



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00927**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/02/2023** BOPI nr. 2/2023

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

(73) Titular:

• **INSTITUTUL DE VIRUSOLOGIE "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 NOVAȚC 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. DOMNIȚA 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, CÂMPULUNG, 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, BUȚEA, 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;
• **UYE 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. AVIAȚIEI 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, SC.A, ET.4, BL.M Y 8, AP.19, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• **ANGHEL RODICA**, STR. BISERICA FLOREASCA NR. 6B, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• **CINCA ȘABIN-AUREL-IOAN- ANTON**, STR. DOAMNA GHICA NR. 3, BL. 2, SC. 2, ET. 1, AP. 50, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:

WO 2016022830 A1; S. COLEMAN ȘI AL., "PANCREATIC CANCER ORGANOTYPICS: HIGH THROUGHPUT, PRECLINICAL MODELS FOR PHARMACOLOGICAL AGENT EVALUATION", WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, NR. 26, VOL. 20, 2014

(54)

METODĂ DE IDENTIFICARE A UNOR COMPUȘI CU ACTIVITATE ANTITUMORALĂ PENTRU TRATAMENTUL INDIVIDUALIZAT AL PACIENȚILOR CU CANCER PANCREATIC

Examinator: biochimist BABALIGEA IRINA



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

RO 132002 B1

1 Invenția se referă la o metodă de identificare a unor compuși cu activitate antitu-
morală pentru tratamentul individualizat al pacienților cu cancer pancreatic.

3 Cultura celulară convențională în sistem 2D (monostrat sau suspensie) a permis
5 identificarea de noi ținte și medicamente, dar, deși aceste sisteme furnizează cu siguranță
7 mult mai multe informații decât testele de biochimie ce nu folosesc celule ca substrat, totuși
9 ele nu sunt capabile să reproducă cu acuratețe micromediul tumoral, în special în experi-
11 mentele în care ținta este identificarea de noi medicamente în adenocarcinomul ductal pan-
13 creatic (ADKP), cazuri în care stroma are un rol deosebit de important în răspunsul la trata-
15 ment. Obținerea de modele celulare, relevante din punct de vedere fiziologic, pentru eva-
17 luarea susceptibilității la anumite medicamente, testarea rezistenței sau screening-ul de
19 medicamente și analiza funcțională care ar putea fi în măsură să ofere o valoare predictivă
21 ridicată pentru eficacitatea clinică a compușilor, este o necesitate absolută.

23 ADKP este caracterizat printr-un prognostic foarte prost, cu o mortalitate la 5 ani de
25 97-98%, metastazarea la distanță rămânând responsabilă mortalitatea și morbiditatea mare
27 cauzată de acest tip de cancer. Totuși „micromediul tumoral”, caracterizat printr-un conținut
29 stromal foarte mare, pare a fi unul dintre cei mai importanți determinanți ai rezistenței la
31 chimioterapie și ai supraviețuirii pacienților cu ADKP. De aceea, este necesară evaluarea
cantitativă și calitativă a efectelor antitumorale ale medicamentelor în contextul stromei
existente în tumori și a interacțiunii dintre proteinele stromale și celulele tumorale. Limitările
cunoștințelor actuale, asociate cu probabilitatea ca stroma să joace un rol fundamental în
răspunsul terapeutic, impun eforturi focalizate și integrate pentru a analiza evoluția efectul
antitumoralelor în prezența stromei de ADKP.

23 Sistemele de cultură 3D reprezintă un model mult mai realist decât sistemele 2D
25 pentru investigarea interacțiunilor celulare la nivelul formațiunii tumorale și mai ales pentru
27 investigarea unor noi strategii anti-tumorale care să țintească celulele tumorale, cele
29 stromale sau pe ambele. Celulele crescute și multiplicare *in vitro*, sunt expuse unor presiuni
31 de mediu diferite de cele la care sunt supuse atunci când sunt într-un țesut, și în consecință,
structura și abilitățile lor de funcționare și proliferare sunt diferite. Cultura 3D modelează în
mod controlat configurația naturală, iar funcțiile celulelor constituente ale țesutului tumoral
sunt diferite de cele ale celulelor cultivate în sistem 2D, utilizate convențional în prezent
pentru evaluarea unor compuși cu activitate anti-tumorală.

33 Au fost descrise mai multe procedee de obținere a sistemului de cultură 3D în alte
35 tipuri de tumori. Jaganathan și colaboratorii (**Jaganathan H., Gage J., Leonard F.,**
37 **Srinivasan S., Souza G.R., Dave B., Godin B., Three-dimensional *in vitro* co-culture**
39 **model of breast tumor using magnetic levitation. Sci Rep. 2014;4:6468. doi:**
41 **10.1038/srep06468**) au testat un sistem de cultura 3D, fără scaffold, menit să mimeze cât
43 mai bine tumorile mamare heterogene. Celulele tumorale au fost co-cultivate cu fibroblastele
și apoi au fost supuse levitației magnetice care conduce la formarea unor structuri tridimen-
sionale (3D) asemănătoare cu țesuturile *in vivo*. Deși modelul tridimensional propus pentru
cancerul mamar are avantajele că se pot forma modele tumorale de mari dimensiuni în 24
h (milimetri în diametru), cu compoziție și densitate controlată, imitând micromediul tumoral
și permițând testare eficienței unor medicamente, totuși, s-a arătat că levitația magnetică
induce o serie de modificări la nivelurile celulelor expuse (alterează metabolismul energetic,
promovează diferențierea, etc.).

