.	Loại	Trình tự
	bản số 1 từ ngày 1 tháng 8 năm 1991	

Ví dụ thực hiện sáng chế

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

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

1.1 Rửa mẫu mô dây rốn:

- a. Lấy dao mổ ra khỏi vỏ bảo vệ.
- b. Giữ chặt dây rốn nhờ sử dụng kẹp và cắt dây rốn thành các mẫu dài 10 cm nhờ sử dụng dao mổ. Đặt dây rốn không được sử dụng trở lại cốc chứa mô ban đầu.
- c. Chuyển mẫu dây rốn dài 10 cm vào đĩa nuôi cấy 150 mm mới. Đĩa nuôi cấy 150mm có thể được sử dụng thay cho các cốc.
- d. Sử dụng nắp của đĩa nuôi cấy 150 mm làm vị trí đặt kẹp và dao mổ.
- e. Lấy 25ml Plasmalyte A (Baxter, Catalog # 2B2543Q) bằng xylanh 30 ml. Giữ xylanh ở góc 45° bằng một tay và phân phối Plasmalyte A trực tiếp lên trên mô dây rốn.
- f. Giữ đĩa nuôi cấy lệch góc nhẹ, loại bỏ Plasmalyte A bằng xylanh 30 ml và kim đầu tù.
- g. Thu gom Plasmalyte A được sử dụng trong túi vận chuyển 300 ml mà đóng vai trò làm vật chứa chất thải và đặt nó vào thùng rác nguy hại sinh học.
- h. Lặp lại quy trình rửa, nếu cần, sử dụng đĩa nuôi cấy mới cho mỗi lần rửa. Bảo đảm loại bỏ tất cả các cục máu trên bề mặt. Nhiều Plasmalyte A hơn có thể được sử dụng nếu cần để làm sạch mô.
- i. Đặt mô vào đĩa nuôi cấy mô được dán nhãn mới để tiếp tục cắt mô. Đặt 20 ml Plasmalyte A vào đĩa để mô không bị khô trong khi cắt nó.

- j. Cắt các dây rốn thành các đoạn khoảng 1-cm bằng nhau tổng cộng thành 10 đoạn.
- k. Lại cắt mỗi đoạn 1 cm thành các mẫu nhỏ hơn với kích thước xấp xỉ 0,3 cm x 0,3 cm to 0,5 cm x 0,5 cm mỗi đoạn.
- l. Lấy Plasmalyte A bất kỳ ở trong đĩa.
- m. Rút 25 ml Plasmalyte A bằng xylanh 30 ml túi Plasmalyte A ban đầu và phân phối trực tiếp lên các mẫu mô dây rốn.
- n. Giữ đĩa nuôi cấy lệch góc để thu gom tất cả Plasmalyte A được sử dụng để rửa mô ở một mặt và loại bỏ nó bằng xylanh và kim đầu tù.
- o. Lặp lại việc rửa một lần nữa. Không nên có cục máu nào còn lại.

LUU Ý: Nếu dây rốn không được đông lạnh ngay lập tức, mô dây rốn được giữ trong Plasmalyte A cho đến khi sẵn sàng để đông lạnh.

1.2 Bảo quản đông lạnh mô dây rốn:

- a. Chuẩn bị dung dịch bảo quản đông lạnh:
 - i. Chuẩn bị 50 ml dung dịch đông lạnh gồm có 60% Plasmalyte A, 30% albumin huyết thanh người 5%, và 10% dimetyl sulfoxit (DMSO).
 - ii. Dán nhãn túi chuyển 150 ml với “Dung dịch đông lạnh mô” và gắn bộ chuyển huyết thanh vào miệng túi nhờ sử dụng kỹ thuật vô trùng.
 - iii. Lấy 30 ml Plasmalyte A bằng xylanh 30 ml từ túi Plasmalyte A ban đầu và chuyển nó vào túi chuyển được gắn nhãn “dung dịch đông lạnh mô” với thời gian và ngày mà dung dịch được tạo.
 - iv. Lấy 15 ml albumin huyết thanh người 5% bằng xylanh 20 ml và chuyển nó vào túi chuyển được gắn nhãn.
 - v. Thêm 5 ml DMSO vào túi chuyển.
 - vi. Trộn kỹ và ghi chép việc trộn dung dịch đông lạnh
- b. Loại Plasmalyte A ra khỏi mô trước khi thêm dung dịch đông lạnh.
- c. Sử dụng xylanh 60 ml, rút tất cả 50 ml dung dịch đông lạnh vào xylanh, thêm xấp xỉ 30 ml dung dịch đông lạnh vào đĩa nuôi cấy tế bào 150 mm chứa mô dây rốn. Đặt kim đầu tù lên xylanh để giữ cho nó vô trùng.
- d. Xoáy cuộn đĩa nuôi cấy chứa mô và dung dịch đông lạnh mỗi phút trong 10 phút.

- e. Sử dụng kẹp, chọn 8 đoạn được chọn ngẫu nhiên và đặt chúng vào mỗi trong số bốn lọ đông lạnh 4 ml. Chọn 4 đoạn chọn ngẫu nhiên và đặt chúng vào một lọ đông lạnh 1,8 ml. Các đoạn này nên không có các cục máu.
- f. Nạp đầy mỗi lọ đông lạnh chứa mô dây rốn với dung dịch đông lạnh còn lại đến vạch nạp đầy 3,6 ml cho các ống 4 ml và đến vạch 1,8 ml cho lọ Nunc 1,8 ml.
- g. Gắn nhãn một chai Bactec Lytic/10 - Anaerobic/F và một chai Bactec Plus Aerobic/F bằng ID của mô.
- h. Lấy 20 ml dung dịch đông lạnh từ đĩa nuôi cấy bằng xylanh và kim đầu tù, sau đó lau sạch các lọ Bactec bằng gạc cồn, thay kim đầu tù bằng kim 18g và bơm vào các chai Bactec hiếu khí và kỵ khí bằng 10 ml dung dịch mỗi chai.
- i. Khởi động tủ đông có tốc độ được kiểm soát.
- j. Sau khi hoàn tất việc đông lạnh ở tốc độ được kiểm soát, đặt các đơn vị trong tủ đông nitơ lỏng được theo dõi nhiệt độ liên tục cho đến khi sử dụng tiếp.

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

2.1. Chuẩn bị môi trường để xử lý các MSC từ mô dây rốn:

- a. Để tạo 500 ml PTT6 (môi trường nuôi cấy/tăng trưởng) thêm các chất sau theo thứ tự được liệt kê:
 - i. DMEM, 250 ml
 - ii. M171 118 ml
 - iii. DMEM F12 118 ml
 - iv. FBS 12,5 ml (nồng độ cuối là 2,5%)
 - v. EGF 1 ml (nồng độ cuối là 10ng/ml)
 - vi. Insulin 0,175 ml (nồng độ cuối là 5µg/ml)

Các thể tích nêu trên của các thành phần i. đến vi đưa đến thể tích cuối là 499,675 ml môi trường nuôi cấy. Nếu không thêm các thành phần khác vào môi trường nuôi cấy, 0,325 ml còn lại (để đủ thể tích 500 ml) có thể, chẳng hạn, là thành phần bất kỳ trong số các thành phần i. đến iv, nghĩa là DMEM, M171, DMEM/F12 hoặc FBS. Theo cách khác, nồng độ của của dung dịch gốc EGF hoặc Insulin dĩ nhiên có thể được điều chỉnh sao cho tổng thể tích của môi trường nuôi cấy là 500 ml. Theo cách khác, dung dịch gốc của kháng sinh như Penixilin-Streptomycin-Amphotericin có thể được thêm vào để đưa đến thể tích cuối là 500

ml. Cũng có thể thêm vào môi trường nuôi cấy thể tích 0,325 ml của một hoặc nhiều trong số các chất bổ sung sau: adenin, hydrocortison, muối 3,3',5-Triiodo-L-thyronin natri (T3), nhờ đó đạt được thể tích cuối là 500 ml môi trường nuôi cấy.

vii. Gắn nhãn chai “PTT6” với ngày môi trường được chuẩn bị, tên viết tắt của người thực hiện, và cụm từ “hết hạn vào ngày” theo sau bởi ngày hết hạn. Ngày hết hạn là ngày hết hạn sớm nhất của bất kỳ một trong các thành phần hoặc 1 tháng kể từ ngày chuẩn bị, tùy ngày nào đến trước.

b. Để tạo môi trường rửa (dung dịch muối được đệm Hank (Hank's Buffered Salt Solution - HBSS) mà không có canxi hoặc magie và với 5% FBS), thêm 2,5 ml FBS vào 47,5 ml HBSS trong ống ly tâm 50 ml. Gắn nhãn ống “Rinse Media” với tên viết tắt của người thực hiện và ngày tạo môi trường.

c. Tất cả môi trường được thử nghiệm về độ vô trùng nhờ sử dụng chai Bactec Lytic/10 – Anaerobic/F (Becton Dickinson & Company) và chai Bactec Pluc + Aerobic/F (Becton Dickinson & Company). Bơm 20 ml môi trường được chuẩn bị vào mỗi chai.

2.2 Rã đông mô dây rốn để thu gom MSC:

a. Bắt đầu rã đông khi người thực hiện sẵn sàng để xử lý mẫu trong phòng sạch. Không rã đông nhiều hơn 1 lọ ở một thời điểm trừ khi các lọ bắt nguồn từ cùng người cho.

b. Lau chậu nước bằng chất diệt khuẩn, sau đó bằng 70% isopropanol và nạp vào 1 L nước vô khuẩn. Làm ấm chậu nước đến nhiệt độ 36-38°C.

c. Chuẩn bị 10 mL môi trường rửa gồm có 70% đến 90% PlasmaLyte A trong phòng sạch trong tủ an toàn sinh học. Lọc vô trùng dung dịch bằng bộ lọc xylanh 0,2-µm được gắn với xylanh 10 ml và giữ dung dịch được làm lạnh cho đến khi sử dụng.

d. Đặt nhãn xử lý trên ống hình nón 50 ml.

e. Xác nhận nhiệt độ của chậu nước là ở 36-38°C.

f. Lấy (các) lọ mô khối kho bảo quản nitơ lỏng và rã đông nhanh ở nhiệt độ chậu nước 37°C có nạp 1L nước vô khuẩn. Giữ lọ cho vật chứa đông lạnh Mr. Frosty Nalgene Cryo 1°C nổi cùng với lọ tại chỗ và có thể được sử dụng làm giá nổi khi rã đông các mẫu.

g. Lấy lọ ra khỏi chậu nước và xịt bằng dung dịch Isopropanol 70%. Thời gian tốt để lấy lọ ra khỏi chậu nước là khi có thể thấy đá lạnh nhỏ nổi trong lọ – cho thấy nhiệt độ bên trong lọ là nhỏ hơn 37°C.

h. Đặt lọ vào lỗ chuyển và cảnh báo kỹ thuật viên xử lý phòng sạch.

2.3 Chuẩn bị xử lý mô:

a. Việc xử lý mô dây rốn nên được thực hiện trong phòng sạch được theo dõi môi trường (environmentally monitored - EM):. Khi kết thúc mỗi ca, thực hiện việc làm sạch cả phòng và tủ cấy.

b. Chuẩn bị/làm sạch tủ an toàn sinh học.

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

d. Lắp ráp tất cả các đồ cần thiết trong tủ an toàn sinh học, kiểm tra từng thứ về hư hỏng bao gói và ngày hết hạn. Khi cầm nắm các xy lanh, các pipet huyết thanh, kẹp vô trùng, dao mổ, đĩa mô, và kim, bảo đảm không chạm vào bề mặt bất kỳ mà sẽ tiếp xúc với sản phẩm vô trùng. Chỉ có bên ngoài của ống xy lanh, ống, đầu pittông và/hoặc mũi chụp hoặc bao kim là có thể được cầm nắm an toàn. Loại bỏ dụng cụ nếu bề mặt đã bị chạm vào hoặc đã chạm vào bề mặt không vô trùng.

e. Ghi số lô và ngày hết hạn (nếu thích hợp) của tất cả các chất phản ứng và đồ cần được sử dụng.

f. Nhận các lọ được rửa đông bằng cách làm sạch lọ bằng khăn không có xơ vải được làm ẩm bằng cồn 70% trước khi chuyển vào tủ an toàn sinh học.

g. Sử dụng kim hút với xy lanh, rút chính xác chất lỏng từ lọ. Tránh hút mô.

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

i. Bổ sung phần phân ước 5 ml môi trường rửa vào các phân đoạn mô.

j. Lắc xoáy các thành phần trong 15-30 giây, sau đó loại bỏ môi trường rửa bằng pipet hoặc xy lanh với kim hút. Lặp lại quy trình rửa này hai lần.

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

2.4. Bắt đầu sự phát triển ra của MSC từ mô:

a. Gắn nhãn đáy đĩa 6 lỗ “Outgrowth 1” với số lô MSC hoặc ID mô dây rốn và ngày bắt đầu phát triển ra. Nếu đĩa nuôi cấy mô 60 mm được sử dụng, chia đĩa thành 4 góc phần tư bằng cách vẽ đường kẻ lên đáy đĩa.

- b. Sử dụng kẹp vô trùng dùng một lần, đặt một mô 3 x 3 mm đến 5 x 5 mm vào mỗi lỗ. Nếu sử dụng đĩa nuôi cấy mô 60 mm, đặt mô vào giữa mỗi góc phần tư để giữ mô cách xa nhau (mỗi mô cách nhau nhiều hơn 1 cm).
- c. Nạp vào mỗi đĩa 3 ml PTT6.
- d. Sử dụng kim hút được ghép với xylanh 30 ml, rút đủ môi trường để che phủ vừa đủ mô. Không làm nghiêng đĩa. Không chạm kim hút vào đáy đĩa.
- e. Sử dụng kính hiển vi quang học soi ngược, quan sát sự phát triển ra của tế bào mỗi ngày (24 ± 6 giờ). Hệ thống chụp ảnh nuôi cấy tế bào thời gian thực có thể được sử dụng thay cho kính hiển vi quang học.
- f. Thay đổi môi trường mỗi ngày. Bảo đảm cân bằng môi trường về nhiệt độ trong phòng trước khi sử dụng.
- i. Hút bỏ môi trường.
- ii. Thêm 3 ml PTT6.
- iii. Hút cho đến khi mô vừa đủ ngập trong môi trường.
- g. Khi quan sát thấy sự phát triển ra của tế bào từ mô, cấy chuyển mô sang đĩa 6 lỗ mới nhờ sử dụng cùng quy trình như 4.a đến 4.e ngoại trừ việc gắn nhãn lên đĩa là “Outgrowth 2”. Duy trì sự phát triển ra của tế bào ở đĩa “Outgrowth 1” bằng cách thêm 2ml PTT6 vào mỗi lỗ. Quan sát sự hợp lưu mỗi ngày. Thay môi trường mỗi 2-3 ngày (bảo đảm cân bằng môi trường về nhiệt độ trong phòng trước khi sử dụng).
- h. Khi quan sát thấy sự phát triển ra của tế bào trong đĩa “Outgrowth 2”, lặp lại bước 4.a đến 4.e ngoại trừ gắn nhãn lên đĩa là “Outgrowth 3.” Duy trì sự phát triển ra của tế bào ở đĩa “Outgrowth 2” bằng cách thêm 2ml PTT6 vào mỗi lỗ. Quan sát sự hợp lưu mỗi ngày. Thay môi trường mỗi 2-3 ngày (bảo đảm cân bằng môi trường về nhiệt độ trong phòng trước khi sử dụng).
- i. Khi quan sát thấy sự phát triển ra của tế bào ở đĩa “Outgrowth 3”, loại bỏ mô. Nếu các mô rất nhỏ và không có vẻ gây trở ngại cho sự tăng trưởng tế bào, loại bỏ mô khi cấy chuyển.
- j. Khi tế bào đạt mức hợp lưu 40-50%, quan sát tế bào mỗi ngày để ngăn chặn sự lan rộng quá mức.

k. Khi tế bào đạt mức hợp lưu 70-80%, cấy chuyển các tế bào. Không cho phép các tế bào lan rộng vượt quá mức hợp lưu 80%.

Với kích thước của mô cấy là khoảng 1-3mm, và việc cấy mô sang/nuôi cấy tế bào được thực hiện trong các đĩa nuôi cấy 175 mm vuông, số lượng trung bình của các tế bào gốc trung mô thu gom được từ mô cấy phổ biến là khoảng 4.000 - 6.000 tế bào/mô cấy. Do đó, khi các tế bào gốc trung mô đồng thời phát triển ra ngoài 48 mô cấy, có thể thu được khoảng 300.000 tế bào khi thu gom. 300.000 tế bào gốc trung mô thu gom từ mô cấy này sau đó có thể được sử dụng để cấy chuyển bằng cách cấy vào bình thót cổ nuôi cấy tế bào 175cm² với 300.000 tế bào đó như được mô tả trong ví dụ 2.5 sau (điều này được gọi là Cấy chuyển 1). Tế bào gốc trung mô thu được từ Cấy chuyển 1 sau đó được sử dụng cấy lại vào bình thót cổ 175cm² (Cấy chuyển 2) và lan rộng các tế bào như được mô tả trong ví dụ 2.5 sau. Các tế bào thu được từ cả Cấy chuyển 1 và Cấy chuyển 2 có thể được “tạo ngân hàng” bằng cách bảo quản đông lạnh, với các tế bào gốc trung mô thu được sau Cấy chuyển 2 được xem là tượng trưng cho ngân hàng tế bào đầu dòng (Master Cell Bank) mà sẽ dùng cho sự lan rộng sau này của các tế bào gốc trung mô, chẳng hạn, trong bình phản ứng sinh học như được giải thích bên dưới trong ví dụ 2.7.

2.5. Cấy chuyển MSC trong các đĩa nuôi cấy tế bào

- a. Thực hiện đếm phần tử sống trong khi làm việc trong tủ an toàn sinh học. Cân bằng tất cả các môi trường về nhiệt độ trong phòng trước khi sử dụng.
- b. Khi sự phát triển ra ngoài của tế bào đạt mức hợp lưu 70-80%, cấy chuyển các tế bào.
 - i. Loại bỏ PTT6 khỏi đĩa petri.
 - ii. Rửa bằng HBSS mà không có canxi hoặc magie.
 - iii. Thêm 0,2 ml TrypLE-EDTA 1X và xoáy trong 1-2 phút.
 - iv. Làm nghiêng đĩa 30-45° để cho phép các tế bào dịch chuyển xuống do dòng chảy trọng lực. Gõ nhẹ lên cạnh đĩa để đẩy nhanh sự tách ra.
 - v. Thêm 1ml PTT6. Hút lên xuống bằng pipet nhẹ nhàng, sau đó chuyển tế bào vào ống ly tâm 15 ml. Sử dụng đầu pipet sạch cho mỗi lỗ. Các tế bào từ tất cả 6 lỗ có thể được gom vào một ống 15ml.

vi. Ly tâm trong 10 phút ở 1200 vòng/phút.

vii. Loại bỏ phần nổi và huyền phù lại các tế bào với 5ml PTT6.

c. Cây chuyên MSC

i. Phân thành các phần nhỏ 50 μ l của mỗi dịch huyền phù tế bào và thử nghiệm về TNC và khả năng sống bằng thử nghiệm loại trừ bằng Xanh Trypan.

ii. Đếm tế bào nhờ sử dụng dụng cụ đếm hồng cầu. Kỳ vọng là đếm được 20-100 tế bào/ô vuông. Nếu số đếm cao hơn 100, pha loãng mẫu ban đầu theo tỷ lệ 1:5 và lặp lại phương pháp xanh Trypan nhờ sử dụng dụng cụ đếm hồng cầu.

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

1. Tế bào sống được/ml = số đếm tế bào sống được x hệ số pha loãng x 10^4

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

iv. Tính% khả năng sống được:

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

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

1. Thể tích “X” = Tổng tế bào sống được/ 10^6 tế bào/ml

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

3. “X” = $10^7/10^6$ tế bào/ml hoặc 10 ml, do đó, đưa tổng thể tích tế bào lên đến 10 ml bằng cách thêm 5 ml vào huyền phù tế bào (mà đang ở 5 ml).

vi. Nếu dịch huyền phù tế bào là nhỏ hơn 10^6 /ml, xác định thể tích cần thiết để cấy 2×10^6 tế bào cho mỗi đĩa petri 150 mm hoặc bình thót cổ 175 cm^2 .

1. Thể tích cho 2×10^6 tế bào = 2×10^6 tế bào ÷ tế bào sống được/ml

2. Chẳng hạn, nếu tế bào sống được/ml là 8×10^5 tế bào/ml, thì 2×10^6 tế bào ÷ 8×10^5 tế bào/ml hay 2,5 ml là cần thiết.

vii. Giữ 0,5 ml để phân tích gen đánh dấu MSC.

viii. Cấy 2×10^6 tế bào vào mỗi đĩa petri 150 mm hoặc bình thót cổ 175 cm^2 với 30 ml PTT6.

ix. Quan sát tế bào về sự gắn, sự hình thành khuẩn lạc, và hợp lưu mỗi ba ngày. Khi tế bào đạt mức hợp lưu 40-50%, quan sát tế bào mỗi một đến hai ngày để ngăn chặn sự lan rộng quá mức. Không cho phép các tế bào lan rộng vượt quá mức hợp

lưu 80%. Hệ thống giám sát nuôi cấy tế bào thời gian thực có thể được sử dụng thay cho kính hiển vi quang học.

x Thay môi trường mỗi 2-3 ngày.

2.6 Bảo quản đông lạnh các tế bào MSC

- a. Thực hiện đếm phần tử sống trong khi làm việc trong tủ an toàn sinh học.
- b. Khi tế bào đạt mức hợp lưu 70-80%, tách các tế bào nhờ sử dụng 2 ml TrypLE-EDTA 1X cho mỗi đĩa petri 150 mm hoặc bình thót cổ 175 cm².
- i. Loại bỏ PTT6 khỏi đĩa petri.
- ii. Rửa bằng 5ml HBSS hoặc PBS mà không có canxi hoặc magie.
- iii. Thêm 2 ml TrypLE-EDTA 1X và xoáy trong 1-2 phút.
- iv. Làm nghiêng đĩa 30-45° để cho phép các tế bào dịch chuyển xuống do dòng chảy trọng lực. Gõ nhẹ lên cạnh đĩa để giúp đẩy nhanh sự tách ra.
- v. Thêm 10 ml PTT6 để bất hoạt TrypLE. Trộn kỹ để phân ly các cục tế bào.
- vi. Chuyển tế bào vào ống ly tâm 15 ml nhờ sử dụng pipet Pasteur.
- vii. Ly tâm trong 10 phút ở 1200 vòng/phút.
- viii. Hút môi trường và huyền phù lại với 10 ml PTT6.
- ix. Phân thành các phần nhỏ 50 µl và xác định tổng số lượng tế bào sống được và% khả năng sống được như trên. Việc đếm tế bào sẽ cần được thực hiện trong vòng 15 phút vì các tế bào có thể bắt đầu kết cụm.
- c. Chuẩn bị tế bào để bảo quản đông lạnh
- i. Chuẩn bị môi trường huyền phù tế bào và môi trường bảo quản đông lạnh và đông lạnh các tế bào

2.7. Cấy chuyên (lan rộng) MSC trong bình phản ứng sinh học Quantum (Terumo BTC, Inc.)

Cũng có thể sử dụng bình phản ứng sinh học Quantum để lan rộng MSC. Số lượng tế bào bắt đầu để lan rộng trong bình phản ứng sinh học Quantum nên nằm trong khoảng giữa 20 đến 30 triệu tế bào mỗi lượt chạy. Hiệu suất phổ biến trên mỗi lượt chạy là 300 đến 700 triệu MSC khi thu gom. Bình phản ứng sinh học được vận hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các tế bào gốc trung mô thu được theo cách đó thường được bảo quản đông lạnh (xem bên dưới) và dùng làm ngân hàng tế bào làm việc (Working Cell Bank).

Vật liệu/Chất phản ứng:

1. Bộ lan rộng Quantum
2. Túi chất thải Quantum
3. Túi môi trường Quantum
4. Túi nạp Quantum
5. PTT6
6. PBS
7. Fibronectin
8. TrypLE
9. Xylanh 3ml
10. Bảng thử Glucoza
11. Bảng thử Lactat
12. Đĩa nuôi cấy tế bào 60ml hoặc tương đương
13. Hỗn hợp khí 5% CO₂ y tế
14. Combi-tip 50ml

Thiết bị:

1. Tủ an toàn sinh học
2. Dụng cụ đo Glucoza (Bayer Healthcare/Ascensia Contour Blood Glucoza Meter)
3. Lactate Plus (Nova Biomedical)
4. Bơm nhu động có đầu
5. Máy ly tâm, Eppendorf 5810
6. Bộ nối ống vô trùng
7. Pipet lặp lại M4
8. Bộ dán kín RF

Quy trình:

1. Chuẩn bị bình phản ứng sinh học Quantum
 - a) Môi bình phản ứng sinh học Quantum
 - b) Phủ bình phản ứng sinh học:
 - 1) Chuẩn bị dung dịch fibronectin trong tủ an toàn sinh học.

- 1) Để fibronectin khô lạnh thích nghi với nhiệt độ phòng (≥ 15 phút ở nhiệt độ phòng)
- 2) Thêm 5ml nước cất vô trùng; không lắc hay khuấy
- 3) Để fibronectin đi vào vào dung dịch trong 30 phút.
- 4) Sử dụng xylanh 10 ml gắn với kim 18g, chuyển dung dịch fibronectin vào túi nạp tế bào chứa 95ml PBS.
- 2) Gắn túi vào đường “chất phản ứng”
- 3) Kiểm tra các bóng khí (bóng khí có thể được loại bỏ bằng cách sử dụng “Remove IC Air” hoặc “Remove EC Air” và sử dụng “Wash” làm nguồn nạp vào.
- 4) Mở hoặc thiết lập chương trình để phủ bình phản ứng sinh học (Fig.1. Bước 3-5).
- 5) Chạy chương trình
- 6) Trong khi chương trình đang chạy để phủ bình phản ứng sinh học, chuẩn bị túi môi trường với 4L môi trường PTT6.
- 7) Gắn túi môi trường vào đường Môi trường IC nhờ sử dụng bộ nối ống vô trùng.
- 8) Khi hoàn thành các bước phủ bình phản ứng sinh học, tách túi nạp tế bào được sử dụng cho dung dịch fibronectin nhờ sử dụng bộ dán kín RF.
- c) Rửa fibronectin thừa
- d) Điều hòa bình phản ứng sinh học bằng môi trường
2. Nuôi cấy các tế bào trong bình phản ứng sinh học Quantum
 - a) Tải và gắn các tế bào với dịch huyền phù Uniform:
 - b) Nuôi và nuôi cấy các tế bào
 - 1) Chọn tốc độ dòng môi trường để nuôi các tế bào.
 - 2) Lấy mẫu cho thử nghiệm lactat và glucoza mỗi ngày.
 - 3) Điều chỉnh tốc độ dòng của môi trường khi mức lactat tăng. Nồng độ lactat tối đa cho phép thực tế sẽ được xác định bằng mẻ nuôi cấy trong bình thót cổ mà tế bào xuất phát từ đó. Xác định nếu môi trường PTT6 đầy đủ có ở trong túi môi trường. Nếu cần, thay thế túi môi trường PTT6 bằng túi môi trường PTT6 mới.

- 4) Khi tốc độ dòng đạt giá trị mong muốn, đo mức lactat mỗi 8-12 giờ. Nếu mức lactat không giảm hoặc nếu mức lactat tiếp tục tăng, thu gom các tế bào.
3. Thu gom các tế bào từ bình phản ứng sinh học Quantum
 - a) Khi nồng độ lactat không giảm, thu gom các tế bào sau khi lấy mẫu đo lactat và glucoza lần cuối.
 - b) Thu gom các tế bào:
 - 1) Gắn túi nạp tế bào được làm đầy bằng 100ml TrypLE vào đường “Chất phản ứng” nhờ sử dụng bộ nối ống vô trùng.
 - 2) Xác nhận có đủ PBS trong túi PBS. Nếu không, gắn túi mới có ít nhất 1,7 lít PBS vào đường “Rửa” nhờ sử dụng bộ nối ống vô trùng.
 - 3) Chạy chương trình thu gom.
4. Bảo quản đông lạnh các tế bào
 - 1) Khi các tế bào được thu gom, chuyển các tế bào vào ống ly tâm 50ml để làm vón các tế bào.
 - 2) Huyền phù lại nhờ sử dụng 25ml dung dịch huyền phù tế bào lạnh. Đếm các tế bào nhờ sử dụng bộ đếm Sysmex hoặc Biorad Cell. Gắn báo cáo đếm tế bào vào bản ghi theo lô xử lý Quantum.
 - 3) Điều chỉnh nồng độ tế bào đến $2 \times 10^7/\text{ml}$
 - 4) Thêm thể tích dung dịch bảo quản đông lạnh và trộn kỹ (không lắc hoặc lắc xoáy)
 - 5) Sử dụng pipet lắp lại, thêm 1ml dịch huyền phù tế bào trong chất bảo quản đông lạnh vào mỗi lọ 1,8ml. Bảo quản đông lạnh nhờ sử dụng chương trình CRF như được mô tả trong chất bảo quản đông lạnh SOP D6.100 CB nhờ sử dụng tủ đông có điều chỉnh tốc độ.
 - 6) Lưu trữ các lọ trong không gian bảo quản bằng nitơ lỏng được chỉ định.
 - 7) Gắn báo cáo chạy CRF vào bản ghi theo lô xử lý MSC P3-Quantum tương ứng.

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

Các thử nghiệm trắc lưu tế bào (flow cytometry) được tiến hành để phân tích các tế bào gốc trung mô được phân lập từ dây rốn về sự biểu hiện của các gen đánh dấu tế bào gốc trung mô là CD73, CD90 và CD105.

Đối với các thử nghiệm này, tế bào gốc trung mô được phân lập từ mô dây rốn bằng cách nuôi cấy mô dây rốn trong ba môi trường nuôi cấy khác nhau, theo sau bởi việc cấy chuyển của các tế bào gốc trung mô trong môi trường tương ứng như nêu trong ví dụ 2.

Ba môi trường nuôi cấy sau được sử dụng trong các thử nghiệm này: a) 90% (thể tích/thể tích) DMEM được bổ sung 10% FBS (thể tích/thể tích), b) môi trường nuôi cấy PTT-4 mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ US 2008/0248005 và đơn sáng chế quốc tế đồng dạng WO2007/046775 mà gồm có 90% (thể tích/thể tích) CMRL1066, và 10% (thể tích/thể tích) FBS (xem đoạn [0183] của WO2007/046775 và c) môi trường nuôi cấy theo sáng chế PTT-6, thành phần của nó được mô tả ở đây. Trong phân tích trắc lưu tế bào này, hai mẫu khác nhau của quần thể tế bào gốc trung mô của màng lót dây rốn (cord lining mesenchymal stem cell - CLMC) được phân tích đối với mỗi trong số ba môi trường nuôi cấy được sử dụng.

Quy trình sau được sử dụng để phân tích trắc lưu tế bào (flow cytometry).

Vật liệu và phương pháp

Tên dụng cụ	Tên công ty	Số seri
BD FACS CANDO	BD	V07300367
Kính hiển vi soi ngược, CKX41SF	Olympus	4K40846
Máy ly tâm, Micro spin Tabletop	Biosan	010213:-1201-0003

Danh mục chất phản ứng	Tên công ty	Số CatLog
Trypsin 10X	Biowest	X0930-100
10 X PBS	Lonza	17-517Q
DMEM	Lonza	12-604F
Huyết thanh bào thai bò	GE healthcare	A11-151

Danh mục kháng thể	Tên công ty	Số CatLog
CD73 của người được tinh sạch AD2 0,1mg	BD	550256
CD90 của người được tinh sạch 5E10 1mL	BD	550402
CD105 của người được tinh sạch 266 0,1mg	BD	555690
IgG Alexa Fluor 647 của dê kháng chuột (H+L) *2 mg/mL*	BD	A21235

Tên các chất phản ứng	Thành phần
PBS 1X (1L)	100ml dung dịch PBS 10X + 900ml H2O cất vô trùng
PBA 1X (50ml)	49,5ml PBS 1X + 0,5 ml FBS

Quy trình

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

1. Các mẫu mô cấy được ủ trong đĩa nuôi cấy tế bào và ngâm trong môi trường tương ứng, sau đó giữ trong tủ nuôi cấy CO₂ ở 37°C như được giải thích trên ví dụ 2.
2. Môi trường được thay mỗi 3 ngày.

3. Sự phát triển ra của tế bào từ các mô cấy nuôi cấy mô được theo dõi dưới kính hiển vi quang học.
4. Ở mức hợp lưu khoảng 70%, tế bào được tách ra khỏi đĩa bằng cách trypsin hóa (0,0125% trypsin/0,05% EDTA) và được sử dụng cho các thử nghiệm trắc lưu tế bào.

b) Trypsin hóa tế bào cho các thử nghiệm

1. Loại bỏ môi trường ra khỏi đĩa nuôi cấy tế bào
2. Rửa nhẹ nhàng bằng dung dịch PBS 1X để loại bỏ vết FBS vì FBS sẽ gây trở ngại hoạt động enzym của trypsin.
3. Thêm trypsin 1X vào đĩa nuôi cấy tế bào và ủ trong 3-5 phút ở 37 °C.
4. Quan sát tế bào dưới kính hiển vi để bảo đảm rằng chúng bị phá vỡ. Trung hòa trypsin bằng cách bổ sung môi trường hoàn chỉnh chứa FBS (DMEM với 10% FBS).
5. Sử dụng pipet để phá vỡ các cụm tế bào bằng cách hút nhả tế bào bằng pipet trong môi trường lên thành đĩa. Thu gom và chuyển dịch huyền phù tế bào vào các ống ly tâm 50 ml.
6. Thêm PBS 1X vô trùng vào đĩa và tráng rửa nó, thu gom dịch huyền phù tế bào vào cùng ống ly tâm.
7. Ly tâm ở 1800 vòng trên phút trong 10 phút.
8. Loại bỏ phần nổi và huyền phù lại phần vón tế bào bằng môi trường PBA.

c) Đếm tế bào

1. Bảo đảm rằng bộ đếm huyết cầu và kính đậy của nó sạch và khô, tốt hơn là bằng cách rửa chúng bằng cồn 70% và để chúng khô trước khi lau bằng giấy lau Kim (giấy không xơ).
2. Phân nhỏ lượng nhỏ tế bào trong dịch huyền phù vào ống vi ly tâm và lấy ra khỏi tủ cấy BSC.

3. Nhuộm tế bào trong dịch huyền phù bằng cùng thể tích Xanh Trypan, ví dụ thêm 500 μ l Xanh Trypan vào 500 μ l dịch huyền phù (hệ số pha loãng = 2X, tạo ra dung dịch Xanh Trypan 0,2%).
4. Tránh cho tiếp xúc tế bào với Xanh Trypan lâu hơn 30 phút vì Xanh Trypan độc hại và sẽ làm tăng số tế bào không sống được, dẫn đến việc đếm tế bào sai.
5. Thêm 20 μ l dịch hỗn hợp huyền phù tế bào vào mỗi buồng của bộ đếm huyết cầu và xem dưới kính hiển vi quang học.
 - a. Đếm số lượng các tế bào sống được (tế bào sáng màu; tế bào không sống được sẽ hấp thụ Xanh Trypan dễ dàng và do đó tối màu) ở mỗi góc phần tư của bộ đếm huyết cầu cho tổng cộng 8 góc phần tư ở buồng trên và buồng dưới.
Tổng số đếm tế bào được thể hiện dưới dạng (số lượng tế bào trung bình/góc phần tư) $\times 10^4$ tế bào/ml.

d) Nhuộm tế bào

i. Chuẩn bị trước khi nhuộm tế bào

- Dịch huyền phù tế bào được phân nhỏ vào 3 ống (CD73, CD90, CD105) thành các lần lặp và 2 hai ống (đối chứng âm), mỗi ống chứa 50.000 tế bào.

ii. Nhuộm bằng kháng thể (Ab) sơ cấp

- Thêm 1 μ l [0,5mg/ml Ab] kháng thể sơ cấp vào 100ul dịch huyền phù tế bào. Ủ ở 4°C trong 45 phút.
- Thêm cho đến 1ml bằng PBA.
- Ly tâm ở 8000 vòng trên phút ở 4°C trong 5 phút.
- Loại bỏ phần nổi
- Thêm 1ml PBA và huyền phù lại viên vón
- Ly tâm ở 8000 vòng trên phút ở 4°C trong 5 phút.
- Loại bỏ phần nổi
- Huyền phù lại trong 100ul PBA.

iii. Nhuộm bằng kháng thể thứ cấp – trong tối

- Thêm 1ul [0,5mg/ml kháng thể] kháng thể thứ cấp vào 100ul dịch huyền phù tế bào. Ủ ở 4°C trong 30 phút.
- Thêm cho đến 1ml bằng PBA.
- Ly tâm ở 8000 vòng trên phút ở 4°C trong 5 phút.
- Loại bỏ phần nổi
- Thêm 1ml PBA và huyền phù lại viên vón
- Ly tâm ở 8000 vòng trên phút ở 4°C trong 5 phút.
- Loại bỏ phần nổi
- Huyền phù lại trong 200-300ul PBA để phân tích trắc lưu tế bào
- Chuyển tế bào vào ống FACS để đọc trên máy trắc lưu tế bào BD FACS CANDO.

Các kết quả phân tích trắc lưu tế bào được thể hiện trên **Fig.6a** đến **Fig.6c**. **Fig.6a** thể hiện phần trăm của các tế bào gốc trung mô màng lót dây rốn được phân lập biểu hiện các gen đánh dấu tế bào gốc CD73, CD90 và CD105 sau khi phân lập từ mô dây rốn và nuôi cấy trong DMEM/10% FBS, **Fig.6b** thể hiện phần trăm của các tế bào gốc trung mô màng lót dây rốn được phân lập biểu hiện các gen đánh dấu tế bào gốc CD73, CD90 và CD105 sau khi phân lập từ mô dây rốn và nuôi cấy trong PTT-4 và **Fig.6c** thể hiện phần trăm của các tế bào gốc trung mô màng lót dây rốn được phân lập biểu hiện các gen đánh dấu tế bào gốc CD73, CD90 và CD105 sau khi phân lập từ mô dây rốn và nuôi cấy trong PTT-6. Như có thể thấy từ **Fig.6a**, quần thể tế bào được phân lập nhờ sử dụng DMEM/10% FBS làm môi trường nuôi cấy có khoảng 75% tế bào CD73+, 78% tế bào CD90+ và 80% tế bào CD105+ (trung bình của hai thử nghiệm), trong khi sau khi phân lập/nuôi cấy mô dây rốn nhờ sử dụng môi trường nuôi cấy PTT-4 (xem **Fig.6b**) số lượng tế bào gốc trung mô dương tính với CD73, dương tính với CD90 và dương tính với CD105 là khoảng 87% (tế bào CD73+), 93% /tế bào CD90+) và 86% (tế bào CD105+), trung bình của hai thử nghiệm. Độ tinh sạch của quần thể tế bào gốc trung mô thu được bằng cách nuôi cấy trong môi trường PTT-6 theo sáng chế là ít nhất 99,0% đối với ba gen đánh dấu (CD73, CD90, CD105), nghĩa là độ tinh sạch của quần thể tế bào này cao hơn đáng kể so với nuôi cấy nhờ sử dụng môi trường

PTT-4 hoặc DMEM/10% FBS. Ngoài ra và thậm chí quan trọng hơn, quần thể tế bào gốc trung mô thu được bằng cách nuôi cấy trong PTT-6 là gần như tinh sạch 100% và là quần thể tế bào gốc xác định. Điều này khiến cho quần thể tế bào gốc theo sáng chế trở thành ứng viên lý tưởng cho các liệu pháp dựa trên tế bào gốc. Do đó, quần thể các tế bào gốc trung mô màng lót dây rốn này có thể trở thành chuẩn vàng cho các phương pháp điều trị sử dụng tế bào gốc.

