



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00017

(22) Data de depozit: 20/01/2021

(41) Data publicării cererii:
30/07/2021 BOPI nr. 7/2021

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI
PATOLOGIE CELULARĂ "NICOLAE
SIMIONESCU", STR. B.P. HAȘDEU NR. 8,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• FILIPPI ALEXANDRU, STR. HAȚEGANA,
NR. 7A, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• ALEXANDRU-MOISE NICOLETA,
ALEEA MARIUS EMANOIL BUTEICA,
NR. 29-33, SC. 1, AP. 17, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• CONSTANTIN ALINA,
ALEEA COLOANA INFINITULUI, NR. 5,
BL. K, SC. 2, AP. 27, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;

• COMARIȚA KARLA, STR. MĂRĂȘEȘTI,
NR. 49, BL. 29, SC. C, ET. 1, AP. 4, SUCEAVA,
SV, RO;
• VÎLCU ALEXANDRA, BD. UNIRII, BL. 26,
SC. A, AP. 7, BUZĂU, BZ, RO;
• PROCOPCIUC ANASTASIA,
BD. METALURGIEI, NR. 29C, BL. C4, ET. 4,
AP. 29, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• GEORGESCU ADRIANA MIHAELA,
STR. BOZIENI, NR. 7, BL. 830, SC. 2, AP. 78,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(74) Mandatar:
CABINET DE PROPRIETATE
INDUSTRIALĂ "LAZĂR ELENA",
B-DUL UNIRII, BL. 16C, AP. 12, OP 1,
CP 52, BUZĂU, JUDEȚUL BUZĂU

(54) PROCEDU DE OBȚINERE A VEZICULELOR
EXTRACELULARE MODIFICATE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a veziculelor extracelulare modificate utilizate în tratarea bolilor cardiovasculare și în special a hipertrofiei ventriculare și a disfuncției vasculare asociată aterosclerozei. Procedeu, conform invenției constă în etapele de: (1) izolarea celulelor stem de la un subiect, (2) cultivarea celulelor stem în condiții care să ducă la producerea de VEC în mediul de cultură, (3), purificarea VEC din mediul de cultură condiționat prin centrifugare inițială, ultracentrifugare pentru eliminarea corpiilor apoptotici din mediu, respectiv, pentru sedimentarea VEC și

spălare într-o soluție apoasă, (4) încapsularea siARN anti-Smad2/3 în VEC prin complexarea siARN anti-Smad2/3 cu lipofectamină și punerea în contact a complexelor de siARN anti-Smad2/3-lipofectamină cu veziculele extracelulare, rezultând VEC cu conținut genetic modificat cu stabilitate bună la temperatura camerei și care se depozitează pe termen lung prin congelare pentru utilizare clinică.

Revendicări: 9
Figuri: 11



Ex. 004. eu onf/nelul
- 35 pas.

Procedeu de obtinere a veziculelor extracelulare modificate

Cerere de brevet de invenție	
Nr.	2 21 00019
Data depozit	20-01-2021

Invenția se referă la un procedeu de obtinere a veziculelor extracelulare modificate, sunt destinate pentru utilizarea lor în tratarea bolilor cardiovasculare, mai precis a hipertrofiei ventriculare și a disfuncției vasculare asociată aterosclerozei.

Stadiul Tehnicii

Ateroscleroza este una dintre cele mai importante și frecvente cauze de deces și invaliditate din lume, favorizând o diversitate de evenimente cardiovasculare majore. Ateroscleroza ca boala inflamatorie cronică a peretelui arterial este strâns legată de retenția lipoproteică subendotelială, activarea endotelială și migrarea celulelor imune în intima inflamată, determinând formarea de striuri lipidice și ulterior de ateroame (vezi, Libby P, 2002, și Hansson GK., 2005).

Membrii familiei Smad sunt componente esențiale în calea de semnalizare intracelulară a TGF- β . Membrii superfamiliei TGF- β controlează proliferarea, diferențierea, migrarea și apoptoza a numeroase tipuri celulare. Proteinele Smad2 și Smad3, sunt mediatori secundari activați în urma stimulării receptorului T β R-I cu TGF- β (vezi Nakao et al., 1997).

Răspunsurile antiproliferative și apoptotice generate de semnalizarea prin TGF- β în celulele endoteliale și hematopoietice limitează creșterea acestor linii celulare și contribuie la transdiferențierea celulelor endoteliale în celule mezenchimale (vezi Siegel, P. M., și Massagué, J., 2003), mecanisme care sunt de natură să agraveze evoluția aterosclerozei. Totuși, semnalizarea prin TGF- β are o miriadă de efecte în tipuri celulare diferite, creând astfel necesitatea blocării țintite în țintele celulare de interes.

Microparticulele (MP) sunt vezicule de dimensiuni mici (0,1-1,5 μ m) eliberate de diferite tipuri de celule printr-un proces controlat. Acestea contin markeri citoplasmatici și de suprafață ai celulelor lor de origine (vezi Hugel B., et al., 2005 și Prokopi M., et al., 2009) iar odată eliberate în circulație, MP leagă și fuzionează cu celulele lor țintă prin interacțiuni receptor-ligand, acționând ca vectori biologici care mediază inflamația vasculară și coagularea (vezi Mause SF., et al., 2010).

Datele actuale indica faptul că efectele pro-inflamatorii și pro-coagulante ale MP asupra celulelor țintă sunt cauzate de compoziția lipidică specifică a acestora

Uscipri

Uscipri

Alexandru

Alexandru

(ex. Fosfatidilserina, PS), precum și de transferul componentelor celulare inflamatorii de la celulele lor de origine (vezi Hugel B., et al., 2005). De asemenea, s-a aratat ca MP transportă ARN mesager și microARN (miARN), afectând astfel exprimarea proteică a celulelor țintă, cu implicații în disfuncția vasculară și ateroscleroză (vezi Ratajczak J, et al., 2006 și Shu, Z. et al., 2019), sugerând că MP ar putea deveni o țintă terapeutică (vezi Baron M, et al., 2011).

Un alt vehicul biologic de miARN este reprezentat de exozomi. Aceștia sunt definiți ca vezicule mici de diametru 40-80nm, ajungând chiar și la 100nm, eliberate din celule prin exocitoza corpurilor multiveziculari constitutivi. La fel ca MP, exozomii prezintă receptori de suprafață, proteine bioactive și material genetic de la celulele de origine și comunică cu celulele țintă eliberându-și conținutul în acestea și determinând schimbări ale exprimării genice. Datorită modului similar de acțiune al exozomilor și MP, aceste nanovezicule sunt denumite colectiv vezicule extracelulare (VEC).

Deși se anticipează că VEC vor juca roluri în tratamentul mai multor boli, incluzând bolile cardiovasculare, în prezent, nu există tratamente pe bază de VEC în curs de testare în studii clinice (vezi Rayyan, M. et al., 2018)

Dezavantaje ale stadiului tehnicii

1. Tratamentele existente în prezent pentru prevenirea și tratamentul aterosclerozei sunt nespecifice adresând în principal ameliorarea factorilor etiologici.
2. Tratamentele existente în prezent pentru prevenirea și tratamentul aterosclerozei sunt ineficiente, mortalitatea și morbiditatea asociate aterosclerozei și complicațiilor acesteia fiind semnificative.
3. Nu există un procedeu de obținere și tratamente bazate pe administrarea de vezicule extracelulare

Problema rezolvată de invenție

Problema tehnică rezolvată de invenție este a unui procedeu pentru furnizarea de vezicule extracelulare, cu conținut genetic modificat să încapsuleze siARN anti-Smad2/3 și veziculele extracelulare rezultate, pentru utilizarea în tratamentul aterosclerozei și complicațiilor acesteia printr-o metodă minim invazivă și cu efecte secundare reduse. Procedeu înlatura dezavantajele menționate prin produsele rezultate și obținute astfel : într-o prima etapă se realizează izolarea celulelor stem de la un subiect, după care într-o a doua etapă se face cultivarea

Stavri

Alexander

Stavri

101
 celulelor stem în condiții care să ducă la producerea de VEC în mediul de cultură urmată de purificarea VEC din mediul de cultură condiționat printr-o centrifugare inițială pentru eliminarea resturilor celulare din mediu, o ultracentrifugare pentru eliminarea corpurilor apoptotici din mediu și o ultracentrifugare la o forță x g superioară celei de la punctul anterior pentru sedimentarea VEC urmată de o spălare într-o soluție apoasă, prin ultracentrifugarea la forțe x g similare celor de la ultracentrifugare și încapsularea siARN anti-Smad2/3 în VEC obținute prin complexarea siARN anti-Smad2/3 cu lipofectamină și punerea în contact a complexelor de siARN anti-Smad2/3 – lipofectamină cu veziculele extracelulare.

În prima etapă într-o primă variantă celulele stem sunt izolate din țesutul adipos astfel: prelevare lipoaspirat sau țesut adipos subcutanat; spălare cu o soluție apoasă, așa cum este PBS, urmată de aspirarea fracției apoase și lipidice; digestie cu proteaze, timp de aproximativ 1 oră la 37°C, sub agitare; centrifugare și îndepărtarea adipocitelor, lipidelor și a fazei apoase; păstrarea sedimentului în care se găsește fracția stromală vasculară (FSV); trecere succesivă a FSV prin sită de Nytex (100μm și 70μm), urmată de evaluarea viabilității celulare folosind colorarea cu albastru Trypan 4% a unei alicote a probei; centrifugare și resuspendarea celulelor în mediu așa cum este DMEM: F12+10% FBS + antibiotice urmată de incubarea la 37°C, 5% CO₂ peste noapte; îndepărtarea celulelor neaderate și menținerea în cultură a ADSC astfel obținute până la pasaj 3-5.

În prima etapă într-o altă variantă, celulele stem sunt izolate din măduva hematogenă astfel : prelevarea aspiratului medular; filtrarea suspensiei celulare printr-o sită Nytex de 40μm, în condiții sterile; centrifugarea suspensiei celulare la 400g, 5 min, 4 °C, urmată de evaluarea viabilității celulare folosind Trypan blue 4% a unei alicote a probei; însamantarea celulelor la o densitate de 2x10⁶ celule/cm² și menținerea în cultură a MSC astfel obținute până la pasaj 3-5.

În etapa a doua, celulele sunt expansionate în cultură până la pasajul 3-5 și apoi mediul de cultură este schimbat în mediu de cultură fără ser, pentru a se evita contaminarea cu VEC de altă proveniență decât cele din celulele stem cultivate, după care celulele vor fi păstrate în cultură pentru o durată suficientă pentru acumularea VEC, dar cât celulele să nu aibă de suferit ca urmare a privării de ser, această perioadă poate fi între 12 și 48 de ore.

În etapa a doua într-o altă variantă poate fi utilizat mediu care conține ser, dacă anterior au fost îndepărtate VEC din acesta prin procedee cunoscute, în această

Steluzzi

Steluzzi

Alexander

Steluzzi

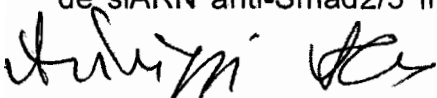
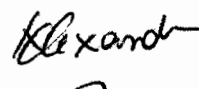
formă de realizare, celulele sunt menținute în cultură pentru secreția de VEC o perioadă de până la 7 zile, preferabil până la 3 zile.

In etapa a treia într-o variantă în prima fază are loc eliminarea resturilor celulare din mediu utilizând o centrifugare inițială la forțe de între 300 x g și 10.000 x g, preferabil între 1.000 x g și 5.000 x g, un optim fiind 2.500 x g și pentru durate de între 1 minut și 30 de minute, urmată de prelevarea ulterioară a fracției lichide pentru procesarea ulterioară; în a doua fază are loc eliminarea corpurilor apoptotici din mediu utilizând o centrifugare la forțe de între 10.000 x g și 20.000 x g și pentru durate de între 1 minut și 20 de minute, urmată de prelevarea ulterioară a fracției lichide pentru procesarea ulterioară; în altă fază are loc sedimentarea VEC utilizând o ultracentrifugare la o forță x g superioară celei de la punctul anterior, preferabil între 50.000 și 150.000 x g, mai preferabil aproximativ 100.000 x g și pentru durate de între 1 oră și 24 de ore, preferabil 18 ore urmată de aruncarea fracției apoase și păstrarea sedimentului pentru procesarea ulterioară; în altă fază are loc spălare într-o soluție apoasă de tip PBS 1x filtrat prin filtru de 0,22 μm prin ultracentrifugarea la forțe x g și pentru durate descrise prin aceleași intervale ca la faza anterioară, urmată de îndepărtarea aproape integrală a fracției apoase și resuspendarea VEC obținute în volumul restant de soluție apoasă pentru a nu aspira accidental odată cu tot lichidul și sedimentul de VEC, volumul restant este caracteristic, mai puțin de 5%, preferabil mai puțin de 1% din volumul inițial de soluție apoasă;

Etapa a treia de purificare a VEC din mediul de cultură condiționat este realizată în alta variantă printr-un procedeu alternativ selectat dintre cromatografie cu excludere prin dimensiune, ultracentrifugare în gradient de densitate, ultrafiltrare, precipitare sau o combinație a acestora.

