



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 00986**

(22) Data de depozit: **18/10/2010**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **27/04/2018** BOPI nr. **4/2018**

(41) Data publicării cererii:
28/10/2011 BOPI nr. **10/2011**

(73) Titular:
• **UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" DIN CLUJ-NAPOCA, STR. EMIL ISAC NR.13, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(72) Inventatori:
• **MIHU CARMEN MIHAELA, STR. GALACTION LIVIU MUNTEANU NR.9, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **ȘORIȚĂU OLGA, STR. SOMEȘUL RECE NR.1233 C, GILĂU, CJ, RO;**
• **RUS CIUCA DAN FLORIN, CALEA DOROBANȚILOR NR.39-41, BL.A, SC.2, AP.12, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**

• **SUSMAN VALERIU SERGIU, STR. CLOȘCA NR.1, BL.C2, AP.4, ALBA IULIA, AB, RO;**
• **MIHU DAN, STR. GALACTION LIVIU MUNTEANU NR.9, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **IRIMIE ALEXANDRU, STR. ADY ENDRE NR.40, CLUJ NAPOCA, CJ, RO;**
• **COLCEAR DOINA, STR. HAȚEG NR.28, BL.K2, AP.36, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(74) Mandatar:
CABINET DE PROPRIETATE INDUSTRIALĂ CIUPAN CORNEL, STR. MESTECENILOR NR. 6, BL. 9E, SC.1, AP. 2, CLUJ NAPOCA, JUDEȚUL CLUJ

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 2010112697 (A1); WO 03042405 (A2)

(54) **PROCEDEU IN VITRO DE OBTINERE CONCOMITENTĂ A PROGENITORILOR HEPATOCITARI ȘI PANCREATICI DIN CELULELE STEM IZOLATE DIN PLACENTA UMANĂ**



RO 126746 B1

1 Invenția se referă la un procedeu de obținere concomitentă a celulelor hepatice și
pancreatice din celulele stem izolate din placentă umană, cu posibilități de utilizare în
3 tratamentul celular.

Deși cunoștințele legate de biologia, comportamentul, potențialul aplicațiilor celulelor
5 stem în clinica umană a luat un avânt substanțial în ultimii ani, definiția termenului de "celulă
stem" este controversată încă, fiind un concept în dezvoltare [Parker M.A., Cotanche
7 D.A., "The potențial use of stem cells for cochlear repair" *Audiol. Neurootol.* 2004; 9: 72-
80, Parolini O., Soncini M. "Human placenta: A source of progenitor/stem cells?" *J.*
9 *Reproduktionsmed. Endocrinol.* 2006; 3: 117-126]. Celulele stem sunt definite generic ca
celule nediferențiate, capabile de autoregenerare, precum și de diferențiere în celule specifice
11 de linieaj. Autoregenerarea poate fi menținută de-a lungul a numeroase generații, amplificând
numărul acestora, dar și dând naștere la celule-fiice din ce în ce mai diferențiate, numite și
13 celule progenitoare sau precursorare. Acestea din urmă sunt capabile să-și continue diferenție-
rea, dar nu sunt capabile și de autoregenerare.

15 S-au delimitat astfel următorii termeni legați de capacitatea de proliferare și diferențiere
a celulelor stem [Fortier L.A., *Stem Cells: Classifications, Controversies and Clinical*
17 *Applications. Vet. Surg.*; 2005: (34): 415-423]:

- *celulele stem totipotente* - care au potențialul genetic de a se diferenția în orice tip de
19 celulă din organism, inclusiv în celule placentare și țesuturi extra-embrionare, având astfel toate
proprietățile necesare obținerii unui întreg fetus uman;

21 - *celulele stem pluripotente* - ce pot fi izolate din masa internă a blastocistului, sunt
capabile de a forma țesuturile cu originea în cele 3 foițe embrionare (endoderm, mezoderm și
23 ectoderm), mai puțin celulele placentare și țesuturile extra-embrionare;

- *celulele stem multipotente* - sunt celule ce pot da naștere doar unui număr limitat de
25 tipuri celulare sau țesuturi, restricționate doar la o anumită foiță embrionară, care pot fi
identificate la feții în dezvoltare și la organisme adulte;

27 - *celulele stem unipotente* - sunt celule ce pot da naștere unui singur tip de celulă.

Celulele stem mai pot fi clasificate după stadiul de dezvoltare al organismului în care
29 sunt obținute:

- *celule stem embrionare* - derivate din masa celulară internă a blastocistului, sunt celule
31 stem pluripotente;

- *celulele stem fetale* - cum sunt celulele recoltate din lichidul amniotic, care sunt
33 pluripotente;

- *celule stem adulte* - care sunt obținute postnatal de la organisme, din țesuturi de
35 origine endodermală, mezodermală și ectodermală.

Aceste celule sunt pluripotente și nu exprimă markerii specifici celulelor totipotente, și
37 nu formează teratoame [Mahendera S.R.: *Stem sense: a proposal for the classification of*
stem cells. Stem Cells and Development, 2004,13: 452-455].

