



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00927

(22) Data de depozit: 28/11/2016

(41) Data publicării cererii:
30/06/2017 BOPI nr. 6/2017

(71) Solicitant:

• INSTITUTUL DE VIROLOGIE "ȘTEFAN S. NICOLAU", ȘOS. MIHAI BRAVU NR.285, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• INSTITUTUL CLINIC FUNDENI, ȘOS. FUNDENI NR. 258, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ "NICOLAE SIMIONESCU", STR. B.P. HAȘDEU NR. 8, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• INSTITUTUL ONCOLOGIC "PROF.DR.ALEXANDRU TRESTIOREANU" DIN BUCUREȘTI, ȘOS.FUNDENI NR.252, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

• DIACONU CARMEN CRISTINA, STR. BABA NOVAQC NR. 21 G11, 7/74, BUCUREȘTI, B, RO;
• MATEI LILIA, STR. SEMILUNEI NR. 7, PARTER, BUCUREȘTI, B, RO;
• DRAGU LAURA DENISA, STR. BANU UDREA NR. 4, BL. G8, AP. 98, BUCUREȘTI, B, RO;
• CORALIA BLEOTU, ALEEA LUNCA BRADULUI NR. 2, BL. H5, SC. 6, AP. 2, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• CHIVU-ECONOMESCU MIHAELA, ȘOS. ȘTEFAN CEL MARE 240, BL. 59A, SC. 4, AP. 105, BUCUREȘTI, B, RO;
• ALDEA-PITICA IOANA MĂDĂLINA, BD. CONSTANTIN BRANCOVEANU NR. 14, BL. B5, AP. 10, BUCUREȘTI, B, RO;
• NECULA LAURA GEORGIANA, ȘOS. COLENTINA NR. 10, BL. 6, SC. D, ET. 8, AP. 167, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• MAMBET CRISTINA, STR. DR. IACOB FELIX NR. 95, BL. 17, SC. A, ET. 6, AP. 25, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• NEAGU ANA IULIA, BD. NICOLAE GRIGORESCU NR. 19, BL. V18, SC. C, AP. 51, BUCUREȘTI, B, RO;
• BOTEZATU ANCA, BD. TIMIȘOARA NR. 89, BL. C1-14, SC. B, AP. 34, BUCUREȘTI, B, RO;
• POPESCU IRINEL, STR. DOMNITA RUXANDRA NR. 30, ET. 1, AP. 2, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;

• DIMA SIMONA, STR. NĂVODULUI NR. 5A, CONSTANȚA, CT, RO;
• NĂSTASE ANCA, STR.SACHELARIE VISARION NR.8, BL.111B, ET.1, AP.50, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• TIȚA VALERIA, STR. VINTILĂ MIHĂILESCU NR. 12, BL. 79A, AP. 5, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• ILIE VERONICA, STR. PIERSICULUI, LILIECI, IL, RO;
• FLOREA RALUCA, STR. DECEBAL NR. 7BIS, CÎMPULUNG, AG, RO;
• SOROP ANDREI, TURBUREA, GJ, RO;
• BACALBAȘA NICOLAE, BD. UNIRII NR. 76, BL. J3A, SC. 1, ET. 8, AP. 31, BUCUREȘTI, B, RO;
• CUCU DANIELA, ȘOS. BUCUREȘTI-TÂRGOVIȘTE NR. 147, BL. 79, SC. F, ET. 2, AP. 7, BÎŢTEA, IF, RO;
• IVAN LUMINIȚA, STR. HISPANIA NR. 22-24, ET. 2, AP. 12, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• ANTOHÉ FELICIA, STR. VICINA NR. 2, BL. 29, ET. 1, AP. 7, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• BOTEANU RALUCA, BD. MIRCEA VODĂ NR. 36, BL. M6, SC. 1, ET. 1, AP. 7, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• UYY ELENA, ALEEA TEBEA NR. 6, BL. D11, SC. 2, ET. 1, AP. 21, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• SUICA VIOREL, STR. APUSULUI NR. 31, BL. M5, SC. A, ET. 5, AP. 22, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• STANCIU ADINA, STR. AVIATIEI NR. 9, BL. IV/C, SC. 5, AP. 69, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• NEGOIȚA VALENTINA, CALEA 13 SEPTEMBRIE NR. 231, BL. VI, SC. 2, ET. 7, AP. 63, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• GRUIA MARIA-IULIANA, BD.BASARABIA NR.244, BL.M Y 8, AP.19, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• ANGHÊL RODICA, STR. BISERICA FLOREASCA NR. 6B, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• CINCA SĂBIN-AUREL-IOAN-ANTON, STR. DOAMNA GHICA NR. 3, BL. 2, SC. 2, ET. 1, AP. 50, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(54) METODĂ DE STABILIRE A CEMOGRAMEI PERSONALIZATE, UTILIZATĂ ÎN MANAGEMENTUL PACIENTULUI CU CANCER PANCREATIC

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de obținere a chemo-gramei personalizate a pacientului oncologic. Metoda conform invenției constă în izolarea celulelor pancreatice din tumora pacientului (ADPK) și a celulelor stromale din pancreas normal, și co-cultivarea lor în matricea 3D, în sisteme polimerice, sub formă de sferoizi, con-

stituind un model organotipic tumoral pentru sceniungul și analiza simultană a unor citostatice, și realizarea unei chemo-grame personalizate.

Revendicări: 1
Figuri: 8

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, 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).



12.2. DESCRIEREA BREVETULUI: METODA DE STABILIRE A CHEMOGRAMEI PERSONALIZATE UTILIZATA IN MANAGEMENTUL PACIENTULUI CU CANCER PANCREATIC

Inventia se refera la metoda de stabilire a strategiei de obtinere a unei chemograme personalizate utilizabila la investigarea unor noi medicamente anti-tumorale specifice pentru celulele tumorale, pentru cele stromale sau pentru ambele, pe baza unor sisteme organotipice de pancreas.

Cultura celulara conventionala in sistem 2D (monostrat sau suspensie) a permis identificarea de noi tinte si medicamente, dar, desi aceste sisteme furnizeaza cu siguranta mult mai multe informatii decat testele de biochimie ce nu folosesc celule ca substrat, totusi ele nu sunt capabile sa reproduca cu acuratete micromediul tumoral, in special in experimentele in care tinta este identificarea de noi medicamente in adenocarcinomul ductal pancreatic (ADKP), cazuri in care stroma are un rol deosebit de important in raspunsul la tratament. Obținerea de modele celulare, relevante din punct de vedere fiziologic, pentru evaluarea susceptibilitatii la anumite medicamente, testarea rezistentei sau *screening*-ul de medicamente si analiza functionala care ar putea fi in masura sa ofere o valoare predictiva ridicata pentru eficacitatea clinica a compusilor, este o necesitate absolută.

ADKP este caracterizat printr-un prognostic foarte prost, cu o mortalitate la 5 ani de 97-98%, metastazarea la distanta ramanand responsabila mortalitatea si morbiditatea mare cauzata de acest tip de cancer. Totusi „*micromediul tumoral*”, caracterizat printr-un continut stromal foarte mare, pare a fi unul dintre cei mai importanti determinanti ai rezistentei la chimioterapie si ai supravietuirii pacientilor cu ADKP. De aceea, este necesara evaluarea cantitativa si calitativa a efectelor antitumorale ale medicamentelor in contextul stromei existente in tumori si a interactiunii dintre proteinele stromale si celulele tumorale. Limitarile cunostintelor actuale, asociate cu probabilitatea ca *stroma* sa joace un rol fundamental in raspunsul terapeutic, impun eforturi focalizate si integrate pentru a analiza evolutia efectul antitumoralelor in prezenta stromei de ADKP.

Sistemele de cultura 3D reprezinta un model mult mai realist decat sistemele 2D pentru investigarea interactiunilor celulare la nivelul formatiunii tumorale si mai ales pentru investigarea unor noi strategii anti-tumorale care sa tinteasca celulele tumorale, cele stromale sau pe ambele. Celulele crescute si multiplicare *in vitro*, sunt expuse unor presiuni de mediu diferite de cele la care sunt supuse atunci cand sunt intr-un tesut, si in consecinta, structura si abilitatile lor de functionare si proliferare sunt diferite. Cultura 3D modeleaza in mod controlat configuratia naturala, iar functiile celulelor constituate ale tesutului tumoral sunt diferite de cele ale celulelor cultivate in sistem 2D, utilizate conventional in prezent pentru evaluarea unor compusi cu activitate anti-tumorală.

Au fost descrise mai multe procedee de obtinere a sistemului de cultura 3D in alte tipuri de tumori. Jaganathan si colaboratorii (Jaganathan H, Gage J, Leonard F, Srinivasan S, Souza GR, Dave B, Godin B. Three-dimensional in vitro co-culture model of breast tumor using magnetic levitation. Sci Rep. 2014;4:6468. doi: 10.1038/srep06468) au testat un sistem de cultura 3D, fara scaffold, menit sa mimeze cat mai bine tumorile mamare heterogene. Celulele tumorale au fost co-cultivate cu fibroblastele si apoi au fost supuse levitatiei magnetice care conduce la formarea unor structuri tridimensionale (3D) asemanatoare cu tesuturile *in vivo*. Desi modelul tridimensional propus pentru cancerul mamar are avantajele ca se pot forma modele tumorale de mari dimensiuni in 24 de ore (milimetri in diametru), cu compozitie si densitate controlata, imitand micromediul tumoral si permitand testare eficientei unor medicamente, totusi, s-a aratat ca levitatie magnetica induce o serie de modificari la nivelurile celulelor expuse (altereaza metabolismul energetic, promoveaza diferentierea, etc).

