



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00197

(22) Data de depozit: 13/04/2020

(41) Data publicării cererii:  
30/10/2020 BOPI nr. 10/2020

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL ONCOLOGIC "PROF.DR.  
ION CHIRICUȚĂ" DIN CLUJ-NAPOCA,  
STR.REPUBLICII NR.34-36,  
CLUJ- NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:  
• SORITAU OLGA, NR.1233C,  
COMUNA GILĂU, CJ, RO;  
• BALACESCU OVIDIU DANIEL,  
STR.PASTEUR, NR.59, AP.38,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• TUDORAN OANA MIHAELA,  
STR.PROF.I.RUS, NR.52E,  
COMUNA FLOREȘTI, CJ, RO

(54) METODĂ DE IZOLARE ȘI CULTIVARE A CELULELOR  
TUMORALE DIN BIOPSIILE DE CANCER MAMAR

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de izolare și cultivare a celulelor tumorale mamare din biopsii de sân recoltate prin tehnica aspirării cu ac fin, sub ghidaj ecografic. Metoda, conform invenției, constă în procesarea mecanică și enzimatică cu colagenază a fragmentelor bioptice la stadiul de suspensie unicelulară heterogenă, cultivarea acestei suspensii pe un substrat de colagen și fibronectină într-un mediu de cultură înalt selectiv de creștere a celulelor epiteliale-EGM2, rezultând culturi

primare de populații tumorale relativ omogene cu fenotip epitelial și de tranziție epitelio-mezenchimală care păstrează caracteristicile inițiale observate la momentul izolării celulelor tumorale și pot fi utilizate în terapia personalizată a cancerului de sân.

Revendicări: 4  
Figuri: 4



## DESCRIEREA INVENȚIEI

Prezenta invenție se referă la o metoda de izolare și cultivare a celulelor tumorale mamare din biopsii recoltate de la pacienți cu cancer de san. Cancerul mamar este principala cauza de deces în rândul populației feminine, iar din punct de vedere histologic, molecular și clinic este o boala extrem de heterogena, stabilirea unui regim terapeutic adecvat fiind o provocare majoră. Deși schemele terapeutice disponibile iau în considerare factori multipli prognostici, precum numărul de ganglioni afectați, dimensiunea tumorală, gradul histologic și statusul receptorilor hormonali, datele epidemiologice arată că răspunsul la terapie este unul foarte variat. Potrivit recomandărilor ASCO, tratamentul cancerului poate să ridice mari probleme datorită creșterii numărului pacienților care prezintă rezistență la terapie, iar aceștia sunt în continuare tratați cu o serie de terapii care eșuează. Date recente arată că diversitatea morfologică și moleculară a celulelor tumorale mamare [1], însoțită de o plasticitate dinamică a micromediului tumoral [2] precum și prezența unor populații de celule stem tumorale (stem-like) [3], face dificilă încadrarea și clasificarea tumorilor mamare din punct de vedere al agresivității sau al răspunsului la terapie [4]. Toate aceste aspecte evidențiază nevoia unor modele preclinice adecvate care să poată predicționa răspunsul clinic al pacienților cu cancer de san. Posibilitatea izolării și cultivării celulelor tumorale proprii fiecărei paciente constituie o platformă de testare foarte valoroasă și utilă pentru avansarea conceptului de terapie personalizată, deoarece reflectă mult mai precis caracteristicile tumorale individuale ale fiecărei paciente [5].

### **Stadiul actual al cunoașterii**

Inițierea *in vitro* a unor culturi de celule primare din punctii bioptice este o misiune dificilă și provocatoare, cu o rată de succes relativ mică. Disponibilitatea limitată a materialului biologic (tesut recoltat prin punctie biopsie) precum și dificultățile întâmpinate în validarea și implementarea protocoalelor în practica de laborator sunt principalii factori determinanți în stabilirea cu succes a unor culturi primare de celule tumorale mamare [6].

Dificultățile inițierii unei culturi primare din fragmentele de țesut mamar:

1. Fragmentele tumorale sunt paucicelulare și bogate în țesut conjunctiv
2. Prezenta unei heterogenități celulare în țesutul biopsiat: celule tumorale în diferite stadii de diferențiere: de tip epitelial (CD24+, exprima cytokeratin 8, 18, 19, E-cadherin, claudine, occludine), în tranziție epitelio-mezenchimală (TEM) (celulele cu supraexprimare de markeri mezenchimali: vimentin, N-cadherin, CD44+, CD24-, pierderea moleculei E-cadherin, pierderea adeziunii intercelulare și a polarității celulare, castigarea proprietății de migrare și invazie), celule stem tumorale (CSC)-populație heterogenă în diferite stadii (dormante, înalt proliferative, activitate crescută ALDH, exclusie Hoechst 33342, markeri de celule stem; Celule asociate tumorii: fibroblaste asociate tumorii, celule ale sistemului imun (polimorfo-nucleare-PMN, limfocite, macrofage, celule dendritice-DC), celule stem mezenchimale normale, celule endoteliale, adipocite, miofibroblaste.
3. Celulele din tumori se află în diferite etape de diferențiere, cu o rată de proliferare în general scăzută la cultivarea *in vitro* și capacitate scăzută de aderență la plăcile de cultură cu suprafețe din plastic. Astfel, celulele tumorale în cultura concurează pentru adeziunea la placa de cultură cu alte tipuri de celule, cum ar fi celulele mezenchimale stromale, celulele endoteliale, monocitele sau celulele dendritice. Inițierea unei culturi poate dura de la câteva zile la 4-6 săptămâni.
4. Menținerea unei culturi primare în stare proliferativă este dificilă, celulele necesitând anumiți factori de creștere sau alte bio-molecule active.

5. Cultivarea *in vitro* a culturilor primare din biopsiile tumorale poate sa duca la modificarea caracteristicilor inițiale ale celulelor tumorale, astfel încât acestea isi pot schimba fenotipul de celule epiteliale differentiate spre celule mai puțin differentiate, cu pierderea markerilor epiteliali specifici.