39 Terapia celulară implică manipularea celulelor vii, sisteme complexe și cu un
comportament imprevizibil în condiții de transplantare. Pentru a implementa terapia cu celule
41 stem în clinica umană, sunt necesare studii aprofundate asupra biologiei celulelor stem.
Manipularea celulelor stem ridică numeroase probleme atât etice, cât și tehnice, iar translația
43 de la cercetarea preclinică la cercetarea clinică a acestora impune îndeplinirea unor condiții
esențiale:

45 - obținerea unui număr suficient de mare de celule;

- metode de izolare și purificare neinvazive;

47 - capacitate sporită de expansiune (proliferare);

RO 126746 B1

- controlul diferențierii acestora; 1
- caracterizarea imunologică; 2
- caracterizare moleculară și funcțională; 3
- reproductibilitatea experimentelor; 4
- să nu dăuneze organismului gazdă. 5

Sursele actuale de celule stem sunt: celulele stem embrionare și celulele stem de tip adult. Ambele surse au avantajele și dezavantajele lor. Obținerea unui număr sporit de celule stem embrionare este limitat de inducerea fenomenului de diferențiere spontană, precum și de posibilitățile restrânse de a controla o diferențiere dirijată spre un anumit tip celular. Un alt dezavantaj al cultivării celulelor stem embrionare umane îl reprezintă rata foarte scăzută de stabilizare de linii celulare [**Kodama M și col. (2009) Embryonic Stem Cell Transplantation Correlates With Endogenous Neurogenin 3 Expression and Pancreas Regeneration in Streptozotocin-injured Mice J. Histochem Cytochem**]. În anul 2005 erau stabilizate în jur de 100 de linii celulare în toată lumea, fără o caracterizare suficient de riguroasă [**Tiina Matikainen, Jarmo Laine: "Placenta-an alternative source of stem cells. Review" Toxicology and Applied Pharmacology (2005); 207: S544-S549**]. Un alt obstacol în utilizarea celulelor stem embrionare îl reprezintă riscul inducerii de teratoame. 7 9 11 13 15 17

Celulele stem de tip adult nu prezintă probleme etice pentru că sunt izolate de la nivelul organismelor adulte. Aceste celule se află în număr foarte mic, dar suficient pentru a asigura reînnoirea țesuturilor, și de a fi mobilizate pentru repararea leziunilor dintr-un organ sau țesut. În aceste condiții celulele stem proliferază și se diferențiază spre celulele țesutului lezată. După epuizarea stocului de celule stem endogene, are loc un proces de recrutare a celulelor stem non-hematopoietice din sângele periferic și măduva osoasă. Acest întreg proces necesită eliberarea de citokine și alți factori de creștere [**Tiina Matikainen, Jarmo Laine: "Placenta-an alternative source of stem cells. Review" Toxicology and Applied Pharmacology (2005); 207: S544-S549**]. 19 21 23 25

Dezavantajul major al celulelor stem adulte este că au un potențial de diferențiere mult mai scăzut față de celulele stem embrionare, precum și faptul că sunt celule rare ($1:10^7 \dots 10^8$ din totalul celulelor) [**Parolini O., Soncini M. "Human placenta: A source of progenitor/stem cells?", J. Reproduktionsmed. Endocrinol, 2006, 3:117-126**]. Celulele stem mezenchimale (CSM) sunt celule stem multipotente care se pot diferenția într-o varietate de tipuri celulare, în afară de celulele hematopoietice: osteoblaste, condrocite, miocite, adipocite, celule neuronale; în ultimul deceniu s-a constatat o evoluție neașteptată în studiul biologiei celulei stem prin faptul că se acumulează tot mai multe dovezi ce demonstrează o plasticitate mult mai mare a celulelor stem adulte decât criteriile stabilite prin definiția impusă de celulele stem embrionare [**Phinney G. D., Prokop D. J.: "Concise review: Mesenchymal stem/pluripotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current" Stem Cells, 2007; 25: 2896-2902**]. În același timp se depun eforturi pentru descifrarea mecanismelor moleculare ce dictează plasticitatea acestor celule, precum și elaborarea unor modalități de exploatare în terapia celulară. În clinica umană, cea mai obișnuită sursă de CSM este măduva osoasă adultă. Procentul de CSM în măduva osoasă este destul de scăzut (0,001...0,01%) [**Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., și col. "Multilineage potențial of adult human mesenchymal stem cells": Science, 1999; 284: 143-147**], și acesta scade și mai mult cu vârsta. Un inconvenient al acestei surse mai este și faptul că recoltarea de măduvă osoasă este o manevră invazivă. 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45

1 O alternativă deja mult exploatată este sângele ombilical, dar, de asemenea, procentul
de CSM este foarte scăzut. Dintr-un număr total de celule nucleate obținute de $1-2 \times 10^9$
3 numărul celulelor CD 34 + este de $2-3 \times 10^6$ [**Kodama M și col. (2009) Embryonic Stem Cell
Transplantation Correlates With Endogenous Neurogenin 3 Expression and Pancreas
5 Regeneration in Streptozotocin-injured Mice J. Histochem Cytochem**]. Celulele stem
hematopoietice izolate din sângele ombilical sunt folosite ca o metodă alternativă în transplantul
7 de măduvă osoasă în malignitățile hematologice. Dezavantajul major al utilizării sângelui
ombilical ca sursă de celule stem este reprezentat de numărul redus de celule ce poate fi
9 obținut. Mult mai bogat în CSM este lichidul amniotic, ce conține o populație heterogenă de
celule de origine fetală.

11 Placenta este una dintre sursele cele mai avantajoase, mult studiată în ultimul timp,
îndeplinind cele 2 deziderate principale ale terapiei celulare: obținerea unui număr cât mai mare
13 de celule, și folosirea unor metode neinvazive pentru recoltarea acestora.