45 Într-un alt studiu Ekert și colaboratorii (**Jason E. Ekert, Kjell Johnson, Brandy**
47 **Strake, Jose Pardin, 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 cultură 3D pentru cancerul pulmonar, utilizând mai multe linii de celule tumorale pulmonare. Acest model presupune cultivarea celulelor tumorale pulmonare în plăci de cultură cu aderență scăzută (Ultra Low Adherence), cu baza în formă de "U". Formarea sferelor a fost observată, în funcție de linia celulară utilizată, la 24-72 h de la incubare. Acest studiu a avut ca scop studierea diferențelor fenotipice și funcționale dintre celulele tumorale pulmonare crescute în monostrat 2D comparativ cu celulele crescute sub formă de sfere 3D, precum și evaluarea răspunsului la tratamentul cu inhibitori de EGFR și cMET (Erlotinib, Crizotinib, Cetuximab [Erbix) și Onartuzumab [MetMab]). Deși, acest studiu a arătat că celulele cultivate în sistem 3D prezintă diferențe morfologice, funcționale și un răspuns alterat la tratament și factori de creștere față de celulele cultivate în sistem 2D, acest sistem nu reușește să mimeze suficient micromediul tumoral întrucât la generarea sferelor au fost utilizate numai celule tumorale provenite din linii celulare fără să se utilizeze celule stromale care, așa cum a fost demonstrat în numeroase studii au un rol esențial în micromediul tumoral.

Recent, într-un studiu publicat de Yu Takahashi și 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 descrisă pentru prima dată cultivarea celulelor hepatice într-un sistem 3D. Acest studiu a avut ca scop obținerea unui sistem simplu de cultură 3D, care să nu implice utilizarea de biomateriale și în care funcțiile hepatice specifice să fie cât mai reproduse, astfel încât să poată fi utilizat în screening-ul de noi compuși terapeutici sau în teste funcționale și farmacologice. Pentru realizarea acestui sistem au fost utilizate două linii celulare tumorale hepatice (HepaRG și HepG2) care au fost cultivate într-un sistem de cultivare în picătură GravityPLUS systems (Inspheero). Cultivarea celulelor sub formă de sfere a dus la creșterea secreției de apolipoprotein B și albumină (considerată un marker al funcției hepatice), comparativ cu sistemul de cultură 2D. De asemenea, s-a observat că expresia genelor implicate în metabolismul glucidelor, medicamentelor și lipidelor a crescut semnificativ în sferele HepaRG. Cu toate că acest model a demonstrat o îmbunătățire a funcțiilor caracteristice celulelor hepatice atunci când au fost cultivate în sistem 3D, *in vivo* ficatul este format din mai multe tipuri de celule, iar co-cultivarea în sistem 3D a celulelor tumorale împreună cu alte tipuri de celule hepatice ar permite o mai bună reprezentare *in vitro* a funcțiilor hepatice.

În brevet **US 9334473 B2**, autorii propun pentru crearea unor sisteme de cultură 3D utilizarea unei matrici formată dintr-un component absorbent rigid (de regulă din fibră de sticlă), iar în unele cazuri includ și un gel. Utilizarea unui astfel de sistem pentru crearea unor matrici extracelulare poate induce anumite modificări în celulele tumorale afectând proliferarea și diferențierea celulară, și nu substituie prezența celulelor stromale și a micromediului tumoral.

În brevetul **US 2013/0295578 A1**, Sempere și colaboratorii au propus o metodă de screening pentru rezistența la medicamente în țesut tumoral *ex vivo* care implică utilizarea unui sistem de culturi celulare 3D ce mimează micromediul tumoral. În acest scop, autorii propun cultivarea celulelor obținute din biopsie în Matrigel 3% utilizat cu scopul de a mima matricea extracelulară, cu sau fără alte componente de tip colagen I, colagen IV, laminina și fibronectina. Totuși, modificarea micromediului celulelor din tumoră prin plasarea lor directă în Matrigel 3%, cu sau fără alte componente, fără o perioadă de acomodare, poate determina modificări morfologice și funcționale la nivelul celulelor din sistemul 3D care pot influența rezultatul testelor de rezistență la citostatice.

RO 132002 B1

1 Problema pe care invenția actuală o rezolvă este stabilirea unei metode de identifi-
care a unor compuși cu activitate antitumorală pentru tratamentul individualizat al pacienților
3 cu cancer pancreatic.

5 Sistemul organotipic PCI-35/PSC, pe care invenția actuală îl propune, este potrivit
pentru investigarea sensibilității terapeutice la medicamente, surmontând dificultățile create
7 de modelele tipice convenționale 2D, care nu reproduc micromediul existent *in vivo*, având
astfel o putere limitată de predicție în eficacitatea clinică, precum și reducerea costurilor și
a timpului necesare în testările pe modele animale și în studiile clinice.

9 Soluția pe care o propune prezenta invenție este stabilirea unei metode de identifi-
care a unor compuși cu activitate antitumorală pentru tratamentul individualizat al pacienților
11 cu cancer pancreatic, caracterizată prin aceea că se co-cultivă celule tumorale pancreatice
de la un pacient de cancer pancreatic împreună cu celule stromale de pancreas, sub formă
13 de sferoizi, într-o matrice preformată de agaroză, sub formă de microplăci tridimensionale,
rezultând astfel o cultură organotipică tridimensională de pancreas, care ulterior se tratează
15 cu un compus de testat, se măsoară viabilitatea celulară și se clasifică compusul testat ca
având sau nu activitate anti-tumorală, pe baza măsurării viabilității celulare.

17 Avantajul metodei de identificare a unor compuși cu activitate antitumorală pentru
tratamentul individualizat al pacienților pe baza unui sistem organotipic de pancreas constă
19 în faptul că sistemului de co-cultură pancreatică 3D este superior în mimarea creșterii tumorii
și a biologiei ei. Reproducând interacțiunea fizică și de activare într-un țesut tumoral, modelul
21 organotipic tumoral 3D oferă informații precise pentru selecția compusului și a țintei,
reducând astfel răspunsul slab sau eșecul chimioterapiei *in vivo* în stadiile târzii. Sistemul
23 organotipic de pancreas permite screening-ul și analiza simultană a unui număr mare de noi
compuși cu scopul de a-i identifica pe cei eficienți sau pentru explorarea interacțiunilor intra-
25 tumorale și descoperirea țintelor și validarea lor. Nu în ultimul rând, modelul celular 3D oferă
posibilitatea de a dezvolta o metodă de identificare a unor compuși cu activitate antitumorală
27 pentru tratamentul individualizat al pacienților.

