



(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

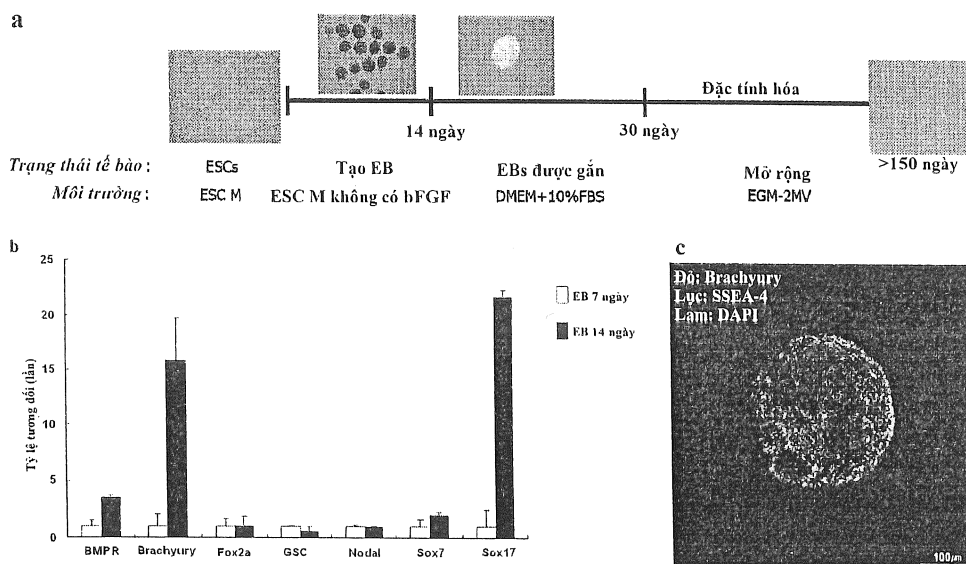
(11) 
1-0022913

(51)⁷ C12N 5/0775, A61K 35/48, C12N 5/02 (13) B

(21) 1-2012-01462 (22) 28.10.2009
(86) PCT/KR2009/006267 28.10.2009 (87) WO2011/052818 05.05.2011
(30) 10-2009-0102458 27.10.2009 KR
(45) 27.01.2020 382 (43) 26.11.2012 296
(73) SNU R&DB FOUNDATION (KR)
56-1 San Sillim-dong, Gwanak-gu, Seoul 151-919, Republic of Korea
(72) KIM, Hyo Soo (KR), KANG, Hyun Jae (KR), LEE, Eun Ju (KR), PARK, Young Bae (KR)
(74) Công ty TNHH Trường Xuân (AGELESS CO.,LTD.)

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT CÁC TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỪ CÁC TẾ BÀO GỐC VẠN NĂNG CỦA NGƯỜI

(57) Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất các tế bào gốc trung mô từ các tế bào gốc vạn năng của người, quy trình này bao gồm các bước: a) tạo các thể phôi từ các tế bào gốc vạn năng; b) gắn các thể phôi vào đĩa nuôi cấy để cảm ứng sự biệt hóa tự nhiên của các thể phôi thành các tế bào gốc trung mô; và c) thực hiện nuôi cấy tăng sinh liên tục các tế bào gốc trung mô trong khi vẫn duy trì sự đồng nhất của các tế bào gốc trung mô này. Sáng chế cũng đề xuất quy trình chuẩn để cảm ứng sự biệt hóa các tế bào gốc trung mô có thể áp dụng rộng rãi cho tất cả các tế bào gốc vạn năng của người bất kể sự khác biệt về nguồn gốc di truyền của chúng. Cuối cùng, sáng chế có thể sản xuất quy mô lớn liên tục các tế bào gốc trung mô cần thiết cho thuốc tái tạo và liệu pháp tế bào bằng cách sử dụng các tế bào gốc vạn năng của người, nhờ đó nhận ra các ứng dụng thực tiễn của các sản phẩm trị liệu tế bào, và hơn nữa sáng chế được mong đợi đóng góp nhiều cho việc điều trị các bệnh nan y, chẳng hạn như các bệnh tim mạch và các bệnh rối loạn thần kinh.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình cảm ứng các tế bào gốc trung mô từ các tế bào gốc vạn năng của người, các tế bào gốc trung mô được sản xuất bởi quy trình này, và các sản phẩm trị liệu tế bào bao gồm các tế bào gốc trung mô.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các tế bào gốc là các tế bào có khả năng biệt hóa thành nhiều loại tế bào tạo thành các mô của cơ quan, và thường dùng để chỉ các tế bào chưa được biệt hóa trước khi biệt hóa, các tế bào này có thể được lấy từ các mô tương ứng của phôi, thai, và cơ thể trưởng thành. Các tế bào gốc biệt hóa thành các tế bào đặc hiệu nhờ tác nhân kích thích biệt hóa (môi trường); cho phép chúng tăng sinh (mở rộng) bằng cách tạo ra các tế bào giống với bản thân chúng thông qua quá trình phân chia tế bào (tự làm mới), các tế bào khác của quá trình phân chia tế bào này bị dừng lại do sự hoàn thành quá trình biệt hóa; và có khả năng tạo hình trong quá trình biệt hóa vì chúng có thể biệt hóa thành các tế bào khác trong các môi trường khác nhau hoặc bởi các tác nhân kích thích biệt hóa khác nhau.

Các tế bào gốc này có thể được phân loại thành các tế bào gốc vạn năng, đa năng, và đơn năng theo khả năng biệt hóa của chúng. Các tế bào gốc vạn năng là các tế bào vạn năng có tính vạn năng để biệt hóa thành tất cả các tế bào, và các tế bào này bao gồm các tế bào gốc phôi (embryonic stem cells- ESCs), và các tế bào gốc vạn năng cảm ứng (induced pluripotent stem cells-iPS cells), v.v... Các tế bào gốc trưởng thành có thể là các ví dụ của các tế bào gốc vạn năng và/hoặc tế bào gốc đơn năng.

Các tế bào S gốc phôi được tạo thành từ khối nội bào của túi phôi trong quá trình phát sinh phôi sớm; có tính toàn năng để biệt hóa thành tất cả các tế bào nhờ đó chúng có thể biệt hóa thành loại tế bào mô bất kỳ; có thể được nuôi cấy ở trạng thái bất tử và chưa biệt hóa; có thể được kế thừa đến thế hệ tiếp theo bằng cách tạo ra các tế bào phôi, khác với các tế bào gốc trưởng thành (Thomson et al., Science, 282; 1145-1147, 1998; Reubinoﬀ et al., Nat, Biotechnol., 18; 399-404, 2000).

Các tế bào gốc phôi của người được tạo ra bằng cách phân lập và nuôi cấy chỉ

khối nội bào ở thời điểm tạo phôi ở người và hiện nay, các tế bào gốc phôi của người được tạo ra thường được lấy từ các phôi đông lạnh còn lại sau các phẫu thuật tiết trùng. Đã có nhiều nỗ lực sử dụng các tế bào gốc phôi vạn năng của người, mà có thể biệt hóa thành tất cả các loại tế bào như là sản phẩm trị liệu tế bào; tuy nhiên, chúng vẫn không hoàn toàn vượt qua được các rào cản lớn chẳng hạn như nguy cơ gây ung thư và khước từ miễn dịch.

Như một nỗ lực bổ sung, các tế bào gốc vạn năng cảm ứng (iPS) đã được báo cáo gần đây. Các tế bào iPS, được bao gồm trong khái niệm về các tế bào gốc vạn năng, là các tế bào được thu nhận bằng cách giải biệt hóa các tế bào trưởng thành mà quá trình biệt hóa chúng được kết thúc theo một số cách và nhờ đó chuyển chúng lại trạng thái giống như phôi ở giai đoạn sớm của quá trình biệt hóa. Xa hơn, được báo cáo là các tế bào được giải biệt hóa thể hiện các đặc điểm gần như giống với các tế bào gốc phôi, là các tế bào gốc vạn năng, do sự biểu hiện gen và khả năng biệt hóa. Các tế bào iPS này cũng có thể sử dụng các tế bào tự thân và do đó loại trừ nguy cơ khước từ miễn dịch, tuy nhiên nguy cơ gây ung thư vẫn còn là vấn đề cần được giải quyết.

Hiện nay, các tế bào gốc trung mô mà có chức năng điều hòa miễn dịch và không có nguy cơ gây ung thư, được giới thiệu như là một giải pháp thay thế để giải quyết vấn đề này. Các tế bào gốc trung mô là các tế bào đa năng có khả năng biệt hóa thành tế bào tạo mỡ, tế bào xương, tế bào sụn, tế bào cơ, tế bào thần kinh, tế bào cơ tim, v.v..., và đã được báo cáo là có chức năng điều hòa phản ứng miễn dịch. Các tế bào gốc trung mô có thể được phân lập và nuôi cấy từ nhiều loại mô khác nhau, nhưng khả năng và các chất chỉ thị bề mặt tế bào của chúng là khác nhau tùy theo nguồn gốc của chúng. Do đó, không dễ dàng để xác định rõ ràng các tế bào gốc trung mô. Tuy nhiên, các tế bào gốc trung mô thường được xác định là các tế bào có thể biệt hóa thành các tế bào xương, tế bào sụn và tế bào cơ; có dạng xoắn ốc; và biểu hiện CD73(+), CD105(+), CD34(-), và CD45(-), các tế bào này là các chất chỉ thị bề mặt tế bào cơ bản.

Trong khi đó, các lĩnh vực thuốc tái tạo và/hoặc liệu pháp tế bào đòi hỏi số lượng tế bào tối thiểu khoảng 1×10^9 , để các tế bào gốc trung mô này được sử dụng làm các sản phẩm trị liệu tế bào. Tuy nhiên, số lượng tế bào thực sự cần thiết được gia tăng thêm, khi xem xét thử nghiệm thiết lập các điều kiện và tiêu chuẩn. Do đó, cần ít nhất là 10 lần cấy chuyển cho thử nghiệm in vitro để cung cấp lượng tế bào này từ các tế

bào gốc trung mô hiện tại thu được từ nhiều nguồn khác nhau. Trong trường hợp này, các tế bào trở nên già đi và biến đổi, và do đó, chúng không thể đủ để sử dụng làm sản phẩm trị liệu tế bào. Mặc dù các điều kiện và tiêu chuẩn được thiết lập bằng cách sử dụng các tế bào này, một số vấn đề có thể xảy ra là các tế bào này có thể bị dùng hết trước khi chúng được sử dụng trong liệu pháp này, nhờ đó các tế bào gốc trung mô từ các nguồn khác cần được sử dụng, và trong trường hợp đó, các thử nghiệm khác cần được thực hiện do việc sử dụng các tế bào khác nhau.

Giải pháp thay thế lý tưởng nhất để giải quyết vấn đề trên về hệ thống nuôi cấy tế bào gốc trung mô hiện nay là sử dụng các tế bào gốc vạn năng của người để sản xuất các tế bào gốc trung mô. Tuy nhiên, việc cảm ứng sự biệt hóa từ các tế bào gốc vạn năng của người thành các tế bào gốc trung mô đòi hỏi quy trình cảm ứng bằng xytokin đặc hiệu (ví dụ như, BMP, bFGF), quy trình này tốn kém và cần kiểm soát nồng độ, hoặc quy trình cảm ứng trên tế bào nuôi ngoại sinh (dòng tế bào chuột OP9) có nguy cơ nhiễm mầm bệnh ngoại sinh, và sau đó phân loại bằng chất chỉ thị đặc hiệu (ví dụ như, CD73).