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau" Dr. Mihai Stăniș	Institutul de Fiziologie Conf. Dr. Carmen Urban	Institutul de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu" Acad. Maya Simionescu	Institutul Oncologic "Prof. Dr. Alexandru Trăstăreanu" Dr. Lidia Anca Katanu
--	--	---	--

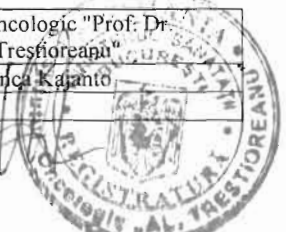
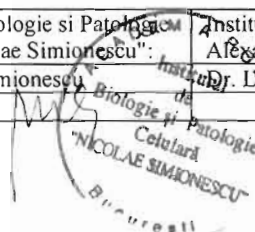
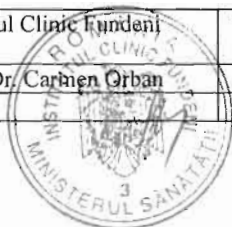
Intr-un alt studiu Ekert si colaboratorii (Jason E. Ekert, Kjell Johnson, Brandy Strake, Jose Pardinias, Stephen Jarantow, Robert Perkinson, David C. Colter Three-Dimensional Lung Tumor Microenvironment Modulates Therapeutic Compound Responsiveness In Vitro – Implication for Drug Development. PLoS One. 2014 Mar 17;9(3):e92248. doi: 10.1371/journal.pone.0092248) au propus un model de cultura 3D pentru cancerul pulmonar, utilizand mai multe linii de celule tumorale pulmonare. Acest model presupune cultivarea celulelor tumorale pulmonare in placi de cultura cu aderenta scazuta (Ultra Low Adherence), cu baza in forma de "U". Formarea sferelor a fost observata, in functie de linia celulara utilizata, la 24 - 72 de ore de la incubare. Acest studiu a avut ca scop studierea diferentelor fenotipice si functionale dintre celulele tumorale pulmonare crescute in monostrat 2D comparativ cu celulele crescute sub forma de sfere 3D, precum si evaluarea raspunsului la tratamentul cu inhibitori de EGFR si cMET (Erlotinib, Crizotinib, Cetuximab [Erbix) si Onartuzumab [MetMab]). Desi, acest studiu a aratat ca celulele cultivate in sistem 3D prezinta diferente morfologice, functionale si un raspuns alterat la tratament si factori de crestere fata de celulele cultivate in sistem 2D, acest sistem nu reuseste sa mimeze suficient micromediul tumoral intrucat la generarea sferelor au fost utilizate numai celule tumorale provenite din linii celulare fara sa se utilizeze celule stromale care, asa cum a fost demonstrat in numeroase studii au un rol esential in micromediul tumoral.

Recent, intr-un studiu publicat de Yu Takahashi si colaboratorii (Yu Takahashi, Yuji Hori, Tomohisa Yamamoto, Toshiki Urashima, Yasunori Ohara and Hideo Tanaka. 3D spheroid cultures improve the metabolic gene expression profiles of HepaRG cells Biosci Rep. 2015 May 7;35(3). pii: e00208. doi: 10.1042/BSR20150034) a fost descrisa pentru prima data cultivarea celulelor hepatice intr-un sistem 3D. Acest studiu a avut ca scop obtinerea unui sistem simplu de cultura 3D, care sa nu implice utilizarea de biomateriale si in care functiile hepatice specifice sa fie cat mai reproduse, astfel incat sa poata fi utilizat in screening-ul de noi compusi terapeutici sau in teste functionale si farmacologice. Pentru realizarea acestui sistem au fost utilizate doua linii celulare tumorale hepatice (HepaRG si HepG2) care au fost cultivate intr-un sistem de cultivare in picatura GravityPLUS systems (Inphero). Cultivarea celulelor sub forma de sfere a dus la cresterea secretiei de apolipoprotein B si albumina (considerata un marker al functiei hepatic), comparativ cu sistemul de cultura 2D. De asemenea, s-a observat ca expresia genelor implicate in metabolismul glucidelor, medicamentelor si lipidelor a crescut semnificativ in sferele HepaRG. Cu toate ca acest model a demonstrat o imbunatatire a functiilor caracteristice celulelor hepatice atunci cand au fost cultivate in sistem 3D, *in vivo* ficatul este format din mai multe tipuri de celule, iar co-cultivarea in sistem 3D a celulelor tumorale impreuna cu alte tipuri de celule hepatice ar permite o mai buna reprezentare *in vitro* a functiilor hepatic.

In brevet US9334473 B2, autorii propun pentru crearea unor sisteme de cultura 3D utilizarea unei matrici formata dintr-un component absorbent rigid (de regula din fibra de sticla), iar in unele cazuri includ si un gel. Utilizarea unui astfel de sistem pentru crearea unor matrici extracelulare poate induce anumite modificari in celulele tumorale afectand proliferarea si diferentierea celulara, si nu substituie prezenta celulelor stromale si a micromediului tumoral.

In brevetul nr.US 2013/0295578 AI, Sempere si colaboratorii au propus o metoda de screening pentru rezistenta la medicamente in tesut tumoral ex vivo care implica utilizarea un sistem de culturi celulare 3D ce mimeaza micromediul tumoral. In acest scop, autorii propun cultivarea celulelor obtinute din biopsie in Matrigel 3% utilizat cu scopul de a mima matricea extracelulara, cu sau fara alte componente de tip colagen I, colagen IV, laminina si fibronectina. Totusi, modificarea micromediului celulelor din tumora prin plasarea lor directa in Matrigel 3%, cu sau fara alte componente, fara o perioada de

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolae"	Institutul Clinic Fundeni	Institutul de Biologie si Patologie Celulara "Nicolae Simionescu": Acad. Maya Simionescu	Institutul Oncologic "Prof. Dr. Alexandru Trestioreanu" Dr. Lydia-Anca Kajanto
Dr. Mihai Stoian	Conf. Dr. Carmen Orban		



acomodare, poate determina modificari morfologice si functionale la nivelul celulelor din sistemul 3D care pot influenta rezultatul testelor de rezistenta la citostatice.

Problema pe care inventia actuala o rezolva este stabilirea unei metode de realizare a chemogramei personalizate utilizata la investigarea unor noi medicamente anti-tumorale specifice pentru celulele tumorale, pentru celulele stromale sau pentru ambele, pe baza unor sisteme organotipice de pancreas. In final inventia aduce beneficii in managementul clinic pacientului cu cancer pancreatic. Sistemul organotipic PCI-35/PSC, pe care inventia actuala il propune, este potrivit pentru investigarea sensibilitatii terapeutice la medicamente, surmontand dificultatile create de modelele tipice conventionale 2D, care nu reproduc micromediul existent *in vivo*, avand astfel o putere limitata de predictie in eficacitatea clinica, precum si reducerea costurilor si a timpului necesare in testarile pe modele animale si in studiile clinice.

Solutia pe care o propune prezenta inventie este stabilirea unei strategii de obtinere a unui model de sistem organotipic de pancreas prin co-cultivarea in matrita 3D, sub forma de sferoizi a celulelor pancreatice din tumora pacientului impreuna cu celule stromale (denumite PSC), separate in cadrul protocolului de izolare al insulelor pancreatice pentru transpalant, pentru imbunatatirea investigarii eficientei strategiilor antitumorale si realizarea chemogramei personalizate.

Metoda conform inventiei permite obtinerea unei culturi 3D de pancreas folosind celule ADPK co-cultivate cu PSC in sisteme polimerice recreand caracteristici reprezentative ale niselor tumorale ale tumorilor *in vivo*, acest sistem fiind util pentru realizarea chemogramei personalizate a pacientului oncologic.

Avantajul metodei de stabilire a strategiei de obtinere a unei chemograme personalizate **pe baza unui sistem organotipic de pancreas consta in faptul ca** sistemului de co-cultura pancreatica 3D este superior in mimarea cresterii tumorii si a biologiei ei. Reproducand interactiunea fizica si de activare intr-un tesut tumoral, modelul organotipic tumoral 3D ofera informatii precise pentru selectia compusului si a tintei, reducand astfel raspunsul slab sau esecul chimioterapiei *in vivo* in stadiile tarzii. Sistem organotipic de pancreas permite *screening*-ul si analiza simultana a unui numar mare de noi compusi cu scopul de a-i identifica pe cei eficienti sau pentru explorarea interactiunilor intra-tumorale si descoperirea tintelor si validarea lor. Nu in ultimul rand, modelul celular 3D ofera posibilitatea de a dezvolta o "chemograma" personalizata care creaza profilul eficacitatii medicamentelor asupra tumorii proprii fiecarui pacient cu cancer pancreatic.