Se prezintă în continuare 4 exemple ale invenției în legătură cu fig. 1...8:

29 - fig. 1, morfologia PSC obținute din pancreas, celule fibroblastice, aplatizate, cu
forma poligonală cu picături lipidice în citoplasmă, pasajul 2, 48 h în cultură (obiectiv 20x);

31 - fig. 2, analiza celulelor PSC prin citometrie în flux; celulele prezintă CD90 (Thy-1)
și CD 105 (endoglin) - dot-plot stânga sus și CD44 - dot-plot dreapta sus.

33 - fig. 3, dinamica formării sferoizilor timp de 1-7 zile în cultură (contrast de fază,
obiectiv 10x);

35 - fig. 4, analiza celulelor din co-cultură PCI-35/PSC în sistem 2D (A, 400X) și 3D (B,
400X; C, 100X, după separarea din sferoid) prin imunofluorescență pentru alfa-SMA (1) și
37 beta-catenina (2);

39 - fig. 5, nivelurile de expresie a genelor GFAP, Nestin, BMP4, Notch1, SHH, WNT1
și vimentin în celule stelate pancreatice cultivate în sistem 2D (Roșu - PSC 2D), 3D (Verde -
PSC 3D) și co-cultură PCI-35/PSC (albastru). Analiza s-a realizat comparativ cu linia de
41 celule tumorale PCI-35 (cultura 2D);

43 - fig. 6, nivelurile de expresie a genelor GFAP, Nestin comparativ cu linia de celule
stem neurale STON. Neurosfere celule stem neurale NECU - cărămiziu; co-cultura PCI-
35/PSC - albastru; PSC 2D - roșu, PSC 3D - verde;

45 - fig. 7, analiza viabilității co-culturi de PCI-35/PSC în sistem 3D și 2D. A) Control co-
cultura 3D tratată cu tampon fosfat salin; B) co-cultura 3D tratată cu 10 μ M 5-FU; C) Control
47 co-cultură 2D tratată cu tampon fosfat salin; D) co-cultura 2D tratată cu 10 μ M 5-FU.
Imaginile au fost colectate folosind un obiectiv de 10x.

49 - fig. 8, cuantificarea toxicității induse de citostaticele analizate - stabilirea
chemogramei.

Exemplul 1

Obținerea culturii organotipice de pancreas

În experimentele noastre au fost utilizate ca model de celulă tumorală proprie pacientului oncologic, celulele liniei PCI-35, inițiată dintr-un adenocarcinom de pancreas de către grupul profesorului A Horii, Japonia (**Hitoshi Sekine; et al, Biochemical and biophysical research Communications 2012;429(3-4):214-9**) și celule stromale izolate din pancreas normal denumite PSC (ca și celule de susținere).

Obținerea celulelor stromale/stem mezenchimale/stelate din pancreas s-a realizat în cadrul operației de izolare a insulelor pancreatice de la donor în moarte clinică de către o echipă formată din specialiști din Institutul Clinic Fundeni și Institutul de Virusologie. Izolarea insulelor pancreatice a fost efectuată în cadrul laboratorului GMP al Institutului Clinic Fundeni, în conformitate cu legislația românească privind terapia cu celule. Insulele au fost izolate din țesutul exocrin și conjunctiv înconjurător utilizând metoda Ricordi modificată, prin digestie cu colagenază. Insulele pancreatice, împreună cu resturile de țesut acinar și celule mezenchimale, au fost menținute în cultură în mediu CMRL și 10% BSA. La 24 h, celulele în suspensie (respectiv insulele) au fost recultivate în recipiente noi, iar celulele aderate (celulele stem mezenchimale/stelate) au fost menținute în alfaMEM suplimentat cu 10% ser fetal bovin, cu schimbarea mediului la fiecare 2 zile până la obținerea monostratului celular. Analiza fenotipică a PSC s-a realizat prin citometrie în flux (Beckman-Coulter Epics XL). Celulele au fost tripsinizate, spălate cu o soluție de TFS rece/BSA 0,1% și incubate o oră cu anticorpi specifici (AbCam, Millipore) diluați în TFS conform recomandărilor producătorului. Rezultatele au fost evaluate în două experimente individuale folosind programul FlowJo (Tree star, Inc.). Spre deosebire de celulele stem mezenchimale, monostratul de celule aderente pancreatice au prezentat o formă fibroblastică, plată, poligonală cu picături mici lipidice în citoplasmă (fig. 1). Pe de altă parte, celulele PSC au prezentat markeri de celule stem cum sunt CD90 (Thy-1) și CD 105 (endoglin). De asemenea, 99,8% din populația PSC au prezentat CD44, o glicoproteină de suprafață implicată în interacțiile intercelulare, adeziune celulară și migrare, și doar, o mică fracție din populație a prezentat CD24, o moleculă de adeziune celulară (fig. 2).