Datorita aspectelor mentionate mai sus, majoritatea cercetătorilor în domeniul oncologiei prefera sa utilizeze linii tumorale mamare imortalizate. O linie celulara stabilizata sau imortalizata este prin definitie o populatie celulara izolata din tumori primare care prezinta din start anomalii cromozomiale sau mutatii ce le permit sa prolifereze la nesfarsit si pot fi astfel cultivate pentru perioade lungi de timp fara sa-si modifice semnificativ fenotipul. Aceste populatii celulare pot fi obtinute si prin manipulare genetica prin transfectarea unor gene implicate in proliferare sau inhibitia mortii celulare. Studiile de cercetare fundamentale ce folosesc celule mamare tumorale se bazeaza majoritatea pe linii celulare imortalizate care sunt derivate în principal din metastaze ale cancerului mamar uman sau celule primare murine. Astfel cele mai cunoscute linii celulare (MCF-7 și MDA-MB231) au fost obtinute din metastazele tumorale, sau au fost stabilizate din probe tumorale provenite de la paciente care au fost deja supuse radioterapiei și chimioterapiei. Aceste linii tumorale contin celule aflate intr-o faza avansata de evolutie a fenotipului tumoral si caracteristicile lor moleculare si functionale nu pot fi intodeauna extrapolate la cancerele mamare din cazuistica clinica, in practica de zi cu zi. O singura linie celulara stabilizata este cunoscuta ca fiind intr-un stadiu precoce al progresiei tumorale (MCF-10), dar aceasta nu este derivata din celule de tip epitelial.

Liniile celulare imortalizate comerciale prezinta mai multe dezavantaje:

1. Reprezintă tipuri de celule tumorale extrem de invazive, deoarece majoritatea sunt derivate din efuziuni pleurale, deci nu recapituleaza diferitele stadii de creștere a tumorilor.
2. Nu contin celule care sa simuleze caracteristicile tumorilor neinvazive in stadii incipiente, precum carcinomul ductal *in situ*.
3. Majoritatea liniilor imortalizate sunt disponibile la pasaje relativ avansate, iar acest fapt poate duce la modificari de genotip si fenotip, sub presiunea unei selectii pozitive sau negative datorita multiplelor pasaje.
4. In general, sunt foarte puține informații despre originea liniilor disponibile.

Cunoscute fiind aceste limite ale cercetarii cu linii celulare stabilizate, s-a incercat dezvoltarea de metode de obtinere si mentinere in cultura a celulelor din tumorile pacientelor cu cancer de san. Inca din anii `80 s-a incercat izolarea acestora mai ales pentru personalizarea terapiilor in cancer, pornind in special de la caracterele particulare si individuale ale fiecărei tumori, aparand astfel notiunea de oncobiograma. Numeroase teste de predicție au fost elaborate în ultimii 50 ani, dar niciunul nu a fost încă implementat în practica clinică, majoritatea testelor rămânând la stadiul de cercetare clinică. Unul dintre motive este dat de heterogenitatea probelor care nu permite o standardizare a metodelor. Un alt obstacol este diferența de comportament a celulelor cultivate *in vitro* față de cele aflate *in vivo*. Cultivarea celulelor izolate din tumorile primare si testarea *in vitro* nu poate reproduce perfect micromediul tumoral și influența factorilor externi indusa de celulele sistemului imun sau circulația sanguină. Obținerea unor culturi primare tumorale cu selectia doar a celulelor tumorale si propagarea acestora in cultura este astfel o sarcina dificila. Exista cateva studii care raporteaza utilizarea de culturi primare de san in cercetarea oncologica, fiind descrise diferite metode de izolare si cultivare. Astfel, lipsa unor metode standardizate de procesare a fragmentelor tumorale obtinute de la pacienti, a protocoalelor de izolare a celulelor tumorale, dar si de cultivare a acestora in cadrul diferitelor laboratoare, duce la obtinerea de rezultate diferite al celulelor epiteliale mamare in experimentele *in vitro*.

Ca urmare a acestui fapt, exista o nevoie imediata pentru identificarea unor proceduri care sa duca la izolarea populatiilor tumorale din biopsiile analizate, ce poate fi ulterior

standardizate și transferate și altor laboratoare implicate în acest tip de analize, pentru a face posibilă compararea rezultatelor.

### **Metode disponibile de procesare a tumorilor**

Majoritatea metodelor de procesare a fragmentelor tisulare, descrise în literatura, presupun o fragmentare mecanică și o digestie enzimatică cu colagenază ± tripsina-EDTA ± dispaza sau hialuronidază [7].

O provocare importantă în izolarea celulelor epiteliale mamare este reprezentată de procedura de digestie și de fracționare a țesuturilor pentru obținerea subseturilor de celule existente într-o tumora. Au fost raportate diferite metode de obținere a celulelor epiteliale mamare din țesutul proaspăt, iar abordările variază în ceea ce privește manipularea mecanică (eliminarea țesutului adipos sau nu, marimea pieselor tumorale), digestia enzimatică (timpul digestiei, tipul de enzime/concentrația enzimelor adăugate-precum colagenază, hialuronidază sau o combinație a ambelor) sau separarea fracției celulare (prin filtrare secvențială sau centrifugare diferențială).

O alta abordare a separării fracției celulare tumorale vizează utilizarea de anticorpi monoclonali care au ca ținta celulele de tip epitelial (de ex. MUC1, CD227, CD44, CD24 sau EpCAM specifici celulelor epiteliale mamare) folosind bilute imuno-magnetice sau sortare prin citometrie de flux [8, 9].

Fiecare dintre aceste proceduri diferă în randamentul (numărul de celule) și viabilitatea celulelor izolate, datorită tipului de digestie aplicată, a etapelor de fracționare celulară și a mediilor de cultură folosite. Este important de asemenea de menționat că celulele din culturile primare se vor propaga limitat datorită apariției senescenței ce apare după 10-40 replicări celulare respectiv a fenomenului de *anoikis* (moarte programată dependentă de ancorajul celulelor la matricea extracelulară) ceea ce va împiedica cultivarea lor pe termen lung. Până acum nu există metode standardizate care să indice timpul optim de digestie enzimatică, concentrația enzimelor care este cea mai potrivită să extragă celulele tumorale din rețeaua de țesut conjunctiv, tipul de mediu de cultură și moleculele biologice active care ar permite proliferarea și creșterea celulară dar și păstrarea caracterelor primare ale celulelor izolate.

### **Metode de cultivare disponibile**

Metodele de cultivare clasice se bazează pe aplicarea patentului elaborat de Stampfer et al. în 1983 [10], care a stat de fapt la baza elaborării a numeroase protocoale de izolare a celulelor epiteliale. În cadrul acestui patent sunt descrise metodele de procesare și cultivare a celulelor din epiteliul mamar. Mediul dezvoltat în patentul lui Stampfer et al. (1983) [10] conține insulină (5-10 μg/ml), hidrocortizon (0.05-0.15 μg/ml), EGF (factor de creștere epidermal, 3-8 ng/ml), mediu condiționat obținut de la diferite linii celulare imortalizate (Hs74Int - linie de epiteliu intestinal fetal uman, și Hs767B1 - linie de celule umane epiteliale de vezică), estradiol ( $10^{-9}$  M), triiodotironină ( $10^{-8}$  M), toxina holerică (1-10 ng/ml) și concentrații foarte scăzute de ser fetal bovin (0.2-0.7%). Acest mediu este înalt selectiv pentru celulele de tip epitelial, cărora le oferă un avantaj de adeziune și proliferare față de celelalte subtipuri celulare existente în tumora.