Ngoài ra, với các tế bào gốc trung mô được sản xuất bằng các phương pháp này, rất khó để duy trì trạng thái cơ bản của nó và hiệu suất sản xuất là không cao. Ngoài ra, các tế bào gốc vạn năng của người có nguồn gốc di truyền khác nhau có cơ chế sinh lý khác nhau, và vì vậy không thể sử dụng các quy trình hiện nay để kích thích sự biệt hóa các tế bào gốc trung mô, các tế bào này đã được thiết lập trước thành hàng đặc hiệu. Do đó, có một số khó khăn để cảm ứng các tế bào gốc trung mô từ các tế bào gốc vạn năng của người có nguồn gốc di truyền khác nhau, các quy trình cảm ứng biệt hóa riêng biệt cần được phát triển và ứng dụng. Vì các lý do này, các tế bào gốc trung mô có các giới hạn trong việc sử dụng làm các sản phẩm trị liệu tế bào lý tưởng trong các lĩnh vực thuốc tái tạo và liệu pháp tế bào.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất quy mô lớn các tế bào gốc trung mô với hiệu suất cao, quy trình này thường được áp dụng cho các tế bào gốc vạn năng của người có nguồn gốc di truyền khác nhau. Ngoài ra, sáng chế đề xuất các tế bào gốc trung mô được sản xuất bằng quy trình này, các sản phẩm trị liệu tế bào chứa các tế bào gốc trung mô, và hệ thống nuôi cấy được chuẩn hóa để sản xuất các tế bào gốc

trung mô từ các tế bào gốc vạn năng của người.

Để giải quyết vấn đề trên đây, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất các tế bào gốc trung mô từ tế bào gốc vạn năng của người, quy trình này bao gồm: a) tạo các thể phôi từ các tế bào gốc vạn năng của người; b) gắn các thể phôi vào đĩa nuôi cấy mô và sau đó cảm ứng sự biệt hóa tự phát của các thể phôi thành tế bào gốc trung mô; và c) thực hiện nuôi cấy tăng sinh liên tục các tế bào gốc trung mô trong khi vẫn duy trì sự đồng nhất của các tế bào gốc trung mô. Cụ thể là, việc cảm ứng sự biệt hóa này có thể bao gồm cảm ứng sự biệt hóa tự phát bằng cách tạo ra các vòng xytokin tự thân, và có đặc tính là sử dụng môi trường chứa yếu tố sinh trưởng biểu mô của người (human epidermal growth factor - hEGF), yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (vascular endothelial growth factor - VEGF), yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi cơ bản của người (human fibroblast growth factor-basic - hFGF-B), yếu tố sinh trưởng tương tự insulin (insulin-like growth factor - IGF-1), hydrocortison, axit ascorbic, v.v... có thể được sử dụng để duy trì và nuôi cấy tăng sinh các tế bào gốc trung mô được cảm ứng biệt hóa.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1A thể hiện sự cảm ứng biệt hóa thành các tế bào gốc trung mô từ các tế bào gốc vạn năng của người và việc nuôi cấy tăng sinh chúng.

Fig.1B thể hiện các kết quả định lượng sự khác biệt về biểu hiện gen liên quan đến sự biệt hóa trung mô các thể phôi 7 ngày và thể phôi 14 ngày bằng cách sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza.

Fig.1C thể hiện kết quả xác nhận sự biểu hiện protein của các gen ở giai đoạn sớm của sự biệt hóa trung mô bằng cách nhuộm các thể phôi 14 ngày.

Fig.2A thể hiện sự phân loại thể phôi vào ngày 14 ở thời điểm gắn chúng.

Fig.2B thể hiện là sự cảm ứng biệt hóa thành các tế bào gốc trung mô được bắt đầu khi các thể phôi được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy thông thường, môi trường này không bổ sung xytokin ngoại sinh.

Các Fig.2C và 2D thể hiện quy trình cảm ứng sự biệt hóa thành các tế bào gốc trung mô trong nhóm không được xử lý và được xử lý bằng Noggin là chất đối vận BMP.

Fig. 3 thể hiện sự khác biệt về hiệu lực giữa môi trường EGM-2MV và môi

trường α -MEM, là môi trường hiện nay để nuôi cấy các tế bào gốc trung mô, được xác nhận bằng cách nhuộm beta-gal kèm theo sự lão hóa tế bào.

Fig.4A thể hiện hình sinh trưởng của tế bào gốc trung mô được nuôi cấy trong môi trường EGM-2MV trong 140 ngày hoặc lâu hơn.

Fig.4B là đường cong sinh trưởng của các tế bào gốc trung mô theo sáng chế thể hiện rằng chúng sinh trưởng trong khi vẫn duy trì hoạt tính lâu dài khi được nuôi cấy in vitro.

Fig.5A và 5B thể hiện là các tế bào gốc trung mô thu được bằng quy trình theo sáng chế biểu hiện các chất chỉ thị đặc hiệu trung mô.

Fig.6 thể hiện các kết quả phân tích nhiễm sắc thể của tế bào gốc trung mô theo sáng chế sau khi nuôi cấy in vitro một thời gian dài.

Fig.7A và 7B thể hiện các kết quả phân tích về khả năng biệt hóa các tế bào gốc trung mô thu được bằng quy trình theo sáng chế;

Fig.8A và 8B thể hiện liệu u quái có được tạo thành và các yếu tố liên quan đến sự cảm ứng miễn dịch có được biểu hiện hay không nhờ tế bào gốc trung mô thu được bằng quy trình theo sáng chế;

Fig.9 thể hiện các kết quả thu được bằng cách quan sát chức năng, sử dụng mô hình chuột bị bệnh tim do thiếu máu tim mạch cục bộ để đánh giá chức năng của các tế bào gốc trung mô thu được bằng quy trình theo sáng chế;

Fig.10 thể hiện các kết quả thử nghiệm về khả năng làm tế bào nuôi tự thân của các tế bào gốc trung mô thu được bằng quy trình theo sáng chế; và

Fig.11 thể hiện các kết quả kiểm tra về khả năng tái sản xuất của sáng chế bằng cách sử dụng dòng tế bào gốc phôi của người số 3 của trung tâm Y học Cha (CHA3-hESC) và dòng tế bào gốc phôi của người H9 có các nguồn gốc di truyền và môi trường nuôi cấy khác nhau từ các tế bào gốc phôi của người của Bệnh viện đại học quốc gia Seoul.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất tế bào gốc trung mô bằng cách sử dụng tế bào gốc vạn năng của người, quy trình này bao gồm: a) tạo thể phôi từ tế bào gốc vạn năng của người; b) gắn thể phôi vào đĩa nuôi cấy mô và sau đó cảm ứng sự biệt hóa tự phát của các thể phôi thành tế bào gốc trung mô; và c) duy trì và nuôi cấy tăng sinh các

tế bào gốc trung mô được cảm ứng biệt hóa. Cụ thể là, sáng chế có thể bao gồm việc tạo ra các thể phôi từ tế bào gốc vạn năng của người, và việc này có thể được thực hiện bằng quy trình thông thường đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ như, tế bào gốc vạn năng của người có thể được xử lý bằng proteaza, và sau đó được nuôi cấy ở trạng thái huyền phù trong môi trường tế bào gốc phôi không chứa yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi cơ bản (bFGF).

Thuật ngữ “tế bào gốc” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ các tế bào chủ có thể tái sinh không hạn chế các tế bào nhờ đó tạo ra các tế bào chuyên biệt của mô và cơ quan. Các tế bào gốc là tế bào đa năng hoặc tế bào vạn năng có thể phát triển được. Tế bào gốc có thể được phân bào thành hai tế bào gốc thế hệ con, hoặc một tế bào gốc thế hệ con và một tế bào chuyển tiếp, và sau đó chúng phát triển thành loại tế bào mô trưởng thành và hoàn thiện. Các tế bào gốc này có thể được phân loại bằng nhiều phương pháp khác nhau. Một trong số các phương pháp được sử dụng phổ biến nhất phụ thuộc vào khả năng biệt hóa tế bào gốc. Theo phương pháp này, các tế bào gốc có thể được phân loại thành các tế bào gốc vạn năng mà có thể biệt hóa thành các tế bào lớp 3 phôi, các tế bào gốc đa năng mà có thể biệt hóa hạn chế thành một hoặc nhiều lớp phôi đặc hiệu, và các tế bào gốc đơn năng mà chỉ có thể biệt hóa thành một lớp phôi đặc hiệu.

Thuật ngữ “tế bào gốc vạn năng” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ các tế bào gốc có khả năng đa dạng, là khả năng biệt hóa thành cả ba lớp phôi tạo nên cơ thể sống, và ví dụ về chúng bao gồm các tế bào gốc phôi và các tế bào gốc vạn năng cảm ứng (induced pluripotent stem - iPS). Các tế bào gốc trưởng thành có thể là các tế bào gốc đa năng hoặc đơn năng.

Thuật ngữ “biệt hóa” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ quy trình mà nhờ nó các tế bào trở nên chuyên biệt về cấu trúc hoặc chức năng trong quá trình phân chia, tăng sinh và sinh trưởng của tế bào, nghĩa là, sự thay đổi về hình thái hoặc chức năng của các tế bào nhờ đó các tế bào, mô, v.v... của sinh vật thực hiện công việc được giao của chúng. Nói chung, đó là quy trình mà một hệ thống tương đối đơn giản được tách thành hai hoặc nhiều hệ thống bộ phận khác biệt về chất. Sự biệt hóa dùng để chỉ trạng thái trong đó các bộ phận của hệ thống sinh học nào đó, ban đầu là đồng nhất, trở nên khác biệt với nhau về chất, hoặc nhờ quy trình này, chúng phân chia thành các phần hoặc các hệ thống bộ phận có thể phân biệt được về chất, chẳng hạn như, đối với sự

phát triển cá thể trứng, mà ban đầu là đồng nhất, trở nên được phân biệt thành đầu, thân, v.v... hoặc các tế bào như tế bào cơ, tế bào thần kinh, v.v... trở nên phân biệt được với nhau.

Thuật ngữ “thể phôi” (embryonic body - EB) như được sử dụng ở đây dùng để chỉ khối tập hợp được tạo ra bằng cách cảm ứng sự biệt hóa các tế bào gốc vạn năng. Thể phôi có thể được tạo ra khi các tế bào gốc vạn năng được nuôi cấy ở trạng thái huyền phù không có các tế bào nuôi trong môi trường tế bào gốc phôi không chứa yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi cơ bản (basic fibroblast growth factor - bFGF). Thể phôi được tạo ra bằng quy trình trên đây đã được báo cáo là có thể biệt hóa thành tất cả các tế bào cần thiết cho sự tạo thành cá thể từ nội bì, trung bì và ngoại bì và điều này phù hợp với một trong số các quy trình in vitro chứng minh khả năng đa dạng của tế bào gốc vạn năng.

Sáng chế có thể bao gồm việc lựa chọn các thể phôi vào ngày nuôi cấy thứ 14, và cảm ứng sự biệt hóa thể phôi thành các tế bào gốc trung mô. Cụ thể là, các thể phôi vào ngày nuôi cấy thứ 14, đã được tạo thành bằng cách nuôi cấy các tế bào gốc vạn năng của người ở trạng thái huyền phù trong môi trường tế bào gốc phôi không chứa bFGF, có thể được lựa chọn và sau đó được sử dụng trong quy trình sản xuất các tế bào gốc trung mô. Các thể phôi vào ngày nuôi cấy thứ 7 thường được sử dụng trong các quy trình hiện nay để cảm ứng sự biệt hóa thành các tế bào gốc trung mô từ các tế bào gốc vạn năng của người (thường là các tế bào gốc phôi của người). Tuy nhiên, các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng việc lựa chọn các thể phôi vào ngày nuôi cấy 14 thay vì các thể phôi vào ngày nuôi cấy 7 có thể làm tăng hiệu lực cảm ứng biệt hóa khi sản xuất các tế bào gốc trung mô từ các tế bào gốc vạn năng của người. Cụ thể là, theo các kết quả nghiên cứu sự biểu hiện gen của các thể phôi vào ngày nuôi cấy 7 và 14, đã xác nhận là các gen liên quan đến sự biệt hóa trung mô sớm (brachyury, BMPR, v.v...) và Sox 17, là gen quan trọng trong các tế bào trung mô tim sớm, được biểu hiện cao rõ rệt trong các thể phôi vào ngày nuôi cấy 14 so với các thể phôi vào ngày nuôi cấy thứ 7 hiện nay (xem Fig. 1B). Được thấy từ các kết quả trên là việc lựa chọn thể phôi vào ngày nuôi cấy 14 có thể cảm ứng sự biệt hóa ưu tiên thành các tế bào gốc trung mô.