Cultura 3D a fost obținută în micro-plăci speciale. Matrițele pentru turnarea micro-plăcilor 3D au fost spălate cu apă distilată și sterilizate prin autoclavare timp de 30 min în ciclul uscat, 1 g de agaroză pură, sterilizată prin autoclavare timp de 30 min în ciclul uscat, a fost fiartă în 50 mL de soluție salină sterilă [0,9% (w/v) NaCl], în condiții aseptice, în cuptorul cu microunde până la dizolvare totală, după care a fost lăsată să se răcească până la 60-70°C. Micro-plăcile 3D[®] au fost preparate prin pipetarea a 330 μL de agaroză topită în micro-matriță, evitându-se formarea bulelor de aer în timpul agitării sau pipetării agarozei. Micro-plăcile 3D[®] au fost transferate în placi cu 24 de godeuri pentru culturi celulare. Micro-plăcile 3D[®] astfel obținute au fost echilibrate prin 3 spălări cu 1 mL/godeu de mediu de cultură, timp de 15 min, la temperatura camerei. Celulele au fost tripsinizate, numărate și preparate suspensii celulare cu diferite concentrații de celule, în scopul obținerii unor sferoizi cu diametrul de 100 μm. Mediul de cultură din jurul și din interiorul micro-plăcilor 3D[®] a fost înlăturat și în interiorul micro-plăcilor 3D[®] s-au pipetat câte 75 μL de suspensie celulară cu câte 6000 celule din fiecare tip celular component al organoidului (proporție 1:1). Plăcile 3D[®] au fost lăsate în repaos timp de 10 min pentru repartizarea celulelor în micro-godeuri, după care s-a adăugat câte 1 mL de mediu de cultură DMEM suplimentat cu 10% ser fetal bovin în fiecare godeu al plăcii cu 24 godeuri conținând sistemul de cultură 3D. Plăcile de 24 de godeuri au fost incubate la 37°C, în atmosferă umedă cu 5% CO₂. Formarea sferelor a fost urmărită zilnic la microscopul inversat Cari Zeiss Microscop GmbH și fotografiate utilizând camera Axio CamMR (Zeiss). Cuntificarea mărimii sferelor s-a realizat utilizând softul Zen 2011 SP1x64.

1 **Exemplul 2**

Analiza morfologiei, proliferării și viabilității celulelor de ADKP în sistem 3D

3 Pattern-ul de creștere și viabilitatea celulelor în micromediul de cultură 3D au fost
urmărite în dinamică pe parcursul a 7 zile (fig. 3). S-a observat că PCI-35 nu a format sferoizi
5 perfect rotunzi, celulele fiind împrăștiate, iar dimensiunea conglomeratului celular fiind mai
mare (de exemplu, dimensiunea medie a sferoidului la 24 h era de aproximativ 250 μm/12000
7 celule înșămânțate în micro-placă). În schimb, sferoizii formați de PSC au fost mai mici, mai
uniformi și mai rotunzi, de aproximativ 180 μm/12000 celule înșămânțate inițial în micro-
9 placă. Prin co-cultivarea PCI-35 cu PSC s-au obținut sferoizi, rotunzi, de dimensiuni medii
(aproximativ 220 μm). Morfologia sferoizilor în sistemul 3D pare a fi dependentă de tipul de
11 celulă: în timp ce PCI-35 nu formează sferoizi, iar celulele agregă în clustere din prima zi de
cultură, celulele PSC formează sferoizi.

13 Analiza de rutină a viabilității celulelor în sistemele de cultură 3D este dificilă datorită
limitărilor legate de difuzia și transportul în structurile celulare complexe 3D. Pentru a cuanti-
15 fica viabilitatea celulară s-au utilizat comparativ 2 metode: testul de excludere a albastrului
de tripan, evaluat folosind microscopie convențională, și colorația cu fluorescein diacetat
17 (FDA)/iodura de propidium (PI) în microscopie de fluorescență. Determinarea viabilității
celulare în sistemele 3D utilizând albastru de tripan a inclus un tratament prealabil de diges-
19 tie enzimatică a sferelor cu soluție de tripsină-EDTA (0,25%, Gibco), iar suspensia mono-
celulară obținută a fost examinată prin procedura clasică folosind camera de numărare
21 Burkert-Turk. În cazul utilizării colorației cu FDA/PI în microscopie de fluorescență, sistemele
3D au fost evaluate ca atare. Prin colorare cu fluorescein diacetat (celulele apar colorate în
23 verde) au fost puse în evidență celulele vii și cu iodura de propidium (celulele apar colorate
în roșu) au fost puse în evidență celulele moarte.

25 Rata de dublare a celulelor în sferoizi, observată în microscopie de fluorescență și
prin colorație cu albastru de tripan, a fost asemănătoare. Diferența între rezultatele obținute
27 prin cele 2 metode a fost de mai puțin de 10%, aspect cauzat probabil de principiile diferite
de estimare a viabilității celulare în fiecare din aceste metode. Rezultatele noastre arată că,
29 deși estimarea precisă a viabilității celulelor în culturile 3D este o operație dificilă, colorația
FDA/PI poate fi o soluție rezonabilă pentru analiza de rutină a viabilității celulare în acest
31 caz. Astfel, putem spune că PCI-35 și PSC sunt capabile să prolifereze în interiorul sferoidu-
lui co-cultură și după 7 zile.

33 Aceste rezultate arată că celulele PCI-35, celulele PSC și co-cultura lor sunt capabile
să supraviețuiască și să prolifereze în sferoizii care mimează țesutul pancreatic. Spre
35 deosebire de culturile de celule 2D, care au o rata de dublare de 24 h, în sferoizi celulele au
proliferat cu o rată relativ scăzută, calculându-se un timp de dublare de aproximativ 8 zile.
37 Sferoizii multicelulari reprezintă analogi tridimensionali ai țesutului ceea ce oferă oportuni-
tatea testării de medicamente *in vitro*, deoarece mențin parametrii fiziologici critici prezenți
39 *in vivo*, incluzând arhitectura multicelulară complexă, matricea extracelulară, și barierele de
penetrare a nutrienților și medicamentelor. Funcțiile și răspunsul celulelor la nivel tisular sunt
41 adesea pierdute în culturile convenționale 2D limitând capacitatea predictivă a metodei. De
aceea este necesară dezvoltarea tehnicilor/sistemelor de cultură 3D, bine caracterizate,
43 simple, reproductibile și care să fie similare fiziologiei țesuturilor.