Mai târziu Band și Sager [11] au folosit în plus față de hormoni și factori de creștere și extractul din glanda pituitară bovină, pentru a menține pe termen lung culturile de celule epiteliale mamare, adăugarea extractului de glanda pituitară permitând subculturi pentru 10-20 de pasaje, cu păstrarea caracterelor de tip epitelial.

În anii '90 s-a pus la punct un mediu serum-free (fără ser fetal bovin) și fără extract de glanda pituitară. Eliminarea serului fetal bovin și extractului de glanda pituitară este unul din dezideratele bio-ingineriei moderne pentru a evita riscurile unor boli transmise prin aceste derivate bovine cum este encefalita spongiformă precum și riscul de respingere a xenogrefelor

[12, 13]. Mediul bazal descris in patentul Stampfer et al. (1983) [10] era unul minimal conventional cum este mediul F-12 Ham sau mediul Dulbecco's Minimal Essential Medium. In prezent mediul de cultură celulară cel mai frecvent utilizat pentru a sustine creșterea in vitro a celulelor mamare de tip epitelial este mediul MCDB 170 fără ser, dezvoltat în anii 1980 de Ham și Stampfer [14], (ex, Lonza-MEGM), un mediu suplimentat cu hormoni estrogenici si factori de crestere si extract de glanda pituitara. Un dezavantaj al acestui mediu este inducerea unei senescente rapide a culturilor celulare.

În ciuda acestui aparent succes în dezvoltarea metodelor de cultură a celulelor epiteliale mamare, niciunul dintre aceste medii nu susține creșterea celulelor epiteliale mamare lumenale, care exprima intens citokeratine (in special citokeratina 19) [15].

Un alt aspect de urmarit, arata ca pentru propagarea si cresterea celulelor epiteliale izolate este esențial să se adapteze condițiile de cultură in care mediile și suplimentele de cultură celulară adecvate sunt esentiale in reusita cultivarii. Este de asemenea important de observat că majoritatea celulelor de tip epitelial depind de substrat (care reprezinta de obicei unul din componentele matricei extracelulare). Substratul imita mediul *in vivo*, promoveaza adeziunea celulară si mentine celulele in stare diferentiata. Cel mai folosit substrat este colagenul, iar o alternativa este fibronectina. In țesuturi, celulele interacționează atat între ele cat și cu matricea extracelulară. Pentru menținerea interacțiunii normale și a semnalizării, factorul cheie este reprezentat de densitatea de înșămânțare a celulelor tumorale, deoarece aceasta poate afecta atat producția de matrice extracelulară cat si metabolismul si viabilitatea acestora [16, 17,18].

Interogarea bazelor de date nationale si internationale cu privire la existenta unor brevete de inventii similare a identificat un numar de 4 brevete care descriu metode de izolare si cultivare de celule tumorale:

**US4423145A** se refera la elaborarea unui mediu de cultura complex selectiv pentru izolarea celulelor epiteliale mamare umane si cresterea lor ca **agregate celulare in cultura**. Metoda include descrierea izolarii agregatelor celulare prin metoda enzimatica, a mediului de cultivare si a obtinerii unor clone celulare prin subcultivare. Mediul descris este serum-free, contine factori de crestere (EGF) si hormoni (insulina, hidrocortizon), toxina holerica precum si mediu conditionat obtinut de la alte linii celulare stabilizate umane (Hs74Int-linie de epiteliu intestinal fetal) si Hs767Bi (linie de epiteliu de vezica urinara fetala). Metoda nu descrie evaluarea expresiei de markeri caracteristici epiteliali. Un dezavantaj major este folosirea mediului conditionat obtinut de la culturile celulare de epiteliu fetal uman, care nu poate fi usor standardizat si care ar putea prezenta diferente de la o cultura la alta. Patentul a stat la baza a numeroase cercetari in domeniul culturilor primare de epiteliu mamar. Metoda prezentata este destul de laborioasa si costisitoare.

**US5026637A** prezinta metoda de obtinere a doua linii imortalizate de celule epiteliale mamare, cu descrierea obtinerii culturilor din tesut mamar normal prin digestie enzimatica cu colagenaza si hialuronidaza. Mediul de cultura este DMEM+F12, cu 5% ser de cal, toxina holerica 100 ng/ml, EGF 20ng/ml, insulina 10μg/ml si cortizol 1.4x10<sup>-6</sup>M. Cele doua linii izolate MCF-10A si MCF10B se caracterizeaza prin diviziuni nelimitate (imortalizate) datorate achizitiei unei mutatii in timpul cultivarii cu concentratii crescute cu ioni de Ca<sup>2+</sup>, dupa ziua 667. Brevetul ofera un instrument de cercetare a celulelor epiteliale mamare normale.

**US006074874A** prezinta o metoda de izolare a celulelor epiteliale din tesut mamar normal, folosind doar procesarea mecanica si cultivarea pe substrat de Matrigel in mediul Magee-Women's Research Institute-I ("MWRI-I"): mediu DMEM cu diferite concentratii de ser fetal bovin tip Hyclone, si β-mercapto-etanol. Dezavantajul metodei prezentate consta in utilizarea substratului de Matrigel, produs comercial mai greu de manipulat, fiind necesar sa fie utilizat la temperaturi de 4°C pentru a nu permite gelificarea necontrolata.

**US20080176267A1** prezinta o metoda de izolare a celulelor tumorale de tip epitelial din cancerul mamar prin obtinere de explante (fragmente tisulare intre 0.5 si 3mm diametru), fara a folosi digestia enzimatica, si cultivarea acestora fara substrat, intr-un mediu comercial MaCA medium (Mammary Epithelial Growth Medium Promocell) suplimentat cu extract de glanda pituitara bovina 13mg/ml, hidrocortizon 0.5mg/ml, EGF 10µg/ml, insulin 5mg/ml. Celulele care vor migra in afara explantelor sunt apoi tripsinizate si filtrate pentru obtinerea unei suspensii monocelulare. Dezavantajul acestei metode este folosirea extractului bovin pituitar in mediul de cultura.

