



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00089

(22) Data de depozit: 03/03/2021

(41) Data publicării cererii:
29/10/2021 BOPI nr. 10/2021

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA TITU
MAIORESCU-INSTITUTUL DE CERCETĂRI
ȘTIINȚIFICE MEDICALE "ACADEMICIAN
NICOLAE CAJAL", CALEA VĂCĂREȘTI,
NR.187, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• TEL HASHOMER MEDICAL RESEARCH,
INFRASTRUCTURE AND SERVICES LTD.,
DERECH SHEBA 2, RAMAT GAN, IL

(72) Inventatori:
• FERBER SARAH, NISSIM ALONI 6,
APT1703, TEL-AVIV, IL;
• LEVY IRIT MEIVAR, HAVRADIM 50B,
YEHUD, IL;
• DIMA SIMONA OLIMPIA,
STR.NĂVODULUI, NR.5A, CONSTANȚA,
CT, RO;
• ȘERBAN ANDREEA-MĂDĂLINA,
DRUMUL BINELUI, NR.184-188, BL.3,
AP.17, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;

• LIXANDRU DANIELA,
STR.OBCINA MARE, NR.7, BL.Z27, SC.1,
ET.10, AP.65, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• FLOREA IOANA RALUCA,
STR.DECEBAL, NR.7BIS, CÂMPULUNG,
AG, RO;
• ASPRITOIU VERONICA MĂDĂLINA,
BD.NICOLAE GRIGORESCU, NR.19,
BL.V18, SC.2, AP.40, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• MATEI IOAN VALENTIN,
STR.DEMOCRĂȚIEI, NR.2, BL.F, SC.A,
AP.14, PLOIEȘTI, PH, RO;
• ALBULESCU RADU,
STR.ROȘIA MONTANĂ NR.6, BL.7, SC.C,
ET.2, AP.125, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• TĂNASE CRISTIANA,
CALEA 13 SEPTEMBRIE NR.126, BL.P 34,
SC.1, AP.30, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;
• POPESCU IRINEL,
STR. DOMNIȚA RUXANDRA NR. 30, ET. 1,
AP. 2, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **UTILIZAREA UNUI BIORECTOR ROTATIV PENTRU
STIMULAREA PROCESULUI DE MATURARE A CELULELOR
PANCREATICE OBȚINUTE PRIN TRANSDIFERENȚIEREA
CELULELOR HEPATICE**

(57) Rezumat:

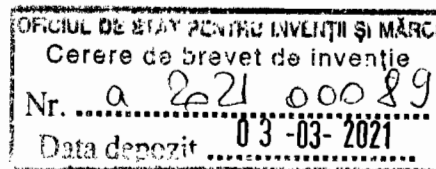
Invenția se referă la o metodă cu aplicabilitate în tratamentul personalizat al diabetului care implică stimularea procesului de maturare a celulelor pancreatice obținute prin transdiferențierea celulelor hepatice. Metoda, conform invenției, constă în cultura tridimensională a celulelor transdiferențiate provenite de la pacienți diabetici, în mediu de cultură DMEM cu 1 g/L glucoză, la care se adaugă 2 mM L-glutamină, într-un bioreactor rotativ cu două porturi, cu volum total de 300...500 ml, la temperatura de 37°C, umiditate de 95% și viteza de rotație 25 rpm, timp de 72 h, respectiv, 8 zile, utilizând suprafețe cu aderență scăzută, cu monitorizarea zilnică a aspectului, integrității și viabilității clusterelor celulare și prin nivelul expresiei genelor specifice celulelor

netratate. Nivelul de expresie al clusterelor de celule pancreatice a fost comparat cu cel al celulelor netratate sau celulelor transdiferențiate în cultura aderentă (2D) drept control. Rezultatele sugerează că această metodă promovează maturarea celulelor endocrine pancreatice generate prin diferențierea celulelor hepatice. Nivelul de maturare a celulelor endocrine pancreatice este determinat prin analiza nivelului de expresie genică a markerilor specifici celulelor endocrine pancreatice mature.

Revendicări: 5
Figuri: 4

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





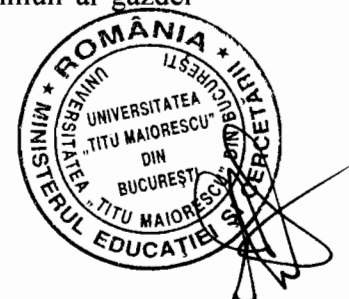
**UTILIZAREA UNUI BIORECTOR ROTATIV PENTRU STIMULAREA PROCESULUI DE
MATURARE A CELULELOR PANCREATICE OBȚINUTE PRIN
TRANSDIFERENȚIEREA CELULELOR HEPATICE**

Prezenta invenție face referire la o metodă de utilizare a unui bioreactor rotativ în condiții predefinite de cultură 3D pentru stimularea procesului de maturare a celulelor pancreatice obținute prin transdiferențierea celulelor hepatice.

Pancreasul endocrin, care reprezintă aproximativ 1-2% din masa pancreatică totală, are drept unitate morfo-funcțională insula Langerhans. Mai multe tipuri celulare cu funcții diferite intră în componența insulelor Langerhans. Printre acestea, cele mai numeroase sunt celulele β , care reprezintă 57.1% din totalul celulelor pancreatice. La nivelul celulelor β are loc producția și secreția de insulină, ca răspuns la factori multipli, în principal nivelul seric crescut de glucoză, dar și anumiți aminoacizi, gliceraldehide sau acizi grași liberi (Eriksson, și alții, 2013).