Các phát hiện thể hiện trên Fig.6 còn được minh chứng thêm bởi các kết quả của phân tích trắc lưu tế bào được thể hiện trên **Fig.7a** và **Fig.7b**. **Fig.7a** thể hiện phần trăm của các tế bào gốc trung mô màng lót dây rốn được phân lập (tế bào gốc trung mô của màng ối của dây rốn) mà biểu hiện các gen đánh dấu tế bào gốc CD73, CD90 và CD105 và không có sự biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR sau khi phân lập từ mô dây rốn và nuôi cấy trong môi trường PTT-6. Như được thể hiện trên **Fig.7a**, quần thể tế bào gốc trung mô chứa 97,5% tế bào sống được mà 100% các tế bào này biểu hiện mỗi trong số CD73, CD90 và CD105 (xem các hàng “CD73+CD90+” và “CD73+CD105+”) trong khi 99,2% quần thể tế bào gốc không biểu hiện CD45 và 100% quần thể tế bào gốc không biểu hiện CD34 và HLA-DR (xem các hàng “CD34-CD45-” và “CD34-HLA-DR-”). Do đó, các quần thể tế bào gốc trung mô thu được bằng cách nuôi cấy trong môi trường PTT-6 là gần như 100% tinh sạch và là quần thể tế bào gốc xác định mà đáp ứng các tiêu chuẩn mà tế bào gốc trung mô cần thỏa mãn để được sử dụng cho liệu pháp tế bào (95% hoặc nhiều hơn của quần thể tế bào gốc biểu hiện CD73, CD90 và CD105, trong khi 98% hoặc nhiều hơn của quần thể tế bào gốc không có sự biểu hiện CD34, CD45 và HLA-DR, xem Sensebe et al.”Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review”, ở trên). Lưu ý ở đây rằng tế bào gốc trung mô của màng ối theo sáng chế bám dính vào nhựa ở điều kiện nuôi cấy chuẩn và biệt hóa *in vitro* thành nguyên bào xương, tế bào tạo mỡ và nguyên bào sụn, xem các patent Mỹ 9,085,755, patent Mỹ 8,287,854 hoặc WO2007/046775 và do đó đáp ứng tiêu chuẩn được chấp nhận chung cho việc sử dụng tế bào gốc trung mô trong liệu pháp tế bào.

Fig.7b thể hiện phần trăm của các tế bào gốc trung mô tủy xương được phân lập mà biểu hiện CD73, CD90 và CD105 và không có sự biểu hiện CD34,

CD45 và HLA-DR. Như được thể hiện trên **Fig.7b**, quần thể tế bào gốc trung mô tủy xương chứa 94,3% tế bào sống được mà 100% các tế bào này biểu hiện mỗi trong số CD73, CD90 và CD105 (xem các hàng “CD73+CD90+” và “CD73+CD105+”) trong khi chỉ 62,8% của quần thể tế bào gốc tủy xương không có sự biểu hiện CD45 và 99,9% quần thể tế bào gốc không có sự biểu hiện CD34 và HLA-DR (xem các hàng “CD34-CD45-” và “CD34-HLA-DR-”). Do đó, tế bào gốc trung mô tủy xương mà được xem là chuẩn vàng của các tế bào gốc trung mô là ít đồng nhất/tinh sạch hơn nhiều về gen đánh dấu tế bào gốc so với các quần thể tế bào gốc trung mô (của màng ối của dây rốn) theo sáng chế. Phát hiện này còn thể hiện rằng quần thể tế bào gốc theo sáng chế có thể là ứng viên lý tưởng cho các liệu pháp sử dụng tế bào gốc và có thể trở thành chuẩn vàng cho các phương pháp chữa bệnh sử dụng tế bào gốc.

4. Các thử nghiệm cho thấy rằng quần thể tế bào gốc trung mô theo sáng chế có thể được vận chuyển/bảo quản trong HypoThermosol™:

Để phân tích sự khỏe mạnh và khả năng sống của các tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây trong các chất mang bảo quản hoặc vận chuyển khác nhau, hai chất mang khác nhau được so sánh với nhau. Cụ thể, chất mang HypoThermosol™-FRS được so sánh với chất mang PlasmaLyte-A. Cả hai đều có bán trên thị trường. HypoThermosol™ -FRS, bảng thông tin sản phẩm của nó được thể hiện trên Fig.30 và thành phần của nó được mô tả ở nơi khác trong bản mô tả này. Mỗi 100 mL PlasmaLyte chứa 526 mg Natri clorua, USP (NaCl); 502 mg Natri Gluconat ($C_6H_{11}NaO_7$); 368 mg Natri Axetat Trihydrat, USP ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$); 37 mg Kali clorua, USP (KCl); và 30 mg Magie clorua, USP ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$). PlasmaLyte không chứa các chất kháng khuẩn. pH của PlasmaLyte được điều chỉnh bằng natri hydroxit đến 7,4 (6,5 đến 8,0).

Thiết lập thử nghiệm để so sánh được thể hiện trên **Fig.8**. Đầu tiên, quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây được phát triển ra trong các bình thót cổ nuôi cấy tế bào. Số lượng tế bào gốc trung mô sống được đếm và sau đó 2 triệu tế bào/lọ được bảo quản trong các khoảng thời gian khác nhau trong PlasmaLyte-A hoặc Hypothermosol™-FRS. Sau khi bảo quản, các tế bào được đếm trong mẫu $\leq 50\mu\text{l}$ hàng ngày trong ngày 1-5 (rút tổng thể tích lỏng 250 μl) và được kiểm tra về

khả năng sống bằng cách nhuộm các tế bào với xanh Trypan. Hơn nữa, vào ngày 1, 3 và 5, lấy mẫu $\leq 80\mu\text{l}$ và phân tích. Ngoài ra, thu phần nổi và làm đông lạnh. Sau đó PDGF-AA, PDGF-BB, VEGF, IL-10, Ang-1, HGF và TGF β 1 được đo bằng hệ thống FLEXMAP 3D.

Fig.9 tóm tắt dữ liệu về khả năng sống. Như có thể thấy từ biểu đồ bên tay trái, 73% của tổng số tế bào (khoảng 95%) mà được bắt đầu bảo quản là vẫn còn sống vào 7 ngày sau khi bảo quản trong HypoThermosol™. Trái lại sau 7 ngày bảo quản trong PlasmaLyte-A chỉ 42% của tổng số tế bào (khoảng 94%) mà được bắt đầu bảo quản là vẫn còn sống. Tất cả việc đếm được dựa trên các bản đọc được thực hiện hai lần mà nằm trong 10% của nhau (theo SOP CR D2.600.1). Trong quá trình đếm, các tế bào được bảo quản trong HypoThermosol™ nhỏ hơn một cách đáng chú ý với các cạnh nhẵn và được định rõ. Trái lại, các tế bào trong Plasmalyte-A cho thấy có khoảng kích thước khác nhau. HypoThermosol™ hỗ trợ một cách đáng chú ý sự tích hợp màng và sự sống sót có thể đoán chừng trong thời gian một tuần (6 ngày). Các kết quả tương tự cũng được thể hiện trên biểu đồ bên phía tay phải.

Fig.10 thể hiện các kết quả thu được khi đo đường kính tế bào của các tế bào. Quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây khi được giữ trong HypoThermosol™ có khoảng đường kính hẹp hơn khi so với tế bào được giữ trong PlasmaLyteA. Việc so sánh được thực hiện sau 3 ngày bảo quản.

Fig.11 thể hiện nồng độ TGF β 1 trong phần nổi từ quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây được bảo quản trong HypoThermosol™ hoặc PlasmaLyte-A sau 48 giờ bảo quản. Như có thể thấy từ biểu đồ bên phía tay phải, tế bào tiết nhiều TGF β 1 khi được bảo quản trong HypoThermosol™ và khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A. Nhìn chung, theo thời gian lượng TGF β 1 được tiết giảm (biểu đồ bên tay phải).

Các Fig. 12 và 13 thể hiện các thử nghiệm đối chứng. Ở đây, nồng độ PDGF-BB và IL-10 được đo trong phần nổi từ quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây được bảo quản trong HypoThermosol™ hoặc PlasmaLyte-A trong 48 giờ. Vì PDGF-BB hoặc IL-10 không được tiết ra một cách bình thường

bởi quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây, không phát hiện có PDGF-BB hoặc IL-10 trong mẫu bất kỳ.

Fig.14 thể hiện nồng độ VEGF trong phần nổi từ quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây được bảo quản trong HypoThermosol™ hoặc PlasmaLyte-A trong 48 giờ. Như có thể thấy từ biểu đồ bên phía tay phải, tế bào tiết nhiều VEGF khi được bảo quản trong HypoThermosol™ hoặc PlasmaLyte-A vào ngày 0. Vào ngày 1 và 5, tế bào tiết nhiều VEGF khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A. Lưu ý, khi được bảo quản trong 3 ngày, tế bào tiết nhiều VEGF khi được bảo quản trong HypoThermosol™ hơn khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A. Do đó, HypoThermosol™ làm tốt hơn PlasmaLyte-A sau ngày 3 bảo quản. VEGF phát hiện được càng nhiều, chủng cấy càng khỏe mạnh. Do đó, nhờ tiết nhiều VEGF hơn sau 3 ngày bảo quản trong HypoThermosol™ so với khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A, tế bào khỏe mạnh hơn trong HypoThermosol™ so với trong PlasmaLyte-A. Từ 5 ngày bảo quản trở đi, PlasmaLyte có vẻ trở thành chất mang tốt hơn, vì ở thời điểm 5 ngày, tế bào được bảo quản trong PlasmaLyte-A tiết nhiều VEGF hơn. Nhìn chung, theo thời gian lượng VEGF được tiết giảm (biểu đồ bên tay phải).

Fig.15 thể hiện nồng độ PDGF-AA trong phần nổi từ quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây được bảo quản trong HypoThermosol™ hoặc PlasmaLyte-A trong 48 giờ. Như có thể thấy từ biểu đồ bên phía tay phải, tế bào tiết nhiều PDGF-AA khi được bảo quản trong HypoThermosol™ hơn khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A vào ngày 0. Vào ngày 1 và 5, tế bào tiết nhiều PDGF-AA khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A. Lưu ý, khi được bảo quản trong 3 ngày, tế bào tiết nhiều PDGF-AA khi được bảo quản trong HypoThermosol™ hơn khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A. Do đó, tế bào được bảo quản trong HypoThermosol™ khỏe mạnh hơn tế bào được bảo quản trong PlasmaLyte-A sau 3 ngày bảo quản. Từ 5 ngày bảo quản trở đi, PlasmaLyte có vẻ trở thành chất mang tốt, vì ở thời điểm 5 ngày, tế bào được bảo quản trong PlasmaLyte-A tiết nhiều PDGF-AA hơn. Nhìn chung, theo thời gian lượng PDGF-AA được tiết giảm (biểu đồ bên tay phải).

Fig.16 thể hiện nồng độ Ang-1 trong phần nổi từ quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây được bảo quản trong HypoThermosol™ hoặc PlasmaLyte-A trong 48 giờ. Như có thể thấy từ biểu đồ bên phía tay phải, tế bào tiết nhiều Ang-1 khi được bảo quản trong HypoThermosol™ hoặc PlasmaLyte-A vào ngày 0 và 3. Vào ngày 5, tế bào tiết nhiều Ang-1 khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A. Lưu ý, khi được bảo quản trong 1 ngày, tế bào tiết nhiều Ang-1 khi được bảo quản trong HypoThermosol™ hơn khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A. Do đó, tế bào được bảo quản trong HypoThermosol™ có vẻ khỏe mạnh hơn khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A trong ít nhất 48 giờ cho đến 3 ngày bảo quản. Từ 5 ngày bảo quản trở đi, PlasmaLyte có vẻ trở thành chất mang tốt hơn, vì ở thời điểm này, tế bào được bảo quản trong PlasmaLyte-A tiết nhiều Ang-1 hơn. Nhìn chung, theo thời gian lượng Ang-1 được tiết giảm (biểu đồ bên tay phải).

Fig.17 thể hiện nồng độ HGF trong phần nổi từ quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây được bảo quản trong HypoThermosol™ hoặc PlasmaLyte-A sau 48 giờ bảo quản. Như có thể thấy từ biểu đồ bên phía tay phải, tế bào tiết nhiều HGF khi được bảo quản trong HypoThermosol™ hơn khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A vào ngày 0. Vào ngày 3 và 5, tế bào tiết nhiều HGF khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A. Lưu ý, khi được bảo quản trong 1 ngày, tế bào tiết nhiều HGF khi được bảo quản trong HypoThermosol™ hơn khi được bảo quản trong PlasmaLyte-A. Do đó, tế bào được bảo quản trong HypoThermosol™ có vẻ khỏe mạnh hơn tế bào được bảo quản trong PlasmaLyte-A giữa ít nhất 1 ngày (48 giờ) cho đến 3 ngày bảo quản. Từ 3 ngày trở đi, PlasmaLyte-A có vẻ trở thành chất mang tốt hơn, vì ở các thời điểm 3 và 5 ngày, tế bào được bảo quản trong PlasmaLyte-A tiết nhiều HGF hơn. Nhìn chung, theo thời gian lượng HGF được tiết giảm (biểu đồ bên tay phải).

Tóm lại, từ dữ liệu trên có thể kết luận rằng việc bảo quản quần thể tế bào gốc trung mô theo sáng chế trong HypoThermosol™ làm tốt hơn việc bảo quản trong PlasmaLyte-A đặc biệt là đối với 3 ngày bảo quản đầu.

5. Các thử nghiệm cho thấy quần thể tế bào gốc trung mô theo sáng chế có đặc tính làm lành vết thương bởi việc điều trị khu trú cho lợn:

Các nghiên cứu tiền lâm sàng đã được thực hiện nhờ sử dụng các con lợn Yorkshire-Landrace cái 10 tuần tuổi (50 kg). Việc điều trị được thực hiện ở Trung tâm thử nghiệm thuốc SingHealth ở Singapore. Các con lợn được làm cho mắc bệnh đái tháo đường bằng 120 mg/kg streptozotoxin và cho phép phục hồi trong 45 ngày trước khi tạo sáu vết thương có độ dày đủ 5 cm x 5 cm trên lưng chúng (xem Fig.18). Các con lợn ($n = 2$) được điều trị hai lần một tuần bằng 10^5 quần thể tế bào gốc trung mô của người như được mô tả ở đây trên cm^2 trong 4 tuần. Hai con lợn đối chứng được điều trị bằng PBS. Các vết thương được chụp ảnh vào ngày hậu phẫu 0 (ngày PO 0) và bảy ngày một lần cho đến ngày hậu phẫu 35. Các vết thương được phân tích kích thước diện tích bề mặt bằng ImageJ. Vào Ngày 35, việc thêm quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây dẫn đến việc đóng miệng 10 trong số 12 vết thương do bệnh đái tháo đường (83%), so với chỉ 3 trong số 12 (25%) của các vết thương đối chứng được điều trị bằng PBS. Tốc độ lành vết thương là $0,8 \text{ cm}^2/\text{ngày}$ với quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây so với $0,6 \text{ cm}^2/\text{ngày}$ ở các con vật đối chứng, mức cải thiện 33%. Các kết quả nghiên cứu được tóm tắt trên Fig.18.

Mô hình lợn tuy không tự nhiên, nhưng cấu trúc da là gần giống nhất với da người. Dữ liệu đề xuất rằng quần thể tế bào gốc trung mô màng lót dây rốn theo sáng chế sẽ cải thiện việc làm lành vết thương mà không có nguy cơ có tác dụng phụ nghiêm trọng. Các dữ liệu này hỗ trợ mạnh mẽ giả thuyết rằng quần thể tế bào gốc trung mô màng lót dây rốn như được mô tả ở đây có thể cải thiện việc làm lành vết thương mạn tính bằng cách ngăn chặn chứng viêm và cải thiện sự tạo mạch. Hơn thế nữa, rõ ràng là không có dấu hiệu viêm với việc sử dụng tế bào gốc trung mô ghép khác loại ở chuột hoặc lợn, và do đó khả năng để tế bào gốc trung mô dị sinh có tác dụng phụ nghiêm trọng ở người là rất thấp.

6. Các thử nghiệm cho thấy rằng các tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây có hiệu quả ở các điều trị khu trú ở người:

Các thử nghiệm cho thấy rằng các tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây có hiệu quả ở các điều trị khu trú ở người đã được mô tả trong WO 2007/046775. Cụ thể, như được giải thích trong các ví dụ 23-26 của WO 2007/046775, tế bào gốc trung mô của màng ối của dây rốn (UCMC) có thể làm

giảm nhẹ các vết bỏng có độ dày đủ (ví dụ 23), các vết thương có độ dày một phần (ví dụ 24), vết thương bức xạ không lành (ví dụ 25) cũng như vết thương do bệnh đái tháo đường không lành và vết thương bàn chân do bệnh đái tháo đường không lành (ví dụ 26). Lưu ý, theo ví dụ 2 của WO 2007/046775, tế bào gốc trung mô được huyền phù lại trong môi trường PTT-4.

Lưu ý, như được minh họa trên Fig.6b và Fig.6c, quần thể tế bào gốc thu được bởi việc nuôi cấy khi sử dụng môi trường nuôi cấy PTT6 (như được sử dụng ở đây) đồng nhất hơn đáng kể so với quần thể tế bào thu được bằng cách sử dụng môi trường PTT4 (được sử dụng trong WO 2007/046775). Vì PTT-4 được sử dụng làm môi trường cho các tế bào gốc trung mô trong các ví dụ 23-26 của WO 2007/046775, rõ ràng rằng quần thể tế bào gốc trung mô còn đồng nhất hơn được phân lập sau nuôi cấy trong PTT-6 (như được sử dụng ở đây) sẽ có cùng tác dụng có lợi trong các ứng dụng làm lành vết thương, như các vết bỏng sâu, các vết thương có độ dày một phần, các vết thương không lành cũng như vết thương do bệnh đái tháo đường không lành và các vết thương bàn chân do bệnh đái tháo đường không lành.

7. Các thử nghiệm cho thấy rằng các tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây có hiệu quả ở các điều trị khu trú ở người:

Đây là nghiên cứu được lập kế hoạch về các liều tăng của quần thể tế bào gốc trung mô thu được như được mô tả ở đây được thực hiện ở Đại học *University of Colorado Anschutz Medical Campus* ở Aurora, Colorado. Mục tiêu của nghiên cứu là để xác định liều an toàn của quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây (tế bào gốc trung mô màng lót dây rốn của người). Đây là nghiên cứu tăng liều, một tâm, trong đó mỗi trong số ba mức liều sẽ áp dụng cho năm đối tượng cho tổng mười lăm đối tượng. Nhóm thứ nhất gồm 5 người bệnh sẽ nhận 100.000 MSC/cm² (diện tích da/vết thương) hai lần một tuần trong 8 tuần. Nhóm thứ hai gồm 5 người bệnh sẽ nhận 300.000 MSC/cm² hai lần một tuần trong 8 tuần. Nhóm thứ ba gồm 5 người bệnh sẽ nhận 500.000 MSC/cm² hai lần một tuần trong 8 tuần. Lịch biểu này sẽ tiếp tục cho đến khi đạt đến liều cao nhất, hoặc cho đến khi ít nhất 2 đối tượng ở một mức liều có phản ứng dị ứng $\geq$ cấp 2 mà được cho là có liên quan đến quần thể tế bào gốc trung mô như thu được ở đây hoặc 2 đối tượng hoặc

nhiều hơn ở một mức liều trải qua biến cố bất lợi nghiêm trọng không mong muốn liên quan đến việc điều trị hoặc độc tính giới hạn liều trong vòng 14 ngày sau liều đầu tiên của quần thể tế bào gốc trung mô như thu được như được mô tả ở đây. Tất cả người bệnh sẽ được đánh giá 30 ngày sau điều trị về sản xuất kháng thể kháng HLA và về sự khép miệng vết thương. Ở thời điểm này, các tác giả sáng chế không xem việc sản xuất kháng thể kháng HLA là chống chỉ định tuyệt đối với liều cụ thể, nhưng nó sẽ là nhân tố góp phần vào đánh giá tổng thể về độ an toàn. Đây là nghiên cứu nhân mở trong đó tất cả đối tượng sẽ nhận thuốc nghiên cứu và tất cả mọi người tham gia nghiên cứu đều biết liều mà mỗi đối tượng nhận. Mục đích thứ hai của nghiên cứu này là sự cải thiện đáng kể tình trạng vết thương. Mục đích này được dựa trên tốc độ khép miệng miệng vết thương, phần trăm diện tích vết thương được khép miệng thành công, và phần trăm vết thương được khép miệng hoàn toàn, như đo được bởi hệ thống ghi nhận và đo vết thương Silhouette. Thiết bị này được FDA phê chuẩn cho mục đích này.

Quần thể đối tượng. Những người bệnh mắc bệnh đái tháo đường Tuýp I hoặc Tuýp II với các vết loét bàn chân mạn tính mà không lành sau ít nhất 30 ngày dùng liệu pháp thông thường và âm tính với các kháng thể HLA đối với quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây. Người bệnh sẽ tiếp tục phép điều trị vết thương thông thường trong 2 tuần đầu bắt đầu từ lúc tham gia, vào lúc đó họ sẽ đã được sàng lọc xem là có vết loét bàn chân do bệnh đái tháo đường mà không lành trong 30 ngày. Việc ghi nhận bằng hình ảnh và đo đạc các thông số vết thương sẽ bắt đầu vào thời điểm này. Các lần thay băng thông thường sẽ được thực hiện hai lần một tuần trong 2 tuần đầu, sau đó quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây sẽ được dùng cho vết thương ở các nồng độ quy định hai lần một tuần. Các vết thương được điều trị bằng quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây cũng sẽ được che phủ bằng băng Tegaderm® và vải kép.

Các mức liều. Mục đích của nghiên cứu là để xác định liều an toàn của tế bào gốc trung mô màng lót dây rốn của người như được mô tả ở đây cho nghiên cứu khác. Người bệnh sẽ được điều trị bằng một trong ba liều: 100.000 tế bào/cm² diện tích da/vết thương, 300.000 tế bào/cm² hoặc 500.000 tế bào/cm² hai lần một tuần trong 8 tuần. Mỗi liều 100.000 tế bào tương trưng cho 0,1 ml quần thể tế bào

gốc trung mô như được mô tả ở đây từ lọ chứa 1 triệu tế bào/ml trong HypoThermosol.

Phác đồ dùng liệu. Đây là nghiên cứu về độ an toàn và dung hạn của các liều tăng của tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây. Mục đích của nghiên cứu là để xác định liều an toàn của tế bào gốc trung mô màng lót dây rốn của người như được mô tả ở đây cho nghiên cứu khác. Mỗi trong ba mức liều sẽ áp dụng cho năm đối tượng. Nhóm thứ nhất gồm 5 người bệnh sẽ nhận 100.000 MSC/cm² diện tích da/vết thương hai lần một tuần trong 8 tuần. Nhóm thứ hai gồm 5 người bệnh sẽ nhận 300.000 MSC/cm² hai lần một tuần trong 8 tuần. Nhóm thứ ba gồm 5 người bệnh sẽ nhận 500.000 MSC/cm² hai lần một tuần trong 8 tuần. Lịch biểu này sẽ tiếp tục cho đến khi đạt đến liều cao nhất, hoặc cho đến khi ít nhất 2 đối tượng ở một mức liều có phản ứng dị ứng $\geq$ cấp 2 mà được cho là có liên quan đến các tế bào gốc trung mô như mô tả ở đây hoặc 2 đối tượng hoặc nhiều hơn ở một mức liều trải qua biến cố bất lợi nghiêm trọng không mong muốn liên quan đến việc điều trị hoặc độc tính giới hạn liều trong vòng 30 ngày sau liều đầu tiên của quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây. Tất cả người bệnh sẽ được đánh giá 30 ngày sau điều trị về sản xuất kháng thể kháng HLA và về mức độ khép miệng vết thương. Ở thời điểm này, các tác giả sáng chế không xem việc sản xuất kháng thể kháng HLA là chống chỉ định tuyệt đối với liệu cụ thể, nhưng nó sẽ là nhân tố góp phần vào đánh giá tổng thể về độ an toàn. Đây là nghiên cứu nhãn mở trong đó tất cả đối tượng sẽ nhận thuốc nghiên cứu và tất cả mọi người tham gia nghiên cứu đều biết liều mà mỗi đối tượng nhận.

Đường dùng. Quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây được dùng khu trú cho các vết loét bàn chân do bệnh đái tháo đường được mở ổ và được giữ tại chỗ bằng băng Tegaderm®.

Quy trình dùng liệu. Sau bước mở vết loét thích hợp, nếu cần, người bệnh được đặt ở tư thế nằm sấp và chân bị bệnh cong lên ở góc 90°. Lọ quần thể tế bào gốc trung mô như được mô tả ở đây được xoáy nhẹ để bảo đảm phân bố đồng đều các tế bào. Sau đó bàn chân nâng cao được điều trị bằng cách lấy ra 100.000 (0,1 ml) đến 500.000 (0,5 ml) tế bào trên cm² từ lọ nhờ sử dụng xylanh vô trùng và đặt vào giữa vết thương. Sau đó băng kín vết thương bằng màng Tegaderm® và xoa

bóp nhẹ nhàng để phân bố các tế bào đồng đều. Bàn chân được giữ ở tư thế nâng cao trong năm phút để cho phép các tế bào lắng xuống và gắn kết. Sau đó bàn chân được băng bằng băng vải kép để che phủ lớp băng Tegaderm®.

8. Chuẩn bị dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô (chứa quần thể tế bào gốc mà nhiều hơn 99% các tế bào trong số đó biểu hiện mỗi trong số CD73, CD90 và CD105 và không có sự biểu hiện CD34 và HLA-DR).

Chuẩn bị để xử lý sau khi cấy chuyển tế bào lần thứ tư (Xử lý giai đoạn 4):

Xử lý giai đoạn 4 thường được thực hiện trong phòng sạch được theo dõi môi trường (environmentally monitored - EM). Các dung dịch và dụng cụ cần thiết cần được chuẩn bị để sẵn sàng sử dụng.

Chuyển tế bào từ lọ đông lạnh vào ống ly tâm 50ml được gắn nhãn.

Sử dụng môi trường PTT6 hoàn chỉnh trong vòng 5 phút sau khi lấy ra từ tủ lạnh (ghi chép thời gian lấy môi trường PTT6 ra từ tủ lạnh). Bổ sung từ từ 9ml môi trường PTT6 hoàn chỉnh vào các tế bào trong khi xoáy nhẹ để tạo thuận lợi cho việc trộn.

Ly tâm ở 1200 vòng trên phút ở nhiệt độ phòng (15-25°C) trong 5 phút để làm vón các tế bào. Ghi chép việc sử dụng máy ly tâm trên mẫu Bảo trì dự phòng định kỳ máy ly tâm (Centrifuge Periodic Preventative Maintenance) – CR và kiểm chứng hiệu năng theo Bảo trì dự phòng máy ly tâm SOP.

Loại bỏ phần nổi và huyền phù lại các tế bào trong lượng đủ môi trường PTT6 hoàn chỉnh để đếm.

Đếm:

Để xác định nồng độ tế bào (có hoặc không có xanh trypan), thực hiện đếm tế bào trên TC20. Trong hầu hết các trường hợp, không cần thiết pha loãng mẫu, vì TC20 phù hợp cho khoảng nồng độ tế bào rộng (5×10^4 đến 1×10^7 tế bào/ml).

Để xác định khả năng sống, đếm trên bộ đếm huyết cầu theo cùng SOP. Bảo đảm rằng tổng số ít nhất 200 tế bào được đếm.

Nếu bộ đếm huyết cầu có yêu cầu về cả mức khả năng sống và nồng độ tế bào, dịch huyền phù có thể phải được pha loãng để phù hợp với quy mô của bộ

đếm huyết cầu (20-100 tế bào trên mỗi ô vuông bên ngoài). Nếu ước tính 10 triệu tế bào đã đông được huyền phù lại, thể tích 6ml nên tạo ra khoảng đó.

Nuôi cấy điều trị (P4):

Cấy 300.000 tế bào sống trên bình thót cổ 175cm² trong 30ml môi trường PTT6 hoàn chỉnh và ủ ở 35-39°C với CO₂ 4 đến 6% . Bảo đảm việc bảo trì dự phòng tủ áp là được cập nhật, theo hướng dẫn sử dụng chung và bảo trì dự phòng tủ áp SOP. Gắn nhãn các bình thót cổ bằng nhãn xử lý MSC P1 - P4.

Khi hầu hết các tế bào đã bám (tốt hơn là qua đêm), thực hiện kiểm tra nhanh bình thót cổ cờ hiệu dưới kính hiển vi soi ngược Nikon đặt trong phòng sạch để xác định xem có vùng nào của bình thót cổ chứa mật độ tế bào lớn hơn một cách đáng lưu ý. Nếu có, sử dụng khu vực đó để theo dõi liên tục bằng CytoSmart. Nếu nhiều bình thót cổ được cấy, một bình thót cổ có thể được sử dụng làm bình thót cổ “cờ hiệu”. Theo một lựa chọn, thông báo cảnh báo bằng email của CytoSmart được thiết lập ở mức hợp lưu 60%, 70%, và 80% cho bình thót cổ “cờ hiệu”.

Thay môi trường bằng 30ml môi trường PTT6 hoàn chỉnh mới được làm ấm trước trên mỗi bình thót cổ vào mỗi 2-3 ngày và tiếp tục ủ.

Khi sự phát triển ra của các tế bào đạt mức hợp lưu 80% ± 10%, thu gom các MSC như sau:

Rửa mỗi bình thót cổ bằng 10ml HBSS mà không có Ca²⁺ hoặc Mg²⁺.

Thêm 5ml TrypLE 1X trên mỗi bình thót cổ. Nghiêng bình thót cổ để phủ toàn bộ bề mặt và ngay lập tức hút TrypLE ra bằng cách nghiêng bình thót cổ và loại bỏ phần lớn TrypLE bằng pipet huyết thanh vô trùng, chỉ để lại TrypLE đủ để phủ bề mặt. Loại bỏ TrypLE được hút ra.

Để các tế bào tách ra (10-20 phút ở 15-25°C). Việc nghiêng bình thót cổ 30-45° cho phép tế bào dịch chuyển xuống do dòng chảy trọng lực. Gõ nhẹ lên thành bình thót cổ để đẩy nhanh việc tách. Bình thót cổ sẽ được theo dõi dưới kính hiển vi soi ngược để bảo đảm tất cả các tế bào đã tách ra.

Thêm 5ml HBSS không có Ca²⁺ hoặc Mg²⁺ vào bình thót cổ thứ nhất. Hút nhả nhẹ nhàng bằng pipet, sau đó chuyển dịch huyền phù tế bào vào bình thót cổ

tiếp theo. Lắp lại cho đến khi thu gom tế bào từ tất cả các bình thót cổ và chuyển vào ống ly tâm 50ml được gắn nhãn bằng nhãn xử lý.

Lắp lại với 5ml HBSS mới không có Ca^{2+} hoặc Mg^{2+} và kết hợp với dịch huyền phù.

Xác nhận bằng kính hiển vi rằng tất cả tế bào được lấy ra và nếu cần lắp lại lần thứ ba để thu gom các tế bào trong tất cả các bình.

Ly tâm dịch huyền phù tế bào kết hợp trong 5 phút ở 1200 vòng trên phút ở 15-25°C. Ghi chép việc sử dụng máy ly tâm trên mẫu Bảo trì dự phòng định kỳ máy ly tâm (Centrifuge Periodic Preventative Maintenance) – CR và kiểm chứng hiệu năng.

Chuẩn bị dịch huyền phù thể bào được thu gom:

Loại bỏ phần nổi mà không làm xáo trộn phần cặn vón và huyền phù lại tế bào trong 1,0ml môi trường PTT6 hoàn chỉnh trên bình thót cổ thu gom bằng pipet hút huyết thanh có kích cỡ thích hợp. Môi trường không cần được làm ấm trước.

Xoáy xuống các tế bào được huyền phù lại trong môi trường PPT6 hoàn chỉnh ở 1200 vòng trên phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng.

Loại bỏ phần nổi môi trường PTT6 hoàn chỉnh mà không làm xáo trộn cặn vón và huyền phù lại nhẹ nhàng cặn vón trong 1,0ml “1% HSA trong Plasmalyte” cho mỗi bình thót cổ thu gom bằng pipet hút huyết thanh có kích cỡ thích hợp. Đây là dịch huyền phù tế bào được thu gom. Giữ dịch huyền phù tế bào được thu gom trong giá giữ lạnh từ thời điểm này trở đi.

Đếm dịch huyền phù tế bào được thu gom:

Trước mỗi lần lấy mẫu để đếm từ dịch huyền phù tế bào được thu gom, bảo đảm các tế bào được trộn kỹ.

Để xác định nồng độ tế bào (có hoặc không có xanh trypan), đếm trên TC20 theo Thử nghiệm khả năng sống và đếm tế bào SOP. Trong hầu hết các trường hợp, không cần pha loãng mẫu, vì TC20 phù hợp với khoảng nồng độ tế bào rộng (5×10^4 đến 1×10^7 tế bào/ml).

Để xác định khả năng sống, đếm trên bộ đếm huyết cầu theo cùng SOP. Bảo đảm rằng ít nhất tổng cộng 200 tế bào được đếm.

Chuẩn bị dịch huyền phù chứa trong lọ (giữ lạnh trong ống hình nón 50ml trong giá giữ lạnh):

Dựa trên việc đếm dịch huyền phù tế bào thu gom trên, xác định thể tích của dịch huyền phù tế bào thu gom và “1% HSA trong HypoThermosol” cần để điều chế liều cần dùng cho người bệnh. Gắn nhãn ống hình nón bằng nhãn thích hợp. Giữ ống hình nón chứa dịch huyền phù chứa trong lọ trong giá giữ lạnh được làm lạnh trước riêng của nó.

HypoThermosol và “1% HSA trong HypoThermosol” được điều chế được bảo quản và được sử dụng ở khoảng nhiệt độ lạnh (2-8°C), do đó giữ dịch huyền phù chứa trong lọ trong giá giữ lạnh.

Ghi chép thể tích của mỗi thành phần (HSA, Plasmalyte-A, và HypoThermosol-FRS) được sử dụng để điều chế dịch huyền phù cuối này. Dựa trên thể tích này, còn ghi chép thể tích của HSA, Plasmalyte, và HypoThermosol sẽ có mặt trong mỗi lọ AT-Closed.

Đếm dịch huyền phù được chứa trong lọ:

Trước mỗi lần lấy mẫu để đếm từ dịch huyền phù chứa trong lọ, bảo đảm các tế bào được trộn kỹ.

Để xác định nồng độ tế bào (có hoặc không có xanh trypan), đếm trên TC20 theo Thử nghiệm khả năng sống và đếm tế bào SOP.

Để xác định khả năng sống, đếm trên bộ đếm huyết cầu theo cùng SOP. Bảo đảm rằng ít nhất tổng cộng 200 tế bào được đếm. Thử nghiệm khả năng sống có thể được thực hiện chỉ một lần trên VLS.

Nạp các lọ AT-Closed như sau:

Lấy xylanh + kim đặt trước tủ lạnh và đặt vào tủ an toàn sinh học (biosafety cabinet - BSC).

Lấy các lọ AT-Closed đặt trước trong thiết bị lõi làm lạnh CoolRackSV10/XT từ tủ lạnh và đặt chúng trong tủ BSC. Bắt đầu bộ đếm giờ để bảo đảm hoàn thành việc nạp trong vòng 30 phút.

Lau miệng bơm bằng miếng gạc cồn.

Trước khi nạp vào lọ, lồng kim 22G vô trùng trong nút bịt, gắn tâm để thông khí cho lọ (điều này để tránh tạo áp suất trong lọ trong quá trình nạp).

Xoáy dịch huyền phù chứa trong lọ để trộn, sau đó hút từ từ vào xylanh mà không tạo bọt khí. Đâm xuyên tâm của nút bịt bằng xylanh và bơm 1,0ml vào mỗi lọ AT-Closed (đọc từ mặt khum đến mặt khum trên xylanh), cẩn thận để không tạo bọt khí.

Loại bỏ xylanh nạp, sau đó loại bỏ kim thông áp suất.

Đậy miệng lọ bằng nắp đi kèm và ấn chặt toàn bộ xung quanh. Để lại vào CoolRackSV10 và bảo quản ở 2-8°C khi vận chuyển đến nơi dự định.

Lấy mẫu phần thu gom cho đánh giá xytokin sau-P4 (thử nghiệm xytokin được thực hiện ít nhất một lần trên mỗi số lô, tức là CBU # và lot # giống nhau của mô người cho):

Dựa trên nồng độ dịch huyền phù chứa trong lọ từ ở trên, phân phối đủ thể tích dịch huyền phù chứa trong lọ vào ít nhất một lỗ trong đĩa 6 lỗ sao cho tổng 100.000 tế bào (sống+ chết) được phân phối trên mỗi lỗ. Thêm dịch huyền phù chứa trong lọ trực tiếp vào môi trường PTT6 hoàn chỉnh đủ đã được thêm vào mỗi lỗ sao cho tổng thể tích trong mỗi lỗ là 2ml. Đánh dấu thời gian bắt đầu ủ.

Ủ trong 48 giờ $\pm$ 1 giờ. Khi kết thúc ủ:

Chụp một ảnh CytoSmart đại diện được đặt ngẫu nhiên ở gần tâm của mỗi lỗ.

Đo lactat từ mỗi lỗ và báo cáo trên mẫu kết quả kiểm tra Lactat.

Thu gom môi trường từ mỗi lỗ và ly tâm ở 1200 vòng trên phút ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Ghi chép việc sử dụng máy ly tâm trên mẫu Bảo trì dự phòng định kỳ máy ly tâm (Centrifuge Periodic Preventative Maintenance) – CR và kiểm chứng hiệu năng.

Phân phối phần nổi môi trường vào ống làm lạnh và đông lạnh trong vòng 1 giờ thu gom. Đánh dấu vị trí bảo quản trên hồ sơ lô.

9. Nghiên cứu về độ ổn định của quá trình tăng sinh và chuyển hóa của MSC trong quá trình bảo quản/vận chuyển

Các mô dây rốn và tế bào từ các lần cấy chuyển sớm được bảo quản ở -195°C và được thử nghiệm về tính ổn định.

Việc kiểm tra tính ổn định ban đầu cho các tế bào gốc trung mô của màng lót dây rốn (các MSC) được mô tả ở đây có độ tinh sạch lớn hơn 99% so với các gen đánh dấu dương tính và âm tính (xem Fig.7 về vấn đề này) được thực hiện với sản phẩm cuối, gồm có các MSC sống chỉ trong HypoThermosol®. Phát hiện trong quá trình sản xuất thực tế rằng sự bám dính của các tế bào gốc trung mô xuất hiện là kết quả của các đặc tính vốn có của các tế bào gốc trung mô và độ nhớt của HypoThermosol®.

Để giảm bớt hao hụt tế bào do các MSC được đặt vào HypoThermosol® một mình khi phân phối, do sự bám dính của các MSC vào nhựa ở các bước khác nhau của xử lý giai đoạn 4 và để tối đa hóa việc thu hồi sản phẩm thuốc từ lọ được sử dụng khi phân phối, Plasmalyte và albumin huyết thanh người (HSA), hai thành phần không hoạt động được lý, khi được thêm vào, được thấy là tối ưu hóa chất lượng của sản phẩm thuốc cuối.

Một nghiên cứu về độ ổn định mới được thực hiện để chứng minh rằng việc bổ sung hai thành phần không hoạt động về dược lý này không gây tác dụng bất lợi đối với độ ổn định của sản phẩm thuốc cuối. Các kết quả được thể hiện trên Fig.33.

Phân tích khả năng sống

Tế bào gốc trung mô được cấy vào các lọ AT-Closed ® với lượng 10^6 tế bào mỗi lọ trong 1mL Plasmalyte/HSA/HypoThermosol®. Từng lọ được lấy mẫu ở các thời điểm khác nhau, với khả năng sống được đánh giá thủ công bằng xanh trypan (bộ đếm huyết cầu) và tổng số lượng tế bào được đếm bằng hệ thống tự động (TC20).

Các MSC được bảo quản ở 2 đến 8°C trong 1 đến 3 ngày để mô phỏng quá trình vận chuyển và bảo quản của sản phẩm trước khi sử dụng lên các vết thương. Như được thể hiện trên **Fig.33a**, các tế bào không thể hiện sự mất khả năng sống đáng kể lên đến 3 ngày trong các điều kiện này.

Phân tích về ngoài

Các MSC được chụp ảnh sau khi lấy ra khỏi các lọ AT-Closed và nuôi cấy trong 24 giờ ở 37°C. Như thấy được dưới đây, tế bào thu được lên đến 2 ngày bảo quản lạnh có khả năng bám dính vào các đĩa nuôi cấy mô và tạo các cấu trúc hình

thoi điển hình. Sau khi bảo quản trong 2,5 ngày ở 2-8°C, các tế bào biểu thị hình dạng giống hình cầu tăng, gợi ý về các tế bào sắp chết. Các kết quả được thể hiện trên Fig.33b.

Phân tích quá trình tăng sinh và chuyển hóa

Các MSC từ cùng mẻ nuôi cấy thể hiện trên **Fig.33a** được thử nghiệm về sự sản xuất lactat làm thước đo về sự chuyển hóa và tăng trưởng, qua thời gian 48 giờ nuôi cấy ở 37°C. Các tế bào được bảo quản trong 24 giờ ở 2-8°C là tương đương về chuyển hóa và tăng trưởng với các tế bào được bảo quản trong 0 giờ, và tế bào được bảo quản trong 36 giờ biểu thị 86% sự sản xuất lactat đối chứng. Vào 72 giờ ở 2-8°C, các tế bào biểu thị sự chuyển hóa chỉ 46% khi được nuôi cấy sau đó. Các kết quả được thể hiện trên **Fig.33c**.