### **Descrierea inventiei**

Problema tehnica pe care o rezolva prezenta inventive se refera la obtinerea de celule tumorale de tip epitelial cu un timp de procesare cat mai scurt si costuri cat mai scazute, avand in vedere numarul mare de cazuri noi diagnosticate intr-un spital oncologic, care ar necesita o testare cat mai rapida. Prin aplicarea acestei metode se va permite procesarea probelor tisulare si investigarea celulelor tumorale de la pacientele cu cancer mamar, facilitand stabilirea unor terapii personalizate in cel mai scurt timp.

Procedeul de obtinere de celule tumorale mamare de tip epitelial consta in aceea ca in **prima etapa** se obtine o suspensie monocelulara prin procesare mecanica si enzimatica a fragmentelor bioptice. Digestia enzimatica propusa foloseste un protocol in care fragmentele tisulare sunt imersate in solutie tampon salina suplimentata cu clorura de calciu si clorura de magneziu (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with calcium chloride and magnesium chloride-Sigma Aldrich) si expuse la o solutie de colagenaza (concentratie finala de 0.1 mg/ml) la o temperatura de 37°C timp de 20-30 de minute, pe un agitator rotativ la 150-200 rpm. Majoritatea protocoalelor din literatura descriu acesta digestie enzimatica in prezenta de mediu cu ser fetal sau solutie tampon fosfat fara adaugarea ionilor de  $Ca^{2+}$  si  $Mg^{2+}$ , care sunt activatori enzimatici. De asemenea in aceste protocoale expunerea probelor tisulare la activitatea colagenazei este prelungita de la 40 min la 24 ore. In metoda expusa aici activitatea enzimei este stopata prin adaugarea de mediu rece DMEM+F-12 HAM suplimentat cu 10% FBS. Fragmentele tisulare si celulele eliberate din biopsii sunt procesate prin filtrare cu filtre Filcons cu retea cu pori de 70µm pentru obtinerea unei suspensii monocelulare care este ulterior centrifugata. Celulele obtinute in peletul celular se resuspenda si se numara automat cu ajutorul unui cell counter (EVE™) care permite si evaluarea viabilitatii celulare. In a **doua etapa** este descrisa pregatirea placilor de cultura cu substrat de colagen si fibronectina, substrat care va permite adeziunea celulelor de tip epitelial si activarea cailor de semnalizare specifice acestor celule. In **etapa 3** se insamanteaza celulele tumorale in placile cu substrat in mediu EGM2 si se mentin in cultura pana la obtinerea unui numar suficient pentru evaluarea fenotipica si genetica/genomica.

### **Avantajele aduse de aplicarea acestei inventii:**

- Rata mare de succes (din 65-70% din biopsiile procesate s-au izolat celule si s-au obtinut culturi celulare cu viabilitate si diviziune celulara crescuta). Eficienta de obtinere **de culturi primare este in jur de 70%**, in functie de calitatea materialului biptic
- Folosirea unei cantitati reduse de tesut tumoral, obtinute prin punctie biopsie, recoltata simultan cu fargmentele tisulare necesare diagnosticului.
- Timpul de prelucrare al fragmentelor bioptice este relativ scurt, in jur **de 2 ore**
- Nu necesita conditii speciale de cultivare, procedura poate fi efectuata intr-un laborator clasic de culturi de celule, fara a necesita aparatura suplimentara costisitoare.
- Se poate obtine un numar suficient de celule tumorale (de ordinul  $1-2 \times 10^6$ ) in timp relativ scurt, de 2-3 saptamani.

In continuare se prezinta **un exemplu** de realizare a procedurii de obtinere de celule tumorale de tip epitelial si in tranzitie epitelio-mezenchimala din cancererele mamare, cu caracterizarea acestora din punct de vedere fenotipic pentru cei mai importanti markeri epiteliali si mezenchimali.

Procedeu presupune mai multe etape, conform protocolului din Figura 1.

### **Etapa 1.**

**Recoltarea biopsiilor** : biopsiile sunt recoltate pre-terapeutic prin tehnica aspirarii cu ac fin sub ghidaj ecografic. Fragmentul tisular este imersat in 5 ml de mediu de cultura complet (DMEM 4.5 g/l glucoza+F-12 HAM, suplimentat cu 10% ser fetal bovin, 1% antibiotic (penicilina+streptomicina), 1% aminoacizi neesentiali, 2mM L-glutamina) si trimise la laboratorul de culturi de celule pentru prelucrare. Fragmentele tisulare pot fi procesate imediat sau in interval de 24 ore de la recoltare, daca acestea sunt pastrate in mediul de recoltare la 4°C pana la procesare.

**Procesarea biopsiilor**: Fragmentul tisular este transferat in placi Petri cu diametru de 3 cm si procesat mecanic cu forfecute fine in fragmente cat mai mici de ordinul 2-3 mm. Intreg procesul are loc in conditii sterile (nisa in flux laminar, instrumente si consumabile sterile). Celulele eliberate prin dezagregarea mecanica sunt preluate periodic cu o seringa pentru insulina, filtrate prin filtre Filcons cu retea de 70 µm si colectate in erubeta tip Falcon de 15 ml pentru obtinerea unei suspensii monocelulare. Celulele sunt centrifugate si spalate in PBS (Phosphate Balanced Salt Solution), un tampon fosfat salin cu pH in domeniul fiziologic (pH 7.2-7.4) cu rol in mentinerea unui echilibru osmotic intra- si extracelular si asigurarea necesarului de apă și ioni anorganici esentiali pentru metabolismul celular normal.

**Digestia enzimatica**: pentru eficientizarea metodei de izolare a celulelor din biopsiile tumorale, pe langa procesarea mecanica se aplica un protocol de digestie enzimatica cu colagenaza 0.1% in PBS. Fragmentele tisulare procesate mecanic ramase in placuta Petri sunt spalate de 3 ori cu PBS continand CaCl<sub>2</sub> (0.133g/l) si MgCl<sub>2</sub> (0.1 g/l) si la final imersate in 900 µl PBS cu CaCl<sub>2</sub> si MgCl<sub>2</sub>. Se adauga 100 µl de solutie stock de colagenaza de 100 mg/ml, rezultand o concentratie finala a colagenazei de 10 mg/ml. Placuta Petri cu fragmentele tumorale este plasata intr-un incubator la 37°C timp de 20 min pe un dispozitiv rotativ (setat la 150-200rpm). Dupa terminarea perioadei de incubare, se adauga 3 ml de mediu complet la fragmentele tisulare (explantele) ramase si se reia procesul de procesare mecanica descris mai sus. Suspensia celulara rezultata este filtrata prin filtre Filcons si celulele sunt colectate in alta eprubeta de 15 ml. Suspensiile monocelulare si explantele sunt apoi centrifugate la 1100 rpm timp de 5 min, iar peletul de celule obtinut este resuspendat in 1 ml de mediu EGM2. Celulele astfel obtinute sunt numarate si evaluate din punct de vedere al viabilitatii celulare cu Tripan blue.