Se prezinta in continuare 4 exemple ale inventiei in legatura cu figurile:

Fig. 1. Morfologia PSC obtinute din pancreas, celule fibroblastice, applatizate, cu forma poligonala cu picaturi lipidice in citoplasma, pasajul 2, 48 de ore in cultura (obiectiv 20x)

Fig. 2. Analiza celulelor PSC prin citometrie in flux; celulele prezinta CD90 (Thy-1) si CD105 (endoglin) - dot-plot stanga sus si CD44 - dot-plot dreapta sus.

Fig. 3. Dinamica formarii sferoizilor timp de 1-7 zile in cultura (contrast de faza, obiectiv 10x).

Fig. 4. Analiza celulelor din co-cultura PCI-35/PSC in sistem 2D (A, 400X) si 3D (B, 400X; C, 100X, dupa separarea din sferoid) prin imunofluorescenta pentru alfa-SMA (1) si beta-catenina (2).

Fig.5. Nivelurile de expresie a genelor GFAP, Nestin, BMP4, Notch1, SHH, WNT1 si vimentin in celule stelate pancreatice cultivate in sistem 2D (Rosu – PSC 2D), 3D (Verde – PSC 3D) si co-cultura PCI-35/PSC (albastru). Analiza s-a realizat comparativ cu linia de celule tumorale PCI-35 (cultura 2D).

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolai"	Institutul Clinic Fundeni	Institutul de Biologie si Patologie Celulara "Nicolae Simionescu"	Institutul Oncologic "Prof. Dr. Alexandru Trestioreanu"
Dr. Mihail Stoian	Conf. Dr. Carmen Orban	Acad. Maya Simionescu	Dr. Lidia Anca Kajanto

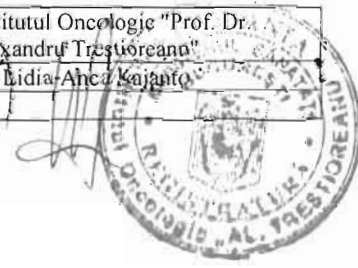
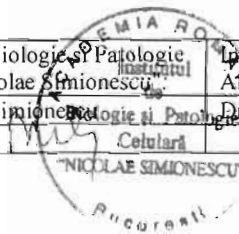
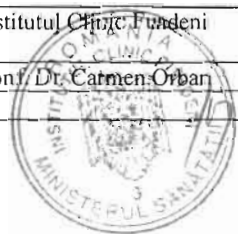


Fig. 6. Nivelurile de expresie a genelor GFAP, Nestin comparativ cu linia de celule stem neurale STON. Neurosfere celule stem neurale NECU - caramiziu; co-cultura PCI-35/PSC - albastru; PSC 2D - rosu, PSC 3D - verde.

Fig. 7. Analiza viabilitatii co-culturi de PCI-35/PSC in sistem 3D si 2D. A) Control co-cultura 3D tratata cu tampon fosfat salin; B) co-cultura 3D tratata cu 10 μ M 5-FU; C) Control co-cultura 2D tratata cu tampon fosfat salin; D) co-cultura 2D tratata cu 10 μ M 5-FU. Imaginile au fost colectate folosind un obiectiv de 10x.

Fig. 8. Cuantificarea toxicitatii induse de citostaticelor analizate - stabilirea chemogramei.

Exemplul 1: *Obtinerea culturii organotipice de pancreas*

In experimentele noastre au fost utilizate celulele PCI-35, obtinute dintr-un adenocarcinom de pancreas de catre grupul profesorului A Horii, Japonia (*Hitoshi Sekine; et al., Biochemical and biophysical research communications 2012;429(3-4):214-9*) si celule stromale izolate din pancreas normal denumite PSC.

Obtinerea celulelor stromale/stem mezenchimale/stelate din pancreas s-a realizat in cadrul operatiei de izolare a insulelor pancreatice de la donor in moarte clinica de catre o echipa formata din specialisti din Institutului Clinic Fundeni si Institutul de Virusologie. Izolarea insulelor pancreatice a fost efectuata in cadrul laboratorului GMP al Institutului Clinic Fundeni, in conformitate cu legislatia romaneasca privind terapia cu celule. Insulele au fost izolate din tesutul exocrin si conjunctiv inconjurator utilizand metoda Ricordi modificata, prin digestie cu colagenaza. Insulele pancreatice, impreuna cu resturile de tesut acinar si celule mezenchimale, au fost mentinute in cultura in mediu CMRL si 10% BSA. La 24 de ore, celulele in suspensie (respectiv insulele) au fost recultivate in recipiente noi, iar celulele aderente (celulele stem mezenchimale/stelate) au fost mentinute in alfaMEM suplimentat cu 10% ser fetal bovin, cu schimbarea mediului la fiecare 2 zile pana la obtinerea monostratului celular. Analiza fenotipica a PSC s-a realizat prin citometrie in flux (Beckman-Coulter Epics XL). Celulele au fost tripsinizate, spalate cu o solutie de TFS rece/ BSA 0,1% si incubate o ora cu anticorpi specifici (AbCam, Millipore) diluati in TFS conform recomandarilor producatorului. Rezultatele au fost evaluate in doua experimente individuale folosind programul FlowJo (Tree star, Inc.). Spre deosebire de celulele stem mezenchimale, monostratul de celule aderente pancreatice au prezentat o forma fibroblastica, plata, poligonala cu picaturi mici lipidice in citoplasma (Fig. 1). Pe de alta parte, celulele PSC au prezentat markeri de celule stem cum sunt CD90 (Thy-1) si CD105 (endoglin). De asemenea, 99,8% din populatia PSC au prezentat CD44, o glicoproteina de suprafata implicata in interactiile intercelulare, adeziune celulara si migrare, si doar, o mica fractie din populatie a prezentat CD24, o molecula de adeziune celulara (Fig. 2).

Cultura 3D a fost obtinuta in micro-placi speciale. Matritele pentru turnarea micro-placilor 3D[®] au fost spalate cu apa distilata si sterilizate prin autoclavare timp de 30 de minute in ciclu uscat. Ig de agaroză pura, sterilizata prin autoclavare timp de 30 de minute in ciclu uscat, a fost fiarta in 50 mL de solutie salina sterila [0,9% (w/v) NaCl], in conditii aseptice, in cuptorul cu microunde pana la dizolvare totala, dupa care a fost lasata sa se raceasca pana la 60 - 70 °C. Micro-placile 3D[®] au fost preparate prin pipetarea a 330 μ L de agaroză topita in micro-matruta, evitandu-se formarea bulelor de aer in timpul agitarii sau pipetarii agarozei. Micro-placile 3D[®] au fost transferate in placi cu 24 de godeuri pentru culturi celulare. Micro-placile 3D[®] astfel obtinute au fost echilibrate prin 3 spalari cu 1 mL/godeu de mediu de cultura, timp de 15 minute, la temperatura camerei. Celulele au fost tripsinizate, numarate si preparate suspensii celulare cu diferite concentratii de celule, in scopul obtinerii unor sferoizi cu diametrul de 100 μ m. Mediul de cultura din jurul si din interiorul micro-placilor 3D[®] a fost inlaturat si s-

Institutul de Virusologie "S Stefan S. Nicolau" Dr. Mihai Stancu	Institutul Clinic Fundeni Conf. Dr. Carmen Orban	Institutul de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu" Acad. Maya Simionescu de	Institutul Oncologic "Prof. Dr. Alexandru Trestioreanu" Dr. Lidia Anca Kajanto
--	---	--	--

au pipetat cate 75 μL de suspensie celulara in interiorul micro-placilor 3D[®]. Placile 3D[®] au fost lasate in repaos timp de 10 minute pentru repartizarea celulelor in micro-godeuri, dupa care s-a adaugat cate 1 mL de mediu de cultura DMEM suplimentat cu 10% ser fetal bovin in fiecare godeu al placi cu 24 godeuri continuand sistemul de cultura 3D. Placile de 24 de godeuri au fost incubate la 37 °C, in atmosfera umeda cu 5% CO₂. Formarea sferelor a fost urmarita zilnic la microscopul inversat Carl Zeiss Microscop GmbH si fotografiate utilizand camera Axio CamMR (Zeiss). Cuntificarea marimii sferelor s-a realizat utilizand softul Zen 2011 SP1x64.

Exemplul 2: Analiza morfologiei, proliferarii si viabilitatii celulelor de ADKP in sistem 3D.

Pattern-ul de crestere si viabilitatea celulelor in micromediul de cultura 3D au fost urmarite in dinamica pe parcursul a 7 zile (Fig. 3). S-a observat ca PCI-35 nu a format sferoizi perfect rotunzi, celulele fiind imprastiate, iar dimensiunea conglomeratului celular fiind mai mare (de exemplu, dimensiunea medie a sferoidului la 24 de ore era de aproximativ 250 μm /12000 celule insamantate in micro-placa). In schimb, sferoizii formati de PSC au fost mai mici, mai uniformi si mai rotunzi, de aproximativ 180 μm /12000 celule insamantate initial in micro-placa. Prin co-cultivarea PCI-35 cu PSC s-au obtinut sferoizi, rotunzi, de dimensiuni medii (aproximativ 220 μm). Morfologia sferoizilor in sistemul 3D pare a fi dependenta de tipul de celula: in timp ce PCI-35 nu formeaza sferoizi, iar celulele agregate in clustere din prima zi de cultura, celulele PSC formeaza sferoizi.