Từng lọ riêng được thử nghiệm thêm vào các ngày 0, 1, 1,5, 2, 2,5 và 3 dựa trên ngưỡng khả năng sống của tế bào trong 3 ngày được thiết lập. Khả năng sống xác định bằng xanh trypan được thực hiện ngay sau khi lấy các tế bào ra khỏi lọ kín, và không có sự giảm rõ ràng về khả năng sống trong 2,5 ngày (khoảng 92-98%). Các tế bào cũng được cấy ở 10^5 tế bào/cm² trong môi trường PTT6 chuẩn, và sự sản xuất lactat được đo sau 24 và 48 giờ. Lactat là sản phẩm của quá trình chuyển hóa glucoza, mà tác giả sáng chế công nhận là tương quan trực tiếp với tốc độ tăng trưởng của tế bào MSC. **Fig.33d** thể hiện sự sản xuất lactat bởi các MSC được bảo quản trong 0, 1, 1,5, 2, 2,5 hoặc 3 ngày trong Plasmalyte/HSA/HypoThermosol®, và sau đó được đo sau 24 giờ và 48 giờ nuôi cấy. Sự sản xuất lactat ở 24 giờ và 48 giờ bởi các MSC được bảo quản trong Plasmalyte/HSA/HypoThermosol® trong 24 giờ (Ngày 1) là bằng với các MSC mà chưa được bảo quản (Ngày 0). Vào Ngày 3, sự sản xuất lactat giảm xuống mức 40-45%.

Phân tích sự sản xuất xytokin

Sự sản xuất xytokin được đo từ cùng mẻ nuôi cấy ở 24 giờ ở 37°C. Khi đồng chỉnh với dữ liệu chuyển hóa, khả năng của các MSC sản xuất Ang-1, TGF β , VEGF và HGF nằm trong mức 10-20% so với các đối chứng (Ngày 0) khi các tế bào được bảo quản ở 2-8°C trong 24 giờ. Các kết quả thể hiện trên **Fig.33e**, cho biết rằng khả năng của các MSC sản xuất VEGF, Angiopoietin-1, TGF- β và HGF

được duy trì khi các tế bào được bảo quản trong Plasmalyte/HSA/HypoThermosol® ở 2 đến 8°C trong 24 giờ. Tuy nhiên, khả năng của các MSC sản xuất VEGF và Angiopoietin-1 bị giảm ở mức xấp xỉ 50% khi được bảo quản trong >2 ngày. Các kết quả cho HGF cũng được bảo toàn tương tự trong 24 giờ, nhưng giảm đi >70% khi được bảo quản trong >2 ngày. Các kết quả cho TGF- β thể hiện rằng khả năng của các MSC sản xuất TGF- β được bảo toàn khoảng 75% khi được bảo quản trong >2 ngày trong Plasmalyte/HSA/HypoThermosol® ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Một phân tích khác về quá trình sản xuất xytokin trên các MSC được bảo quản trong 0, 1, 1,5, 2, 2,5 hoặc 3 ngày trong Plasmalyte/HSA/HypoThermosol® xác minh các kết quả thu được bằng cách phân tích quá trình sản xuất xytokin thứ nhất (**Fig.33e**). Các kết quả thể hiện rằng khả năng của các MSC sản xuất VEGF, Angiopoietin-1 và TGF- β được duy trì khi các tế bào được bảo quản trong Plasmalyte/HSA/HypoThermosol® ở 2 đến 8°C trong 24 giờ. Hơn nữa, mức tiết của VEGF và Angiopoietin-1 bị giảm ở mức xấp xỉ 50% khi được bảo quản trong >2 ngày, trong đó mức tiết của TGF- β bị giảm ở mức xấp xỉ 25%.

Tóm lại, dựa trên khả năng sống, bền ngoài, sự chuyên hóa và sản xuất xytokin được chứng minh bởi các tế bào trong các nghiên cứu này, có thể thiết lập thời gian hết hạn là 72 giờ từ khi mở lọ sản phẩm. Do đó, vì về nguyên tắc có thể đến được bất kỳ nơi nào trên thế giới (các nước phát triển) bằng đường bay trong vòng 72 giờ, dạng bào chế bảo quản và vận chuyển theo sáng chế về bản chất cho phép vận chuyển MSC sống từ cơ sở sản xuất MSC đến gần như mọi nơi trên thế giới, ở đó MSC được dùng cho đối tượng. Do đó, dạng bào chế bảo quản và/hoặc vận chuyển theo sáng chế làm giảm đáng kể độ phức tạp của chuỗi sản xuất và củng cố GMP của các quần thể tế bào gốc trung mô được dụng, nhờ đó khiến cho các liệu pháp dựa trên tế bào gốc trung mô dễ dàng ứng dụng cho cộng đồng lớn hơn.

Sáng chế còn được đặc trưng bởi các mục sau:

1. Phương pháp điều chế dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô, trong đó dạng bào chế chứa khoảng 0,5 đến khoảng 10 triệu tế bào gốc trung mô, phương pháp này bao gồm

a) tạo huyền phù tế bào gốc trung mô trong thể tích định trước của dung dịch tinh thể, trong đó dung dịch tinh thể chứa khoảng 0,5% đến khoảng 5% (trọng lượng/thể tích) albumin huyết thanh, nhờ đó thu được dịch huyền phù tế bào thứ nhất,

b) xác định nồng độ của các tế bào gốc trung mô trong dịch huyền phù tế bào thứ nhất, và xác định thể tích của dịch huyền phù tế bào thứ nhất cần để điều chế dạng bào chế chứa khoảng 0,5 đến khoảng 10 triệu tế bào gốc trung mô,

c) trộn thể tích xác định của dịch huyền phù tế bào thứ nhất với thể tích của chất mang lỏng, trong đó chất mang lỏng này chứa khoảng 0,5% đến khoảng 5% (trọng lượng/thể tích) albumin huyết thanh cũng như

- i) Trolox;
- ii) Na^+ ;
- iii) K^+ ;
- iv) Ca^{2+} ,
- v) Mg^{2+}
- vi) Cl^- ;
- vii) H_2PO_4^- ;
- viii) HEPES;
- ix) Lactobionat;
- x) Sucroza;
- xi) Manitol;
- xii) Glucoza;
- xiii) Dextran-40;
- xiv) Adenosin, và
- xv) Glutathion,

nhờ đó thu được dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô chứa khoảng 0,5 đến khoảng 10 triệu tế bào gốc trung mô.

2. Phương pháp theo mục 1, trong đó thể tích định trước của dung dịch tinh thể được sử dụng để tạo huyền phù các tế bào gốc trung mô là khoảng 1 ml đến khoảng 10 ml.

3. Phương pháp theo mục 1 hoặc 2, trong đó, sau khi trộn thể tích xác định của dịch huyền phù tế bào thứ nhất với thể tích của chất mang lỏng, tổng thể tích của dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô là khoảng 1 ml.
4. Phương pháp theo mục 2, trong đó dạng bào chế chứa khoảng 0,5 đến khoảng 10 triệu tế bào gốc trung mô sống.
5. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục 1 đến 4, trong đó dạng bào chế chứa khoảng 1, khoảng 3 hoặc khoảng 5 triệu tế bào gốc trung mô.
6. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó “khoảng” liên quan đến số lượng của tế bào gốc trung mô nghĩa là $\pm 1\%$, $\pm 2\%$, $\pm 3\%$, $\pm 4\%$, $\pm 5\%$, $\pm 6\%$, $\pm 7\%$, $\pm 8\%$, $\pm 9\%$ hoặc $\pm 10\%$.
7. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó các tế bào gốc trung mô được thu gom từ bình nuôi cấy tế bào trước khi tạo huyền phù lại các tế bào gốc trung mô trong thể tích định trước của dung dịch tinh thể.
8. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó cả dung dịch tinh thể và chất mang lỏng chứa cùng nồng độ của albumin huyết thanh.
9. Phương pháp theo mục 8, trong đó cả dung dịch tinh thể và chất mang lỏng chứa khoảng 0,5% đến khoảng 5% (trọng lượng/thể tích) albumin huyết thanh.
10. Phương pháp theo các mục 8 hoặc 9, trong đó cả dung dịch tinh thể và chất mang lỏng chứa khoảng 1% đến khoảng 5% (trọng lượng/thể tích) albumin huyết thanh.
11. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 8 đến 10, trong đó cả dung dịch tinh thể và chất mang lỏng chứa khoảng 1% đến khoảng 3% (trọng lượng/thể tích) albumin huyết thanh.
12. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 8 đến 11, trong đó cả dung dịch tinh thể và chất mang lỏng chứa khoảng 1% (trọng lượng/thể tích) albumin huyết thanh.

13. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó albumin huyết thanh là albumin huyết thanh người.
14. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó dung dịch tinh thể chứa natri, kali, magie và clorua.
15. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó dung dịch tinh thể là PlasmaLyte hoặc lactat Ringer.
16. Phương pháp theo mục 15, trong đó dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô chứa không nhiều hơn 20% PlasmaLyte.
17. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó các tế bào gốc trung mô là tế bào gốc trung mô được chọn từ nhóm gồm có tế bào gốc trung mô của dây rốn, tế bào gốc trung mô của nhau thai, tế bào gốc trung mô điểm nối dây rốn-nhau thai, tế bào gốc trung mô của máu dây rốn, tế bào gốc trung mô của tủy xương, và tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ mô mỡ động vật.
18. Phương pháp theo mục 17, trong đó các tế bào gốc trung mô của dây rốn được chọn từ nhóm gồm có tế bào gốc trung mô của màng ối, tế bào gốc trung mô quanh mạch, tế bào gốc trung mô của chất nhầy sệt Wharton, tế bào gốc trung mô của màng ối của dây rốn.
19. Phương pháp theo các mục 17 hoặc 18, trong đó các tế bào gốc trung mô của màng ối của dây rốn là quần thể tế bào gốc trung mô, trong đó ít nhất khoảng 90% tế bào của quần thể tế bào gốc trung mô hoặc nhiều hơn biểu hiện mỗi trong số các gen đánh dấu sau: CD73, CD90 và CD105.
20. Phương pháp theo mục 19, trong đó ít nhất khoảng 90% tế bào của quần thể tế bào gốc trung mô hoặc nhiều hơn không có sự biểu hiện gen đánh dấu sau: CD34, CD45 và HLA DR.
21. Phương pháp theo các mục 19 hoặc 20, trong đó ít nhất khoảng 91% hoặc nhiều hơn, khoảng 92% hoặc nhiều hơn, khoảng 93% hoặc nhiều hơn, khoảng 94% hoặc nhiều hơn, khoảng 95% hoặc nhiều hơn, khoảng 96% hoặc nhiều hơn, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn, khoảng 99% tế bào của

quần thể tế bào gốc trung mô hoặc nhiều hơn biểu hiện mỗi trong số CD73, CD90 và CD105 và không có sự biểu hiện mỗi trong số CD34, CD45 và HLA- DR (Human Leukocyte Antigen – antigen D Related).

22. Dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô thu được bằng phương pháp như được xác định theo mục bất kỳ trong số các mục 1 đến 21.

23. Dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô có thể thu được bằng phương pháp như được xác định theo mục bất kỳ trong số các mục 1 đến 21.

24. Phương pháp vận chuyển tế bào gốc trung mô, phương pháp này bao gồm vận chuyển các tế bào gốc trung mô trong dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô như được xác định theo mục 22 hoặc 23.

25. Phương pháp theo mục 24, trong đó việc vận chuyển được thực hiện trong khoảng 7 ngày hoặc ít hơn.

26. Phương pháp theo mục 24 hoặc 25, trong đó việc vận chuyển được thực hiện trong khoảng 6 ngày, khoảng 5 ngày, khoảng 4 ngày, khoảng 3 ngày, khoảng 2 ngày, khoảng 1 ngày hoặc ít hơn một ngày.

27. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục 24 đến 26, trong đó việc vận chuyển được thực hiện trong khoảng 48 giờ hoặc khoảng 24 giờ hoặc ít hơn.

28. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục 24 đến 27, trong đó việc vận chuyển được thực hiện ở nhiệt độ khoảng -5°C đến khoảng 15°C .

29. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục 24 đến 28, trong đó việc vận chuyển được thực hiện ở nhiệt độ khoảng 2°C đến khoảng 8°C .

30. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục 24 đến 29, trong đó việc vận chuyển được thực hiện ở nhiệt độ cao hơn khoảng -5°C , cao hơn khoảng -10°C , cao hơn khoảng -15°C , hoặc nhiều hơn khoảng -20°C .

31. Phương pháp điều trị đối tượng mắc bệnh, phương pháp này bao gồm dùng khu trú tế bào gốc trung mô mà đã được bảo quản hoặc vận chuyển trong dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô như được xác định theo mục 22 hoặc 23.
32. Phương pháp theo mục 31, trong đó các tế bào gốc trung mô được dùng cho đối tượng sau khi tách các tế bào gốc trung mô từ dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô.
33. Phương pháp theo mục 32, trong đó việc tách các tế bào gốc trung mô từ dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô bao gồm bước ly tâm.
34. Phương pháp theo mục 32 và 33, việc tách các tế bào gốc trung mô từ dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô bao gồm bước rút quần thể tế bào từ lọ bằng xylanh.
35. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục 31 đến 34, bao gồm việc dùng các tế bào gốc trung mô bằng xylanh.
36. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục 31 đến 35, trong đó các tế bào gốc trung mô được dùng ở dạng liều khoảng 3, khoảng 5 hoặc khoảng 10 triệu tế bào.
37. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục 31 đến 36, trong đó quần thể tế bào gốc trung mô được dùng trong vòng khoảng 72 giờ, khoảng 48 giờ, khoảng 24 giờ, khoảng 12 giờ, khoảng 6 giờ hoặc ít hơn từ thời điểm quần thể tế bào gốc trung mô được thu gom.
38. Phương pháp theo mục 37, trong đó các tế bào gốc trung mô được dùng trong vòng khoảng 72 giờ, khoảng 48 giờ, khoảng 24 giờ, khoảng 12 giờ, khoảng 6 giờ hoặc ít hơn từ thời điểm các tế bào gốc trung mô được thu gom.
39. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục 31 đến 38, trong đó bệnh là bệnh ngoài da hoặc vết thương.

40. Phương pháp theo mục 39, trong đó vết thương được gây ra do bỏng, vết cắn, chấn thương, phẫu thuật hoặc bệnh.
41. Phương pháp theo mục 40, trong đó vết thương được gây ra bởi bệnh đái tháo đường, trong đó vết thương tốt hơn là vết thương do bệnh đái tháo đường.
42. Phương pháp theo mục 41, trong đó vết thương là vết loét bàn chân do bệnh đái tháo đường.
43. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục 31 đến 42, trong đó dạng liều khoảng 10 triệu tế bào, khoảng 5 triệu tế bào, khoảng 4 triệu tế bào, khoảng 3 triệu tế bào, khoảng 2 triệu tế bào, khoảng 1 triệu tế bào, khoảng 0,5 triệu tế bào, khoảng 0,25 triệu tế bào hoặc ít hơn 0,25 triệu tế bào được dùng một đến hai lần một tuần.
44. Phương pháp theo mục 43, trong đó dạng liều khoảng 10 triệu tế bào, khoảng 5 triệu tế bào, khoảng 4 triệu tế bào, khoảng 3 triệu tế bào, khoảng 2 triệu tế bào, khoảng 1 triệu tế bào, khoảng 0,5 triệu tế bào, khoảng 0,25 triệu tế bào hoặc ít hơn 0,25 triệu tế bào được dùng một hoặc hai lần một tuần trong khoảng thời gian ba tuần, bốn tuần, hoặc năm tuần hoặc sáu tuần, hoặc bảy tuần hoặc tám tuần hoặc mười tuần hoặc nhiều tuần hơn.
45. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục 31 đến 44, trong đó các tế bào gốc trung mô được dùng khu trú và được bao phủ bởi màng hoặc băng.
46. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục 31 đến 45, trong đó các tế bào gốc trung mô được dùng ở dạng liều khoảng 1000 tế bào/cm² đến khoảng 5 triệu tế bào/cm².
47. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục 31 đến 46, trong đó các tế bào gốc trung mô được dùng ở dạng liều khoảng 100.000 tế bào/cm², khoảng 300.000 tế bào/cm² hoặc khoảng 500.000 tế bào/cm².
48. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục 31 đến 47, trong đó các tế bào gốc trung mô được dùng một lần, hai lần hoặc nhiều lần một tuần.

49. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục 31 đến 48, trong đó các tế bào gốc trung mô được dùng trong một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một tuần hoặc nhiều hơn.

50. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục 31 đến 49, trong đó các tế bào gốc trung mô được dùng hai lần một tuần trong khoảng 8 tuần ở dạng liều khoảng 100.000 tế bào/cm², khoảng 300.000 tế bào/cm² hoặc khoảng 500.000 tế bào/cm².

51. Liều đơn vị của tế bào gốc trung mô thu được bằng phương pháp như được xác định theo mục bất kỳ trong số các mục 1 đến 21.

52. Liều đơn vị của tế bào gốc trung mô có thể thu được bằng phương pháp như được xác định theo mục bất kỳ trong số các mục 1 đến 21.

53. Liều đơn vị theo các mục 51 hoặc 52, trong đó dạng liều đơn vị chứa khoảng 0,5 đến khoảng 10 triệu tế bào gốc trung mô ở thể tích 1 ml.

54. Liều đơn vị theo mục 53, trong đó dạng liều đơn vị chứa khoảng 1 triệu, khoảng 3 triệu hoặc khoảng 5 triệu tế bào.

55. Liều đơn vị theo mục bất kỳ trong số các mục 52 đến 54, trong đó các tế bào gốc trung mô của dây rốn được chọn từ nhóm gồm có tế bào gốc trung mô của màng ối, tế bào gốc trung mô quanh mạch, tế bào gốc trung mô của chất nhày sệt Wharton, tế bào gốc trung mô của màng ối của dây rốn.

56. Liều đơn vị theo mục 55, trong đó các tế bào gốc trung mô của màng ối của dây rốn là quần thể tế bào gốc trung mô, trong đó ít nhất khoảng 90% tế bào của quần thể tế bào gốc trung mô hoặc nhiều hơn biểu hiện mỗi trong số các gen đánh dấu sau: CD73, CD90 và CD105.

57. Liều đơn vị theo mục 56, trong đó ít nhất khoảng 90% tế bào của quần thể tế bào gốc trung mô hoặc nhiều hơn không có sự biểu hiện gen đánh dấu sau: CD34, CD45 và HLA DR.

58. Liều đơn vị theo mục 56 hoặc 57, trong đó ít nhất khoảng 91% hoặc nhiều hơn, khoảng 92% hoặc nhiều hơn, khoảng 93% hoặc nhiều hơn, khoảng 94% hoặc nhiều hơn, khoảng 95% hoặc nhiều hơn, khoảng 96% hoặc nhiều hơn, khoảng 97% hoặc nhiều hơn, khoảng 98% hoặc nhiều hơn khoảng 99% tế bào của quần thể tế bào gốc trung mô hoặc nhiều hơn biểu hiện mỗi trong số CD73, CD90 và CD105 và không có sự biểu hiện mỗi trong số CD34, CD45 và HLA- DR (Human Leukocyte Antigen – antigen D Related).

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

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

Sáng chế được mô tả theo cách minh họa ở đây có thể được thực hiện một cách phù hợp khi không có mặt yếu tố hoặc các yếu tố, giới hạn hoặc các giới hạn bất kỳ, mà không được bộc lộ cụ thể ở đây. Do đó, ví dụ, các thuật ngữ “chứa”, “bao gồm,” “gồm có”, v.v. sẽ được hiểu theo nghĩa rộng và không có giới hạn. Ngoài ra, các thuật ngữ và dạng thể hiện được sử dụng ở đây đã được sử dụng như các thuật ngữ mô tả và không phải giới hạn, và việc sử dụng các thuật ngữ và dạng thể hiện đó không có ý định loại trừ dạng tương đương bất kỳ của các dấu hiệu được thể hiện và mô tả hoặc các phần của chúng, nhưng thừa nhận rằng có thể thực hiện các sửa đổi khác nhau trong phạm vi sáng chế được yêu cầu bảo hộ. Do đó, cần hiểu rằng mặc dù sáng chế được bộc lộ cụ thể bằng các phương án ưu tiên và các dấu hiệu tùy chọn, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể thực hiện các cải biến và thay đổi của sáng chế được bao gồm trong đó được bộc lộ ở đây, và các cải biến và thay đổi này được coi là nằm trong phạm vi của sáng chế. Sáng chế được mô tả một cách rộng rãi và khái quát ở đây. Mỗi trong số các phân nhóm loài hẹp hơn và phân nhóm giống phụ đều nằm trong phần mô tả chung cũng tạo thành một phần của sáng chế. Điều này bao gồm phần mô tả chung

của sáng chế với điều kiện hoặc giới hạn phủ định loại bỏ đối tượng bất kỳ ra khỏi một giống, bất kể nguyên liệu đã được loại bỏ có được đề cập cụ thể ở đây hay không. Ngoài ra, khi các dấu hiệu hoặc khía cạnh của sáng chế được mô tả theo các nhóm Markush, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận ra rằng sáng chế nhờ đó cũng được mô tả theo thành viên hoặc nhóm phụ bất kỳ gồm các thành viên của nhóm Markush. Các phương án khác theo sáng chế sẽ trở nên rõ ràng từ các điểm yêu cầu bảo hộ sau.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "khoảng" được hiểu nghĩa là có thể có sự biến thiên ở giá trị hoặc khoảng tương ứng (như pH, nồng độ, thành phần phần trăm, nồng độ mol, số lượng axit amin, thời gian v.v.) có thể lên đến 5%, lên đến 10%, lên đến 15% hoặc lên đến và bao gồm 20% của giá trị đã cho. Chẳng hạn, nếu dạng bào chế chứa khoảng 5 mg/ml của một hợp chất, điều này được hiểu nghĩa là dạng bào chế có thể có giữa 4 và 6 mg/ml, tốt hơn là giữa 4,25 và 5,75 mg/ml, tốt hơn nữa là giữa 4,5 và 5,5 mg/ml và thậm chí tốt hơn nữa là giữa 4,75 và 5,25 mg/ml, với tốt nhất là 5 mg/ml. Như được sử dụng ở đây, các khoảng mà được xác định là "(từ) X đến Y" bằng với các khoảng mà được xác định là "giữa X và Y". Cả hai khoảng này bao gồm giới hạn trên và giới hạn dưới. Điều này có nghĩa là chẳng hạn các khoảng "5 mg/ml đến 10 mg/ml" hoặc "giữa 5 mg/ml và 10 mg/ml" bao gồm các nồng độ 5, 6, 7, 8, 9, và 10 mg/ml cũng như giá trị được cho ở giữa bất kỳ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp điều chế dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô, trong đó các tế bào gốc trung mô là tế bào gốc trung mô của màng ối của dây rốn, trong đó dạng bào chế này chứa 0,5 đến 10 triệu tế bào gốc trung mô, phương pháp này bao gồm
 - a) tạo huyền phù tế bào gốc trung mô trong thể tích định trước của dung dịch tinh thể, trong đó dung dịch tinh thể là PlasmaLyte và chứa 0,5% đến 3% (trọng lượng/thể tích) albumin huyết thanh, nhờ đó thu được dịch huyền phù tế bào thứ nhất,
 - b) xác định nồng độ của các tế bào gốc trung mô trong dịch huyền phù tế bào thứ nhất, và xác định thể tích của dịch huyền phù tế bào thứ nhất cần để điều chế dạng bào chế chứa 0,5 đến 10 triệu tế bào gốc trung mô,
 - c) trộn thể tích xác định của dịch huyền phù tế bào thứ nhất với thể tích của chất mang lỏng, trong đó sau khi trộn dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô chứa không nhiều hơn 20% PlasmaLyte, trong đó chất mang lỏng này chứa 0,5% đến 3% (trọng lượng/thể tích) albumin huyết thanh, và cũng như
 - i) Trolox;
 - ii) Na^+ ;
 - iii) K^+ ;
 - iv) Ca^{2+} ,
 - v) Mg^{2+}
 - vi) Cl^- ;
 - vii) H_2PO_4^- ;
 - viii) HEPES;
 - ix) Lactobionat;
 - x) Sucroza;
 - xi) Manitol;
 - xii) Glucoza;
 - xiii) Dextran-40;

xiv) Adenosin, và

xv) Glutathion,

nhờ đó thu được dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô chứa 0,5 đến 10 triệu tế bào gốc trung mô.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thể tích định trước của dung dịch tinh thể được sử dụng để tạo huyền phù các tế bào gốc trung mô là 1 ml đến 10 ml.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó, sau khi trộn thể tích xác định của dịch huyền phù tế bào thứ nhất với thể tích của chất mang lỏng, tổng thể tích của dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô là 1 ml.
4. Phương pháp theo điểm 2, trong đó, sau khi trộn thể tích xác định của dịch huyền phù tế bào thứ nhất với thể tích của chất mang lỏng, tổng thể tích của dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô là 1 ml.
5. Phương pháp theo điểm 2, trong đó dạng bào chế này chứa 0,5 đến 10 triệu tế bào gốc trung mô sống.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó dạng bào chế này chứa 1, 3 hoặc 5 triệu tế bào gốc trung mô.
7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó các tế bào gốc trung mô được thu gom từ bình nuôi cấy tế bào trước khi tạo huyền phù lại các tế bào gốc trung mô trong thể tích định trước của dung dịch tinh thể.
8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó cả dung dịch tinh thể và chất mang lỏng chứa cùng nồng độ của albumin huyết thanh.

9. Phương pháp theo điểm 6, trong đó cả dung dịch tinh thể và chất mang lỏng chứa cùng nồng độ của albumin huyết thanh.
10. Phương pháp theo điểm 8, trong đó cả dung dịch tinh thể và chất mang lỏng chứa 1% đến 3% (trọng lượng/thể tích) albumin huyết thanh.
11. Phương pháp theo điểm 9, trong đó cả dung dịch tinh thể và chất mang lỏng chứa 1% đến 3% (trọng lượng/thể tích) albumin huyết thanh.
12. Phương pháp theo điểm 8, trong đó cả dung dịch tinh thể và chất mang lỏng chứa 1% (trọng lượng/thể tích) albumin huyết thanh.
13. Phương pháp theo điểm 9, trong đó cả dung dịch tinh thể và chất mang lỏng chứa 1% (trọng lượng/thể tích) albumin huyết thanh.
14. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 và từ 9 đến 13, trong đó albumin huyết thanh là albumin huyết thanh người.
15. Phương pháp theo điểm 8, trong đó albumin huyết thanh là albumin huyết thanh người.
16. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 và từ 9 đến 13, trong đó các tế bào gốc trung mô của màng ối của dây rốn là quần thể tế bào gốc trung mô, trong đó ít nhất 90% tế bào của quần thể tế bào gốc trung mô hoặc nhiều hơn biểu hiện mỗi trong số các gen đánh dấu sau: CD73, CD90 và CD105.
17. Phương pháp theo điểm 16, trong đó ít nhất 90% tế bào của quần thể tế bào gốc trung mô hoặc nhiều hơn không có sự biểu hiện các gen đánh dấu sau: CD34, CD45 và HLA-DR.

18. Phương pháp theo điểm 16, trong đó ít nhất 91% hoặc nhiều hơn, 92% hoặc nhiều hơn, 93% hoặc nhiều hơn, 94% hoặc nhiều hơn, 95% hoặc nhiều hơn, 96% hoặc nhiều hơn, 97% hoặc nhiều hơn, 98% hoặc nhiều hơn 99% tế bào của quần thể tế bào gốc trung mô hoặc nhiều hơn biểu hiện mỗi trong số các gen đánh dấu sau CD73, CD90 và CD105 và không có sự biểu hiện mỗi trong số các gen đánh dấu sau CD34, CD45 và HLA- DR.
19. Phương pháp theo điểm 6, trong đó ít nhất 91% hoặc nhiều hơn, 92% hoặc nhiều hơn, 93% hoặc nhiều hơn, 94% hoặc nhiều hơn, 95% hoặc nhiều hơn, 96% hoặc nhiều hơn, 97% hoặc nhiều hơn, 98% hoặc nhiều hơn 99% tế bào của quần thể tế bào gốc trung mô hoặc nhiều hơn biểu hiện mỗi trong số các gen đánh dấu sau CD73, CD90 và CD105 và không có sự biểu hiện mỗi trong số các gen đánh dấu sau CD34, CD45 và HLA- DR
20. Dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô thu được bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 19.
21. Phương pháp vận chuyển tế bào gốc trung mô, phương pháp này bao gồm vận chuyển các tế bào gốc trung mô trong dạng bào chế bảo quản hoặc vận chuyển tế bào gốc trung mô như được xác định theo điểm 20.
22. Phương pháp theo điểm 21, trong đó việc vận chuyển được thực hiện trong 7 ngày hoặc ít hơn.
23. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 21 đến 22, trong đó việc vận chuyển được thực hiện ở nhiệt độ -5°C đến 15°C.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CellResearch Corporation Pte Ltd
The Regents of the University of Colorado

<120> Dạng bào chế bảo quản và vận chuyển tế bào gốc trung mô và phương pháp điều chế dạng bào chế này

<160> 13

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 574

<212> PRT

<213> người

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

210		215		220
Met Asp Lys Leu Ile Ala Gln Lys Val Arg Gly Val Asp Val Val Val				
225		230		235 240
Gly Gly His Ser Asn Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Asn Pro Pro Ser Lys				
		245		250 255
Glu Val Pro Ala Gly Lys Tyr Pro Phe Ile Val Thr Ser Asp Asp Gly				
		260		265 270
Arg Lys Val Pro Val Val Gln Ala Tyr Ala Phe Gly Lys Tyr Leu Gly				
		275		280 285
Tyr Leu Lys Ile Glu Phe Asp Glu Arg Gly Asn Val Ile Ser Ser His				
		295		300
Gly Asn Pro Ile Leu Leu Asn Ser Ser Ile Pro Glu Asp Pro Ser Ile				
305		310		315 320
Lys Ala Asp Ile Asn Lys Trp Arg Ile Lys Leu Asp Asn Tyr Ser Thr				
		325		330 335
Gln Glu Leu Gly Lys Thr Ile Val Tyr Leu Asp Gly Ser Ser Gln Ser				
		340		345 350
Cys Arg Phe Arg Glu Cys Asn Met Gly Asn Leu Ile Cys Asp Ala Met				
		355		360 365
Ile Asn Asn Asn Leu Arg His Thr Asp Glu Met Phe Trp Asn His Val				
		370		375 380
Ser Met Cys Ile Leu Asn Gly Gly Gly Ile Arg Ser Pro Ile Asp Glu				
385		390		395 400
Arg Asn Asn Gly Thr Ile Thr Trp Glu Asn Leu Ala Ala Val Leu Pro				
		405		410 415
Phe Gly Gly Thr Phe Asp Leu Val Gln Leu Lys Gly Ser Thr Leu Lys				
		420		425 430
Lys Ala Phe Glu His Ser Val His Arg Tyr Gly Gln Ser Thr Gly Glu				
		435		440 445
Phe Leu Gln Val Gly Gly Ile His Val Val Tyr Asp Leu Ser Arg Lys				
450		455		460
Pro Gly Asp Arg Val Val Lys Leu Asp Val Leu Cys Thr Lys Cys Arg				
465		470		475 480
Val Pro Ser Tyr Asp Pro Leu Lys Met Asp Glu Val Tyr Lys Val Ile				
		485		490 495
Leu Pro Asn Phe Leu Ala Asn Gly Gly Asp Gly Phe Gln Met Ile Lys				

```

                500                      505                      510
Asp Glu Leu Leu Arg His Asp Ser Gly Asp Gln Asp Ile Asn Val Val
    515                      520                      525

Ser Thr Tyr Ile Ser Lys Met Lys Val Ile Tyr Pro Ala Val Glu Gly
    530                      535                      540

Arg Ile Lys Phe Ser Thr Gly Ser His Cys His Gly Ser Phe Ser Leu
545                      550                      555                      560

Ile Phe Leu Ser Leu Trp Ala Val Ile Phe Val Leu Tyr Gln
    565                      570

<210>  2
<211> 161
<212> PRT
<213> người
<400>  2
Met Asn Leu Ala Ile Ser Ile Ala Leu Leu Leu Thr Val Leu Gln Val
1                      5                      10                      15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu

```

```

<210>  3
<211> 658

```


<212> PRT

<213> người

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Thr Gly Glu Tyr Ser Phe Lys Ile Phe Pro Glu Lys Asn Ile Arg
 275 280 285
 Gly Phe Lys Leu Pro Asp Thr Pro Gln Gly Leu Leu Gly Glu Ala Arg
 290 295 300
 Met Leu Asn Ala Ser Ile Val Ala Ser Phe Val Glu Leu Pro Leu Ala
 305 310 315 320
 Ser Ile Val Ser Leu His Ala Ser Ser Cys Gly Gly Arg Leu Gln Thr
 325 330 335
 Ser Pro Ala Pro Ile Gln Thr Thr Pro Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro
 340 345 350
 Glu Leu Leu Met Ser Leu Ile Gln Thr Lys Cys Ala Asp Asp Ala Met
 355 360 365
 Thr Leu Val Leu Lys Lys Glu Leu Val Ala His Leu Lys Cys Thr Ile
 370 375 380
 Thr Gly Leu Thr Phe Trp Asp Pro Ser Cys Glu Ala Glu Asp Arg Gly
 385 390 395 400
 Asp Lys Phe Val Leu Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Cys Gly Met Gln Val
 405 410 415
 Ser Ala Ser Met Ile Ser Asn Glu Ala Val Val Asn Ile Leu Ser Ser
 420 425 430
 Ser Ser Pro Gln Arg Lys Lys Val His Cys Leu Asn Met Asp Ser Leu
 435 440 445
 Ser Phe Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser Pro His Phe Leu Gln Ala Ser
 450 455 460
 Asn Thr Ile Glu Pro Gly Gln Gln Ser Phe Val Gln Val Arg Val Ser
 465 470 475 480
 Pro Ser Val Ser Glu Phe Leu Leu Gln Leu Asp Ser Cys His Leu Asp
 485 490 495
 Leu Gly Pro Glu Gly Gly Thr Val Glu Leu Ile Gln Gly Arg Ala Ala
 500 505 510
 Lys Gly Asn Cys Val Ser Leu Leu Ser Pro Ser Pro Glu Gly Asp Pro
 515 520 525
 Arg Phe Ser Phe Leu Leu His Phe Tyr Thr Val Pro Ile Pro Lys Thr
 530 535 540
 Gly Thr Leu Ser Cys Thr Val Ala Leu Arg Pro Lys Thr Gly Ser Gln
 545 550 555 560

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

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

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

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

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

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

Met Ala

<210> 4

<211> 385

<212> PRT

<213> người

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Leu Ser Thr Thr Ser Thr Ser Leu Ala Thr Ser Pro Thr Lys Pro

```

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

```

Leu
385

<210> 5
<211> 1304
<212> PRT
<213> người
<400> 5

```

Met Tyr Leu Trp Leu Lys Leu Leu Ala Phe Gly Phe Ala Phe Leu Asp
1                      5                      10                      15

```

Thr Glu Val Phe Val Thr Gly Gln Ser Pro Thr Pro Ser Pro Thr Gly
 20 25 30
 Leu Thr Thr Ala Lys Met Pro Ser Val Pro Leu Ser Ser Asp Pro Leu
 35 40 45
 Pro Thr His Thr Thr Ala Phe Ser Pro Ala Ser Thr Phe Glu Arg Glu
 50 55 60
 Asn Asp Phe Ser Glu Thr Thr Thr Ser Leu Ser Pro Asp Asn Thr Ser
 65 70 75 80
 Thr Gln Val Ser Pro Asp Ser Leu Asp Asn Ala Ser Ala Phe Asn Thr
 85 90 95
 Thr Gly Val Ser Ser Val Gln Thr Pro His Leu Pro Thr His Ala Asp
 100 105 110
 Ser Gln Thr Pro Ser Ala Gly Thr Asp Thr Gln Thr Phe Ser Gly Ser
 115 120 125
 Ala Ala Asn Ala Lys Leu Asn Pro Thr Pro Gly Ser Asn Ala Ile Ser
 130 135 140
 Asp Val Pro Gly Glu Arg Ser Thr Ala Ser Thr Phe Pro Thr Asp Pro
 145 150 155 160
 Val Ser Pro Leu Thr Thr Thr Leu Ser Leu Ala His His Ser Ser Ala
 165 170 175
 Ala Leu Pro Ala Arg Thr Ser Asn Thr Thr Ile Thr Ala Asn Thr Ser
 180 185 190
 Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Ser Glu Thr Thr Thr Leu Ser Pro Ser Gly
 195 200 205
 Ser Ala Val Ile Ser Thr Thr Thr Ile Ala Thr Thr Pro Ser Lys Pro
 210 215 220
 Thr Cys Asp Glu Lys Tyr Ala Asn Ile Thr Val Asp Tyr Leu Tyr Asn
 225 230 235 240
 Lys Glu Thr Lys Leu Phe Thr Ala Lys Leu Asn Val Asn Glu Asn Val
 245 250 255
 Glu Cys Gly Asn Asn Thr Cys Thr Asn Asn Glu Val His Asn Leu Thr
 260 265 270
 Glu Cys Lys Asn Ala Ser Val Ser Ile Ser His Asn Ser Cys Thr Ala
 275 280 285
 Pro Asp Lys Thr Leu Ile Leu Asp Val Pro Pro Gly Val Glu Lys Phe
 290 295 300

Gln Leu His Asp Cys Thr Gln Val Glu Lys Ala Asp Thr Thr Ile Cys
 305 310 315 320
 Leu Lys Trp Lys Asn Ile Glu Thr Phe Thr Cys Asp Thr Gln Asn Ile
 325 330 335
 Thr Tyr Arg Phe Gln Cys Gly Asn Met Ile Phe Asp Asn Lys Glu Ile
 340 345 350
 Lys Leu Glu Asn Leu Glu Pro Glu His Glu Tyr Lys Cys Asp Ser Glu
 355 360 365
 Ile Leu Tyr Asn Asn His Lys Phe Thr Asn Ala Ser Lys Ile Ile Lys
 370 375 380
 Thr Asp Phe Gly Ser Pro Gly Glu Pro Gln Ile Ile Phe Cys Arg Ser
 385 390 395 400
 Glu Ala Ala His Gln Gly Val Ile Thr Trp Asn Pro Pro Gln Arg Ser
 405 410 415
 Phe His Asn Phe Thr Leu Cys Tyr Ile Lys Glu Thr Glu Lys Asp Cys
 420 425 430
 Leu Asn Leu Asp Lys Asn Leu Ile Lys Tyr Asp Leu Gln Asn Leu Lys
 435 440 445
 Pro Tyr Thr Lys Tyr Val Leu Ser Leu His Ala Tyr Ile Ile Ala Lys
 450 455 460
 Val Gln Arg Asn Gly Ser Ala Ala Met Cys His Phe Thr Thr Lys Ser
 465 470 475 480
 Ala Pro Pro Ser Gln Val Trp Asn Met Thr Val Ser Met Thr Ser Asp
 485 490 495
 Asn Ser Met His Val Lys Cys Arg Pro Pro Arg Asp Arg Asn Gly Pro
 500 505 510
 His Glu Arg Tyr His Leu Glu Val Glu Ala Gly Asn Thr Leu Val Arg
 515 520 525
 Asn Glu Ser His Lys Asn Cys Asp Phe Arg Val Lys Asp Leu Gln Tyr
 530 535 540
 Ser Thr Asp Tyr Thr Phe Lys Ala Tyr Phe His Asn Gly Asp Tyr Pro
 545 550 555 560
 Gly Glu Pro Phe Ile Leu His His Ser Thr Ser Tyr Asn Ser Lys Ala
 565 570 575
 Leu Ile Ala Phe Leu Ala Phe Leu Ile Ile Val Thr Ser Ile Ala Leu
 580 585 590