Disfuncțiile la nivelul insulelor Langerhans determină apariția diabetului. O serie de forme anatomo-clinice distincte pot fi incluse în această arie patologică. Dintre acestea, diabetul zaharat tip I, sau insulino-dependent, afectează 5-10% din totalul pacienților diabetici (Mezza, și alții, 2014). Diabetul tip I se caracterizează etiologic prin distrucția specifică a celulelor β pancreatice, fără o afectare a celorlalte tipuri celulare din cadrul insulei Langerhans. Procesul de distrucție are la bază o reacție auto-imună, care face ca organismul să perceapă ca structură străină celulele producătoare de insulină și să le distrugă.

Opțiunile terapeutice standard în acest moment vizează aportul extern de insulină, prin injecții administrate zilnic. Aree de cercetare inovative includ transplantul de insule pancreatice, sub forma unui allotransplant, cu donator insular cadaveric sau xenogrefe insulare de la anumite specii animale, în principal bovine sau porcine (Figliuzzi, și alții, 2005) (Zhu, Wang, Yu, & Wang, 2014). Rămân însă constrângeri importante, legate de numărul mic de organe disponibile pentru transplant de la donator cadaveric, variabilitatea și cantitatea mică de insule pancreatice obținute prin disociere, dar și lezarea fizică și mecanică a structurilor celulare ca urmare a procedurilor incluse în procesul de izolare. Fiind vorba de hetero- sau xeno- transplant, răspunsul imun al gazdei



rămâne un aspect esențial de luat în considerare, iar necesitatea tratamentului imunosupresor post-transplant este corelată cu efecte adverse semnificative.

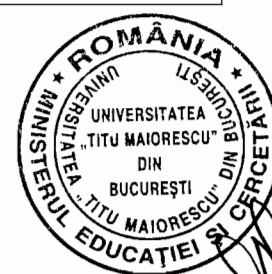
În acest context, în ultimii ani s-au intensificat cercetările în domeniul obținerii de celule pancreatice autoloage, iar transdiferențierea din celule hepatice s-a impus ca o opțiune viabilă (Meivar-Levy & Ferber, 2019). Deși principiile fundamentale sunt larg înțelese, prioritatea în acest context rămâne punerea la punct a unor protocoale fiabile, care să asigure proliferarea și maturarea rapidă și completă a celulelor endocrine pancreatice derivate prin transdiferențierea celulelor hepatice.

Cu excepția situațiilor specifice în care se fac mențiuni explicite, toți termenii tehnici și științifici utilizați în descrierea prezentei invenții au înțelesul comun atribuit în domeniul de expertiză la care fac referire. Deși materiale și metode similare sau echivalente celor descrise mai jos pot fi utilizate în practică pentru testarea și utilizarea curentă a prezentei invenții, materialele și metodele adecvate sunt cele descrise în prezentul document.

Toate publicațiile și referințele utilizate au fost incluse în text cu date de identificare complete. Descrierea materialelor și metodelor întrebuițate, precum și exemplele incluse au rol ilustrativ și nu sunt menite să fie limitative. Pe lângă cele menționate explicit, alte funcționalități și avantaje ale prezentei invenții pot deriva din descrierea detaliată furnizată.

Echipa are experiență anterioară solidă în domeniu, reflectat și în lista de patente deținute cuprinsă mai jos.

Nr. Crt.	Titlu	Inventator	Data publicării	Numărul de înregistrare
1.	<i>Methods of transdifferentiation and methods of use thereof</i>	Sarah FERBER, Tel Aviv (IL)	24 Septembrie 2020	US 2020/0297777 A1
2.	<i>Transdifferentiated cell populations and methods of use thereof</i>	Sarah FERBER, Tel Aviv (IL)	7 Mai 2020	US 2020/0140825 A1



3.	<i>Cell populations, methods of transdifferentiation and methods of use thereof</i>	Sarah FERBER , Tel Aviv (IL)	29 Noiembrie 2018	US 2018 / 0340146 A1
4.	<i>Methods of inducing regulated pancreatic hormone production in non-pancreatic islet tissues</i>	Sarah FERBER , Tel Aviv (IL)	1 Noiembrie 2016	US 9.481,894 B2
5.	<i>Methods of inducing regulated pancreatic hormone production in non-pancreatic islet tissues</i>	Sarah Ferber, Ramat Hasharon (IL)	27 Decembrie 2012	US 2012/0329710 A1
6.	<i>Method of inducing regulated pancreatic hormone production in non-pancreatic islet tissue</i>	Sarah Ferber (IL)	7 Aprilie 2011	JP 2011-68660 A 2011.4.7

Scopul invenției este de a proteja o metodă de cultură 3D într-un bioreactor rotativ care asigură maturarea celulelor endocrine pancreatice generate prin transdiferențierea celulelor hepatice. Procesul de maturare celulară la nivelul pancreasului endocrin este determinat prin nivelul relativ de expresie genică al markerilor exprimați în mod natural de celula matură din insula Lanherhans. Punerea la punct a unor protocoale care să optimizeze fiecare etapă din procesul de obținere de celule autoloage cu potențial de suplینire a funcției endocrine pancreatice reprezintă o prioritate actuală în planul cercetării terapiei personalizate a diabetului zaharat.

Procesul de transdiferențiere reprezintă reprogramarea directă de celule adulte, fără interpoziție de stări intermediare de pluripotență, prin transformarea unui tip celular într-un tip celular distinct, cu fenotip și funcție specifice (Graf, 2011).

