



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2016 00510**

(22) Data de depozit: **19/07/2016**

(41) Data publicării cererii:
28/04/2017 BOPI nr. **4/2017**

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

(72) Inventatori:
• **TUȘA IRIS-MARIA, STR. ELIE CARAFOLI
NR. 12, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **TOADER ANDREEA- CĂTĂLINA- LAVINA,
DRUMUL TABEREI NR. 138, BL. 715, SC. 1,
ET. 8, AP. 23, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **BRATOSIN DANIELA, STR. TRESTIANA
NR. 5, BL. 9, SC. 1, ET. 6, AP. 24,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **METODĂ DE OBTINERE A UNUI LIZAT DE PLACHETE
UMANE DIN UNITĂȚI PLACHETARE EXPIRATE, UTILIZABIL
CA ALTERNATIVĂ LA SERUL FETAL BOVIN (SFB) SAU CA
SUPLIMENT DE CREȘTERE PENTRU MEDIILE DE CULTURI
CELULARE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de obținere a unui lizat de plachete umane, derivat din unitățile plachetare expirate (hPL-e), din centrele de transfuzii, utilizabil ca alternativă la serul fetal bovin (SFB), sau ca supliment de creștere pentru mediile de culturi celulare complete. Metoda conform invenției constă în aceea că unități plachetare ajunse la limita duratei de conservare în centrele de transfuzii (hPL-e) sunt stocate la temperatura de -80°C, înainte de prelucrare fiind dezghețate la 37°C, după care sunt centrifugate timp de 30 min la 4500 g, supernatantele recuperate sunt filtrate pe un

filtru de 0,45 μm, filtratul rezultat fiind alicotat în criotuburi de depozitate la -80°C, urmând ca, înainte de utilizare, probele alicotate să fie dezghețate și recentrifugate 15 min la 4500 g, produsul fiind utilizat în concentrații de 2,1...10% ca supliment de creștere pentru medii de cultură celulare, în asociere cu 10% SFB sau ca substitut al acestuia.

Revendicări: 3
Figuri: 4



DESCRIEREA INVENȚIEI

METODA DE OBTINERE A UNUI LIZAT DE PLACHETE UMANE DIN UNITĂȚI PLACHETARE EXPIRATE UTILIZABIL CA ALTERNATIVĂ LA SERUL FETAL BOVIN (SFB) SAU CA SUPLIMENT DE CREȘTERE PENTRU MEDIILE DE CULTURI CELULARE

Invenția se referă la o metodă de obținere a unui lizat de plachete umane, prescurtat hPL sau HPL obținut din unitățile plachetare conservate în centrele de transfuzii ajunse la expirarea termenului de conservare (5-7 zile) ce poate fi utilizat ca o alternativă a SFB, similar cu hPL produs din unitățile plachetare proaspăt izolate. În particular, lizatul obținut din plachete expirate (HPL-e) ameliorează proliferarea, creșterea și viabilitatea celulelor din culturile celulare (fibroblaste, keratinocite, celule stem mezenchimale, etc.) atât în culturi monostrat cât și în structuri de tip 3D, dar și pentru alte posibile aplicații biomedicale.

Recent, culturile celulare au scop terapeutic și stau la baza ingineriei tisulare și a medicinei regenerative. 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 proliferarea 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. 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.

Alternativele actuale la FBS se bazează pe componente derivate din sânge uman: derivați de plasmă, ser, sânge din cordonul ombilical (UCB) ser și trombocite, cum ar fi hPL (Bieback *et al.*, 2009; Kinzebach *et al.*, 2013). Cultivarea și expansiunea celulelor stem mezenchimale (MSC) sau de alt tip în mediu de creștere conținând HPL fabricat din unitățile plachetare proaspăt

izolate în loc de utilizarea tradiționalului SFB s-a dovedit fezabilă (Schallmoser *et al.*, 2007; Brinchmann JE 2008 ; Bieback K *et al.*, 2009; Schallmoser & Strunk 2013).

Deși lizatele plachetare umane (HPL) sunt în curs de dezvoltare ca o posibilă alternativă în înlocuirea SFB în culturile celulare MSC sau de alt tip. Se recomandă foarte multă precauție la manipularea produselor de origine umană, în scopul evitării transmiterii bolilor infecțioase. De aceea se preferă ca lizatele plachetare umane (HPL) aplicate în condiții clinice să fie fabricate în conformitate cu aceleași reglementări stricte practicate în centrele de procesare a sângelui și din mediul spitalicesc general (Warnke *et al.*, 2013).

