



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2013 00742**

(22) Data de depozit: **17.10.2013**

(41) Data publicării cererii:
27.02.2015 BOPI nr. 2/2015

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU ȘTIINȚE
BIOLOGICE BUCUREȘTI,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **BRATOSIN DANIELA, STR. TRESTIANA
NR. 5, BL. 9, SC. 1, ET. 6, AP. 24,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **OPRIȚA ELENA IULIA,
STR. VĂLEA IALOMIȚEI NR.6, BL. C 10,
ET.9, SC.C, AP.184, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **RUGINĂ ALEXANDRINA MARIA,
STR.LUICĂ NR.21, BL.7, SC.2, AP.67,
SECTOR 4, O.P.7, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **DOBRE ANA-MARIA,
STR. VISTIERNICUL STR AVRINOS
NR. 17, BL. 56, SC. D, ET. 1, AP. 44,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CIOTEC ANDREEA CĂTĂLINA LAVINIA,
STR. APEDUCTULUI NR. 3, BL. C4A, SC. 2,
ET. 3, AP. 33, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **SIDOROFF MANUELA ELISABETA,
STR. DRUMUL TABEREI NR. 138, BL. 715,
SC. A, ET. 1, AP. 1, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **IODĂCHEL CĂTĂLIN, STR. NOVACI
NR.11, BL.P 33, SC.2, AP.48, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **SUPLIMENT DE CREȘTERE PENTRU MEDIILE DE CULTURI
CELULARE CU PROPRIETĂȚI BENEFICE ASUPRA
PROLIFERĂRII ȘI VIABILITĂȚII CULTURILOR PRIMARE ȘI
LINIILOR CELULARE CONTINUE ANIMALE ȘI UMANE**

(57) Rezumat:

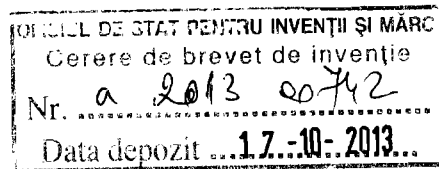
Invenția se referă la un supliment de creștere pentru medii de cultură celulare, și la o metodă de cultivare a celulelor care utilizează acest supliment. Suplimentul conform invenției este un dipeptid H-Gly-Gly-OH cu efect de proliferare și creștere a viabilității celulare și antioxidant. Metoda conform invenției constă în utilizarea suplimentului, într-o concentrație de 50 μM... 10 mM

în amestec cu un mediu de cultură uzual, 5...20% ser fetal bovin și 1% amestec antibiotic, pentru cultivarea unor celule primare și linii celulare continue.

Revendicări: 2
Figuri: 3

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





27

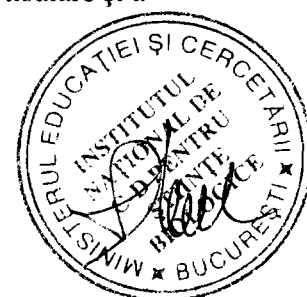
DESCRIEREA INVENȚIEI

SUPLIMENT DE CREȘTERE PENTRU MEDIILE DE CULTURI CELULARE CU PROPRIETĂȚI BENEFICE ASUPRA PROLIFERĂRII ȘI VIABILITĂȚII CULTURILOR PRIMARE ȘI LINIILOR CELULARE CONTINUE ANIMALE ȘI UMANE

Invenția se referă la o metodă de cultivare a celulelor folosind un nou supliment de creștere pentru mediile de culturi celulare pe bază de Glicil-Glicină (Glycyl-Glicine, Diglycine) (H-Gly-Gly-OH) (C₄H₈N₂O₃), dipeptid al aminoacidului neesențial Glicină (Glicocol), destinat stimulării *in vitro* a proliferației și viabilității diferitelor tipuri de culturi celulare primare și linii celulare continue animale și umane. În particular, suplimentul conținând Glicil-Glicină ameliorează proliferarea, creșterea și viabilitatea celulelor din culturile celulare (fibroblaste, keratinocite, celule stem mezenchimale, etc.) păstrându-le *sănătatea* o perioadă mai lungă de timp.