Analiza de rutina a viabilitatii celulelor in sistemele de cultura 3D este dificila datorita limitarilor legate de difuzia si transportul in structurile celulare complexe 3D. Pentru a cuantifica viabilitatea celulara s-au utilizat comparativ 2 metode: testul de excludere a albastrului de tripan, evaluat folosind microscopie conventionala, si coloratia cu fluorescein diacetat (FDA)/iodura de propidium (PI) in microscopie de fluorescenta. Determinarea viabilitatii celulare in sistemele 3D utilizand albastru de tripan a inclus un tratament prealabil de digestie enzimatica a sferelor cu solutie de tripsina-EDTA (0,25%, Gibco), iar suspensia monocelulara obtinuta a fost examinata prin procedura clasica folosind camera de numarare Burkert-Turk. In cazul utilizarii coloratiei cu FDA/PI in microscopie de fluorescenta, sistemele 3D au fost evaluate ca atare. Prin colorare cu fluorescein diacetat (celulele apar colorate in verde) au fost puse in evidenta celulele vii si cu iodura de propidium (celulele apar colorate in rosu) au fost puse in evidenta celulele moarte.

Rata de dublare a celulelor in sferoizi, observata in microscopie de fluorescenta si prin coloratie cu albastru de tripan, a fost asemanatoare. Diferenta intre rezultatele obtinute prin cele 2 metode a fost de mai putin de 10%, aspect cauzat probabil de principiile diferite de estimare a viabilitatii celulare in fiecare din aceste metode. Rezultatele noastre arata ca, desi estimarea precisa a viabilitatii celulelor in culturile 3D este o operatie dificila, coloratia FDA/PI poate fi o solutie rezonabila pentru analiza de rutina a viabilitatii celulare in acest caz. Astfel, putem spune ca PCI-35 si PSC sunt capabile sa prolifereze in interiorul sferoidului co-cultura si dupa 7 zile.

Aceste rezultate arata ca celulele PCI-35, celulele PSC si co-cultura lor sunt capabile sa supravietuiasca si sa prolifereze in sferoizii care mimeaza tesutul pancreatic. Spre deosebire de culturile de celule 2D, care au o rata de dublare de 24 de ore, in sferoizi celulele au proliferat cu o rata relativ scazuta, calculandu-se un timp de dublare de aproximativ 8 zile. Sferoizii multicelulari reprezinta analogi tridimensionali ai tesutului ceea ce ofera oportunitatea testarii de medicamente *in vitro*, deoarece mentin parametrii fiziologici critici prezenti *in vivo*, incluzand arhitectura multicelulara complexa, matricea extracelulara, si barierele de penetrare a nutrientilor si medicamentelor. Functiile si raspunsul celulelor la nivel tisular sunt adesea pierdute in culturile conventionale 2D limitand capacitatea predictiva a

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau" Dr. Miral Stoian	Institutul Clinic Fundeni Conf. Dr. Carmea Orban	Institutul de Biologie si Patologie Celulara "Nicolae Simionescu" Acad. Maya Simionescu	Institutul Oncologic "Prof. Dr. Alexandru Trestoreanu" de Dr. Lidia-Anca Kajanto
--	---	---	---

metodei. De aceea este necesara dezvoltarea tehnicilor / sistemelor de cultura 3D, bine caracterizate, simple, reproductibile si care sa fie similare fiziologiei tesuturilor.

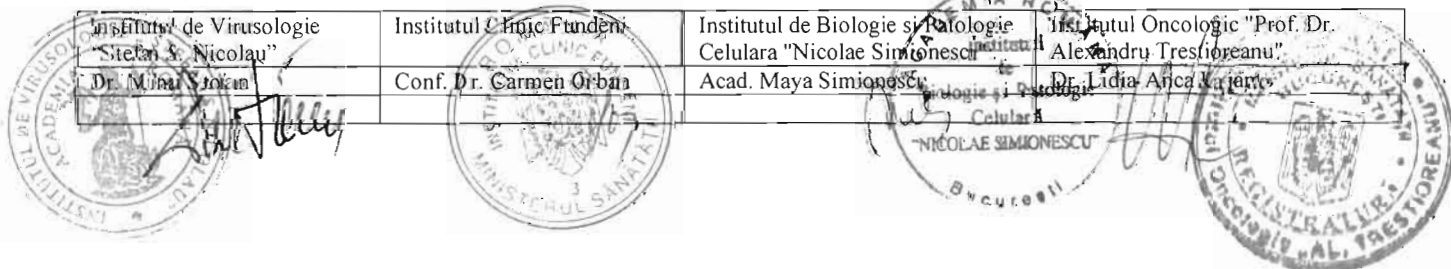
Exemplul 3: Analiza fenotipica comparativa a sistemelor de co-cultura 2D si 3D

Pentru analiza comparativa a expresiei alfa-SMA si beta-catenina in culturile 2D si 3D, sferele si celulele individuale din sistemele 3D de co-cultura ADKP/PSC, respectiv 2D, au fost recoltate si fixate in etanol 70%. Sferele si celulele au fost spalate cu solutie rece de TFS si BSA 0,1% si incubate o ora cu anticorpi monoclonali anti-SMA alfa (Santa Cruz, SC-53142) sau anticorpi monoclonali anti beta-catenina (Santa Cruz, SC-59737). Ulterior, probele au fost incubate cu un anticorp secundar anti-mouse cuplat cu FITC (Light DIAGNOSTIC Chemicon), iar analiza comparativa a cele doua sisteme a fost realizata pe imaginile capturate folosind Leica DM IL Fluo cu aplicatia Leica Suite.

Analizand prin imunofluorescenta expresia alfa-SMA in co-culturile 3D comparativ cu culturile 2D s-a putut observa expresia mult mai redusa a acestei proteine in culturile 2D comparativ cu nivelul de expresie in sferoizii obtinuti in culturile 3D (Fig. 4). Acest lucru indica activarea celulelor PSC in co-cultura 3D, fapt explicabil prin hipoxia descrisa in astfel de sferoizi. Sistemele noastre de co-cultura 3D par a fi capabile sa imite starea hipoxica din centrul sferelor si activarea PSC prin cresterea nivelului expresiei α -SMA evidenta, aceasta fiind o caracteristica tipica in cresterea tumorala si invazivitate. Hipoxia este un proces important ce poate afecta functionalitatea PSC in sferoizii cultivati 3D, dar si in tumorile pancreatice cunoscute ca fiind hipovasculare si cu celule tumorale care prolifereaza eficient in conditii hipoxice. Sistemul nostru organotipic de pancreas (co-cultura 3D) imita mult mai bine decat o co-cultura 2D interactiunile intra-tumorale si ar putea fi mai potrivit pentru investigarea mecanismelor care favorizeaza cresterea tumorala si, de asemenea, pentru testarea de medicamente anti-tumorale mai eficiente.

Caracterizarea PSC initiate din pancreas uman si a co-culturii cu celule tumorale (PCI-35) a constat in evaluarea expresiei genelor GFAP (glial fibrillary acidic protein) si nestina, precum si a altor gene, cum ar fi: BMP4 (bone morphogenetic protein 4), Notch1, SHH (Sonic HedgeHog), WNT1 (Wingless-Type MMTV Integration Site Family Member 1) si vimentin, prin RT-PCR semicantitativ. Pentru aceasta, celulele cultivate in sistem 2D si 3D au fost colectate si s-a extras ARN total cu Trizol (Invitrogen, USA) conform indicatiilor producatorului. ARN-ul total (2 μ g) a fost revers-transcris folosind kit-ul High Capacity cDNA Reverse Transcription cu inhibitori pentru RN-aze (Applied Biosystems). O cantitate de 50 ng cDNA a fost supus reactiei de real time PCR (qPCR) pentru expresia genelor GFAP, nestina, BMP4, Notch1, SHH, WNT1 si vimentin folosind Taqman Gene Expression Assay conform indicatiilor producatorului (Applied Biosystems). Ca si control endogen s-a folosit beta-actina umana. Fiecare experiment a fost lucrat in triplicat. Pentru a compara nivelul relativ de expresie s-a utilizat metoda $\Delta\Delta C_T$. Comparativ cu linia de celule tumorale PCI-35, celulele PSC crescute in sistem 2D au prezentat o expresie crescuta a ARNm GFAP si nestin. Expresia acestor markeri a fost mai scazuta in PSC mentinute in sistemul 3D si mult scazuta in co-cultura 3D PCI-35/PSC (Fig. 5). De remarcat a fost faptul ca atat expresia GFAP cat si a nestinei a fost mult mai mica comparativ cu celulele stem neurale tumorale NECU si STON (care cresc normal sub forma de neurosfere) (Fig. 6). Expresia scazuta a acestor markeri in sistemul co-cultura 3D PCI-35/PSC ar putea fi explicata prin modificarile progresive ale expresiei nestinei si GFAP care au loc in timpul etapelor-cheie in diferentierea tipurilor celulare. De aceea, presupunem ca diferentierea ar putea fi indusa sub influenta semnalelor si factorilor de crestere produsi in micromediu de celulele APKD.