Modelul de transdiferențiere utilizat în descrierea invenției vizează utilizarea de factori de transcripție pancreatici, introduși la nivel celular prin transfecție cu adenovirusuri recombinante (Berneman-Zeitouni, și alții, 2014). Acestea au rolul de a induce modificări epigenetice la nivelul ADN-ului celulei gazdă, determinând exprimarea unor gene altfel inactive. De remarcat că intervenția acestor factori de transcripție este punctuală și de scurtă durată, efectul funcțional fiind

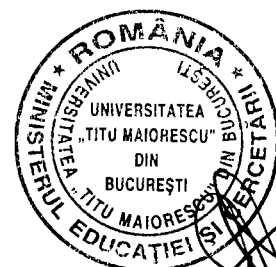


însă unul ireversibil (Meivar-Levy & Ferber, 2006). În cazul de față, celulele hepatice, care au aceeași origine embriologică cu cele pancreatice, prezintă și avantajul unui număr mare de receptori adenovirali la nivelul membranei plasmatică, ceea ce face ca infecția cu adenovirusul recombinant să fie eficientă (Arnberg, 2012).

Prima etapă în protocolul de transdiferențiere este reprezentată de obținerea biopsiilor hepatice. Cu o greutate de 1-2 g, acestea sunt secționare inițial în porțiuni de 1-2 mm diametru. Izolarea hepatocitelor se realizează mai apoi urmând procedura descrisă anterior (Kim, și alții, 1995) (Sapir, și alții, 2005). Procesul de digestie a țesutului se efectuează folosind colagenază tip I 0.03% pentru 20 de minute la 37°C. Mediul de cultură folosit este reprezentat de DMEM cu 1g/L glucoză, cu adăugare de 10% ser FBS, sub protecție antibiotică și antifungică prin adăugarea de penicilină 100 μg/ml, streptomycină 250 ng/ml și amfotericină B. Se utilizează pentru cultură plăci cu înveliș de fibronectină (3 μg/cm²), la o concentrație de 1-2 x 10⁵ celule/ml. Culturile celulare sunt păstrate în incubator, cu atmosferă de 5% CO₂ și 95% aer, la temperatură de 37°C. Schimbarea mediului se realizează zilnic în primele trei zile, în vederea îndepărtării celulelor non-aderente. Rata de multiplicare celulară este monitorizată pentru a asigura un număr de celule suficient de mare pentru crioprezervare și utilizare în aplicații ulterioare.

Următoarea etapă este reprezentată de procesul de infecție cu adenovirusuri recombinante, care asigură expresia factorilor specifici de transcripție. Acestea au rolul de a asigura expresia ectopică a factorilor de transcripție pancreatică la nivelul celulelor hepatice. Rata de eficiență a infecției adenovirale a celulelor hepatice devine astfel un factor determinant al succesului procesului de transdiferențiere pancreatică. În acest sens, se impune monitorizarea acestui parametru în cadrul protocolului de cercetare.

Pentru procesul de inducere a transdiferențierii *in vitro*, mediul de cultură ales este reprezentat de DMEM cu 1 g/L glucoză, la care se adăugă 2 mM L-glutamine, 10% FBS și amestecul antibiotic/antifungic penicilină/streptomycină/amfotericină, 10 mM nicotinamidă, 20 ng/ml EGF și 5 nM exendină-4. Densitatea celulară optimă este de 10 000 celule/cm². Studii anterioare ale grupului (Berneman-Zeitouni, și alții, 2014) au pus în evidență ca factori determinanți pentru acest proces nu doar prezența și expresia acestor factori de transcripție, ci și stricta succesiune temporală a etapelor implicate. Astfel, secvența de transfecție include:



- Timp 0: 1000 MOI Ad-*PDX-1* și 250 MOI Ad-*NEUROD1*
- După 48 de ore: numărarea celulelor și transfecția cu 50 MOI of Ad-*MAFA*; repunere în cultură în aceleași condiții descrise anterior
- După 72 de ore: determinarea nivelului de expresie genică

Pentru analiza expresiei genice, metodologia este cea descrisă anterior în publicațiile din laboratorul Prof. Ferber (Sapir, și alții, 2005). ARN-ul total este izolat din celule, cu obținerea succesivă a ADNc utilizat în reacția de RT-PCR cantitativ. Setările procesului de amplificare includ inițierea la 50°C pentru 2 minute și denaturarea la 95°C pentru 10 minute, urmate de 40 de cicluri, fiecare dintre acestea cu denaturare la 95°C pentru 15 secunde și anelare la 60°C pentru 1 minut. Analiza expresiei relative se realizează după metoda C_T comparativ, folosind formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, cu normalizare la nivelul de expresie al β -actinei sau TBP.

După determinarea nivelului de expresie genică, celulele transdiferențiate astfel obținute sunt păstrate în cultură. Studii anterioare realizate utilizând celule embrionare sau celule stem pluripotente (Bose & Sudheer, 2016) au arătat în acest sens superioritatea culturilor 3D, care permit creșterea numărului de interacțiuni inter-celulare și o mai bună proliferare și maturare a celulelor endocrine pancreatice.

Invenția prezentată urmează direcția definirii condițiilor de cultură 3D care să permită definitivarea procesului de maturare a celulelor pancreatice obținute prin transdiferențierea celulelor hepatice. În acest scop, definim condițiile de lucru într-un bioreactor rotativ cu proprietăți specifice. De asemenea, ilustrăm eficiența acestei proceduri prin analiza nivelului de expresie genică a unor markeri specifici celulelor pancreatice mature.