Creșterea *in vitro* a celulelor animale și umane (culturi primare și linii continue) necesită condiții de cultivare și medii de cultură adecvate. Mediul de cultură trebuie să suplinească toți nutrienții esențiali pentru metabolismul celular, creșterea și proliferația celulară *in vitro*. Principalele componente ale mediilor celulare includ aminoacizi, săruri organice și anorganice, vitamine, minerale, zaharuri, lipide și acizi nucleici, tipurile și cantitățile acestora variind în funcție de cerințele specifice ale unui anumit tip celular. Formulele nutrienților, pH-ul și osmolaritatea mediilor celulare variază în funcție de: tipul celular, densitatea celulară și sistemul de cultivare.

Astăzi, produsele pentru culturi celulare reprezintă modalități importante atât pentru cercetare, cât și pentru industria biofarmaceutică. Cultura de masă a unor linii celulare animale este fundamentală pentru fabricarea de vaccinuri virale și alte produse rezultate prin biotehnologii. Produsele biologice rezultate prin tehnica ADN-ului recombinant, precum enzime și hormoni sintetici, sau cele imunobiologice, precum anticorpii monoclonali, interleukinele, limfokinele sau agenții anticancer sunt obținute în culturi de celule animale la scară industrială în bioreactoare. Mai recent, culturile celulare au scop terapeutic și stau la baza ingineriei tisulare și a medicinei regenerative.



În general, mediile de cultură utilizate constau dintr-un mediu de bază (DMEM, MEM, RPMI și altele), suplimentat cu ser de origine animală, de exemplu ser fetal bovin (SFB) și un amestec de antibiotice.

Ameliorarea proliferării celulare este deosebit de importantă în domeniul ingineriei celulare. Astfel, cercetările actuale și-au concentrat atenția în direcția suplimentării mediilor de cultură bazale cu diferiți aditivi: *aminoacizi, peptone și peptide*.

Astfel, s-a încercat suplimentarea mediilor de cultură celulare mamaliene cu cisteină sau o sare a acesteia, însă cu limitări din cauza solubilității scăzute a cisteinei (Wurm F.W., *Nat Biotechnol.*, 22(11):1393-8, 2004) și a stabilității reduse a hipocloritului de cisteină în soluție apoasă (Fürst P., *J. Nutr.*, 131:2562s-2568s, 2001).

În documentul WO 01/46220 se propune adăugarea de peptide mici, în particular oligopeptide conținând 3 - 5 aminoacizi pentru creșterea în bioreactoare a viabilității celulelor utilizate pentru producerea de antibiotice și proteine de interes. De asemenea, în acest document se arată că, adăugarea monomerului de glicină sau diglicinei la mediul de cultură crește foarte puțin proliferarea celulelor hibridoma de șoarece (CAU 96) comparativ cu cea observată într-un mediu de cultură nesuplimentat, în timp ce adăugarea tri-, tetra- și pentapeptidului de glicină crește semnificativ proliferarea celulară.

Documentul WO 2012/017925 prezintă o metodă de cultivare a celulelor animale într-un mediu suplimentat cu un oligopeptid având unul sau mai mulți aminoacizi L-cisteină și excluzând glutatoniul.

O altă abordare a fost aceea de a suplimenta mediile de cultură bazale cu aminoacidul L-glutamină în scopul sterilizării termice a mediului de cultură (Patent Literature 3: JP Patent Publication No. 61-271985; Patent Literature 4: EP Patent No. 0220379).

Documentul US 20110262965 propune un mediu pentru culturile celulare conținând cel puțin un peptid scurt, denumit peptidul care conține cel puțin doi aminoacizi dintre care cel puțin unul este cisteină sau tirozină.

Franek arată că peptidele mici reprezintă o nouă clasă de agenți capabili să intervină într-un spectru larg de procese celulare. Peptidele pur sintetice conținând 3-6 aminoacizi pot îmbunătăți parametrii importanți ai culturii celulare chiar dacă aceste peptide sunt compuse din aminoacizi neesențiali (Franek F, *BioProcessInternational*, 48-52, 2004; Franek F. and Kefinger H., *Biotechnol. Prog.*, 18:155-158, 2002).