Exemplul 3

Analiza fenotipică comparativă a sistemelor de co-cultură 2D și 3D

45 Pentru analiza comparativă a expresiei alfa-SMA și beta-catenina în culturile 2D și
47 3D, sferule și celulele individuale din sistemele 3D de co-cultură ADKP/PSC, respectiv 2D,
au fost recoltate și fixate în etanol 70%. Sferule și celulele au fost spălate cu soluție rece de

RO 132002 B1

TFS și BSA 0,1% și incubate o oră 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 comparativă a cele două sisteme a fost realizată pe imaginile capturate folosind Leica DM IL Fluo cu aplicația Leica Suite. 1
3
5

Analizând prin imunofluorescență expresia alfa-SMA în co-culturile 3D comparativ cu culturile 2D s-a putut observa expresia mult mai redusă a acestei proteine în culturile 2D comparativ cu nivelul de expresie în sferoizii obținuți în culturile 3D (fig. 4). Acest lucru indică activarea celulelor PSC în co-cultură 3D, fapt explicabil prin hipoxia descrisă în astfel de sferoizi. Sistemele noastre de co-cultură 3D par a fi capabile să imite starea hipoxică din centrul sferelor și activarea PSC prin creșterea nivelului expresiei a-SMA evidentă, aceasta fiind o caracteristică tipică în creșterea tumorală și invazivitate. Hipoxia este un proces important ce poate afecta funcționalitatea PSC în sferoizii cultivați 3D, dar și în tumorile pancreatice cunoscute ca fiind hipovasculare și cu celule tumorale care proliferază eficient în condiții hipoxice. Sistemul nostru organotipic de pancreas (co-cultură 3D) imită mult mai bine decât o co-cultură 2D interacțiunile intra-tumorale și ar putea fi mai potrivit pentru investigarea mecanismelor care favorizează creșterea tumorală și, de asemenea, pentru testarea de medicamente anti-tumorale mai eficiente. 7
9
11
13
15
17

Caracterizarea PSC inițiate din pancreas uman și a co-culturii cu celule tumorale (PCI-35) a constat în evaluarea expresiei genelor GFAP (glial fibrillary acidic protein) și nestina, precum și a altor gene, cum ar fi: BMP4 (bone morphogenetic protein 4), Notch1, SHH (Sonic HedgeHog), WNT1 (Wingless-Type MMTV Integration Site Family Member 1) și vimentin, prin RT-PCR semicantitativ. Pentru aceasta, celulele cultivate în sistem 2D și 3D au fost colectate și s-a extras ARN total cu Trizol (Invitrogen, USA) conform indicațiilor producătorului. ARN-ul total (2 μg) 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 reacției de real time PCR (qPCR) pentru expresia genelor GFAP, nestina, BMP4, Notch1, SHH, WNT1 și vimentin folosind Taqman Gene Expression Assay conform indicațiilor producătorului (Applied Biosystems). Ca și control endogen s-a folosit beta-actina umană. Fiecare experiment a fost lucrat în 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 în sistem 2D au prezentat o expresie crescută a ARNm GFAP și nestin. Expresia acestor markeri a fost mai scăzută în PSC menținute în sistemul 3D și mult scăzută în co-cultura 3D PCI-35/PSC (fig. 5). De remarcat a fost faptul că atât expresia GFAP cât și a nestinei a fost mult mai mică comparativ cu celulele stem neurale tumorale NECU și STON (care cresc normal sub formă de neurosfere) (fig. 6). Expresia scăzută a acestor markeri în sistemul co-cultură 3D PCI-35/PSC ar putea fi explicată prin modificările progresive ale expresiei nestinei și GFAP care au loc în timpul etapelor-cheie în diferențierea tipurilor celulare. De aceea, presupunem că diferențierea ar putea fi indusă sub influența semnalelor și factorilor de creștere produși în micromediu de celulele APKD. 19
21
23
25
27
29
31
33
35
37
39

Exemplul 4

 41

Analiza calitativă (IF) și cantitativă (CellTiter-Glo®) a toxicității induse de citostatice

Pentru analiza calitativă a toxicității induse de citostatice, celulele cultivate în sistem 2D și în sistem 3D au fost menținute în cultură 7 zile și apoi, tratate cu 10 μM 5-Fluorouracil (5-FU; Teva Parenteral Medicines) diluat în TFS (Invitrogen) exact înainte de folosire, sau cu un amestec 1:1 de două extracte hidro-alcoolice obținute din cătină roșie (*Tamarix gallica*) și armurariu (*Sylibum marianum*). După 24 h, s-a evaluat răspunsul la tratament în culturile 3D versus culturile 2D folosind 10 μL din soluția stoc cu concentrația de 1 mg/mL FDA/PI 43
45
47

RO 132002 B1

1 (fig. 7). S-a observat că în condițiile culturii 3D celulele PCI-35 au fost mai rezistente la
10 μM 5-FU. Rezultatele sunt datorate integrității sferoizilor 3D, fiind mult mai dificil pentru
3 acești compuși să difuzeze și să penetreze în centrul masei celulare. Mai mult, 5-FU un
blocant al proliferării celulare, țintește celulele aflate în proliferare, și nu afectează celulele
5 dormande din sferoid.

Pentru analiza cantitativă a toxicității induse de citostatice, culturile de celule în
7 sistem 3D au fost obținute în plăci HDP1096 Perfecta3D[®] în picătură suspendată cu 96 de
godeuri (3D Biomatrix, SUA). În acest scop au fost create sisteme de cultură 3D formate din
9 celule tumorale PCI-35 și sisteme 3D de co-cultură PCI35/HpaSteC în raport de 1:1 în mediu
de cultură DMEM suplimentat cu 10% ser fetal bovin. Plăcile HDP1096 Perfecta3D[®] în
11 picătură suspendată cu 96 de godeuri (3D Biomatrix, SUA) reprezintă un ansamblu format
dintr-o tavă inferioară, o placă intermediară cu orificii pentru formarea picăturilor suspendate
13 și capac. Placa intermediară și tava inferioară sunt prevăzute pe marginea periferică cu
rezervoare, separate de ecrane deflectoare în secțiuni, acestea putând fi umplute cu apă
15 distilată sau agaroză 0,5-1% pentru a evita evaporarea mediului de cultură din picăturile
suspendate în cazul unor incubări îndelungate. Pentru obținerea sistemelor de cultură 3D,
17 celulele au fost tripsinizate, numărate și preparate suspensii celulare cu o densitate de 5000
de celule/40 μL . "Picăturile suspendate" au fost obținute prin pipetarea a câte 40 μL din
19 suspensia celulară per godeu/orificiu în placa intermediară. În rezervoarele situate pe mar-
ginea periferică a plăcii și a tăvii a fost adăugată apă distilată pentru a evita evaporarea
21 mediului de cultură pe perioada incubării. Plăcile au fost incubate la 37°C, în atmosferă
umedă cu 5% CO₂ pentru a permite formarea sferelor. După 72 h, sferile formate au fost
23 transferate prin fixarea plăciilor intermediare pe plăci albe de 96 de godeuri (NUNC, SUA)
și centrifugare timp de 5 min la 300 x g. Analiza toxicității citostaticelor în sistem 3D s-a
25 realizat comparativ cu sistemele de cultură 2D. Pentru sistemul 2D, celulele au fost tripsini-
zate, numărate și însămânțate în plăci albe de 96 de godeuri (NUNC, SUA) la o densitate
27 de 5000 de celule per godeu. Plăcile au fost incubate la 37°C, în atmosferă umedă cu 5%
CO₂ timp de 24 h.