Bioreactorul utilizat este PRB 0.5 MAG (PBS Biotech®). Dimensiunile acestui tip de bioreactor sunt de 13.3/ 16.3/ 15.5 cm, iar acesta poate asigura viteze de rotație verticală cuprinse între 5 și 100 RPM, cu o posibilitate de ajustare fină de ± 1 RPM. Dispozitivul este versatil și din punctul de vedere al temperaturilor de lucru, ce pot fi incluse în intervalul 16-40°C, și al umidității- 0-100%. Pentru transdiferențierea celulelor hepatice în celule pancreatice, bioreactorul ales are două porturi, ceea ce permite un volum total de lucru de 300-500 mL. Schimbul de gaze este controlat de un filtru de 0.22 μ m, situat în capacul portului. Lista completă de specificații ale bioreactorului este făcută publică de producător (<https://www.pbsbiotech.com/pbs-mini.html>)



cercetării noastre, parametrii de funcționare au inclus o temperatură de 37°C, umiditate de 95%, și o viteză de rotație 25 RPM.

Noutatea invenției vine din utilizarea acestui tip de dispozitiv pentru o aplicație originală, și anume maturarea celulelor hepatice transdiferențiate în cultură 3D a clusterelor de celule pancreatice transdiferențiate din celule hepatice (denumite și „sferoide”, „celule sferoide” „colonii de celule 3D”). De asemenea, s-a demonstrat eficiența transdiferențierii prin evaluarea nivelului de expresie genică a factorilor endogeni pancreatici NKX6.1 și GCG în celulele TD din sistemul tridimensional PBSmini cu ajutorul qRT-PCR.

Mediul de cultură utilizat nu include FBS, iar suprafața non-aderentă și condițiile de mediu controlate strict de la nivelul bioreactorului sunt factorii care stimulează proliferarea celulară și formarea de clustere. Numărul crescut de interacțiuni inter-celulare contribuie astfel la creșterea gradului de maturare a celulelor pancreatice, aspect corelat cu o funcționalitate crescută și un potențial impact clinic superior.

Aplicabilitatea invenției a fost demonstrată printr-un studiu desfășurat în cadrul proiectului Diacure (ID P_37_794 – cod MySMIS 106897), Universitatea Titu Maiorescu, Bucuresti. Prelevarea și prelucrarea probelor de țesut hepatic s-au făcut după obținerea acordului instituțional pentru realizarea cercetării, în toate centrele implicate din Romania, Israel si Korea. Biopsiile hepatice au provenit de la 25 de pacienți cu vârste cuprinse între 2 și 79 de ani, diabetici sau non-diabetici. Pacienții adulți și aparținătorii pacienților minori au semnat consimțământ informat înaintea includerii în studiu.

Dintre donatorii incluși, 14 pacienți (56%) sunt bărbați, iar 11 (44%) sunt femei. Șapte pacienți (28%) sunt copii, 8 pacienți (32%) au vârste între 18 și 40 de ani, în timp ce 10 donatori (40%) au vârste peste 60 de ani. Au fost incluși atât pacienți diabetici (36% din totalul celor incluși, respectiv 50% dintre adulți), cât și pacienți cu valori glicemice normale. Dintre donatorii diabetici, 6 aveau diabet zaharat tip 2 (33% din grupul pacienților adulți, 24% din totalul pacienților din studiu), în timp ce 3 pacienți aveau diabet zaharat tip 1 (16.6% dintre adulți, 12% din totalul celor incluși în studiu).

Biopsiile hepatice au fost prelevate și prelucrate conform protocolului descris anterior (Sama și alții, 2005). Rata de multiplicare celulară a acestora a fost monitorizată până la pasajele 10-12.



timpul de dublare mediu fiind calculat pentru pasajele 2-10. Valorile au variat între 2.47 ± 0.57 zile și 8.47 ± 3.83 zile, cu o valoare medie pentru grupul testat de 5.03 ± 1.65 zile. Toate cele 25 de biopsii hepatice ale pacienților incluși în studiu au avut rate de proliferare celulară corespunzătoare în cultură.

Următoarea etapă a fost reprezentată de procesul de infecție cu adenovirusuri recombinante. Pentru a evalua eficiența acestui proces, s-a determinat într-o primă etapă rata generală de infecție adenovirală. Criteriile de analiză au inclus vârsta donatorului, sexul, precum și statusul metabolic-pacienți diabetici și non-diabetici. În acest scop a fost ales Ad-CMV-eGFP, un adenovirus recombinant care are la nivelul regiunii promotoare CMV GFP, marker fluorescent care permite identificarea cu ușurință în microscopie cu faza de contrast a celulelor infectate viral. Doza de adenovirus a fost incrementată treptat pe parcursul a 5 zile, iar rata de infecție a fost determinată la finalul acestei perioade. Valoarea acesteia a fost cuprinsă între $50 \pm 9.8\%$ celule pozitive, în cazul utilizării unei doze de adenovirus de 500 MOI, și $86.1 \pm 7.6\%$, pentru 1300 MOI. Nu au existat diferențe semnificative statistic între grupurile de donatori, conform criteriilor predefinite.

Pentru a putea evidenția superioritatea metodelor de mentinere în cultură 3D, am utilizat celulele transdiferențiate provenind de la 12 pacienți adulți, diabetici sau normoglicemici. Pentru aceste celule, am utilizat în paralel două condiții diferite de cultură, metoda clasică 2D, cu aderență la substrat, și 3D, cu utilizarea unor suprafețe cu aderență scăzută. Cultura 2D s-a realizat în mediul anterior descris, cu includere de 10% FBS, în timp ce pentru celulele non-aderente s-a optat pentru un mediu fără ser. De asemenea, s-au folosit drept control celule netratate cu factori de transdiferențiere.