### **Etapa 2**

**Pregatirea substratului de colagen cu fibronectina**: se folosesc placi de 6 godeuri cu suprafata tratata pentru culturi celulare. Se pregateste un amestec vol/vol de solutie de colagen (20 µg/ml in PBS) si o solutie de fibronectina (10 µg/ml PBS) cu o concentratie finala de colagen de 10 µg/ml si fibronectina de 5 µg/ml. Din acesta solutie stoc se adauga in fiecare godeu al placii cate 1 ml si se incubeaza la 37°C timp de 20 min. Dupa terminarea perioadei de incubare solutia este recuperata (se poate permite re folosirea ei la 3-4 astfel de proceduri) si placile se lasa cu capacul deschis in nisa de flux laminar pentru uscare.

### **Etapa 3**

**Cultivarea suspensiilor monocelulare in mediu de tip epitelial (EGM2)**: suspensia monocelulara, dupa numararea si stabilirea viabilitatii celulare, este insamantata pe placile cu 6 godeuri acoperite cu substratul de colagen si fibronectina in 3 ml **mediu EGM-2** (Epithelial Growth Medium) per godeu. Acest mediu contine factori de crestere ce permit selectia celulelor

tumorale de tip epitelial (diferentiate) si este formulat dupa cum urmeaza: mediu DMEM cu 4.5g glucoza/l : F-12 HAM (vol:vol), 10% ser fetal bovin, 50 µg/ml toxina holerica, 30 ng/ml factor de crestere epidermal (EGF-Epidermal Growth Factor), 20 ng/ml factor basic de crestere al fibroblastilor (basicFGF-Fibroblast Growth Factor), 1% supliment N2 (din solutia stock x100, reactiv Gibco obtinut dupa formula lui Bottenstein; contine transferina umana, insulina, progesteron, putresceina si selenit de sodiu), 1% supliment B27 (din solutia stock x50 reactiv Gibco; contine un cocktail antioxidant), 10 nM dexametazona, 1% ITS (insulina, transferina, selenium-reactiv Gibco). Culturile se mentin la 37 °C intr-un incubator cu 5% CO<sub>2</sub> si se vizualizeaza periodic la un microscop inversat in contrast de faza. Dupa aderare, mediul se schimba periodic la 3-4 zile. In **Figura 2A** se observa un placard de celule de tip epiteliale si in tranzitie epitelio-mezenchimala aderate la substratul de collagen + fibronectina cultivate in mediul EGM2 timp de 4 zile (BMG 79) In **Figura 2B** se observa o cultura primara la 21 de zile de la insamantare pe substrat de collagen+fibronectina in mediu EGM2 (BMG 64). Aspectul celulelor este de tip epitelial organizate in placarde. In **Figura 3A** este ilustrata o cultura de 30 zile, ajunsa la confluenta, pe substrat de colagen+fibronectina in mediu EGM2, cu aspect mixt de celule epiteliale si celule in tranzitie epitelio-mezenchimala (BMG118). Aceeasi cultura (BMG118) este ilustrata in **Figura 3B**, la pasajul 3 dupa 60 de zile. Acesta cultura a suferit o tranzitie epitelio-mezenchimala la pasajul 3, pastrand o rata de proliferare crescuta.

#### **Etapa 4**

##### ***Caracterizarea fenotipica a celulelor izolate prin coloratii imunocitochimice:***

validarea culturilor obtinute se realizeaza prin coloratii imunocitochimice cu anticorpi specifici celulelor mezenchimale (vimentin) si celulelor de tip epithelial (EpCAM, Pancitokeratina si E-Cadherin). La pasajul 1 celulele sunt tripsinizate si insamantate pe placute camerale cu 8 godeuri. Dupa 2 zile, celulele aderate sunt fixate cu paraformaldhida 4% (solutie in PBS) timp de 20 min dupa care sunt spalate de 3 ori cu PBS. Fixarea este urmata de o etapa de permeabilizare cu triton X100, solutie 0.1% timp de 15 min, urmata de 3 spalari cu PBS. Posibilitatea unor legari nespecifice a anticorpilor este blocata prin incubare cu 10% BSA (Bovin Serum Albumin), timp de 20 min, dupa care se efectueaza marcarea cu anticorpii monoclonali primari: coloratie cu EpCAM (anticorp maraca cu FITC), pancitokeratina maracata cu PE (phycoerthrine), Vimentin FITC si E-Cadherina PE. Probele sunt incubate peste noapte la 4°C, iar apoi sunt splate de 3X cu PBS. Placutele camerale sunt montate cu colorantul DAPI pentru evidentierea nucleilor si vizualizate in fluorescenta folosind filtrele de 346, 488 si 546 nm, cu un microscop Zeiss Axiovert D1. Preluarea si prelucrarea de imagini se efectueaza cu un program de morfometrie Axiovert 4.6. In Figura 3 se observa expresia celulelor izolate dintr-o tumora mamara pentru markerii epiteliali (EpCAM, pancitokeratina, E-cadherina) si mezenchimali (vimentin). Se observa o co-expresie a markerilor atat epiteliali (mai intens pentru EpCAM) cat si mezenchimali (vimentin), sugerand un fenotip de tranzitie epitelio-mezenchimala.