In etapa a patra, într-o formă de realizare a încapsulării siARN anti-Smad2/3 în VEC, siARN anti-Smad2/3 liofilizat este resuspendat în apă lipsită de RNaze la o concentrație între 1 μM și 100 μM este amestecat cu mediu de transfecție în proporție de o unitate de volum de suspensie siARN anti-Smad2/3 la între 1 și 100 unități de volum mediu de transfecție, în paralel, este obținută o soluție de agent de transfecție, în mediu de transfecție la un raport de volum de între 1:10 și 1:100 agent de transfecție la mediu de transfecție, apoi, soluțiile așa cum sunt descrise mai sus sunt amestecate în proporții egale și se incubează la temperatura camerei timp de aproximativ 20 de minute, amestecul astfel obținut este apoi utilizat pentru transferul de siARN anti-Smad2/3 în VEC prin incubarea împreună pentru o durată de între

100


aproximativ 6 ore și 5 zile, opțional, pentru a purifica VEC care încapsulează siARN anti-Smad2/3 din amestec, se face o spălare în soluție salină.

Etapa a patra de încapsulare a siARN anti-Smad2/3 este realizată printr-o alta varianta selectata dintre: electroporare, optoporare, sonoporare, biolistică sau transferul pe bază de lipozomi.

Principalele avantaje ale invenției

1. Procedeu conform invenției furnizează VEC-uri cu conținut genetic modificat care pot fi utilizate în tratamentul bolilor metabolice și în special al aterosclerozei și complicațiilor acesteia.
2. Tratamentul cu VEC duce la îmbunătățiri marcate ale funcției endoteliale și cardiace la subiecții hipercolesterolemici și hipertensivi.
3. VEC conform invenției sunt bine tolerate, mai ales în cazul obținerii din celule autologe, putând fi utilizate într-un tratament minim invaziv cu toxicitate redusă și efecte secundare minime.
4. VEC conform invenției pot fi depozitate pe termen lung prin congelare și au stabilitate bună la temperatura camerei, ceea ce facilitează utilizarea clinică.

Scurtă descriere a figurilor

Figura 1 prezintă o diagramă de proces pentru obținerea celulelor stem din lipoaspirat/țesut subcutanat (ADSC).

Figura 2 prezintă o diagramă de proces pentru obținerea celulelor stem din măduva hematogenă osoasă (MSC).

Figura 3 prezintă o diagramă de proces pentru obținerea VEC care conțin siARN anti-Smad2/3 încapsulat. Blocul 1 reprezintă obținerea celulelor stem (ADSC sau MSC), blocul 2 – cultivarea celulelor stem în condiții optime pentru secreția VEC în mediul de cultură, blocul 3 – purificarea VEC din mediul de cultură și blocul 4 – încapsularea siARN anti-Smad2/3 în VEC.

Figura 4 prezintă distribuția volumului VEC în funcție de dimensiunea particulelor. Pentru ambele tipuri de VEC de la ADSC (VEC-ADSC) și VEC de la MSC (VEC-MSC) se observă două populații de vezicule, una între aproximativ 10 nm și 100 nm care reprezintă exozomii și una la dimensiuni cuprinse între aproximativ 100 nm și 1 μm care reprezintă microparticulele.

Figura 5 arată diagrame prin puncte obținute prin măsurători de citometrie în flux ale VEC-ADSC (rândul de sus) și VEC-MSC (rândul de jos) necolorate (coloana din

Aluigi

Pe

Bloxand

Bucur

stânga) sau colorate cu Anexina V conjugată cu FITC și anticorpi CD63 conjugăți cu AF647 (coloana din dreapta). Se observă că atât VEC-ADSC cât și VEC-MSC sunt pozitive pentru ambele Anexina V și CD63. 98

Figura 6 arată diagrame prin puncte ale împrăștierii laterale a luminii pe împrăștieră înainte a luminii și histograme ale fluorescenței în verde obținute prin măsurători de citometrie în flux ale VEC-ADSC (rândul de sus) și VEC-MSC (rândul de jos). În partea stângă a figurii sunt prezentate rezultatele pentru VEC native, iar în partea dreaptă rezultatele pentru VEC în care a fost încapsulat siARN anti-Smad2/3 conjugat cu FITC. Se observă că aproximativ jumătate din VEC-ADSC cât și VEC-MSC au captat cantități considerabile de siARN-FITC.

Figura 7 arată imagini reprezentative pentru grosimea pereților aortei ascendente și diametrul deschiderii aortei ascendente obținute prin ecocardiografie în modul B. Se observă un diametru al deschiderii aortice constant între grupuri. În cazul animalelor hipertensive-hipercolesterolemice (grupul HH) se observă o îngroșare a peretelui aortic comparativ cu animalele sănătoase (grupul martor), care este ameliorată prin administrarea de VEC indiferent de proveniență sau de conținutul acestora de siARN anti-Smad2/3.

Figura 8 prezintă imagini reprezentative pentru variația diametrelor interne în sistolă și diastolă ale aortei ascendente obținute prin ecocardiografie în modul M. Se observă că în imaginea provenită de la hamsterul HH diferența dintre diametrul intern aortic în sistolă și cel din diastolă este redusă comparativ cu cea observată pentru hamsterul martor ceea ce indică o rigidizare a peretelui aortic. În cazul animalelor la care au fost administrate VEC-ADSC (cu sau fără siARN anti-Smad2/3 încorporat) distensibilitatea peretelui aortic este crescută la valori similare celor de la martor, în timp ce administrarea VEC-MSC duce la o ameliorare slabă.

Figura 9 prezintă imagini reprezentative pentru variația integralei viteză-timp (VTI) și viteză maxime (Vel) în aorta ascendentă, obținute prin ecocardiografie în modul undă pulsată Doppler. La hamsterii hipertensivi-hipercolesterolemici sunt crescute atât VTI cât și Vel comparativ cu cele de la hamsterii martor. VTI este ameliorat prin tratamentul cu VEC-ADSC sau MSC iar incorporarea siARN anti-Smad2/3 îmbunătățește suplimentar valorile VTI.

Figura 10 prezintă imagini reprezentative pentru variația diametrelor interne în sistolă și diastolă ale ventriculului stâng cât și pentru grosimea peretelui ventricular în diastolă obținute prin ecocardiografie în modul M. Se observă o grosime a peretelui

Steluta

Arina

ventricular crescută în măsurătorile de la toți hamsterii comparativ cu hamsterii martor. Procentul scurtării ventriculului stâng calculat prin formula: (diametrul intern la sfârșitul diastolei - diametrul intern la sfârșitul sistolei)/diametrul intern la sfârșitul diastolei x 100, este scăzut la șoarecii hipertensivi-hipercolesterolemici dar este crescut la hamsterii injectați cu VEC (de la ADSC sau MSC) încapsulate cu siARN anti-Smad2/3 până la valori apropiate de cele de la martor.

Figura 11 prezintă imagini reprezentative pentru contracția declanșată de noradrenalină (NA) și relaxarea declanșată de acetilcolină (ACh) a aortelor (figurat în roșu) și carotidelor (figurat în mov). La animalele hipertensive-hipercolesterolemice contractia și relaxarea sunt afectate comparativ cu cea de la martor, iar tratamentul cu VEC-ADSC sau VEC-MSC și suplimentar incorporarea siARN anti-Smad2/3 îmbunătățește considerabil atât contractia NA cât și relaxarea la ACh.

Lista prescurtărilor

ADSC – celulele stem mezenchimale din țesutul adipos subcutanat; MSC – celulele stem mezenchimale din maduva osoasă; VEC – vezicule extracelulare; Ang II – Angiotensina II; ARN – acid ribonucleic; siARN – ARN scurt de interferență; ARNm – ARN mesager; miARN – microARN; CD63-AF647 – cluster de diferențiere 63 conjugat cu Alexa Fluor 467; DLS – împrăștierea dinamică a luminii; DMEM – mediu Eagle modificat de Dulbecco; EDTA – acid etilendiamino tetraacetic; FITC – izotiocianat de fluoresceina; FSV – fracția stromală vasculară; FBS – ser fetal bovin; HDL- lipoproteine de densitate înaltă; LDL – lipoproteine de densitate joasă; NA – noradrenalina; ACh - acetilcolina; PBS – soluție salină tamponată cu fosfat; PS – fosfatidilserina; TβR-I – receptorul I pentru TGF-β; TGF-β1 – factorul de creștere transformator; Vel – viteză; VTI – integrala viteză timp;

Descrierea detaliată

Invenția furnizează un procedeu de producere a veziculelor extracelulare (VEC) din celule stem, în care este încapsulat siARN împotriva Smad2/3 (anti-SMAD2/3), pentru tratamentul unui subiect care suferă de hipertensiune, hiperlipidemie, ateroscleroză sau complicații ale acestora.

Într-o primă etapă (1) sunt izolate celule stem de la un subiect. Subiectul poate fi subiectul de tratat cu VEC conform invenției, un subiect din aceeași specie cu acesta sau un subiect dintr-o altă specie. Într-o variantă conform invenției prezente, celulele stem sunt izolate din țesutul adipos (1a) urmând protocolul expus

Andrei

[Signature]

Alexander

[Signature]

În continuare, sau o variantă a acestuia: **i)** Prelevare lipoaspirat sau țesut adipos subcutanat; **ii)** Spălare cu o soluție apoasă, așa cum este PBS, urmată de aspirarea fracției apoase și lipidice; **iii)** Digestie cu proteaze, de exemplu, colagenaza sau/și dispază, timp de aproximativ 1 oră la 37°C, sub agitare; **iv)** Centrifugare și îndepărtarea adipocitelor, lipidelor și a fazei apoase; **v)** Păstrarea sedimentului în care se găsește fracția stromală vasculară (FSV); **vi)** Trecere succesivă a FSV prin sită de Nytex (100μm și 70μm), urmată de evaluarea viabilității celulare folosind colorarea cu albastru Trypan 4% a unei alicote a probei; **vii)** Centrifugare și resuspendarea celulelor în mediu așa cum este DMEM: F12+10% FBS + antibiotice urmată de incubarea la 37°C, 5% CO₂ peste noapte; **viii)** Îndepărtarea celulelor neaderate (hematopoietice) și menținerea în cultură a ADSC astfel obținute până la pasaj 3-5.

Într-o altă variantă alternativă conform invenției prezente, celulele stem sunt izolate din măduva hematogenă (**1b**) urmând protocolul expus în continuare, sau o variantă a acestuia: **i)** Prelevarea aspiratului medular; **ii)** Filtrarea suspensiei celulare printr-o sita Nytex de 40μm, în condiții sterile; **iii)** Centrifugarea suspensiei celulare la 400g, 5 min, 4 °C, urmată de evaluarea viabilității celulare folosind Trypan blue 4% a unei alicote a probei; **iv)** Însamantarea celulelor la o densitate de 2x10⁶ celule/cm² și menținerea în cultură a MSC astfel obținute până la pasaj 3-5.

În etapa (**2**), celulele sunt expansionate în cultură până la pasajul 3-5 și apoi mediul de cultură este schimbat în mediu de cultură fără ser, pentru a se evita contaminarea cu VEC de altă proveniență decât cele din celulele stem cultivate după cum este descris mai sus. În continuare, celulele vor fi păstrate în cultură pentru o durată suficientă pentru acumularea VEC, dar cât celulele să nu aibă de suferit ca urmare a privării de ser. Această perioadă poate fi între 12 și 48 de ore, preferabil, aproximativ 48 de ore. Alternativ, într-o altă variantă de realizare a invenției, în această etapă poate fi utilizat mediu care conține ser, de exemplu FBS, dacă anterior au fost îndepărtate VEC din acesta printr-o metodă cunoscută specialistului în domeniu, așa cum este prin ultracentrifugare. În această formă de realizare, celulele pot fi menținute în cultură pentru secreția de VEC o perioadă mai lungă, de exemplu până la 7 zile, preferabil până la 3 zile.