Un alt considerent implică utilizarea de donatori umani necesari pentru producerea de HPL și plasmă bogată în plachete. Până în prezent, există deja un deficit de donatori de sânge și plachete și prin urmare, este de dorit să nu se concureze această nevoie de plachete proaspete cu cea a băncilor de sânge sau a centrelor de transfuzii.

Este cunoscut de asemenea că unitățile plachetare au un timp de viață relativ scurt și, ca rezultat, sunt necesari mai mulți donatori pentru a menține numărul minim de unități plachetare disponibile pentru transfuzie la un moment dat. Cererea de plachete variază, ceea ce îngreunează pentru băncile de sânge estimarea necesarului de unități plachetare. S-a raportat că aproximativ 20 % din totalul unităților plachetare expiră înainte de a putea fi folosite, și sunt prin urmare, eliminate (Verma A & Agarwal P, 2009).

La aceste argumente se adaugă timpul de viață foarte scurt al unităților plachetare datorită riscului crescut de contaminare cu agenți patogeni, după câteva zile de depozitare la temperatura camerei, și care nu este legată de funcționalitatea plachetelor. (Murphy *et al.* 2008) După o perioadă scurtă de 5-7 zile, unitățile plachetare nu mai sunt considerate sigure pentru transfuzii umane, chiar dacă funcția plachetelor poate fi încă intactă (Dumont & Van den Broeke, 2003). În consecință, în prezent se încearcă posibilitatea utilizării plachetelor expirate în alte scopuri decât pentru transfuzie. Mai mult decât atât, unitățile plachetare expirate au fost fabricate în conformitate cu standardele acceptate care se aplică la producerea materialelor de transfuzie pentru pacienți umani (Sweeney, 1998).

În cadrul prezentei invenții, s-a reușit îmbunătățirea celor mai importanți parametri ai culturilor celulare folosite, celule primare (celule stem mezenchimale umane, condrocite) și linii celulare continue animale și umane (fibroblaste NCTC, etc.) prin utilizarea lizatului plachetar obținut din unități plachetare expirate, demonstrând că lizatului plachetar derivat din unitățile

plachetare expirate (hPL-e) poate fi utilizat ca o alternativă a SFB, similar cu HPL produs din unitățile plachetare proaspăt isolate (hPL-p).

Utilizarea lizatului plachetar derivat din unitățile plachetare expirate (hPL-e) poate fi făcută atât ca substitut al SFB cât și ca supliment de creștere pentru mediile celulare complete (cu 10 % SFB), la diferite concentrații (variind între 2,5 – 10 %), reușindu-se astfel îmbunătățirea celor mai importanți parametri ai culturilor celulare folosite.

Metoda de obținere a lizatului plachetar

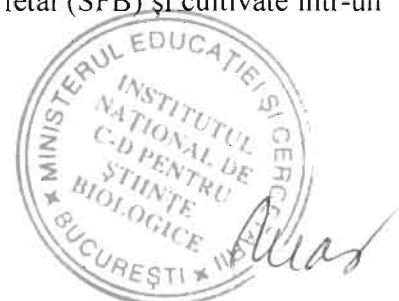
O unitate de transfuzie cu concentrat plachetar (CP) obținut prin afereză, cu un volum de 50 mL/unit, conținând $5,5 \times 10^{10}$ plachete în plasmă, pH 6,2, a fost divizat în 2 probe. O probă a fost conservată la temperatura camerei (20 °C), timp de 7 zile după colectare, sub agitare până la expirare, iar apoi a fost depozitată la -80 °C. Cealaltă probă a fost depozitată imediat după colectare la -80 °C. Înainte de prelucrare, ambele unități congelate au fost dezghețate la 37 °C, pe baie de apă, ceea ce a condus la liza trombocitelor. Probele au fost centrifugate timp de 30 minute la 4500 g, fiind recuperate supernatantele. Pentru obținerea unui lizat filtrat, supernatantele au fost filtrate pe un filtru de 0,45 μm (Millipore, MA, USA). Filtratul obținut a fost alicotat în criotuburi și depozitate la -80 °C. Înainte de utilizare ca supliment de creștere în mediul de cultură celulară, probele alicotate au fost după dezghețare recentrifugate 15 minute la 4500 g și s-au folosit numai supernatantele.