Brevetul francez 07/07113 din 2007 cu titlul: „Methode pour stimuler la proliferation de cellules differenciees appartenant au lignage chondrogenique”, extins la un brevet european WO/2009/080914 și brevet US 20100256234 descrie o metodă de stimulare a proliferării celulelor condrogenice umane diferențiate prin cultivarea celulelor într-un mediu de cultură care conține dipeptidul Ac-Gly-Gly-OH într-o cantitate suficientă pentru a stimula proliferarea.

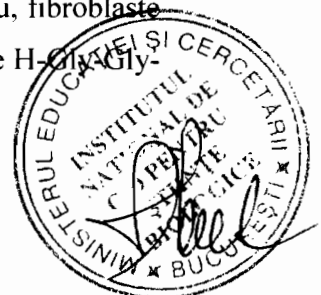
În cadrul prezentei invenții, metoda de cultivare a diferitelor celule primare (celule stem mezenchimale umane) și linii celulare continue (fibroblaste de șobolan NCTC, keratinocite, etc.) animale și umane folosind medii de cultură obținute prin suplimentarea mediilor clasice (MEM, DMEM) cu dipeptidul H-Gly-Gly-OH la diferite concentrații s-a reușit îmbunătățirea celor mai importanți parametri ai culturilor celulare folosite.

Utilizarea dipeptidului H-Gly-Gly-OH ca supliment în mediile de cultură bazale pentru culturile celulare primare, inclusiv celulele stem, și liniile celulare continue animale și umane, în conformitate cu prezenta invenție, oferă numeroase avantaje: stimularea proliferării și creșterea viabilității celulare, stimulează metabolismul celular, inhibă fenomenul de apoptoză, dipeptidul H-Gly-Gly-OH având și un efect antioxidant.

În Figura 1 este prezentată o analiză comparativă prin microscopie optică demonstrativă a unei culturi de fibroblaste NCTC cultivate în absența (A) și prezența de supliment de creștere reprezentat de glicilglicină la o concentrație de 200μM (B), unde se observă clar efectul de stimulare a proliferării celulare prin numărul crescut de celule din eșantionul crescut în prezență de supliment de creștere.

În vederea elucidării mecanismului *de proliferare și creștere a viabilității celulare exercitat de către dipeptidul H-Gly-Gly-OH*, s-a urmărit analiza fenomenului de apoptoză pe culturi celulare primare (de exemplu celule stem mezenchimale) și linii celulare continue (de exemplu fibroblaste de șobolan NCTC), cultivate în condiții speciale de stres inductor de apoptoză (mediu cu concentrații crescute de Ca^{2+}), în prezență și absență de dipeptid. Rezultatele obținute (Figura 2) evidențiază clar efectul de inhibare a fenomenului de apoptoză, ceea ce explică și numărul mai mare de celule obținut într-o cultură realizată în prezență de H-Gly-Gly-OH prin blocarea morții celulare.

De asemenea, a fost testat eventualul *efect antioxidant al dipeptidului H-Gly-Gly-OH*, în experiențe efectuate pe culturi celulare primare și linii celulare continue (de exemplu, fibroblaste NCTC), asupra cărora s-a indus un stres oxidant cu H_2O_2 , în prezență sau absență de H-Gly-Gly-OH.



OH, la diferite concentrații, respectiv de 200 μ M. Rezultatele obținute sunt prezentate în Figura 3, unde se constată blocarea apariției speciilor reactive de oxigen (ROS) intracelular la celulele preincubate cu dipeptid, comparativ cu martorul de cultură neincubat, supus aceluiași stres oxidativ.

EXEMPLU

Se prepară steril, o soluție de lucru de H-Gly-Gly-OH, de concentrație 100mM, care se aliquotează și se pastrează la -20⁰C până în momentul folosirii.

Culturile celulare primare și liniile celulare continue, animale și umane sunt însămânțate în plăci de cultură (35mm, 60mm) sau flaskuri de cultură (T25, T75, T150).