Apoi, în etapa (**3**), este recoltat mediul de cultură condiționat obținut din cultura celulară de ADSC sau MSC, așa cum este prezentat mai sus și sunt purificate VEC din mediu prin: (**3a**) eliminarea resturilor celulare din mediu utilizând o

Stela

Alexander

Blas

centrifugare inițială la forțe de între aproximativ 300 x g și 10.000 x g, preferabil între aproximativ 1.000 x g și 5.000 x g și cel mai preferabil aproximativ 2.500 x g și pentru durate de între aproximativ 1 minut și 30 de minute, mai preferabil, aproximativ 10 minute, urmată de prelevarea ulterioară a fracției lichide pentru procesarea ulterioară; **(3b)** eliminarea corpiilor apoptotici din mediu utilizând o centrifugare la forțe de între aproximativ 10.000 x g și 20.000 x g, mai preferabil, aproximativ 16.000 x g și pentru durate de între aproximativ 1 minut și 20 de minute, cel mai preferabil, aproximativ 5 minute urmată de prelevarea ulterioară a fracției lichide pentru procesarea ulterioară; **(3c)** sedimentarea VEC utilizând o ultracentrifugare la o forță x g superioară celei de la punctul anterior, preferabil între 50.000 și 150.000 x g, mai preferabil aproximativ 100.000 x g și pentru durate de între aproximativ 1 oră și 24 de ore, mai preferabil, între aproximativ 2 ore și 20 de ore și cel mai preferabil, aproximativ 18 ore urmată de aruncarea fracției apoase și păstrarea sedimentului pentru procesarea ulterioară; **(3d)** spălare într-o soluție apoasă (așa cum este de exemplu PBS 1x filtrat prin filtru de 0,22 μm sau o soluție similară) prin ultracentrifugarea la forțe x g și pentru durate descrise prin aceleași intervale ca la (3c) urmată de îndepărtarea aproape integrală a fracției apoase și resuspendarea VEC obținute în volumul restant de soluție apoasă pentru a nu aspira accidental odată cu tot lichidul și sedimentul de VEC, volumul restant este caracteristic, mai puțin de aproximativ 5%, preferabil mai puțin de aproximativ 1% din volumul inițial de soluție apoasă;

În unele forme de realizare a invenției, etapa **(3a)** poate fi absentă, iar resturile celulare să fie îndepărtate odată cu corpii apoptotici, în etapa **(3b)**.

Specialistului în domeniu îi este cunoscut că purificarea VEC dintr-o suspensie impură (o probă biologică, sau de laborator) poate fi făcută printr-un procedeu alternativ prin care se obțin VEC similare cu cele obținute prin ultracentrifugări succesive, așa cum este descris mai sus. Astfel de procedee includ cromatografia cu excludere prin dimensiune, ultracentrifugarea în gradient de densitate, ultrafiltrarea, precipitarea sau o combinație a acestora.

Într-o variantă conform invenției, separarea VEC poate fi făcută prin cromatografia de excludere prin dimensiune. Acest procedeu se bazează pe eluarea diferită a particulelor de dimensiuni diferite care trec printr-o coloană de substrat solid discontinuu, dintr-un polimer poros, atunci când sunt angrenate prin această coloană de o soluție, numită și fază lichidă. Particulele mici, așa cum sunt proteinele,

Handwritten signature

Handwritten signature

Handwritten signature

pot să pătrundă în porii polimerului și sunt astfel încetinite. VEC au dimensiuni mai mari decât porii polimerului, și astfel, ocolind fragmentele substratului solid, eluează mai rapid. Pentru îndepărtarea inițială a celulelor și debriurilor celulare, cromatografia de excludere prin dimensiune este de obicei cuplată cu o altă metodă, așa cum este centrifugarea sau ultrafiltrarea.

Într-un alt aspect conform invenției, separarea VEC poate fi făcută prin ultrafiltrare. Acest procedeu se bazează pe ultracentrifugarea în tuburi care conțin membrane semipermeabile care au dimensiuni cunoscute ale porilor, care mențin în partea superioară a tubului de ultracentrifugare particulele cu dimensiune mai mare decât a porilor și permit trecerea particulelor mai mici. O astfel de strategie poate fi utilizată pentru a separa atât celulele și debriurile din soluția de VEC atunci când membrana are dimensiunea porilor mai mare decât diametrul VEC (între aproximativ 300 μM și 1500 μM , mai preferabil între 500 μM și 1000 μM) cât și pentru separarea proteinelor și altor componente moleculare de VEC (utilizând membrane cu dimensiunea porilor de aproximativ 1 nm – 30 nm, mai preferabil, aproximativ 20 nm). Alternativ, procedeu de ultrafiltrare pentru separarea VEC de alte componente în suspensie, așa cum sunt proteinele, poate fi combinată cu o altă tehnică, de exemplu centrifugarea, pentru îndepărtarea celulelor și debriurilor celulare.

În încă un alt aspect conform invenției, separarea VEC este realizată prin precipitare utilizând polietilenglicoli (PEG). Acest procedeu se bazează pe scăderea solubilității compușilor sau particulelor în soluții de polimeri superhidrofili. PEG cu diferite mase moleculare au fost utilizați în trecut pentru precipitarea proteinelor, acizilor nucleici, virusurilor și altor particule mici. Prin utilizarea precipitării cu PEG, sedimentarea agregatelor de VEC poate fi făcută prin centrifugarea la forțe mici de aproximativ 1500 $\times g$. Atunci când se utilizează procedeu de separare a VEC prin precipitare, proba biologică care conține VEC de separat este amestecată cu PEG pentru concentrații finale de aproximativ 5 la 15% (masă pe volum), probele sunt lăsate să formeze agregate pe perioade de ordinul orelor la 2-8°C, și apoi VEC agregate sunt sedimentate prin centrifugare la forțe de centrifugare între 1000 și 2000 $\times g$. Opțional, într-o formă de realizare, pentru îndepărtarea PEG rezidual din VEC izolate, procedeu poate fi suplimentat cu o spălare într-o soluție salină urmată de ultracentrifugare sau cromatografie pentru obținerea VEC purificate.

Într-un alt aspect conform invenției, separarea VEC este realizată prin precipitarea utilizând protamină. Procedeu de separare care utilizează protamina se

Andrei

Alexander
1. 2. Alina

Alina


bazează pe prezența sarcinilor electrice negative de la suprafața tuturor veziculelor extracelulare. Deoarece protamina este o moleculă încărcată electric pozitiv, aceasta duce la agregarea VEC din probele biologice. În plus, pentru o agregare mai eficientă a VEC, incubarea cu protamină poate fi făcută în prezența PEG, așa cum este descris mai sus. Protocolul de separare a VEC prin acest procedeu presupune incubarea cu concentrații de aproximativ 0,01 la 1 mg/ml de protamină, opțional cu adăugarea PEG între aproximativ 0,1 și 5%, urmată de centrifugare la forțe de centrifugare între 1000 și 2000 x g pentru sedimentarea VEC agregate. Similar procedurii de precipitare în PEG, descrisă mai sus, într-o formă de realizare, pentru îndepărtarea protaminei și PEG reziduale în VEC izolate, procedeu poate fi suplimentat cu o spălare într-o soluție salină urmată de ultracentrifugare sau cromatografie pentru obținerea VEC purificate.

VEC obținute așa cum este descris mai sus pot fi caracterizate pentru a verifica dimensiunea și conținutul biologic al acestora pentru consistența acestora între repetiții ale protocoalelor de separare, între loturi de obținere și pentru conformitatea cu caracteristicile descrise în literatura științifică pentru VEC.

Specialistului în domeniu îi este cunoscut faptul că evaluarea dimensiunii VEC rezultate în urma etapei de purificare așa cum a fost descrisă mai sus poate fi evaluată utilizând o diferite tehnici așa cum sunt măsurătorile cu un aparat nanosizer, zetasizer sau prin microscopie electronică. Instrumentele nanosizer efectuează măsuratori ale dimensiunilor particulelor, utilizând un procedeu numit DLS (Dynamic Light Scattering). DLS măsoară mișcarea Browniană și o corelează cu dimensiunea particulelor. Acest lucru îl realizează prin iluminarea particulelor cu un laser și analizarea intensității fluctuațiilor luminii împrăștiată. Particulele de dimensiuni mici se vor deplasa mai rapid decât cele de dimensiuni mai mari și vor traversa fasciculul de lumină cu un flux mai mare. Este calculată automat o distribuție a intensității luminoase la ieșirea din probă care poate fi convertită într-o distribuție de volum dacă proprietățile optice ale particulelor sunt cunoscute.

Într-o formă de realizare alternativă conform invenției, evaluarea dimensiunii VEC rezultate în urma etapei de purificare poate fi făcută utilizând vizualizarea prin microscopie electronică de transmisie a VEC.

VEC conform invenției cuprind două populații principale de vezicule, o populație cu dimensiune între aproximativ 10nm și 100nm, numită populație de

Andrei 
VA...

Alexander

Flora 

exozomi și o populație de între aproximativ 100nm și 1000nm numită populație de microparticule. 92

Într-o altă etapă **(4)** conform invenției este efectuată încapsularea siARN anti-Smad2/3 în VEC obținute, prin **(4a)** complexarea siARN anti-Smad2/3 cu un agent de transfecție și **(4b)** punerea în contact a complexelor de siARN anti-Smad2/3 – agent de transfecție cu veziculele extracelulare.

Într-o formă de realizare a încapsulării siARN anti-Smad2/3 în VEC conform invenției, siARN anti-Smad2/3 liofilizat este resuspendat în apă lipsită de RNaze la o concentrație între 1 μ M și 100 μ M, preferabil aproximativ 10 μ M, este amestecat cu mediu de transfecție în proporție de o unitate de volum de suspensie siARN anti-Smad2/3 la între 1 și 100 unități de volum mediu de transfecție, mai preferabil, aproximativ o unitate de volum de suspensie siARN anti-Smad2/3 la 20 unități de volum mediu de transfecție. În paralel, este obținută o soluție de agent de transfecție, de exemplu lipofectamină, în mediu de transfecție la un raport de volum de între 1:10 și 1:100 agent de transfecție la mediu de transfecție, mai preferabil aproximativ 1:20 agent de transfecție la mediu de transfecție. Apoi, soluțiile așa cum sunt descrise mai sus sunt amestecate în proporții egale și se incubează la temperatura camerei timp de aproximativ 20 de minute. Amestecul astfel obținut poate fi apoi utilizat pentru transferul de siARN anti-Smad2/3 în VEC prin incubarea împreună pentru o durată de între aproximativ 6 ore și 5 zile, mai preferabil, aproximativ 3 zile. Opțional, pentru a purifica VEC care încapsulează siARN anti-Smad2/3 din amestec, poate fi făcută o spălare în soluție salină, urmată de o etapă de izolare a VEC așa cum a fost descris mai sus, de exemplu, prin ultracentrifugare sau cromatografie.

Așa cum îi este cunoscut specialistului în domeniu, există și alte metode care pot fi utilizate pentru inserarea materialului genetic în VEC, așa cum sunt electroporarea, optoporarea, sonoporarea, biolistica (pistolul genic) sau transferul pe bază de lipozomi, iar aceste metode sunt incluse în unele forme de realizare a etapei **(4)** conform invenției.

Într-o variantă de realizare a invenției, pentru inserarea siARN anti-Smad2/3 poate fi utilizată electroporarea. Electroporarea se bazează pe suspendarea mediilor biologice delimitate de membrane lipidice, în cazul de față – VEC, împreună cu moleculele de material genetic într-o soluție care conduce curentul electric și cu această soluție este închis un circuit electric. Prin suspensia de VEC este descărcat

Arbuzi

Alexander

Arbuzi

un puls electric cu un voltaj optimizat, care are caracteristic o durată de microsecunde până la o milisecundă, care duce la formarea temporară de pori prin membrana fosfolipidică a VEC prin care pot pătrunde moleculele de siARN conform invenției. 9.1

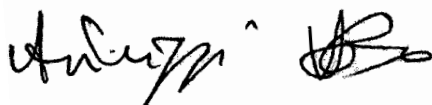
Similar electroporării, pot fi formați pori temporari prin membranele VEC prin alte procedee fizice așa cum sunt optoporarea, în care pulsuri laser cu durată de femtosecunde pentru intensități luminoase mari, sau până la de ordinul microsecundelor atunci când sunt utilizate fascicule de lumină cu energie mai mică sau sonoporarea care modifică permeabilitatea membranelor prin expunerea la ultrasunete de frecvențe de aproximativ 1 MHz pentru perioade de timp de ordinul secundelor. Aceste procedee pot fi utilizate de asemenea în forme particulare de realizare a invenției prezente.

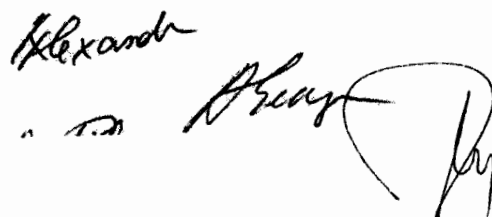
Într-o altă variantă de realizare a invenției, pentru inserarea siARN anti-Smad2/3 poate fi utilizată o metodă de incorporare cu lipozomi. Lipozomii sunt vezicule de mici dimensiuni cu membrane fosfolipidice care se pot uni cu membranele VEC. Lipidele încărcate electric pozitiv formează agregate cu siARN care este încărcat electric negativ și pot transfera astfel materialul genetic în interiorul veziculelor extracelulare conform invenției.