Pentru cultura 3D în bioreactorul rotativ, aspectul clusterelor celulare a fost monitorizat zilnic, cu evaluarea integrității și viabilității. **Figura 1** prezintă aspectul specific al unui astfel de stoc celular, pentru care au fost utilizate condițiile descrise anterior (Aspectul stocului celular transdiferențiat cu ajutorul factorilor Ad5-CMV-PDX1, Ad5-CMV-MafA, Ad5-CMV-NeuroD1 în cultură tri-dimensională în bioreactor rotativ la 72 de ore- A, respectiv 8 zile- B).

În următoarea etapă de analiză, a fost evaluat comparativ eficiența procesului de transdiferențiere, prin determinarea nivelului de expresie al factorilor PDX-1, NEUROD1 și MAF A pentru celule transdiferențiate vs. netratate, în condiții de cultură 2D și respectiv, 3D.

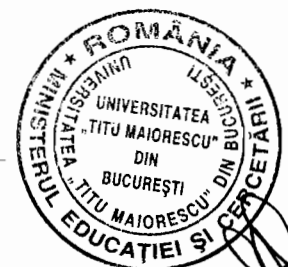


tridimensională au fost considerate două condiții. Mai întâi a fost inclus un stoc celular pe substrat non-aderent de polihidroxietilmetacrilat (polyHEMA), iar mai apoi celule menținute în bioreactorul rotativ. Rezultatele arată că utilizarea unor condiții de cultură non-aderente, în bioreactor rotativ, cu stimularea formării de cluster celulare, fără FBS adăugat, crește expresia ectopică a factorilor de transcripție pancreatică (**Figura 2-** Expresia genică determinată prin qRT-PCR a factorilor ectopici de transcripție pancreatică PDX1, NeuroD1 și MafA în celule transdiferențiate menținute în sistemul tridimensional PBSmini (cu evoluția lor în timp), comparat la 5 zile de cultură cu sistemul bidimensional și sistemul tridimensional standard cu PolyHEMA . Probele au fost normalizate la țesut pancreatic, TBP s-a folosit ca genă housekeeping. Axa Y- nivelul relativ de expresie genică al factorilor PDX-1, NeuroD1 și MAFA. Formarea sferoidelor pe sistem tridimensional cu PolyHEMA sau cu sistemul PBS mini (cu evoluția lor în timp), a avut loc consecutiv infecției cu Ad-MafA. Mediul a fost completat cu 10% ITS în locul soluției de 10% ser fetal bovin).

Efectele semnificative ale utilizării unui mediu de cultură 3D, cu ITS, într-un bioreactor rotativ, sunt evidente și în analiza gradului de maturare celulară post-transdiferențiere, evaluat prin nivelul relativ de expresie genică a unor markeri specifici celulelor mature din insulele Langerhans, și anume *NKX6.1* și *GCG* (**Figura 3-** Determinarea nivelului relativ al expresiei genice prin qRT-PCR pentru factorii pancreatici endogeni *NKX6.1* și *GCG* în celule transdiferențiate menținute în sistemul tridimensional PBSmini (cu evoluția lor în timp), comparat la 5 zile de cultură cu sistemul bidimensional și sistemul tridimensional standard cu PolyHEMA. Probele au fost normalizate la țesut pancreatic. Axa Y- nivelul relativ de expresie genică al factorilor *NKX6.1* și *GCG*).

Pentru evaluarea funcțională, agregatele au fost colectate și transferate la nivelul inserturilor și plasate pe o placă de 12 godeuri, fiind tratate cu KRB + 2mM glucoză și incubate la 37°C timp de 2h. Apoi inserturile au fost transferate pe plăci de 24 de godeuri și tratate cu KRB+2mM glucoză și incubate la 37°C timp de 30'; supernatantul s-a colectat în vederea realizării testului ELISA. Ulterior, inserturile au fost tratate cu KRB+17,5mM glucoză și incubate la 37°C timp de 30'; supernatantul s-a colectat de asemenea în vederea realizării testului ELISA. Evaluarea comparativă s-a efectuat astfel pentru cele două condiții- *low* și, respectiv *high-glucose*, și în două momente diferite în timp, la 3 și 8 zile. Datele obținute pentru un stoc celular au arătat creșterea în timp a secreției de peptid C mediată de concentrații crescute de glucoză (17,5mM) pentru celulele din

sistemul tridimensional PBSmini (**Figura 4-** Creșterea secreției de peptid C la 72 de ore, respectiv 8 zile în cultură tridimensională în bioreactor rotativ pentru probele tratate cu KRB+17.5mM glucoză comparativ cu probele tratate cu KRB+2,5mM).



AVANTAJE

Aplicarea invenției în practica transdiferențierii de celule pancreatice din celule hepatice oferă avantaje multiple, atât generale, în domeniul medicinei personalizate, cât și specifice procedurii în discuție.

Înainte de toate, într-o manieră generală, punerea la punct a unui protocol de lucru în această direcție permite reproductibilitatea procedurii, făcând astfel posibilă aplicarea sa în mai multe centre de cercetare. Aceasta constituie fără îndoială o etapă esențială spre aplicarea soluției în mod curent ca opțiune de terapie personalizată a pacienților cu diabet zaharat.