EXEMPLE DE TESTĂRI EXPERIMENTALE ALE HPL-e

1. Testarea comparativă a HPL obținut din plachete proaspăt conservate și ajunse la termenul de expirare pe o cultură de fibroblaste

Fibroblastele de șoarece (NCTC, clona 929) au fost cultivate pentru expansiune în mediu de cultură DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplimentat cu 10 % SFB, penicilină (100 U/mL), streptomicină (0,1 mg/mL), amfotericină (0,25 μg/mL) utilizând plăci de 6 godeuri, 4×10^4 celule/godeu, în 2 mL mediu de cultură DMEM complet.

Pentru testarea comparativă, celulele au fost împărțite în trei culturi pentru expansiuni viitoare în mediu DMEM suplimentat cu 10 % lizat plachetar proaspăt (HPL-p), 10 % lizat plachetar obținut după expirarea plachetelor (HPL-e) sau 10 % ser fetal (SFB) și cultivate într-un



19-07-2016

incubator cu 5 % CO₂, 95 % umiditate la 37 °C. Celulele au fost cultivate în mod independent și au fost efectuate experimente în triplicate, fiind analizate la 3 și 5 zile de cultură.

Așa cum se poate constata din Figurile 1 și 2 expansiunea celulară în prezența de lizat plachetar obținut din plachete proaspete sau ajunse la limita conservării de 7 zile a fost mult superioară față de multiplicarea celulară în proba martor, în prezența de SVF. În plus, nu au existat diferențe de proliferare a celulelor la suplimentarea cu lizat plachetar obținut din plachete proaspete sau după conservarea lor în plasmă timp de 7 zile.

Aceste observații permit în concluzie posibilitatea de a utiliza plachetele pentru îmbunătățirea tehnicilor de cultură celulară, rezultatele fiind mai mult decât promițătoare, și chiar posibilitatea înlocuirii serului fetal.

2. Obținerea unui suport 3D (scaffold) cu microbile de alginat conținând HPL-e pentru cultivarea celulelor utilizabile în medicină regenerativă (gel de alginat cu HPL-e)

Pe baza rezultatelor bune obținute în cultivarea în monostrat a celulelor, în care am demonstrat că lizatul plachetar expirat (HPL-e) a generat aceleași efecte ca lizatul obținut din plachete proaspete (HPL-p) asupra expansiunii celulare a liniei de fibroblaste și chiar superioare culturii cu SVF, am testat utilizarea HPL-e la obținerea unui gel suport 3D pentru cultivarea celulelor cu aplicații în terapia celulară și/sau medicina regenerativă.

În acest sens s-a folosit alginatul, un polizaharid natural, anionic și hidrofilic, derivat în principal din alge brune și bacterii, materialul cel mai des utilizat pentru încapsularea de celule și cultivarea lor într-un suport 3D, pentru avantajele oferite. Alginatul permite obținerea unei game variate de biomateriale, matrici suport sau sistem de livrare utilizate în medicină putând fi condiționat într-o varietate de forme: hidrogeluri moi, geluri elastice, microsferă, fibre, spume, nanoparticule, multistraturi, el fiind pretabil ca material pentru încapsularea celulară și vehicul injectabil pentru transplantarea celulelor. În plus are proprietăți remarcabile pentru medicină: biocompatibilitate, biodegradabilitate, non-antigenicitate, cost scăzut și gelificarea ușoară cu cationi bivalenți încât a permis obținerea unei game variate de biomateriale pe bază de alginat pentru repararea și regenerarea diferitelor țesuturi cum ar fi pielea, cartilajul și țesutul osos, etc.

Astfel, am elaborat o metodă de obținere a unui gel pe bază de microbile de alginat în care încapsularea celulelor se face în prezență de lizat plachetar ca stimulent de creștere celulară.



Metoda utilizată de noi a fost conform celei descrise de Marijnissen *et al.*, 2002, cu adaptare pentru includerea lizatului plachetar.