Thêm vào đó, sáng chế có thể bao gồm việc gắn các thể phôi ở ngày nuôi cấy 14 vào đĩa nuôi cấy mô, sau đó cảm ứng sự biệt hóa tự phát của các thể phôi thành các

tế bào gốc trung mô. Khi việc cảm ứng sự biệt hóa thành các tế bào gốc trung mô từ các tế bào gốc vạn năng của người được cảm ứng, thường khởi động sự cảm ứng biệt hóa bằng cách bổ sung protein hình thái xương (BMP)-2, v.v... từ bên ngoài. Các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng sự biệt hóa tự phát thành các tế bào gốc trung mô được cảm ứng khi các thể phôi được nuôi cấy bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy tế bào thông thường, chẳng hạn như môi trường Eagle cải biến của Dulbecco (DMEM), v.v... mà không bổ sung BMP-2, v.v... từ bên ngoài (xem Fig. 2B). Liên quan đến cơ chế này, các tác giả sáng chế xem xét khả năng tạo vòng tự động của BMP, là yếu tố cảm ứng tế bào gốc trung mô, được biết đến trong lĩnh vực có liên quan, và sau đó, để chứng minh điều này, quan sát quy trình cảm ứng sự biệt hóa các tế bào gốc trung mô bằng cách xử lý với Noggin là chất đối vận BMP (xem Fig. 2C và 2D). Quy trình biệt hóa thành các tế bào gốc trung mô được cảm ứng trong nhóm không được xử lý bằng Noggin (xem Fig. 2C). Tuy nhiên, được quan sát thấy là các tế bào gốc trung mô không xuất hiện trong nhóm được xử lý bằng Noggin (xem Fig. 2D), và khi môi trường nuôi cấy được chuyển tiếp, việc nuôi cấy tế bào là không thể vì các tế bào này không thể được gắn lại. Có thể thấy được từ các kết quả trên là, khi thể phôi ở ngày nuôi cấy 14 được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy thông thường sau khi gắn chúng, sự biệt hóa tự phát thành các tế bào gốc trung mô được cảm ứng ngay cả khi không bổ sung xytokin từ bên ngoài, và điều này là do sự tự điều hòa bằng hệ thống vòng BMP.

Thêm vào đó, sáng chế có thể bao gồm việc duy trì và nuôi cấy tăng sinh các tế bào gốc trung mô được cảm ứng biệt hóa bằng cách sử dụng môi trường chứa xytokin. Trong sáng chế, môi trường tế bào nội mô vi mạch-2 (EGM-2MV, Lonza; Basel, Switzerland) chứa yếu tố sinh trưởng biểu mô của người (hEGF), yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (VEGF), yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi cơ bản của người (human fibroblast growth factor-basic: hFGF-B), yếu tố sinh trưởng tương tự insulin (IGF-1), hydrocortison, và axit ascorbic, v.v... được sử dụng làm môi trường nuôi cấy của các tế bào gốc trung mô. Các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng hoạt tính của tế bào gốc trung mô được duy trì tương đối dài hơn trong môi trường nuôi cấy in vitro của chúng, khi môi trường EGM-2MV được sử dụng thay vì môi trường α -MEM đã được sử dụng rộng rãi làm môi trường nuôi cấy tế bào gốc trung mô hiện nay.

Để sử dụng các tế bào gốc trung mô làm sản phẩm trị liệu tế bào, việc cung cấp số lượng vừa đủ tế bào như được mô tả trên đây phải được đặt lên hàng đầu, và với

mục đích này, môi trường nuôi cấy được chuyển tiếp của các tế bào gốc trung mô là cần thiết. Tuy nhiên, môi trường nuôi cấy được chuyển tiếp lặp lại có thể gây ra sự lão hóa tế bào gốc trung mô, dẫn đến mất khả năng phân chia của chúng, và do đó, hoạt tính (khả năng biệt hóa) của chúng có thể bị mất. Về mặt này, được xác nhận là môi trường EGM-2MV theo sáng chế có khả năng duy trì hoạt tính tốt hơn so với môi trường α -MEM đã được sử dụng làm môi trường nuôi cấy tế bào gốc trung mô hiện nay (xem Fig. 3). Cụ thể là, do thực hiện nhuộm beta gal mà nhờ đó các tế bào được nhuộm ở thời điểm lão hóa của chúng, đã được thấy là việc nhuộm beta-gal nhiều tế bào hơn được thực hiện và kích thước của các tế bào trở nên lớn hơn rõ rệt trong các tế bào gốc trung mô được nuôi cấy bằng cách sử dụng môi trường α -MEM so với trong tế bào gốc trung mô được nuôi cấy bằng cách sử dụng môi trường EGM-2MV. Thường được biết là, khi nuôi cấy in vitro tế bào gốc, sự không sinh trưởng do lão hóa tế bào có liên quan đến sự phình to của tế bào. Điều này có nghĩa là, khi các tế bào gốc trung mô được nuôi cấy bằng cách sử dụng môi trường α -MEM, sự lão hóa của tế bào gốc trung mô bị tăng nhanh, và do đó, khả năng biệt hóa của các tế bào gốc trung mô bị mất đi.

Thêm vào đó, sáng chế đề xuất tế bào gốc trung mô được sản xuất bằng quy trình theo sáng chế. Các tế bào gốc trung mô có thể biệt hóa thành tế bào xương, tế bào sụn, và tế bào cơ, v.v.... và được xác định bằng dạng xoắn, và mức độ biểu hiện của các chất chỉ thị bề mặt tế bào cơ bản, SH2(+), SH3(+), CD34(-), và CD45(-). Tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ tế bào gốc phôi của người của Bệnh viện trường đại học Quốc gia Seoul (tế bào nuôi STO, đực, Asian #1) thu được bằng quy trình theo sáng chế thu được các kết quả giống nhau trong 3 thử nghiệm khác nhau, các kết quả này được xác nhận bằng máy phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang và bằng cách biệt hóa chức năng.

Sáng chế đề xuất quy trình chuẩn hóa để cảm ứng sự biệt hóa và nuôi cấy tăng sinh, quy trình này có thể được sử dụng để sản xuất các tế bào gốc trung mô từ các tế bào gốc vạn năng của người có nguồn gốc di truyền khác nhau. Về mặt này, quy trình theo sáng chế được thực hiện trên các tế bào gốc phôi của người của Trung tâm y học Cha (tế bào nuôi MEF, đực, Asian #2) và các tế bào gốc phôi người H9 (tế bào nuôi MEF, cái, Westerner), các tế bào này có các nguồn gốc di truyền khác so với các tế bào gốc phôi của người của Bệnh viện đại học Quốc gia Seoul, và các kết quả đạt được

từ đó là giống nhau. Nghĩa là, quy trình chuẩn hóa theo sáng chế có thể được sử dụng để cảm ứng sự biệt hóa các tế bào gốc trung mô từ các tế bào gốc vạn năng của người có nguồn gốc di truyền khác nhau và/hoặc các môi trường nuôi cấy khác nhau.

Thêm vào đó, sáng chế đề xuất các sản phẩm trị liệu tế bào bao gồm các tế bào gốc trung mô thu được bằng quy trình theo sáng chế. Cụ thể là, các sản phẩm trị liệu tế bào có thể được sử dụng để tạo ra tế bào tạo mỡ, tế bào xương, tế bào sụn, tế bào cơ, tế bào thần kinh và các tế bào cơ tim và sự biệt hóa thành nhiều loại tế bào khác nhau tùy theo các môi trường.

Thuật ngữ “sản phẩm trị liệu tế bào” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ thuốc cho mục đích điều trị, chẩn đoán, và phòng ngừa chứa các tế bào hoặc mô được bào chế từ người bằng cách phân lập, nuôi cấy và thao tác chuyên môn hóa (hướng dẫn FDA Mỹ), cụ thể hơn là, thuốc cho mục đích điều trị, chẩn đoán, và phòng ngừa, được bào chế bằng quy trình bất kỳ bao gồm tăng sinh hoặc phân loại các tế bào sống tự thân, đồng nhất hoặc khác loại in vitro, hoặc biến đổi các đặc tính sinh học của tế bào bằng các quy trình khác, để hồi phục chức năng của tế bào hoặc mô. Sản phẩm trị liệu tế bào được phân loại rộng thành các sản phẩm trị liệu tế bào xoma và các sản phẩm trị liệu tế bào gốc theo mức độ biệt hóa tế bào, và sáng chế đề cập cụ thể đến sản phẩm trị liệu tế bào gốc.

Thêm vào đó, sáng chế đề xuất hệ thống sản xuất tế bào gốc trung mô từ các tế bào gốc vạn năng của người có nhiều nguồn gốc di truyền khác nhau. Hệ thống này bao gồm: a) nuôi cấy tế bào gốc vạn năng của người và lựa chọn các thể phôi vào ngày nuôi cấy thứ 14; b) gắn các thể phôi vào đĩa nuôi cấy mô và nuôi cấy các thể phôi này bằng cách sử dụng môi trường DMEM + FBS cảm ứng, nhờ đó cảm ứng sự biệt hóa các thể phôi; c) và duy trì và nuôi cấy tăng sinh các tế bào gốc trung mô bằng cách sử dụng môi trường chứa yếu tố sinh trưởng biểu mô của người (hEGF), yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (VEGF), yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi cơ bản của người (hFGF-B), yếu tố sinh trưởng tương tự insulin (IGF-1), hydrocortison, và axit ascorbic.

Thêm vào đó, sáng chế đề xuất tế bào nuôi để nuôi cấy tế bào gốc vạn năng của người. Tế bào nuôi cần thiết để duy trì liên tục trạng thái chưa biệt hóa của tế bào gốc vạn năng của người trong môi trường nuôi cấy của nó. Nguyên bào sợi có nguồn gốc từ phôi của chuột được ưu tiên sử dụng làm tế bào nuôi hiện nay cho các tế bào gốc

vận năng của người. Tuy nhiên, do sự thâm nhiễm nhiều mầm bệnh khác nhau giữa các loài đã được thừa nhận là một vấn đề khi các tế bào gốc vận năng được sử dụng lâm sàng, một số tế bào có nguồn gốc từ người đã được báo cáo là có thể làm tế bào nuôi như một giải pháp thay thế. Tuy nhiên, điều này cũng không khắc phục được các nhược điểm: không thể loại trừ tuyệt đối các mầm bệnh khác loại; cần phải có các yếu tố ngoại lai để duy trì trạng thái chưa biệt hóa (ví dụ như, bFGF, IGF, và ACTIVIN, v.v...); và không thể cung cấp liên tục các tế bào để nuôi cấy lâu dài. Ngược lại, các tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ các tế bào gốc vận năng của người, mà được sản xuất theo sáng chế, có thể cung cấp liên tục các tế bào có nguồn gốc giống nhau, và cũng có thể loại trừ sự khước từ miễn dịch và/hoặc thâm nhiễm các mầm bệnh khác như các tế bào nuôi tự thân. Ngoài ra, sáng chế phát hiện ra ưu điểm là các yếu tố duy trì trạng thái chưa biệt hóa ngoại lai là không cần thiết khi các tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ các tế bào gốc vận năng của người, mà được sản xuất theo sáng chế, được sử dụng làm tế bào nuôi. Nói cách khác, được xác nhận là trạng thái chưa biệt hóa được duy trì ngay cả khi không bổ sung các yếu tố duy trì trạng thái chưa biệt hóa trong 30 hoặc nhiều lần cấy chuyển hơn (xem, Fig. 10), và tác dụng đáng chú ý này, “duy trì trạng thái chưa biệt hóa trong một thời gian dài” không thể thu được ngay cả khi một số tế bào nuôi hiện nay có nguồn gốc từ người được sử dụng trong điều kiện bổ sung lượng dư các yếu tố để duy trì trạng thái chưa biệt hóa.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết bằng cách tham khảo các ví dụ dưới đây. Tuy nhiên, các ví dụ dưới đây là để minh họa cho sáng chế, và do đó phạm vi của sáng chế không bị giới hạn vào các ví dụ này. Rõ ràng là nhiều biến đổi khác nhau được tạo ra bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đều được bao gồm trong phạm vi kỹ thuật của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất các tế bào gốc trung mô từ các tế bào gốc phôi của người của bệnh viện đại học quốc gia Seoul

(1) Tạo thể phôi

Các tế bào gốc phôi của người của bệnh viện đại học Quốc gia Seoul (tế bào nuôi STO, đực, Asian #1), các tế bào này được duy trì ở trạng thái chưa biệt hóa, được xử lý bằng dispaza (2mg/ml), tiếp theo là phân lập bằng thao tác chính xác, và sau đó được nuôi cấy ở trạng thái huyền phù trong môi trường tế bào gốc phôi không chứa

bFGF trong 14 ngày.