Leu Val Val Leu Tyr Lys Ile Tyr Asp Leu His Lys Lys Arg Ser Cys
 595 600 605
 Asn Leu Asp Glu Gln Gln Glu Leu Val Glu Arg Asp Asp Glu Lys Gln
 610 615 620
 Leu Met Asn Val Glu Pro Ile His Ala Asp Ile Leu Leu Glu Thr Tyr
 625 630 635 640
 Lys Arg Lys Ile Ala Asp Glu Gly Arg Leu Phe Leu Ala Glu Phe Gln
 645 650 655
 Ser Ile Pro Arg Val Phe Ser Lys Phe Pro Ile Lys Glu Ala Arg Lys
 660 665 670
 Pro Phe Asn Gln Asn Lys Asn Arg Tyr Val Asp Ile Leu Pro Tyr Asp
 675 680 685
 Tyr Asn Arg Val Glu Leu Ser Glu Ile Asn Gly Asp Ala Gly Ser Asn
 690 695 700
 Tyr Ile Asn Ala Ser Tyr Ile Asp Gly Phe Lys Glu Pro Arg Lys Tyr
 705 710 715 720
 Ile Ala Ala Gln Gly Pro Arg Asp Glu Thr Val Asp Asp Phe Trp Arg
 725 730 735
 Met Ile Trp Glu Gln Lys Ala Thr Val Ile Val Met Val Thr Arg Cys
 740 745 750
 Glu Glu Gly Asn Arg Asn Lys Cys Ala Glu Tyr Trp Pro Ser Met Glu
 755 760 765
 Glu Gly Thr Arg Ala Phe Gly Asp Val Val Val Lys Ile Asn Gln His
 770 775 780
 Lys Arg Cys Pro Asp Tyr Ile Ile Gln Lys Leu Asn Ile Val Asn Lys
 785 790 795 800
 Lys Glu Lys Ala Thr Gly Arg Glu Val Thr His Ile Gln Phe Thr Ser
 805 810 815
 Trp Pro Asp His Gly Val Pro Glu Asp Pro His Leu Leu Leu Lys Leu
 820 825 830
 Arg Arg Arg Val Asn Ala Phe Ser Asn Phe Phe Ser Gly Pro Ile Val
 835 840 845
 Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly Thr Tyr Ile Gly Ile
 850 855 860
 Asp Ala Met Leu Glu Gly Leu Glu Ala Glu Asn Lys Val Asp Val Tyr
 865 870 875 880

Gly Tyr Val Val Lys Leu Arg Arg Gln Arg Cys Leu Met Val Gln Val
 885 890 895
 Glu Ala Gln Tyr Ile Leu Ile His Gln Ala Leu Val Glu Tyr Asn Gln
 900 905 910
 Phe Gly Glu Thr Glu Val Asn Leu Ser Glu Leu His Pro Tyr Leu His
 915 920 925
 Asn Met Lys Lys Arg Asp Pro Pro Ser Glu Pro Ser Pro Leu Glu Ala
 930 935 940
 Glu Phe Gln Arg Leu Pro Ser Tyr Arg Ser Trp Arg Thr Gln His Ile
 945 950 955 960
 Gly Asn Gln Glu Glu Asn Lys Ser Lys Asn Arg Asn Ser Asn Val Ile
 965 970 975
 Pro Tyr Asp Tyr Asn Arg Val Pro Leu Lys His Glu Leu Glu Met Ser
 980 985 990
 Lys Glu Ser Glu His Asp Ser Asp Glu Ser Ser Asp Asp Asp Ser Asp
 995 1000 1005
 Ser Glu Glu Pro Ser Lys Tyr Ile Asn Ala Ser Phe Ile Met Ser
 1010 1015 1020
 Tyr Trp Lys Pro Glu Val Met Ile Ala Ala Gln Gly Pro Leu Lys
 1025 1030 1035
 Glu Thr Ile Gly Asp Phe Trp Gln Met Ile Phe Gln Arg Lys Val
 1040 1045 1050
 Lys Val Ile Val Met Leu Thr Glu Leu Lys His Gly Asp Gln Glu
 1055 1060 1065
 Ile Cys Ala Gln Tyr Trp Gly Glu Gly Lys Gln Thr Tyr Gly Asp
 1070 1075 1080
 Ile Glu Val Asp Leu Lys Asp Thr Asp Lys Ser Ser Thr Tyr Thr
 1085 1090 1095
 Leu Arg Val Phe Glu Leu Arg His Ser Lys Arg Lys Asp Ser Arg
 1100 1105 1110
 Thr Val Tyr Gln Tyr Gln Tyr Thr Asn Trp Ser Val Glu Gln Leu
 1115 1120 1125
 Pro Ala Glu Pro Lys Glu Leu Ile Ser Met Ile Gln Val Val Lys
 1130 1135 1140
 Gln Lys Leu Pro Gln Lys Asn Ser Ser Glu Gly Asn Lys His His
 1145 1150 1155

Lys Ser Thr Pro Leu Leu Ile His Cys Arg Asp Gly Ser Gln Gln
 1160 1165 1170
 Thr Gly Ile Phe Cys Ala Leu Leu Asn Leu Leu Glu Ser Ala Glu
 1175 1180 1185
 Thr Glu Glu Val Val Asp Ile Phe Gln Val Val Lys Ala Leu Arg
 1190 1195 1200
 Lys Ala Arg Pro Gly Met Val Ser Thr Phe Glu Gln Tyr Gln Phe
 1205 1210 1215
 Leu Tyr Asp Val Ile Ala Ser Thr Tyr Pro Ala Gln Asn Gly Gln
 1220 1225 1230
 Val Lys Lys Asn Asn His Gln Glu Asp Lys Ile Glu Phe Asp Asn
 1235 1240 1245
 Glu Val Asp Lys Val Lys Gln Asp Ala Asn Cys Val Asn Pro Leu
 1250 1255 1260
 Gly Ala Pro Glu Lys Leu Pro Glu Ala Lys Glu Gln Ala Glu Gly
 1265 1270 1275
 Ser Glu Pro Thr Ser Gly Thr Glu Gly Pro Glu His Ser Val Asn
 1280 1285 1290
 Gly Pro Ala Ser Pro Ala Leu Asn Gln Gly Ser
 1295 1300
 <210> 6
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> người
 <400> 6
 Met Ala Ile Ser Gly Val Pro Val Leu Gly Phe Phe Ile Ile Ala Val
 1 5 10 15
 Leu Met Ser Ala Gln Glu Ser Trp Ala Ile Lys Glu Glu His Val Ile
 20 25 30
 Ile Gln Ala Glu Phe Tyr Leu Asn Pro Asp Gln Ser Gly Glu Phe Met
 35 40 45
 Phe Asp Phe Asp Gly Asp Glu Ile Phe His Val Asp Met Ala Lys Lys
 50 55 60
 Glu Thr Val Trp Arg Leu Glu Glu Phe Gly Arg Phe Ala Ser Phe Glu
 65 70 75 80
 Ala Gln Gly Ala Leu Ala Asn Ile Ala Val Asp Lys Ala Asn Leu Glu
 85 90 95

Ile Met Thr Lys Arg Ser Asn Tyr Thr Pro Ile Thr Asn Val Pro Pro
 100 105 110
 Glu Val Thr Val Leu Thr Asn Ser Pro Val Glu Leu Arg Glu Pro Asn
 115 120 125
 Val Leu Ile Cys Phe Ile Asp Lys Phe Thr Pro Pro Val Val Asn Val
 130 135 140
 Thr Trp Leu Arg Asn Gly Lys Pro Val Thr Thr Gly Val Ser Glu Thr
 145 150 155 160
 Val Phe Leu Pro Arg Glu Asp His Leu Phe Arg Lys Phe His Tyr Leu
 165 170 175
 Pro Phe Leu Pro Ser Thr Glu Asp Val Tyr Asp Cys Arg Val Glu His
 180 185 190
 Trp Gly Leu Asp Glu Pro Leu Leu Lys His Trp Glu Phe Asp Ala Pro
 195 200 205
 Ser Pro Leu Pro Glu Thr Thr Glu Asn Val Val Cys Ala Leu Gly Leu
 210 215 220
 Thr Val Gly Leu Val Gly Ile Ile Ile Gly Thr Ile Phe Ile Ile Lys
 225 230 235 240
 Gly Val Arg Lys Ser Asn Ala Ala Glu Arg Arg Gly Pro Leu
 245 250

<210> 7
 <211> 503
 <212> PRT
 <213> người
 <400> 7

Met Glu Ala Ala Val Ala Ala Pro Arg Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr
 20 25 30
 Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys
 35 40 45
 Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys
 50 55 60
 Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg
 65 70 75 80
 Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr
 85 90 95
 Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro

-117-

```

385                      390                      395                      400
Ile Tyr Ala Met Gly Leu Val Phe Trp Glu Ile Ala Arg Arg Cys Ser
                      405                      410                      415

Ile Gly Gly Ile His Glu Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Tyr Asp Leu Val
                      420                      425                      430

Pro Ser Asp Pro Ser Val Glu Glu Met Arg Lys Val Val Cys Glu Gln
                      435                      440                      445

Lys Leu Arg Pro Asn Ile Pro Asn Arg Trp Gln Ser Cys Glu Ala Leu
                      450                      455                      460

Arg Val Met Ala Lys Ile Met Arg Glu Cys Trp Tyr Ala Asn Gly Ala
465                      470                      475                      480

Ala Arg Leu Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Ser Gln Leu Ser
                      485                      490                      495

Gln Gln Glu Gly Ile Lys Met
                      500

<210> 8
<211> 232
<212> PRT
<213> người
<400> 8
Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1                      5                      10                      15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
                      20                      25                      30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
                      35                      40                      45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
                      50                      55                      60

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

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

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

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

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

```

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

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

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

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

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

Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
225 230

<210> 9

<211> 1089

<212> PRT

<213> người

<400> 9

Met Gly Thr Ser His Pro Ala Phe Leu Val Leu Gly Cys Leu Leu Thr
1 5 10 15

Gly Leu Ser Leu Ile Leu Cys Gln Leu Ser Leu Pro Ser Ile Leu Pro
20 25 30

Asn Glu Asn Glu Lys Val Val Gln Leu Asn Ser Ser Phe Ser Leu Arg
35 40 45

Cys Phe Gly Glu Ser Glu Val Ser Trp Gln Tyr Pro Met Ser Glu Glu
50 55 60

Glu Ser Ser Asp Val Glu Ile Arg Asn Glu Glu Asn Asn Ser Gly Leu
65 70 75 80

Phe Val Thr Val Leu Glu Val Ser Ser Ala Ser Ala Ala His Thr Gly
85 90 95

Leu Tyr Thr Cys Tyr Tyr Asn His Thr Gln Thr Glu Glu Asn Glu Leu
100 105 110

Glu Gly Arg His Ile Tyr Ile Tyr Val Pro Asp Pro Asp Val Ala Phe
115 120 125

Val Pro Leu Gly Met Thr Asp Tyr Leu Val Ile Val Glu Asp Asp Asp
130 135 140

Ser Ala Ile Ile Pro Cys Arg Thr Thr Asp Pro Glu Thr Pro Val Thr
145 150 155 160

Leu His Asn Ser Glu Gly Val Val Pro Ala Ser Tyr Asp Ser Arg Gln
 165 170 175
 Gly Phe Asn Gly Thr Phe Thr Val Gly Pro Tyr Ile Cys Glu Ala Thr
 180 185 190
 Val Lys Gly Lys Lys Phe Gln Thr Ile Pro Phe Asn Val Tyr Ala Leu
 195 200 205
 Lys Ala Thr Ser Glu Leu Asp Leu Glu Met Glu Ala Leu Lys Thr Val
 210 215 220
 Tyr Lys Ser Gly Glu Thr Ile Val Val Thr Cys Ala Val Phe Asn Asn
 225 230 235 240
 Glu Val Val Asp Leu Gln Trp Thr Tyr Pro Gly Glu Val Lys Gly Lys
 245 250 255
 Gly Ile Thr Met Leu Glu Glu Ile Lys Val Pro Ser Ile Lys Leu Val
 260 265 270
 Tyr Thr Leu Thr Val Pro Glu Ala Thr Val Lys Asp Ser Gly Asp Tyr
 275 280 285
 Glu Cys Ala Ala Arg Gln Ala Thr Arg Glu Val Lys Glu Met Lys Lys
 290 295 300
 Val Thr Ile Ser Val His Glu Lys Gly Phe Ile Glu Ile Lys Pro Thr
 305 310 315 320
 Phe Ser Gln Leu Glu Ala Val Asn Leu His Glu Val Lys His Phe Val
 325 330 335
 Val Glu Val Arg Ala Tyr Pro Pro Pro Arg Ile Ser Trp Leu Lys Asn
 340 345 350
 Asn Leu Thr Leu Ile Glu Asn Leu Thr Glu Ile Thr Thr Asp Val Glu
 355 360 365
 Lys Ile Gln Glu Ile Arg Tyr Arg Ser Lys Leu Lys Leu Ile Arg Ala
 370 375 380
 Lys Glu Glu Asp Ser Gly His Tyr Thr Ile Val Ala Gln Asn Glu Asp
 385 390 395 400
 Ala Val Lys Ser Tyr Thr Phe Glu Leu Leu Thr Gln Val Pro Ser Ser
 405 410 415
 Ile Leu Asp Leu Val Asp Asp His His Gly Ser Thr Gly Gly Gln Thr
 420 425 430
 Val Arg Cys Thr Ala Glu Gly Thr Pro Leu Pro Asp Ile Glu Trp Met
 435 440 445

Ile Cys Lys Asp Ile Lys Lys Cys Asn Asn Glu Thr Ser Trp Thr Ile
 450 455 460
 Leu Ala Asn Asn Val Ser Asn Ile Ile Thr Glu Ile His Ser Arg Asp
 465 470 475 480
 Arg Ser Thr Val Glu Gly Arg Val Thr Phe Ala Lys Val Glu Glu Thr
 485 490 495
 Ile Ala Val Arg Cys Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gly Ala Glu Asn Arg
 500 505 510
 Glu Leu Lys Leu Val Ala Pro Thr Leu Arg Ser Glu Leu Thr Val Ala
 515 520 525
 Ala Ala Val Leu Val Leu Leu Val Ile Val Ile Ile Ser Leu Ile Val
 530 535 540
 Leu Val Val Ile Trp Lys Gln Lys Pro Arg Tyr Glu Ile Arg Trp Arg
 545 550 555 560
 Val Ile Glu Ser Ile Ser Pro Asp Gly His Glu Tyr Ile Tyr Val Asp
 565 570 575
 Pro Met Gln Leu Pro Tyr Asp Ser Arg Trp Glu Phe Pro Arg Asp Gly
 580 585 590
 Leu Val Leu Gly Arg Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Lys Val Val
 595 600 605
 Glu Gly Thr Ala Tyr Gly Leu Ser Arg Ser Gln Pro Val Met Lys Val
 610 615 620
 Ala Val Lys Met Leu Lys Pro Thr Ala Arg Ser Ser Glu Lys Gln Ala
 625 630 635 640
 Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Met Thr His Leu Gly Pro His Leu Asn
 645 650 655
 Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Lys Ser Gly Pro Ile Tyr Ile
 660 665 670
 Ile Thr Glu Tyr Cys Phe Tyr Gly Asp Leu Val Asn Tyr Leu His Lys
 675 680 685
 Asn Arg Asp Ser Phe Leu Ser His His Pro Glu Lys Pro Lys Lys Glu
 690 695 700
 Leu Asp Ile Phe Gly Leu Asn Pro Ala Asp Glu Ser Thr Arg Ser Tyr
 705 710 715 720
 Val Ile Leu Ser Phe Glu Asn Asn Gly Asp Tyr Met Asp Met Lys Gln
 725 730 735

Ala Asp Thr Thr Gln Tyr Val Pro Met Leu Glu Arg Lys Glu Val Ser
 740 745 750
 Lys Tyr Ser Asp Ile Gln Arg Ser Leu Tyr Asp Arg Pro Ala Ser Tyr
 755 760 765
 Lys Lys Lys Ser Met Leu Asp Ser Glu Val Lys Asn Leu Leu Ser Asp
 770 775 780
 Asp Asn Ser Glu Gly Leu Thr Leu Leu Asp Leu Leu Ser Phe Thr Tyr
 785 790 795 800
 Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Lys Asn Cys Val His
 805 810 815
 Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Leu Ala Gln Gly Lys Ile Val
 820 825 830
 Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Met His Asp Ser Asn
 835 840 845
 Tyr Val Ser Lys Gly Ser Thr Phe Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro
 850 855 860
 Glu Ser Ile Phe Asp Asn Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Asp Val Trp Ser
 865 870 875 880
 Tyr Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Gly Thr Pro Tyr
 885 890 895
 Pro Gly Met Met Val Asp Ser Thr Phe Tyr Asn Lys Ile Lys Ser Gly
 900 905 910
 Tyr Arg Met Ala Lys Pro Asp His Ala Thr Ser Glu Val Tyr Glu Ile
 915 920 925
 Met Val Lys Cys Trp Asn Ser Glu Pro Glu Lys Arg Pro Ser Phe Tyr
 930 935 940
 His Leu Ser Glu Ile Val Glu Asn Leu Leu Pro Gly Gln Tyr Lys Lys
 945 950 955 960
 Ser Tyr Glu Lys Ile His Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp His Pro Ala
 965 970 975
 Val Ala Arg Met Arg Val Asp Ser Asp Asn Ala Tyr Ile Gly Val Thr
 980 985 990
 Tyr Lys Asn Glu Glu Asp Lys Leu Lys Asp Trp Glu Gly Gly Leu Asp
 995 1000 1005
 Glu Gln Arg Leu Ser Ala Asp Ser Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Pro
 1010 1015 1020

Asp Ile Asp Pro Val Pro Glu Glu Glu Asp Leu Gly Lys Arg Asn
 1025 1030 1035
 Arg His Ser Ser Gln Thr Ser Glu Glu Ser Ala Ile Glu Thr Gly
 1040 1045 1050
 Ser Ser Ser Ser Thr Phe Ile Lys Arg Glu Asp Glu Thr Ile Glu
 1055 1060 1065
 Asp Ile Asp Met Met Asp Asp Ile Gly Ile Asp Ser Ser Asp Leu
 1070 1075 1080
 Val Glu Asp Ser Phe Leu
 1085
 <210> 10
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> người
 <400> 10
 Met Thr Val Phe Leu Ser Phe Ala Phe Leu Ala Ala Ile Leu Thr His
 1 5 10 15
 Ile Gly Cys Ser Asn Gln Arg Arg Ser Pro Glu Asn Ser Gly Arg Arg
 20 25 30
 Tyr Asn Arg Ile Gln His Gly Gln Cys Ala Tyr Thr Phe Ile Leu Pro
 35 40 45
 Glu His Asp Gly Asn Cys Arg Glu Ser Thr Thr Asp Gln Tyr Asn Thr
 50 55 60
 Asn Ala Leu Gln Arg Asp Ala Pro His Val Glu Pro Asp Phe Ser Ser
 65 70 75 80
 Gln Lys Leu Gln His Leu Glu His Val Met Glu Asn Tyr Thr Gln Trp
 85 90 95
 Leu Gln Lys Leu Glu Asn Tyr Ile Val Glu Asn Met Lys Ser Glu Met
 100 105 110
 Ala Gln Ile Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn His Thr Ala Thr Met Leu
 115 120 125
 Glu Ile Gly Thr Ser Leu Leu Ser Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys
 130 135 140
 Leu Thr Asp Val Glu Thr Gln Val Leu Asn Gln Thr Ser Arg Leu Glu
 145 150 155 160
 Ile Gln Leu Leu Glu Asn Ser Leu Ser Thr Tyr Lys Leu Glu Lys Gln
 165 170 175
 Leu Leu Gln Gln Thr Asn Glu Ile Leu Lys Ile His Glu Lys Asn Ser

-124-

-125-

His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro
 225 230 235 240
 His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp
 245 250 255
 Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr
 260 265 270
 Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys
 275 280 285
 Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu
 290 295 300
 Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile
 305 310 315 320
 Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu
 325 330 335
 His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn
 340 345 350
 Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr
 355 360 365
 Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp
 370 375 380
 Met Ser His Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met
 385 390 395 400
 Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp
 405 410 415
 Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala
 420 425 430
 Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His
 435 440 445
 Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys
 450 455 460
 Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu
 465 470 475 480
 Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val
 485 490 495
 Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg
 500 505 510

Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp
 515 520 525
 Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr
 530 535 540
 Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys
 545 550 555 560
 Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly
 565 570 575
 Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp
 580 585 590
 Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu
 595 600 605
 Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn
 610 615 620
 Tyr Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu
 625 630 635 640
 Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu
 645 650 655
 Ile Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp
 660 665 670
 Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu
 675 680 685
 Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly
 690 695 700
 Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile
 705 710 715 720
 Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser
 725

<210> 12

<211> 241

<212> PRT

<213> người

<400> 12

Met Asn Arg Cys Trp Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg
 1 5 10 15

Leu Val Ser Ala Glu Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met
 20 25 30

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

Ala

<210> 13
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> người
 <400> 13

Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Val Leu Leu Thr Gly Val
 1 5 10 15

Arg Ala Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His
 20 25 30

Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe

-129-

Fig.1

www.lonza.com
U.S. Scientific Support: 800-521-0390
scientific.support@lonza.com
EU/ROW Scientific Support: +49-221-99199-400
scientific.support.eu@lonza.com
Document # TS-12-604-3 08/11
© 2011 Lonza Walkersville, Inc.

Môi trường eagle biến đổi của Dulbecco (DMEM)

Công dụng sản phẩm

Môi trường eagle biến đổi Dulbecco được phát triển vào năm 1969 và là môi trường cải biến của môi trường eagle cơ bản (BME) mà khác với môi trường BME và MEM bởi các đặc trưng sau:

- Các vitamin 4X lớn hơn MEM. Các vitamin và axit amin lớn hơn BME
- Loại và lượng của axit amin lớn hơn MEM và BME
- Sắt (sắt nitrat)

Mô tả

- 12-604 Với 4,5 g/L glucoza, với L-glutamin
- 12-614 Với 4,5 g/L glucoza, không có L-glutamin
- 12-707 Với 1,0 g/L glucoza, không có L-glutamin
- 12-708 Với 1,0 g/L glucoza, và 25 mM Đệm HEPES, không có L-glutamin
- 12-709 Với 4,5 g/L glucoza, và 25 mM Đệm HEPES, không có L-glutamin
- 12-733 Với 4,5 g/L glucoza, không có L-glutamin, không có natri pyruvat
- 12-741 Với 4,5 g/L glucoza, với L-glutamin, không có natri pyruvat
- 12-914 Với 4,5 g/L glucoza, không có L-glutamin, screened to support hybridoma growth
- 12-917 Với 4,5 g/L glucoza, không có L-glutamin hoặc phenol đỏ
- 15-604 Với 4,5 g/L glucoza, với L-glutamin, không có natri pyruvat, bột
- 15-614 Với 4,5 g/L glucoza, không có L-glutamin hoặc natri pyruvat, bột
(Các dạng bào chế bột đòi hỏi việc bổ sung 49,3 ml/L dung dịch NaHCO₃ 7,5% hoặc 3,70 g/L of NaHCO₃ bột)

Biểu đồ tham chiếu nhanh

	Glucose	L-glutamin	Phenol đỏ	Đệm HEPES	Natri pyruvat
12-604	4,5 g/L	+	+	-	+
12-614	4,5 g/L	-	+	-	+
12-707	1,0 g/L	-	+	-	+
12-708	1,0 g/L	-	+	+	+
12-709	4,5 g/L	-	+	+	+
12-733	4,5 g/L	-	+	-	-
12-741	4,5 g/L	+	+	-	-
12-914	4,5 g/L	-	+	-	+
12-917	4,5 g/L	-	-	-	+

Fig.1 tiếp theo

Thông số kỹ thuật

	Độ vô khuẩn	pH	Nồng độ osmol (mOsm)	Đẩy mạnh sự tăng trưởng tế bào (% của đối chứng)	
12-604	Âm tính 7,0-7,4		324-352	>75%	FIO
12-614	Âm tính 7,0-7,4		324-352	>75%	FIO
12-707	Âm tính 7,0-7,4		306-346	>75%	FIO
12-708	Âm tính 7,03-7,27		300-326	>75%	FIO
12-709	Âm tính 7,0-7,4		321-351	>75%	FIO
12-733	Âm tính 7,0-7,4		318-360	>75%	FIO
12-741	Âm tính 7,0-7,4		318-360	>75%	FIO
12-914	Âm tính 7,0-7,4		324-352	>85% **	FIO
12-917	Âm tính 7,0-7,4		329-343	>75%	FIO
15-604	5,5-7,0		235-265	>75%	≤1,0
15-614	5,5-7,0		235-265	>75%	≤1,0

FIO – chỉ để tham khảo
 Kết quả của kiểm định chức năng
 Hàm lượng ẩm #1,0

Bảo quản
 2°C đến 8°C

Công dụng sản phẩm

Các sản phẩm này chỉ dùng cho mục đích nghiên cứu.

Không được chấp thuận để sử dụng ở người hoặc thú y,
 Không dùng cho người hoặc động vật,
 hoặc không sử dụng trong các quy trình lâm sàng hoặc *in vitro*.

2/68

Thông tin đặt hàng

Số catalog	Mô tả	Dung tích
12-604 F	DMEM với 4,5 g/L glucoza, với L-glutamin	500 ml
12-604Q	DMEM với 4,5 g/L glucoza, với L-glutamin	1 L
12-614F	DMEM với 4,5 g/L glucoza, không có L-glutamin	500 ml
12-614Q	DMEM với 4,5 g/L glucoza, không có L-glutamin	1 L
12-707F	DMEM với 1.0 g/L glucoza, không có L-glutamin	500 ml
12-708F	DMEM với 1.0 g/L glucoza, và 25 mM Đệm HEPES, không có L- glutamin	500 ml
12-709F	DMEM với 4,5 g/L glucoza, và 25 mM Đệm HEPES, không có L- glutamin	500 ml
12-733F	DMEM với 4,5 g/L glucoza, không có L-glutamin, không có natri pyruvat	500 ml
12-733Q	DMEM với 4,5 g/L glucoza, không có L-glutamin, không có natri pyruvat	1 L
12-741F	DMEM với 4,5 g/L glucoza, với L-glutamin, không có natri pyruvat	500 ml
12-914F	DMEM với 4,5 g/L glucoza, không có L-glutamin. screened to support hybridoma growth.	500 ml
12-917F	DMEM với 4,5 g/L glucoza, không có L-glutamin hoặc phenol đỏ.	500 ml
15-604 D	DMEM với 4,5 g/L glucoza, với L-glutamin, không có natri pyruvat, bột	1 x 10L
15-604 F	DMEM với 4,5 g/L glucoza, không có L-glutamin hoặc natri pyruvat, bột	1 X 50L
15-614D	DMEM với 4,5 g/L glucoza, không có L-glutamin hoặc natri pyruvat, bột	1 x 10L

Tất cả các nhãn hiệu có ở đây là nhãn hiệu của Lonza Group
 hoặc công ty con của nó.

3/68

Lonza

Fig. 2

Lonza Walkersville, Inc.
www.lonza.com
biotechserv@lonza.com
Tech Service: 800-521-0390
Document #TS 12-615-2 11/08
Walkersville, MD 21793-0127 USA
© 2008 Lonza Walkersville, Inc.

Môi trường Ham's F12

Công dụng

Môi trường Ham's F12 là hỗn hợp dinh dưỡng được thiết kế để nuôi cấy nhiều loại tế bào động vật có vú và tế bào lai hybridoma khi được sử dụng với huyết thanh kết hợp với hormon và transferin.

Thông số kỹ thuật

Tính vô khuẩn	pH	Nồng độ osmol (mOsm)
Âm tính	7,07-7,40	286-305
Sản lượng tăng trường tế bào ≥75% của đối chứng	Nội độc tố (EU/ml) FIO	

Bảo quản

2°C đến 8°C

Tuyên bố sử dụng sản phẩm

Các sản phẩm này chỉ dùng cho mục đích nghiên cứu.

Không được chấp thuận để sử dụng ở người hoặc thú y,
Không dùng cho người hoặc động vật,
hoặc không sử dụng trong các quy trình lâm sàng hoặc *in vitro*.

Thông tin đặt hàng

Số catalog	Mô tả	Dung tích
12-615F	Môi trường Ham's F12 với L- glutamin	500 ml

Fig.3

4/68

Lonza

www.lonza.com
 U.S. Scientific Support: 800-521-0390
 scientific.support@lonza.com
 EU/ROW Scientific Support: +49-221-99199-400
 scientific.support.eu@lonza.com
 Document # TS-12-719-3 08/11
 ©2011 Lonza Walkersville, Inc.

Môi trường DMEM: F12 (1:1)**Công dụng**

DMEM kết hợp với Hams F12 đã được sử dụng rộng rãi để chứng minh hiệu quả của các hormon và yếu tố tăng trưởng khác nhau lên các mô đích.

Mô tả

12-719 với L-glutamin, 15 mM HEPES, và 3.151 g/L glucoza
 15-719 bột-với L-glutamin, 15 mM HEPES, và 3.151 g/L glucoza.
 04-687 Môi trường bột đòi hỏi việc bổ sung 16,0 ml/L dung dịch NaHCO₃ 7,5% hoặc 1,2 g/L NaHCO₃ bột với 3,151 g/L glucoza, với L-glutamin không có HEPES

Thông số kỹ thuật

	Độ vô khuẩn	pH	Nồng độ osmol (mOsm)
12-719	Âm tính	7,0-7,4	286-356
15-719*	Âm tính	4,5-6,5	260-290
04-687	Âm tính	FIO	FIO
	Sự đẩy mạnh sự tăng trưởng tế bào > 75% của đối chứng	Nội độc tố (EU/ml) FIO	Độ ẩm
12-719	> 75% của đối chứng	≤ 1 EU/ml	≤ 2%
15-719*	chứng		
04-687	--	FIO	--

* pH, Nồng độ osmol, nội độc tố, và độ ẩm được ghi nhận mà không có NaHCO₃; NaHCO₃ được bổ sung cho thử nghiệm tăng trưởng tế bào.

Bảo quản

2°C đến 8°C

Tuyên bố sử dụng sản phẩm

Các sản phẩm này chỉ dùng cho mục đích nghiên cứu.

Không được chấp thuận để sử dụng ở người hoặc thú y,
 Không dùng cho người hoặc động vật,
 hoặc không sử dụng trong các quy trình lâm sàng hoặc *in vitro*.

Thông tin đặt hàng

Số catalog	Mô tả	Dung tích
12-719F	DMEM: F12 với L-glutamin, 15 mM HEPES, và 3,151 g/L glucoza	500 ml
12-719Q	DMEM: F12 với L-glutamin, 15 mM HEPES, và 3,151 g/L glucoza	1L
15-719D	DMEM: F12 bột-với L- 1 x 10L glutamin, 15 mM HEPES, và 3,151 g/L glucoza. Môi trường bột đòi hỏi việc bổ sung 16,0 ml/L dung dịch NaHCO ₃ , 7,5% hoặc 1,2 g/L NaHCO ₃ bột	1x10L
04-687Q	DMEM: F12 với 3,151 g/L glucoza, với L-glutamin, không có HEPES	1L

5/68

Fig. 4 Cascade Biologies™
invitrogen cell culture

GIBCO
invitrogen cell culture

Môi trường 171, Môi trường 171PRF, và MEGS

Môi trường 171

M-171-500

500 ml

Môi trường 171PRF (không chứa Phenol đỏ)

M-171PRF-500

500 ml

Mô tả sản phẩm

Môi trường 171 và Môi trường 171PRF là môi trường nuôi cấy mô lông, vô trùng được dự tính để sử dụng như một thành phần trong môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh cho sự tăng trưởng của các tế bào biểu mô tuyến vú bình thường của người. Môi trường 171 là môi trường cơ bản chứa axit amin thiết yếu và không thiết yếu, vitamin, các hợp chất hữu cơ khác, khoáng vi lượng và muối vô cơ. Môi trường 171PRF là phiên bản không chứa phenol đỏ của Môi trường 171. Các môi trường này không chứa kháng sinh, thuốc chống co thắt, hormon, yếu tố tăng trưởng hoặc protein. Các môi trường này là FIEPES và được đệm bicarbonat và được thiết kế để sử dụng trong tủ ấp với bầu khí quyển 5% CO₂ / 95% không khí. Để hỗ trợ cấy trải và tăng sinh lâu dài các tế bào biểu mô tuyến vú bình thường của người, các môi trường này phải được bổ sung với chất bổ sung tăng trưởng biểu mô tuyến vú (MEGS, số catalog S-015-5).

Mục đích sử dụng

Môi trường 171 được dự tính để sử dụng trong nuôi cấy thông thường các tế bào biểu mô tuyến vú bình thường của người. Môi trường 171PRF được dự tính để sử dụng cho các nhà nghiên cứu muốn nuôi cấy các tế bào biểu mô tuyến vú bình thường của người trong trường hợp không có phenol đỏ. Khi được bổ sung MEGS, các môi trường này sẽ hỗ trợ việc cấy trải và tăng sinh các tế bào biểu mô tuyến vú bình thường của người với mật độ từ $2,5 \times 10^3$ tế bào / cm² và 8×10^4 tế bào / cm². **Sản phẩm này chỉ sử dụng cho nghiên cứu. Không sử dụng cho động vật, con người hoặc các quy trình chẩn đoán.**

Thận trọng: Nếu xử lý không đúng cách, một số thành phần của sản phẩm này có thể gây nguy hiểm cho sức khỏe. Thực hiện các biện pháp phòng ngừa thích hợp khi xử lý sản phẩm này, bao gồm việc mặc quần áo bảo hộ và kính bảo hộ. Vứt bỏ đúng cách.

Bảo quản và Tính ổn định

Môi trường 171 và Môi trường 171PRF được bảo quản ở 4° C tại cơ sở của chúng tôi và được vận chuyển ở nhiệt độ môi trường. Sau khi nhận, các môi trường này nên được bảo quản ở 4° C và không nên đông lạnh. Tránh ánh sáng. Một vài thành phần của môi trường nuôi cấy mô này không bền với ánh sáng, và chúng tôi khuyến nghị rằng môi trường này không nên được tiếp xúc với ánh sáng trong thời gian dài. Nếu môi trường được làm ấm trước khi sử dụng, không được vượt quá 37°C. Khi được bảo quản trong tối ở 4°C, sản phẩm sẽ ổn định cho đến ngày hết hạn trên nhãn.

Điều chế môi trường 171 bổ sung

1. Rửa đông một chai MEGS. Lấy một chai Môi trường từ kho bảo quản lạnh. Đảm bảo rằng nắp của các bình vẫn chặt.
2. Xoáy nhẹ chai chứa chất bổ sung. Tránh để chất bổ sung bắn vào nắp chai hoặc làm cho chất bổ sung bị sủi bọt.
3. Lau bên ngoài chai đựng bằng dung dịch khử trùng như etanol 70% hoặc isopropanol.
4. Sử dụng kỹ thuật vô trùng trong tủ cấy dòng chảy tầng, chuyển toàn bộ thành phần bên trong chai chứa chất bổ sung sang chai môi trường.
5. Đậy chặt nắp chai môi trường được bổ sung và xoáy nhẹ thành phần để đảm bảo dung dịch đồng nhất. Tránh làm môi trường bị sủi bọt.

Bảo quản và Tính ổn định của Môi trường 171 được bổ sung

Khi môi trường 171 hoặc môi trường 171PRF được bổ sung với MEGS, môi trường được bổ sung nên được bảo quản ở trong tối ở 4° C và không nên đông lạnh. Khi bảo quản trong tối ở 4° C, môi trường được bổ sung ổn định trong 1 tháng.

Tài liệu tham khảo được chọn

Công thức môi trường 171 được dựa trên môi trường MCDB 170, với các cải biến.
Hammond SL, Ham RG, Stampfer MR; PNAS 81:5435- 5439, 1984

Chỉ dùng cho nghiên cứu.

Life Technologies Corporation • 5791 Van Allen Way • Carlsbad • CA 92008 • Tel: 800.955.6288 • www.invitroaen.com • E-mail: tech_support@invitrogen.com
MAN0001585

Sửa đổi: 30 tháng 5 năm 2009

6/68

Fig. 4 tiếp theo

GIBCO®
 invitrogen cell culture

 Cascade Biologies™
 invitrogen cell culture

MEGS
Chất bổ sung tăng trưởng biểu mô tuyến vú
 Số catalog S-015-5
 5 ml

Mô tả sản phẩm

Chất bổ sung tăng trưởng biểu mô tuyến vú (MEGS) là dung dịch vô trùng, đậm đặc (100X) được sử dụng như một thành phần trong môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh cho sự tăng trưởng của các tế bào biểu mô tuyến vú ở người bình thường. Mỗi chai MEGS 5 ml chứa tất cả các yếu tố tăng trưởng, hormon và chiết xuất mô cần thiết cho việc nuôi cấy tế bào biểu mô tuyến vú bình thường của người và là lượng bổ sung chính xác cho chai Môi trường 171 hoặc Môi trường 171PRF 500 ml. MEGS là chất bổ sung cân bằng ion có chứa chiết xuất tuyến yên bò (BPE), insulin bò, hydrocortison và yếu tố tăng trưởng biểu bì tái tổ hợp của người. Khi chai Môi trường 171 hoặc Môi trường 171PRF 500 ml được bổ sung MEGS, nồng độ cuối cùng của các thành phần trong môi trường được bổ sung là: BPE, 0,4% thể tích/thể tích; insulin bò, 5 pg/ml; hydrocortison, 0,5 pg/ml; và yếu tố tăng trưởng biểu bì tái tổ hợp của người, 3 ng/ml.

Mục đích sử dụng

MEGS được dự tính để sử dụng kết hợp với môi trường 171 hoặc môi trường 171PRF để nuôi cấy thông thường không có huyết thanh của các tế bào biểu mô tuyến vú bình thường của người.

Sản phẩm này chỉ sử dụng cho nghiên cứu. Không sử dụng cho động vật, con người hoặc các quy trình chẩn đoán.

Thận trọng: Nếu xử lý không đúng cách, một số thành phần của sản phẩm này có thể gây nguy hiểm cho sức khỏe. Thực hiện các biện pháp phòng ngừa thích hợp khi xử lý sản phẩm này, bao gồm việc mặc quần áo bảo hộ và kính bảo hộ. Vứt bỏ đúng cách.

Bảo quản và tính ổn định

MEGS được bảo quản ở -20° C tại cơ sở của chúng tôi và được vận chuyển trên đá khô. Sau khi nhận, sản phẩm nên được bảo quản ở -20°C trong tủ đông không tự rã đông. Khi được bảo quản ở -20 ° C, sản phẩm ổn định cho đến ngày hết hạn ghi trên nhãn.

Sau khi Bảo quản trong thời gian dài ở -20 ° C, MEGS có thể chứa một lượng nhỏ kết tủa. Kết tủa này tạo ra từ vật liệu không hòa tan khi lạnh trong thành phần BPE của MEGS và sẽ không ảnh hưởng đến chất lượng của sản phẩm.

Rã đông

Để rã đông, đặt sản phẩm vào chậu nước ở 37°C hoặc để qua đêm ở 4° C. Nếu rã đông trong chậu nước, không để sản phẩm ở 37° C sau khi đã rã đông sản phẩm. Để biết hướng dẫn việc thêm MEGS vào môi trường 171, vui lòng tham khảo hướng dẫn đi kèm với môi trường cơ bản.

Tài liệu tham khảo được chọn

Công thức MEGS được dựa trên sự bổ sung được công bố của môi trường MCDB 170, với các cải biến.

Hammond SL, Ham RG, Stampfer MR; PNAS 81:5435- 5439, 1984

Cấp phép nhân sử dụng hạn chế số 5: Invitrogen Technology

Việc mua sản phẩm này mang lại cho người mua quyền không thể chuyển nhượng để sử dụng lượng sản phẩm đã mua và các thành phần của sản phẩm trong quá trình nghiên cứu do người mua thực hiện (cho dù người mua là một tổ chức học thuật hay vì lợi nhuận). Người mua không thể bán hoặc chuyển giao (a) sản phẩm này (b) các thành phần hoặc (c) các vật liệu được tạo ra từ sản phẩm này hoặc các thành phần của nó cho bên thứ ba hoặc sử dụng sản phẩm này hoặc các thành phần hoặc vật liệu được làm bằng sản phẩm này hoặc các thành phần của nó cho Mục đích Thương mại. Người mua có thể chuyển giao thông tin hoặc các vật liệu được tạo ra thông qua việc sử dụng sản phẩm này cho cộng tác viên khoa học, với điều kiện việc chuyển giao đó không phải cho bất kỳ Mục đích Thương mại nào và cộng tác viên đó đồng ý bằng văn bản (a) không chuyển giao các tài liệu đó cho bất kỳ bên thứ ba nào, và (b) sử dụng các vật liệu và/hoặc thông tin được chuyển giao đó chỉ cho mục đích nghiên cứu chứ không phải cho Mục đích Thương mại. Mục đích Thương mại có nghĩa là bất kỳ hoạt động nào của một bên để xem xét và có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: (1) sử dụng sản phẩm hoặc các thành phần của nó trong việc sản xuất; (2) sử dụng sản phẩm hoặc các thành phần của nó để cung cấp dịch vụ, thông tin hoặc dữ liệu; (3) sử dụng sản phẩm hoặc các thành phần của sản phẩm cho mục đích điều trị, chẩn đoán hoặc phòng bệnh; hoặc (4) bán lại sản phẩm hoặc các thành phần của nó, cho dù sản phẩm đó hoặc các thành phần của nó được bán lại để sử dụng trong nghiên cứu hay không. Đối với các sản phẩm mà cần có nhiều giấy phép nhân sử dụng hạn chế, các điều khoản của giấy phép nhân hạn chế sử dụng hạn chế nhất sẽ được áp dụng. Life Technologies Corporation sẽ không khiếu nại đối với người mua về việc xâm phạm các bằng sáng chế do Life Technologies Corporation sở hữu hoặc kiểm soát liên quan đến sản phẩm này dựa trên việc sản xuất, sử dụng hoặc bán sản phẩm điều trị, chẩn đoán lâm sàng, vắc xin hoặc phòng bệnh được phát triển trong quá trình nghiên cứu của người mua trong đó sản phẩm này hoặc các thành phần của nó đã được sử dụng, với điều kiện cả sản phẩm này và bất kỳ thành phần nào của nó đều không được sử dụng để sản xuất sản phẩm đó. Nếu người mua không sẵn sàng chấp nhận các hạn chế của tuyên bố sử dụng hạn chế này, Life Technologies sẵn sàng chấp nhận trả lại sản phẩm với một khoản hoàn lại đầy đủ. Để biết thông tin về việc cấp giấy cho sản phẩm này cho các mục đích khác ngoài nghiên cứu, hãy liên hệ với Bộ phận cấp phép, Life Technologies Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008. Điện thoại (760) 603-7200. Fax (760) 602-6500. Email: outlicensing@invitrogen.com.