În încă o altă variantă particulară de realizare a invenției, pentru inserarea siARN anti-Smad2/3 poate fi utilizată un procedeu care utilizează tehnica de biolistică. Prin această tehnică, particule de aur tungsten sau alte materiale sunt accelerate la viteze înalte pentru a putea traversa membranele lipidice ale VEC. Propulsarea particulelor poate fi făcută, de exemplu utilizând un gaz inert, așa cum este heliul, cu dispozitive speciale numite pistoale genice.

Astfel, un obiect al prezentei invenții este furnizarea unor vezicule extracelulare provenite din celule ADSC sau MSC caracterizate prin faptul că conțin două populații distincte, numite exozomi și microparticule, cu dimensiuni între aproximativ 10 și 100 nm și, respectiv, 100 nm – 1 μm și prin faptul că au fost modificate să conțină siARN anti-Smad2/3.

Este cunoscut în domeniu faptul că VEC prezintă o stabilitate bună la temperatura camerei, rezistă la congelare și pot fi păstrate la 2-8°C pentru perioade de săptămâni sau chiar luni fără o modificare considerabilă a proprietăților acestora, ceea ce favorizează stocarea și distribuirea VEC modificate conform invenției.





În mod surprinzător, VEC modificate conform invenției au fost descoperite în invenția prezentă a avea efecte de îmbunătățire a funcției cardiovasculare atunci când sunt administrate la animale hipertensive hiperlipemice, așa cum este ilustrat suplimentar în Exemple, mai jos.

VEC cu conținut genetic modificat conform invenției pot fi administrate unui subiect pentru tratamentul sau prevenirea unei afecțiuni selectate dintre hipertensiune, dislipidemie ateroscleroză, stenoză aortică, hipertrofie ventriculară și insuficiență cardiacă.

Într-un exemplu de realizare al invenției administrarea către subiect este prin injectare sau perfuzare intravenoasă. Cantitatea de VEC care va fi administrată către subiect și regimul de dozare pentru administrarea VEC conform invenției pot depinde de factori cunoscuți specialistului în domeniu, așa cum sunt subiectul la care acestea sunt administrate, sexul, vârsta și greutatea acestuia cât și de alți factori care țin de afecțiunea de care suferă subiectul și de gravitatea acesteia. Astfel, cantitatea de VEC și regimul de dozare vor putea varia în funcție de judecata medicului curant. Într-un exemplu conform invenției, cantitatea de VEC raportată ca masă de proteină conținută de acestea, poate varia între aproximativ 10 și 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de greutate corporală, mai preferabil între aproximativ 100 și 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de greutate corporală. Într-un alt exemplu al invenției injectarea poate fi unică sau repetată o dată la o zi, o dată la câteva zile, o dată la o săptămână, o dată la o lună sau mai rar pentru a fi obținute îmbunătățiri ale funcției cardiovasculare sau pentru întârzierea apariției complicațiilor cardiovasculare.

Așa cum este utilizat aici, este intenționat ca termenul „subiect” să cuprindă un om sau un mamifer neuman așa cum este de exemplu un hamster, șoarece, șobolan, iepure, oaie, capră, vacă, măgar sau cal.

Așa cum este utilizat aici, forma la singular „un”, „o” sau articulată hotărât care modifică un element sau o entitate a invenției este intenționată a nu limita la prezența unui singur astfel de element sau entitate ci poate fi interpretată ca „cel puțin un” sau „cel puțin o” astfel de element sau entitate este prezent,-ă.

Pe întreaga întindere a invenției, atunci când sunt indicate valori numerice ale unui parametru cuantificabil, acestea trebuie privite mai degrabă ca un interval de valori centrat pe valoarea menționată. Specialistului în domeniu îi va fi clar că pot fi făcute oarece modificări ale acestor parametri fără a se schimba spiritul invenției.

Anghel

Alexandru

10

10

Invenția este ilustrată suplimentar prin intermediul următoarelor exemple care nu trebuie interpretate a limita în vreun fel întinderea invenției.

EXEMPLE

Exemplul 1: Realizarea modelelor experimentale animale: hamsterul hipertensiv-hipercolesterolemic (HH)

În toate experimentele au fost utilizați hamsteri Sirieni Aurii, masculi în vârstă de 12 săptămâni, crescuți în biobaza Institutului de Biologie și Patologie Celulară (IBPC) 'Nicolae Simionescu' în cuști cu ventilație, în condiții specifice, cu cicluri de lumină:întuneric de 12:12, în conformitate cu legislațiile naționale și europene referitoare la utilizarea animalelor în cercetarea biomedicală. Toate protocoalele experimentale au fost aprobate de comisia de etică a IBPC 'N Simionescu' și de autoritatea națională, ANSVSA.

Dieta hamsterilor a constat în peletii standard suplimentați cu 3% colesterol și 15% unt (85% grăsimi) pentru inducerea hiperlipemiei și cu 8% NaCl pentru inducerea hipertensiunii arteriale. Această dietă duce la modificări similare celor observate în patologia cardiovasculară umană legată de obiceiuri nesănătoase (mâncare grasă, aport crescut de sare, sedentarism).

Ca martor, au fost utilizați hamsteri martor de aceeași vârstă și crescuți în aceleași condiții dar hrăniți cu dieta normală conținând 1% NaCl. Animalele au avut acces la hrană și apă ad libitum cu excepția privării de hrană timp de 18 ore anterior recoltării de sânge din plexul retroorbital.

Pentru prelevarea sângelui prin puncție retroorbitală cât și pentru citiri ecocardiografice hamsterii au fost anesteziați cu 2,5% izofluran iar sacrificarea la sfârșitul celor patru luni de urmărire a fost făcută prin administrarea unui amestec de ketamina-xilazina-acepromazina (80mg/10mg/2mg/kg corp).

Exemplul 2: Obținerea de VEC provenite de la ADSC, sau MSC, izolate de la hamsterul sanatos

Pentru obținerea celulelor stem mezenchimale din măduva osoasă (MSC) sau și a celulelor stem din țesutul adipos subcutanat (ADSC), au fost sacrificați hamsteri sănătoși în vârstă de 3-4 luni, prin dislocare cervicală. Ulterior, în condiții sterile, a fost recoltat țesutul adipos subcutan din regiunea abdominală și, de asemenea, au fost excizate femurul și tibia.

Țesutul adipos subcutan recoltat a fost spălat cu PBS, iar ulterior, după aspirarea fracțiilor apoasă și lipidică, digestie cu collagenază 1h la 37°C, cu agitare,

Andrei *DR*

Alexandru *Andrei*

suspensia rezultată a fost filtrată prin site Nytex cu dimensiunea porilor de 100 μm și apoi a fost centrifugată timp de 10 min la 380 x g, rezultând trei fracții: (1) fracția lipidică, care conține adipocite mature care plutesc și lipide rezultate prin adipoliză, (2) fracția apoasă, și (3) fracția care sedimentează și este constituită din celule din stroma vasculară (FSV) (vezi Figura 1). Celulele din FSV au fost trecute prin sită de Nytex (100 μm și 70 μm), resuspendate în tampon de liză a eritrocitelor ((0.154 mol/l NH_4Cl , 10 mmol/l KHCO_3 , 0,1 mM soluție de acid etilendiamino tetraacetic (EDTA)), iar după centrifugarea la 400 x g, 5 min și resuspendarea în DMEMs/Ham's F12 suplimentat cu 10% ser fetal bovin (FBS) și antibiotice, au fost incubate la 37°C, 5% CO_2 , peste noapte. Ulterior, celulele au fost însămânțate la o densitate de 5×10^4 celule/ml în mediu DMEM/Ham's F12 suplimentat cu 10% FBS și penicilină (100U/ml), streptomycină (100 $\mu\text{g/ml}$), și neomicină (50 $\mu\text{g/ml}$). După 20 de ore, celulele neatașate (hematopoietice) au fost îndepărtate, iar celulele aderate (celule stem mezenchimale) au fost menținute în cultură, până la pasajul 3, în mediu DMEM: F12 suplimentat cu 10% FBS și antibiotice, pentru obținerea ulterioară de VEC (VEC-ADSC).

Aspiratul medular din femur și tibie a fost prelevat după îndepărtarea țesutului muscular, clătirea în PBS steril și îndepărtarea epifizei, cu ajutorul acului unei seringi (25G), într-o placă Petri ce conținea PBS steril pe gheata. Suspensia celulară obținută a fost filtrată în condiții sterile printr-o sită Nytex de 40 μm , iar după centrifugarea la 400g, 5 min, 40°C, urmată de evaluarea viabilității celulare folosind Trypan blue 4%, celulele au fost însămânțate la o densitate de 2×10^6 celule/ cm^2 . (vezi Figura 2). Celulele au fost menținute până la pasajul 3 în mediu DMEM 1‰ suplimentat cu 10 % ser specific pentru MSC, pentru obținerea ulterioară de VEC (VEC-MS).

Izolarea VEC din mediul privat de ser, condiționat timp de 48h, colectat de la ADSC și MSC, obținute în cultură, la pasajul 3, s-a realizat după cum urmează. Mediul condiționat a fost centrifugat la 2500xg, 10 min, pentru îndepărtarea debriurilor celulare, iar supernatantul obținut a fost centrifugat la 16000xg, 5 min, pentru îndepărtarea corpurilor apoptotici. Ulterior, după ultracentrifugarea supernatantului la 100000 x g, 20h, 4°C, peletul obținut care conține VEC a fost spălat cu PBS și ultracentrifugat din nou la 100000 x g, 2h și 30 min, 4°C, pentru a obține o populație pură de VEC (vezi Figura 3).

[Handwritten signature]

Alexandre
[Handwritten signature]

Exemplul 3: Măsurarea dimensiunii și analiza markerilor specifici pentru VEC provenite de la MSC sau ADSC de la animale sanatoase

Pentru a arăta că populația de VEC, atât VEC-ADSC, cât și, VEC-MSC izolata de la hamsterii martor, este reprezentata de doua tipuri de particule, de dimensiuni diferite, aceasta a fost analizata cu aparatul Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK), după cum urmează: VEC, obținute prin ultracentrifugarea mediului de cultură provenit de la ADSC sau MSC, izolate de la hamsterii martor, așa cum este descris mai sus, au fost diluate în PBS în volum final de 1 ml (1:10). Așa cum se observa în Figura 4, curbele de distribuție a dimensiunilor veziculelor sunt bimodale, atât în cazul VEC-ADSC cât și a VEC-MSC, valorile dimensiunilor particulelor (Z) fiind cuprinse între 50 nm și 100 nm pentru exozomi (~30% din volum), și între la 100 nm și 1000 nm pentru microvezicule (~70% din volum).

VEC obtinute prin ultracentrifugarea mediului de cultură provenit de la MSC sau ADSC, izolate de la hamsterii martor, aflate în suspensie în PBS au fost marcate cu Anexina V-FITC (leaga fosfatidilserina (PS), marker specific pentru microvezicule) și anticorp antiCD63-AF647 (leaga CD63, marker specific pentru exozomi). Analiza și ulterior, cuantificarea, au fost realizate prin citometrie în flux, după incubarea timp de 40 de minute la temperatura camerei, la întuneric. Așa cum se observă în Figura 5, populațiile de VEC, atât VEC-ADSC cât și VEC-MSC izolate de la hamsterii martor, sunt pozitive pentru markerii de microvezicule (AnexinaV) și exozomi (CD63).

Exemplul 4: Transferul de siARN anti-Smad2/3 a VEC provenite de la MSC sau ADSC și verificarea eficienței transferului

În acest exemplu în VEC provenite de la MSC sau ADSC după cum a fost descris în Exemplul 2 a fost încapsulat siARN anti-Smad2/3 după cum urmează: (1) siARN anti-Smad2/3 liofilizat a fost resuspendat în apă lipsită de RNaze la o concentrație de 10 μ M, (2) a fost realizat un amestec de 50 μ l de Opti-Mem (Gibco) cu 3 μ L de reactiv Lipofectamine 2000 (Invitrogen), acesta a fost lăsat la temperatura camerei timp de 5 minute și (3) a fost combinat ulterior cu al doilea amestec de 50 μ l de Opti-Mem cu 3 μ L siARN anti-Smad2/3, după care s-a incubat la temperatura camerei timp de 20 de minute; (4) VEC obținute de la MSC sau ADSC suspendate în PBS (100 μ g de proteină/ml) au fost apoi incubate timp de 72 ore, la 37°C, 5% CO₂ cu acest amestec; apoi (5) probele au fost spălate cu PBS filtrat prin ultracentrifugare la

100.000 x g (28.800 rpm) timp de 150 de minute, la 4°C, iar ulterior resuspendate în 300µl PBS.