Phân tích gen được thực hiện trên các thể phôi vào ngày nuôi cấy thứ 7 và thứ 14, và sự khác biệt về biểu hiện gen liên quan đến biệt hóa trung mô cho các thể phôi tương ứng được định lượng bằng cách sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR). Được xác nhận rằng brachyury và BMPR là các gen liên quan đến sự biệt hóa trung mô sớm, và Sox 17 là gen quan trọng trong các tế bào trung mô tim sớm, được biểu hiện cao rõ rệt trong các thể phôi vào ngày nuôi cấy 14 so với các thể phôi vào ngày nuôi cấy thứ 7 (xem Fig. 1B). Thêm vào đó, sự biểu hiện protein của brachyury và vị trí của nó được xác nhận bằng cách nhuộm các thể phôi vào ngày nuôi cấy 14 (xem, Fig. 1C).

(2) Cảm ứng sự biệt hóa thành các tế bào gốc trung mô

Các thể phôi đã được tạo ra bằng cách nuôi cấy huyền phù trong 14 ngày được gắn vào đĩa nuôi cấy mô, và sau đó được cảm ứng biệt hóa tự nhiên thành các tế bào gốc trung mô. Việc phân loại các thể phôi vào ngày thứ 14 ở thời điểm gắn được chỉ ra trong Fig. 2A. Sau khi gắn, một số thể phôi được sinh trưởng tốt (hình ảnh bên trái của Fig. 2A), và các thể phôi khác không sinh trưởng tốt (hình ảnh bên phải của Fig. 2A). Việc cảm ứng sự biệt hóa thành các tế bào gốc trung mô được quan sát trong khi các thể phôi được nuôi cấy trong môi trường chứa môi trường của Eagle cải biến Dulbecco (DMEM) và huyết thanh bào thai bò (10% v/v) trong 16 ngày. Các kết quả quan sát vào ngày thứ 3 và thứ 7 sau khi gắn các thể phôi được thể hiện trong Fig. 2B.

Như thấy được từ Fig. 2B, được xác nhận là việc cảm ứng sự biệt hóa tự phát các thể phôi thành các tế bào gốc trung mô được khởi động khi các thể phôi được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy thông thường (DMEM+FBS) mà không có xytokin. Để phát hiện ra cơ chế của sự cảm ứng biệt hóa, quy trình cảm ứng sự biệt hóa thành các tế bào gốc trung mô bằng cách xử lý với Noggin, là chất đối vận BMP, được so sánh và quan sát (xem Fig. 2C và 2D). Được xác nhận là sự biệt hóa thành các tế bào gốc trung mô được cảm ứng trong nhóm không được xử lý bằng Noggin (xem Fig. 2C), trong khi đó các tế bào gốc trung mô không được quan sát thấy trong nhóm được xử lý bằng Noggin (xem Fig. 2D). Có thể thấy được từ các kết quả trên là, khi các thể phôi được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy thông thường không bổ sung xytokin từ bên ngoài, việc cảm ứng sự biệt hóa tự phát thành các tế bào gốc trung mô là do bởi hệ thống vòng phản hồi tự động BMP.

(3) Duy trì và nuôi cấy tăng sinh các tế bào gốc trung mô được cảm ứng biệt hóa

Các tế bào gốc trung mô, đã được cảm ứng biệt hóa bằng cách nuôi cấy các thể phôi trong 16 ngày sau khi gắn chúng trong (2) theo ví dụ 1, được xử lý bằng các enzym (Trypsin-EDTA, 0,25% Trypsin với EDTA 4Na), được cách ly vào các tế bào đơn lẻ, các tế bào này sau đó được gắn lại vào đĩa nuôi cấy mô. Sau đó, các tế bào này được duy trì và nuôi cấy tăng sinh ở 37°C, bằng cách sử dụng 500ml môi trường nuôi cấy chứa 0,5ml yếu tố sinh trưởng biểu mô của người (hEGF), 0,5ml yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (VEGF), 2ml yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi cơ bản của người (hFGF-B), 0,5ml yếu tố sinh trưởng tương tự insulin (IGF-1), 0,2ml hydrocortison, và 0,5ml axit ascorbic, cộng thêm 470ml môi trường bazơ.

Về việc liệu hoạt tính của các tế bào gốc trung mô có được duy trì trong suốt quá trình nuôi cấy tăng sinh hay không, khả năng duy trì hoạt tính trong môi trường EGM-2MV được sử dụng trong sáng chế và môi trường α -MEM là môi trường nuôi cấy tế bào gốc trung mô hiện nay, được so sánh với nhau trong thử nghiệm. Cụ thể là, việc nhuộm beta-gal liên quan đến sự lão hóa được thực hiện trên các nhóm tế bào được nuôi cấy bằng cách sử dụng môi trường tương ứng, và các kết quả được thể hiện trong Fig. 3 (việc nuôi cấy và so sánh được thực hiện trong một tháng, và các tế bào của lần cấy chuyển thứ 7 được sử dụng).

Được thể hiện trong Fig. 3 là việc nhuộm beta-gal nhiều tế bào hơn được thực hiện trong các tế bào gốc trung mô được nuôi cấy bằng cách sử dụng môi trường α -MEM so với trong các tế bào gốc trung mô được nuôi cấy bằng cách sử dụng môi trường EGM-2MV. Điều này có nghĩa là, khi các tế bào gốc trung mô được nuôi cấy bằng cách sử dụng môi trường α -MEM, sự lão hóa các tế bào gốc trung mô được thúc đẩy nhanh hơn, và do đó, khả năng biệt hóa các tế bào gốc trung mô bị mất, và cuối cùng các tế bào gốc trung mô không thể có tác dụng làm sản phẩm trị liệu tế bào. Trong khi đó, việc sử dụng môi trường EGM-2MV theo sáng chế có thể duy trì hoạt tính của các tế bào gốc trung mô trong một thời gian dài mặc dù môi trường nuôi cấy được cấy chuyển liên tục, và do đó, có thể cải thiện tương đối tính khả thi làm các sản phẩm trị liệu tế bào, so với việc sử dụng môi trường α -MEM.

Thêm vào đó, thực hiện kiểm tra liệu sự đồng nhất và hoạt tính của các tế bào gốc trung mô có thể được duy trì liên tục hay không khi các tế bào gốc trung mô được

nuôi cấy trong một thời gian dài bằng cách sử dụng môi trường EGM-2MV, và các kết quả của việc kiểm tra được thể hiện trong Fig. 4. Fig. 4A chỉ ra các tế bào sau khi nuôi cấy 140 ngày hoặc lâu hơn bằng cách sử dụng môi trường EGM-2MV, và nó chỉ ra là hình dạng sinh trưởng của các tế bào này vẫn có mô hình in dấu, là mô hình điển hình của các tế bào gốc trung mô. Fig. 4B thể hiện là sự phân chia tế bào liên tục và nhanh xảy ra đến tận 140 ngày nuôi cấy, và được chỉ ra là hoạt tính của các tế bào gốc trung mô có thể được duy trì liên tục. Kết luận là, có thể thấy rõ sự đồng nhất và hoạt tính của các tế bào gốc trung mô có thể được duy trì trong một thời gian dài khi các tế bào gốc trung mô đã cảm ứng biệt hóa được duy trì và nuôi cấy tăng sinh trong môi trường EGM-2MV theo sáng chế.

Ví dụ 2: Mô tả các tế bào gốc trung mô

(1) Phân tích các chất chỉ thị bề mặt tế bào

Được phân tích là liệu các chất chỉ thị bề mặt tế bào đặc hiệu với các tế bào gốc trung mô thu được trong ví dụ 1 có được biểu hiện hay không. Các kết quả thu được bằng cách sử dụng máy phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang sau phản ứng kháng nguyên-kháng thể được thể hiện trong Fig. 5. IgG, được sử dụng làm đối chứng.

Được xác nhận từ Fig. 5A là CD73 và CD105 là các chất chỉ thị đặc hiệu với các tế bào gốc trung mô vẫn được biểu hiện với số lượng lớn trong các tế bào này vào ngày nuôi cấy 95 (D95) và vào ngày nuôi cấy 129 (D129). Thêm vào đó, việc phân tích các chất chỉ thị bề mặt tế bào được thực hiện trên các tế bào gốc trung mô vào ngày nuôi cấy 129, và các kết quả được thể hiện trong Fig. 5B. Được xác nhận từ Fig. 5B là CD29, CD44, và CD90 là các chất chỉ thị tế bào gốc trung mô của người (hMSC) được biểu hiện nhưng SSEA1, SSEA4, TRA-1-60, và OCT-4 là các chất chỉ thị tế bào gốc phôi của người (hESC), cũng như chất chỉ thị nội bì và ngoại bì (các chất chỉ thị nội giống khác) đều không được biểu hiện.

Cuối cùng, theo quy trình theo sáng chế, được chỉ ra một cách rõ ràng là chỉ sự biệt hóa của các tế bào gốc trung mô là được cảm ứng chọn lọc từ các tế bào gốc vạn năng của người, và ngoài ra, sự đồng nhất của các tế bào gốc trung mô vẫn có thể được duy trì trong thời gian nuôi cấy tăng sinh dài các tế bào này.

(2) Phân tích kiểu hình nhân

Kiểu hình nhân của các tế bào gốc trung mô (vào ngày nuôi cấy 160) thu được trong ví dụ 1 được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp tạo dải G (Saccone et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4913-4917, 1992), và các kết quả này được thể hiện trong Fig. 6. Được xác nhận từ Fig. 6 là tế bào gốc trung mô có kiểu hình nhân bình thường là XY+44.

(3) Xác nhận chức năng (khả năng biệt hóa) của các tế bào gốc trung mô

Để xác nhận khả năng biệt hóa của các tế bào gốc trung mô (vào ngày nuôi cấy 129) thu được trong ví dụ 1, phân tích được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp đã được báo cáo trước đây (Tiziano Barberi et al., PLoS Medicine, 2:0554-0560, June 2005; và Kitsie J. Penick et al., Biotechniques, 39:687-691, 2005). Cụ thể là, sự biệt hóa thành tế bào tạo mỡ, tế bào sụn, tế bào xương và tế bào cơ từ các tế bào gốc trung mô được cảm ứng, và sau đó sự biểu hiện gen đặc hiệu với các tế bào tương ứng được kiểm tra bằng phản ứng nhuộm miễn dịch. Các kết quả biệt hóa tế bào được chỉ ra trong Fig. 7A.