Formarea placentei este esențială pentru ca sarcina să evolueze normal. După
15 fertilizare, implantarea necesită diferențierea trofoblastului, urmată de o asamblare rapidă a
celulelor embrionare într-o placentă funcțională [**Kodama M și col. (2009) Embryonic Stem
17 Cell Transplantation Correlates With Endogenous Neurogenin 3 Expression and
Pancreas Regeneration in Streptozotocin-injured Mice J Histochem Cytochem**]. Celulele
19 ectodermale, numite și citotrofoblast, vor ancora placenta la circulația intrauterină, permițând
transportul nutrienților și a gazelor sanguine, precum și eliminarea toxinelor. Placenta
21 îndeplinește și rolul de organ extramedular hematopoietic în timpul embriogenezei timpurii. În
afară de celulele stem hematopoietice, placenta conține și o populație de celule stem
23 multipotente, ce exprimă o parte din markerii celulelor stem embrionare: c-kit, Oct 4, Sox 2,
SSEA-1 , SSEA-3, 4 și fosfataza alcalină. Aceste celule se aseamănă cu celulele stem
25 mezenchimale și prin faptul că pot fi diferențiate în celule hepatice, endoteliale, pancreatice,
neuronale [**Strom S., Miki T., "Placental derived stem cells and uses thereof", United
27 States Patent Application Publication US 2003/0235563 A1**].

Bolile hepatice însoțite de insuficiență hepatică reprezintă o problemă importantă a
29 patologiei clinice, iar una dintre opțiunile de terapie cu tentative de curabilitate o reprezintă
transplantul de organ, metodă dificilă ce presupune prezența unui donator compatibil. De aceea
31 se caută alternative la transplantul de organ, cum sunt terapiile bazate pe transplantul de
hepatocite sau implantarea de constructe hepatocelulare. Cultura primară a hepatocitelor
33 normale este extrem de pretențioasă, pornind încă de la procedeul de recoltare intraoperator,
la acordarea importanței semnalelor micromediului, ale matricei extracelulare și mediatorilor
35 solubili. Astfel, construirea unei platforme de inginerie tisulară hepatică presupune o cunoaștere
în profunzime și o reconstituire controlată a acestor factori de mediu complecși [**Culture of
37 Cells for Tissue Engineering Gordana Vunjak-Novakovic, R. Ian Freshney, 2006 Wiley-
Liss, Chap. 15: 417-473 Tissue Engineering of the Liver**].

39 Principalul scop, în ceea ce privește tratamentul diabetului zaharat, este de a realiza un
nivel optim al glicemiei, evitând episoadele hipoglicemice. Experimentele realizate prin
41 transplantarea celulelor beta la pacienții diabetici au dovedit parțial că acest tip de tratament
poate fi o soluție. Deoarece celulele beta izolate de la nivelul pancreasului sunt în cantitate
43 limitată, sunt necesare noi surse de celule stem din care să se obțină celule producătoare de
insulină și noi protocoale. Rezultate promițătoare, dar care au încă nevoie de îmbunătățiri au
45 fost obținute utilizând ca sursă celulele stem embrionare și pe cele de tip adult.

În ceea ce privește celulele embrionare, s-au folosit o serie de protocoale de 1
diferențiere, toate cu rezultate variabile [Kodama M și col. (2009), *Embryonic stem Cell* 3
Transplantation Correlates With Endogenous Neurogenin 3 Expression and Pancreas 3
Regeneration in Streptozotocin-injured Mice J Histochem Cytochem, Parekh VS și col. 5
(2009) *Differentiation of human umbilical cord blood-derived mononuclear cells to* 5
endocrine pancreatic lineage., *Differentiation* 24: 105-227]. Trebuie spus că și în acest caz, 7
ca de altfel în toate cazurile care folosesc celule embrionare, acestea prezintă avantaje, dar și 7
o serie de dezavantaje. Deosebita lor plasticitate le face greu de controlat, atunci când se 9
dorește să se obțină un anumit tip de celulă specializată, pentru că aceasta presupune controlul 9
tuturor căilor de semnalizare intracelulare, lucru imposibil pentru cercetători astăzi. Astfel se 11
explică rezultatele parțiale și unele controversate, obținute utilizând celulele stem embrionare, 11
cât și discrepanța între potențialul lor teoretic și rezultatele practice concrete în ceea ce privește 13
utilizarea lor în terapie [Jenifer M și col. , 2008, *On the origin of the beta cells*, *Genes and* 13
Development 22: 1998-2021].

În ceea ce privește placentă, ca sursă pentru obținerea de celule secretoare de insulină, 15
numărul studiilor este mult mai redus. În principal există două studii, ambele aparținând cercetă- 17
torilor chinezi. În primul dintre ele, Sun NZ [Sun NZ și col., (2009), *In vitro differentiation of* 17
human placenta-derived adherent cells into insulin-producing cells J Int Med Res 37 (2): 17
400-6] utilizează un protocol extrem de simplu, cel puțin în ceea ce declară. Mediul este clasic, 19
Mediul Eagle modificat de Dulbecco cu concentrație mare de glucoză, cu 10% ser fetal bovin 21
și 1% aminoacizi neesențiali, beta-mercaptoetanol și glutamină, la care adaugă doar bFGF, 21
factorul basic de creștere al fibroblastelor. Celulele sunt pasate la 2...3 zile și observate la 23
microscopul în fază inversată zilnic. Deși protocolul este extrem de simplu în comparație cu 23
celelalte protocoale utilizate, cercetătorii afirmă că au obținut o expresie genică pentru Pd x 1, 25
insulin 1 și insulin 2 la 7 și 14 zile [Chang CM et al, (2007) *Placenta-derived multipotent stem* 25
cells induced to differentiate into insulin-positive cells. Biochem Biophys Res Commun 27
357: 414-20], utilizând celule izolate din placentă, folosește un protocol mai complex: mediul 27
este Mediul Eagle modificat de Dulbecco/mediul F 12 1:1, cu ITS (insulină-transferină seleniu), 29
0,6% glucoză, 25 g/ml insulină 100 g/ml transferină, 20 nM progesteronă, putrescină, 30 nM 29
clorură de seleniu, 2 mM glutamină, 3 mM bicarbonat de sodiu, 20 ng/ml Factor de creștere 31
epitelial, 20 ng/ml Factorul basic de creștere al fibroblastelor, 20 ng/ml Factor de creștere al 31
hepatocitului.