©2009 Life Technologies Corporation. All rights reserved.

Chỉ sử dụng cho nghiên cứu. Không dành cho mục đích sử dụng chẩn đoán hoặc điều trị cho động vật hoặc con người bất kỳ.

Chỉ sử dụng cho nghiên cứu.

Life Technologies Corporation • 5791 Van Allen Way • Carlsbad • CA 92008 • Tel: 800.955.6288 • www.invitrogen.com • E-mail: tech_support@invitrogen.com
 MAN0001585

Sửa đổi: 30 tháng 5 năm 2009

7/68

Fig. 5*Danh mục thành phần môi trường PTT6*

Danh mục thành phần môi trường	Tên công ty	Số catalog
--------------------------------	-------------	------------

Môi trường cơ bản

DMEM (còn được gọi là môi trường PTT6 cơ bản)	Lonza	I2-604F
DMEM/F12	Lonza	12-719F
M171	Life technologies	M171500

Huyết thanh

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

Kháng sinh

Penixilin- Streptomycin- Amphotericin B	Lonza	17-745E
---	-------	---------

Chất bổ sung

Adenin (tùy ý)	Sigma	A8626-25G
Hydrocortison (tùy ý)	Sigma	H-0888
Yếu tố tăng trưởng biểu bì	Millipore	GF-144
T3 (muối 3,3',5-Triiodo-L-thyronin natri) (tùy ý)	Sigma	200-223-5
Insulin của người tái tổ hợp AOF	Life Technologies	A113821J

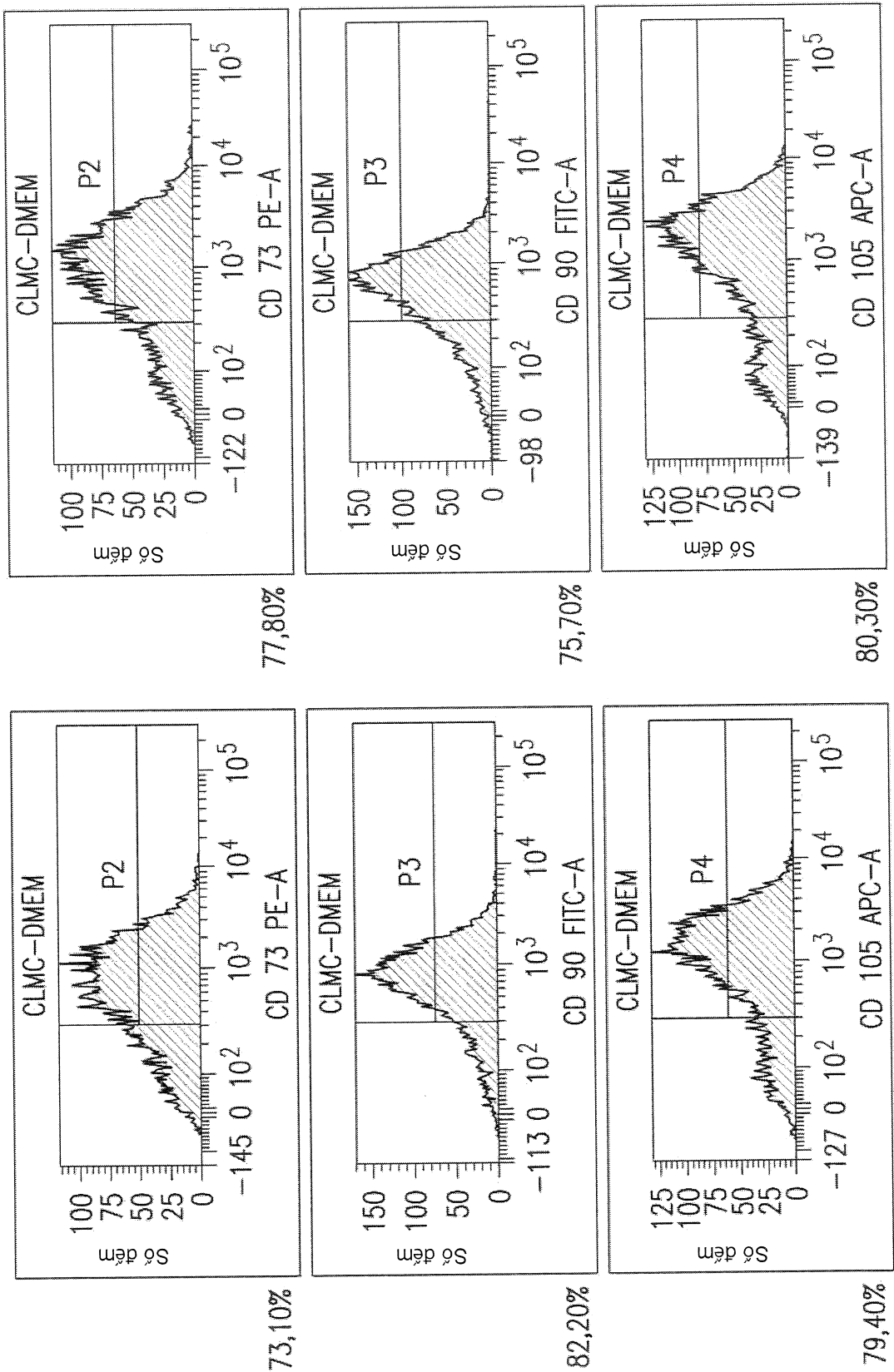


FIG.6A

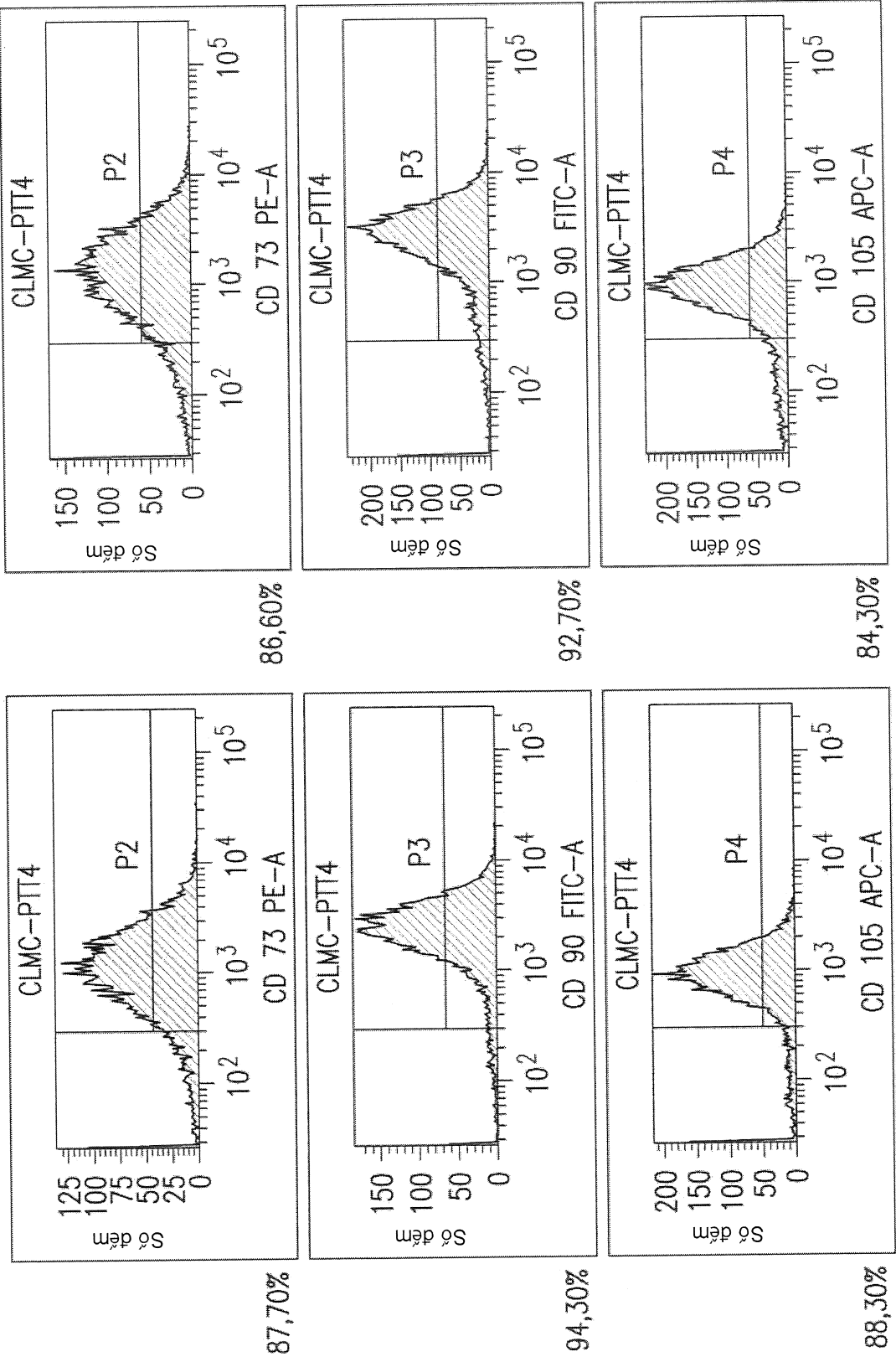


FIG.6B

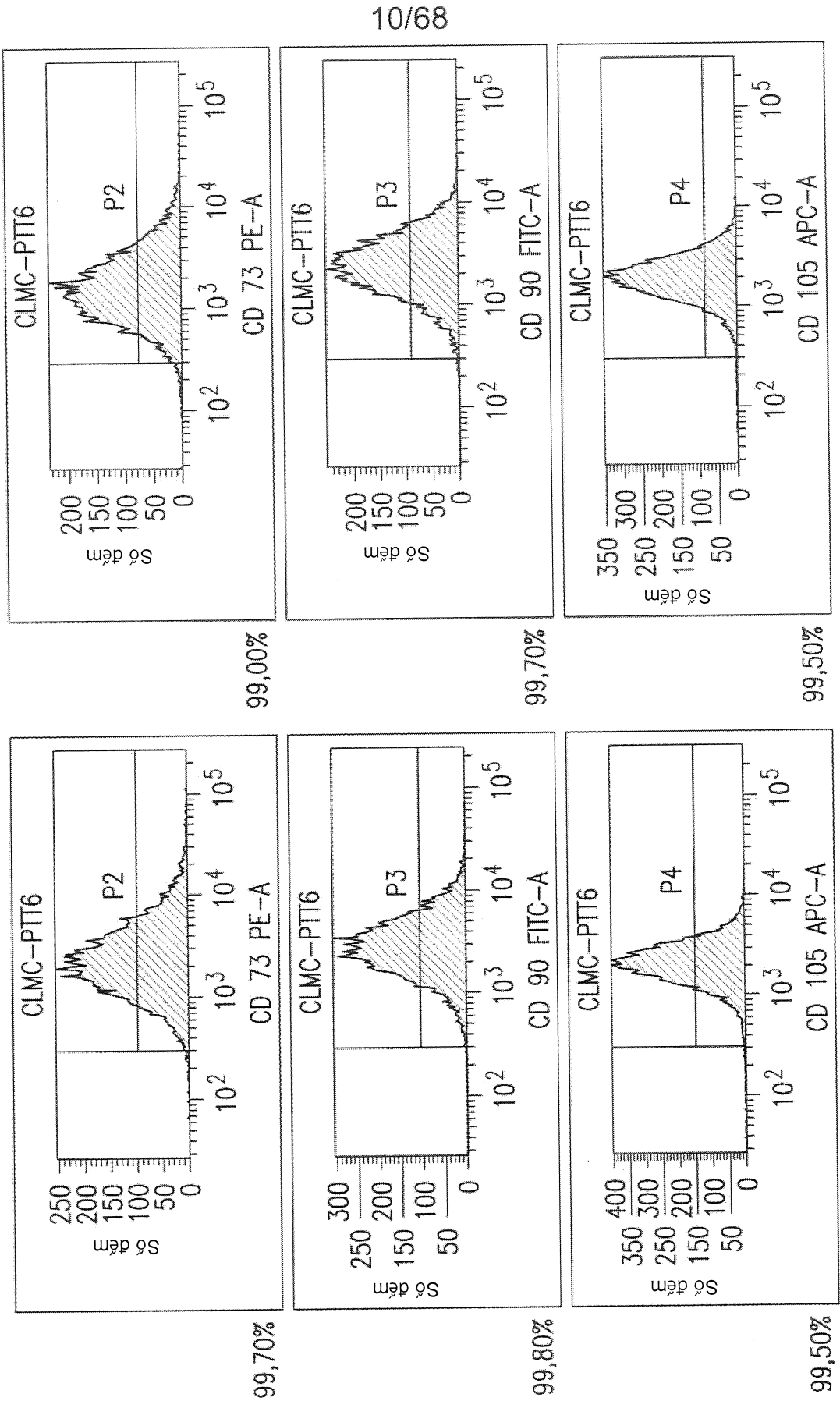
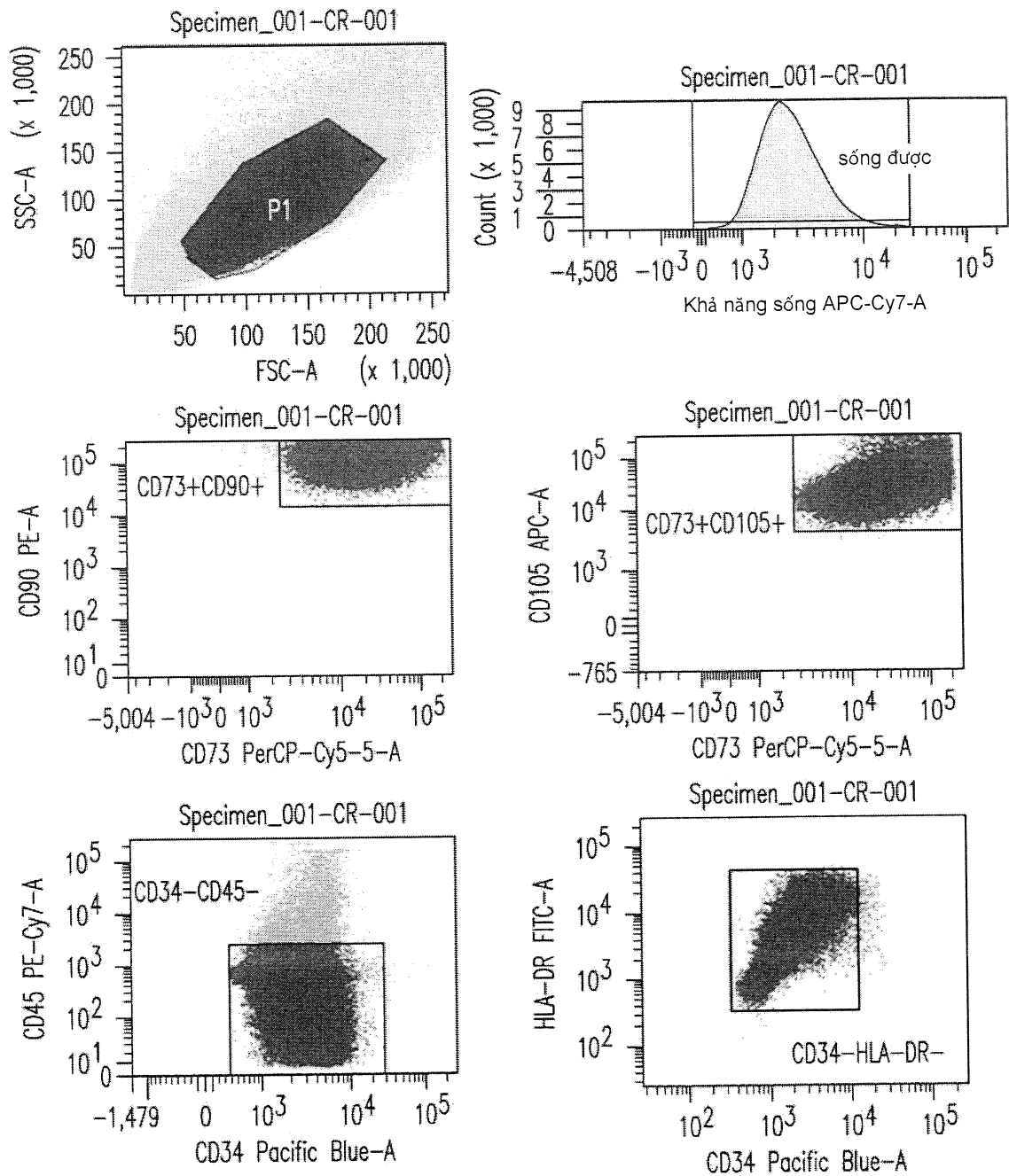


FIG.6C

11/68

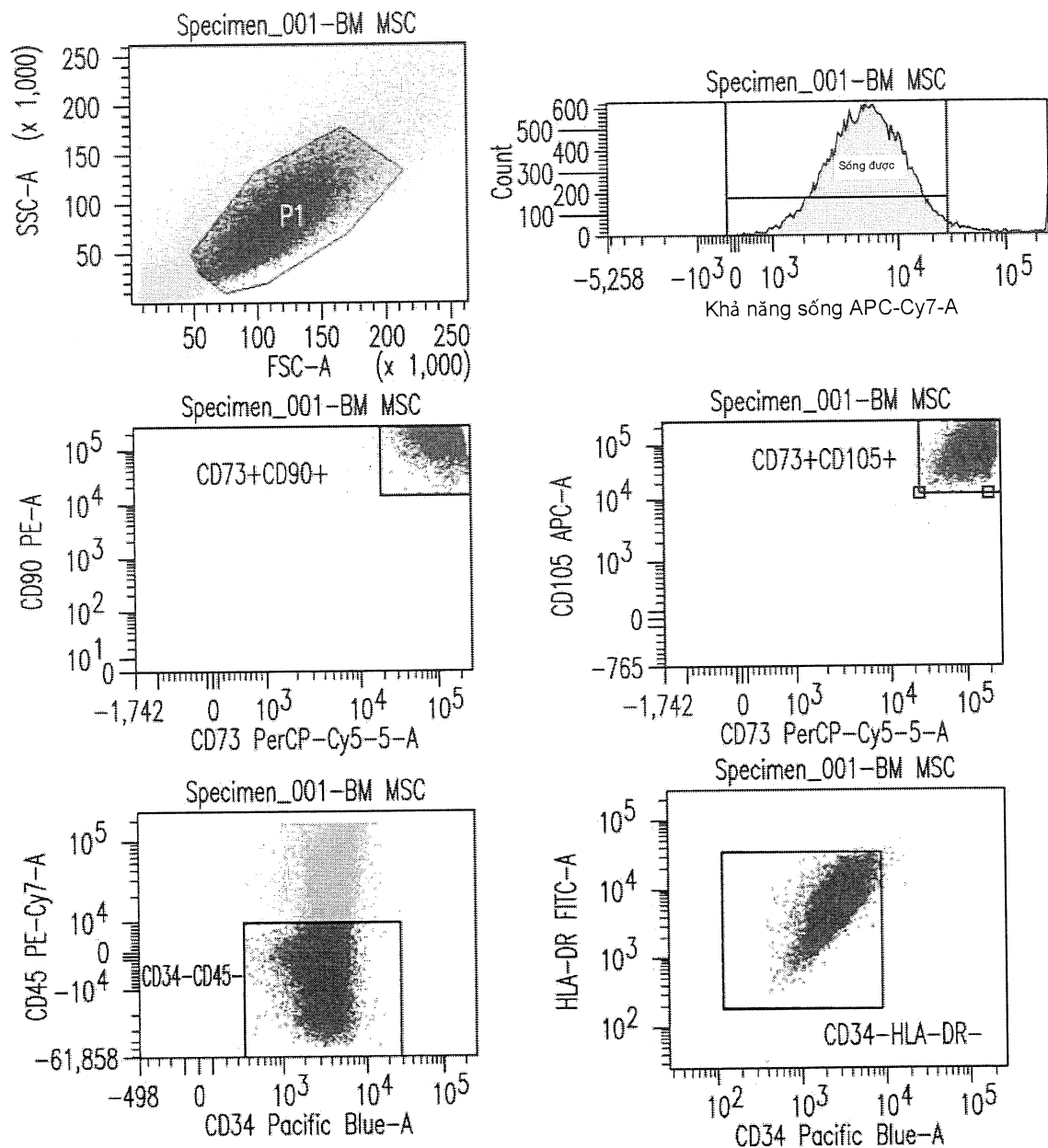
BD FACSDiva 8.0.1



Ống: CR-001			
Quần thể	#Sự kiện	%Bố mẹ	%Tổng
Tất cả các sự kiện	540,988	####	100,0
P1	425,093	78,6	78,6
Sống được	414,643	97,5	76,6
CD73+CD90+	414,554	100,0	76,6
CD73+CD105+	414,490	100,0	76,6
CD34-CD45-	411,206	99,2	76,0
CD34-HLA-DR	411,061	100,0	76,0

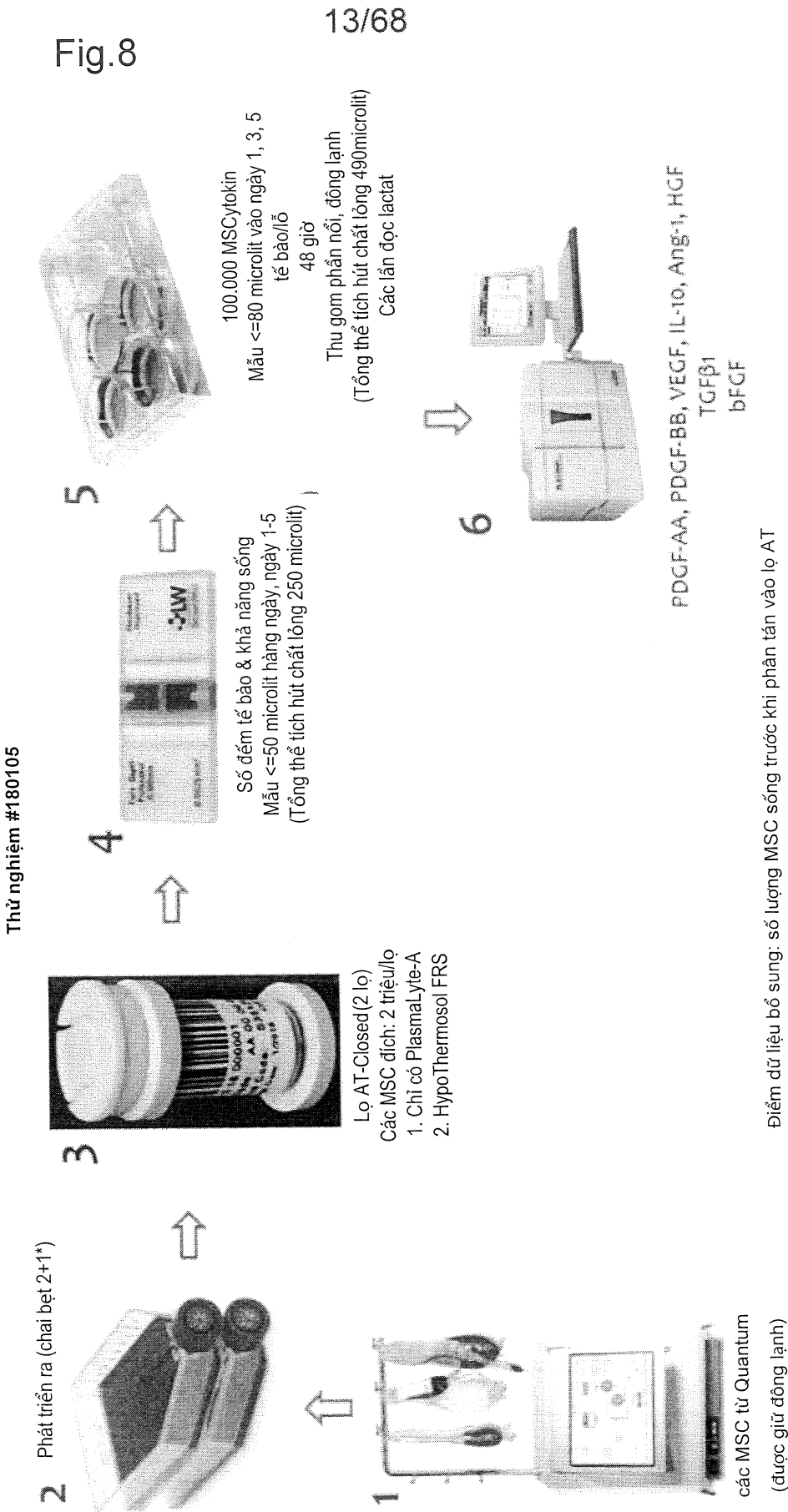
FIG.7A

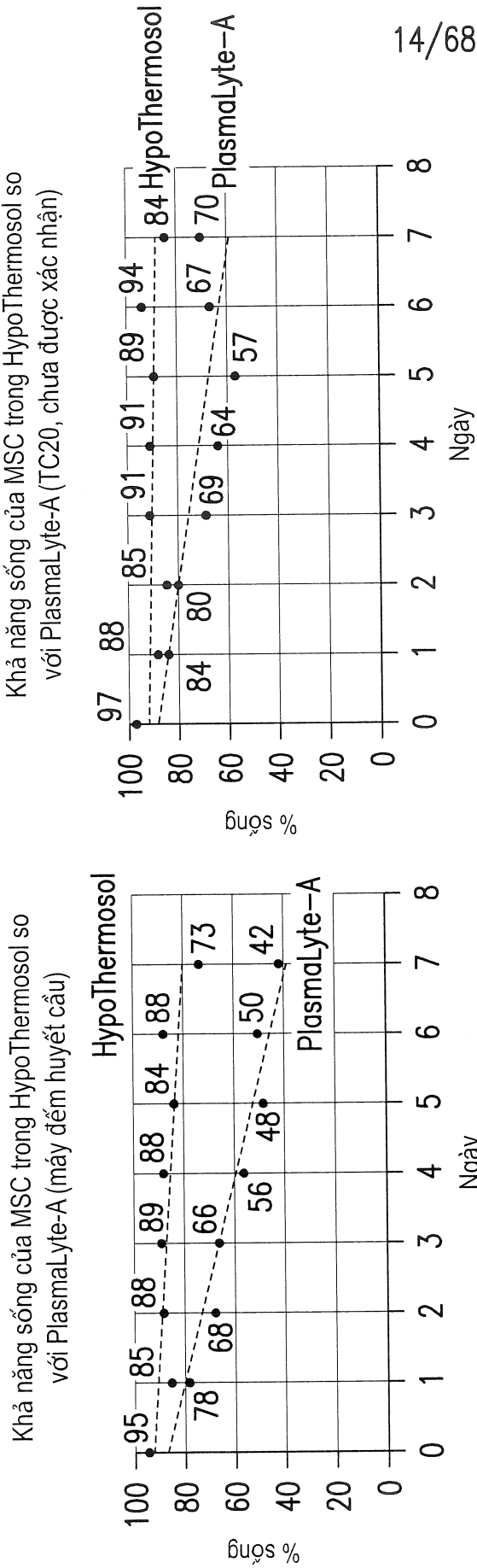
12/68



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

FIG.7B



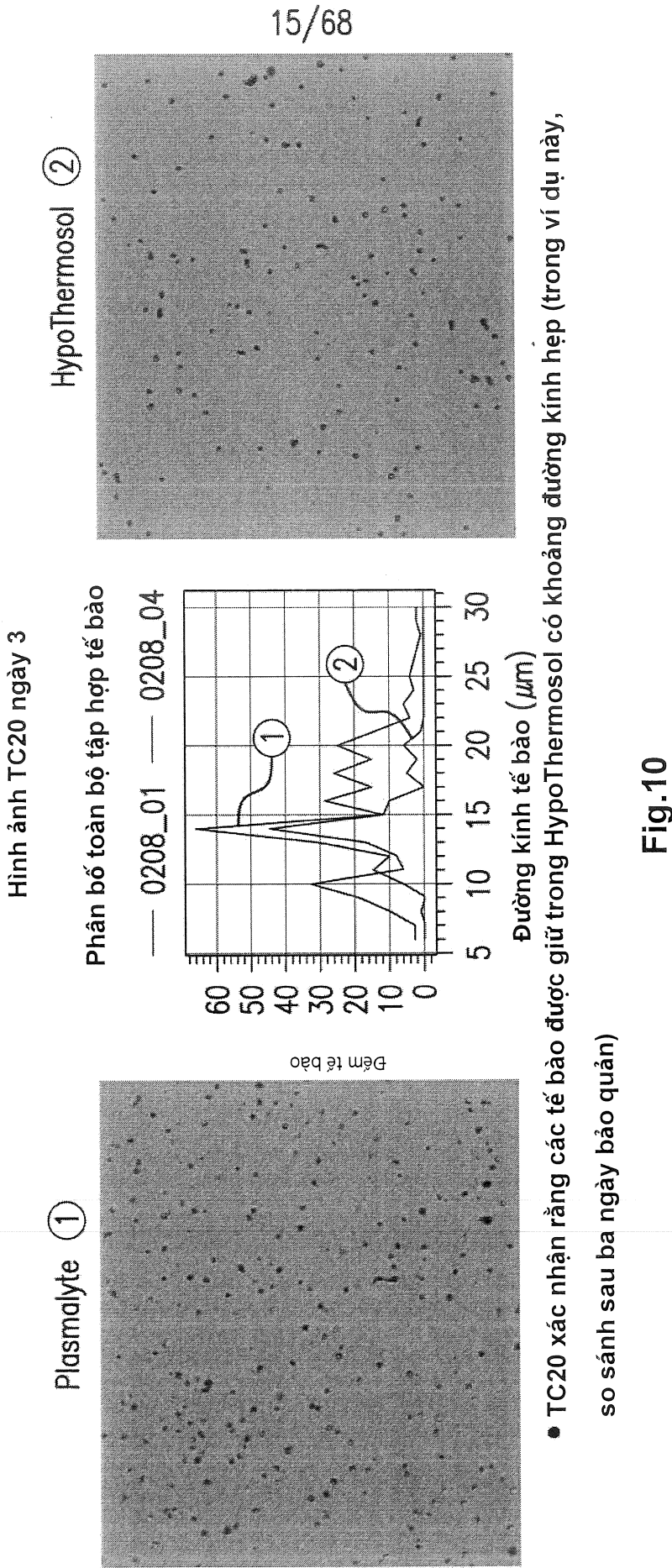


14/68

Tổng số đếm tế bào	Huyết cầu kế	Độ lệch chuẩn	% Độ lệch chuẩn	TC20	Độ lệch chuẩn	% Độ lệch chuẩn
HypoThermosol:	802.500	119.155	14,8	758.357	104.994	13,8
Plasmalyte:	1.608.571	213.902	13,3	1.301.571	208.991	16,1

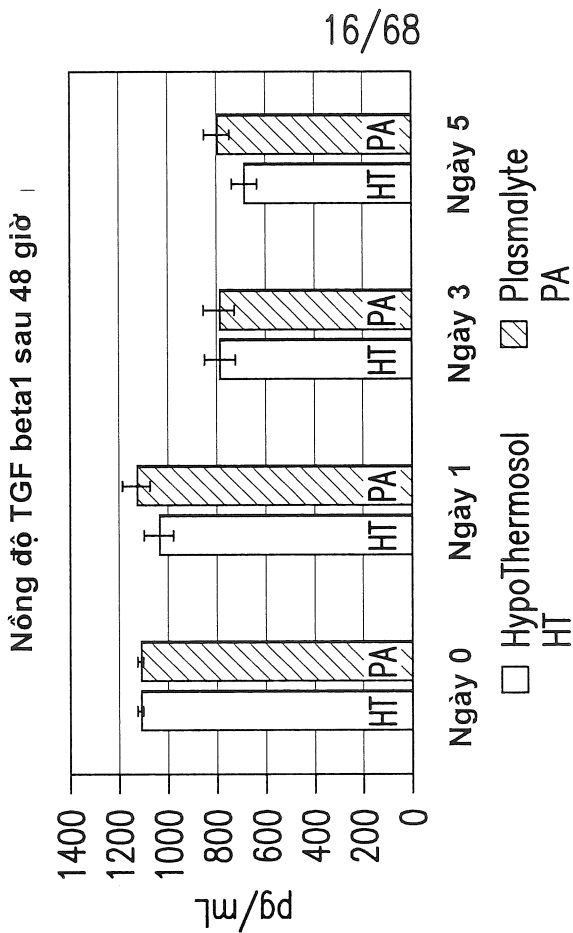
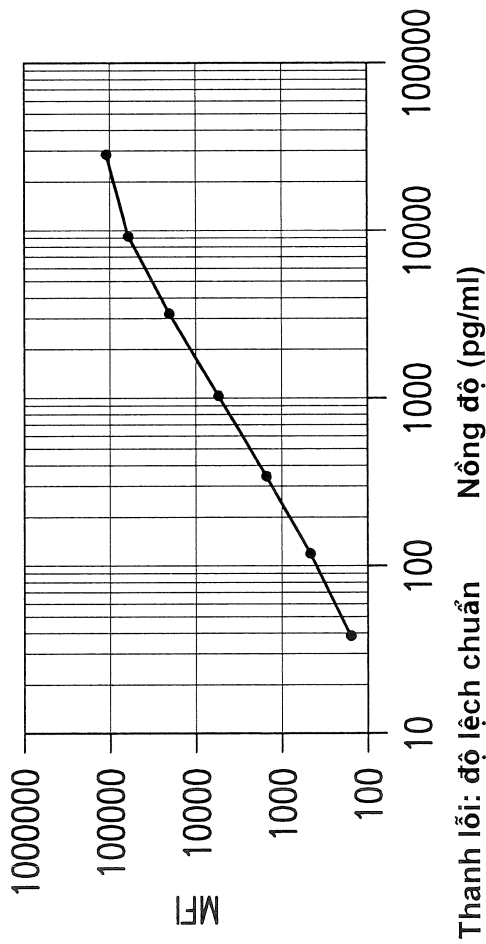
- HypoThermosol hỗ trợ một cách đáng chú ý sự tích hợp màng và có lẽ là sự sống sót kéo dài cả tuần (6 ngày)
- Tất cả các số đếm dựa trên các bản đọc lặp mà nằm trong 10% của nhau. Theo SOP CR D2.600.1.
- Trong quá trình đếm, các tế bào được bảo quản trong HypoThermosol là nhỏ hơn một cách đáng chú ý và có cạnh nhẵn và rõ. Trái lại, các tế bào trong Plasmalyte có khoảng kích thước khác nhau.