Các tế bào tạo mỡ được nhuộm bằng dầu đỏ O, chất này nhuộm nhỏ giọt tế bào tạo mỡ, và các tế bào sụn được nhuộm bằng aggrecan và collagen II là các protein biểu hiện đặc hiệu bằng cách sử dụng phản ứng kháng nguyên-kháng thể. Ngoài ra, sự biệt hóa của tế bào xương được xác nhận bằng cách nhuộm Von Kossa, phương pháp nhuộm này xác nhận sự tạo thành các chất khoáng, và sự biệt hóa của các tế bào cơ được xác nhận bằng MYF 5 là protein biểu hiện đặc hiệu, bằng cách sử dụng phản ứng kháng nguyên-kháng thể.

Thêm vào đó, sự biểu hiện của các gen tương ứng đặc hiệu với các tế bào tạo mỡ, tế bào sụn, tế bào xương, và tế bào cơ được định lượng bằng PCR khi các tế bào gốc trung mô được biệt hóa thành các tế bào tương ứng, và các kết quả được thể hiện trong Fig. 7B. Được xác nhận từ Fig. 7B, là Serbf và PPAR γ trong tế bào tạo mỡ, ALP, Osteocalcin, và Osteopontin trong tế bào xương, Aggrecan trong tế bào sụn, và MyoD trong tế bào cơ lần lượt được biểu hiện. Được chỉ ra một cách rõ ràng từ các kết quả trên đây là các tế bào gốc trung mô thu được theo quy trình theo sáng chế vẫn giữ được khả năng đa dạng để biệt hóa thành tế bào tạo mỡ, tế bào sụn, tế bào xương, và tế bào cơ.

(4) Xác nhận sự tạo u bằng cách sử dụng chuột suy giảm miễn dịch

Các tế bào gốc trung mô theo sáng chế thu được bằng cách sử dụng chuột suy giảm miễn dịch trong ví dụ 1 được xác nhận xem có tạo u hay không. Các tế bào gốc phôi của người được sử dụng cho thử nghiệm đối chứng. Cụ thể là, 1×10^7 tế bào gốc

trung mô và 3×10^6 tế bào gốc phôi của người của bệnh viện đại học Quốc gia Seoul được tiêm vào chuột suy giảm miễn dịch, và các kết quả mô phân tích sau 12 tuần được chỉ ra trong Fig. 8A. Được xác nhận từ Fig. 8A, là u quái được tạo ra ở chuột mà trong đó tế bào gốc phôi của người của bệnh viện đại học Quốc gia Seoul được tiêm vào, và u quái không được tạo ra ở chuột mà trong đó các tế bào gốc trung mô theo sáng chế được tiêm vào. Thêm vào đó, được xác nhận bằng FACS là các yếu tố liên quan đến cảm ứng miễn dịch không được biểu hiện, và các kết quả này được chỉ ra trong Fig. 8B. IgG, được sử dụng làm đối chứng. Được xác nhận từ Fig. 8B là HLA-DR và HLA-DQ là các phân tử MHC II được biểu hiện do sự xuất hiện khả năng gây miễn dịch không được biểu hiện như các yếu tố bề mặt, và B7-2 và B7-1 là các chất đồng mô phỏng liên quan đến cảm ứng miễn dịch không được biểu hiện.

Kết luận, được xác nhận là khối u không được cảm ứng ngay cả khi các tế bào gốc trung mô theo sáng chế được cấy vào chuột với lượng gấp khoảng 3 hoặc nhiều lần số lượng tế bào gốc phôi, đối chứng và các yếu tố liên quan đến cảm ứng miễn dịch không được biểu hiện ngay cả khi sự nuôi cấy kéo dài 12 tuần. Do đó, được chỉ ra một cách rõ ràng là các tế bào gốc trung mô theo sáng chế không có nguy cơ tạo khối u.

(5) Đánh giá chức năng bằng cách sử dụng mô hình bệnh tim mạch do thiếu máu cục bộ

Để đánh giá chức năng của các tế bào gốc trung mô theo sáng chế thu được từ ví dụ 1 đối với bệnh tim mạch do thiếu máu cục bộ, mô hình chuột bị bệnh tim mạch do thiếu máu cục bộ được sử dụng. Sau khi cấy 5×10^4 tế bào gốc trung mô (vào ngày nuôi cấy 129) trên mỗi cá thể vào chuột bị bệnh trên đây và chức năng của các tế bào gốc trung mô được đánh giá trong 8 tuần và các kết quả được chỉ ra trong Fig. 9.

Các Fig. 9A và 9B thể hiện tim mà trong đó các tế bào gốc trung mô được cấy vào và tim mà trong đó các tế bào gốc trung mô không được cấy vào. Chứng xơ hóa được quan sát thấy bằng cách nhuộm MT, và phần màu xanh lam trong hình vẽ chỉ ra chứng xơ hóa. Được thể hiện trong Fig. 9A và 9B, là sự mỏng đi do xơ hóa thành tim ít hơn ở mô tim mà trong đó các tế bào này được cấy vào (Fig. 9A) so với trong mô tim mà trong đó các tế bào không được cấy vào (Fig. 9A). Nghĩa là, chứng xơ hóa thành tim xảy ra ở bệnh tim do thiếu máu cục bộ, và do đó thành này bị mỏng đi. Trong khi đó, khi các tế bào gốc trung mô theo sáng chế được cấy, sự mỏng đi của

thành tim do chứng xơ hóa có thể được phòng ngừa. Thêm vào đó, Fig. 9C thể hiện các kết quả là phần xơ hóa của thành tim trong vùng gây tổn thương được biểu hiện và định lượng bằng số, và được thể hiện rõ ràng là phần xơ hóa được làm giảm thêm trong nhóm cấy tế bào so với trong nhóm đối chứng không cấy tế bào. Fig. 9D thể hiện các kết quả đo diện tâm đồ Echo trong 8 tuần tiếp theo. 2 dữ liệu đo diện tâm đồ ở tuần thứ 4 và 8 có thể xác nhận là sự dịch chuyển của thành tim là tốt hơn trong nhóm cấy tế bào so với đối chứng. LVEDD thể hiện tâm trương, và LVFS thể hiện tâm thu, và vì giá trị LVEDD nhỏ hơn và giá trị LVFS là lớn hơn, nên chức năng tim là tốt hơn.

Được xác nhận từ các kết quả là khi các tế bào gốc trung mô theo sáng chế được cấy vào mô hình chuột bị bệnh tim mạch, thành tim không bị mỏng đi, và các tế bào gốc trung mô thay thế mô chết, và do đó, vùng xơ hóa gây ra sự sai lệch chức năng tim bị thu nhỏ, nhờ đó cải thiện bệnh tim mạch do thiếu máu cục bộ.

(6) Các thử nghiệm về vai trò làm tế bào nuôi tự thân

Khả năng được dùng làm các tế bào nuôi để duy trì các tế bào gốc vạn năng của người ở trạng thái chưa biệt hóa của các tế bào gốc trung mô theo sáng chế được kiểm tra. Trong thử nghiệm này, việc nuôi cấy được tiến hành mà không có bFGF, đây là yếu tố duy trì trạng thái chưa được biệt hóa của các tế bào gốc vạn năng của người.

Cụ thể là, dòng tế bào gốc phôi của người số 3 của bệnh viện đại học quốc gia Seoul (SNUhES3) được nuôi cấy bằng cách sử dụng các tế bào gốc trung mô (SNU3MSC-1) theo sáng chế thu được bằng cách cảm ứng sự biệt hóa của dòng tế bào gốc phôi của người số 3 ở bệnh viện đại học quốc gia Seoul (SNUhES3) làm tế bào nuôi. Được xác nhận là, khi tế bào gốc phôi của người được nuôi cấy mà không có yếu tố duy trì trạng thái chưa biệt hóa, bFGF, trạng thái chưa được biệt hóa của các tế bào gốc phôi của người được duy trì dù là 30 lần cấy chuyển hoặc nhiều hơn (xem, Fig. 10). Có thể thấy được từ Fig. 10 là, OCT-4, SSEA-4, và TRA-1-60, là các chất chỉ thị tế bào gốc vạn năng của người, được biểu hiện ngay cả sau 30 lần cấy chuyển, và điều này chứng minh là khả năng chưa được biệt hóa của chúng được duy trì nguyên vẹn. Kết luận lại, được xác nhận là khi các tế bào gốc trung mô theo sáng chế được sử dụng làm tế bào nuôi tự thân ở thời điểm nuôi cấy các tế bào gốc vạn năng của người, khả năng chưa biệt hóa của các tế bào gốc vạn năng có thể được duy trì liên tục ngay cả khi không bổ sung bFGF, là yếu tố cần thiết để duy trì khả năng chưa biệt hóa của các tế bào gốc vạn năng trong quá trình nuôi cấy chúng hiện nay.

Ví dụ 3: Sản xuất các tế bào gốc trung mô từ tế bào gốc phôi của người của Trung tâm y tế Cha và các tế bào gốc phôi của người H9 và mô tả đặc điểm của chúng

Các thử nghiệm được thực hiện để xác nhận xem liệu quy trình sản xuất các tế bào gốc trung mô theo sáng chế có thể được áp dụng cho các tế bào gốc vạn năng của người có nguồn gốc di truyền và/hoặc môi trường nuôi cấy khác nhau, nghĩa là khả năng sinh sản của chúng hay không. Thử nghiệm này được thực hiện bằng quy trình giống như ví dụ 1 theo sáng chế, ngoại trừ là dòng tế bào gốc phôi của người số 3 của Trung tâm y tế Cha (CHA3-hESC) và các tế bào gốc phôi của người H9 có nguồn gốc di truyền và/hoặc môi trường nuôi cấy khác với các tế bào gốc phôi của người của bệnh viện đại học quốc gia Seoul được sử dụng. Cụ thể là, sau khi gắn các thể phôi vào ngày nuôi cấy 14, sự biệt hóa tự phát thành các tế bào gốc trung mô được cảm ứng trong môi trường nuôi cấy thông thường mà không bổ sung thêm xytokin từ bên ngoài, và sau đó, các tế bào gốc trung mô được thu bằng cách duy trì và nuôi cấy tăng sinh sử dụng môi trường EGM-2MV.

Fig.11 thể hiện các kết quả kiểm tra về khả năng sinh sản trong quy trình sản xuất của các tế bào gốc trung mô theo sáng chế bằng cách sử dụng dòng tế bào gốc phôi của người số 3 của trung tâm y tế Cha (CHA3-hESC) và các tế bào gốc phôi của người H9 có nguồn gốc di truyền và/hoặc môi trường nuôi cấy khác với các tế bào gốc phôi của người của bệnh viện đại học quốc gia Seoul.

Như có thể thấy được từ Fig. 11A và Fig. 11B, cả tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ Trung tâm y tế Cha (vào ngày nuôi cấy 90) và tế bào gốc trung mô thu được từ tế bào H9 (vào ngày nuôi cấy 90) đều thể hiện kiểu hình đặc trưng của các tế bào gốc trung mô. Thêm vào đó, các kết quả phân tích về sự biểu hiện protein bằng cách sử dụng máy phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang xác nhận là CD105, CD73, CD29, CD44, và CD90 là protein đặc hiệu với các tế bào gốc trung mô được công nhận là dương tính, và SSEA-1, SSEA-4, và TRA-1-60 là các chất chỉ thị đặc hiệu với các tế bào gốc phôi, và CD45, CD34 là các chất chỉ thị có nguồn gốc từ các lớp phôi khác được công nhận là âm tính [xem Fig. 11C (D90, các tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ các tế bào của Trung tâm y tế Cha và Fig. 11 (D90, các tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ các tế bào H9)].