Pentru a verifica eficiența transferului de siARN anti-Smad2/3 în VEC provenite de la MSC, sau ADSC a fost realizat un experiment separat de încapsulare a siARN anti-Smad2/3, conform protocolului de mai sus dar utilizând un siARN conjugat cu izotiocianat de fluoresceină (FITC), iar după spalarea finală cu PBS prin ultracentrifugare, a fost determinată incorporarea FITC prin citometrie în flux. Așa cum este arătat în Figura 6, aproximativ 50% dintre VEC detectabile prin citometrie în flux au incorporat cantități considerabile de siARN-FITC.

Exemplul 5: Generarea grupurilor de hamsteri

La hamsterii hipertensivi-hiperlipidemici obținuți conform Exemplului 1 au fost injectate retroorbital lunar, timp de 4 luni, 4 doze, fiecare continand 30µg în 300uL de VEC obținute conform Exemplului 2 (grupurile de tratament **HH-VEC(ASDC)** și **HH-VEC(MSC)**), sau 30µg în 300uL de VEC obținute conform Exemplului 2, în care a fost încapsulat material genetic (siARN anti-Smad2/3) conform Exemplului 4 (grupurile de tratament **HH-VEC(ASDC) + Smad2/3 siRNA** și **HH-VEC(MSC) + Smad2/3 siRNA**). Ca martor au fost utilizați hamsteri sănătoși, hrăniți cu dietă standard (grupul **Martor**) și hamsteri hipertensivi-hiperlipidemici netratați (grupul **HH**).

Exemplul 8: Tratamentul cu VEC care încorporează siARN anti-Smad2/3 îmbunătățește funcția cardiacă a hamsterilor hipertensivi-hiperlipidemici

Pentru a analiza modificările structurale și funcționale au fost urmăriti parametrii ecocardiografici ai animalelor din cele șase grupe experimentale cu ajutorul aparatului Ecocardiograf Vevo 2100 (Imaging System), utilizand sonda MS pentru hamster (550MHz), Vevo Imaging Station - platforma încălzită cu accesorii pentru monitorizarea și menținerea constanta a temperaturii, precum și monitorizarea traseului electric (EKG) și a respirației, cu gel preîncălzit. Seturile de date ecocardiografice au fost achiziționate în secțiune parasternală ax lung standard. Pentru aorta toracica au fost efectuate masuratori pe înregistrările prin ecografie pentru grosimea peretelui (în modul B), pentru diametrul în sistola și diastola (în modul M) și pentru integrala viteză timp (VTI) și viteză (Vel) (în modul de undă pulsată Doppler: PW-Doppler). VTI a undei fluxului de sânge este o măsură a

Ungureanu

Alexandru
1.12
Cristian

funcției sistolice cardiace și a debitului cardiac, iar VEL reprezintă viteza maximă a sângelui la nivelul secțiunii analizate. 88

Pentru artera carodidă au fost analizați următorii parametri: grosime perete și diametru interior (în modul B), iar pentru ventriculul stâng au fost măsurate aria cavitatii interioare (secțiune pe axul lung, în modul B), diametrul în diastolă și în sistolă, grosimea peretelui anterior și posterior (în modul M).

Pentru fiecare animal au fost urmăriti parametrii descriși mai sus și în Figurile 7-10 sunt prezentate înregistrările reprezentative, cât și valorile medii pe grupuri. Datele obținute au evidențiat o creștere semnificativă a grosimii peretelui vascular, cât și a valorilor pentru VTI și pentru VEL și o scădere semnificativă a diametrului intern și a distensibilității la animalele hipertensive-hipercolesterolemice, comparativ cu hamsterii sănătoși, ceea ce evidențiază disfuncția aortei toracice și a arterei carotide în cazul modelului animal de ateroscleroză (vezi Figurile 7-10). Dieta aterogenă a indus hipertrofie ventriculară stângă, după cum a fost evidențiat prin reducerea fracției de scurtare ventriculară stângi și îngroșarea peretelui posterior (vezi Figura 10).


În mod surprinzător, tratamentul administrat – injectarea de VEC obținute de la MSC, sau ADSC, sau cu VEC care încorporează siARN anti-Smad2/3, a redus grosimea peretelui vascular, a crescut distensibilitatea aortei la grupele HH-VEC (ASDC) și HH-VEC (ASDC) + Smad2/3 siRNA și a redus viteza maximă aortică la grupele HH-VEC (ADSC) + Smad2/3 siRNA și HH-VEC (MSC) + Smad2/3 siRNA (vezi Figurile 7-10).

Deși tratamentul cu VEC-ADSC sau VEC-MSC nu a indus nicio modificare a structurii și funcției ventriculului stâng, în mod surprinzător, administrarea de VEC-ADSC sau VEC-MSC care încorporează siARN anti-Smad2/3 a îmbunătățit elasticitatea ventriculului stâng, respectiv a crescut fracția lui de scurtare (vezi Figura 10).

Exemplul 9: VEC care încorporează siARN anti-Smad2/3 ameliorează disfuncția vasculară

A fost evaluat răspunsul peretelui vascular la agenți vasoconstrictori (noradrenalina – NA, 10^{-8} M + 10^{-4} M) și vasodilatatori (acetilcolină – ACh, 10^{-8} M + 10^{-4} M) pentru aortele toracice și arterele carotide ale hamsterilor obținuți în Exemplul 5, utilizând un miograf cu fir.

Andrzej 

Exandh 

84

Asa cum este arătat în Figura 11, hamsterii HH prezintă modificări specifice pentru boala aterosclerotică, cu modificari semnificative în ceea ce privește funcția aortei toracice și a arterei carotide, contracția și relaxarea fiind diminuate comparativ cu valorile înregistrate la hamsterii martor.

În mod surprinzător, tratamentul cu VEC obținute de la MSC, sau ADSC, sau cu VEC care incorporează siARN anti-Smad2/3 a dus la restabilirea funcției vasculare. La nivel de contracție, grupurile care au fost tratate cu VEC-ADSC sau VEC-MSC care incorporează siARN anti-Smad2/3 au raspuns mai amplu față de cele injectate doar cu VEC-ADSC sau VEC-MSC, iar relaxarea indusă de ACh a fost amplă atât pentru grupele injectate cu VEC-ADSC sau VEC-MSC, cât și pentru cele tratate cu VEC-ADSC sau VEC-MSC care incorporează siARN anti-Smad2/3 (vezi Figura 11 în care sunt prezentate imagini reprezentative pentru înregistrările obținute la miograf ale contracției și relaxării aortei toracice (roșu) și arterei carotide (mov) de la cele 6 grupuri experimentale).

Steluti

Alexandru

Alexandru

1. Libby P, Aikawa M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nat Med* **2002**; 8:1257-1262.
2. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl J Med* **2005**; 352:1685-1695.
3. Baron M, Boulanger C M, Staels B, Tailleux A. Cell-derived microparticles in atherosclerosis: biomarkers and targets for pharmacological modulation? *J Cell Mol Med* **2011**; 1486: 1582-4934.
4. Shantsila E, Kamphuisen PW, Lip GY. Circulating microparticles in cardiovascular disease: implications for atherogenesis and atherothrombosis. *J Thromb Haemost* **2010**; 8:2358–2368.
5. Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)* **2005**; 20: 22–27.
6. Prokopi M, Pula G, Mayr U, Devue C, Gallagher J, Xiao Q, Boulanger CM, Westwood N, Urbich C, Willeit J, Steiner M, Breuss J, Xu Q, Kiechl S, Mayr M. Proteomic analysis reveals presence of platelet microparticles in endothelial progenitor cell cultures. *Blood* **2009**; 114:723–732.
7. Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* **2010**; 107:1047–1057.
8. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of ARNm and protein delivery. *Leukemia* **2006**; 20:847–856.
9. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna* **2004**; 10:1957–1966.
10. Shi MA, Shi G-P. Intracellular delivery strategies for MicroRNAs and potential therapies for human cardiovascular diseases. *Sci. Signal* **2010**; 3:40-47.
11. Diehl P, Fricke A, Sander L, Stamm J, Bassler N, Htun N, Ziemann M, Helbing T, El-Osta A, Jowett JBM, Peter K. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc Res* **2012**; 93:633–644.
12. Siegel, P. M., & Massagué, J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nature Reviews Cancer* **2003**; 3(11), 807–820.
13. Shu, Z., Tan, J., Miao, Y., & Zhang, Q. *The role of microvesicles containing microRNAs in vascular endothelial dysfunction. Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2019, doi:10.1111/jcmm.14716
14. Rayyan, M., Zheutlin, A., & Byrd, J. B. Clinical research using extracellular vesicles: insights from the International Society for Extracellular Vesicles 2018 Annual Meeting. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2018, 7(1), 1535744

Handwritten signature and initials.


Handwritten signatures and initials.


Revendicări:

1. Procedeu de obținere a veziculelor extracelulare modificate caracterizat prin aceea că într-o prima etapă (1) se realizează izolarea celulelor stem de la un subiect, după care într-o a doua etapă (2) se face cultivarea celulelor stem în condiții care să ducă la producerea de VEC în mediul de cultură urmată de (3) purificarea VEC din mediul de cultură condiționat printr-o (3a) centrifugare inițială pentru eliminarea resturilor celulare din mediu, (3b) o ultracentrifugare pentru eliminarea corpurilor apoptotici din mediu și (3c) o ultracentrifugare la o forță x g superioară celei de la punctul anterior pentru sedimentarea VEC urmată de o (3d) spălare într-o soluție apoasă, prin ultracentrifugarea la forțe x g similare celor de la (3c) și (4) încapsularea siARN anti-Smad2/3 în VEC obținute prin (4a) complexarea siARN anti-Smad2/3 cu lipofectamină și (4b) punerea în contact a complexelor de siARN anti-Smad2/3 – lipofectamină cu veziculele extracelulare.

2. Procedeu de obținere a veziculelor extracelulare modificate, conform cu revendicarea 1, caracterizat prin aceea că în etapa (1) într-o primă variantă (1a) celulele stem sunt izolate din țesutul adipos astfel: (i) prelevare lipoaspirat sau țesut adipos subcutanat; (ii) spălare cu o soluție apoasă, așa cum este PBS, urmată de aspirarea fracției apoase și lipidice; (iii) digestie cu proteaze, timp de aproximativ 1 oră la 37°C, sub agitare; (iv) centrifugare și îndepărtarea adipocitelor, lipidelor și a fazei apoase; (v) păstrarea sedimentului în care se găsește fracția stromală vasculară (FSV); (vi) trecere succesivă a FSV prin sită de Nytex (100μm și 70μm), urmată de evaluarea viabilității celulare folosind colorarea cu albastru Trypan 4% a unei alicote a probei; (vii) centrifugare și resuspendarea celulelor în mediu așa cum este DMEM: F12+10% FBS + antibiotice urmată de incubarea la 37°C, 5% CO₂ peste noapte; (viii) îndepărtarea celulelor neadrate și menținerea în cultură a ADSC astfel obținute până la pasaj 3-5.

3. Procedeu de obținere a veziculelor extracelulare modificate, conform cu revendicarea 1, caracterizat prin aceea că în etapa (1) într-o altă variantă, (1b), celulele stem sunt izolate din măduva hematogenă astfel: (i) prelevarea aspiratului medular; (ii) filtrarea suspensiei celulare printr-o sită Nytex de 40μm, în condiții sterile; (iii) centrifugarea suspensiei celulare la 400g, 5 min, 4 °C, urmată de evaluarea viabilității celulare folosind Trypan blue 4% a unei alicote a probei; (iv)

Anduzzi 

Alexandru 

însamantarea celulelor la o densitate de 2×10^6 celule/cm² și menținerea în cultură a MSC astfel obținute până la pasaj 3-5.

4. Procedeu de obținere a veziculelor extracelulare modificate, conform cu revendicarea 1, 2 și 3 caracterizat prin aceea că în etapa (2), celulele sunt expansionate în cultură până la pasajul 3-5 și apoi mediul de cultură este schimbat în mediu de cultură fără ser, pentru a se evita contaminarea cu VEC de altă proveniență decât cele din celulele stem cultivate, după care celulele vor fi păstrate în cultură pentru o durată suficientă pentru acumularea VEC, dar cât celulele să nu aibă de suferit ca urmare a privării de ser, această perioadă poate fi între 12 și 48 de ore.