Sedimentul de fibroblaste în concentrație de 4×10^5 celule/ml a fost suspendat în 5 mL soluție NaCl 155mM în care a fost dizolvat 0,06 g alginat de sodiu și suplimentat după aceea cu 10 % - 20 % HPL-p sau HPL-e. Suspensia celule/alginat de sodiu obținută a fost transferată ulterior picătură cu picătură în 70 mL soluție CaCl_2 de concentrație 102 mM, realizându-se astfel polimerizarea și încapsularea celulelor în microbulele de alginat conținând HPL. Ulterior, microbulele au fost spălate cu mediul de cultură DMEM și cultivate în continuare în mediul de cultură, în condiții standard (37°C și 5 % CO_2), în raport de 10-12 microsferă/mL, timp de 5-7 zile (Figura 3). Astfel, în urma analizelor efectuate prin microscopie optică, s-a observat o proliferare mai crescută a fibroblastelor de șobolan înglobate în gelul de alginat de sodiu suplimentat cu lizat HPL-p sau HPL-e, față de proba martor cu SVF.

Expansiunea celulară precum și viabilitatea celulară determinată prin dubla colorație cu kitul Live/Dead, respectiv cu calceină-AM/Iodură de Propidiu (Figura 4) nu au evidențiat diferențe.

În concluzie, utilizarea HPL-e preparat din concentrate plachetare expirate ca supliment de creștere a culturii de fibroblaste de șoarece (NCTC, clona 929) a fost comparabilă cu cultura celulară în prezența de HPL derivat din concentrate plachetare proaspete (HPLp) și cu utilizarea tradițională a SFB. Caracteristicile de bază ale fibroblastelor au rămas neschimbate, fără modificări morfologice, în timp ce utilizarea HPL ca supliment a condus la creșterea semnificativă a proliferării, datorată probabil prezenței unor factori adiționali din HPL, care nu se găsesc, în general, în SFB.

Deoarece utilizarea HPL expirat sau proaspăt nu a afectat creșterea ratei de expansiune, utilizarea unităților plachetare expirate ca suplimente de creștere pentru expansiunea celulară poate fi avantajoasă. Această creștere a proliferării și a ratei de dublare a populației se datorează cu siguranța unor factori de creștere prezenți în HPL.

În plus, mediul suplimentat cu HPL poate fi folosit în aceeași măsură ca și SFB. Acest lucru indică faptul că lizatele plachetare ar putea avea abilități de protecție asemănătoare, în general, atribuite SFB, dar fără a furniza inhibitori proteolitici și risc de contaminare virală.

Obținerea HPL din plachete ajunse la limita duratei de conservare în centrele de transfuzii precum și posibilitatea stocării acestora la -80°C asigură îndeplinirea criteriilor stricte de

securitate, cum ar fi cele aplicate produselor din sânge, asigurând sterilitatea și stabilitatea condițiilor de depozitare.

Lizatul celular HPL-e, dar și cultivarea celulelor pe suport 3D obținut din alginat și HPL-e, pot fi considerate componente sanguine și urmărite cu același sistem de baze de date pentru a furniza trasabilitatea completă a produsului de la donare la utilizarea de către pacient.

Atât HPL-e cât și gelul plachetar obținut poate fi folosite în chirurgia regenerativă și domeniul medicinei dentare clinice, în cabinetele de chirurgie plastică și estetică, înlocuind procedeul de obținere al PRP-ului autolog, consumator de timp și materiale sau imposibil de practicat în cabinetele mici.



REVENDICĂRI

1. Metoda de obținere a unui lizat de plachete umane din unități plachetare expirate utilizabil pentru culturi celulare în monostrat sau în sistem 3D pe suport de alginat de sodiu (microbule de alginat).
2. Folosirea lizatului plachetar obținut din unități plachetare expirate (HPL-e) ca supliment de creștere pentru mediile de culturi celulare, destinate stimulării *in vitro* a proliferării și viabilității diferitelor tipuri de culturi celulare primare, inclusiv celulele stem, și linii celulare continue animale și umane.
3. Utilizarea lizatului plachetar obținut din unități plachetare expirate (HPL-e) ca alternativă la serul fetal bovin (SFB).