##### ***Caracterizarea fenotipica a celulelor izolate prin citometrie de flux***

Biopsiile procesate, care au prezentat o rata de izolare buna a celulelor, care au proliferat si au prezentat un numar suficient de celule au fost fixate cu paraformaldehida 4% timp de 20 min. Fixarea celulelor s-a efectuat dupa tripsinizarea lor si spalare cu PBS prin centrifugare timp de 5 min la 1200 rpm. Dupa fixare s-a mai efectuat o spalare cu PBS si celulele au fost pastrate la 4°C pana la marcarea lor. Marcarea s-a efectuat dupa cum urmeaza: celulele au resuspendate in 90-95µl PBS rece. La acesta suspensie s-au adaugat 5-10 µl din anticorpii monoclonali conjugati cu fluorocromi: CD24 PE, CD44 FITC, EpCAM FITC, pancitokeratina PE, CD29 PE. Pentru Vimentina, care este situata intra-citoplasmatic s-a aplicat permeabilizarea timp de 5 min cu Perm Wash Buffer x10 (Intracellular staining- Biolegend). Celulele au fost incubate timp de 30 min la 4°C la intuneric. Suspensiile celulare au fost apoi



spalate cu PBS rece si resuspendate in 100 µl PBS rece si au fost analizate cu un flowcitolmetru BIORAD. Rezultatele obtinute sunt prezentate in Figura 3 si Tabelul 2. Majoritatea culturilor primare analizate au prezentat un fenotip de tranzitie epiteliu-mezenchimal. Markerii CD24, EpCAM, E-cadherina si pan-citokeratina sunt exprimatii de celulele epiteliale. Markerii de celule mezenchimale sunt CD44 vimentina si CD29. Se observa ca expresia de CD 44 si vimentin au avut valori foarte mari in cazurile BMG 89, 98 si 99.

Tabel 2. Evaluarea markerilor epiteliali si mezenchimali in celulele tumorale izolate si cultivate conform procedurii descrise in propunerea de brevet.

Proba	%						
	CD24	E-caderina	EpCAM	Pan-citokeratina	CD44	Vimentin	CD29
BMG 75	64.16	-	8.72	-	-	58.94	-
BMG 89	13.80	-	-	-	80.10	88.16	-
BMG 98	22.21	1.23	-	6.59	99.81	98.06	-
BMG 99	6.68	-	-	-	84.71	63.49	-
BMG 108	10.77	6.26	-	-	98.93	-	20.26
BMG 110	-	2	1	-	90	25	30
BMG 119	-	-	-	-	96	98	95
BMG 123	-	-	1.8	-	80	30	87

#### Descriere figuri:

**Figura 1.** Diagrama etapelor de procesare a biopsiilor tumorale pentru obtinerea culturilor primare

**Figura 2.** Aspectul in microscopia optica a celulelor izolate din biopsiile mamare cultivate in mediul EGM2 pe substrat de colagen+fibronectina la A) 4 zile si B) 21 zile

**Figura 3.** Aspectul in microscopia optica a celulelor izolate din biopsiile mamare cultivate in mediul EGM2 pe substrat de colagen+fibronectina la A) 30 de zile si B) la pasajul 3, la 60 zile de la initierea culturii primare

**Figura 4.** Expresia celulelor izolate dintr-o tumora mamara pentru markerii epiteliali: A) EpCAM, B) pancitokeratina, E) E-cadherina) si mezenchimali: D) Vimentina. Nucleii sunt marcati cu DAPI (C, F)

#### Referinte:

1. Wellenstein MD, de Visser KE. Cancer-Cell-Intrinsic Mechanisms Shaping the Tumor Immune Landscape. *Immunity*. 2018;48(3):399-416
2. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med*. 2018;24(5):541-550
3. Bhat V, Allan AL, Raouf A. Role of the Microenvironment in Regulating Normal and Cancer Stem Cell Activity: Implications for Breast Cancer Progression and Therapy Response. *Cancers (Basel)*. 2019;11(9)
4. Ferdinando Mannello Understanding breast cancer stem cell heterogeneity: time to move on to a new research paradigm. *BMC Med*. 2013; 11: 169. Published online 2013 Jul 23. doi: 10.1186/1741-7015-11-169.
5. Rodon J, Soria JC, Berger R, et al. Genomic and transcriptomic profiling expands precision cancer medicine: the WINTHER trial. *Nat Med*. 2019;25(5):751-758.

6. Janik K, Popeda M, Peciak J, Rosiak K, Smolarz M, Treda C, Rieske P, Stoczynska-Fidelus E, Ksiazkiewicz M. Efficient and simple approach to in vitro culture of primary epithelial cancer cells. *Biosci Rep.* 2016 Dec 9;36(6). pii: e00423. doi: 10.1042/BSR20160208. Print 2016 Dec.
7. Linnemann JR, Miura H, Meixner LK, Irmeler M, Kloos UJ, Hirschi B, Bartsch HS, Sass S, Beckers J, Theis FJ, Gabka C, Sotlar K, Scheel CH. Quantification of regenerative potential in primary human mammary epithelial cells. *Development.* 2015 Sep 15;142(18):3239-51. doi: 10.1242/dev.123554. Epub 2015 Jun 12.
8. Zubeldia-Plazaola A, Ametller E, Mancino M, Prats de Puig M, López-Plana A, Guzman F, Vinyals L, Pastor-Arroyo EM, Almendro V, Fuster G, Gascón P. Comparison of methods for the isolation of human breast epithelial and myoepithelial cells. *Front Cell Dev Biol.* 2015 May 21;3:32. doi: 10.3389/fcell.2015.00032. eCollection 2015.]
9. Speirs V, Green AR, Walton DS, Kerin MJ, Fox JN, Carleton PJ, Desai SB, Atkin SL. Short-term primary culture of epithelial cells derived from human breast tumours. *Br J Cancer.* 1998 Dec;78(11):1421-9.]
10. Stampfer, Martha R., Smith, Helene S., and Hackett, Adeline J. Enhanced growth medium and method for culturing human mammary epithelial cells. United States: N. p., 1983. Web. <https://www.osti.gov/biblio/864822-enhanced-growth-medium-method-culturing-human-mammary-epithelial-cells>
11. Band. V, and Sager, R. Distinctive trails of normal and tumor derived human mammary epithelial cells expressed in a medium that supports long-term growth of both cell types. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 1249-1253, 1989.][Hammond SL, Ham RG, Stampfer MR. Serum-free growth of human mammary epithelial cells: rapid clonal growth in defined medium and extended serial passage with pituitary extract. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Sep;81(17):5435-9
12. Petersen, O. W., and van Deurs. B. Preservation of defined phenotypic traits in short-term cultured human breast carcinoma derived epithelial cells. *Cancer Res.*, 47: 856-866, 1987.
13. Ethier SP, Mahacek ML, Gullick WJ, Frank TS, Weber BL. Differential isolation of normal luminal mammary epithelial cells and breast cancer cells from primary and metastatic sites using selective media. *Cancer Res.* 1993 Feb 1;53(3):627-35.
14. Lee JK, Bloom J, Zubeldia-Plazaola A, Garbe JC, Stampfer MR, LaBarge MA. Different culture media modulate growth, heterogeneity, and senescence in human mammary epithelial cell cultures. *PLoS One.* 2018 Oct 1;13(10):e0204645. doi: 10.1371/journal.pone.0204645. eCollection 2018
15. Bartek. J., Papadimitriou. J. T. Miller. N.. and Millis. R. Patterns of expression of keratin 19 as detected with monoclonal antibodies in human breast tissues and tumors. *Int. J. Cancer.* 36: 299-306, 1985.
16. Emerman JT, Burwen SJ, Pitelka DR. Substrate properties influencing ultrastructural differentiation of mammary epithelial cells in culture. *Tissue Cell.* 1979;11(1):109-19.
17. Chandrasekaran S., Guo N. H., Rodrigues R. G., Kaiser J., et al. Pro-adhesive and chemotactic activities of thrombospondin-1 for breast carcinoma cells are mediated by alpha3beta1 integrin and regulated by insulin-like growth factor-1 and CD98. *J Biol Chem.* 1999; 274 (16): 11408–11416.
18. Williams CM, Engler AJ, Slone RD, Galante LL, Schwarzbauer JE. Fibronectin expression modulates mammary epithelial cell proliferation during acinar differentiation. *Cancer Res.* 2008 May 1;68(9):3185-92. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2673.