5. Procedeu de obținere a veziculelor extracelulare modificate, conform cu revendicarea 1, 2 și 3 caracterizat prin aceea că în etapa (2) într-o alta varianta poate fi utilizat mediu care conține ser, dacă anterior au fost îndepărtate VEC din acesta prin procedee cunoscute, în această formă de realizare, celulele sunt menținute în cultură pentru secreția de VEC o perioadă de până la 7 zile, preferabil până la 3 zile.

6. Procedeu de obținere a veziculelor extracelulare modificate, conform cu revendicarile 1-5 caracterizat prin aceea că în etapa (3) într-o variantă în prima fază (3a) are loc eliminarea resturilor celulare din mediu utilizând o centrifugare inițială la forțe de între 300 x g și 10.000 x g, preferabil între 1.000 x g și 5.000 x g, un optim fiind 2.500 x g și pentru durate de între 1 minut și 30 de minute, urmată de prelevarea ulterioară a fracției lichide pentru procesarea ulterioară; în a doua fază (3b) are loc eliminarea corpurilor apoptotici din mediu utilizând o centrifugare la forțe de între 10.000 x g și 20.000 x g și pentru durate de între 1 minut și 20 de minute, urmată de prelevarea ulterioară a fracției lichide pentru procesarea ulterioară; în altă fază (3c) are loc sedimentarea VEC utilizând o ultracentrifugare la o forță x g superioară celei de la punctul anterior, preferabil între 50.000 și 150.000 x g, mai preferabil aproximativ 100.000 x g și pentru durate de între 1 oră și 24 de ore, preferabil 18 ore urmată de aruncarea fracției apoase și păstrarea sedimentului pentru procesarea ulterioară; în altă fază (3d) are loc spălarea într-o soluție apoasă de tip PBS 1x filtrat prin filtru de 0,22 μm prin ultracentrifugarea la forțe x g și pentru durate descrise prin aceleași intervale ca la faza (3c), urmată de îndepărtarea aproape integrală a fracției apoase și resuspendarea VEC obținute în volumul restant de soluție apoasă pentru a nu aspira accidental odată cu tot lichidul și

Julian

Alexandru

sedimentul de VEC, volumul restant este caracteristic, mai puțin de 5%, preferabil mai puțin de 1% din volumul inițial de soluție apoasă;

7. Procedeu de obținere a veziculelor extracelulare modificate, conform cu revendicarile 1-5 caracterizat prin aceea că etapa (3) de purificare a VEC din mediul de cultură condiționat este realizată într-o alta varianta printr-un procedeu alternativ selectat dintre cromatografie cu excludere prin dimensiune, ultracentrifugare în gradient de densitate, ultrafiltrare, precipitare sau o combinație a acestora.

8. Procedeu de obținere a veziculelor extracelulare modificate, conform cu revendicarile 1-7 caracterizat prin aceea că, într-o variantă, în etapa (4), într-o formă de realizare a încapsulării siARN anti-Smad2/3 în VEC, siARN anti-Smad2/3 liofilizat este resuspendat în apă lipsită de RNaze la o concentrație între $1\mu\text{M}$ și $100\mu\text{M}$ este amestecat cu mediu de transfecție în proporție de o unitate de volum de suspensie siARN anti-Smad2/3 la între 1 și 100 unități de volum mediu de transfecție, în paralel, este obținută o soluție de agent de transfecție, în mediu de transfecție la un raport de volum de între 1:10 și 1:100 agent de transfecție la mediu de transfecție, apoi, soluțiile așa cum sunt descrise mai sus sunt amestecate în proporții egale și se incubează la temperatura camerei timp de aproximativ 20 de minute, amestecul astfel obținut este apoi utilizat pentru transferul de siARN anti-Smad2/3 în VEC prin incubarea împreună pentru o durată de între aproximativ 6 ore și 5 zile, opțional, pentru a purifica VEC care încapsulează siARN anti-Smad2/3 din amestec, se face o spălare în soluție salină.

9. Procedeu de obținere a veziculelor extracelulare modificate, conform cu revendicarile 1-7 caracterizat prin aceea că etapa (4) de încapsulare a siARN anti-Smad2/3 este realizată printr-o alta varianta selectate dintre: electroporare, optoporare, sonoporare, biolistică sau transferul pe bază de lipozomi.

Andrei

Hexanoh

Alina

1a) izolarea celulelor stem din țesutul adipos

- i. Prelevare lipoaspirat / țesut adipos subcutanat
- ii. Spălare cu PBS, aspirare fracție apoasă și lipidică
- iii. Digestie cu colagenază 1h la 37°C, cu agitare
- iv. Centrifugare și aspirarea adipocitelor, lipidelor și a fazei apoase
- v. Păstrare 'pellet' - fracție stromală vasculară (FSV)
- vi. Trecere succesivă a FSV prin sită de Nytex (100μm și 70μm), urmată de evaluarea viabilității celulare folosind Trypan blue 4%
- vii. Centrifugare și resuspendare celule în DMEM: F12+10% FBS + antibiotice, și incubare la 37°C, 5% CO₂ peste noapte
- viii. Indepărtare celule neaderate (hematopoietice) și menținere în cultură a ADSC până la pasaj 3-5

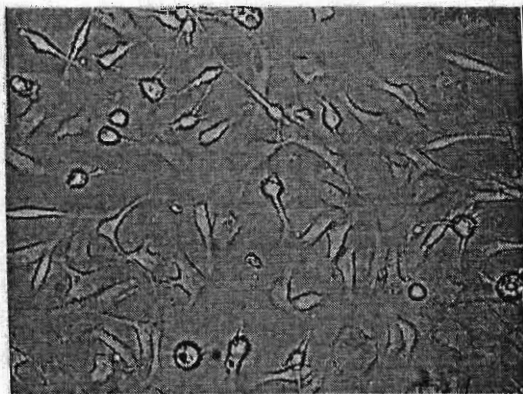


Figura 1.

Andrei

Alexandru

Bucur

1b) izolarea celulelor stem din măduva hematopoietică

i. Prelevarea aspiratului medular



ii. Filtrarea suspensiei celulare
printr-o sita Nytex de 40µm, în
condiții sterile



iii. Centrifugarea suspensiei
celulare la 400g, 5 min, 4°C,
urmată de evaluarea viabilității
celulare folosind Trypan blue 4%



iv. Insamantarea celulelor la o
densitate de 2×10^6 celule/cm²

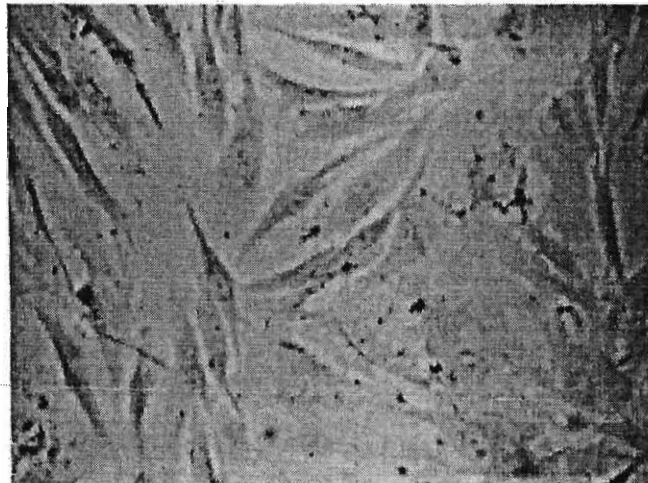


Figura 2.

Andrei *FS*

Alexandra
doz. Dr. *Scary*
Py

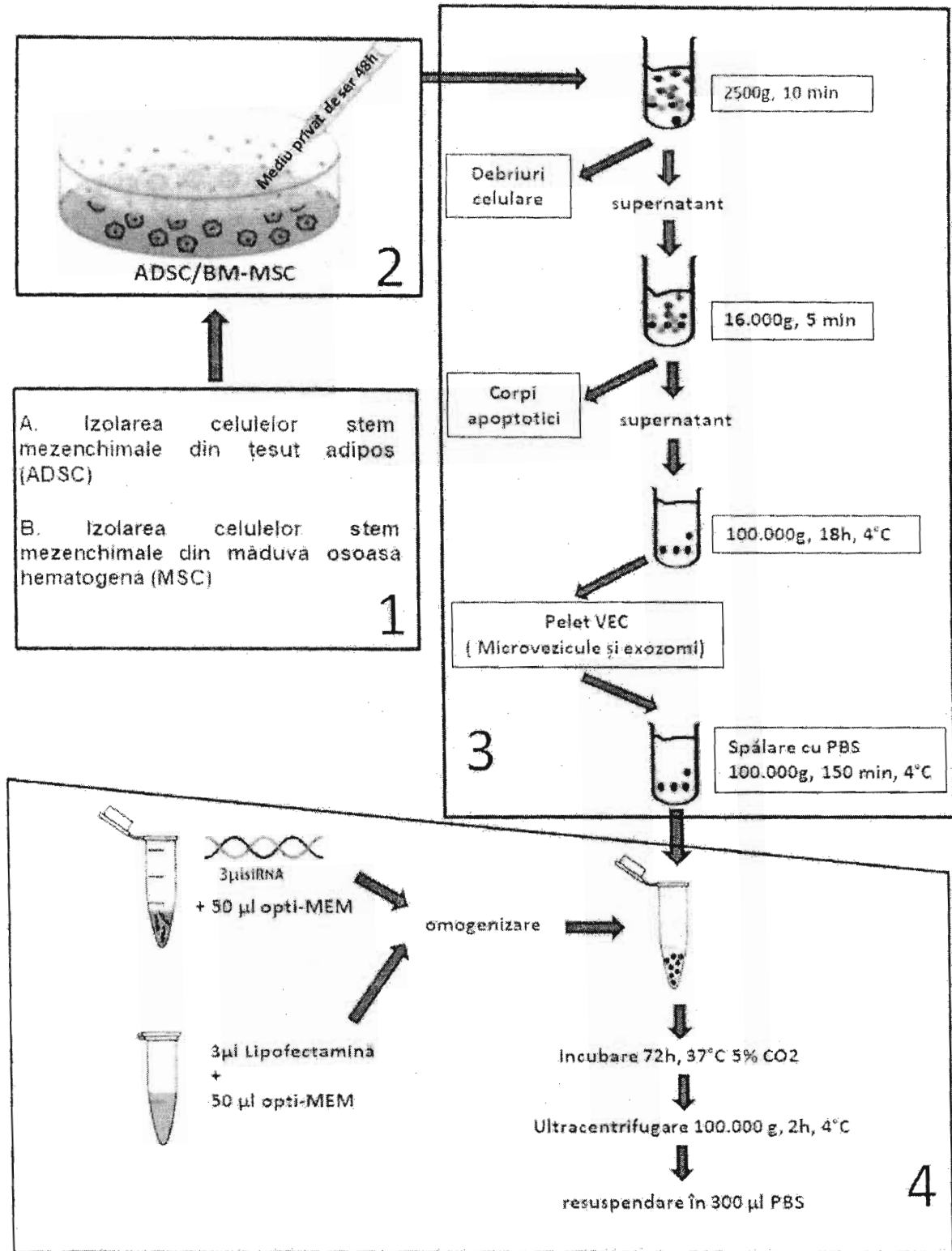


Figura 3.

Andrei P. v.l.