Thêm vào đó, như các kết quả phân tích kiểu hình nhân của các tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ các tế bào của trung tâm y tế Cha (vào ngày nuôi cấy 90) và

các tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ các tế bào H9 (vào ngày nuôi cấy 90) bằng cách sử dụng phương pháp gắn dải G (Saccone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4913-4917, 1992), được xác nhận là cả hai loại tế bào này đều có kiểu hình nhân bình thường của XY+44 (xem lần lượt Fig. 11E và Fig. 11F).

Từ các kết quả trên, quy trình sản xuất các tế bào gốc trung mô từ các tế bào gốc vạn năng của người theo sáng chế được chứng minh là quy trình nuôi cấy tế bào gốc trung mô được chuẩn hóa, quy trình này thường được áp dụng cho các tế bào gốc vạn năng của người có nguồn gốc di truyền và/hoặc môi trường nuôi cấy khác nhau.

Sáng chế đề xuất quy trình chuẩn hóa để cảm ứng sự biệt hóa và nuôi cấy tăng sinh các tế bào gốc trung mô, quy trình này có thể được áp dụng rộng rãi cho tất cả các tế bào gốc vạn năng của người bất kể sự khác biệt về nguồn gốc di truyền của chúng. Ngoài ra, sáng chế có thể sản xuất quy mô lớn liên tục các tế bào gốc trung mô, như các nguồn tốt nhất cho các sản phẩm trị liệu tế bào, trong khi đó vẫn duy trì tính đồng nhất của các tế bào gốc trung mô. Ngoài ra, sáng chế có thể khắc phục nguy cơ mầm bệnh ngoại lai do sự cảm ứng các tế bào nuôi ngoại lai và phá hủy tế bào do sự phân loại bằng máy phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (fluorescent activated cell sorter - FACS), và cho phép sản xuất hiệu suất cao các tế bào gốc trung mô với giá thành thấp. Cuối cùng, sáng chế có thể dễ dàng sản xuất quy mô lớn các tế bào gốc trung mô có thể được sử dụng một cách lý tưởng trong thuốc tái tạo và liệu pháp tế bào, bằng cách sử dụng các tế bào gốc vạn năng của người, nhờ đó nhận ra các ứng dụng thực tế của các sản phẩm trị liệu tế bào. Thêm vào đó, sáng chế được mong đợi đóng góp lớn cho việc điều trị các bệnh nan y, chẳng hạn như các bệnh tim mạch và các bệnh rối loạn thần kinh.

Theo sáng chế, các tế bào gốc trung mô có thể được sản xuất với quy mô lớn như là các nguồn tốt nhất cho các sản phẩm trị liệu tế bào với giá thành thấp, trong khi đó vẫn duy trì tính đồng nhất của chúng. Cuối cùng, sáng chế có thể dễ dàng sản xuất quy mô lớn các tế bào gốc trung mô có thể được sử dụng một cách lý tưởng trong thuốc tái tạo và liệu pháp tế bào, bằng cách sử dụng các tế bào gốc vạn năng của người, nhờ đó nhận ra các ứng dụng thực tiễn của các chất trị liệu tế bào. Ngoài ra, sáng chế có thể đóng góp lớn cho việc điều trị các bệnh nan y, chẳng hạn như các bệnh tim mạch và các bệnh rối loạn thần kinh.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất các tế bào gốc trung mô từ các tế bào gốc vạn năng của người, quy trình này bao gồm các bước:

a) nuôi cấy các tế bào gốc vạn năng của người trong môi trường nuôi cấy tế bào gốc phôi không có bFGF trong 14 ngày để tạo các thể phôi, trong đó các tế bào thể phôi biểu hiện một hoặc nhiều chất chỉ thị được chọn lọc từ brachyury, BMPR, và Sox17;

b) gắn các thể phôi nêu ở bước a) vào đĩa nuôi cấy và nuôi cấy các thể phôi chứa các tế bào thể phôi trong môi trường Eagle cải biến của Dulbecco (DMEM) chứa huyết thanh bào thai bò (FBS) để cảm ứng sự biệt hóa tự phát của các tế bào thể phôi thành các tế bào gốc trung mô; và

c) duy trì và nuôi cấy các tế bào gốc trung mô nêu ở bước b) sử dụng môi trường nuôi cấy chứa yếu tố sinh trưởng biểu mô của người (hEGF), nhân tố sinh trưởng nội mô mạch (VEGF), nhân tố sinh trưởng nguyên bào sợi cơ bản của người (hFGF-B), nhân tố sinh trưởng tương tự insulin (IGF-1), hydrocortison, và axit ascorbic,

trong đó các tế bào gốc trung mô nêu ở bước b) và c) biểu hiện một hoặc nhiều chất chỉ thị được chọn từ nhóm bao gồm CD29, CD44, CD73, CD90 và CD105, và trong đó, các tế bào gốc trung mô nêu ở bước c) có khả năng biệt hóa thành các tế bào được chọn từ nhóm chứa tế bào tạo mỡ, tế bào xương, tế bào sụn, tế bào cơ, tế bào thần kinh, tế bào cơ tim.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó kiểu hình của tế bào gốc trung mô bao gồm CD29(+), CD44(+), CD73(+), CD90(+), CD105(+), SSEA-1(-), SSEA-4(-), TRA-1-60(-), CD45(-) và CD34(-).