Pentru a avea informații despre stadiul cercetărilor și al brevetelor de invenție elaborate, 33
s-au efectuat cercetări în bazele de date pentru brevete de invenție, și s-au reținut ca fiind 35
apropiate de invenția propusă următoarele două brevete de invenție: **US 2010112697 (A1)** și 35
WO 03042405 (A2).

Brevetul de invenție **US 2010112697 (A1)** se referă la o metodă pentru izolarea celulelor 37
stem mezenchimale, derivate din placa corionică. Metoda include: recoltarea plăcii membranare 37
corionice, și izolarea și cultivarea celulelor într-un mediu care conține un ser fetal bovin și un 39
antibiotic. Acest brevet de invenție revendică doar metode de obținere a celulelor stem 39
mezenchimale, în special prin tratamente mecanice și enzimatică, iar în descriere se referă la 41
metode de caracterizare morfologică și fenotipică, fără a evidenția și capacitatea acestora de 41
a se diferenția spre multiple lineaje. 43

Brevetul de invenție **WO 03042405 (A2)** prezintă o metodă de izolare, expansiune și 45
diferențiere a celulelor stem pluripotente fetale din zona corionică, din fluidul amniotic și 45
placentă, precum și utilizarea acestora în terapia celulară. De asemenea, **WO 03042405 (A2)** 47
revendică obținerea și expansiunea unei populații de celule stem pluripotente fetale, prin 47

RO 126746 B1

1 selectarea celulelor pozitive C-kit de la nivelul vilozităților coriale, din lichidul amniotic sau
2 placentă. Sub acțiunea unor agenți de diferențiere inductori, aceste celule au fost diferențiate
3 spre celule cu fenotip osteogenic, hematopoietic, adipogenic, miogenic, hepatic, neurogen și
4 endotelial. Autorii brevetului de invenție descriu o posibilă aplicare a celulelor stem izolate cu
5 anticorpi monoclonali c-kit, și diferențierea spre lineajul hepatic. Dezavantajul procedurii
6 prezentat în **US 2010112697 (A1)** constă în folosirea ca substrat pentru diferențierea hepatică
7 a Matrigelului, și în folosirea unor doze mari de Factor acid de creștere al fibroblastelor, de
8 100 ng/ml, și de Factor de creștere al hepatocitului, de 20 ng/ml, care cresc costurile metodei.
9 De asemenea, acest procedeu nu oferă obținerea concomitentă a progenitorilor hepatici și
10 pancreatici, fapt ce constituie un element de noutate al invenției propuse.

11 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția propusă este de a realiza un procedeu de
12 obținere concomitentă a celulelor hepatice și pancreatice din celulele stem izolate din placenta
13 umană, care să ofere posibilitatea de obținere a unui număr suficient de mare de celule, cu
14 capacitate sporită de proliferare, cu diferențiere controlată, și cu o bună caracterizare imuno-
15 logică, moleculară și funcțională, astfel încât să poată fi utilizate în terapia celulară.

16 Procedeu de obținere concomitentă *in vitro* a progenitorilor hepatocitari și pancreatici
17 din celulele stem izolate din porțiunea corionică sau membrana a placentei umane constă în
18 aceea că, în prima etapă, se obțin progenitori comuni hepato-pancreatici, prin cultivarea
19 celulelor expansionate, timp de 16...48 h, pe plăci cu substrat de colagen și laminină, în
20 prezența unui mediu de diferențiere H1, urmată de procesarea celulelor care au aderat la plăcile
21 cu colagen și laminină din prima etapă, în prezența unui mediu H2, timp de 3...4 săptămâni, cu
22 schimbarea mediului H2 la fiecare 3...4 zile, rezultând progenitori hepatocitari, și, în final,
23 procesarea suspensiei celulare rezultate în prima etapă, rezultând progenitori pancreatici.

24 Aplicarea invenției aduce următoarele avantaje:

25 - folosirea celulelor stem izolate din placenta reprezintă o sursă acceptată, și elimină
26 neajunsurile celorlalte surse de celule stem (prelevare neinvazivă, imunogenicitate scăzută,
27 posibilitatea obținerii unui număr mare de celule stem adulte, încă din faza de izolare);

28 - obținerea concomitentă de celule progenitoare comune pentru lineajul hepatic și
29 pancreatic, permițând astfel ca din același lot de celule să se obțină atât celule progenitoare
30 hepatice, cât și celule progenitoare pancreatice, care apoi pot fi utilizate în terapiile celulare,
31 ducând la economie de reactivi și de timp;

32 - metoda durează 21...28 zile până la obținerea unor celule complet diferențiate și
33 funcționale;

34 - nu necesită condiții speciale de cultivare, se poate efectua în condițiile unui laborator
35 clasic de culturi de celule, fără a necesita aparatură adițională costisitoare;

36 - permite modularea diferențierii și a stadiului dorit în funcție de necesități.

37 În continuare se prezintă un exemplu de realizare a procedurii de diferențiere *in vitro*
38 a celulelor stem placentare, ce produce o rată crescută și omogenă de celule progenitori
39 comuni, cu potențial dublu de diferențiere atât spre hepatocite, cât și spre celule beta
40 pancreatice funcționale.