Blexarch de. PhD

Bray

76

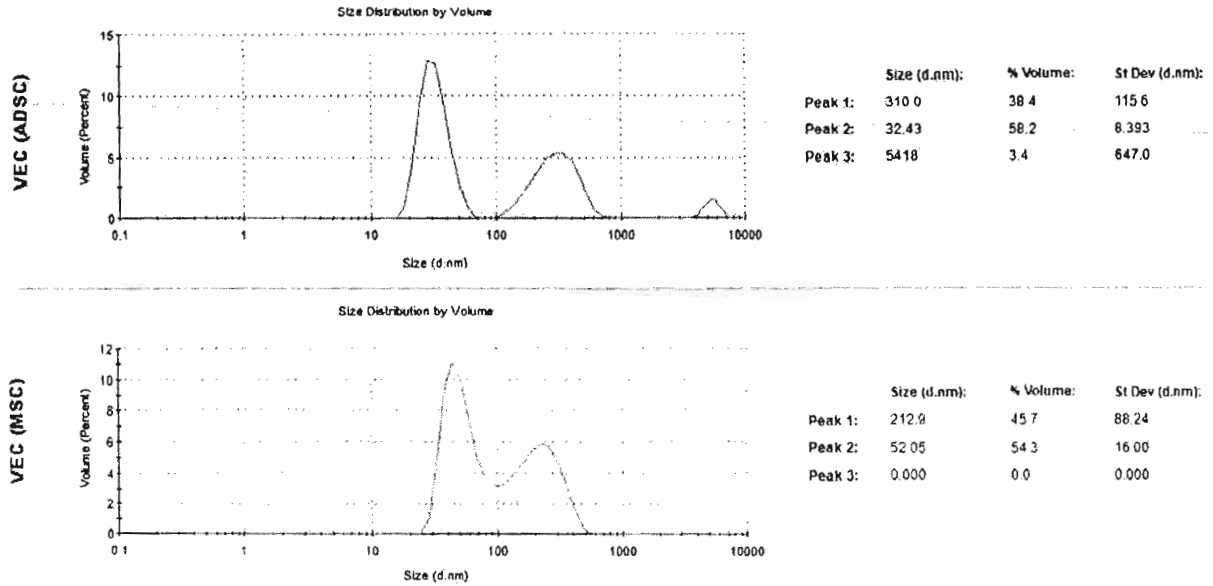


Figura 4

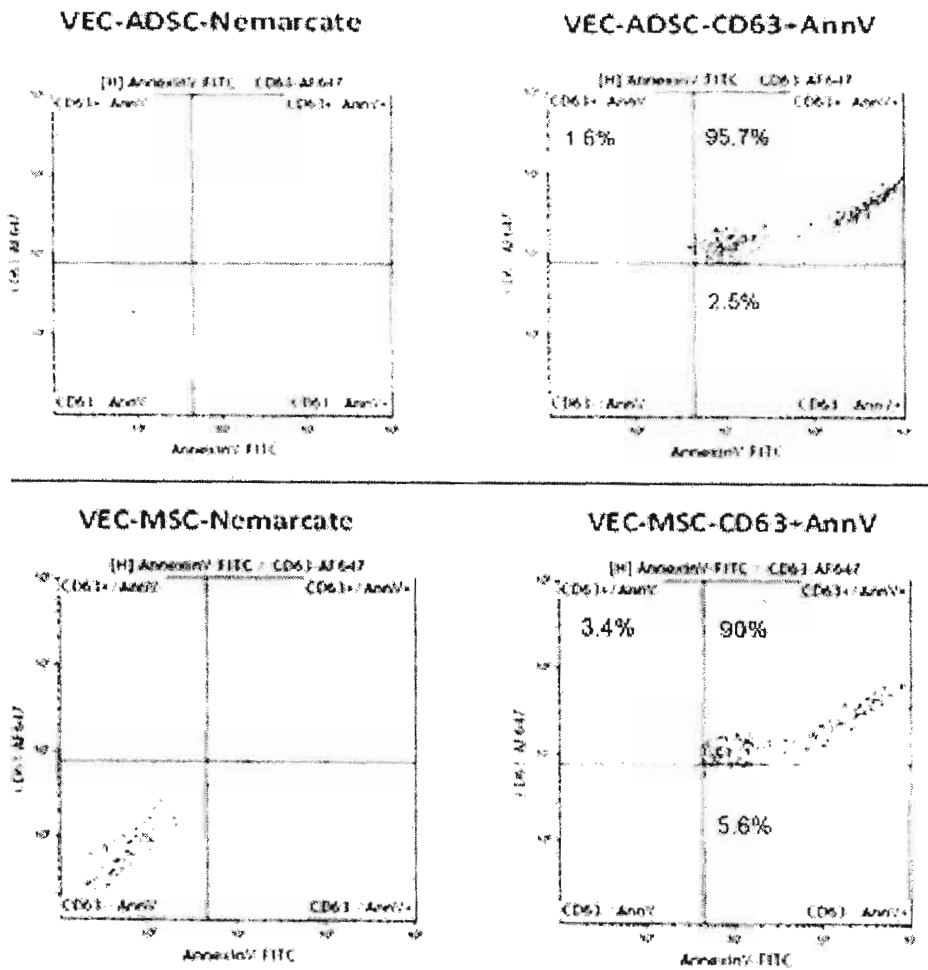
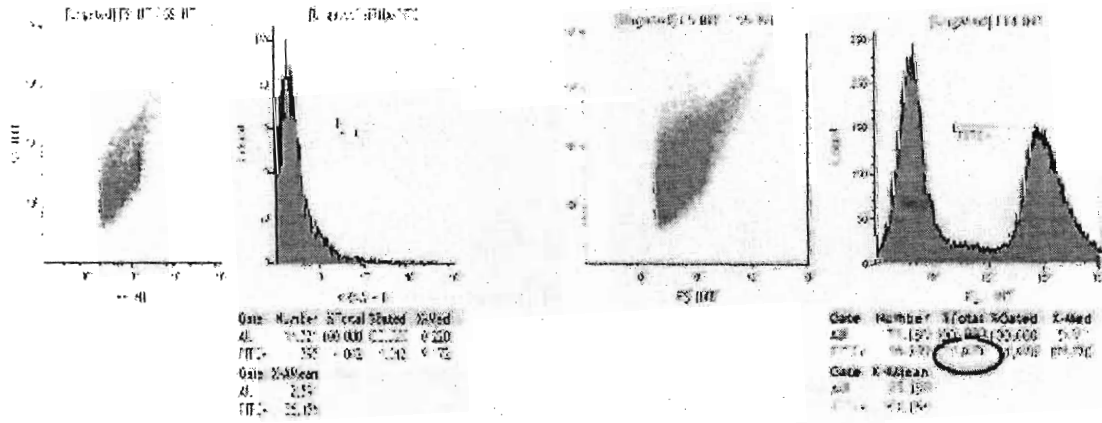


Figura 5.

Handwritten signature

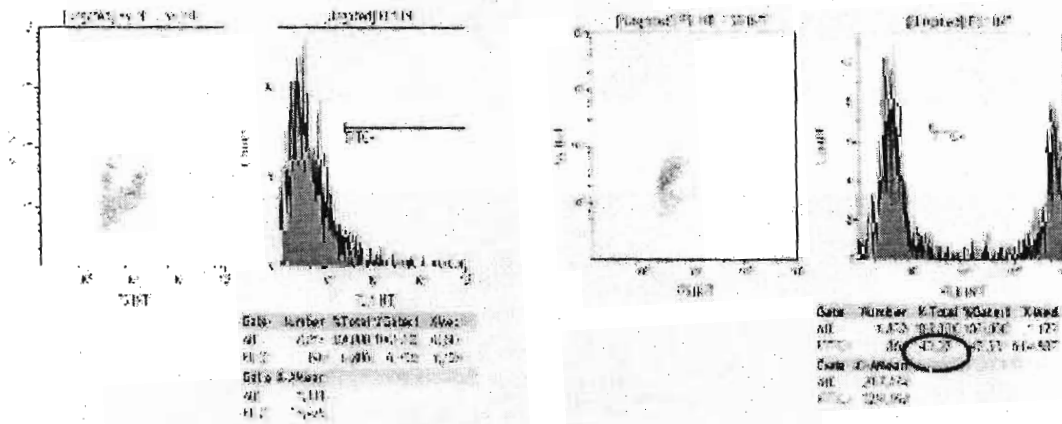
Handwritten signatures and notes

26



VEC-ADSC nemarkate

VEC-ADSC transfectate cu siRNA SMAD 2/3



VEC-MSC nemarkate

VEC-MSC transfectate cu siRNA SMAD2/3

Figura 6

Andrei

[Signature]

[Signature]

[Signature]

74

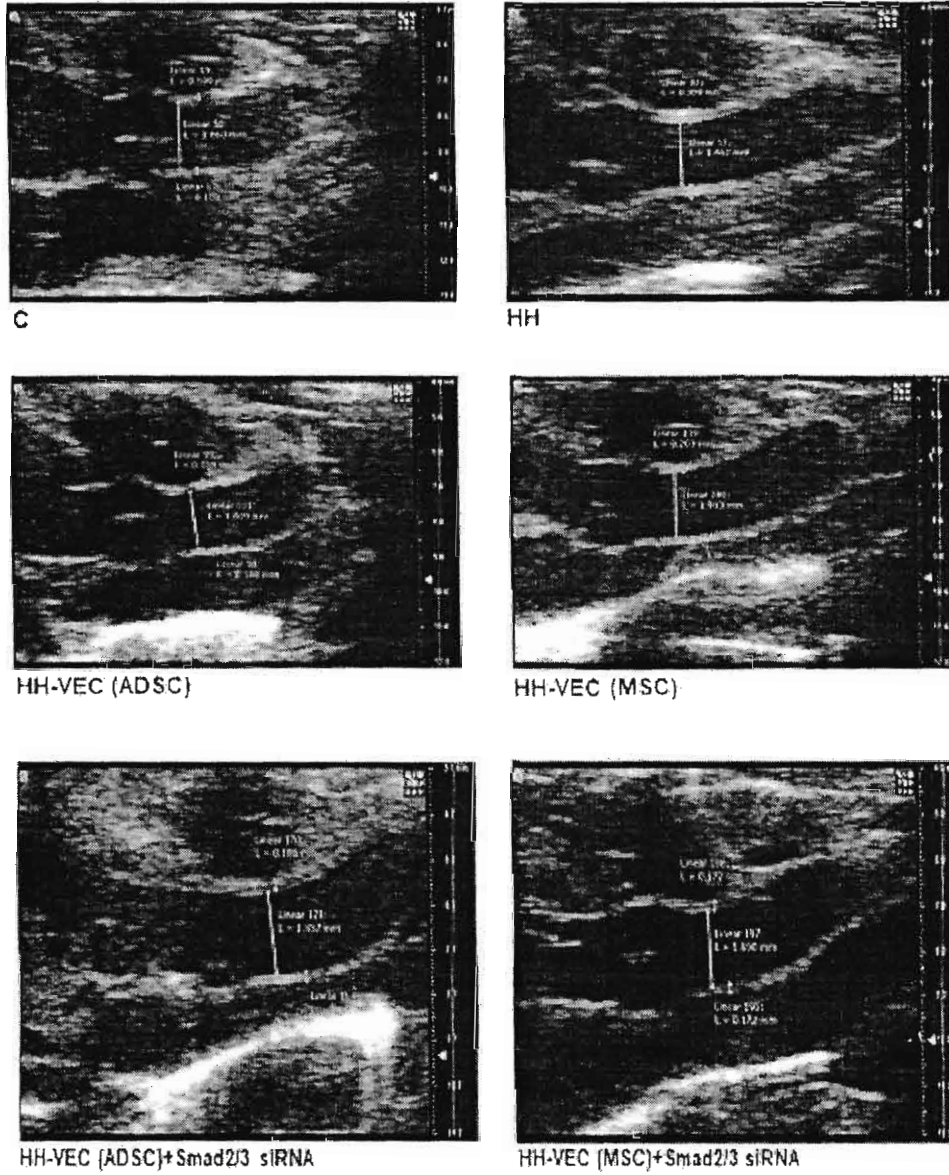


Figura 7

Subyoni [Signature]

Alexander [Signature] [Signature]