Fig.9



Nồng độ TGFbeta1 sau 48 giờ trong môi trường từ các MSC bản quản trong HypoThermosol hoặc PlasmaLyte

Thử nghiệm đường cong chuẩn TGF beta1 180105



Độ ổn định của CR001C (Bảo quản ở -80 độ C)				
Ngày bảo quản	2	137	140	332
Nồng độ (pg/ml)	1046 ± 34	830 ± 33	952 ± 22	1046 ± 34

Fig.11

17/68

Nồng độ PDGF-BB sau 48 giờ trong môi trường từ các MSC bản quản trong HypoThermosol hoặc PlasmaLyte

Thử nghiệm đường cong chuẩn PDGF-BB 180105

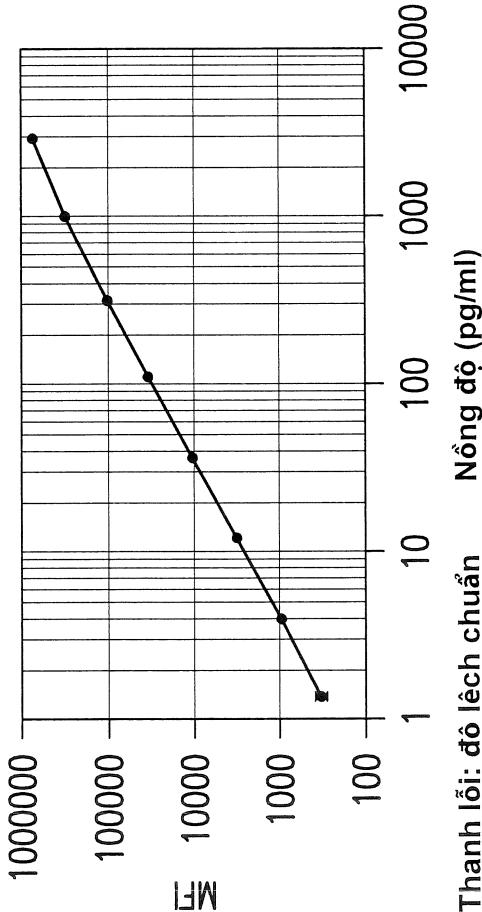
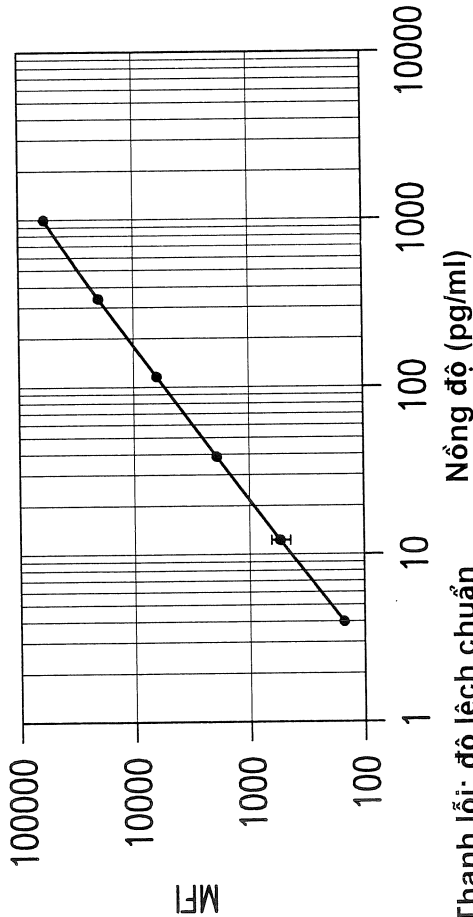


Fig.12

Không phát hiện thấy PDGF-BB ở mẫu bất kỳ

Nồng độ IL-10 sau 48 giờ trong môi trường từ các MSC bản quản trong HypoThermosol hoặc PlasmaLyte

Thử nghiệm đường cong chuẩn IL-10 180105



Thanh lõi: độ lệch chuẩn

Nồng độ (pg/ml)

Không phát hiện thấy IL-10 ở mẫu bất kỳ

Fig.13

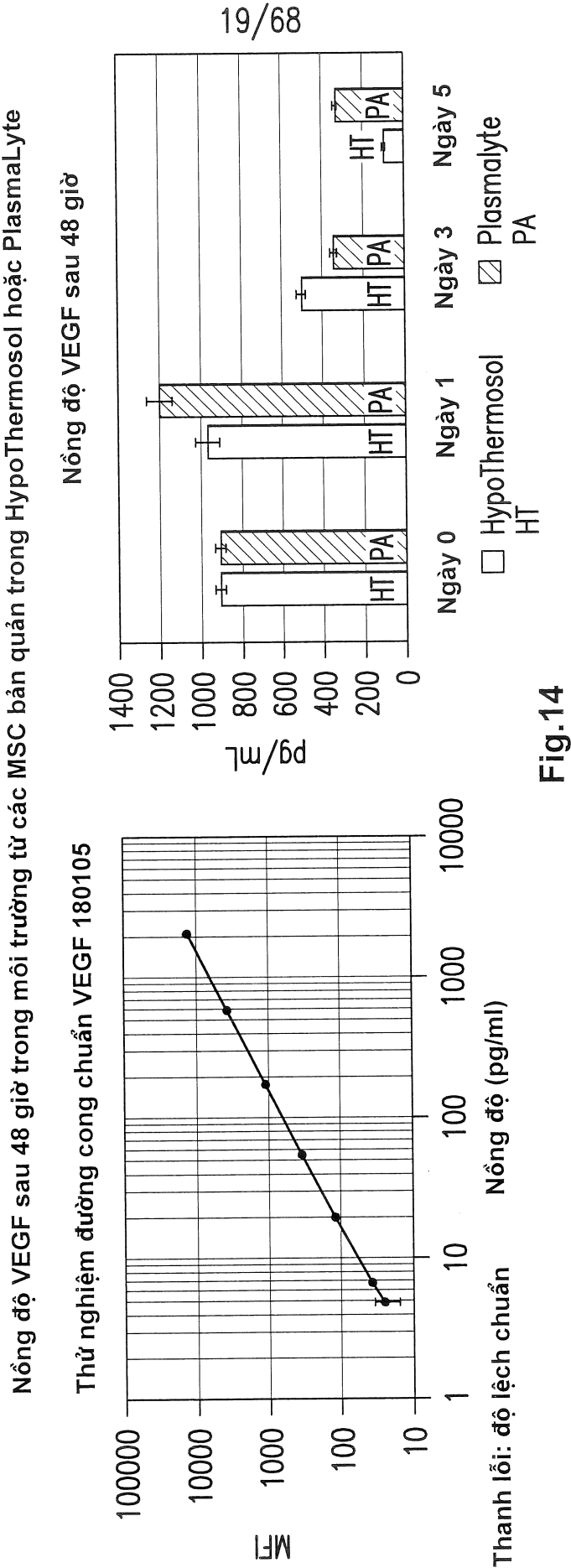
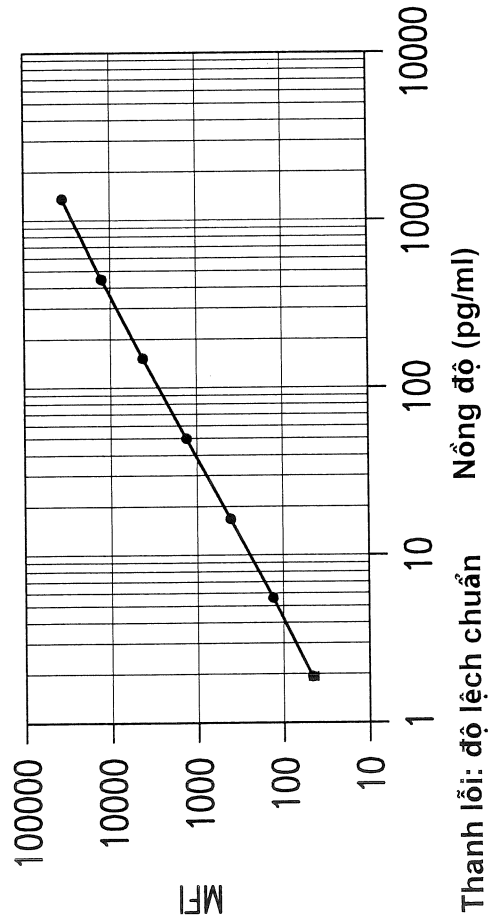


Fig.14

Nồng độ PDGF-AA sau 48 giờ trong môi trường từ các MSC bản quản trong HypoThermosol hoặc PlasmaLyte

Thử nghiệm đường cong chuẩn PDGF-AA 180105



Nồng độ PDGF-AA sau 48 giờ

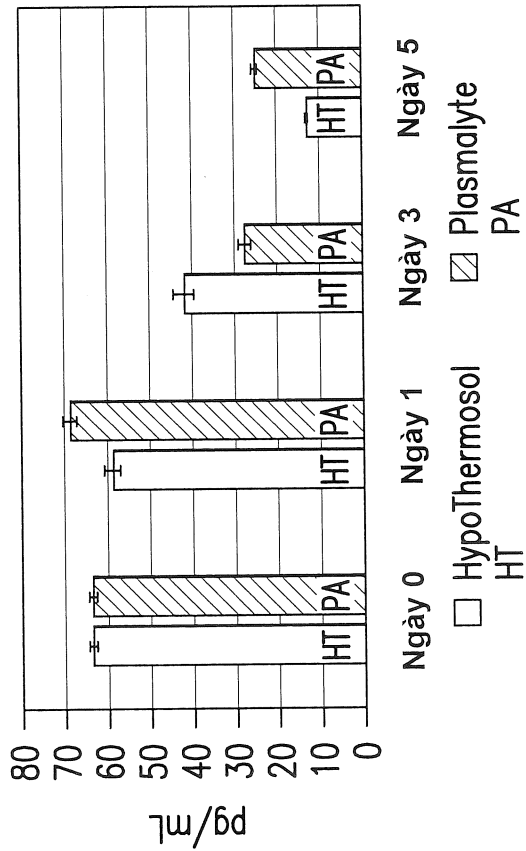


Fig.15

Nồng độ Ang-1 sau 48 giờ trong môi trường HypoThermosol hoặc PlasmaLyte

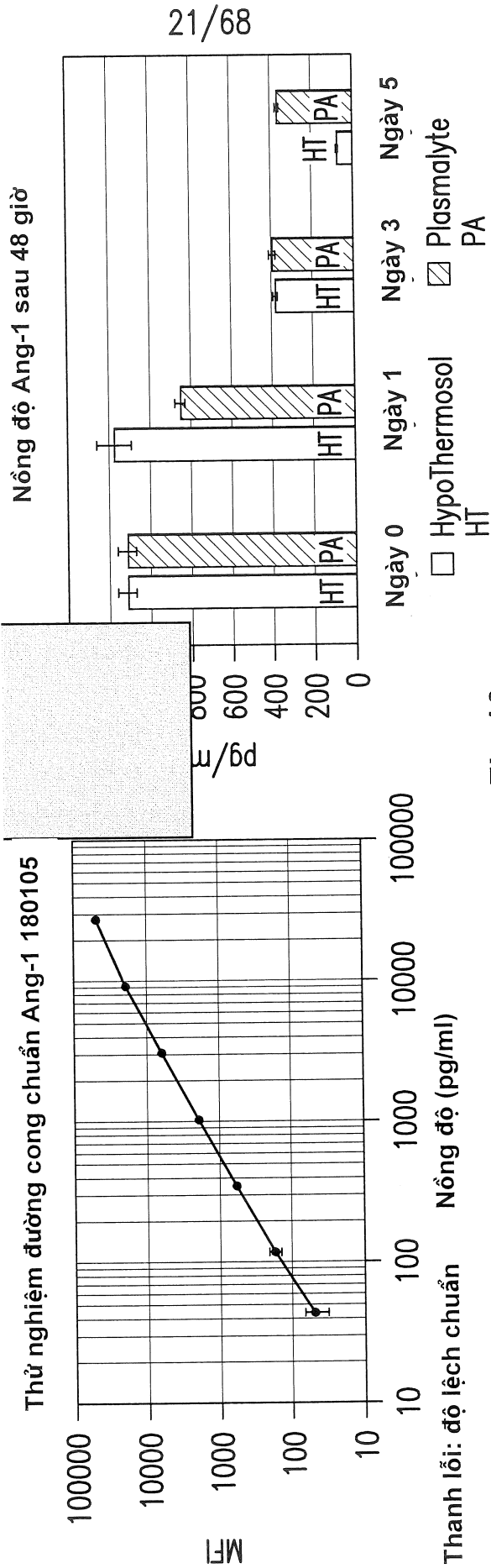


Fig.16

Nồng độ HGF sau 48 giờ trong môi trường từ các MSC bản quản trong HypoThermosol hoặc PlasmaLyte

Thử nghiệm đường cong chuẩn HGF 180105

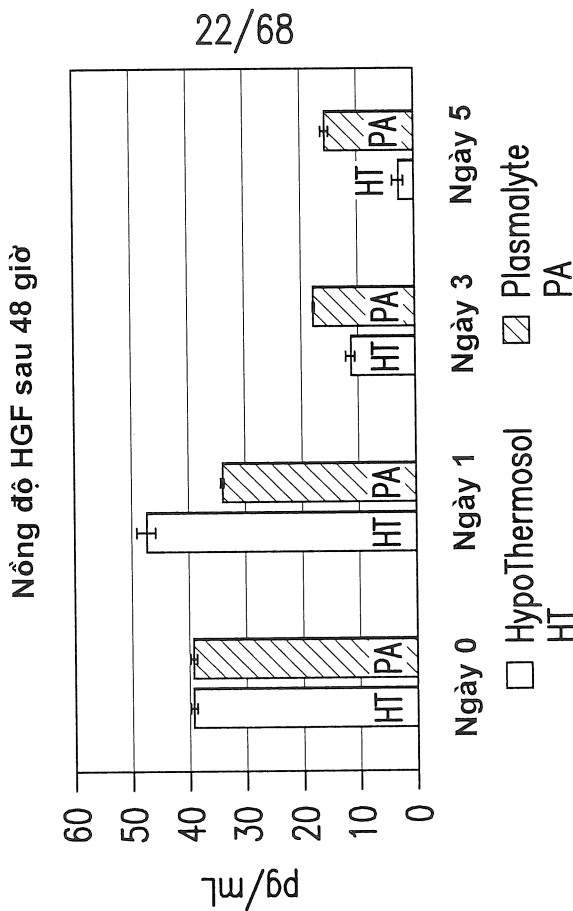
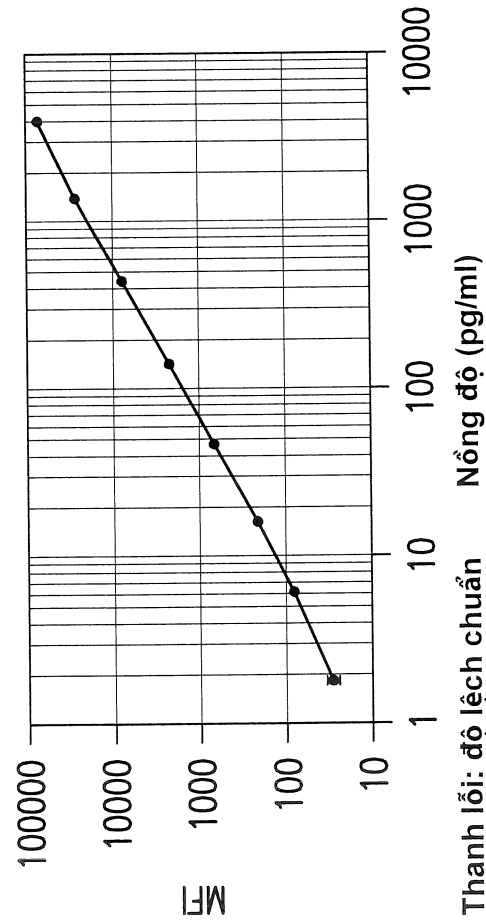
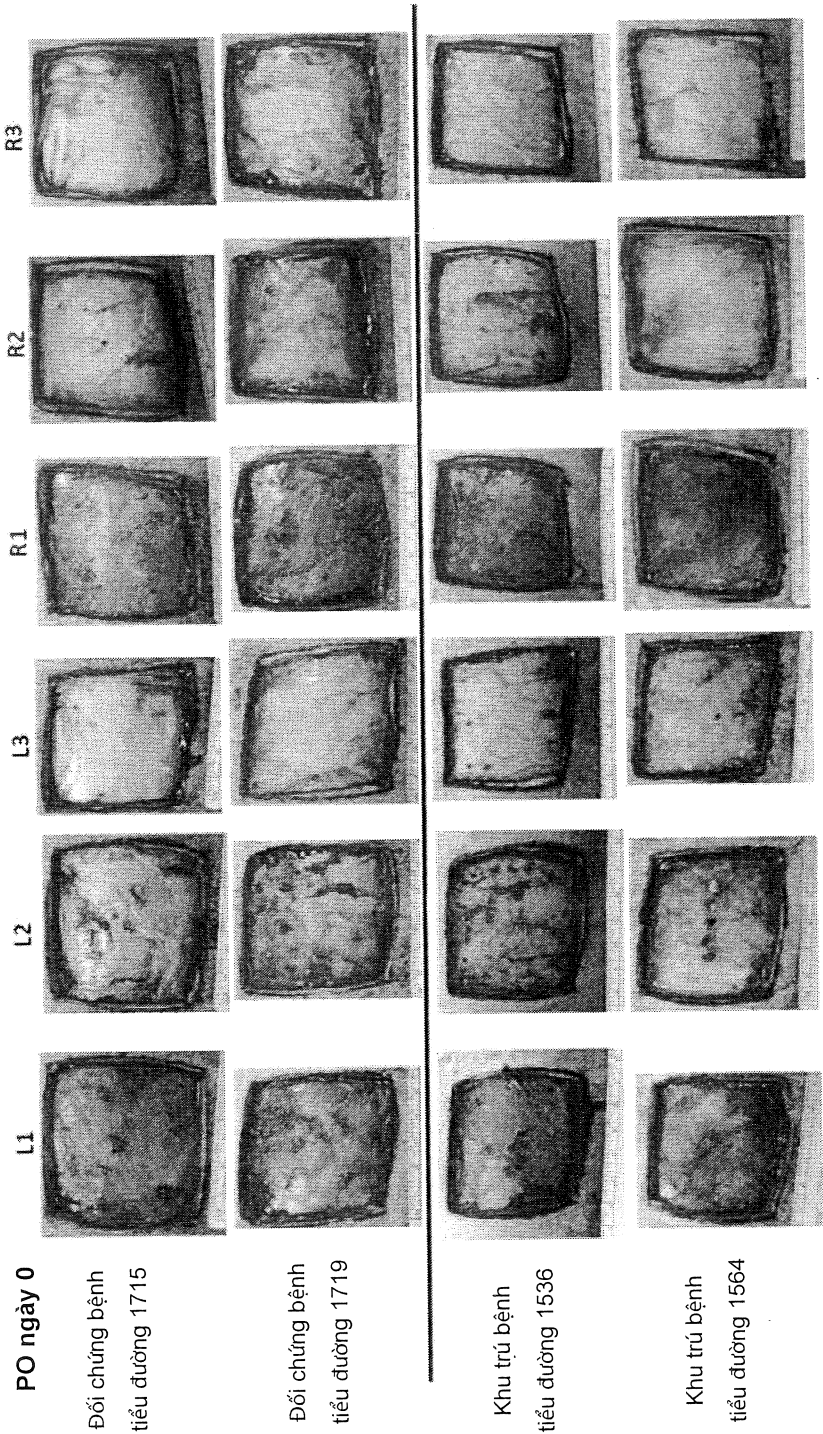


Fig.17

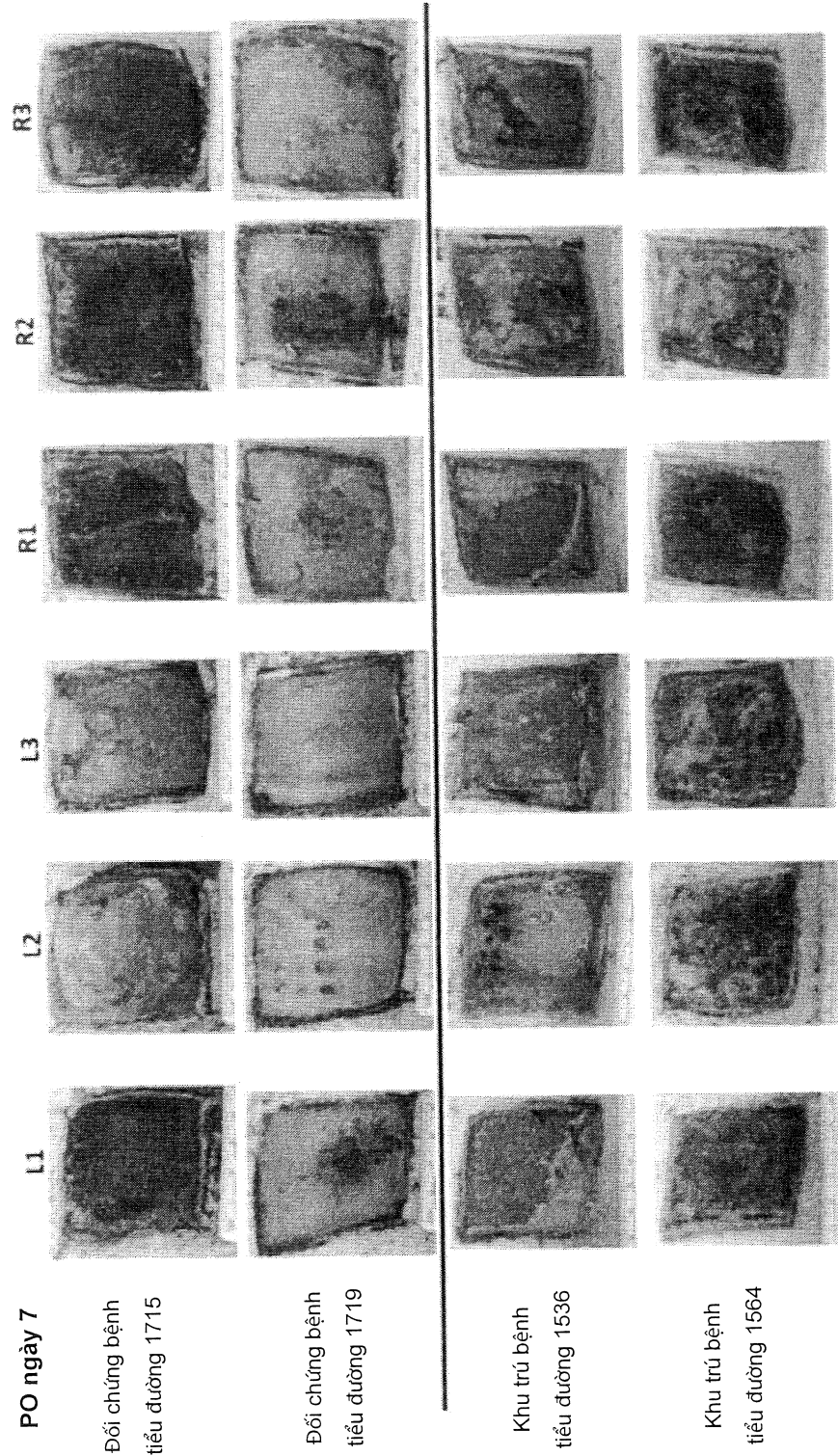
23/68

Figure 18



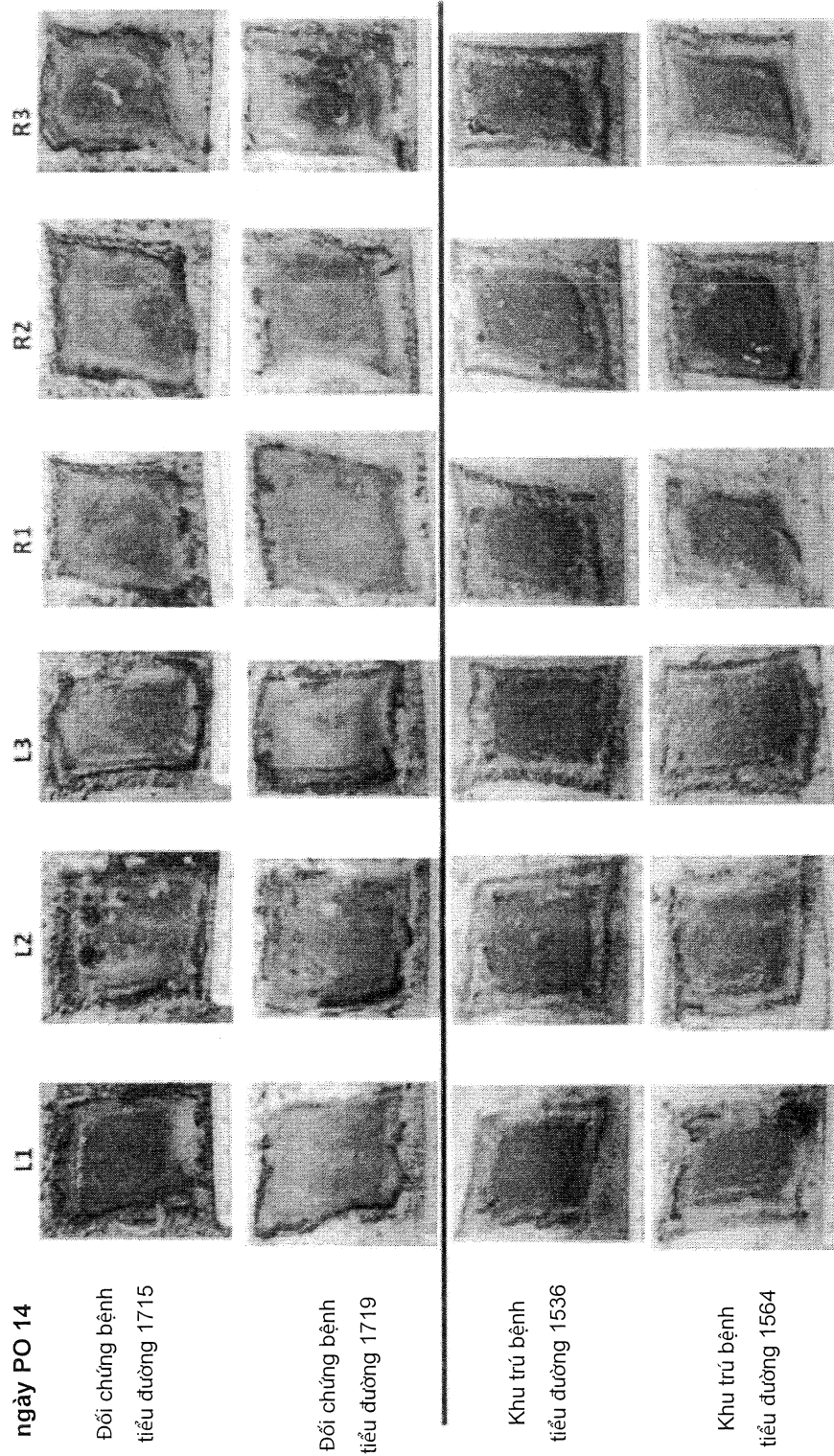
24/68

Fig.18 tiếp theo



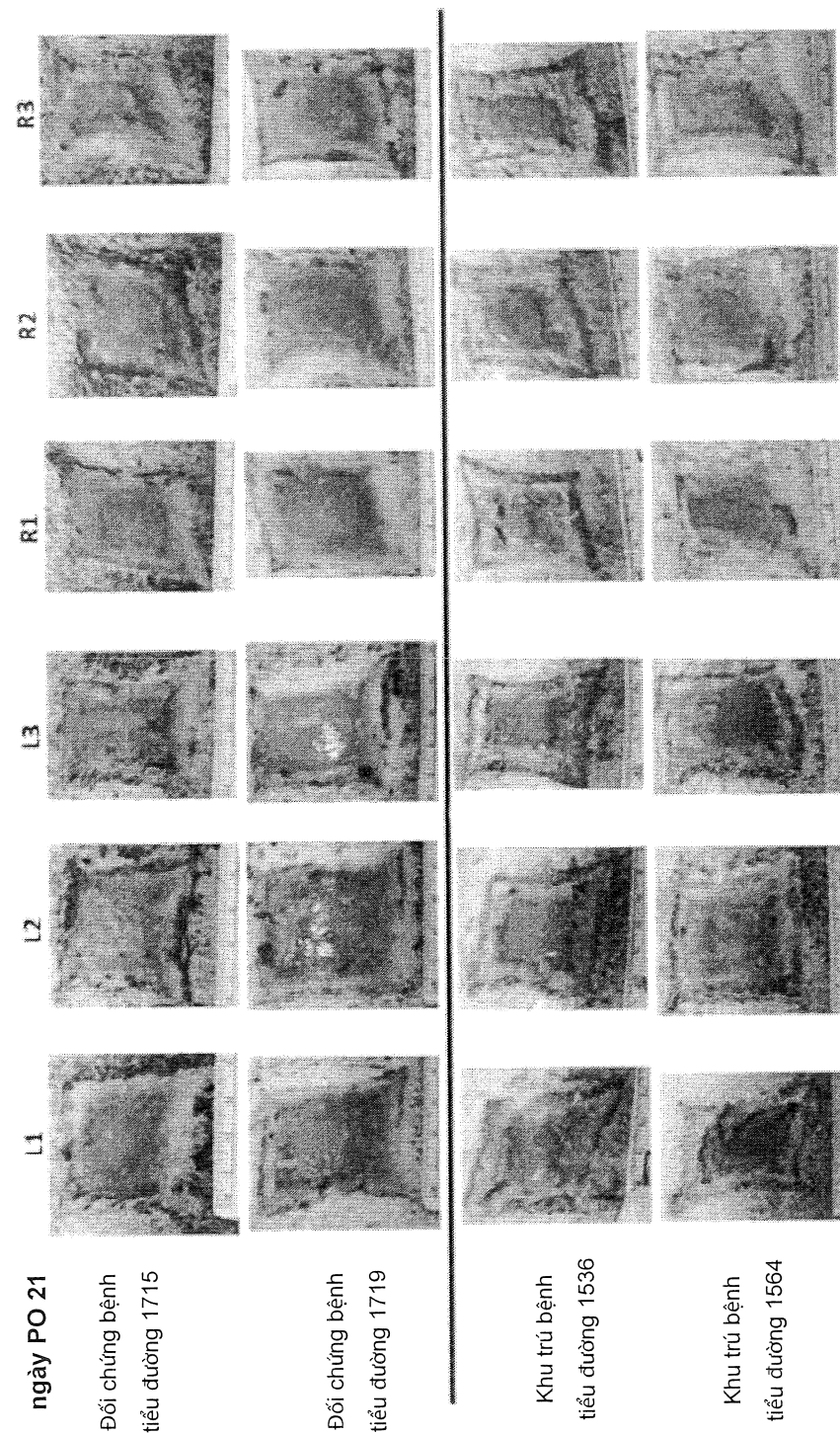
25/68

Fig.18 tiếp theo



26/68

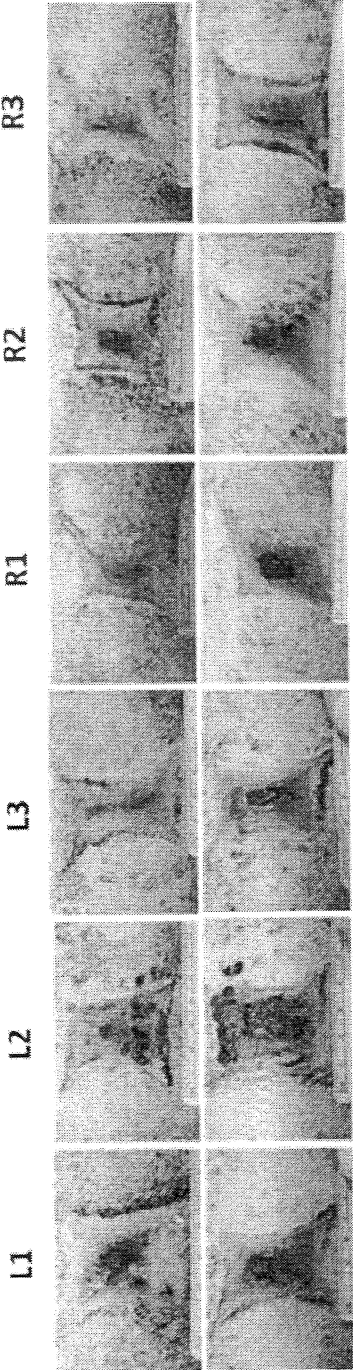
Fig.18 tiếp theo



27/68

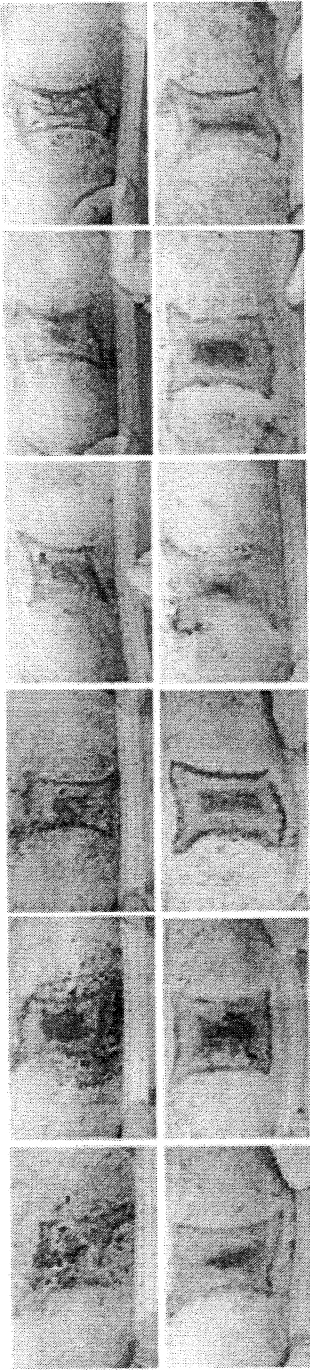
Fig.18 tiếp theo

ngày PO 35



Đối chứng bệnh
tiểu đường 1715

Đối chứng bệnh
tiểu đường 1719



Khu trú bệnh
tiểu đường 1536

Khu trú bệnh
tiểu đường 1564

Fig.19

28/68

TOCRIS**a biotechnie brand**

Chứng nhận phân tích

Ngày in: 16 tháng 6 năm 2016
www.tocris.com

Tên sản phẩm: Trolox

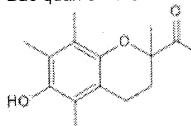
Số Catalog: 6002 Số lô: 1

Số CAS: 53188-07-1

Tên IUPAC: Axit 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametyl-2F/-1-benzopyran-2-carboxylic

1. TÍNH CHẤT VẬT LÝ VÀ HÓA HỌC

Công thức phân tử: $C_{14}H_{18}O_4 \cdot 1/2 H_2O$
 Trọng lượng phân tử: 259,3
 Bề ngoài vật lý: Chất rắn màu be
 Độ tan: DMSO đến 100nM
 etanol đến 100nM
 Bảo quản: Bảo quản ở +4°C
 Cấu trúc phân tử:



2. Dữ liệu phân tích:

HPLC: Cho thấy độ tinh khiết 99,7%
 1H NMR: Phù hợp với cấu trúc
 Phổ khối: Phù hợp với cấu trúc
 Vi phân tích: Cacbon Hydro Nitơ
 Lý thuyết 64,85 7,39
 Phát hiện 64,72 7,58

Thận trọng- Chưa được kiểm định đầy đủ • Chỉ sử dụng để nghiên cứu • Không sử dụng cho người hoặc thú y

bio-technie.com
info@bio-technie.com
techsupport@bio-technie.com

North America
 Tel: (800) 343 7475

China
info.cn@bio-technie.com
 Tel: +86 (21) 52380373

Europe Middle East Africa
 Tel: +44 (0)1235 529449

Rest of World
www.tocris.com/distributors
 Tel: +1 612 379 2956

29/68

Fig.19 tiếp theo

TOCRIS
a biotechnie brand

Thông tin sản phẩm

Ngày in: 16 tháng 6 năm 2016
www.tocris.com

Tên sản phẩm: Trolox

Số catalog: 6002

Số lô: 1

Số CAS: 53188-07-1

Tên IUPAC: Axit 3,4-Dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylic

Mô tả

Dẫn xuất vitamin E chống oxy hóa; ngăn chặn sự hình thành tế bào hủy xương và ức chế sự mất xương do tế bào hủy xương do IL-1 gây ra. Thẩm được qua tế bào và tan được trong nước.

Bảo quản: Bảo quản ở +4°C

Thông tin độ tan và công dụng:

DMSO đến 100 mM

etanol đến 100 mM

Tính chất vật lý và hóa học:

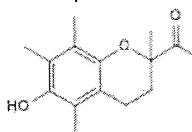
Công thức phân tử: $C_{14}H_{18}O_4 \cdot 1/2 H_2O$

Trọng lượng phân tử: 259,3

Bề ngoài vật lý: Chất rắn màu be

Độ tinh khiết tối thiểu: >98%

Cấu trúc phân tử:



Lời khuyên về tính ổn định và Độ tan:

Một số dung dịch có thể khó thu nhận và có thể được khuyến khích bằng cách khuấy nhanh, siêu âm hoặc làm ấm nhẹ nhàng (trong bể cách thủy 45-60°C). Thông tin liên quan đến tính ổn định của sản phẩm, đặc biệt là ở dung dịch, hiếm khi được báo cáo và trong hầu hết các trường hợp, chúng tôi chỉ có thể đưa ra một hướng dẫn chung. Các khuyến nghị chuẩn của chúng tôi là:

Chất rắn: Việc bảo quản được đề xuất là như đã ghi trên nhãn sản phẩm và lọ được đậy kín nắp, sản phẩm có thể bảo quản đến 6 tháng kể từ ngày nhận.

Dung dịch: Chúng tôi khuyến nghị rằng dung dịch gốc, sau khi đã được pha chế, nên bảo quản chia nhỏ trong lọ đậy kín ở nhiệt độ -20°C hoặc thấp hơn và sử dụng trong vòng 1 tháng. Bất cứ nơi nào có thể các dung dịch nên được tạo và sử dụng trong cùng một ngày.

Tài liệu tham khảo:

Lee *et al* (2009) Trolox prevents osteodastogenesis by suppressing RANKL expression and signaling. J.Biol.Chem. **284** 13725. PMID: 19299513.

Giulivi *et al* (1993) Inhibition of protein radical reactions of ferrylmyoglobin by the water-soluble analog of vitamin E, Trolox C. Arch.Biochem.Biophys. **303** 152. PMID: 8489259.

Thận trọng- Chưa được kiểm định đầy đủ • Chỉ sử dụng để nghiên cứu • Không sử dụng cho người hoặc thú y

bio-technie.com
info@bio-technie.com
techsupport@bio-technie.com

North America
Tel: (800) 343 7475

China
info.cn@bio-technie.com
Tel: +86 (21) 52380373

Europe Middle East Africa
Tel: +44 (0)1235 529449

Rest of World
www.tocris.com/distributors
Tel: +1 612 379 2956

SIGMA -ALDRICH

30/68
Fig.20

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
 Website: www.sigmaaldrich.com
 Email USA: techserv@sial.com
 Outside USA: eurtechserv@sial.com

Thông số kỹ thuật của sản phẩm

Tên sản phẩm:

Natri clorua - PharmaGrade, USP. được sản xuất dưới sự kiểm soát GMP thích hợp cho sản xuất dược phẩm và được phẩm sinh học.

Số sản phẩm: RES0926S-A7

Số CAS: 7647-14-5

Công thức: NaCl

Trọng lượng công thức: 58,44 g/mol

Kiểm định**Thông số kỹ thuật**

Bề ngoài (màu sắc)	Trắng
Bề ngoài (Dạng)	Bột
Bề ngoài của dung dịch nước 20% trong nước (Độ đục)	Trong suốt
Bề ngoài của dung dịch nước 20% trong nước (Màu sắc)	Không màu
Kiểm loại nặng (mỗi USP)	≤ 5 ppm
Nhận dạng	Thông qua
Iodua	Thông qua
Sắt (Fe)	≤ 2,0 pG/g
Giới hạn của Bromua	≤ 0,010 %
Giới hạn của Phosphat	≤ 0,0025 %
Giới hạn của kali	≤ 0,05 %
Hao hụt khi làm khô (USP)	≤ 0,5 %
Độ axit hoặc độ kiềm	Thông qua
Nhôm (Al)	≤ 0,2 pG/g
Arsen (As)	≤ 1,0 pG/g
Kiểm định	99,0 - 100,5 %
Trên cơ sở khô	
Bari (USP)	Thông qua
Clorua	Thông qua
Sắt xyanua	Thông qua
Magie/Kiểm loại kiềm thổ	Thông qua
Nitrit	Thông qua
Sulfat (S04)	≤ 0,020 %

Sigma-Aldrich bảo đảm rằng, vào thời điểm này ban hành chất lượng hoặc kiểm định lại sau đó, sản phẩm này phù hợp với thông tin chứa trong ấn phẩm này. Từ mô tả này có thể có sẵn trên Sigma-Aldrich.com. Nếu có câu hỏi khác, vui lòng liên hệ Dịch vụ kỹ thuật. Người mua phải xác định sự phù hợp của sản phẩm cho mục đích sử dụng cụ thể của nó. Xem mặt trái của hóa đơn hoặc phiếu giao hàng để biết các điều khoản và điều kiện bán hàng bổ sung.

31/68

SIGMA -ALDRICH

Fig.20 tiếp theo

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.comEmail USA: techserv@sial.comOutside USA: aurtechserv@sial.com

Thông số kỹ thuật của sản phẩm

Tên sản phẩm:

Natri clorua - PharmaGrade, USP. Được sản xuất dưới sự kiểm soát GMP thích hợp cho sản xuất dược phẩm và dược phẩm sinh học.

Số sản phẩm: RES0926S-A7

Số CAS: 7647-14-5

Công thức: NaCl

Trọng lượng công thức: 58,44 g/mol

Kiểm định**Thông số kỹ thuật**

Thông số kỹ thuật: PRD.0.ZQ5.10000051146

Sigma-Aldrich bảo đảm rằng, vào thời điểm này ban hành chất lượng hoặc kiểm định lại sau đó, sản phẩm này phù hợp với thông tin chứa trong ấn phẩm này. Từ mô tả này có thể có sẵn trên Sigma-Aldrich.com. Nếu có câu hỏi khác, vui lòng liên hệ Dịch vụ kỹ thuật. Người mua phải xác định sự phù hợp của sản phẩm cho mục đích sử dụng cụ thể của nó. Xem mặt trái của hóa đơn hoặc phiếu giao hàng để biết các điều khoản và điều kiện bán hàng bổ sung.

32/68

SIGMA-ALDRICH

Fig.21

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
Website: www.sigmaaldrich.com
Email USA: techserv@sial.com
Outside USA: eurtechserv@sial.com

Thông số kỹ thuật của sản phẩm

Tên sản phẩm:

Kali phosphat đơn hóa trị - 99,99% trên cơ sở kim loại vết

Số sản phẩm: 229806

Số CAS: 7778-77-0

MDL: MFCD00011401

Công thức: KH_2PO_4

Trọng lượng công thức: 136,09 g/mol

 KH_2PO_4

KIỂM ĐỊNH

Bề ngoài (Màu sắc)

Trắng hoặc Không màu

Bề ngoài (dạng)

Độ tinh khiết (Chuẩn độ bằng NaOH)

% P

Phân tích ICP chính

Xác nhận các thành phần kali và photpho

Phân tích kim loại vết

Độ tinh khiết

99,99% dựa trên phân tích kim loại vết

Thông số kỹ thuật

Phù hợp với yêu cầu

Bột hoặc tinh thể

22,3 – 23,2 %

Xác nhận

≤ 150,0 ppm

Đáp ứng yêu cầu

Thông số kỹ thuật: PRD.2 ZQ5.10000038396

Sigma-Aldrich bảo đảm rằng, vào thời điểm này ban hành chất lượng hoặc kiểm định lại sau đó, sản phẩm này phù hợp với thông tin chứa trong ấn phẩm này. Từ mô tả này có thể có sẵn trên Sigma-Aldrich.com. Nếu có câu hỏi khác, vui lòng liên hệ Dịch vụ kỹ thuật. Người mua phải xác định sự phù hợp của sản phẩm cho mục đích sử dụng cụ thể của nó. Xem mặt trái của hóa đơn hoặc phiếu giao hàng để biết các điều khoản và điều kiện bán hàng bổ sung.

33/68

SIGMA-ALDRICH**Fig.22**sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.comEmail USA: techserv@sial.comOutside USA: eurtechserv@sial.com**Thông số kỹ thuật của sản phẩm**

Tên sản phẩm:

HEPES - PharmaGrade, được sản xuất dưới sự kiểm soát thích hợp để sử dụng làm vật liệu thô trong sản xuất dược phẩm và dược phẩm sinh học, thích hợp cho nuôi cấy tế bào

Số sản phẩm: RES6003H-B7

Số CAS: 7365-45-9

Công thức: C₈H₁₈N₂O₄S

Trọng lượng công thức: 238,3 g/mol

KIỂM ĐỊNH

Bề ngoài (Màu sắc)

Bề ngoài (Dạng)

Phổ hồng ngoại

Độ tan (Độ đục)

Dung dịch 1,0M trong nước

Độ tan (Màu sắc)

Dung dịch 1,0M trong nước

Độ tan (Dạng)

Dung dịch 1,0M trong nước

Nước (từ Karl Fischer)

Chuẩn độ bằng NaOH

Độc tính tế bào

DNaza - Nickaza

DNaza-Endo/Exonuclease

Phát hiện ARNaza

pH

Dung dịch 1,0% trong nước

Nội độc tố

Nấm men và mốc

Bioburden

Phát hiện Proteaza

Còn lại khi đốt cháy

Arsen (As)

Sắt (Fe)

Kẽm (Zn)

Thông số kỹ thuật

Trắng

Bột chảy tự do

Phù hợp với chuẩn

Trong suốt

Không màu

Dung dịch

≤ 0,5 %

> 99,5 %

Thông qua

Thông qua

Thông qua

Thông qua

4,7 – 5,3

≤ 50 EU/g

≤ 100 CFU/g

≤ 100 CFU/g

Thông qua

≤ 0,1 %

≤ 3,0 ppm

≤ 5,0 ppm

≤ 5,0 ppm

Sigma-Aldrich bảo đảm rằng, vào thời điểm này ban hành chất lượng hoặc kiểm định lại sau đó, sản phẩm này phù hợp với thông tin chứa trong ấn phẩm này. Từ mô tả này có thể có sẵn trên Sigma-Aldrich.com. Nếu có câu hỏi khác, vui lòng liên hệ Dịch vụ kỹ thuật. Người mua phải xác định sự phù hợp của sản phẩm cho mục đích sử dụng cụ thể của nó. Xem mặt trái của hóa đơn hoặc phiếu giao hàng để biết các điều khoản và điều kiện bán hàng bổ sung.