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau" Dr. Mihail Stokan	Institutul Clinic Fundeni Conf. Dr. Carmen Orban	Institutul de Biologie si Patologie Celulara "Nicolae Simionescu" Acad. Maya Simionescu	Institutul Oncologic "Prof. Dr. Alexandru Trestioreanu" Dr. Lidia Anca Karjane
---	---	---	--



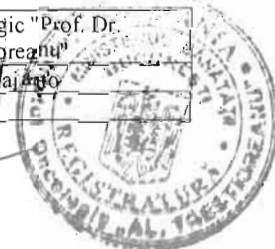
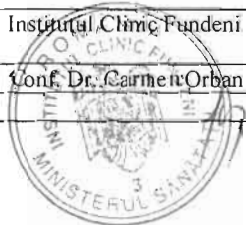
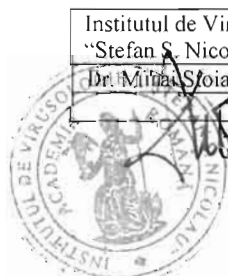
Exemplul 4: Analiza calitativa (IF) si cantitativa (CellTiter-Glo®) a toxicitatii induse de citostatice

Pentru analiza calitativa a toxicitatii induse de citostatice, celulele cultivate in sistem 2D si in sistem 3D au fost mentinute in cultura 7 zile si apoi, tratate cu 10 μM 5-Fluorouracil (5-FU; Teva Parenteral Medicines) diluat in TFS (Invitrogen) exact inainte de folosire, sau cu un amestec 1:1 de doua extracte hidro-alcoolice obtinute din catina rosie (*Tamarix gallica*) si armurariu (*Sylibum marianum*). Dupa 24 de ore, s-a evaluat raspunsul la tratament in culturile 3D versus culturile 2D folosind 10 μL din solutia stoc cu concentratia de 1 mg/mL FDA/PI (Fig. 7). S-a observat ca in conditiile culturii 3D celulele PCI-35 au fost mai rezistente la 10 μM 5-FU. Rezultatele sunt datorate integritatii sferoizilor 3D, fiind mult mai dificil pentru acesti compusi sa difuzeze si sa penetreze in centrul masei celulare. Mai mult, 5-FU un blocant al proliferarii celulare, tinteste celulele aflate in proliferare, si nu afecteaza celulele dormande din sferoid.

Pentru analiza cantitativa a toxicitatii induse de citostatice, culturile de celule in sistem 3D au fost obtinute in placi HDP1096 Perfecta3D® in picatura suspendata cu 96 de godeuri (3D Biomatrix, SUA). In acest scop au fost create sisteme de cultura 3D formate din celule tumorale PCI-35 si sisteme 3D de co-cultura PCI35/HpaSteC in raport de 1:1 in mediu de cultura DMEM suplimentat cu 10% ser fetal bovin. Placile HDP1096 Perfecta3D® in picatura suspendata cu 96 de godeuri (3D Biomatrix, SUA) reprezinta un ansamblu format dintr-o tava inferioara, o placa intermediara cu orificii pentru formarea picaturilor suspendate si capac. Placa intermediara si tava inferioara sunt prevazute pe marginea periferica cu rezervoare, separate de ecrane deflectoare in sectiuni, acestea putand fi umplute cu apa distilata sau agaroză 0,5 – 1% pentru a evita evaporarea mediului de cultura din picaturile suspendate in cazul unor incubari indelungate. Pentru obtinerea sistemelor de cultura 3D, celulele au fost tripsinizate, numarate si preparate suspensii celulare cu o densitate de 5000 de celule / 40 μL . "Picaturile suspendate" au fost obtinute prin pipetarea a cate 40 μL din suspensia celulara per godeu/orificiu in placa intermediara. In rezervoarele situate pe marginea periferica a placii si a tavii a fost adaugata apa distilata pentru a evita evaporarea mediului de cultura pe perioada incubarii. Placile au fost incubate la 37 °C, in atmosfera umeda cu 5% CO₂ pentru a permite formarea sferelor. Dupa 72 de ore, sferele formate au fost transferate prin fixarea placii intermediare pe placi albe de 96 de godeuri (NUNC, SUA) si centrifugare timp de 5 minute la 300 x g. Analiza toxicitatii citostaticelor in sistem 3D s-a realizat comparativ cu sistemele de cultura 2D. Pentru sistemul 2D, celulele au fost tripsinizate, numarate si insamantate in placi albe de 96 de godeuri (NUNC, SUA) la o densitate de 5000 de celule per godeu. Placile au fost incubate la 37 °C, in atmosfera umeda cu 5% CO₂ timp de 24 de ore.

Pentru a evalua eficienta utilizarii sistemului de co-cultura 3D elaborat in determinarea citotoxicitatii/rezistentei unor medicamente utilizate in tratamentul ADKP, sistemele de cultura 3D, cit si cele 2D, au fost tratate cu 5-fluorouracil, gemcitabina, oxaliplatin, cisplatin si sorafenib. In acest scop, medicamentele au fost supuse unor dilutii seriale binare, concentratia finala testata variind intre 2,44 μM si 5 mM pentru 5-fluorouracil, gemcitabina si oxaliplatin, si intre 0,05 – 100 μM pentru cisplatin si sorafenib. Sistemele de cultura 2D si 3D au fost supuse tratamentului timp de 72 de ore la 37 °C, in atmosfera umeda cu 5% CO₂. Viabilitatea celulara a fost determinata folosind kitul CellTiter-Glo® (Promega, G7572). Tamponul CellTiter-Glo® a fost decongelat si echilibrat, impreuna cu substratul CellTiter-Glo® liofilizat, la temperatura camerei inainte de utilizare. Substratul liofilizat a fost reluat in tamponul CellTiter-Glo® si omogenizat prin agitare. Pentru determinarea viabilitatii celulelor cultivate in sisteme de cultura 2D sau 3D si supuse tratamentului cu medicamente antitumorale, in fiecare godeu a fost adaugat un volum egal de reactiv CellTiter-Glo®. Placile au fost incubate la temperatura camerei timp de 10 minute pentru a permite stabilizarea semnalului luminescent. Luminiscenta a fost citita la un

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau"	Institutul Clinic Fundeni	Institutul de Biologie si Patologie Celulara "Nicolae Simionescu"	Institutul Oncologic "Prof. Dr. Alexandru Trestioreanu"
Dr. Mihaela Stoian	Conf. Dr. Carmen Orban	Acad. Maya Simionescu	Dr. Lidia-Anca Kajano



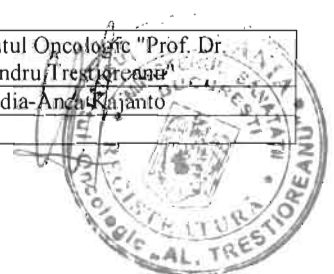
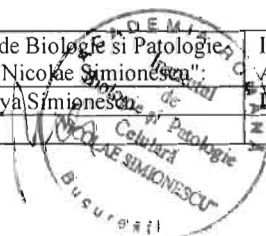
aparatură FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, SUA), iar rezultatele au fost interpretate utilizând soft-ul GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., SUA). Cuantificarea toxicității induse de citostaticele analizate (prezentată în tabelul 1) arată o reducere a sensibilității la medicament în sistemul 3D comparativ cu sistemul 2D demonstrând că integritatea sferelor din sistemele 3D potențează dificultatea de pătrundere a tratamentului (medicamentelor) spre centrul masei de celule într-un țesut tumoral și susține importanța micromediului înconjurător tumoral asupra eficienței chimioterapiei.

Tabel 1. Cuantificarea toxicității induse de citostaticele analizate (IC₅₀).

TIP CULTURA	IC ₅₀ (μM)			
	5- Fluorouracil	Oxaliplatin	Cisplatin	Sorafenib
PCI-35 2D	100,3	62,1	29,87	5,91
PCI-35 3D	373,5	84,75	45,82	9,07
Cocultura* 2D	85,83	38,9	22,27	6,15
Cocultura* 3D	445,1	100,8	59,97	7,021

*Cocultura – co-cultura PCI-35 cu HPaSteC în raport 1:1

Institutul de Virusologie "Sretan S. Nicolau" Dr. Mihai Stoian	Institutul Clinic Fundeni Conf. Dr. Carmen Orban	Institutul de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu" Acad. Maya Simionescu	Institutul Oncologic "Prof. Dr. Alexandru Trestioreanu" Dr. Lidia-Anca Rujanto
--	---	---	--



12.3. REVENDICARE: METODA DE STABILIRE A CHEMOGRAMEI PERSONALIZATE UTILIZATA IN MANAGEMENTUL PACIENTULUI CU CANCER PANCREATIC

Inventia se refera la o metodă de stabilire a chemogramei personalizate utilizata in managementul pacientului cu cancer pancreatic. Metoda conform invenției are urmatoarele etape:

- obținerea celulelor pancreatice si/sau stromale din tumora pacientului
- co-cultivarea in matrita 3D, sub forma de sferoizi a celulelor pancreatice din tumora pacientului impreuna cu celule stromale (denumite PSC), separate in cadrul protocolului de izolare al insulelor pancreatice pentru transplant.
- investigarea eficientei strategiilor antitumorale si realizarea chemogramei personalizate.