78

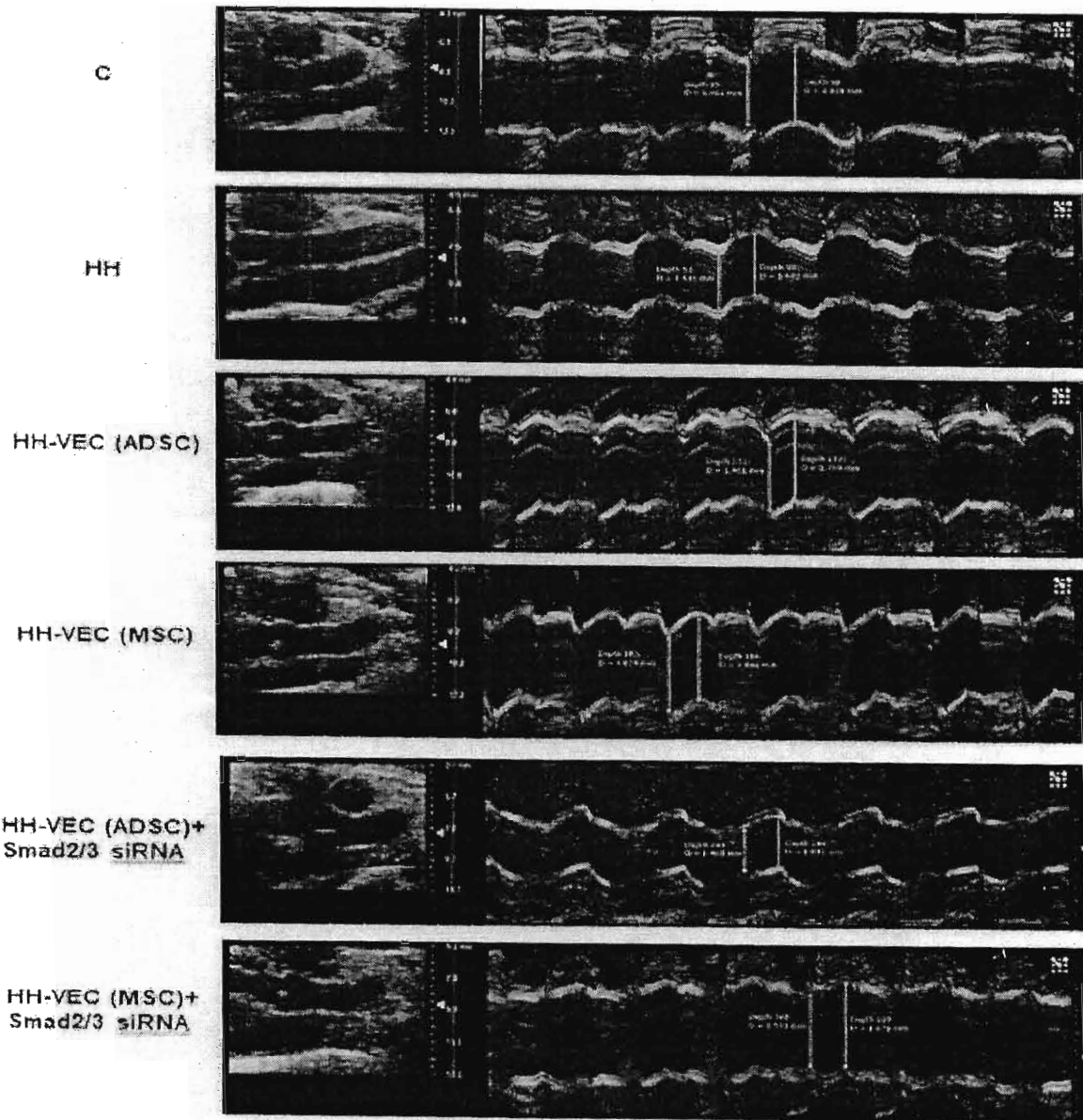




Figura 8

Andrzej 

Alexander 

72

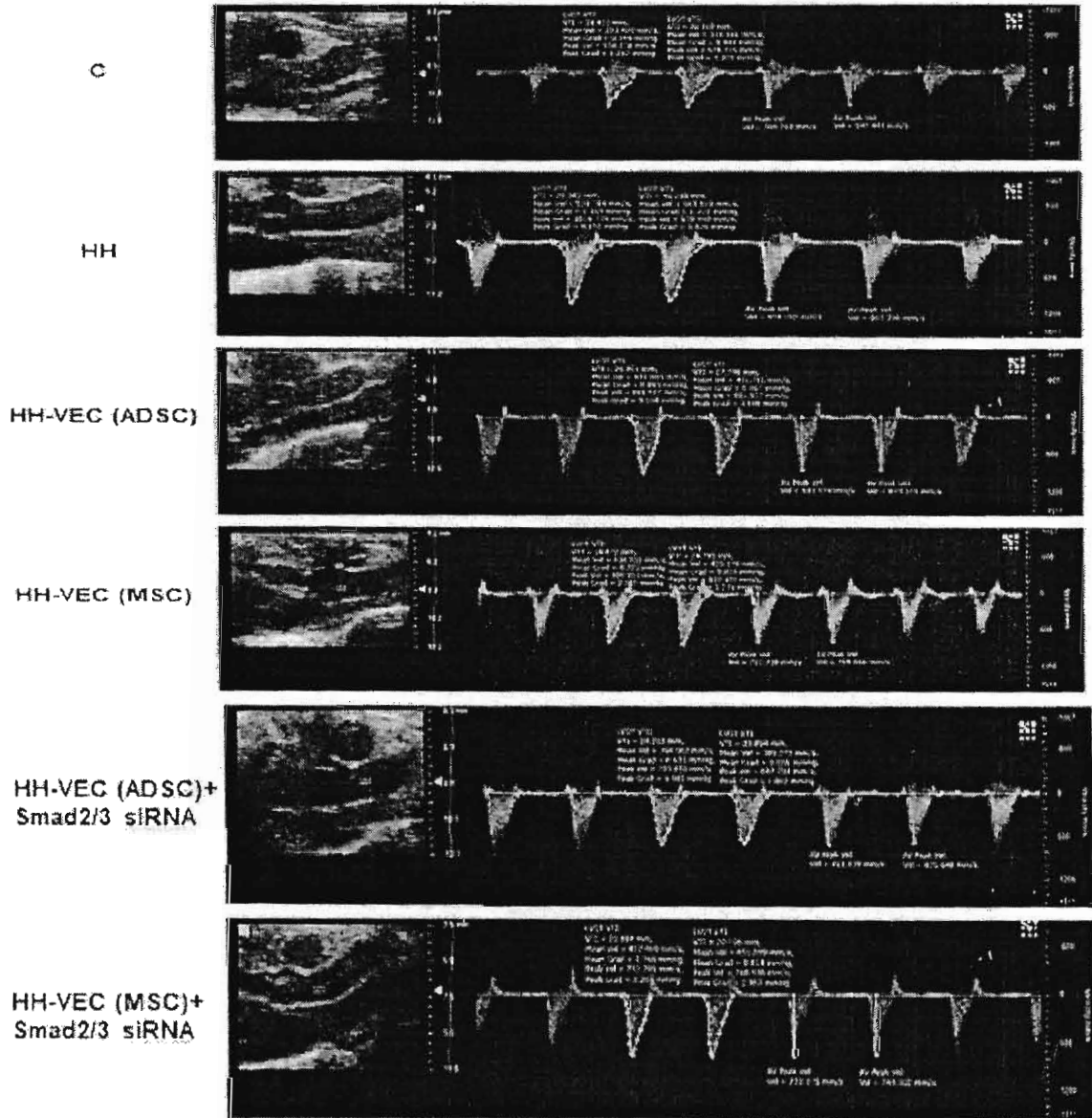


Figura 9

Handwritten signature

Handwritten signatures and notes

21

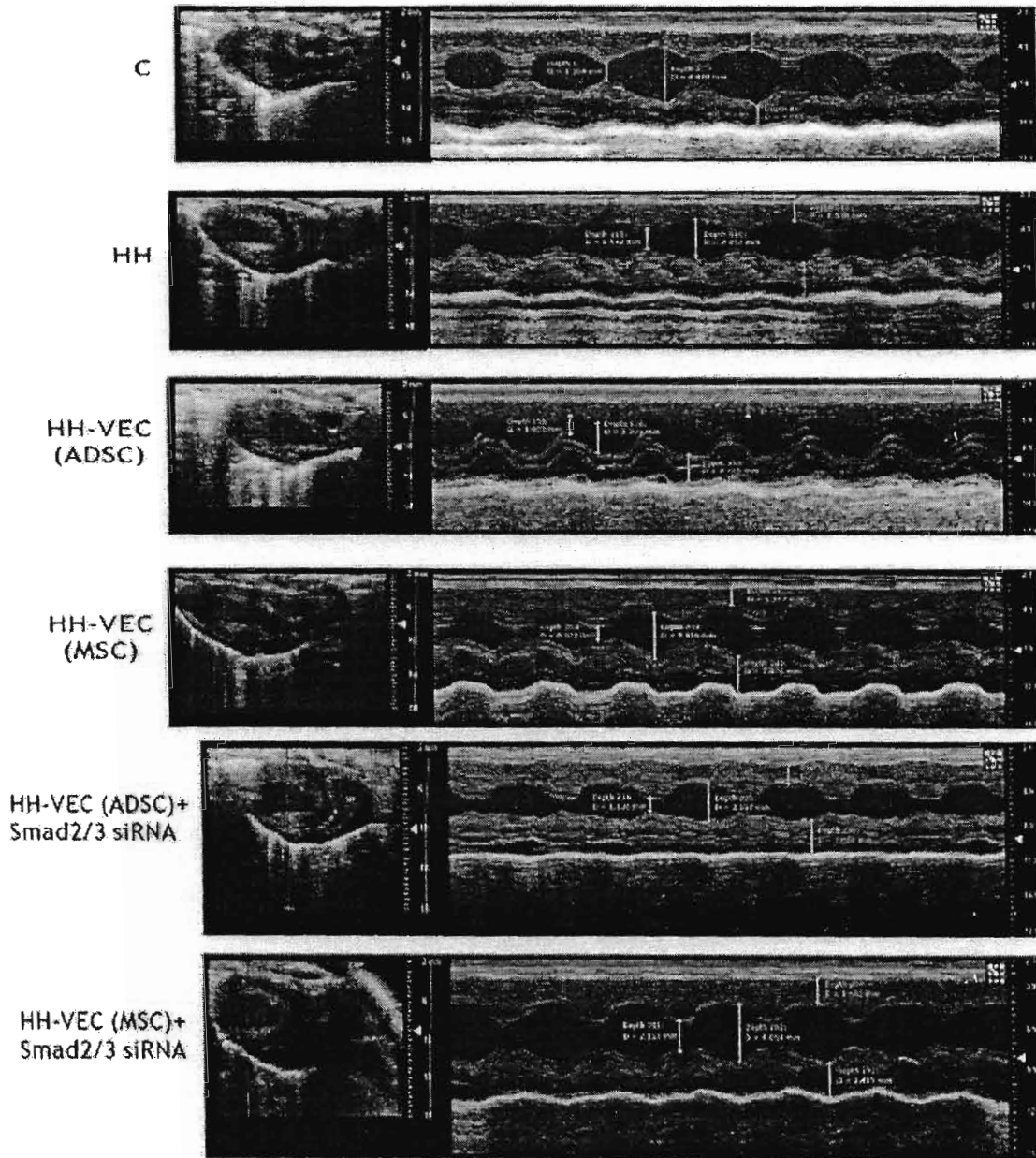


Figura 10

Handwritten signature

Handwritten signature

Handwritten signature

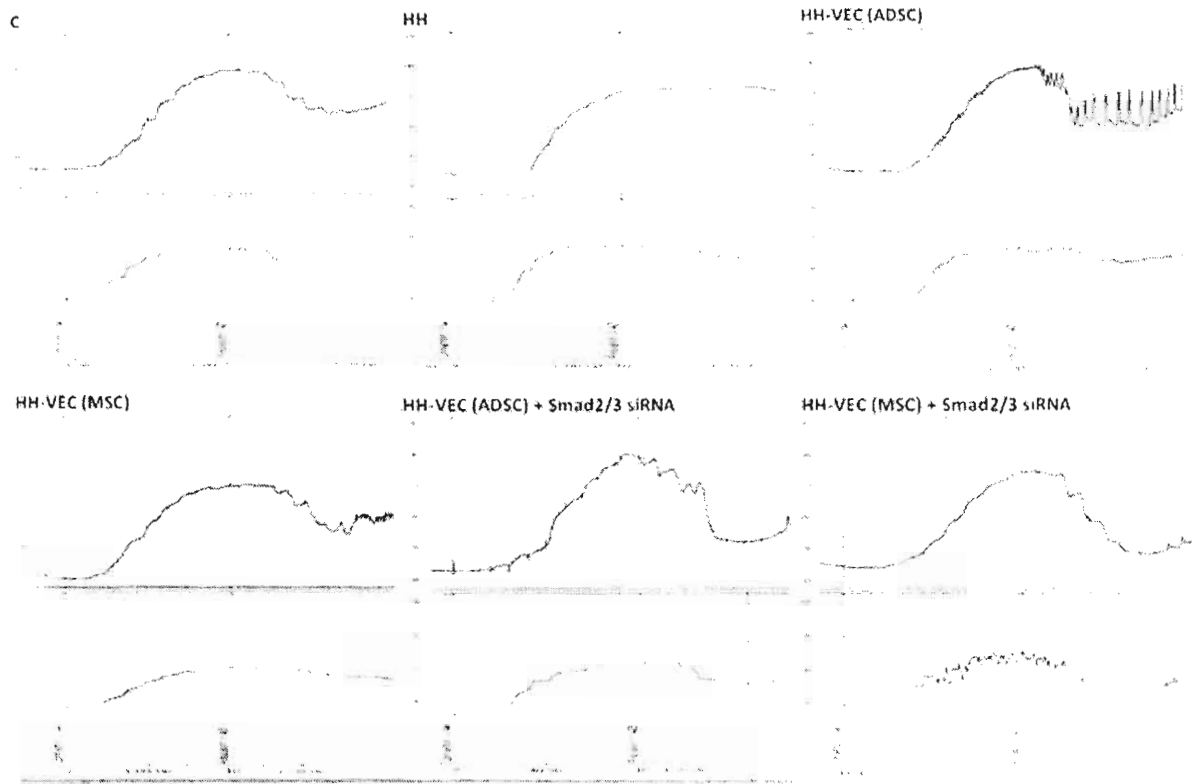


Figura 11

Handwritten signature

Handwritten signatures: Alexandre, David, and a large signature