## REVENDICARI

1. Procedeu de izolare si expansionare a celulelor tumorale de tip epitelial si a celulelor in tranzitie epitelio-mezenchimala din biopsiile de cancer mamar, constand in mai multe etape de procesare a pieselor bioptice. Procedeu este **caracterizat prin aceea ca** in prima etapa se obtin celule in suspensie monocelulara prin procesare mecanica si digestie enzimatica, cultivarea acestora pe placi acoperite de substrat de colagen si fibronectina in mediu selectiv EGM2, rezultand celule tumorale cu fenotip epitelial si de tranzitie epitelio-mezenchimala.
2. Procedeu conform **revendicarii 1**, caracterizat prin aceea ca procesarea pieselor bioptice se face mecanic si prin digestie enzimatica cu colagenaza obtinuta din filtratul culturilor de Clostridium histolyticum la o concentratie de 0.1mg/ml in solutie de tampon fosfat salin cu CaCl<sub>2</sub> si MgCl<sub>2</sub> la 37°C pentru 20-30 min. Activitatea colagenazei este inactivata cu mediu rece cu 10% ser fetal bovin, iar fragmentele tisulare ramase sunt din nou procesate mecanic. Suspensia celulara rezultata este filtrata prin filtre Filcons, colectata si centrifugata la 1100 rpm timp de 5 min.
3. Procedeu conform **revendicarii 2**, caracterizat prin pregatirea placilor de culturi celulare prin tapetare cu substrat de colagen si fibronectina. In placile de cultura se adauga o solutie de solutie de colagen (20µg/ml in PBS) si o solutie de fibronectina (10µg/ml PBS) cu o concentratie finala de colagen de 10µg/ml si fibronectina de 5µg/ml. Placile se incubeaza 37°C timp de 20 min, dupa care solutia este recuperata si placile tratate se usuca in nisa in flux laminar.
4. Procedeu conform **revendicarii 3**, caracterizat prin aceea ca suspensia monocelulara de celule obtinuta prin procesare mecanica si enzimatica este insamantata pe placile cu substrat de colagen si fibronectina in mediu de cultura selectiv de crestere a celulelor epiteliale- EGM2 (Epithelial Growth Medium), care este formulat dupa cum urmeaza: mediu DMEM cu 4.5g glucoza/l : F-12 HAM (vol:vol), 10% ser fetal bovin, 50µg/ml toxina holerica, 30ng/ml factor de crestere epidermal, 20ng/ml factor basic de crestere al fibroblastilor, 1% supliment N2, 1% supliment B27, 10nM dexametazona, 1% ITS (insulina, transferina, selenium).

## DESENE

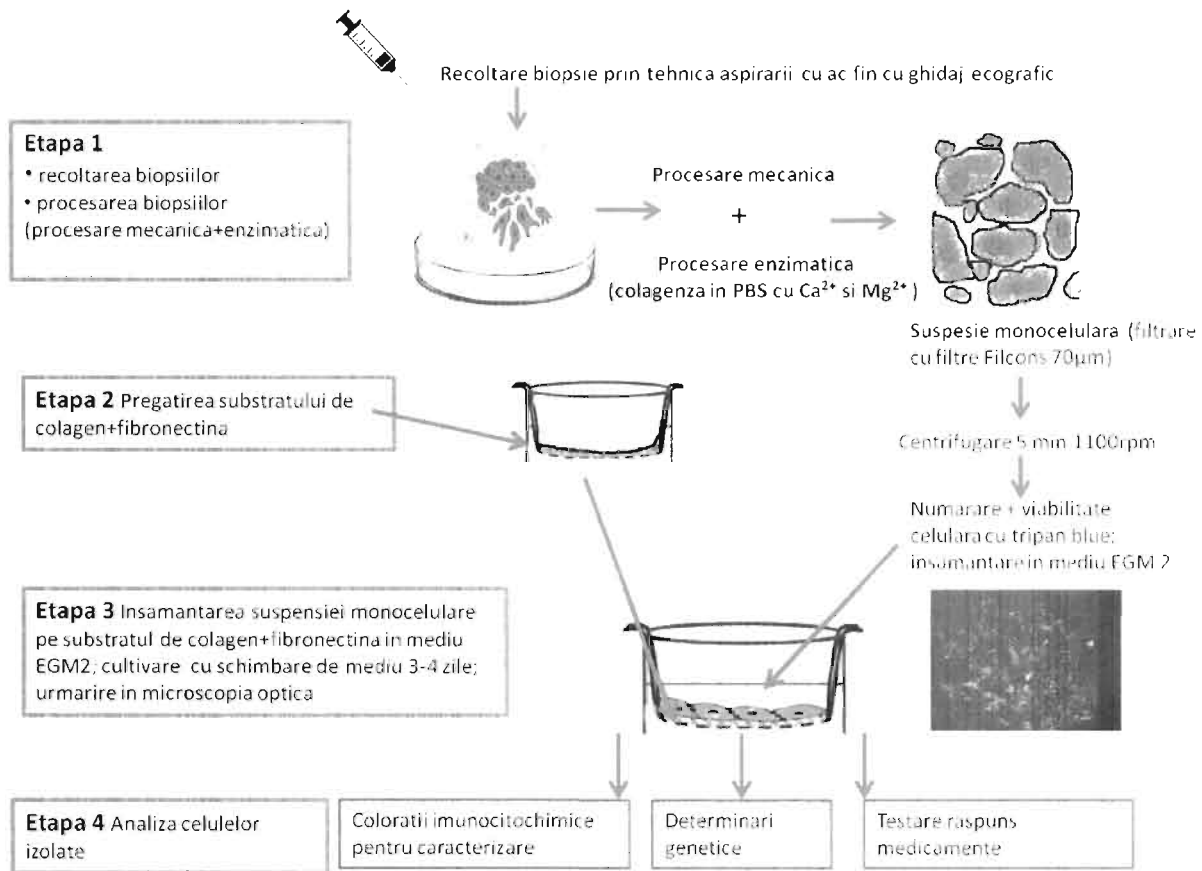


Figura 1.