Metoda conform invenției permite obtinerea unei culturi 3D de pancreas folosind celule ADPK co-cultivate cu PSC in sisteme polimerice recreand caracteristici reprezentative ale niselor tumorale ale tumorilor *in vivo*, acest sistem fiind util pentru realizarea chemogramei personalizate a pacientului oncologic.

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau"	Institutul Clinic Fundeni	Institutul de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu"	Institutul Oncologic "Prof. Dr. Alexandru Trestioreanu"
Dr. Mihail Stolan	Conf. Dr. Carmen Orban	Acad. Maya Simionescu	Dr. Lidia Anca Kajanto

12.4. DESENE

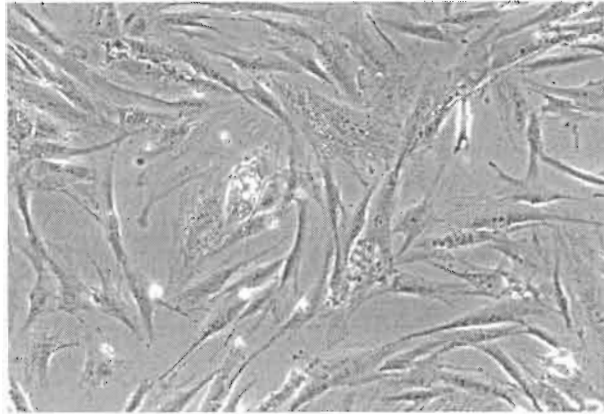
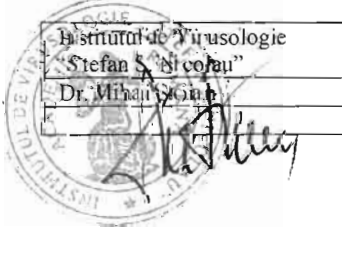

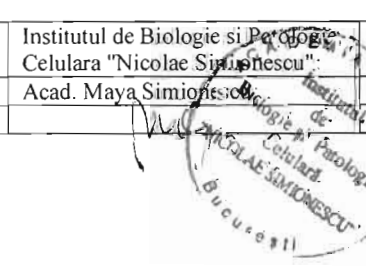
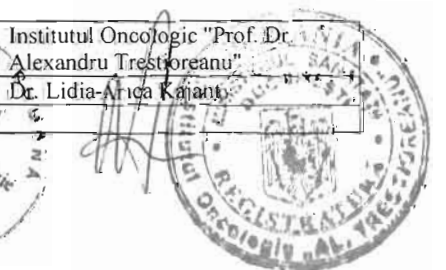


Fig. 1.

<p>Institutul de Virologie "Stefan S. Nicolau" Dr. Mihail G. G. G.</p> 	<p>Institutul Clinic Fundeni Conf. Dr. Carmen Orban</p> 	<p>Institutul de Biologie si Patologie Celulara "Nicolae Simionescu" Acad. Maya Simionescu</p> 	<p>Institutul Oncologic "Prof. Dr. Alexandru Trestioreanu" Dr. Lidia Anca Kajant</p> 
---	---	---	--

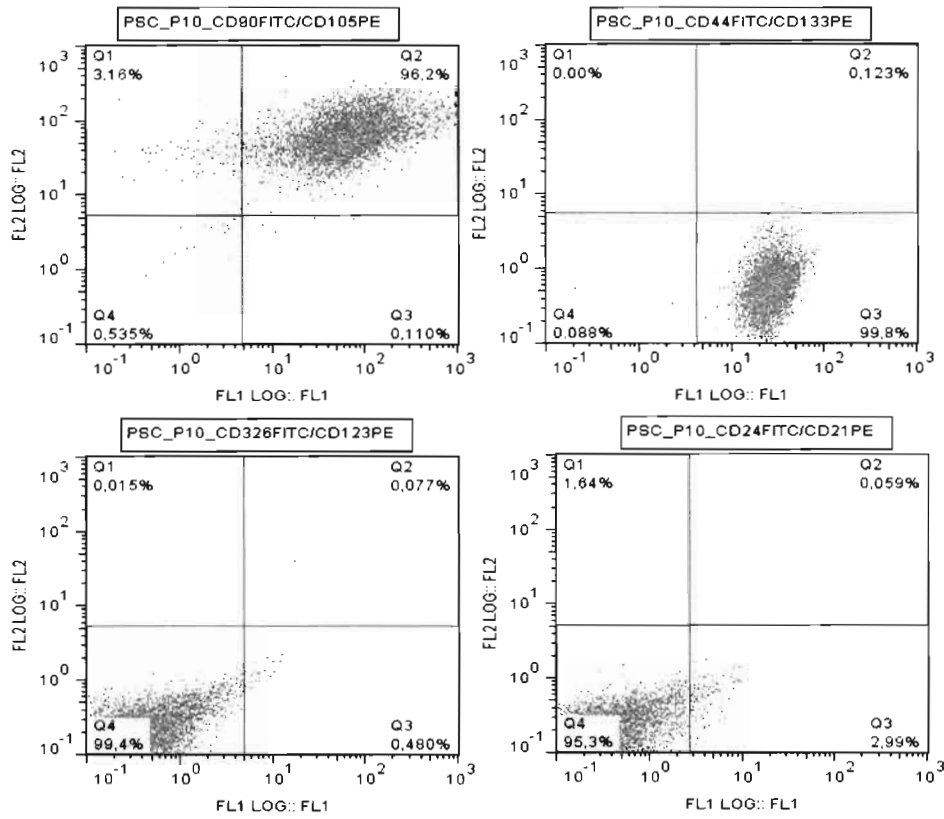


Fig. 2.

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau"	Institutul Clinic Fundeni	Institutul de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu"	Institutul Oncologic "Prof. Dr. Alexandru Trestioreanu"
Dr. Mihai Stoian	Conf. Dr. Carmen Orban	Acad. Maya Simionescu	Dr. Lidia-Anca Karanto

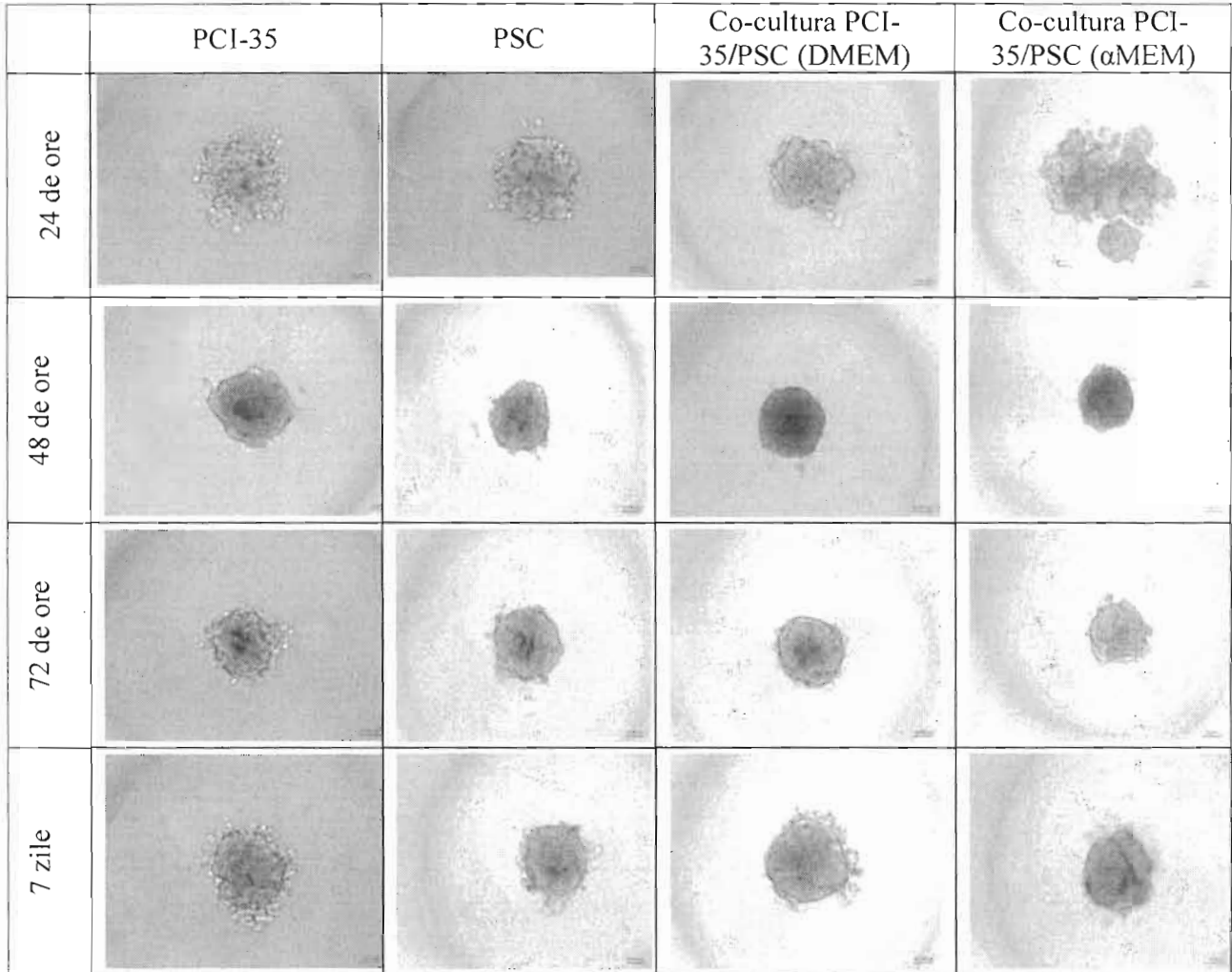
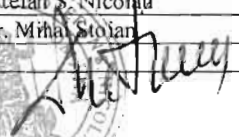
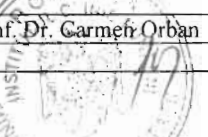
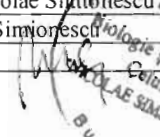