41 Procedeu presupune mai multe etape.

42 **Etapa 1 - Izolarea celulelor stem din placenta**

43 Recoltarea placentei la termen se efectuează în condiții sterile, de la nașterile la termen,
44 pe cale naturală sau prin cezariană, prin plasarea acesteia pe gheață, în recipiente sterile.
45 Placentele, membranele fetale și cordonul ombilical se spală la exterior cu o soluție salină
46 tamponată cu fosfat, sterilă, rece, pentru îndepărtarea sângelui, iar apoi sunt plasate în
47 recipiente de plastic sterilizate la etilenoxid, imersate în soluție salină tamponată cu fosfat,
sterilă, rece la 4°C. Procesarea anexelor fetale se efectuează în decurs de 3...24 h, fără o

RO 126746 B1

influență majoră asupra viabilității celulelor și a posibilității de cultivare a acestora. Se detașează membrana amniotică de corionul subjacent, și cele două componente sunt apoi procesate mecanic și enzimatic în recipiente separate. Celulele epiteliale din membrana amniotică (MAE) se extrag prin digestie enzimatică cu tripsină 0,05%/EDTA-4 (Acid Ethilendiaminotetraacetic) Na 0,53 mM, în 3 etape de 10, 30 și 30 min. Celulele mezenchimale amniotice (MAM) sunt izolate prin 2 etape de tratament enzimatic: tratament cu tripsină 0,25%, timp de 5 min, și tratament cu 0,25% tripsină + 0,1% colagenază de tip IV, timp de 5 min. Celulele mezenchimale corionice (MC) se obțin prin procesare mecanică + digestie enzimatică cu dispază + colagenază de tip IV, timp de 30 min. Celulele izolate sunt apoi însămânțate pe plăci de cultură tip flacoane Cole de 25 cm², în mediu de cultivare.

Etapa 2 - Expansiunea celulelor stem în cultură, și caracterizarea acestora prin evidențierea exprimării markerilor de pluripotență

Cultivarea celulelor izolate din diferitele componente ale placentei se realizează la 37°C, în atmosferă de CO₂ 7%, 99% umiditate. În ziua a 7-a de la izolare, după evidențierea aderării primelor celule, se aruncă mediul de cultură, iar apoi schimbarea mediului se efectuează la 3..4 zile, până la atingerea unei confluențe celulare de 70..80%. Mediul de cultivare pentru celulele stem este mediu Mediul Eagle modificat de Dulbecco 4,5 g glucoză/l: mediul F-12 raport 1:1, 15% ser fetal bovin, 1% L-glutamină, 1% penicilină-streptomicină, 1% acizi neesențiali, 55 μM beta-mercaptoetanol, 1 mM piruvat de sodiu.

Celulele expansionate se vor pasa la momentul atingerii subconfluenței, prin detașarea celulelor cu tripsina-Acid Ethilendiaminotetraacetic. Celulele au fost caracterizate prin colorații imunocitochimice și prin citometrie de flux. Pozitivitatea celulelor izolate pentru markerii specifici celulelor stem mezenchimale este ilustrată în tabelul următor.

Markerii specifici celulelor stem adulte, care au fost exprimați de celulele izolate din placenta umană

Markeri de suprafață	Celule stem din membrană (MAM)	Celule stem din corion
CD 29	+	+
CD 105	+	+
SSEA-4	+	+
Nanog	±	±
Sox 2	±	±
F Alc	+	±
CD 45	-	-
CD 14	+	+
CD 49 e	+	+
CD 34	-	-
CD 73	+	+
Oct 3/4	+	+

RO 126746 B1

1 **Etapa 3 - Diferențierea celulelor stem mezenchimale placentare spre celule progenitori**
2 **comuni hepato-pancreatici, printr-o cultivare pe substrat de colagen + laminină**

3 Această etapă durează 16...48 h, în prezență de mediu de diferențiere H1.

4 Se însămânțează $2-3 \times 10^5$ celule stem izolate din placentă, la pasajul 4, pe plăcile cu
5 substrat de colagen + laminină. Mediul de cultivare până la atingerea confluenței este mediul
6 uzual de cultivare al celulelor stem nediferențiate: Mediul Eagle modificat de Dulbecco 4,5 g
7 glucoză/l: F-12 raport 1:1, 15% ser fetal bovin, 1% L-glutamină, 1% + penicilină-streptomycină,
8 1% acizi neesențiali, 55 μ M beta-mercaptoetanol, 1 mM piruvat de sodiu.

9 În momentul atingerii confluenței se face schimbarea de mediu cu mediu H1: Mediul
10 Eagle modificat de Dulbecco 1g glucoză/1:MCDB201 raport 1:1, 1%, 4,7 μ g/ml acid linoleic, 1%
11 insulină-transferină-seleniu, Factor de creștere provenit din plăcuțe sanguine 10 ng/ml, Factor
12 de creștere epitelial 20 ng/ml, 10 nM dexametazonă, 10 mM acid ascorbic, 1% L-glutamină, 1%
13 penicilină-streptomycină, 1% amonoacizi neesențiali.

14 *Prepararea substraturilor de colagen cu laminină*

15 *Colagen* - se prepară o soluție de colagen de tip IV, la o concentrație finală de 15 μ g/ml.
16 S-au folosit godeuri și plăci Petri cu diametrul de 6 cm. Soluția finală pentru colagen este
17 plasată în plăci cu 6 godeuri, câte 1 ml/godeu, și lăsate timp de 1 h în nișa cu flux laminar.
18 Surplusul de soluție se aruncă, rămânând doar o lamă fină de lichid pe fundul plăcii. Plăcile sunt
19 lăsate să se usuce, după care se sterilizează la etilenoxid.