În mod specific, utilizarea unui bioreactor rotativ cu proprietăți specifice ca ultima etapă în procedeul de transdiferențiere a celulelor pancreatice din celule hepatice oferă avantajele evidențiate din aplicarea sa în exemplul citat. Astfel, față de cultura 2 D, cultura celulară 3D în bioreactor rotativ prezintă avantajul creșterii gradului de interacțiune inter-celulară, care la rândul său antrenează, conform studiilor din literatură, o proliferare celulară mai bună. În același timp, menținerea celulelor transdiferențiate în bioreactor, conform protocolului descris, stimulează maturarea lor, aspect obiectivat prin determinarea nivelului relativ de expresie genică a markerilor celulari specifici celulelor pancreatice mature. În plus, utilizarea acestui dispozitiv asigură menținerea funcționalității celulare, obiectivate prin creșterea secreției de peptid C.



Abrevieri utilizate

Nr. Crt.	Abreviere	Semnificație
1.	ADN	Acid Dezoxiribonucleic
2.	DMEM	Mediu de cultură Dulbecco modificat (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
3.	FBS	Ser Bovin Fetal (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
4.	CMV	Citomegalovirus
5.	GFP	Proteină Fluorescentă Verde (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
6.	MOI	Rată de infecție virală (<i>Multiplicity of Infection</i>)
7.	EGF	Factorul de creștere epidermal (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
8.	ITS	Soluție insulină-transferină-seleniu (<i>Insulin-Transferrin-Selenium</i>)
9.	PDX-1	Factorul de transcripție pancreatico-duodenal tip 1 (<i>Pancreatic Duodenal Homeobox type 1</i>)
10.	NEUROD1	Factorul de diferențiere neurogenică tip 1 (<i>Neurogenic differentiation factor 1</i>)
11.	MAFA	Factorul de transcripție musculoaponevrotic omolog tip A al oncogenei de fibrosarcom (<i>V-maf Musculoaponeurotic Fibrosarcoma oncogene homolog A</i>)
12.	ARN	Acid Ribonucleic
13.	ADNc	Acid Dezoxiribonucleic Complementar
14.	RT-PCR	Reacție de polimerizare în lanț cu revers-transcriere (<i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i>)
15.	TBP	Proteină de legare secvență TATA (<i>TATA-Box Binding Protein</i>)
16.	RPM	Rotații pe minut



Referințe

- Arnberg, N. (2012). Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors. *Trends in pharmacological sciences*, 33(8), 442-448.
- Berneman-Zeitouni, D., Molakandov, K., Elgart, M., Mor, E., Fornoni, A., Domínguez, M., . . . Ferber, S. (2014). The temporal and hierarchical control of transcription factors-induced liver to pancreas transdifferentiation. *PLoS One*, 9(2):e87812. doi:10.1371/journal.pone.0087812
- Bose, B., & Sudheer, P. (2016). In Vitro Differentiation of Pluripotent Stem Cells into Functional beta Islets Under 2D and 3D Culture Conditions and In Vivo Preclinical Validation of 3D Islets. *Methods in Molecular Biology*, 257-284.
- Eriksson, A., Svensson, C., Hörnblad, A., Cheddad, A., Kostromina, E., Eriksson, M., . . . Ahlgren, U. (2013, Jan 12). Near infrared optical projection tomography for assessments of β -cell mass distribution in diabetes research. *Vis Exp*, 71:e50238. doi:10.3791/50238
- Figliuzzi, M., Cornolti, R., Plati, T., Rajan, N., Adobati, F., Remuzzi, G., & Remuzzi, A. (2005). Subcutaneous xenotransplantation of bovine pancreatic islets. *Biomaterials*, (28):5640-7. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.02.019
- Graf, T. (2011). Historical origins of transdifferentiation and reprogramming. *Cell Stem Cell*, 504-516. doi:10.1016/j.stem.2011.11.012
- Kim, H., Han, S., Hyun, B., Ahn, C., Cha, Y., Jeong, K., & Oh, G. (1995). Functional human hepatocytes: isolation from small liver biopsy samples and primary cultivation with liver-specific functions. *J Toxicol Sci*, 20(5):565-78.
- Meivar-Levy, I., & Ferber, S. (2006). Regenerative medicine: using liver to generate pancreas for treating diabetes. *Isr Med Assoc J*, 8: 430-434.
- Meivar-Levy, I., & Ferber, S. (2019). Liver to Pancreas Transdifferentiation. *Curr Diab Rep*, 19(9):76. doi:10.1007/s11892-019-1198-2



- Mezza, T., Muscogiuri, G., Sorice, G., Clemente, G., Hu, J., Pontecorvi, A., . . . Kulkarni, R. (2014, Mar.). Insulin resistance alters islet morphology in nondiabetic humans. *Diabetes*, 63(3):994-1007. doi:10.2337/db13-1013
- Sapir, T., Shternhall, K., Meivar-Levy, I., Blumenfeld, T., Cohen, H., Skutelsky, E., . . . Ferber, S. (2005). Cell-replacement therapy for diabetes: Generating functional insulin-producing tissue from adult human liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(22): 7964–7969.
- Zhu, H., Wang, W., Yu, L., & Wang, B. (2014). Pig-islet xenotransplantation: recent progress and current perspectives. *Front Surg*, 1:7. doi:10.3389/fsurg.2014.00007