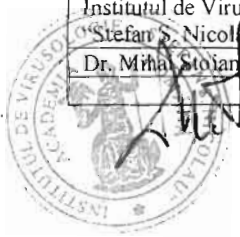

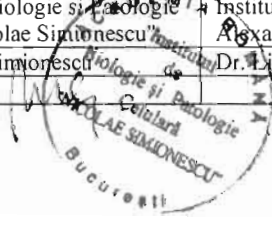



Fig. 3.

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau" Dr. Mihaela Stolan 	Institutul Clinic Fundeni Conf. Dr. Carmela Orban 	Institutul de Biologie si Patologie Celulara "Nicolae Simionescu" Acad. Maya Simionescu 	Institutul Oncologic "Prof. Dr. Alexandru Trestoreanu" Dr. Lidia-Anca Kajano 
---	---	---	---

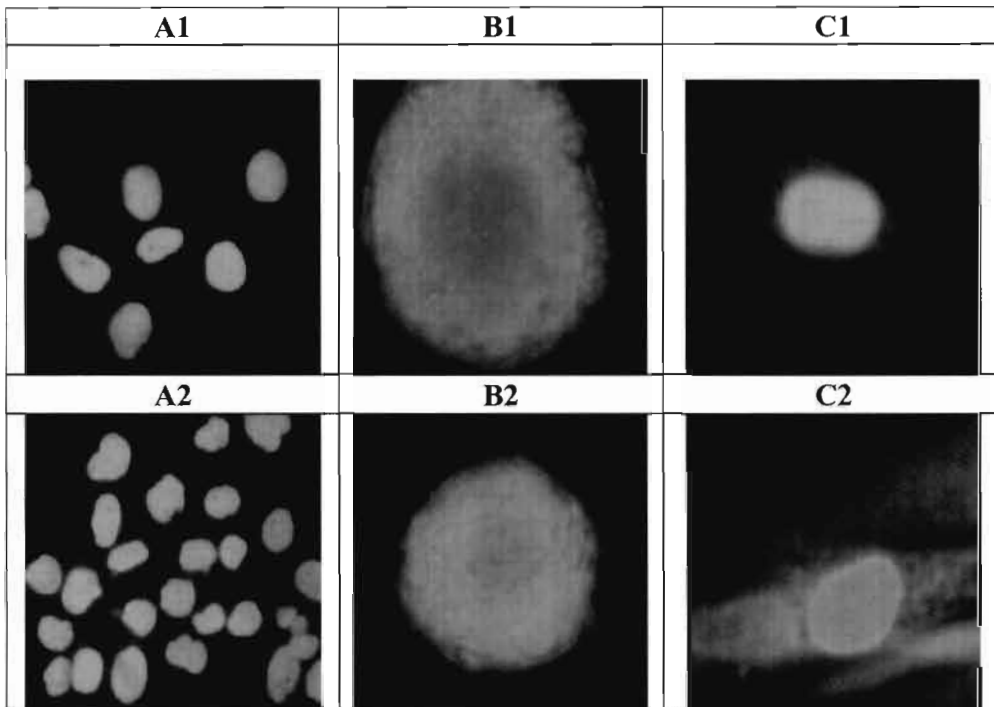
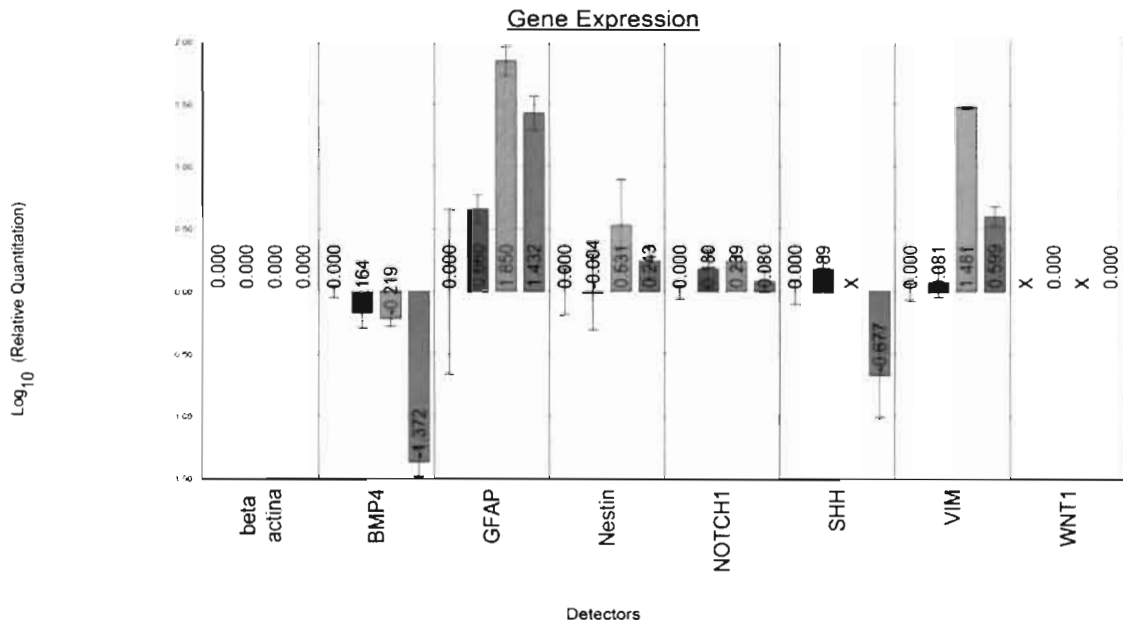


Fig. 4.

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau" Dr. Mihai Stoiar	Institutul Clinic Fundeni Conf. Dr. Carmen Orban	Institutul de Biologie si Patologie Celulara "Nicolae Simionescu" Acad. Maya Simionescu	Institutul Oncologic "Prof. Dr. Alexandru Trestoreanu" Dr. Lidia-Arjca Kajanto
--	---	---	--

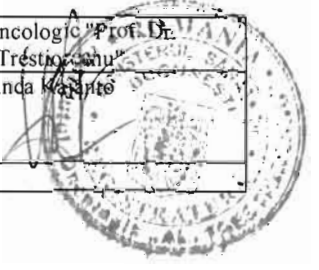
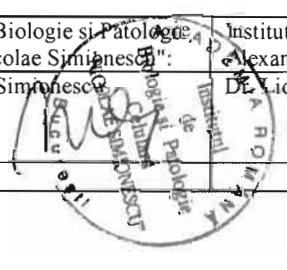
Stamps: Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau", Institutul Clinic Fundeni, Institutul de Biologie si Patologie Celulara "Nicolae Simionescu", Institutul Oncologic "Prof. Dr. Alexandru Trestoreanu", Ministerul Sănătății, România.



Document: 26.11.2014_coclutun_3D_8_gene1.sdm (ddCt Study)

Fig. 5.