Mediul de cultură utilizat (MEM, DMEM, RPMI și altele) este suplimentat cu ser fetal bovin (SFB) (5-20%), 1% amestec antibiotice și soluția de lucru H-Gly-Gly-OH în diferite cantități pentru a se ajunge la concentrația dorită ce poate varia între 50 μ M și 10mM. Mediul de cultură suplimentat cu diferite concentrații de H-Gly-Gly-OH se utilizează în continuare la cultivarea celulelor după metoda aleasă de utilizator.

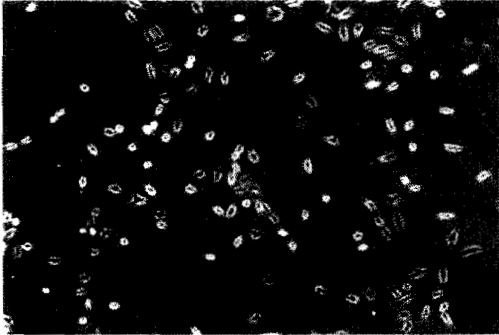


REVEDICĂRI

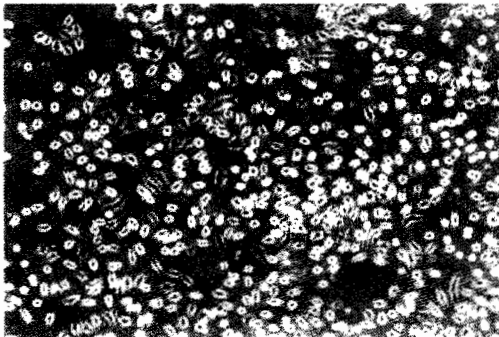
1. Nou supliment de creștere pentru mediile de culturi celulare pe bază de Glicil-Glicină (Glycyl-Glicine, Diglycine) (H-Gly-Gly-OH) (C₄H₈N₂O₃), dipeptid al aminoacidului Glicina (Glicocol), destinat stimulării *in vitro* a proliferării și viabilității diferitelor tipuri de culturi celulare primare, inclusiv celulele stem, și linii celulare continue animale și umane.
2. Metodă de cultivare a celulelor caracterizată prin aceea că, celulele primare și liniile celulare continue, animale și umane, însămânțate în plăci de cultură (35mm, 60mm) sau flaskuri de cultură (T25, T75, T150) sunt crescute în mediul de cultură conținând următoarele elemente:
 - mediul MEM (Minimum Essential Medium Eagle) sau mediul DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) sau alte medii de cultură;
 - 5-20% SFB;
 - 1% amestec antibiotice (penicilină, streptomycină, neomicină);
 - soluția de lucru H-Gly-Gly-OH, utilizată ca supliment de creștere a proliferării și viabilității celulare cu concentrații variind între 50 μM și 10mM.



DESENE



Cultura fibroblaste NCTC 3 zile-
Martor



Cultura fibroblaste NCTC 3 zile
cu Gly-Gly 200μM Gy-Gly

Figura 1. Analiza comparativă prin microscopie optică a unei culturi de fibroblaste NCTC cultivate în absența (A) și prezența de supliment de creștere reprezentat de glicinglicină la o concentrație de 200μM (B).