Pentru a evalua eficiența utilizării sistemului de co-cultură 3D elaborat în deter-
minarea citotoxicității/rezistenței unor medicamente utilizate în tratamentul ADKP, sistemele
31 de cultură 3D, cât și cele 2D, au fost tratate cu 5-fluorouracil, gemcitabina, oxaliplatin,
cisplatin și sorafenib. În acest scop, medicamentele au fost supuse unor diluții seriale binare,
33 concentrația finală testată variind între 2,44 μM și 5 mM pentru 5-fluorouracil, gemcitabina
și oxaliplatin, și între 0,05-100 μM pentru cisplatin și sorafenib. Sistemele de cultură 2D și
35 3D au fost supuse tratamentului timp de 72 h la 37°C, în atmosferă umedă cu 5% CO₂.
Viabilitatea celulară a fost determinată folosind kitul CellTiter-Glo[®] (Promega, G7572).
37 Tamponul CellTiter-Glo[®] a fost decongelat și echilibrat, împreună cu substratul CellTiter-
Glo[®] liofilizat, la temperatura camerei înainte de utilizare. Substratul liofilizat a fost reluat în
39 tamponul CellTiter-Glo[®] și omogenizat prin agitare. Pentru determinarea viabilității celulelor
cultivate în sisteme de cultură 2D sau 3D și supuse tratamentului cu medicamente
41 antitumorale, în fiecare godeu a fost adăugat un volum egal de reactiv CellTiter-Glo[®]. Plăcile
au fost incubate la temperatura camerei timp de 10 min pentru a permite stabilizarea sem-
43 nalului luminescent. Luminiscența a fost citită la un aparat FilterMax F5 Multi-Mode
Microplate Reader (Molecular Devices, SUA), iar rezultatele au fost interpretate utilizând soft-
45 ul GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., SUA). Cuantificarea toxicității induse de
citostaticele analizate (prezentată în tabelul 1) arată o reducere a sensibilității la medicament
47 în sistemul 3D comparativ cu sistemul 2D demonstrând că integritatea sferelor din sistemele
3D potențează dificultatea de pătrundere a tratamentului (medicamentelor) spre centrul
49 masei de celule într-un țesut tumoral și susține importanța micromediului înconjurător tumoral
asupra eficienței chimioterapiei.

RO 132002 B1

Cuantificarea toxicității induse de citostaticele analizate (IC50)

Tabelul 1

Tip cultură	IC50 (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

RO 132002 B1

1

Revendicare

3

Metodă de identificare a unor compuși cu activitate antitumorală pentru tratamentul individualizat al pacienților cu cancer pancreatic, **caracterizată prin aceea că**, se co-cultivă

5

celule tumorale pancreatice de la un pacient de cancer pancreatic împreună cu celule stromale de pancreas, sub formă de sferoizi, într-o matrice preformată de agaroză, sub

7

formă de microplăci tridimensionale, rezultând astfel o cultură organotipică tridimensională de pancreas, care ulterior se tratează cu un compus de testat, se măsoară viabilitatea

9

celulară și se clasifică compusul testat ca având sau nu activitate anti-tumorală, pe baza măsurării viabilității celulare.

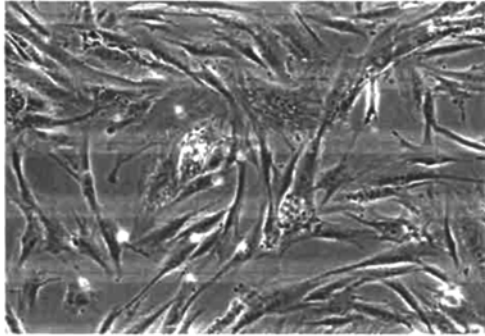


Fig. 1

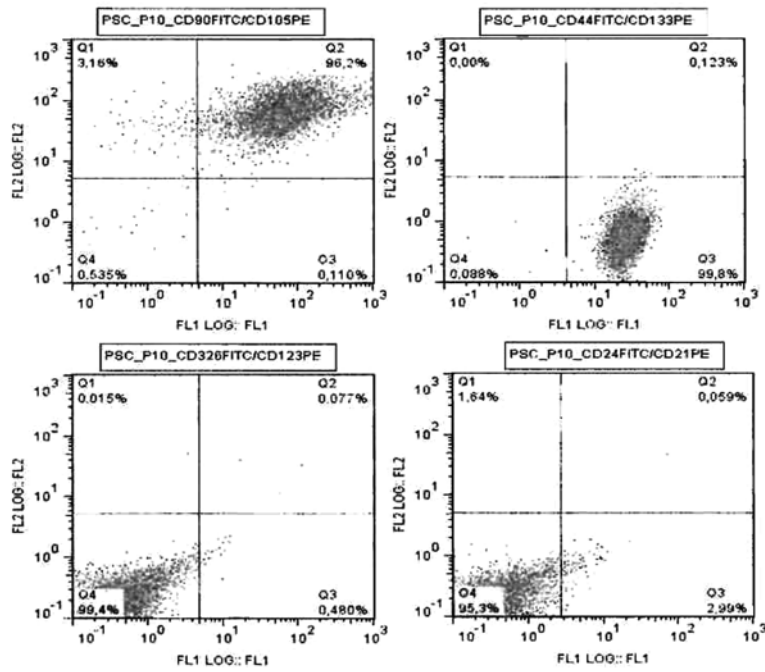


Fig. 2

(51) Int.Cl.