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau"	Institutul Clinic Fundeni	Institutul de Biologie si Patologie Celulara "Nicolae Simionescu"	Institutul Oncologic "Prof. Dr. Alexandru Trestioreanu"
Dr. Mihai Stoian	Conf. Dr. Carmen Orban	Acad. Maya Simionescu	Dr. Lidia-Anda Marjito



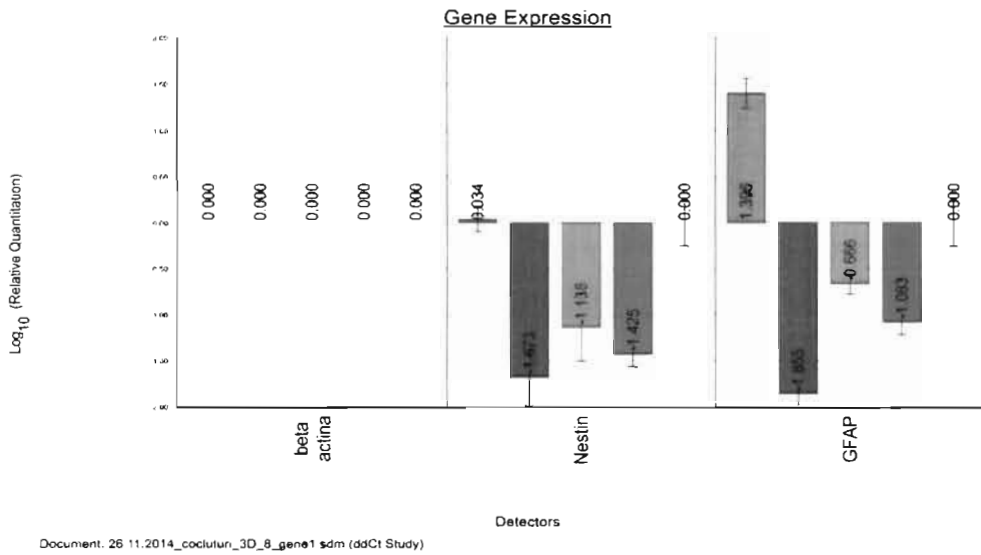
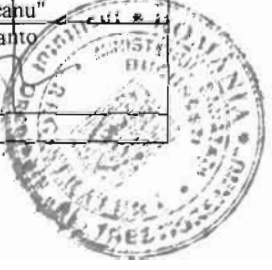
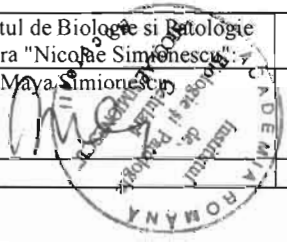
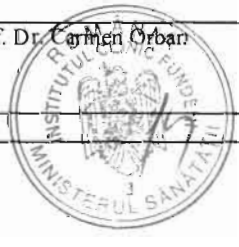
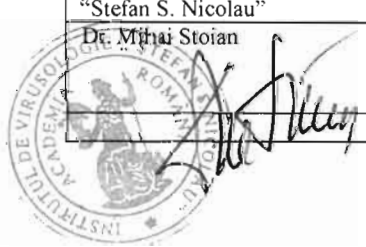


Fig. 6.

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau" Dr. Mihai Stoian	Institutul Clinic Fundeni Conf. Dr. Carmen Orban	Institutul de Biologie si Patologie Celulara "Nicolae Simionescu" Acad. Maya Simionescu	Institutul Oncologic "Prof. Dr. Alexandru Trestoreanu" Dr. Lidia-Anca Kajanto
--	---	---	---



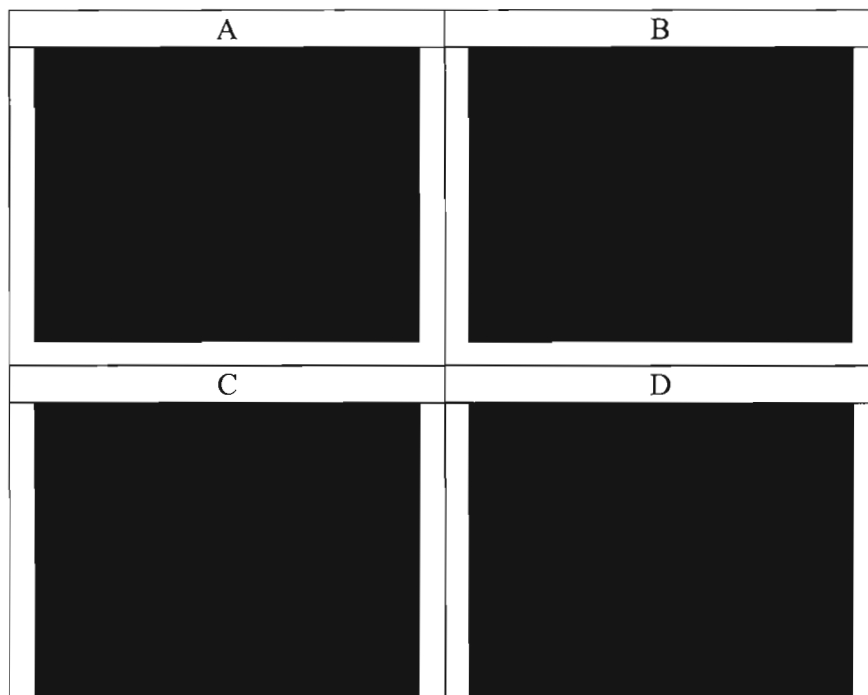
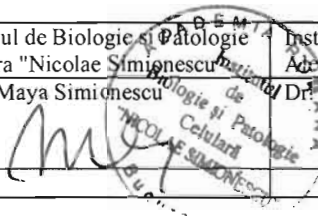


Fig. 7.

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau"	Institutul Clinic Fundeni	Institutul de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu"	Institutul Oncologic "Prof. Dr. Alexandru Trestioreanu"
Dr. Mihai Stoian	Conf. Dr. Carmen Orban	Acad. Maya Simionescu	Dr. Lidia-Anca Kajanto



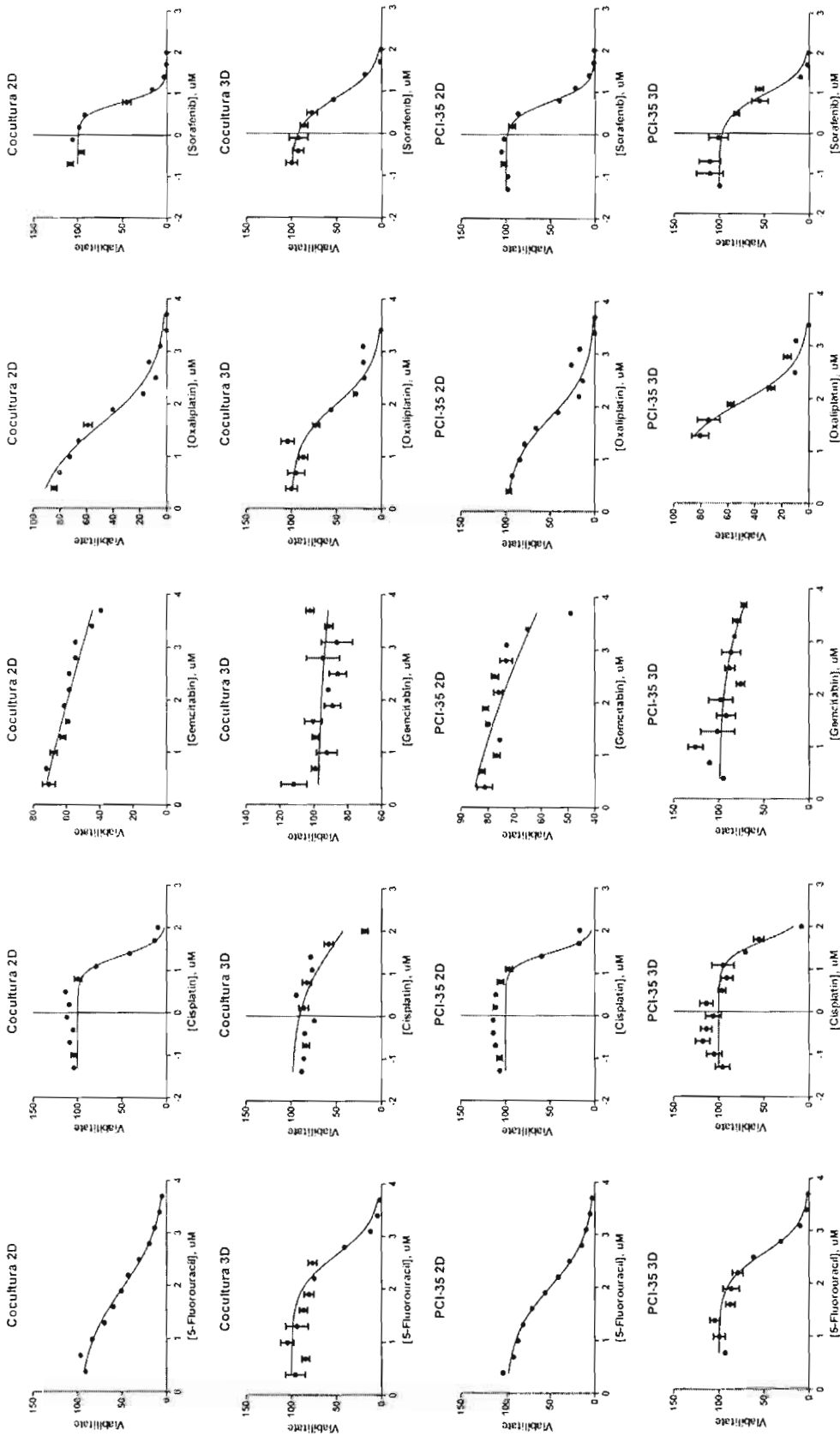


Fig. 8.




 Institutul de Biologie Celulară "Nicolae Simionescu"
 Conf. Dr. Carmen Gheorghiu
 Acad. Maya S. Popescu
 Biologie și Patologie Celulară
 "NICOLAE SIMIONESCU"
 București




 Institutul Clinic Fundeni
 Conf. Dr. Carmen Gheorghiu
 Acad. Maya S. Popescu




 Institutul de Virologie "Stefan S. Nicolae"
 Dr. Mihai Stoian