Handwritten signature

DESENE

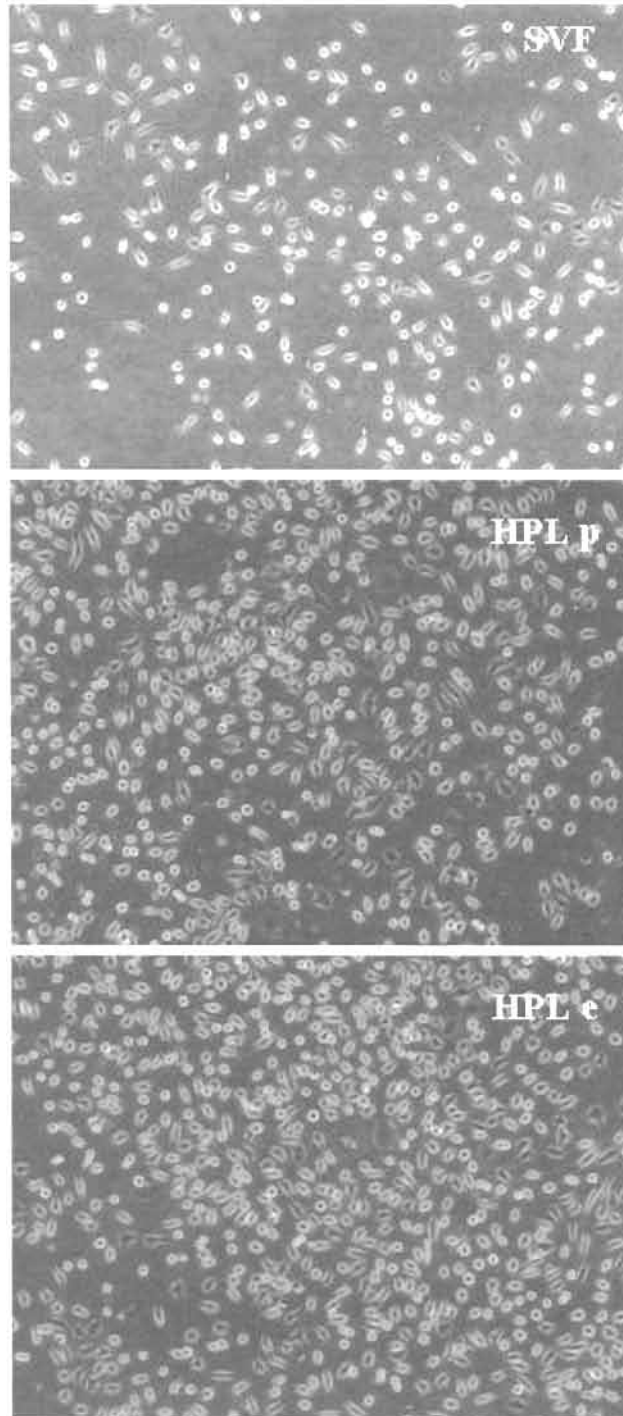


Figura 1. Analiza comparativă prin microscopie optică a unei culturi de fibroblaste de șoarece (NCTC, clona 929) cultivate în mediu DMEM suplimentat cu SVF, HPL-p sau HPL-e, după 3 zile de cultivare (20x).

[Handwritten marks]