REVENDICĂRI

1. O metodă de stimulare a maturării în condiții de cultură 3D în bioreactor rotativ a celulelor pancreatice rezultate din transdiferențierea celulelor hepatice, prin utilizarea unui bioreactor cu proprietăți specifice (Single-Use Bioreactors with Vertical-Wheel™ Technology).
2. O metodă de stimulare a maturării celulelor endocrine pancreatice provenite din transdiferențierea celulelor hepatice în condiții de cultură 3D prin utilizarea oricărui dispozitiv cu caracteristici comune cu cele ale bioreactorului rotativ Single-Use Bioreactors with Vertical-Wheel™ Technology, care prin funcționarea sa asigură parametri similari de mediu pentru celulele pancreatice rezultate din transdiferențierea celulelor hepatice
3. O metodă de stimulare a maturării celulare prin utilizarea unui dispozitiv cu caracteristici comune cu cele ale bioreactorului rotativ anterior descris, care prin funcționarea sa asigură parametri similari de mediu pentru celule transdiferențiate rezultate din orice tip celular și cu orice fenotip celular rezultat în urma procesului de transdiferențiere
4. O metodă de stimulare a caracteristicilor epiteliale și inhibare a caracteristicilor mezenchimale ale celulelor umane propagate în cultură 2D
5. Utilizarea metodei descrise la punctul 3 în tratamentul diabetului zaharat.



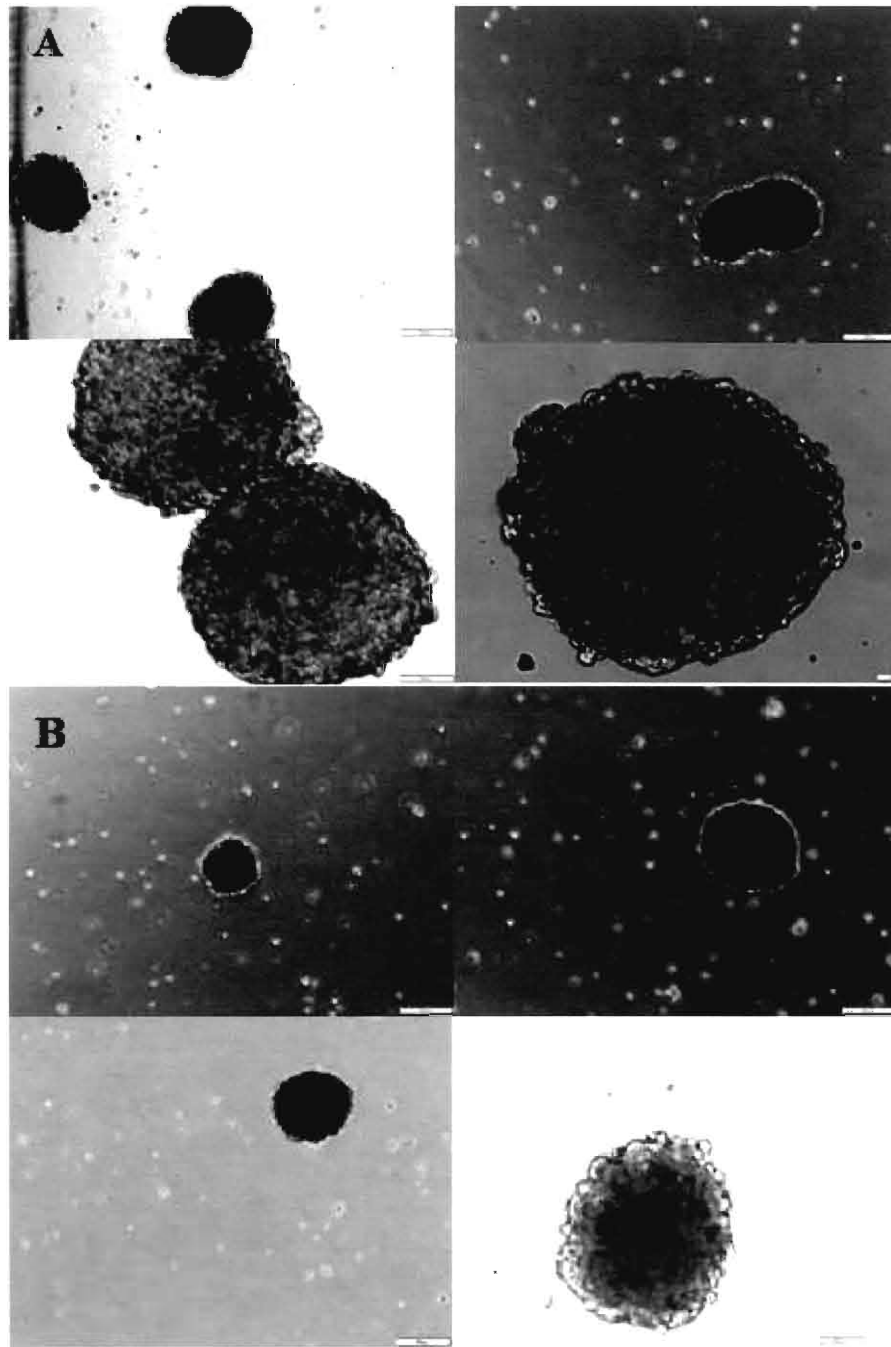


Figura 1.