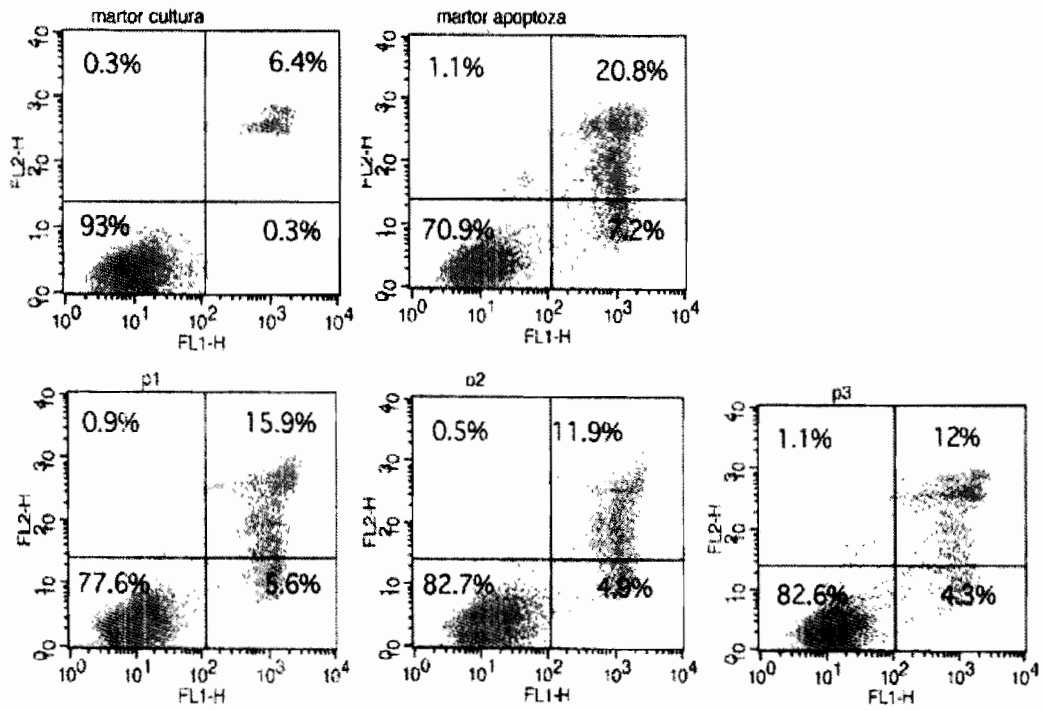


Figura 2. Analiza fenomenului de apoptoză pe linie celulară de fibroblaste de șobolan (NCTC), cultivate în condiții de stres apoptotic (martor apoptoză), în absența și prezența H-Gly-Gly-OH 200μM (p1), 800 μM (p2) și 10 mM (p3), comparativ cu cultura martor (martor cultură).



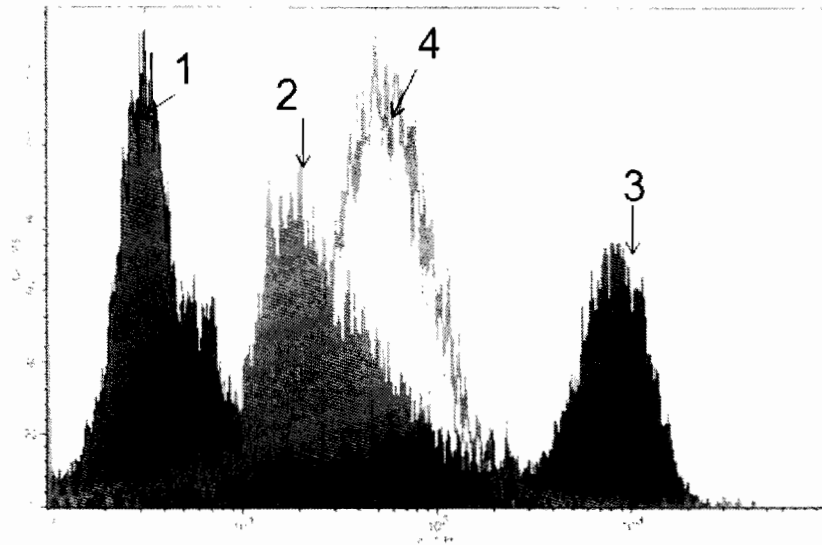


Figura 3. Analiza capacității antioxidante exercitate de H-Gly-Gly-OH pe fibroblaste NCTC supuse unui stres oxidativ indus cu H_2O_2 .

1: Autofluorescență celulară;

2: Martor netratat cu H_2O_2 ;

3: Martor tratat cu H_2O_2 (martor pozitiv);

4: Fibroblaste tratate cu H_2O_2 în prezență de $200\mu M$ H-Gly-Gly-OH;