G01N 33/50 (2006.01),

C12N 5/09 (2010.01)

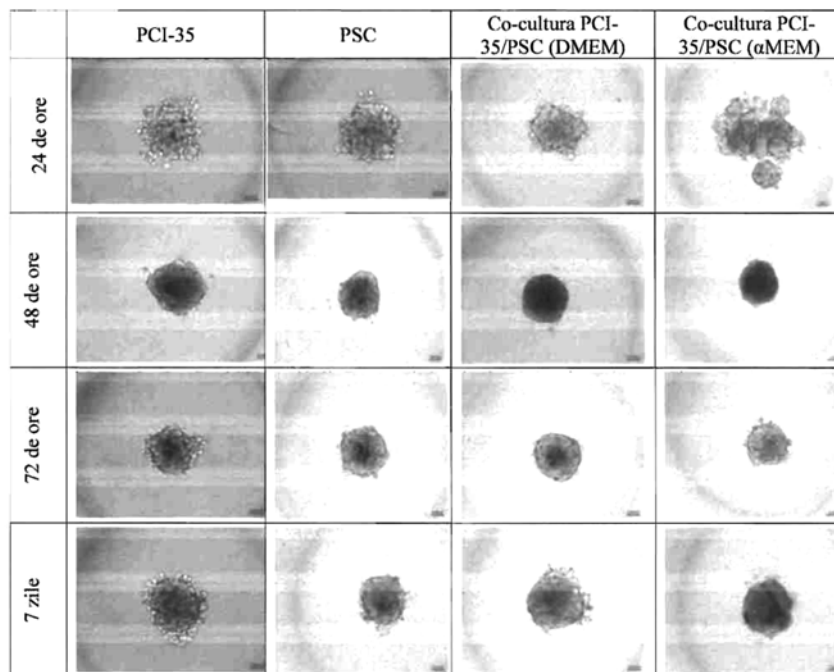


Fig. 3

(51) Int.Cl.

G01N 33/50 (2006.01);

C12N 5/09 (2010.01)

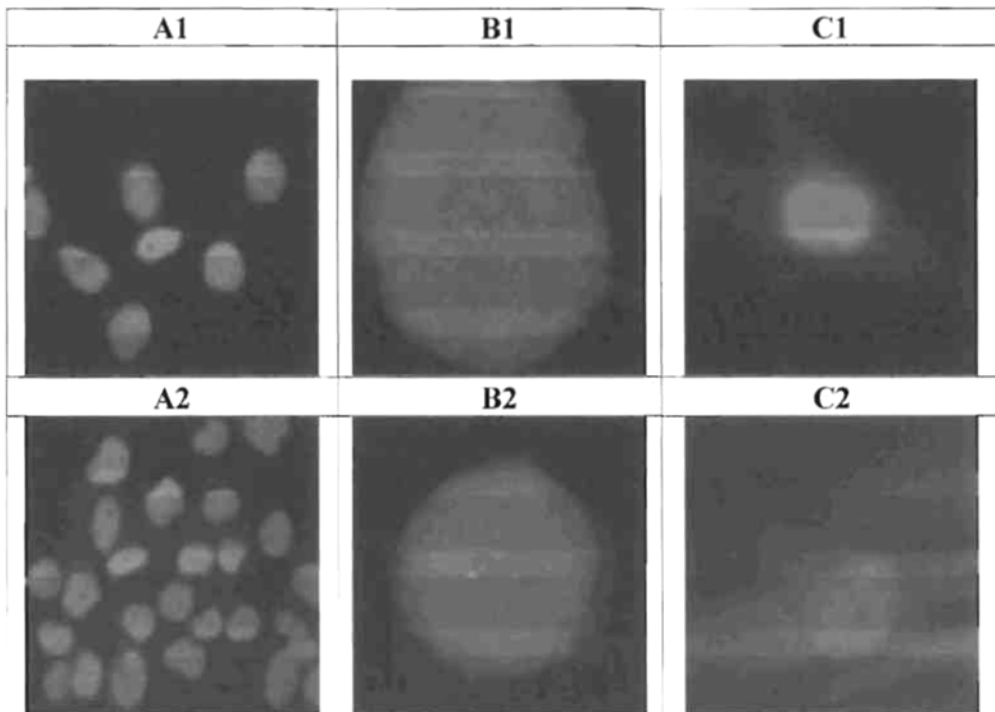


Fig. 4

(51) Int.Cl.

G01N 33/50 (2006.01),

C12N 5/09 (2010.01)