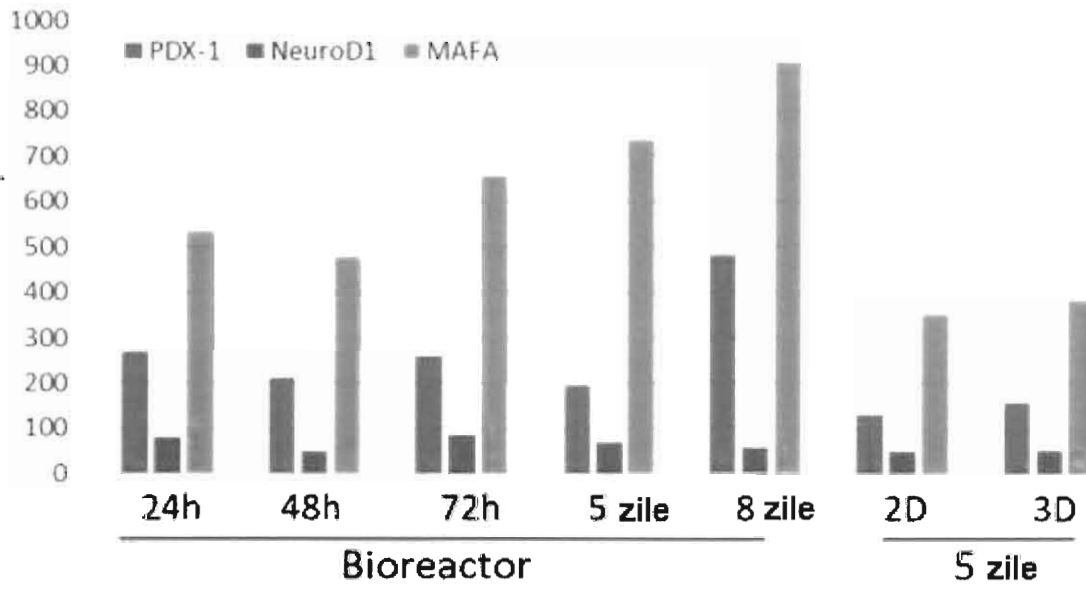


Figura 2.



Handwritten signature.

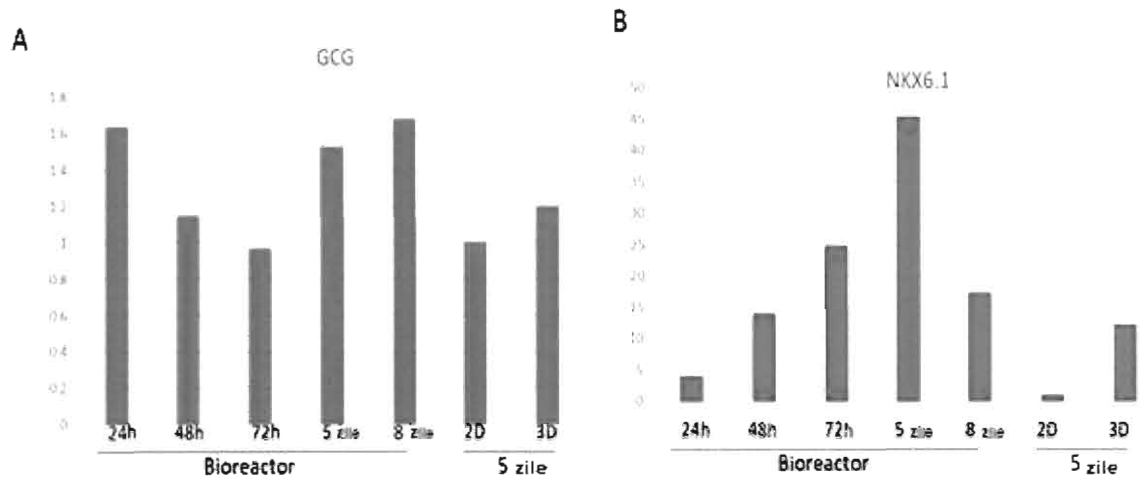


Figura 3.

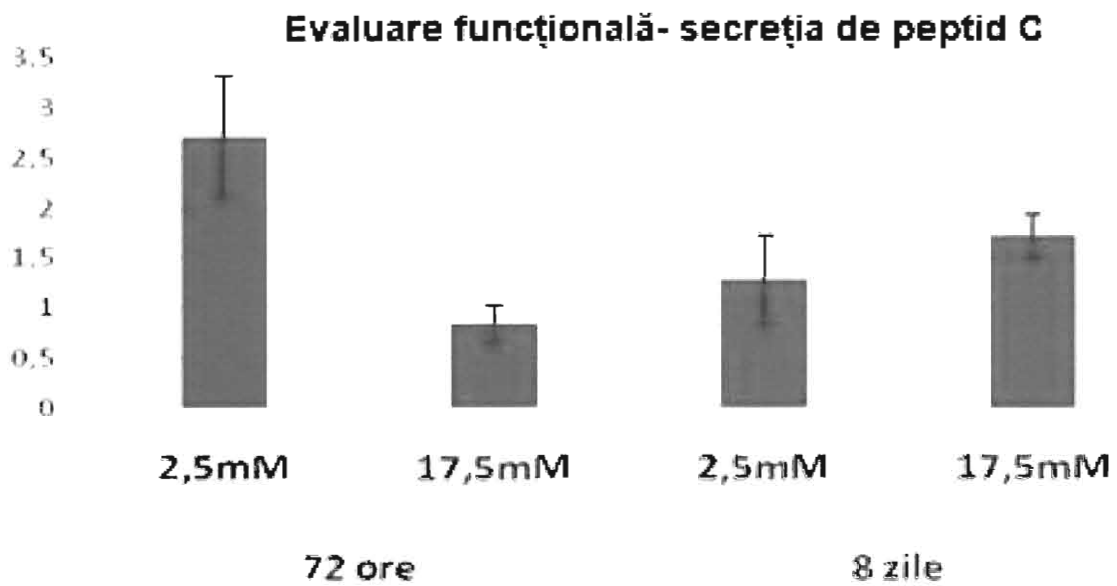


Figura 4.



[Handwritten signature]