Fig. 1

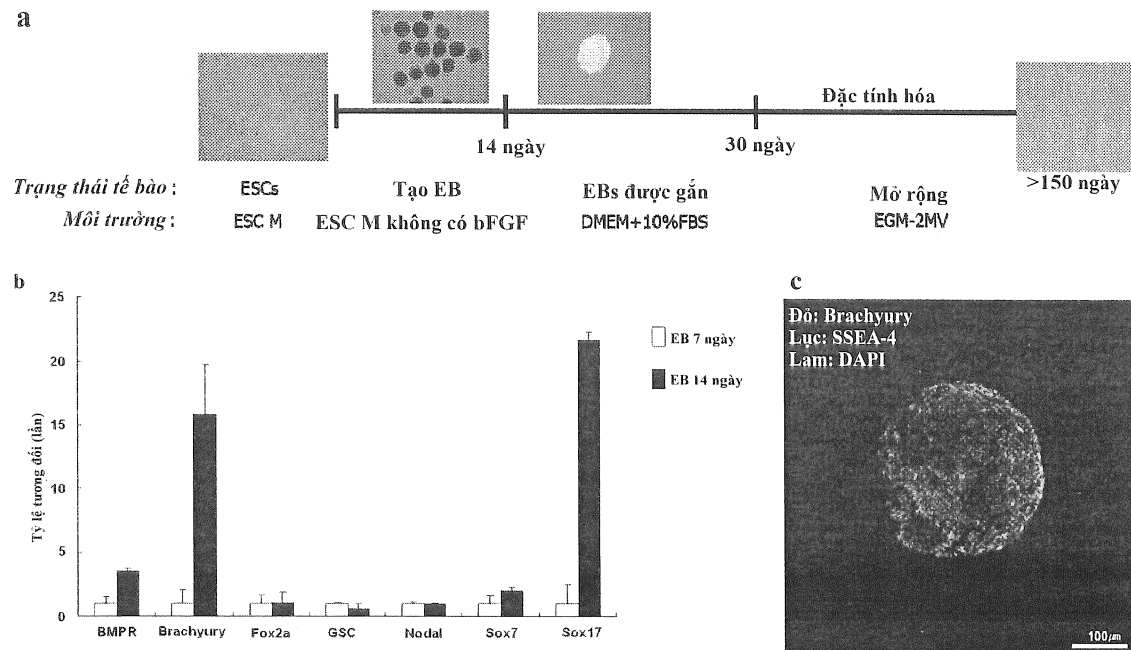


Fig. 2

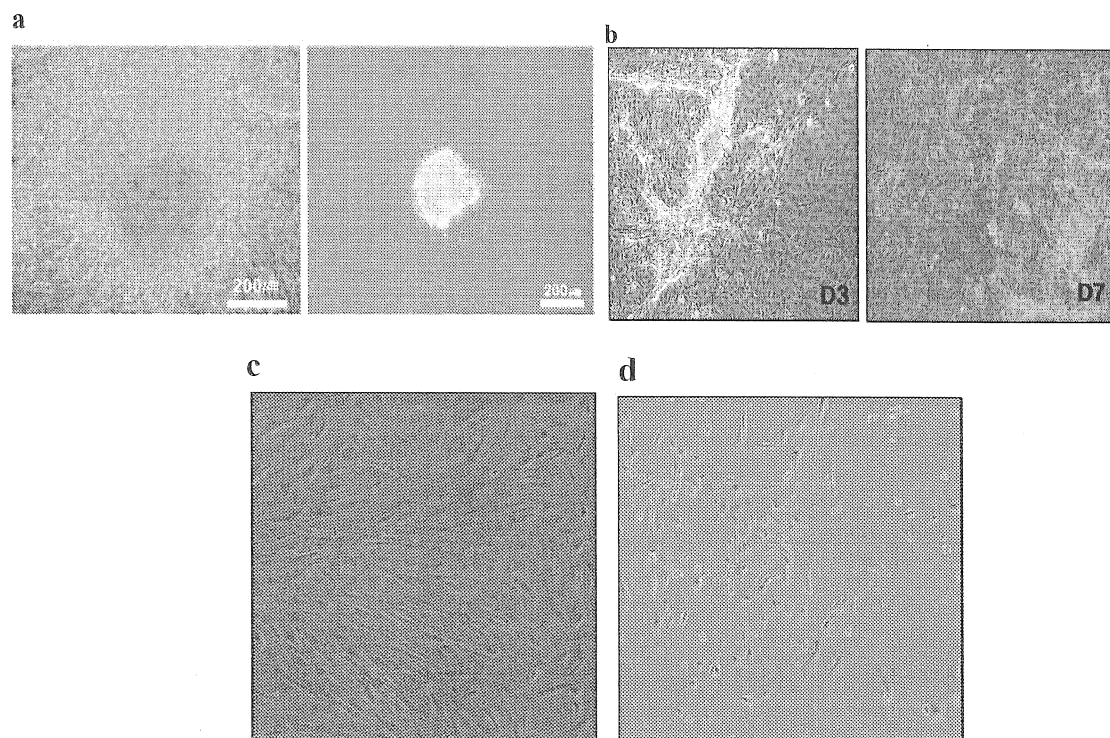


Fig. 3

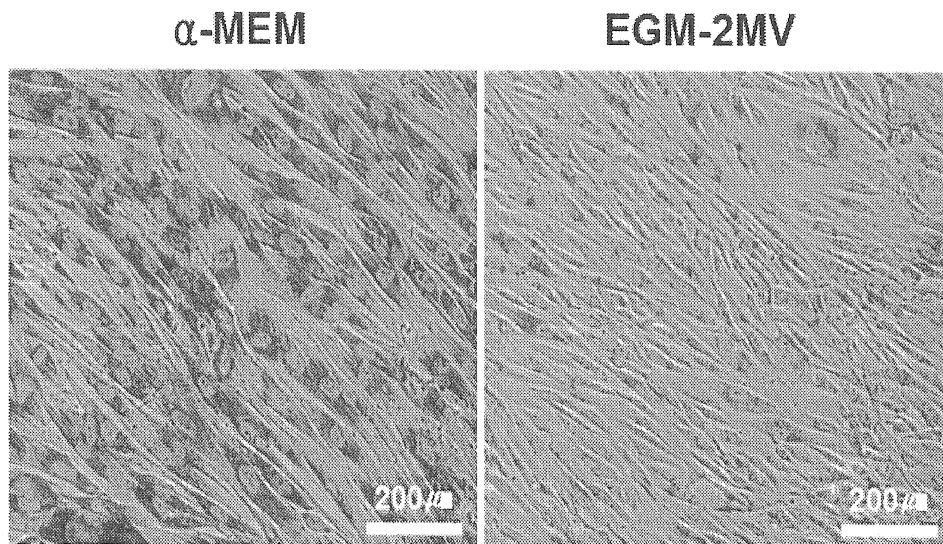


Fig. 4

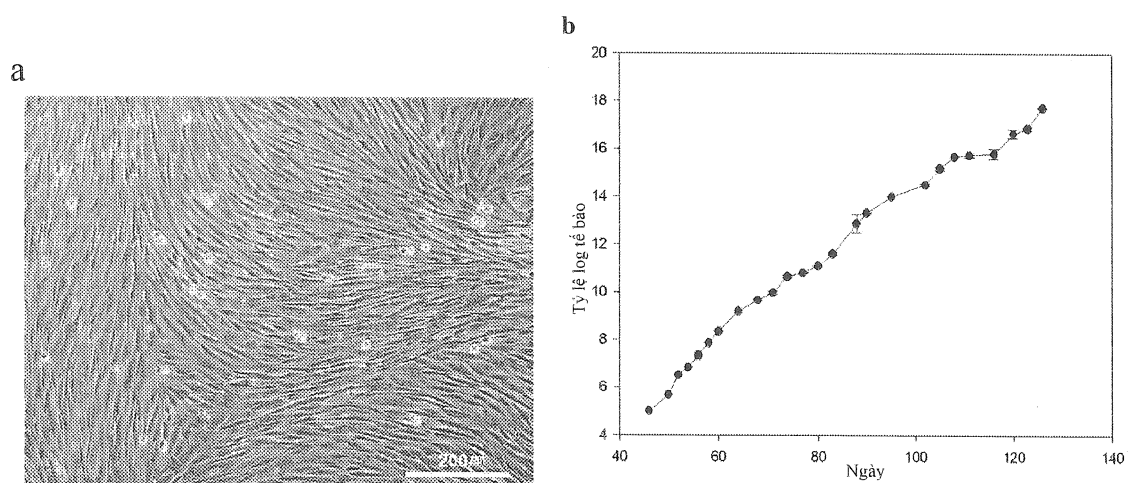


Fig. 5

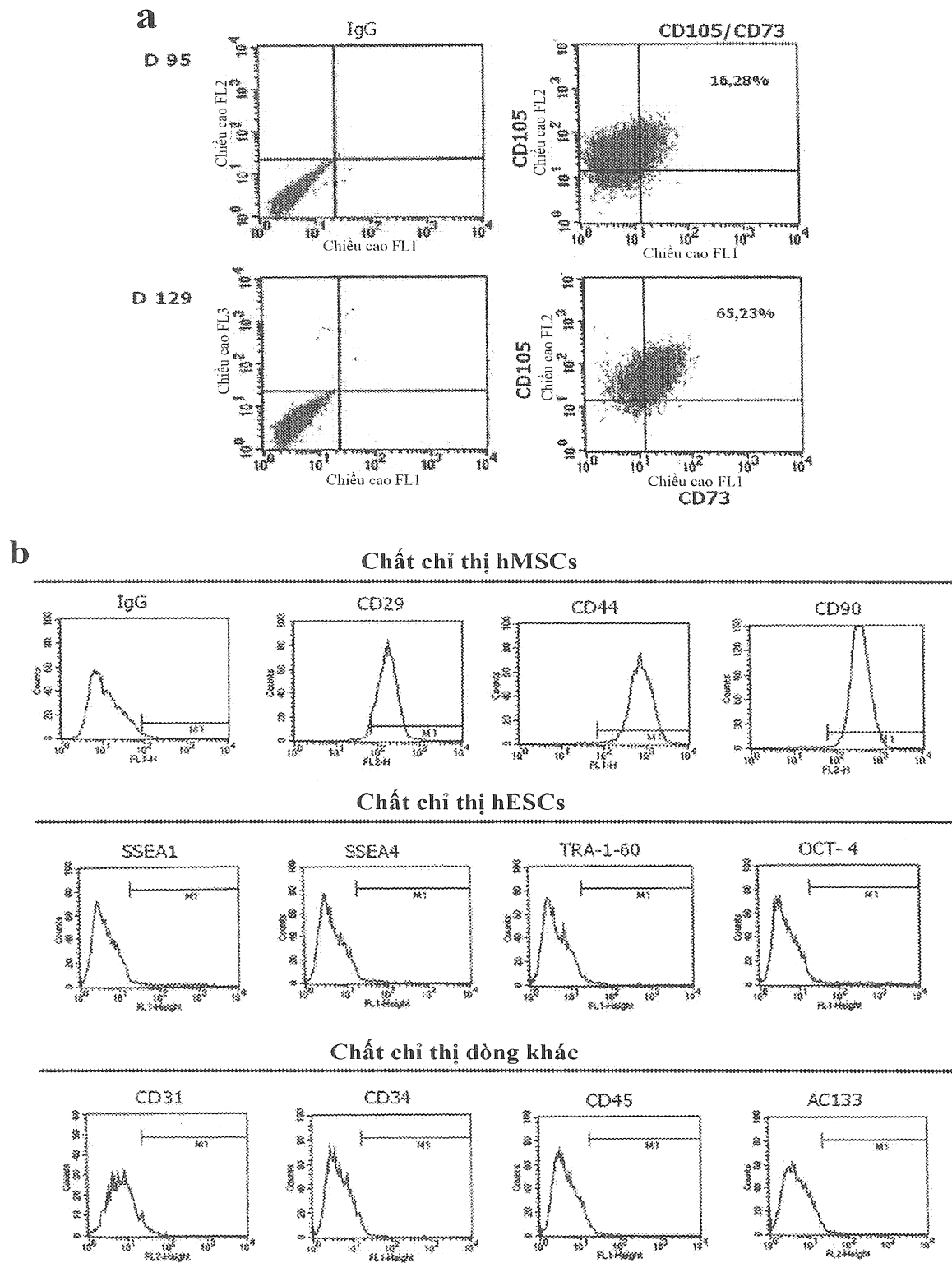


Fig. 6

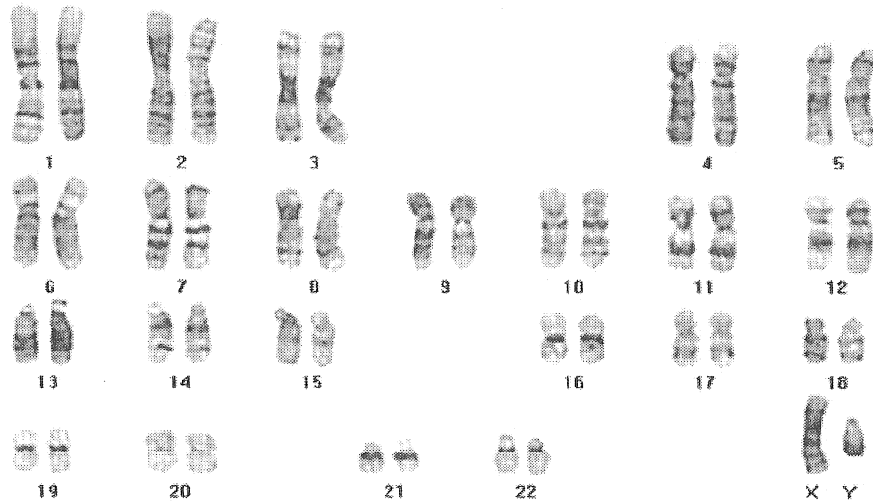


Fig. 7

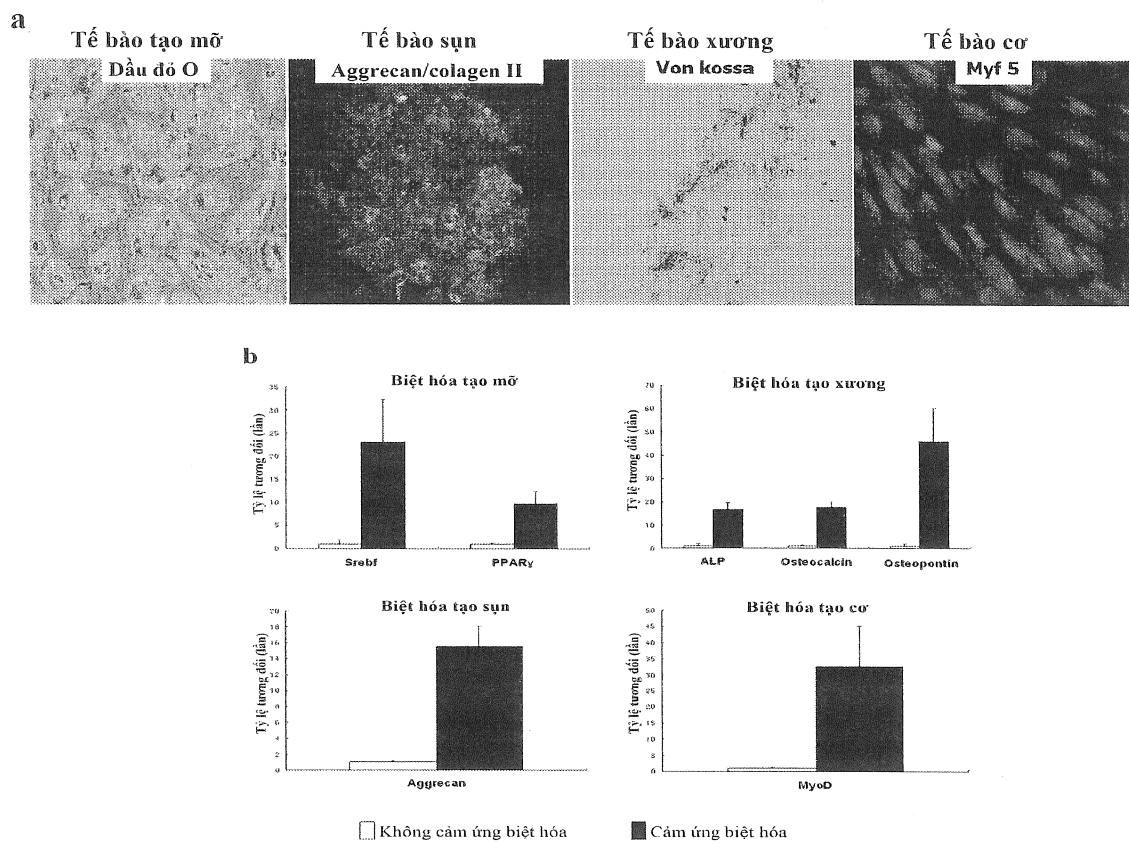
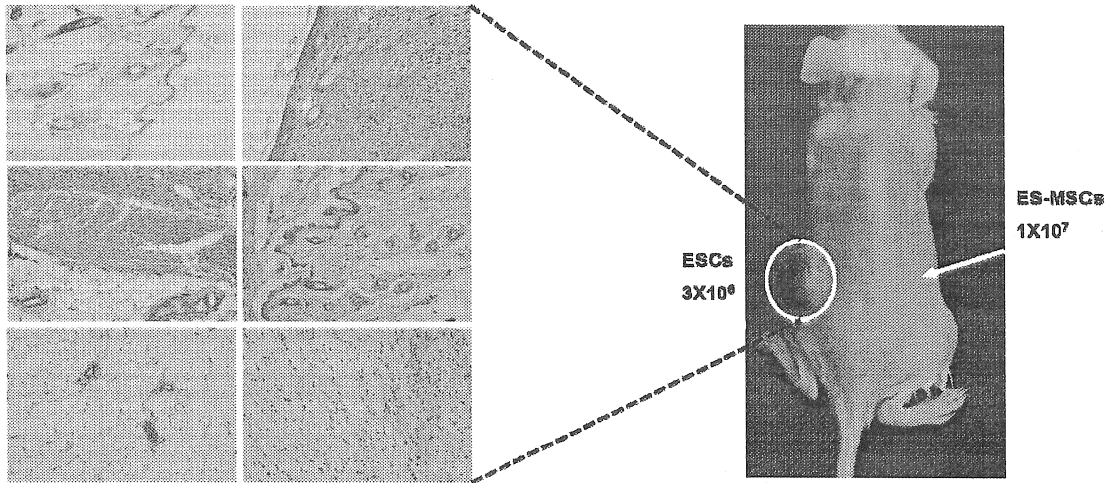