34/68

SIGMA-ALDRICH**Fig.22 tiếp theo***sigma-aldrich.com*

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
 Website: www.sigmaaldrich.com
 Email USA: techserv@sial.com
 Outside USA: eurtechserv@sial.com

Thông số kỹ thuật của sản phẩm

Tên sản phẩm:

HEPES - PharmaGrade, được sản xuất dưới sự kiểm soát thích hợp để sử dụng làm vật liệu thô trong sản xuất dược phẩm và dược phẩm sinh học, thích hợp cho nuôi cấy tế bào

Số sản phẩm: RES6003H-B7

Số CAS: 7365-45-9

Công thức: C₈H₁₈N₂O₄S

Trọng lượng công thức: 238,3 g/mol

KIỂM ĐỊNH**Thông số kỹ thuật**

Niken (Ni)	≤ 5,0 ppm
Magie (Mg)	≤ 5,0 ppm
Canxi (Ca)	≤ 30,0 ppm
Chì (Pb)	≤ 5,0 ppm
Bitmut (Bi)	≤ 5,0 ppm
Lithi (Li)	≤ 5,0 ppm
Molybden (Mo)	≤ 5,0 ppm
Nhôm (Al)	≤ 5,0 ppm
Antimon (Sb)	≤ 5,0 ppm
Bari (Ba)	≤ 5,0 ppm
Coban (Co)	≤ 5,0 ppm
Crom (Cr)	≤ 5,0 ppm
Cadimi (Cd)	≤ 5,0 ppm
Đồng (Cu)	≤ 5,0 ppm
Mangan (Mn)	≤ 5,0 ppm
Hấp thụ UV 260nm	≤ 0,05 Abs UN
Dung dịch 1,0M chứa nước	
Hấp thụ UV 280nm	≤ 0,04 Abs UN
Dung dịch 1,0M chứa nước	

Thông số kỹ thuật: PRD. 0.ZQ5,10000050458

Sigma-Aldrich bảo đảm rằng, vào thời điểm này ban hành chất lượng hoặc kiểm định lại sau đó, sản phẩm này phù hợp với thông tin chứa trong ấn phẩm này. Từ mô tả này có thể có sẵn trên Sigma-Aldrich.com. Nếu có câu hỏi khác, vui lòng liên hệ Dịch vụ kỹ thuật. Người mua phải xác định sự phù hợp của sản phẩm cho mục đích sử dụng của nó. Xem mặt trái của hóa đơn hoặc phiếu giao hàng để biết các điều khoản và điều kiện bán hàng bổ sung.

35/68

Fig.23

12/26/2017

COMBI-BLOCKS

QW-1395 p.1

Bảng dữ liệu an toàn

1. Nhận dạng hóa chất

Tên sản phẩm: **Natri lactobionat**
Tên tương tự: QW-1395
Số catalog:
Nhà cung cấp: Combi-Blocks, Inc., 7949 Silverton Ave # 915, San Diego, CA 92126, USA. Tel: 858-635-8950

2. Nhận diện nguy hiểm Không có mối nguy hại đã biết.**3. Thành phần/thông tin về các thành phần.**

Tên thành phần: Natri lactobionat
Số CAS: 27297-39-8

4. Biện pháp sơ cứu:

Tiếp xúc với da: Rửa sạch da ngay lập tức với nhiều nước trong ít nhất 15 phút trong khi loại bỏ quần áo và giày bị nhiễm bẩn. Nếu vẫn kích ứng, tìm kiếm chăm sóc y tế.
Tiếp xúc với mắt: Rửa sạch da ngay lập tức với nhiều nước trong ít nhất 15 phút. Đảm bảo mắt ứng hồng vừa đủ bằng cách dùng ngón tay tách mí mắt. Nếu vẫn kích ứng, tìm kiếm chăm sóc y tế.
Hít phải: Di chuyển đến nơi có không khí trong sạch. Trong trường hợp nghiêm trọng hoặc nếu các triệu chứng vẫn còn, hãy tìm kiếm chăm sóc y tế.
Nuốt phải: Súc miệng với nhiều nước trong ít nhất 15 phút. Tìm kiếm chăm sóc y tế.

5. Biện pháp chữa cháy

Trong trường hợp hỏa hoạn liên quan đến vật liệu này, một mình hoặc kết hợp với các vật liệu khác, hãy sử dụng bình chữa cháy bột hoặc carbon dioxide khô. Cần mặc quần áo bảo hộ và thiết bị thở khép kín

6. Các biện pháp giảm nhẹ tai nạn

Phòng ngừa cá nhân: Mang thiết bị bảo hộ cá nhân phù hợp phù hợp và đáp ứng các chuẩn địa phương / tiểu bang / quốc gia.
 Phòng ngừa về đường hô hấp: Mang khẩu trang / mặt nạ phòng độc đã được phê duyệt
 Biện pháp phòng ngừa cho tay: Mang găng tay / bao tay phù hợp
 Bảo vệ da: Mặc quần áo bảo hộ phù hợp
 Bảo vệ mắt: Mang thiết bị bảo vệ mắt phù hợp
Phương pháp dọn sạch: Trộn với cát hoặc vật liệu hấp thụ tro tương tự, quét sạch và giữ trong thùng đậy kín để xử lý. Xem mục 12.
Phòng ngừa cho môi trường: Không cho phép vật liệu đi vào cống rãnh hoặc các dòng nước

7. Xử lý và Bảo quản

Xử lý: Sản phẩm này chỉ nên được xử lý bởi, hoặc dưới sự giám sát chặt chẽ của những người có trình độ thích hợp trong việc xử lý và sử dụng các hóa chất có khả năng nguy hiểm, những người phải tính đến các dữ liệu nguy hiểm về hỏa hoạn, sức khỏe và hóa chất được cung cấp trên tờ thông tin này
Bảo quản: Bảo quản trong bình kín.

8. Kiểm soát phơi nhiễm/bảo vệ cá nhân

Kiểm soát kỹ thuật: Chỉ sử dụng trong tủ hút hóa chất.
Thiết bị bảo vệ cá nhân: Mặc quần áo phòng thí nghiệm, găng tay chống hóa chất và kính bảo hộ.
Các biện pháp vệ sinh chung: Rửa kỹ sau khi xử lý. Giặt quần áo nhiễm bẩn trước khi tái sử dụng

Fig.23 tiếp theo

36/68

12/26/2017

COMBI-BLOCKS

QW-1395 p.2

9. Tính chất vật lý và hóa học

Bề ngoài: Không định rõ
Điểm sôi: Không có dữ liệu
Điểm nóng chảy: Không có dữ liệu
Điểm bốc cháy: Không có dữ liệu
Tỷ trọng: Không có dữ liệu
Công thức phân tử: $C_{12}H_{21}O_{12}.Na$
Trọng lượng phân tử: 380,3

10. Tính ổn định và tính phản ứng

Điều kiện cần tránh: Nhiệt, lửa, tia lửa.
Vật liệu cần tránh: Chất oxy hóa.
Các sản phẩm cháy nguy hiểm có thể có: Cacbon monoxit, nitơ oxit.

11. Thông tin độc học

Độc tính cấp tính: Không có dữ liệu.
Kích ứng / ăn mòn da: Không có dữ liệu.
Tổn thương / kích ứng mắt: Không có dữ liệu.
Nhạy cảm đường hô hấp hoặc da: Không có dữ liệu.
Khả năng gây đột biến tế bào mầm: Không có dữ liệu.
Khả năng gây ung thư: Không có dữ liệu phân loại về đặc tính gây ung thư của vật liệu này từ EPA, IARC, NTP, OSHA hoặc ACGIH.
Độc tính đối với sinh sản: Không có ảnh hưởng nào được biết.
Độc tính hệ thống cơ quan đích cụ thể - tiếp xúc lặp lại: Không có ảnh hưởng nào được biết.
Độc tính hệ thống cơ quan đích cụ thể - một lần tiếp xúc: Không có dữ liệu.
Nguy hiểm khi hít phải: Không có dữ liệu.
Thông tin bổ sung: Theo hiểu biết tốt nhất của chúng tôi, các đặc tính hóa học, vật lý và độc học của chất này vẫn chưa được nghiên cứu kỹ lưỡng.

12. Thông tin sinh thái học

Độc tính: Không có dữ liệu.
Tính bền và khả năng thoái biến: Không có dữ liệu.
Khả năng tích tụ sinh học: Không có dữ liệu.
Độ di động trong đất: Không có dữ liệu.
Kết quả đánh giá PBT và vPvB: PBT: Không áp dụng. vPvB: không áp dụng.
Tác dụng phụ khác: Không có thông tin liên quan.

13. Xem xét xử lý vứt bỏ

Sắp xếp việc xử lý vứt bỏ như chất thải đặc biệt, bởi công ty xử lý có giấy phép, với sự tham vấn của cơ quan xử lý chất thải địa phương, phù hợp với các quy định của quốc gia và khu vực.

14. Thông tin vận chuyển

Không có mối nguy hiểm đã biết nào đối với phương tiện giao thông đường hàng không và mặt đất.

15. Thông tin điều chỉnh

Không có hóa chất nào trong vật liệu này tuân theo các yêu cầu báo cáo của SARA Title III, Mục 302, hoặc có Số CAS đã biết vượt quá ngưỡng báo cáo được thiết lập bởi SARA Title III, Mục 313.

37/68

12/26/2017

COMBI-BLOCKS

QW-1395 p.3

16. Thông tin khác

MSDS này là chính xác với hiểu biết tốt nhất vào ngày công bố nhưng không ngụ ý bao gồm tất cả và chỉ nên được sử dụng làm hướng dẫn. Combi-Blocks không chịu trách nhiệm về thương tổn hoặc thiệt hại bất kỳ do việc xử lý hoặc tiếp xúc với sản phẩm trên.

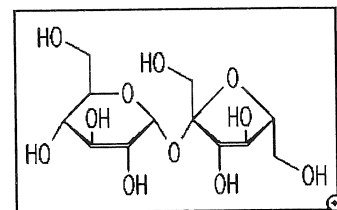
Fig.23 tiếp theo

38/68

USA Home ARK2195B - Sucroza, Nội độc tố thấp

SIGMA-ALDRICH

ARK2195B SIGMA-ALDRICH

**Sucroza, Nội độc tố thấp**

PharmaGrade, USP/NF, Ph Eur, Sản xuất trong điều kiện kiểm soát GMP thích hợp cho sản xuất dược phẩm và dược phẩm sinh học.

Tên đồng nghĩa: α -D-Glc-(1 2)- β -D-Fru, α -D-Glucopyranosyl / β -D-fructofuranosit, β -D-Fructofuranosyl- α -D-glucopyranosit, D(+)-Sacaroza, Sucroza, Đường

SDS

Số CAS 57-50-1; Công thức thực nghiệm (quy tắc Hill Notation) $C_{12}H_{22}O_{11}$; Trọng lượng phân tử 342,30 | Số đăng ký Bellstein 90825; số EC 200-334-9; số MDL MFCD00006626, ID chất PubChem 329773061

Đặc tính

Hạng mục liên quan	Hóa sinh và Chất phản ứng, hydratcacbon để làm ổn định protein, Protein và dẫn xuất, Chất phản ứng để làm ổn định Protein
Nguồn sinh học	Thực vật
Hạng	Ph Eur
	USP/NF
Mã InChi	CZMRCDWAGMRECN-UGDNZRGBSA-N
Dòng sản phẩm	PharmaGrade
Dạng	bột
Tạp chất	Nội độc tố; Đã kiểm định, Sulfit; Đã kiểm định
mp	185—187°C(lit.)
Tính thích hợp	Thích hợp để sử dụng trong sản xuất
	Thể hiện ít đặc tính hơn

Fig.24

Mô tả

39/68

Mô tả chung

Sản phẩm PharmaGrade được sản xuất dưới sự kiểm soát thích hợp để sử dụng làm nguyên liệu thô cho sản xuất dược phẩm và dược phẩm sinh học. Để biết thêm thông tin về chương trình PharmaGrade, truy cập sigma-aldrich.com/safc-pharmagrade.

Liên hệ

Hồ sơ chất lượng về Sucroza PharmaGrade, Nội độc tố thấp

Giá và sẵn hàng

SKU-Kích thước đóng gói	Sẵn hàng	Giá (USD)	Số lượng
ARK2195B- 25KG	Ước tính vận chuyển vào ngày 05/08/18	5.590,70	0
ARK2195B- 1KG	Chỉ còn 2 sản phẩm (hàng sắp về) – Từ	376,70	0
ARK2195B- 10KG	Ước tính vận chuyển vào ngày 04/12/18	2.893,70	0
ARK2195B- 100G	Chỉ còn 3 sản phẩm (hàng sắp về) - From	202,00	0

Đặt mua số lượng lớn?

Thêm vào giỏ hàng

Fig.24 tiếp theo

Giới thiệu sản phẩm cá nhân hóa	
 S3929 Sucroza đáp ứng các thông số kỹ thuật kiểm định USP	 16104 Sucroza puriss., đáp ứng các thông số kỹ thuật phân tích của Ph. Eur., BP, NF
 S7903 Sucroza BioXtra, >=99,5% (GC)	
 1.00892 Sucroza Sucroza có nội độc tố thấp thích hợp dùng làm tá dược EMPROVE exp Ph Eur, BP, JP, NF. CAS 57-50-1, pH 7 (100 g/l, H2O, 20 độ C), có nội độc tố thấp thích hợp làm tá dược EMPROVE exp Ph Eur, BP, JP, NF	 84097 Sucroza BioUltra, cho sinh học phân tử, >=99,5% (HPLC)
 16104 Sucroza puriss., đáp ứng các thông số kỹ thuật phân tích của Ph. Eur., BP, NF	 S3929 Sucroza đáp ứng các thông số kỹ thuật kiểm định USP
Customers Also Viewed	

Fig.24 tiếp theo

41/68

<chem>O[C@H]1[C@H](O[C@H]2[C@@H](CO)O[C@H](O)[C@H](O)[C@H]2O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]1O</chem>	S0389 Sucroza cho sinh học phân tử, >=99,5% (GC)
<chem>O[C@H]1[C@H](O[C@H]2[C@@H](CO)O[C@H](O)[C@H](O)[C@H]2O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]1O</chem>	S9378 Sucroza >=99,5% (GC)
<chem>O[C@H]1[C@H](O[C@H]2[C@@H](CO)O[C@H](O)[C@H](O)[C@H]2O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]1O</chem>	S1600000 Sucroza Chuẩn tham chiếu được điện châu Âu (EP)
<chem>O[C@H]1[C@H](O[C@H]2[C@@H](CO)O[C@H](O)[C@H](O)[C@H]2O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]1O</chem>	S1888 Sucroza Chất phản ứng sinh học, thích hợp để nuôi cấy tế bào, thích hợp để nuôi cấy tế bào côn trùng, >=99,5% (GC)
<chem>O[C@H]1[C@H](O)[C@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]1O</chem>	1.37048 D(+)-Glucose D(+)-Glucose khan thích hợp để sản xuất được phẩm EMPROVE bio Ph Eur, BP, USP. CAS 57-99-7, khối lượng mol 180,16 g/mol, khan thích hợp để sản xuất được phẩm EMPROVE bio Ph Eur, BP, USP, ACS

Fig.24 tiếp theo

Xem gần đây L3375 Canxi lactobionat monohydrat 98,0%-102,0% (chuẩn độ EDTA)	153516 Axit Lactobionic 97%	RES6003H-B7 HEPES PharmaGrade Được sản xuất dưới sự kiểm soát thích hợp để sử dụng làm nguyên liệu thô trong sản xuất dược phẩm hoặc được phẩm sinh học, thích hợp để nuôi cấy tế bào	229806 Kali phosphat đơn bazơ 99,99% trên cơ sở kim loại vết KH₂PO₄	RES20760-A7 Kali phosphat đơn bazơ PharmaGrade, NF Được sản xuất dưới sự kiểm soát GMP thích hợp để sản xuất dược phẩm hoặc được phẩm sinh học KH₂PO₄
---	--	--	---	---

Thông tin an toàn

RIDADR	NONH cho tất cả chế độ vận chuyển
WGK Đức	2
RTECS	WN6500000

Tài liệu

Chứng nhận phân tích	Anfi
Số lô nhập	SDS
Báo giá số lượng lớn sản phẩm đặt hàng	Sucroza, nội độc tố thấp EQP
Tìm kiếm cấu trúc	Tài liệu (1MB)

Nội dung liên quan

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/ark2195b?lang=en®ion=US> 30.03.2018

Fig.24 tiếp theo

43/68

VWR giờ đây là nhãn hiệu Avantor®

TÌM HIỂU THÊM

Tìm kiếm FAQ

Liên hệ

Tìm nhà phân phối

Quản lý đặt mua

Đăng nhập

Tiếng Anh/Mỹ



Search

Go

Tìm kiếm nâng cao

Thương hiệu đã được chứng minh Sản phẩm Thị trường Hệ thống chất lượng kỹ thuật Hỗ trợ Chọn Avantor
Về Nghề nghiệp

TÌM KIẾM LẠI

Manitol, Bột, USP-GenAR®Công thức: $C_6H_{14}O_6$

Trọng lượng công thức: 182.17

Thích hợp để sử dụng trong công nghệ sinh học

Lựa chọn kích cỡ	Số sản phẩm	Số đơn vị trên mỗi hộp	Kích thước đóng gói	Loại thùng chứa	Giá của mỗi đơn vị	Giá hộp	Đặt hàng tối thiểu, đơn vị	Số lượng (đơn vị)
□	7781-88	1	12KG	Thùng 6,5GL polyethylene: nắp xoáy	\$1467,49	—	1	□

Bạn phải đăng nhập để thêm sản phẩm vào giỏ hàng.

* Các sản phẩm được ghi chú với dấu hoa thị (*) trong cột "Số đơn vị trên mỗi hộp" chỉ có sẵn để bán ở đơn vị hộp.

(Các) sản phẩm sau đã bị xóa khỏi danh mục:

Các sản phẩm đã xóa	Kích thước đóng gói	Sản phẩm tương đương	Kích thước đóng gói tương đương	Nhận xét / Ghi chú
7781-04	500G	Không có		Các sản phẩm Vui lòng liên hệ với bộ phận Dịch vụ Khách hàng.

BẢNG DỮ LIỆU AN TOÀN

TÌM KIẾM BẢNG DỮ LIỆU QUY ĐỊNH VỀ SẢN PHẨM

Fig.25

44/68

Thông số kỹ thuật của sản phẩm

KIỂM ĐỊNH	THÔNG SỐ KỸ THUẬT
Sản phẩm được sản xuất theo GMP	
Đáp ứng Thông số kỹ thuật B.P. Chemical	
Đáp ứng Thông số kỹ thuật E.P. Chemical	
Đáp ứng Yêu cầu U.S.P	
Thận trọng: Để sản xuất, xử lý hoặc đóng gói lại	
Bulk Pharmaceutical Chemical	
USP—Thử nghiệm (trên cơ sở khô)	97,0-102,0 %
USP—Nhận diện	Thông qua kiểm định
USP—Các chất liên quan: Sorbitol	≤ 2,0 %
USP—Các chất liên quan: Tổng của isomalt & maltitol	≤ 2,0 %
USP—Các chất liên quan: Tạp chất không được chỉ rõ	≤ 0,10 %
USP—Các chất liên quan: Tổng tạp chất	≤ 2,0 %
USP—Hao hụt khi làm khô ở 105°C	≤ 0,5 %
USP—Điểm nóng chảy	165-170°C
USP—Đường khử	≤ 0,1%
USP—Niken (Ni)	≤ 1 ppm
USP—Bề ngoài của dung dịch	Thông qua kiểm định
USP—Độ dẫn (uS cm-1)	≤ 20 μS/cm
USP—Tổng số vi khuẩn hiếu khí	≤ 100 cfu/g

OK

Trang web này sử dụng cookie để nâng cao trải nghiệm người dùng.

Khi sử dụng trang này bạn đồng ý với chính sách bảo mật của chúng tôi.
<https://www.avantorinc.com/commerce/product.aspx?ich21474846759>

Fig.25 tiếp theo

45/68

USP—Tổng số nấm men và mốc	≤ 100cfu/g
USP—Escherichia coli	Thông qua kiểm định
EP/BP—Thử nghiệm (là C ₆ H ₁₄ O ₆)(được tính trên cơ sở khan)	97,0-102,0 %
EP/BP—Độ dẫn, uS cm-1	≤ 20
EP/BP — Nhận diện C	Thông qua kiểm định
EP/BP—Điểm nóng chảy	165-170°C
EP/BP—Kim loại nặng (là Pb)	≤ 5 ppm
EP/BP—Niken (Ni)	≤ 1 ppm
EP/BP—Hao hụt khi làm khô	≤ 0,5 %
EP/BP—Đường khử	≤ 0,1 %
EP/BP—Các chất liên quan: Tạp chất A	≤ 2,0 %
EP/BP—Các chất liên quan: Tổng của Tạp chất B & C	≤ 2,0 %
EP/BP—Các chất liên quan: Tạp chất chưa được chỉ rõ, mỗi	≤ 0,10 %
EP/BP—Các chất liên quan: Tổng tạp chất	≤ 2,0 %
EP/BP—Bề ngoài của dung dịch	Thông qua kiểm định
Tổng số vi khuẩn hiếu khí (cfu/g)	≤ 1000
Tổng số mốc và nấm men (cfu/g)	≤ 100
EP/BP-Escherichia coli (không có mặt)	Thông qua kiểm định
Salmonella (không có mặt)	Thông qua kiểm định
Nồng độ nội độc tố (EU/g)	≤ 10
Bề ngoài (mịn, bột kết tinh trắng)	
Không sử dụng ngoài đường tiêu hóa	
Chỉ có các dung môi lớp 2 (Etylen Glycol) là có thể có mặt. Tất cả đều dưới giới hạn cho Lựa chọn 1.	
Cặn kim loại: Không có chất xúc tác kim loại hoặc chất phản ứng kim loại, như được định rõ bởi	
Hướng dẫn EMA EMEA/CHMP/SWP/4446/2000, được sử dụng khi sản vật liệu này.	

Fig.25 tiếp theo



47/68

Fig.26

3050 Spruce Street Saint Louis,
Missouri 63103 USA Telephone
800-325-5832 • (314) 771-5765 Fax
(314) 286-7828 email:
techserv@sial.com sigma-aldrich.com

Thông tin sản phẩm

D-(+)-Glucosa

Số sản phẩm **G 8270**

Bảo quản ở nhiệt độ phòng

Mô tả sản phẩm

Công thức phân tử: $C_6H_{12}O_6$

Số CAS: 50-99-7

Trọng lượng phân tử: 180,2

Điểm nóng chảy: 146°C đối với α -D-glucosa và 150°C đối với β -D-glucosa¹pH: 5,9 (dung dịch 0,5M trong nước)²Tỷ trọng các dung dịch nước (trọng lượng/thể tích) ở 17,5°C so với nước:²

Nồng độ (%)	5	10	20	30	40
Tỷ trọng (g/ml)	1,019	1,038	1,076	1,113	1,149

Glucosa là nguồn năng lượng chính cho sinh vật sống. Glucosa xuất hiện trong tự nhiên ở trạng thái tự do trong trái cây và các phần khác của thực vật. Glucosa được kết hợp vào glucosit, disacarit, oligosacarit, polysacarit (xenluloza và tinh bột), và glycogen.

Glucosa là hỗn hợp của α - và β -anome, chủ yếu là α -anome. Sự quay quang của α -anome là +112,2° (c = 10% trong nước, 20°C) và β -anome là +18,7° (c = 10% trong nước, 20°C). Khi D-glucosa được hòa tan trong nước, sự quay quang thay đổi từ từ (mutarotates) theo thời gian và đạt đến giá trị cân bằng cuối là +52,7° (c = 10%, 20°C) do sự tạo hỗn hợp cân bằng gồm có một phần ba α - và hai phần ba β -D-glucosa²

Máu người bình thường chứa 0,08-0,1% glucosa.² Các lượng nhỏ glucosa (hydro peroxit hoặc glucosa oxidaza) có thể được đo nhờ sử dụng luminol làm cơ chất với peroxidaza củ cải ngựa.³

Phòng ngừa và Tuyên bố từ chối trách nhiệm

Chỉ sử dụng trong phòng thí nghiệm. Không dùng làm thuốc, nội trợ, hoặc mục đích sử dụng khác.

Hướng dẫn điều chế

Một gam glucosa hòa tan trong 1,1 ml nước ở 25 °C và trong 0,18 ml nước ở 90°C.²

Bảo quản/Tính ổn định

Dung dịch được vô trùng trong tủ hấp vô trùng.

Tài liệu tham khảo

1. Biochemistry, 2nd ed., Lehninger, A. L., ed., Worth Publishers, Inc. (New York, NY: 1975), p. 253.
2. The Merck Index, 13th Ed., Entry# 4472.
3. Puget, K., and Michelson, A. M., Microestimation of glucosa and glucosa oxidase. Biochimie, 58, 757-758(1976).
4. Martindale The Extra Pharmacopoeia, 29th ed., Reynolds, J. E. F., ed., The Pharmaceutical Press (London, England: 1989), p. 1265.

MES/AJH 11/02

Các sản phẩm của thương hiệu Sigma được bán thông qua Sigma-Aldrich, Inc.

Sigma-Aldrich, Inc. đảm bảo rằng các sản phẩm của mình tuân theo thông tin có trong ấn phẩm này và các ấn phẩm Sigma-Aldrich khác. Người mua phải xác định tính phù hợp của (các) sản phẩm cho mục đích sử dụng cụ thể của họ. Các điều khoản và điều kiện bổ sung có thể được áp dụng. Vui lòng xem mặt trái của hóa đơn hoặc phiếu đóng gói.

48/68

48/68

USA Home 31389 – Dextran từ *Leuconostoc* spp.SIGMA-ALDRICH

31389 SIGMA

Dextran từ *Leuconostoc* spp. $M_r \sim 40.000$

Tên đồng nghĩa: DEXTRAN 40

Các sản phẩm tương tự SDS

Số CAS 9004-54-0; Công thức thẳng $(C_6H_{10}O_5)_n$; Số EC 232-677-5; số MDL MFCD00130935**Đặc tính**

Hạng mục liên quan	Hóa sinh và Chất phản ứng, các chất ổn định sinh học, hydrate cacbon, Dextran, Dextran cho ứng dụng nghiên cứu chung, v.v.
Trọng lượng mol	$M_r \sim 40.000$
Hao hụt	Hao hụt $\leq 7\%$ khi làm khô
Hấp thụ	A10%/375 nm, H20 $\leq 0,05$
Nhiệt độ bảo quản	Nhiệt độ phòng

Mô tả

Đóng gói
500 g trong chai poly
Ứng dụng Dextran là glucan phân nhánh cấu thành từ các đơn vị glucoza liên kết $\alpha(1 \rightarrow 6)$ và $\alpha(1 \rightarrow 3)$ link initiated branches. Dextran có kích thước nằm trong khoảng 10.000 đến 150.000 Kd. Dextran được sử dụng trong nhiều ứng dụng làm chất đệm thể tích, chất ổn định, thành phần nền, nền liên kết, chất làm trơn và các thành phần cấu trúc vật lý. Dextran 40 được sử dụng trong việc phát triển các dung dịch bảo quản cải tiến mới để ghép cơ quan. Dextran 40 có thể được sử dụng để xác định độ chặt tế bào và các tham số dòng trên các lớp tế bào. Dextran 40 được sử dụng làm chất đệm thể tích plasma dạng keo.

Giá và sẵn hàng

SKU-Kích thước đóng gói	Sẵn hàng	Giá (USD)	Số lượng
31389-100G	Chỉ còn 6 sản phẩm (hàng sắp về) - từ	296,00	0
31389-25G	Có sẵn để vận chuyển vào 03/30/18 - từ	88,50	0
31389-500G	Có sẵn để vận chuyển vào 03/30/18 - từ	1.022,00	0
Đặt hàng số lượng lớn?		Thêm vào giỏ hàng	

Fig.27

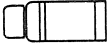
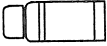
Khách hàng còn xem			
	68084 Dextran từ <i>Leuconostoc</i> spp. $M_r \sim 40000$	1179708 Dextran 40 Chuẩn tham chiếu được điện Mỹ (USP)	31388 Dextran từ <i>Leuconostoc</i> spp. $M_r \sim 6.000$
	D1662 Dextran từ <i>Leuconostoc mesenteroides</i> trọng lượng mol trung bình 35.000-45.000	31392 Dextran từ <i>Leuconostoc</i> spp. M_r 450.000-650.000	31387 Dextran từ <i>Leuconostoc</i> spp. M_r 15.000-25.000
		31390 Dextran từ <i>Leuconostoc</i> spp. $M_r \sim 70.000$	09184 Dextran từ <i>Leuconostoc</i> spp. $M_r \sim 100.000$
		D2447 Dimetyl sulfoxit DMSO/Dextran T 40 55% trọng lượng/thể tích DMSO USP, Ph. Eur. 5% trọng lượng/thể tích Dextran T40 USP trong NaCl	

Fig.27 tiếp theo

50/68

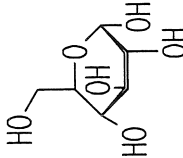
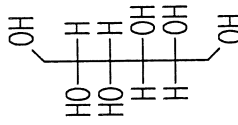
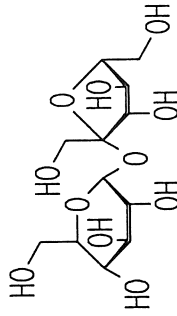
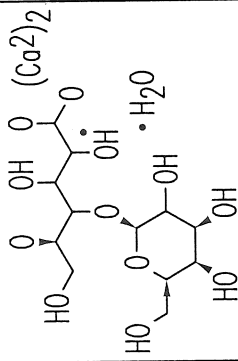
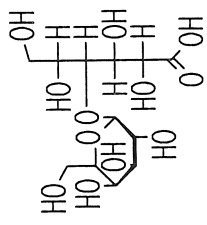
Xem gần đây	 <chem>O=C[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)CO</chem>	G8270 D-(+)-Glucose ≥99,5% (GC)
	 <chem>OCC(O)[C@H](O)[C@@H](O)CO</chem>	M4125 D-Manitol ≥98%
	 <chem>OC[C@H]1O[C@H](O[C@@H]2[C@@H](CO)[C@H](O)[C@@H](O)O[C@H]2O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]1O</chem>	ARK2195B Sucroza, nội độc tố thấp, Pharmagrade, USP/NF, Ph Eur, được sản xuất dưới sự kiểm soát GMP thích hợp để sản xuất dược phẩm hoặc dược phẩm sinh học
	 <chem>OC[C@H]1O[C@H](OC(=O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H](O)C(=O)O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]1O.O</chem>	L3375 Canxi lactobionat monohydrat 98,0-102,0% (chuẩn độ EDTA)
	 <chem>OC(=O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)CO</chem>	153516 Axit Lactobionic 97%

Fig.27 tiếp theo

Thông tin an toàn

Thiết bị bảo hộ cá nhân	Kính che mắt, găng tay, khẩu trang lọc khí loại N95 (US), loại P1 (EN143)
RIDADR	NONH cho tất cả chế độ vận chuyển
WGK Đức	2

Tài liệu

Chứng nhận phân tích	
Số lô nhập	Anf
Bảo giá số lượng lớn sản phẩm đặt hàng	SDS
Bảng thông số kỹ thuật	

Bài báo

Dextran and Related Polysaccharides
Historically, dextrans had been long recognized as contaminants in sugar processing and other food production. The formation of dextran in wine was shown by Pasteur to be due to the activity of micro...
Vicki Caligur
BioFiles 2008, 3.10, 17.
Keywords. Adhesion, Applications, Chromatography, Clinical, Cosmetics, Derivatizations, Diffusion, Diltration, Immobilization, Industries, Ion Exchange, Ligands, Microscopy, Molecular biology, Monocular biology techniques, Nuclear magnetic resonance spectroscopy, nucleic acid hybridization, Pharmaceutical, Precipitation, Purification, Separation, Size exclusion chromatography, Spectroscopy, Sulfations, Type

51/68

Các tài liệu được đánh giá ngang hàng

Bạn có dùng sản phẩm này trong tài liệu của bạn không? Nếu có hãy nhấn vào đây

<https://www.sigmadrich.com/catalog/product/sigma/31389?lang=en®ion=US&g...>

30.03.2018

Fig.27 tiếp theo

Thông tin sản phẩm Fig.28

52/68

sigma-aldrich.com

3050 spruce Street, Saint lou MO 63103 USA
Tel: (800) 521-8956 (314) 771-5765 Fax (800) 325-5057 (314) 771-5757
ema i: techservic@sial.com *Sigma-aldrich.com*

AdenosinSố sản phẩm **A9251**

Nhiệt độ bảo quản 2-8 °C

Mô tả sản phẩmCông thức phân tử: $C_{10}H_{13}N_5O_4$

Trọng lượng phân tử: 267,2

Số CAS: 58-61-7

Sự quay riêng: $-61,7^\circ$ (7 mg/100 ml nước)¹pK_a: 3,5 và 12,5.²Hệ số tắt: E_{mm} = 15,4 (259 nm trong 0,01 M PO₄, pH 7)³

Adenosin là nucleosit, một purin ribosit được phân bố rộng rãi trong tự nhiên.

Adenosin là sản phẩm của quá trình phân hủy AMP.

Bảo quản/Tính ổn định

Adenosin dễ dàng thủy phân trong axit khoáng loãng thành adenin và D-riboza.

Axit nitơ gây ra sự khử amin.²**Tài liệu tham khảo**

1. The Merck Index, 11th ed., Entry# 143
2. Dawson, R.M. C., et al., Data for Biochemical Research, 3rd ed., p. 77., Oxford University Press, New York, (1986).
3. Specifications and Criteria for Biochemical Compounds, 3rd ed., p. 157.

MES/ 8/08

Phòng ngừa và Tuyên bố từ chối trách nhiệm

Chỉ sử dụng trong phòng thí nghiệm. Không dùng làm thuốc, nội trợ, hoặc mục đích sử dụng khác.

Hướng dẫn điều chếHòa tan trong nước (7 mg/ml).¹

Các sản phẩm của thương hiệu Sigma được bán thông qua Sigma-Aldrich, Inc.

Sigma-Aldrich, Inc. đảm bảo rằng các sản phẩm của mình tuân theo thông tin có trong ấn phẩm này và các ấn phẩm Sigma-Aldrich khác. Người mua phải xác định tính phù hợp của (các) sản phẩm cho mục đích sử dụng cụ thể của họ. Các điều khoản và điều kiện bổ sung có thể được áp dụng. Vui lòng xem mặt trái của hóa đơn hoặc phiếu đóng gói.

53/68

SIGMA-ALDRICH

Fig.29

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
 Website: www.sigmaaldrich.com
 Email USA: techserv@sial.com
 Outside USA: eurtechserv@sial.com

Thông số kỹ thuật của sản phẩm

Tên sản phẩm:
 L-Glutathion oxy hóa - PharmaGrade. Được sản xuất dưới sự kiểm soát thích hợp để sử dụng làm nguyên liệu thô cho sản xuất dược phẩm và dược phẩm sinh học.

Số sản phẩm: G2299
 Số CAS: 27025-41-8
 Công thức: C₂₀H₃₂N₆O₁₂S₂
 Trọng lượng công thức: 612,63 g/mol
 Nhiệt độ bảo quản: 2 – 8 °C



KIỂM ĐỊNH

Thông số kỹ thuật

Bề ngoài (Màu sắc)

Bề ngoài (Dạng)

Độ tan (Màu sắc)

Độ tan (Độ đục)

10 mg/ml, H₂O

Phổ hồng ngoại

Nước (bởi Karl Fischer)

Nitơ (khan)

Độ tinh khiết (HPLC)

Tap chất



m bằng HPLC

i khuyến nghị

5.10000041806

Trắng

Bột

Không màu

Trong suốt

Phù hợp với cấu trúc

≤ 6 %

13,4 - 14,0 %

> 98 %

≤ 2 %

Sigma-Aldrich đảm bảo rằng tại thời điểm ban hành chất lượng hoặc ngày kiểm định lại sau đó, sản phẩm này phù hợp với thông tin có trong ấn phẩm này. Từ mô tả này có thể có sẵn tại Sigma-Aldrich.com. Mọi thắc mắc vui lòng liên hệ Dịch vụ Kỹ thuật. Người mua phải xác định tính phù hợp của sản phẩm với mục đích sử dụng cụ thể của nó. Xem mặt trái của hóa đơn hoặc phiếu đóng gói để biết các điều khoản và điều kiện bán hàng bổ sung.

HypoThermosol® FRS

Môi trường bảo quản hạ nhiệt xác định (2 - 8°C)
không có thành phần từ động vật

Fig.30

54/68

STEMCELL

TECHNOLOGIES
Scientists Helping Scientists™ | www.stemcell.com
TOLL FREE PHONE 1 800 667 0322 • PHONE +1 604 877 0713
INFO@STEMCELL.COM • TECHSUPPORT@STEMCELL.COM
FOR GLOBAL CONTACT DETAILS VISIT OUR WEBSITE

Catalog#	
07935	100mL
07934	16x10mL
07936	chai 500mL
07945	túi 500mL

Mô tả sản phẩm

HypoThermosol® FRS là môi trường bảo quản hạ nhiệt tối ưu (2-8 °C) cho phép cải thiện và bảo quản kéo dài tế bào, mô và cơ quan. HypoThermosol® FRS được sản xuất duy nhất để giải quyết đáp ứng sinh học-phân tử của tế bào trong quá trình bảo quản hạ nhiệt. HypoThermosol® FRS bao gồm các ion chính ở nồng độ giúp cân bằng trạng thái nội bào ở nhiệt độ hạ nhiệt. Các thành phần bổ sung bao gồm chất đệm pH, chất nền năng lượng, chất chống gốc tự do và chất ổn định thẩm thấu /keo.

- Sẵn để dùng
- Không chứa huyết thanh, không chứa protein
- Không có thành phần từ động vật
- Được sản xuất theo cGMP với các thành phần chất lượng cao nhất/loại USP
- Hồ sơ gốc FDA
- Độ vô khuẩn, nội độc tố, và kiểm định giải phóng dựa trên tế bào

Đặc tính

Bảo quản: Bảo quản ở 2 - 8°C.

Thời hạn sử dụng: Ổn định cho đến khi hết hạn sử dụng (EXP) trên nhãn. Sản phẩm cần được bảo vệ khỏi tiếp xúc lâu với ánh sáng.

Vui lòng tham khảo Bảng dữ liệu an toàn (SDS) để biết thông tin nguy hiểm.

Sản phẩm có thể được vận chuyển ở nhiệt độ phòng (15-25°C) và phải được bảo quản lạnh khi nhận hàng.

Xử lý / Hướng dẫn sử dụng

HypoThermosol® FRS là sản phẩm sẵn dùng và chứa các chất bảo vệ.

1. Lau sạch bên ngoài hộp đựng HypoThermosol® FRS bằng etanol hoặc isopropanol 70% trước khi mở.
2. Thay thế hoàn toàn môi trường nuôi cấy bằng HypoThermosol® FRS lạnh (2-8°C). Không làm ấm HypoThermosol® FRS đến 37°C.
3. Duy trì mẫu ở 2-8°C trong thời gian bảo quản lạnh. HypoThermosol® FRS không phải là môi trường nuôi cấy, không sử dụng ở nhiệt độ trên 15°C.

Khi kết thúc quá trình bảo quản lạnh, chỉ cần ly tâm các tế bào để tạo viên và loại bỏ môi trường HypoThermosol® FRS. Thay HypoThermosol® FRS bằng môi trường nuôi cấy đã được làm ấm được chọn và gỡ nhẹ ống để huyền phù lại các tế bào.