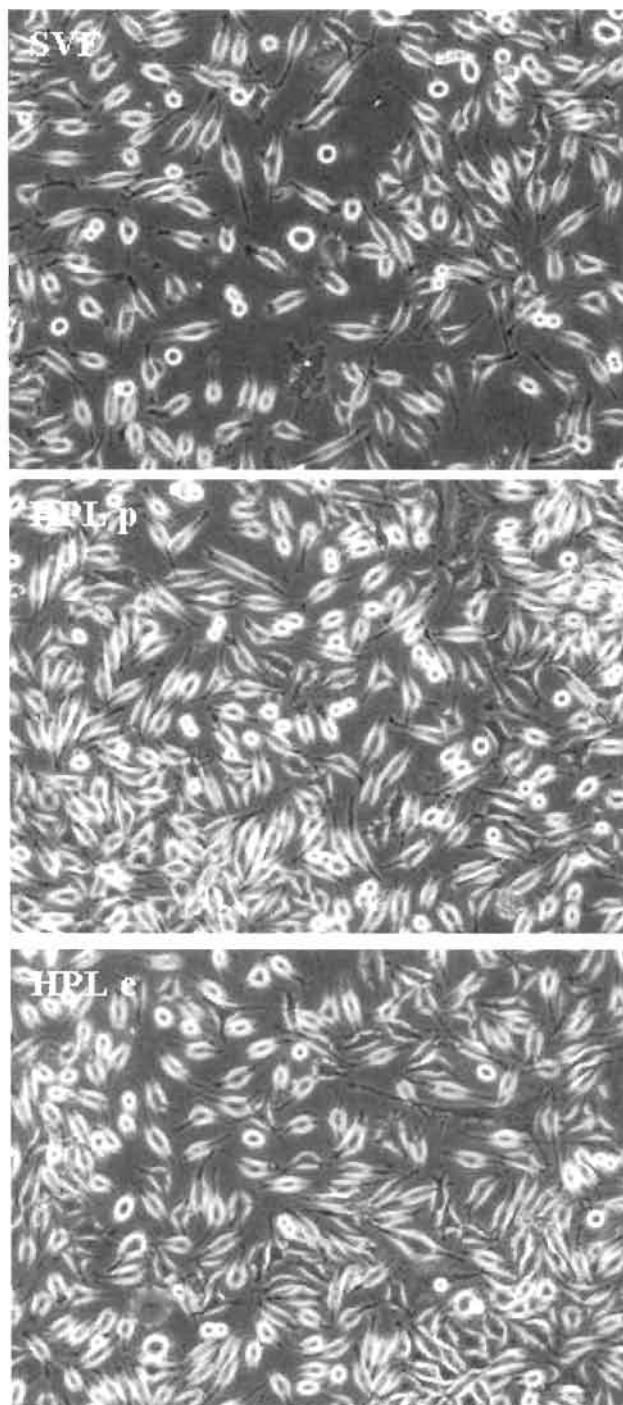


Figura 2. Analiza comparativă prin microscopie optică a unei culturi de fibroblaste de șoarece (NCTC, clona 929) cultivate în mediu DMEM suplimentat cu SVF, HPL-p sau HPL-e, după 5 zile de cultivare (30x).