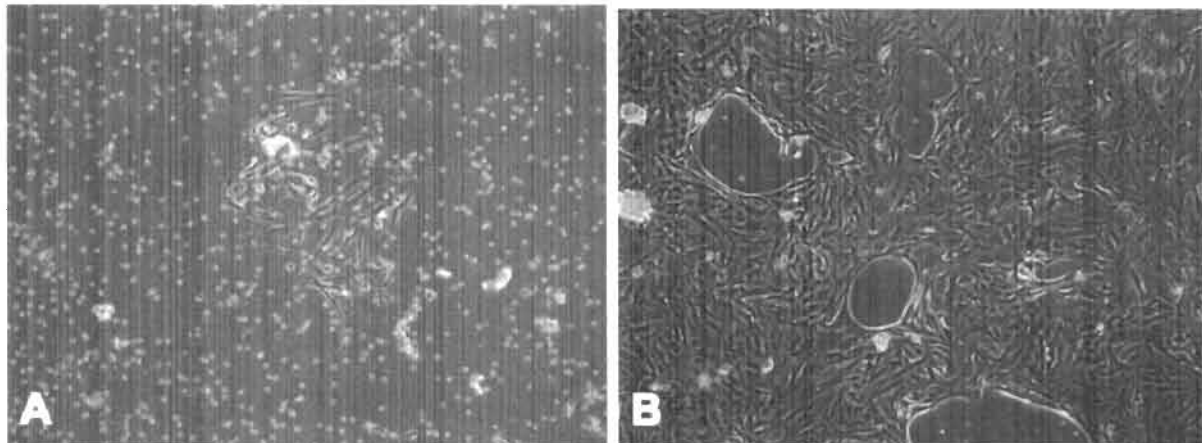


Figura 2.

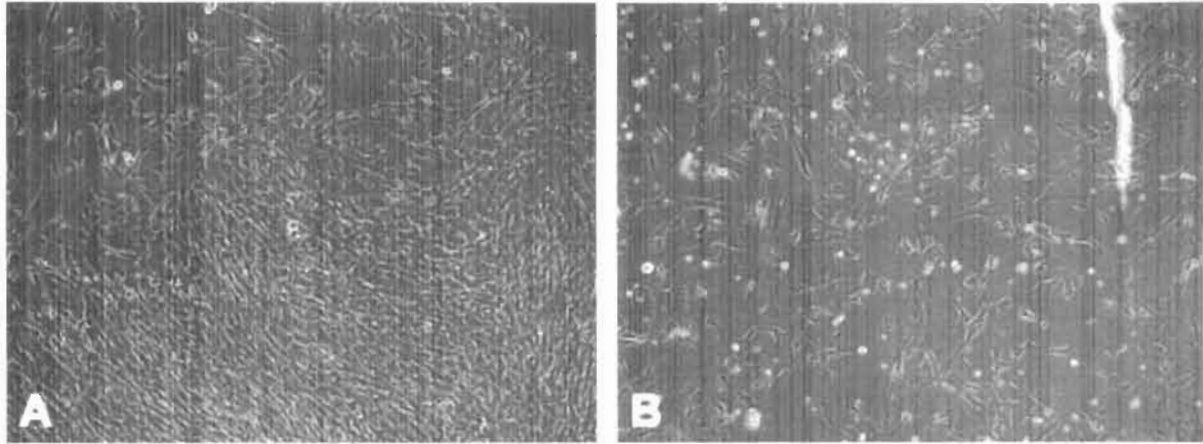


Figura 3.

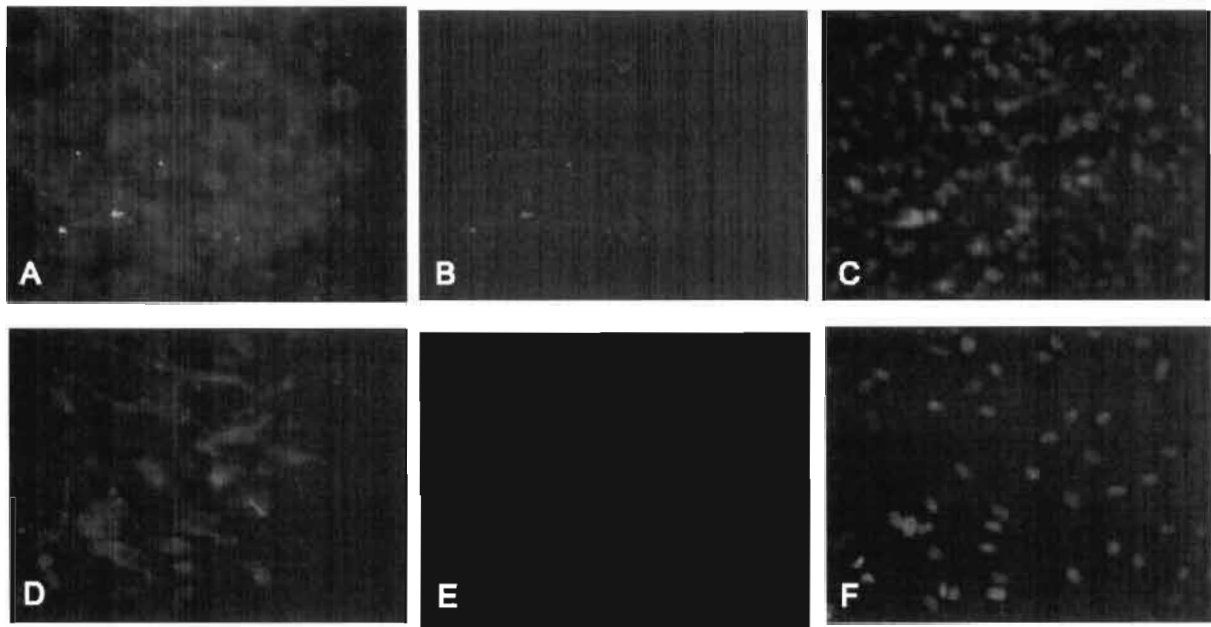


Figura 4.