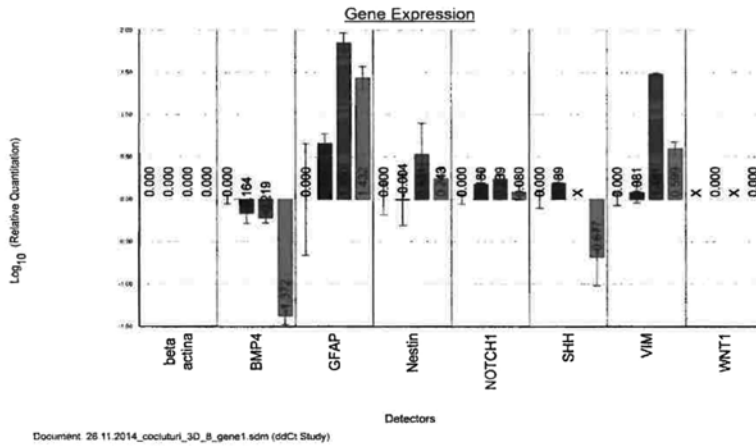


Fig. 5

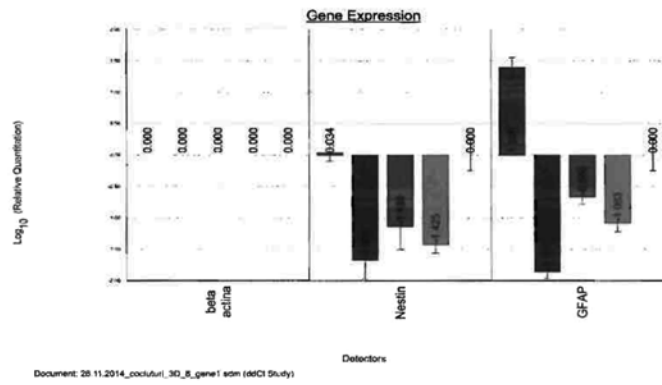


Fig. 6

(51) Int.Cl.

G01N 33/50 (2006.01);

C12N 5/09 (2010.01)

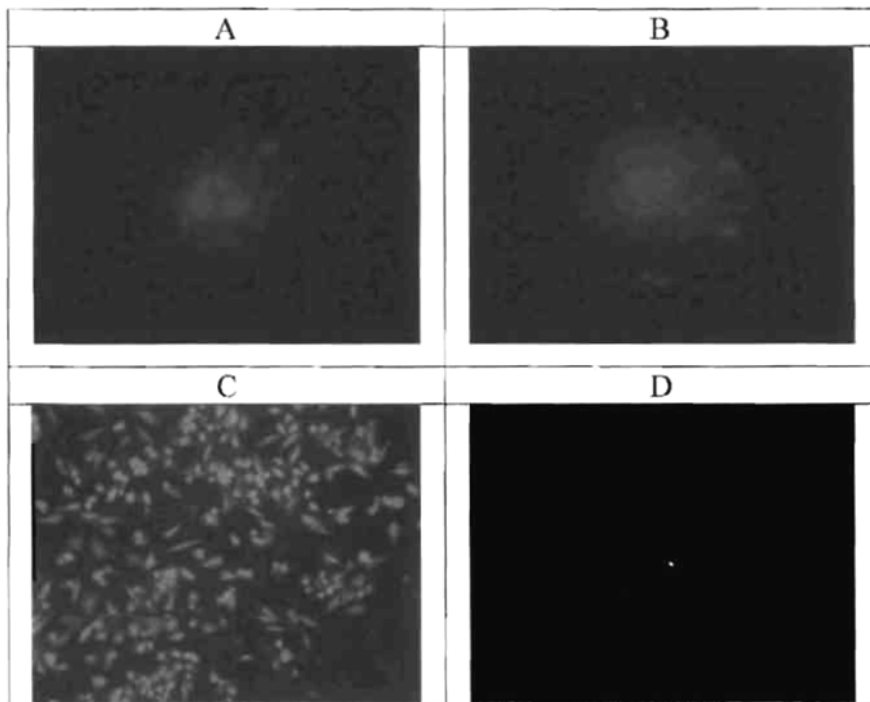


Fig. 7

(51) Int.Cl.

G01N 33/50 (2006.01),

C12N 5/09 (2010.01)

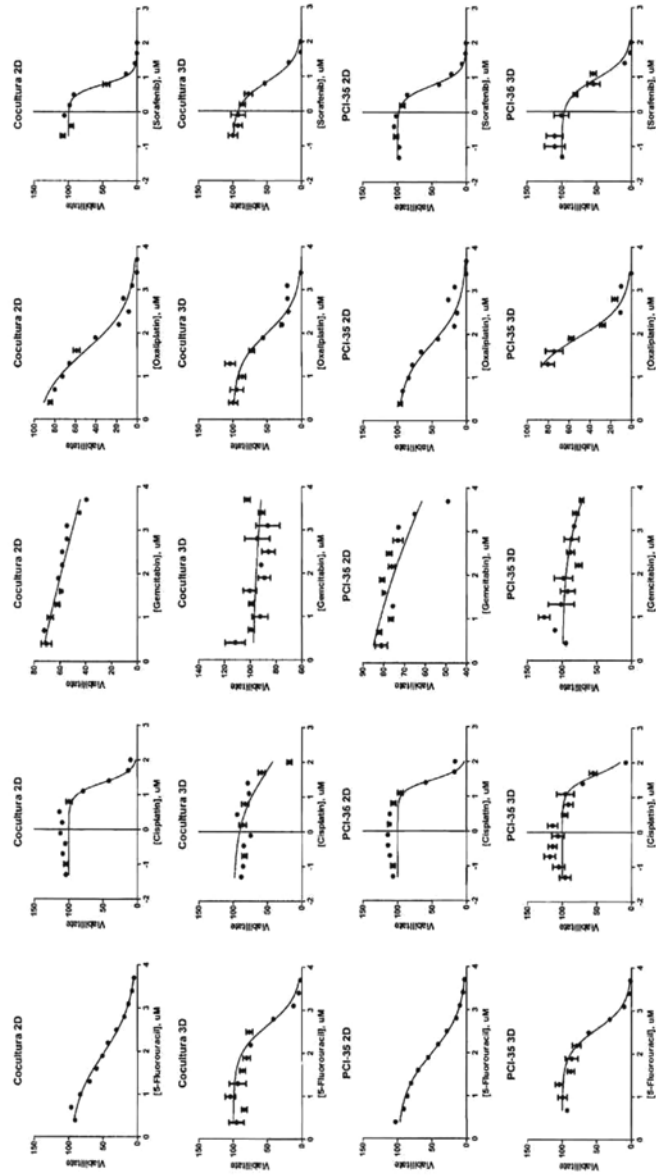


Fig. 8