SẢN PHẨM NÀY ĐƯỢC SẢN XUẤT THEO HỆ THỐNG QUẢN LÝ CHẤT LƯỢNG cGMP PHÙ HỢP VỚI Z1 Cf R 870

Bản quyền 2016 của STEMCELL Technologies Inc. Các quyền AO được bảo lưu bao gồm đồ họa và hình ảnh STEMCELL Technologies & Design. STEMCELL Shield Design và Scientists Helping Scientists là các nhãn hiệu của STEMCELL Technologies Inc. Tất cả các nhãn hiệu khác là tài sản của các chủ sở hữu tương ứng. Mặc dù STEMCELL đã thực hiện tất cả các nỗ lực hợp lý để đảm bảo rằng thông tin được cung cấp bởi STEMCELL và các nhà cung cấp của nó là chính xác, STEMCELL không đảm bảo hoặc đại diện về tính chính xác hoặc tính đầy đủ của thông tin này.

55/68

SIGMA-ALDRICH

Bảng dữ liệu an toàn hóa chất

Phiên bản 6.1

Ngày sửa đổi 05/28/2017

Ngày in 08/08/2019

1. NHẬN DẠNG SẢN PHẨM VÀ CÔNG TY

1.1 Nhận dạng sản phẩm

Tên sản phẩm Canxi clorua

Số sản phẩm 449709

Nhãn hàng: Aldrich

Số chỉ dẫn: 017-013-00-2

CAS-No. 10043-52-4

1.2 Các công dụng được xác định có liên quan của hóa chất hoặc hỗn hợp và các cách sử dụng được khuyến cáo không nên

Các công dụng được xác định Hóa chất phòng thí nghiệm, tổng hợp chất

1.3 Chi tiết về nhà cung cấp của bảng dữ liệu an toàn

Công ty Sigma-Aldrich Inc.
3050 Spruce Street
ST. LOUIS MO 63103
UNITED STATES

Điện thoại +1 314 771-5765

Fax +1 800 325-5052

1.4 Số điện thoại khẩn cấp

Số điện thoại khẩn cấp: +1-703-527-3887

2. NHẬN DẠNG NGUY HIỂM

2.1 Phân loại chất hoặc hỗn hợp

Phân loại GHS theo 29 CFR 1910 (OSHA HCS)

Kích ứng mắt (hạng mục 2A), H319

Để biết toàn bộ nội dung của thông báo H được đề cập trong mục này, hãy xem mục 16.

2.2 Phân tử nhãn GHS, bao gồm các thông báo phòng ngừa

Yếu tố tượng hình



Từ tín hiệu

Cảnh báo

Thông báo nguy hiểm

H319

Gây kích ứng mắt nghiêm trọng.

Thông báo phòng ngừa

P264

Rửa sạch da sau khi xử lý.

P280

Mang găng tay bảo vệ/bảo vệ mắt/bảo vệ mặt.

P305 + P351 + P338

Nếu dính vào mắt: rửa cẩn thận bằng nước nhiều lần. Bỏ kính áp tròng ra, nếu có và dễ thực hiện.

Tiếp tục rửa

P337 + P313

Nếu mắt vẫn kích ứng: T tư vấn/chăm sóc y tế

Aldrich- 449709

Fig.31

56/68

2.3 Các nguy hiểm chưa được phân loại (HNOC) hoặc chưa được bao gồm bởi GHS – không có

3. THÀNH PHẦN/THÔNG TIN VỀ CÁC THÀNH PHẦN

3.1 Các hóa chất

Công thức: CaCl_2
 Trọng lượng phân tử: 110,98 g/mol
 CAS-No.: 10043-52-4
 EC-No.: 233-140-8
 Index-No.: 017-013-00-2

Các thành phần nguy hiểm

Thành phần	Phân loại	Nồng độ
Canxi clorua		
	Kích ứng mắt 2A; H319	$\leq 100\%$

Để biết toàn bộ nội dung của thông báo H được đề cập trong mục này, hãy xem mục 16.

4. CÁC BIỆN PHÁP SƠ CỨU

4.1 Mô tả các biện pháp sơ cứu

Lời khuyên chung

Tham khảo ý kiến của bác sĩ. Đưa bằng dữ liệu an toàn này cho bác sĩ chăm sóc. Di chuyển ra khỏi khu vực nguy hiểm.

Nếu hít phải

Nếu hít phải, hãy đưa người đó đến nơi có không khí trong lành. Nếu không thở được, phải hô hấp nhân tạo. Tham khảo ý kiến của bác sĩ.

Nếu tiếp xúc với da

Rửa sạch bằng xà phòng và nhiều nước. Tham khảo ý kiến bác sĩ.

Nếu tiếp xúc với mắt

Rửa kỹ bằng nhiều nước trong ít nhất 15 phút và hỏi ý kiến bác sĩ.

Nếu nuốt phải

Không bao giờ cho bất cứ thứ gì vào miệng của người đã bất tỉnh. Súc miệng bằng nước. Tham khảo ý kiến bác sĩ.

4.2 Các triệu chứng và ảnh hưởng quan trọng nhất, cả cấp tính và muộn

Các triệu chứng và ảnh hưởng quan trọng nhất đã biết được mô tả trong nhãn (xem mục 2.2) và/hoặc trong mục 11.

4.3 Chỉ định chăm sóc y tế tức thời bất kỳ và điều trị đặc biệt cần thiết

Không có dữ liệu

5. CÁC BIỆN PHÁP CHỮA CHÁY

5.1 Phương tiện chữa cháy

Phương tiện chữa cháy thích hợp

Sử dụng bình xịt nước, bọt chống cồn, hóa chất khô hoặc cacbon dioxit.

5.2 Các nguy hiểm đặc biệt phát sinh từ hóa chất hoặc hỗn hợp

Khí hydro clorua, Canxi oxit

5.3 Lời khuyên dành cho lính cứu hỏa

Mang thiết bị thở khép kín để chữa cháy nếu cần thiết.

5.4 Thông tin khác

Không có dữ liệu

6. BIỆN PHÁP GIẢI QUYẾT TAI NẠN

6.1 Các biện pháp phòng ngừa cá nhân, thiết bị bảo hộ và các quy trình khẩn cấp

Sử dụng thiết bị bảo vệ cá nhân. Tránh tạo bụi. Tránh hít hơi, sương mù hoặc khí. Đảm bảo thông gió đầy đủ. Tránh hít bụi.

Để bảo vệ cá nhân, hãy xem mục 8.

57/68

6.2 Các biện pháp phòng ngừa về môi trường

Không cho sản phẩm vào đường cống nước.

6.3 Các phương pháp và vật liệu để chứa và làm sạch

Thu gom và sắp xếp việc vứt bỏ không tạo ra bụi. Quét lên và xúc bằng xẻng. Giữ trong các thùng chứa thích hợp, đậy kín để vứt bỏ.

6.4 Tham khảo các mục khác

Để xử lý vứt bỏ, hãy xem mục 13.

7. XỬ LÝ VÀ BẢO QUẢN**7.1 Các biện pháp phòng ngừa để xử lý an toàn**

Tránh tiếp xúc với da và mắt. Tránh tạo bụi và sol khí.

Cung cấp hệ thống thông gió thích hợp tại những nơi có bụi.

Để biết các biện pháp phòng ngừa, xem mục 2.2.

7.2 Các điều kiện bảo quản an toàn, bao gồm các tình trạng không tương thích bất kỳ

Đậy kín hộp đựng ở nơi khô ráo và thông khí tốt.

7.3 (Các) công dụng cuối cùng cụ thể

Ngoài công dụng được đề cập trong mục 1.2, không có công dụng cụ thể nào khác được quy định.

8. KIỂM SOÁT TIẾP XÚC / BẢO VỆ CÁ NHÂN**8.1 Các thông số kiểm soát**

Các thành phần với các thông số kiểm soát nơi làm việc

Không chứa các hóa chất có các giá trị giới hạn phơi nhiễm nghề nghiệp.

8.2 Kiểm soát phơi nhiễm**Các kiểm soát kỹ thuật phù hợp**

Xử lý theo thực hành tốt vệ sinh công nghiệp và an toàn. Rửa tay trước khi nghỉ giải lao và khi kết thúc ngày làm việc.

Thiết bị bảo vệ cá nhân**Bảo vệ mắt / mặt**

Kính an toàn với tấm chắn hai bên theo tiêu chuẩn EN166. Sử dụng thiết bị bảo vệ mắt được kiểm định và được phê duyệt theo các chuẩn thích hợp của chính phủ như NIOSH (US) hoặc EN 166 (EU).

Bảo vệ da

Làm việc với găng tay. Găng tay phải được kiểm tra trước khi sử dụng. Sử dụng kỹ thuật tháo găng tay thích hợp (không chạm vào bề mặt ngoài của găng tay) để tránh da tiếp xúc với sản phẩm này. Vứt bỏ găng tay bị nhiễm bẩn sau khi sử dụng theo luật hiện hành và thực hành tốt trong phòng thí nghiệm. Rửa sạch và làm khô tay.

Tiếp xúc lâu

Vật liệu: Cao su nitrile

Độ dày lớp tối thiểu: 0,11 mm

Thời gian thấm: 480 phút

Vật liệu đã kiểm định: Dermatrill® (KCL 740 / Aldrich Z677272, Size M)

Tiếp xúc nhanh

Vật liệu: Cao su nitrile

Độ dày lớp tối thiểu: 0,11 mm

Thời gian thấm: 480 phút

Vật liệu đã kiểm định: Dermatrill® (KCL 740 / Aldrich Z677272, Size M)

Nguồn dữ liệu: KCL GmbH, D-36124 Eichenzell, điện thoại +49 (0) 6659 87300, e-mail sales@kcl.de, Phương pháp kiểm định: EN374

Nếu sử dụng dưới dạng dung dịch, hoặc trộn với các chất khác, và trong các điều kiện khác với EN 374, hãy liên hệ với nhà cung cấp găng tay đã được CE phê duyệt. Khuyến nghị này chỉ mang tính tư vấn và phải được đánh giá dựa trên tình huống sử dụng công nghiệp dự tính bởi khách hàng. Khuyến nghị này không nên được hiểu là đưa ra sự chấp thuận cho bất kỳ tình huống sử dụng cụ thể nào.

Bảo vệ cơ thể

Quần áo không thấm nước. Loại thiết bị bảo hộ phải được lựa chọn theo nồng độ và lượng hóa chất nguy hiểm tại nơi làm việc cụ thể.

Fig.31 tiếp theo

58/68

Bảo vệ đường hô hấp

Đối với những trường hợp phơi nhiễm gây hại, sử dụng hộp đựng mặt nạ phòng độc loại P95 (US) hoặc loại P1 (EU EN 143) hoặc loại ABEK-P2 (EU EN 143). Sử dụng mặt nạ và linh kiện Kiểm soát điện trở và được phê duyệt theo các tiêu chuẩn thích hợp của chính phủ như NIOSH (US) hoặc CEN (EU).

Kiểm soát mức độ tiếp xúc với môi trường

Không cho sản phẩm vào đường cống nước.

9. TÍNH CHẤT VẬT LÝ VÀ HÓA HỌC**9.1 Thông tin về tính chất vật lý và hóa học cơ bản**

- | | |
|---|------------------------------|
| a) Bề ngoài | Dạng: kết tinh
Màu: Trắng |
| b) Mùi | Không có dữ liệu |
| c) Ngưỡng mùi | Không có dữ liệu |
| d) pH | Không có dữ liệu |
| e) Điểm nóng chảy/điểm đông đặc | 772 °C (1422 °F) |
| f) Nhiệt độ bắt đầu sôi và khoảng nhiệt độ sôi | 1,670 °C (3,038 °F) |
| g) Điểm bắt cháy | ()Không có dữ liệu |
| h) Tốc độ bay hơi | Không có dữ liệu |
| i) Tính dễ bắt cháy (rắn, khí) | Không có dữ liệu |
| j) Giới hạn trên/dưới về tính dễ bắt cháy và gây nổ | Không có dữ liệu |
| k) Áp suất hơi | 0,01 hPa at 20 °C (68 °F) |
| l) Tỷ trọng hơi | Không có dữ liệu |
| m) Tỷ trọng tương đối | 2.150 g/cm ³ |
| n) Độ tan trong nước | Không có dữ liệu |
| o) Hệ số phân tách: n-octanol/nước | Không có dữ liệu |
| p) Nhiệt độ tự bốc cháy | Không có dữ liệu |
| q) Nhiệt độ phân hủy | Không có dữ liệu |
| r) Độ nhớt | Không có dữ liệu |
| s) Đặc tính gây nổ | Không có dữ liệu |
| t) Đặc tính oxy hóa | Không có dữ liệu |

9.2 Thông tin an toàn khác

Không có dữ liệu

10. TÍNH ỔN ĐỊNH VÀ KHẢ NĂNG PHẢN ỨNG**10.1 Khả năng phản ứng**

Không có dữ liệu

10.2 Tính ổn định hóa học

Ổn định trong các điều kiện bảo quản khuyến nghị.

Fig.31 tiếp theo

10.3 Khả năng xảy ra phản ứng nguy hiểm

59/68

Không có dữ liệu

10.4 Các điều kiện cần tránh

Không có dữ liệu

10.5 Vật liệu không tương thích

Axit mạnh, Boran / oxit bo, Kẽm, Canxi oxit, Metyl vinyl ete, Canxi clorua bị tác động bởi brom triflorua

10.6 Các sản phẩm phân hủy nguy hiểm

Các sản phẩm phân hủy nguy hiểm sinh ra trong điều kiện hỏa hoạn. - Khí hydro clorua, canxi oxit.

Các sản phẩm phân hủy khác - Không có dữ liệu

Trong trường hợp hỏa hoạn: xem mục 5

11. THÔNG TIN ĐỘC HỌC**11.1 Thông tin về tác dụng độc học****Độc tính cấp tính**

LD50 Oral – Chuột - 2,301 mg/kg (Canxi clorua)

(Hướng dẫn kiểm định OECD 401)

Hít: Không có dữ liệu (Canxi clorua)

Da: Không có dữ liệu (Canxi clorua)

Không có dữ liệu (Canxi clorua)

Ăn mòn/kích ứng da

Da – Thỏ (Canxi clorua)

Kết quả: Không kích ứng da

Tổn thương mắt nghiêm trọng / Kích ứng mắt

Mắt – Thỏ (Canxi clorua)

Kết quả: Kích ứng mắt vừa phải (Hướng dẫn kiểm định OECD 405)

Nhạy cảm với da hoặc đường hô hấp

Không có dữ liệu (Canxi clorua)

Khả năng gây đột biến tế bào mầm

(Canxi clorua)

Chuột

Tổng hợp ADN không theo lịch trình

Khả năng gây ung thư

IARC: Không có thành phần nào của sản phẩm này có mặt ở mức lớn hơn hoặc bằng 0,1% được xác định là có thể, có khả năng hoặc được xác nhận là chất gây ung thư ở người bởi IARC.

ACGIH: Không có thành phần nào của sản phẩm này có mặt ở mức lớn hơn hoặc bằng 0,1% được xác định là chất gây ung thư hoặc chất gây ung thư tiềm ẩn bởi ACGIH.

NTP: Không có thành phần nào của sản phẩm này có mặt ở mức lớn hơn hoặc bằng 0,1% được xác định là chất gây ung thư đã biết hoặc được dự đoán trước bởi NTP.

OSHA: Không có thành phần nào của sản phẩm này có mặt ở mức lớn hơn hoặc bằng 0,1% được xác định là chất gây ung thư hoặc chất gây ung thư tiềm ẩn bởi OSHA.

Độc tính với hệ sinh sản

Không có dữ liệu (Canxi clorua)

Không có dữ liệu (Canxi clorua)

Độc tính cơ quan đích cụ thể - phơi nhiễm một lần

Không có dữ liệu (Canxi clorua)

Độc tính cơ quan đích cụ thể - phơi nhiễm nhiều lần

Không có dữ liệu

Fig.31 tiếp theo

60/68

Nguy hiểm khi hít vào

Không có dữ liệu (Canxi clorua)

Thông tin bổ sung

RTECS: EV9800000

Theo hiểu biết của chúng tôi, các đặc tính hóa học, vật lý và độc học vẫn chưa được nghiên cứu kỹ lưỡng. (Canxi clorua)

12. THÔNG TIN SINH THÁI HỌC**12.1 Độc tính**Độc tính với cá LC50 - *Lepomis macrochirus* -10,650 mg/l - 96 h(Canxi clorua)Độc tính với daphnia và động vật không xương sống thủy sinh khác EC50 - *Daphnia magna* (bọ chết nước) – 2,400 mg/l - 48 giờ (Canxi clorua) (Hướng dẫn kiểm định OECD 202)**12.2 Độ bền và khả năng phân hủy**

Không có dữ liệu

12.3 Tiềm năng tích tụ sinh học

Không có dữ liệu

12.4 Tính lưu động trong đất

Không có dữ liệu (Canxi clorua)

12.5 Các kết quả đánh giá PBT và vPvB

Không có đánh giá PBT/vPvB vì đánh giá an toàn hóa chất không được yêu cầu / không được tiến hành

12.6 Các tác dụng phụ khác

Không có dữ liệu

13. XEM XÉT XỬ LÝ VỨT BỎ**13.1 Các phương pháp xử lý chất thải****Sản phẩm**

Đưa ra đề nghị về các giải pháp xử lý phần dư và không thể tái chế cho công ty xử lý được cấp phép. Liên hệ với dịch vụ xử lý chất thải chuyên nghiệp được cấp phép để xử lý vật liệu này.

Bao bì bị nhiễm

Xử lý các sản phẩm không sử dụng.

14. THÔNG TIN VẬN CHUYỂN**DOT (US)**

Không phải hàng hóa nguy hiểm

IMDG

Không phải hàng hóa nguy hiểm

IATA

Không phải hàng hóa nguy hiểm

15. THÔNG TIN ĐIỀU CHỈNH**Các thành phần SARA 302**

Không có hóa chất nào trong vật liệu này tuân theo các yêu cầu báo cáo của SARA Title III, mục 302.

Các thành phần SARA 313

Vật liệu này không chứa bất kỳ thành phần hóa học nào với Số CAS đã biết vượt quá các mức báo cáo ngưỡng (De Minimis) được thiết lập bởi SARA Title III, Mục 313.

Fig.31 tiếp theo

61/68

Mối nguy hại của SARA 311/312

Nguy hiểm cấp tính với sức khỏe

Quyền được biết các thành phần của Massachusetts

Không có thành phần nào tuân theo Đạo luật Quyền được biết của Massachusetts.

Quyền được biết các thành phần của Pennsylvania

	CAS-No.	Sửa đổi
Canxi clorua	10043-52-4	

Quyền được biết các thành phần của New Jersey

	CAS-No.	Sửa đổi
Canxi clorua	10043-52-4	

Các thành phần Prop. 65 của California

Sản phẩm này không chứa bất kỳ hóa chất nào đã được Bang California xác định là gây ung thư, dị tật bẩm sinh hoặc bất kỳ tác hại nào khác về sinh sản.

16. THÔNG TIN KHÁC**Toàn bộ nội dung của thông báo H được đề cập trong các mục 2 và 3.**

H319 Gây kích ứng mắt nghiêm trọng.

Đánh giá HMIS

Mối nguy hại cho sức khỏe: 2

Mối nguy hại cho sức khỏe mạn tính:

Tính dễ bốc cháy: 0

Mối nguy hại vật lý: 0

Đánh giá NFPA

Mối nguy hại cho sức khỏe: 2

Mối nguy bốc cháy: 0

Mối nguy phản ứng: 0

Thông tin khác

Bản quyền 2016 Sigma-Aldrich Co. LLC. Được phép tạo bản sao giấy không giới hạn chỉ để sử dụng nội bộ.

Thông tin trên được cho là đúng nhưng không có nghĩa là bao gồm tất cả và sẽ chỉ được sử dụng làm hướng dẫn. Thông tin trong tài liệu này dựa trên kiến thức hiện tại của chúng tôi và có thể áp dụng cho sản phẩm với các biện pháp phòng ngừa an toàn thích hợp. Nó không đại diện cho bất kỳ sự đảm bảo nào về các đặc tính của sản phẩm. Sigma-Aldrich Corporation và các chi nhánh sẽ không chịu trách nhiệm về bất kỳ thiệt hại nào do việc xử lý hoặc do tiếp xúc với sản phẩm trên. Xem www.sigma-aldrich.com và/hoặc mặt sau của hóa đơn hoặc phiếu đóng gói để biết các điều khoản và điều kiện bán hàng bổ sung.

Thông tin điều chế

Sigma-Aldrich Corporation

Product Safety - Americas Region

1-800-521-8956

Phiên bản: 6.1

Ngày sửa đổi: 05/28/2017

Ngày in: 08/08/2019

Fig.31 tiếp theo

SIGMA-ALDRICH

62/68

Sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.comEmail USA: techserv@sial.comOutside USA: eurtechserv@sial.com

Thông số kỹ thuật của sản phẩm

Tên sản phẩm:

Magie clorua - khan, >98%

Số sản phẩm: M8266

Số CAS: 7786-30-3

MDL: MFCD00011106

Công thức: Cl_2Mg

Trọng lượng công thức: 95,21 g/mol

KIỂM ĐỊNH

Bề ngoài (Màu sắc)

Có thể chứa các đốm màu xám hoặc đen

Bề ngoài (Dạng)

Không tan được trong nước

Nước (bởi Karl Fischer)

Chuẩn độ với EDTA

Khan

Thời gian kiểm định lại khuyến nghị

4 năm

Thông số kỹ thuật: PRD.0.ZQ5.10000030665

Thông số kỹ thuật

Trắng

Bột

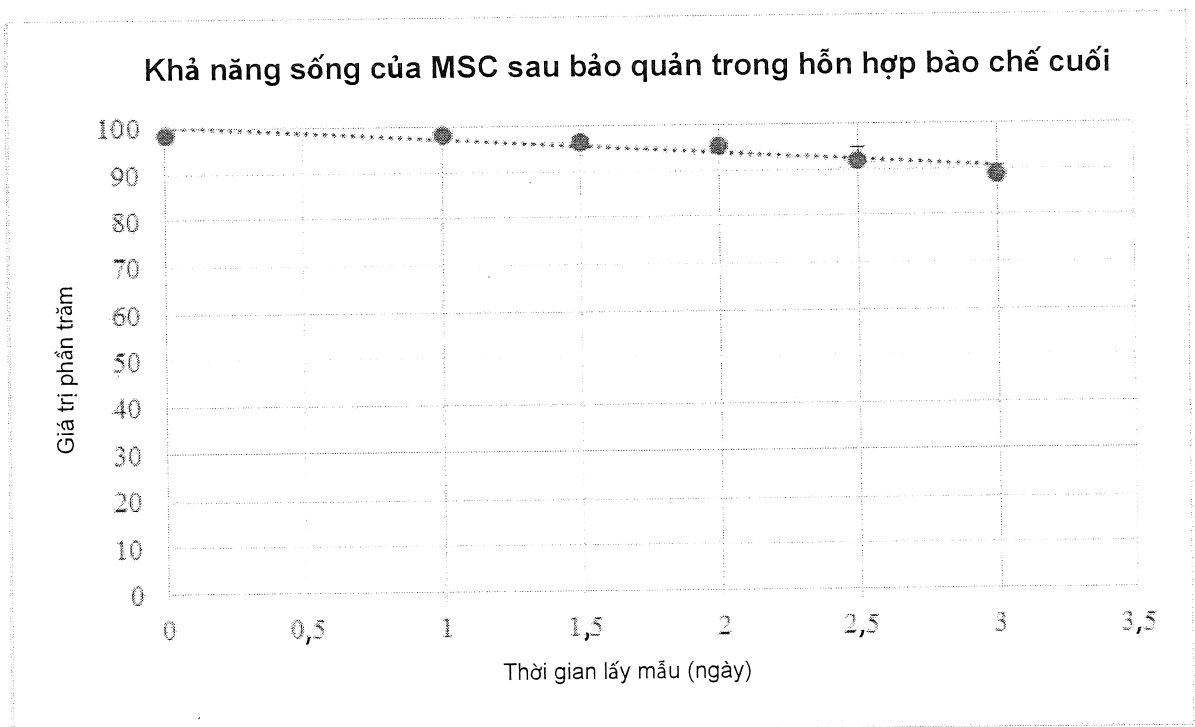
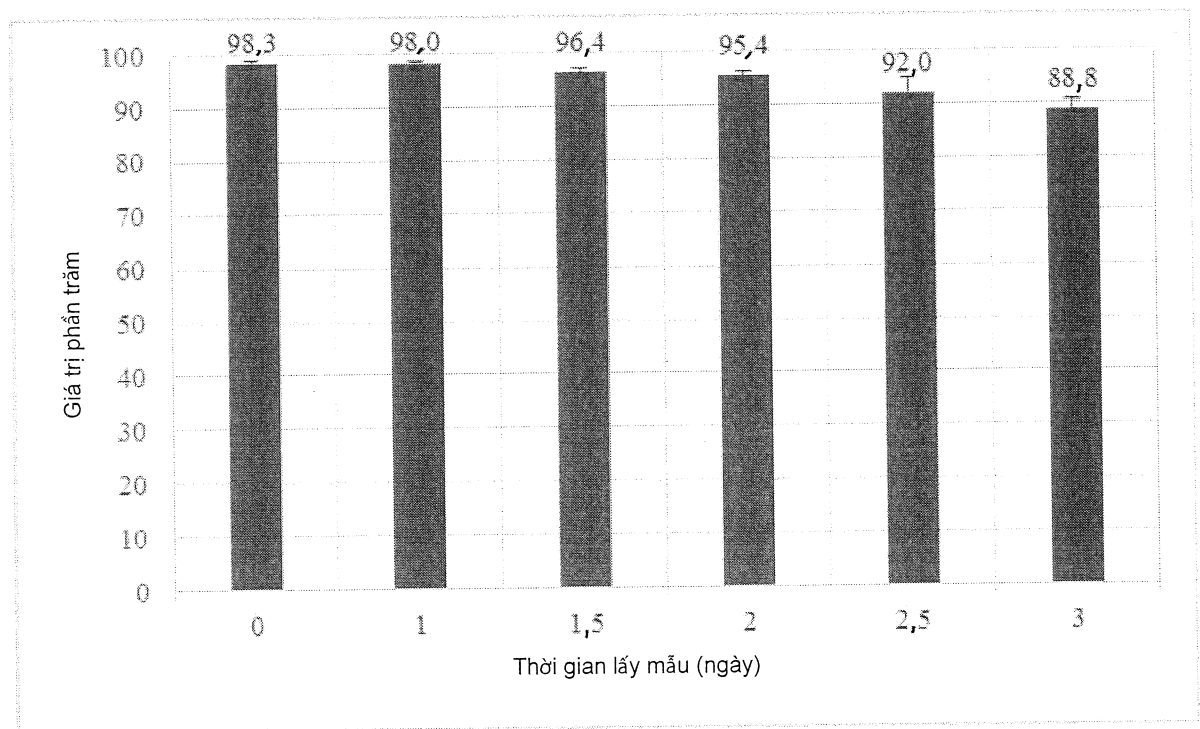
 $\leq 0,5$ % $\leq 3,0$ % > 98 %

Sigma-Aldrich đảm bảo rằng tại thời điểm ban hành chất lượng hoặc ngày kiểm định lại sau đó, sản phẩm này phù hợp với thông tin có trong ấn phẩm này. Bảng thông số kỹ thuật này có thể có sẵn tại Sigma-Aldrich.com. Mọi thắc mắc vui lòng liên hệ với Dịch vụ Kỹ thuật. Người mua phải xác định tính phù hợp của sản phẩm với mục đích sử dụng cụ thể của nó. Xem mặt trái của hóa đơn hoặc phiếu đóng gói để biết các điều khoản và điều kiện bán hàng bổ sung.

Fig.32

63/68

Fig.33

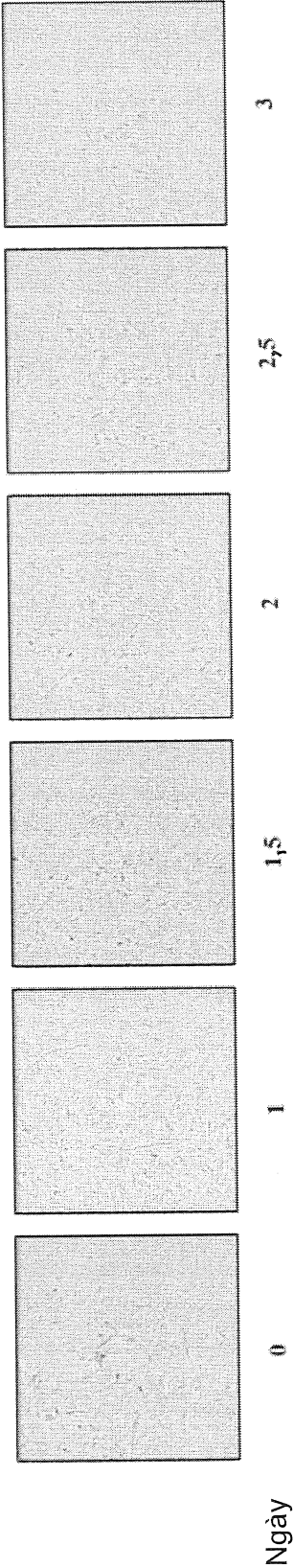
a

64/68

Fig.33 (tiếp theo 1)

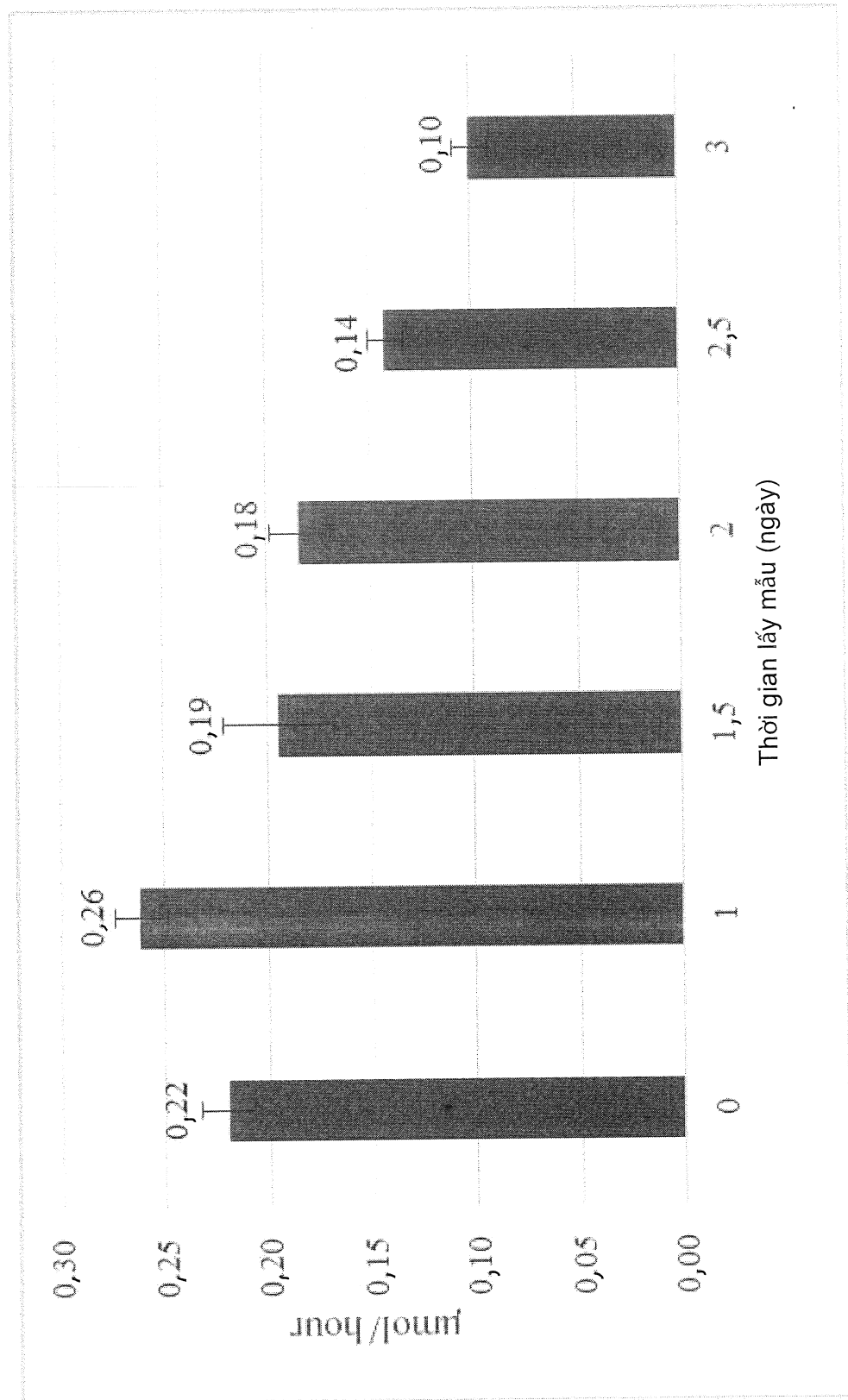
b

Hình thái tế bào gốc trung mô sau bảo quản ở 2-8 độ C



65/68

Fig.33 (tiếp theo 2)



C

66/68

Fig.33 (tiếp theo 3)

d

Sản xuất lactat bởi MSC sau bảo quản trong hỗn hợp dạng bào chế cuối

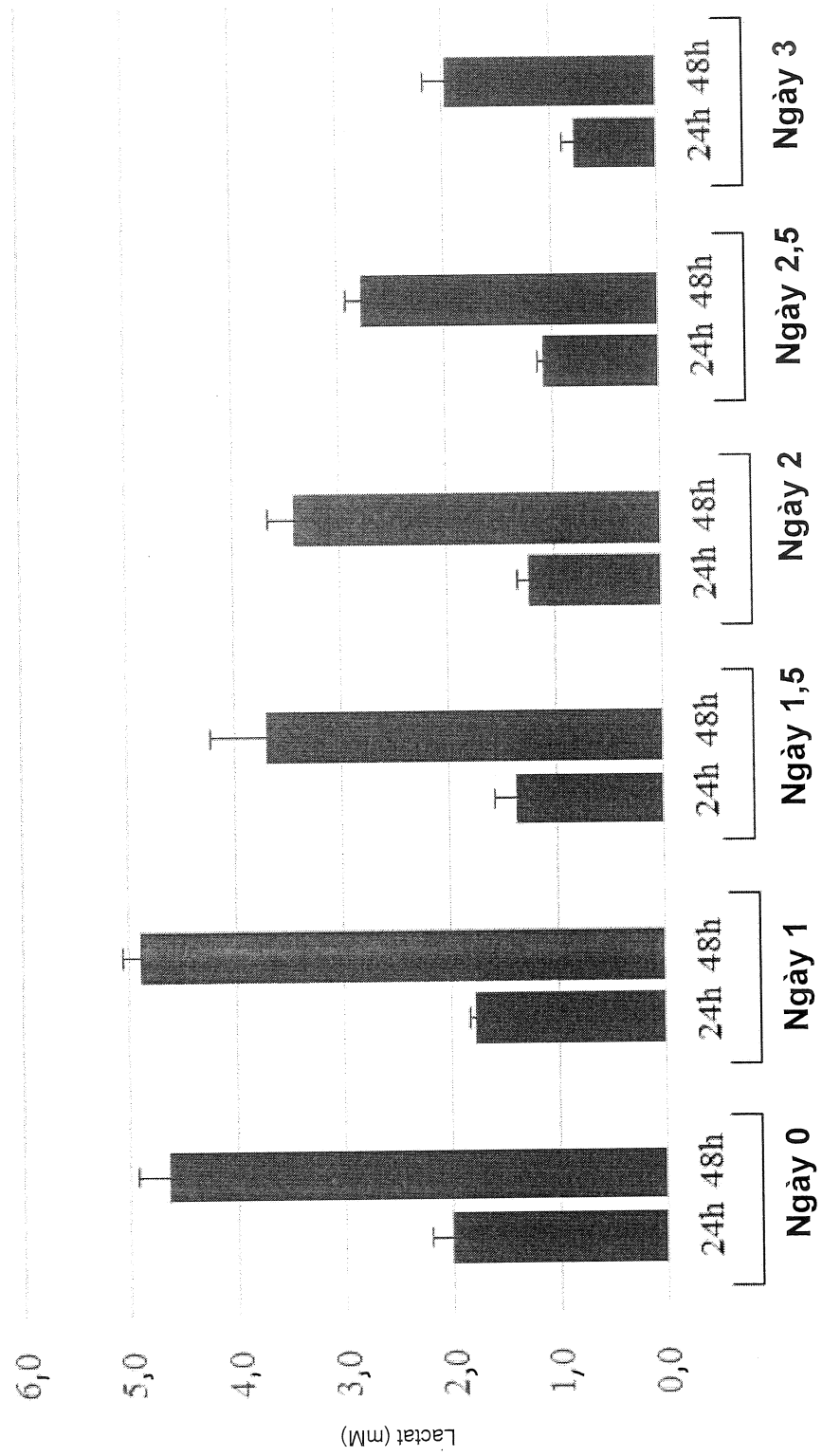
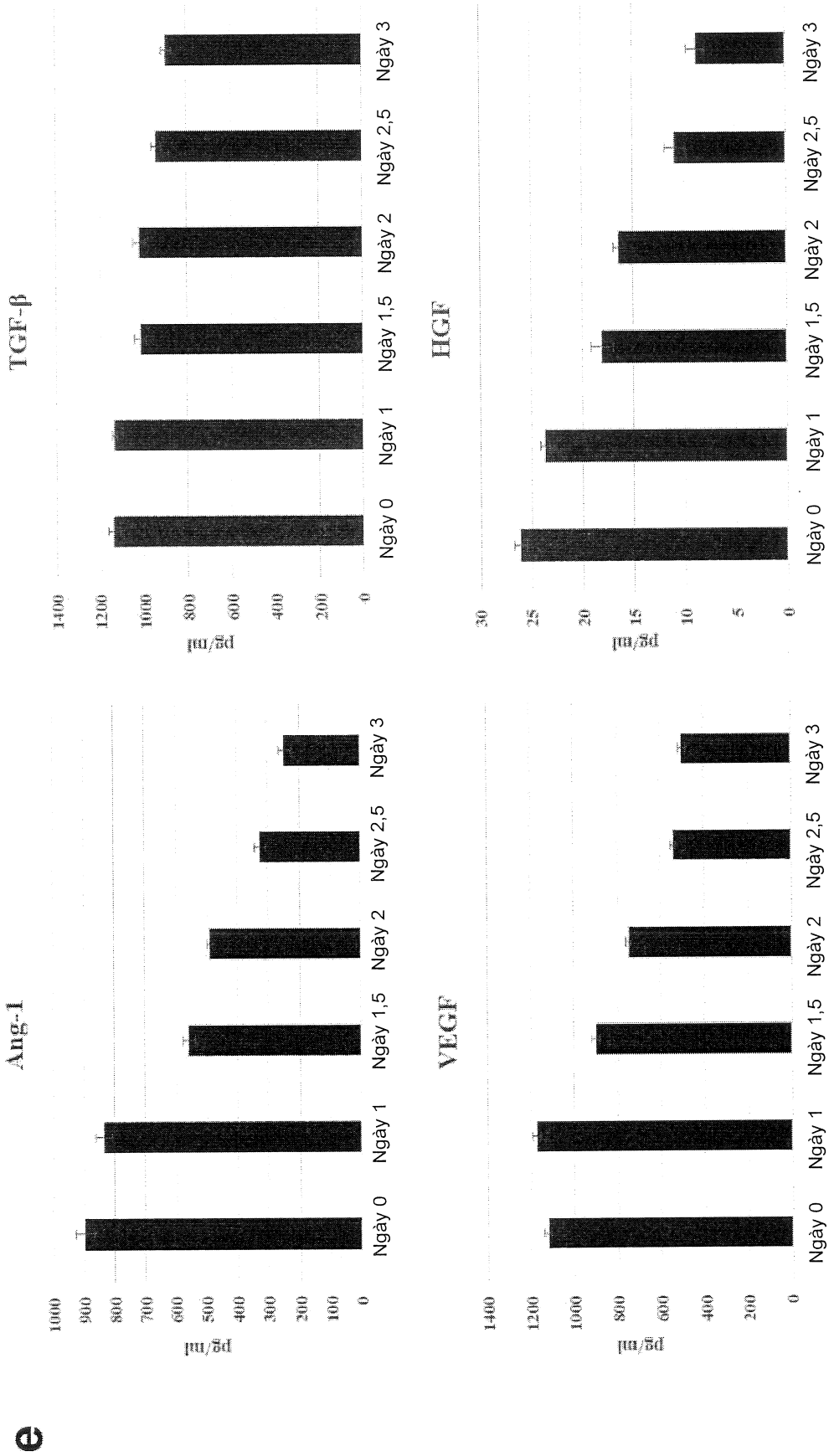


Fig.33 (tiếp theo 4)

67/68



68/68

Fig.33 (tiếp theo 5)