Fig. 8

a



b

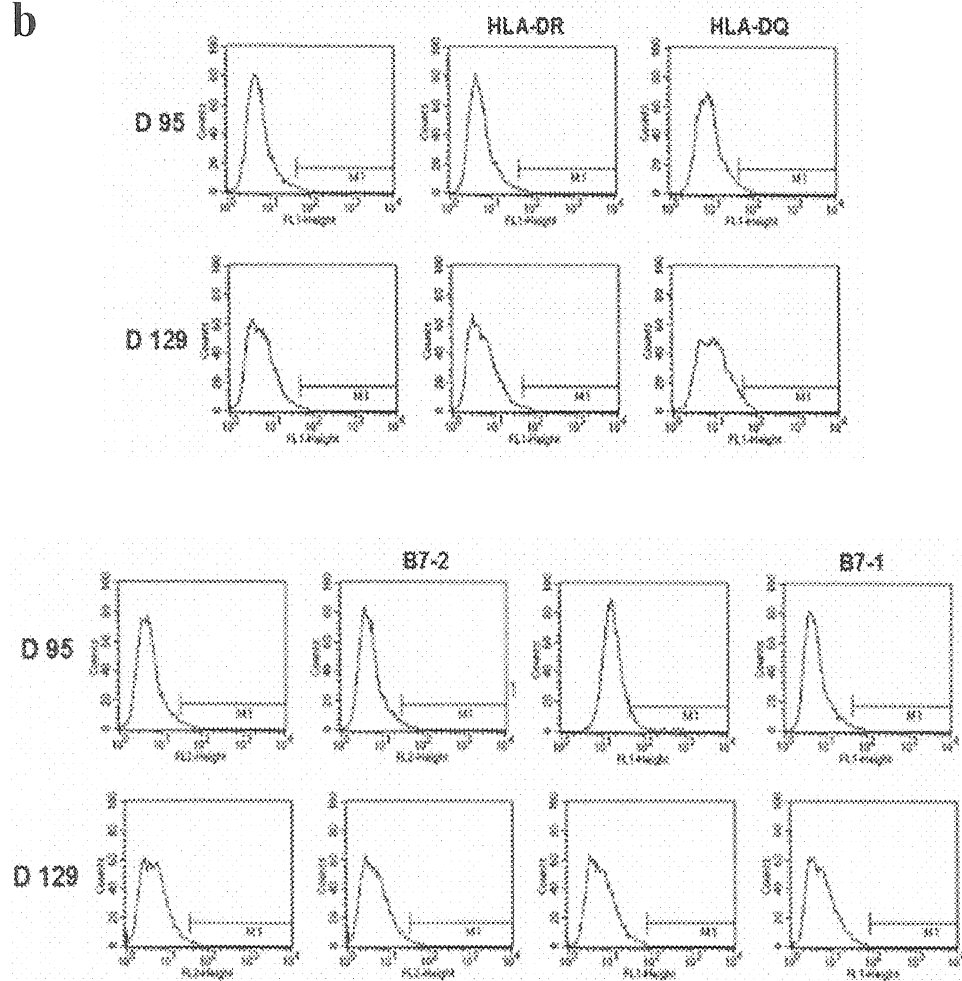
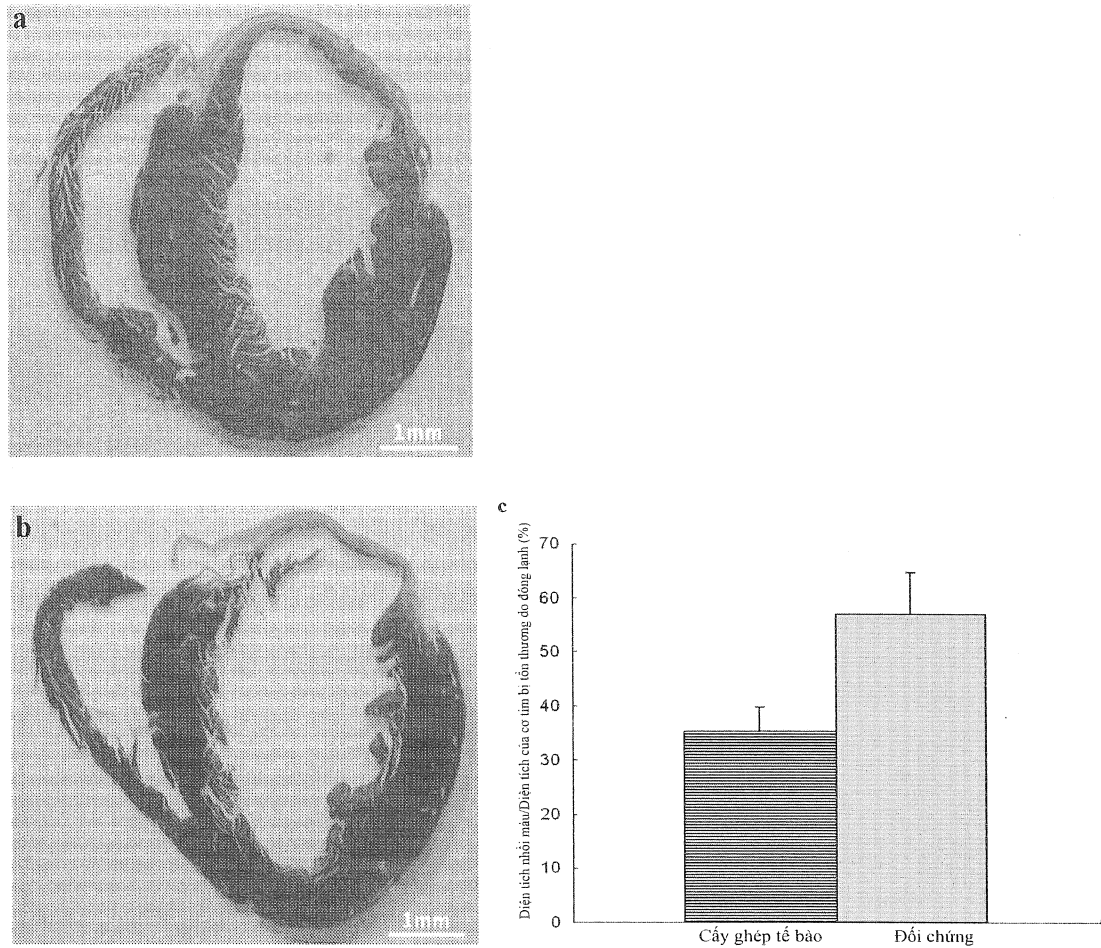


Fig. 9



d Các biến đổi trong phổ siêu âm tim ở mô hình chuột tổn thương do nhiệt độ thấp

	Đường cơ sở		4 tuần		8 tuần	
	LVEDD	LVFS (%)	LVEDD	LVFS (%)	LVEDD	LVFS (%)
	(mm)		(mm)		(mm)	
Đối chứng	39,1±3,8	22,1±0,2	41,6±3,7	20,3±2,9	42,6±4,7	20,5±1,0
Tế bào cấy ghép	38,0±0,9	22,8±0,4	40,0±1,5	25,0±2,2	41,1±2,5	23,7±3,7

*LVEDD: chiều tâm trương cuối cùng của tâm thất trái, LVFS: cơ phân đoạn tâm thất trái

Fig. 10

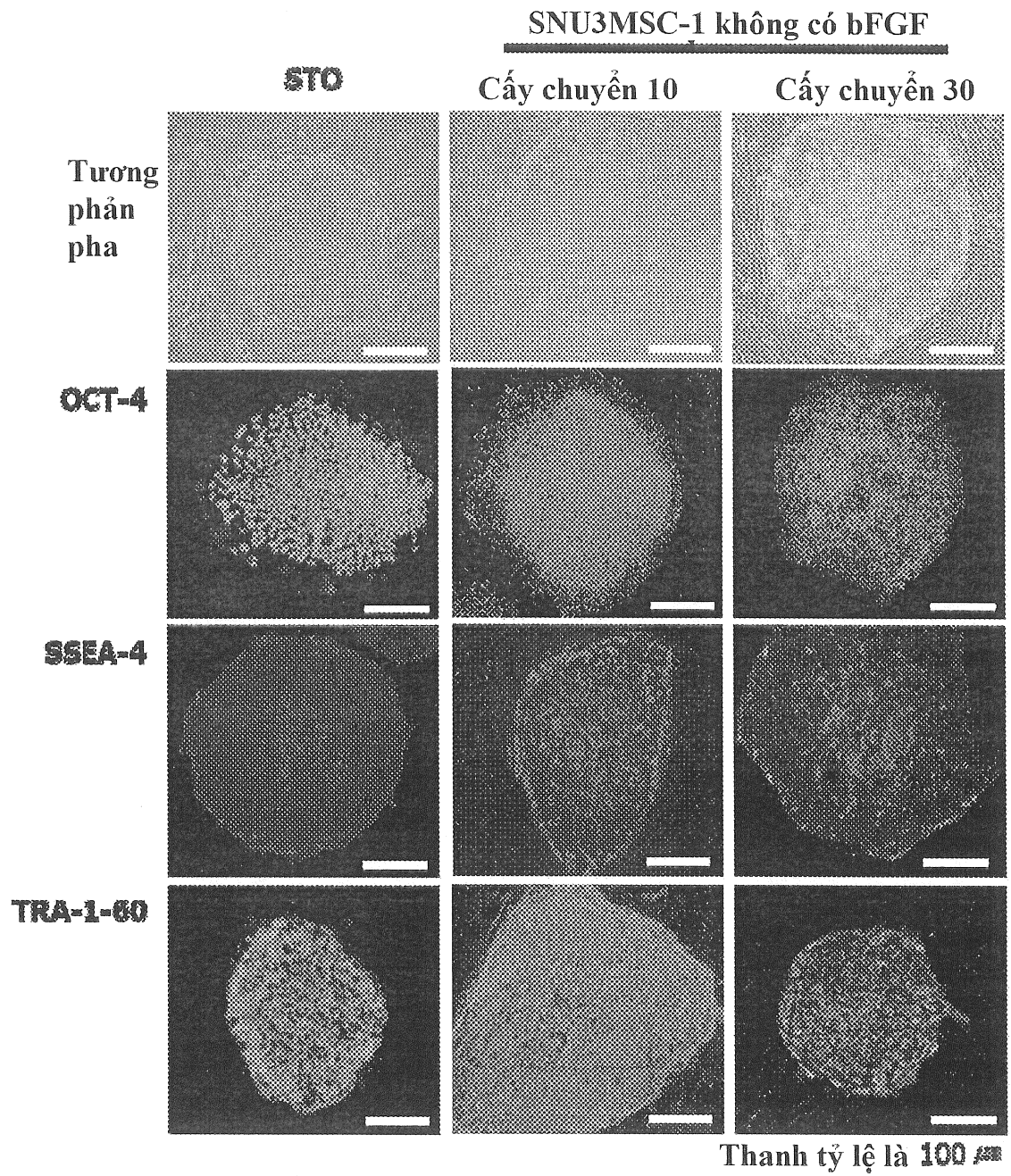


Fig. 11