20 *Laminină* - soluția STOCK (vezi explicații în revendicări) de 1 mg/ml păstrată la -20°C
21 se dezgheață la $2...8^{\circ}\text{C}$. Diluția se efectuează în soluție salină tamponată cu fosfat, aducându-
22 se la o soluție de 100 μ g/ml. Se calculează cantitatea necesară de soluție pentru fiecare
23 suprafață, astfel încât la final concentrația să fie de 2 μ g/cm². Plăcile acoperite cu colagen,
24 presterilizate, se incubează cu soluția de laminină timp de 2 h la 37°C , apoi se spală 2X cu
25 soluție salină tamponată cu fosfat, și se pregătesc pentru însămânțarea cu celule.

26 Diferențierea spre progenitori hepatici și pancreatici se prezintă în legătură cu fig. 1...4,
27 ce reprezintă:

28 - fig. 1, expresia genică în diferite stadii și condiții, în timpul diferențierii hepatice, în
29 comparație cu linia celulară de hepatocarcinom HepG2 (F1BH - etapa 1, 16 h, 100 ng Factor
30 de creștere epidermal; F1BL - prescurtare pe care am folosit-o pentru a identifica - celule
31 supuse protocolului de diferențiere hepatică (F) în prima etapă (1), cu o durată scurtă de acțiune
32 a factorilor de creștere (BL) - etapa 1, 16 h 20 ng Factor de creștere epidermal; F11B - celule
33 supuse protocolului de diferențiere hepatică (F) în prima etapă (1), cu o durată lungă de acțiune
34 a factorilor de creștere (B) - etapa 2, 72 h; F2B celule supuse protocolului de diferențiere
35 hepatică (F) în a doua etapă (2), cu o durată lungă de acțiune a factorilor de creștere (B) - etapa
36 2, cu Factorul de creștere hepatocitar și oncostatina M; F2BR - celule supuse protocolului de
37 diferențiere hepatică (F) în a doua etapă (2), cu o durată lungă de acțiune a factorilor de
38 creștere (B) și rifampicină (R) -etapa 2 cu Factorul de creștere hepatocitaroncostatina M și
39 rifampicină);

40 - fig. 2, celule izolate din corion diferențiate în mediu H2, timp de cultivare 30 zile;
41 colorație pentru citokeratina 18 marcată cu FITC;

42 - fig. 3, rezultate obținute, evidențiate prin colorare cu dithizonă;

43 - fig. 4, schema diferențierii duble hepato-pancreatice.

44 **Etapa 4 - Diferențierea spre progenitori hepatici**

45 După expunerea la mediul H1 se produce o schimbare a morfologiei celulelor cu
46 rotunjirea formei, precum și desprinderea unor grupuri celulare ce formează agregate sferice.
47 După 16...48 h se schimbă mediul, cu preluarea celulelor în suspensie, ce vor fi transferate în
48 plăcile cu colagen + laminină, pentru inducerea diferențierii pancreatice. Celulele aderate,
49 rămase pe plăcile cu colagen + laminină, vor fi supuse celei de-a doua etape de diferențiere
spre hepatocit, în prezența mediului H2, mediu identic cu H1, la care se adaugă, ca factori de

RO 126746 B1

creștere suplimentari: 4 ng/ml Factorul de creștere hepatocitar și 4 ng/ml Oncostatin M, 1% L-glutamină, 1% penicilină-streptomycină, 1% aminoacizi neesențiali. Această etapă durează 3...4 săptămâni, cu schimbarea de mediu H2 la fiecare 3...4 zile. La mediul H2 nu se vor mai adăuga în plus Factor de creștere provenit din plăcuțe sanguine, și Factor de creștere epitelial. Aceste celule aderate la sfârșitul perioadei de 3...4 săptămâni vor exprima markerii de diferențiere hepatocitari.

În urma experimentelor realizate, s-a observat că o concentrație de Factor de creștere epitelial 20 ng/ml este suficientă pentru inducerea diferențierii spre progenitori hepatici în prima etapă, după cum se observă în fig. 1 (analiza genetică prin metoda reacției în lanț a polimerazei, precedată de utilizarea reverstrascriptazei, a celulelor aderate la placă, în comparație cu linia celulară de hepatocarcinom HepG2). Din aceeași analiză s-a tras concluzia că un timp de incubare de 16 h este suficient pentru inducerea diferențierii (proba F1BL), deoarece aceste celule încep să exprime genele pentru citokeratina 18. Din aceeași figură se concluzionează că celulele cultivate în etapa a doua a diferențierii exprimă mai intens lipaza pancreatică și α fetoproteina, în cazul protocolului cu mediu ce conține Factor de creștere hepatocitar și Oncostatina M. (proba F2BR).

Prezența citokeratinei 18 a fost confirmată și prin colorație imunocitochimică (fig. 2).

Etapa 5 - Diferențierea spre progenitori pancreatici

Această etapă se desfășoară în 3 faze:

a) Suspensia celulară preluată de pe plăcile cu colagen + laminină se centrifughează 4 min la 500 rot/min, iar sedimentul celular este resuspendat în mediul P1, și însămânțat pe plăcile cu colagen + laminină. Perioada de cultivare este de 4...7 zile. Celulele rămân în suspensie, dar morfologia acestora se modifică, agregatele celulare devin mai dense, mai condensate, cu o formă sferică de mai mari dimensiuni.