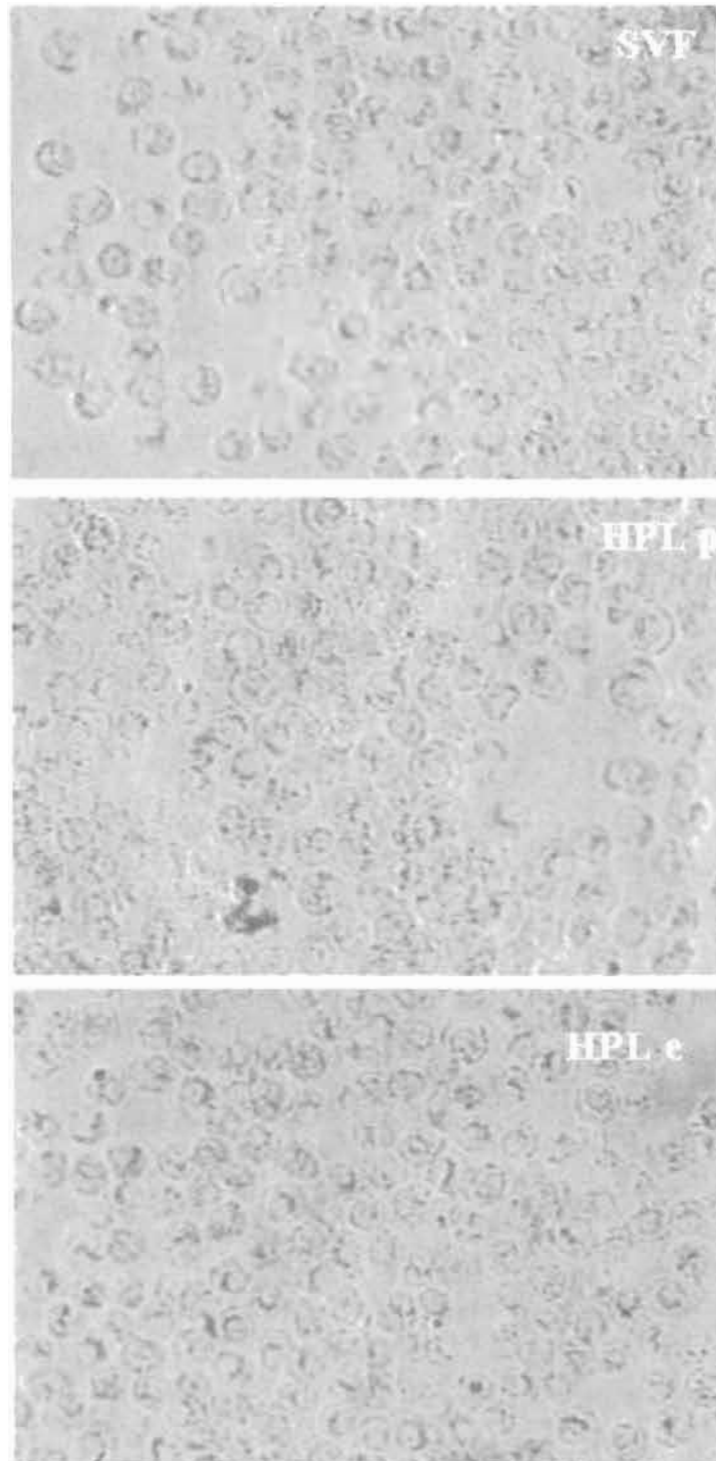


Figura 3. Analiză prin microscopie optica a fibroblastelor de șoarece (NCTC, clona 929) cultivate în suport de microbule de alginat de sodiu suplimentate cu SVF, HPL-p sau HPL-e, după 5 zile de cultivare (20x).

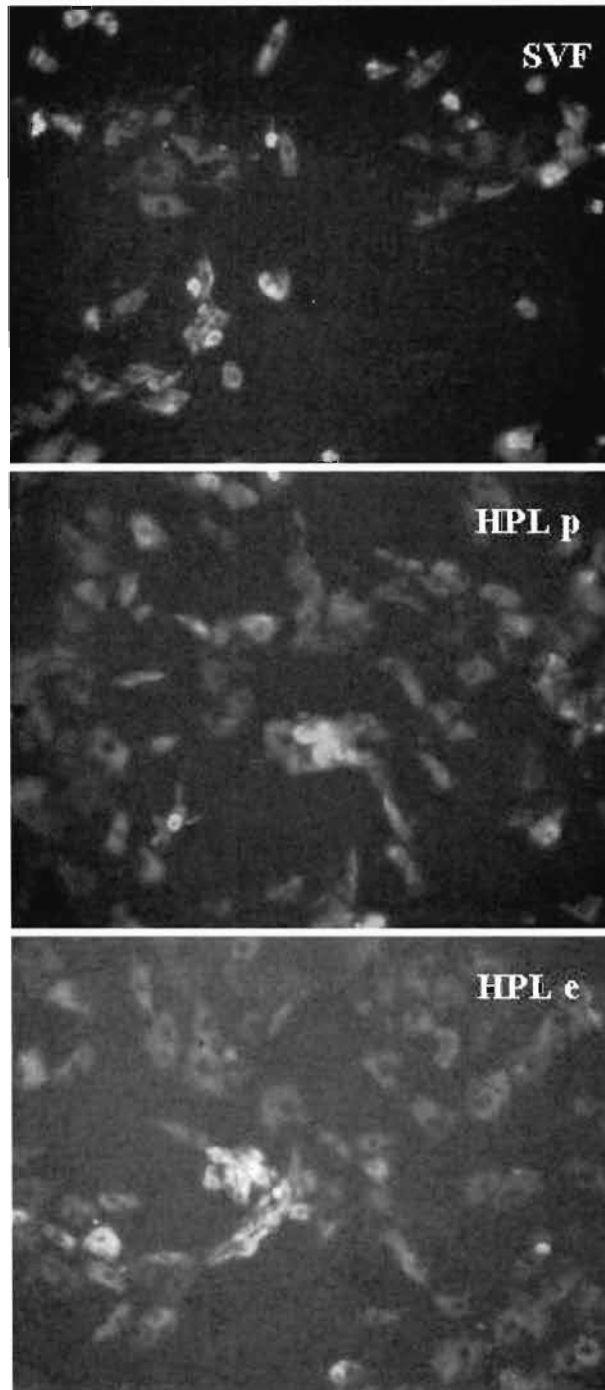


Figura 4. Fibroblaste de șoarece (NCTC, clona 929) cultivate în suport de microbule de alginat de sodiu suplimentate cu SVF, HPL-p sau HPL-e, după 5 zile de cultivare (microscopie de fluorescență și colorare pentru viabilitate Live/Dead; 30x)