Se folosesc Mediul Eagle modificat de Dulbecco/MCDB201 (cantitatea finală de glucoză 6,5 g/l), 1% albumină serică bovină, 1% Supliment N1, 0,5% B27, 10 ng/ml Factorul de creștere al fibroblastului, 10 ng/ml Factorul de creștere al fibroblastului basic, 4 ng/ml Factorul de creștere hepatocitar, heparină, 1% insulină-transferină-seleniu, 1% L-glutamină, 1% penicilină-streptomycină, 1% acizi neesențiali.

b) Suspensia celulară astfel cultivată este preluată și centrifugată, resuspendată în mediul P2, și însămânțată pe alte plăci cu colagen + laminină. Cultivarea în mediul P2 este de 6...7 zile. Mediul P2 este compus din soluție de glucoză cu concentrație scăzută Mediul Eagle modificat de Dulbecco/MCDB 201 (concentrație de glucoză de 1 g/l), 10% FCS, 10 mM nicotinamidă, 1% Glutamină, 1% penicilină-streptomycină, 1% acizi neesențiali.

c) Suspensia celulară astfel cultivată este preluată și centrifugată, resuspendată în mediul P3, și însămânțată pe alte plăci cu colagen + laminină. Cultivarea în mediul P3 este de 6...7 zile. Mediul P3 este compus din Mediul Eagle modificat de Dulbecco/MCDB201 (glucoză 1 g/l), 10% ser fetal bovin, 10 mM eExendin 4, 1% Glutamină, 1% penicilină-streptomycină, 1% aminoacizi neesențiali. La sfârșitul celor 6...7 zile se adaugă în mediu glucagon și Factorul beta de creștere transformator.

Colorațiile cu dithizonă - un colorant care se folosește pentru punerea în evidență a insulelor beta, la sfârșitul perioadei de cultivare cu mediul P3 a agregatelor celulare derivate din populațiile de celulele stem, au demonstrat obținerea de celule pozitive pentru colorația cu dithizonă, atât ca număr, cât și ca procent de pozitivitate (fig. 3). În fig. 3 s-a analizat aspectul morfologic al celulelor stem izolate din corion și membrana amniotică, expuse la o diferențiere secvențială: mediu H → mediu P1 → mediu P2 → mediu P3. Se observă prezența agregatelor celulare sferice în suspensie, unele dintre ele fiind pozitive pentru dithizonă (colorație în roșu).

Fig. 4 ilustrează pe scurt secvența de administrare și compoziția mediilor destinate fiecărei etape a diferențierii.

RO 126746 B1

Revendicări

1
3 1. Procedeu de obținere concomitentă *in vitro* a progenitorilor hepatocitari și pancreatici
din celulele stem izolate din porțiunea corionică sau membranară a placentei umane, constând
5 în etape de izolare, expansiune și diferențiere a celulelor izolate în diferite medii de cultură,
caracterizat prin aceea că în prima etapă se obțin progenitori comuni hepato-pancreatici, prin
7 cultivarea celulelor expansionate, timp de 16...48 h, pe plăci cu substrat de colagen și laminină,
în prezența unui mediu de diferențiere H1, urmată de procesarea celulelor care au aderat la
9 plăcile cu colagen și laminină din prima etapă, în prezența unui mediu H2, timp de 3...4
săptămâni, cu schimbarea mediului H2 la fiecare 3...4 zile, rezultând progenitori hepatocitari,
11 și, în final, procesarea suspensiei celulare din prima etapă, rezultând progenitori pancreatici.

13 2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** procesarea suspensiei
celulare, pentru obținerea de progenitori pancreatici, constă în:

15 a) centrifugarea suspensiei celulare 4 min la 500 rot/min, resuspendarea suspensiei într-
un mediu P1 și cultivarea 4...7 zile pe plăcile cu colagen și laminină;

17 b) resuspendarea suspensiei celulare rezultată din faza a), într-un mediu P2, și culti-
varea 6...7 zile pe plăci cu colagen și laminină, resuspendarea suspensiei celulare rezultată din
19 faza b), într-un mediu P3, și cultivarea 6...7 zile pe plăci cu colagen și laminină.

21 3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** mediul H1 este
constituit din mediul Eagle modificat de Dulbecco 1 g glucoză/l: mediul MCDB201 în
raport de 1:1, 1% albumină serică bovină, 4,7 μg/ml acid linoleic, 1% insulină-transferină-
23 seleniu, 10 ng/ml Factor de creștere provenit din plăcuțe sanguine, 20 ng/ml Factor de creștere
epitelial, 10 nM dexametazonă, 10 mM acid ascorbic, 1% L-glutamină, 1% penicilină-strepto-
micină, 1% acizi neesențiali.

25 4. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** mediul H2 este
constituit din 4 ng/ml Factor de creștere al hepatocitului și 4 ng/ml oncostatină M,
27 1% L-glutamină, 1% penicilină-streptomicină, 1% aminoacizi neesențiali, Mediul Eagle modificat
de Dulbecco 1 g glucoză/l: mediul MCDB201 în raport 1:1, 1% albumină serică bovină,
29 4,7 μg/ml acid linoleic, 1% insulină-transferină-seleniu, 10 ng/ml factor de creștere provenit din
plăcuțe sanguine, 20 ng/ml Factor de creștere epitelial, 10 nM dexametazonă, 10 mM acid
31 ascorbic, 1% L-glutamină, 1% penicilină-streptomicină, 1% acizi neesențiali.

33 5. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că** mediul P1 este
constituit din Mediul Eagle modificat de Dulbecco cu nivel ridicat de glucoză: mediul MCDB201
cantitatea finală de glucoză fiind de 6,5 g/l, 1% albumină serică bovină, 1% supliment N1,
35 0,5% B27, 10 ng/ml factor de creștere epidermal, 10 ng/ml factor de creștere al fibroblastului,
4 ng/ml factor de creștere hepatocitar, heparină, 1% insulină-transferină-seleniu,
37 1% L-glutamină, 1% penicilină-streptomicină, 1% aminoacizi acizi neesențiali.

39 6. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că** mediul P2 este
constituit din Mediul Eagle modificat de Dubelcco cu nivel scăzut de glucoză: MCDB 201 cu
glucoză de 1g/l, 10% ser fetal bovin, 10 mM nicotinamidă, 1% L-glutamină, 1% penicilină-
41 streptomicină, 1% aminoacizi neesențiali.

43 7. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că** mediul P3 este
constituit din: Mediul Eagle modificat de Dubelcco cu nivel scăzut de glucoză: mediul MCDB201
cu glucoză 1 g/l, 10% ser fetal bovin, 10 mM exendin, 1% L-glutamină, 1% penicilină-strepto-
45 micină, 1% aminoacizi neesențiali.

(51) Int.Cl.

A61K 35/50 (2006.01);

A61K 35/545 (2015.01)

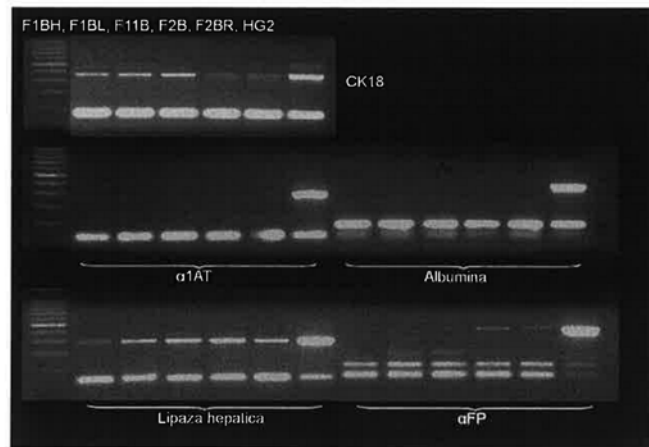


Fig. 1



Fig. 2

(51) Int.Cl.

A61K 35/50 (2006.01);

A61K 35/545 (2015.01)

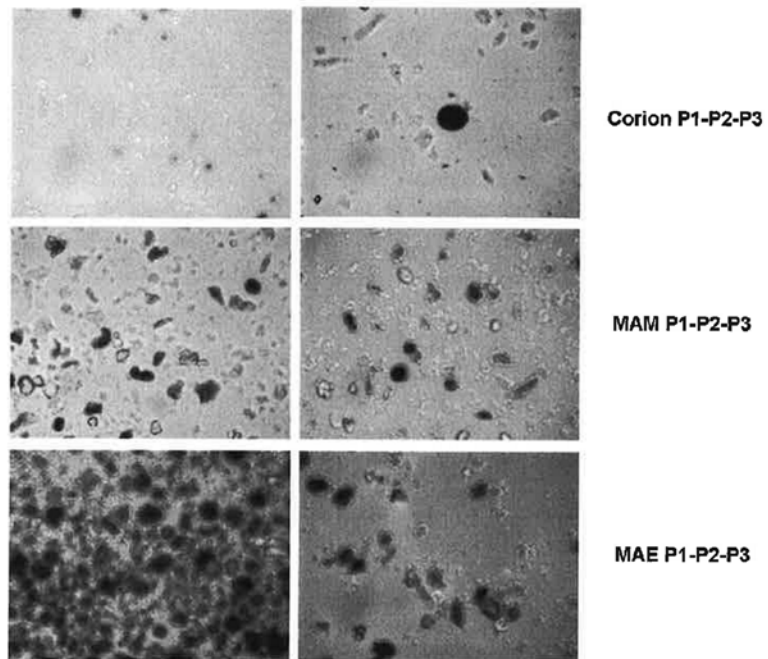


Fig. 3

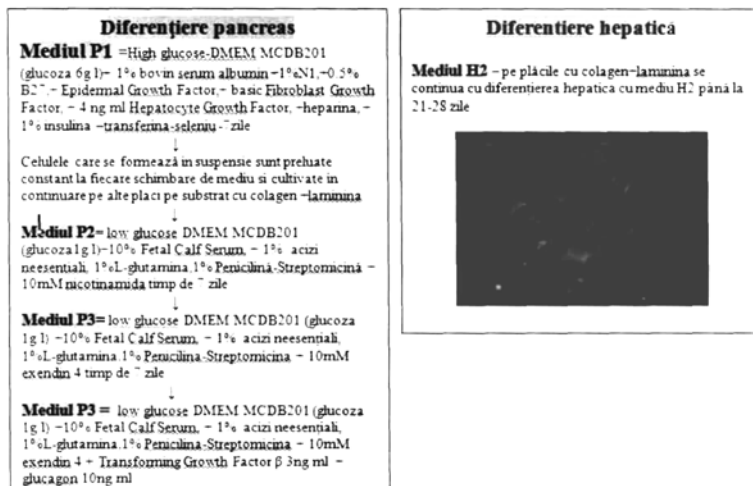
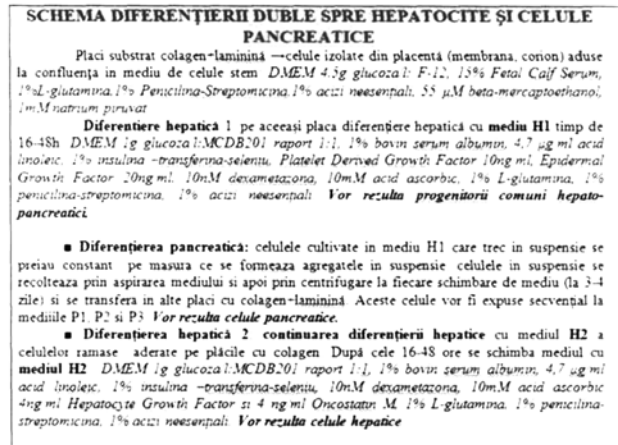


Fig. 4

