



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00284

(22) Data de depozit: 25/05/2020

(41) Data publicării cererii:
30/12/2021 BOPI nr. 12/2021

(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;
• VLAD LOREDANA MIHAELA, STR.
PUTNA, NR. 8, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• CONSTANTIN ALINA,
ALEEA COLOANA INFINITULUI, NR. 5,
BL. K, SC. 2, AP. 27, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;

• CONSTANTINESCU CRISTINA ANA,
STR. MIHAIL SEBASTIAN NR. 110, BL. V86,
SC. 2, AP. 68, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;
• ALEXANDRU-MOISE NICOLETA,
ALEEA MARIUS EMANOIL BUTEICA,
NR. 29-33, SC. 1, AP. 17, SECTOR 3,
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) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNOR CELULE
PROGENITOARE ENDOTELIALE MODIFICATE GENETIC**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor celule progenitoare endoteliale modificate genetic pentru tratamentul complicațiilor cardiovasculare ale unor boli metabolice, în special tratamentul valvulopatiei diabetice. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de:

- 1) recoltare a sângelui de la un pacient, de la un donator sau dintr-o colecție de sânge de la mai mulți donatori,
- 2) separare a monocitelor, prin centrifugare în gradient de densitate sau centrifugare împotriva curgerii utilizând un elutriator,
- 3) lizare celulară suplimentară,

- 4) izolare celule progenitoare endoteliale (EPC),
- 5) identificare EPC,
- 6) procese specifice de transfer deliberat de acid nucleic și
- 7) administrarea EPC modificare genetic către subiect prin injectare sau perfuzie intravenoasă într-un regim de dozare personalizat.

Revendicări: 12
Figuri: 6



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	2020-05-284
Data depozit ...	25-05-2020

84

PROCEDEU DE OBTINERE A UNOR CELULE PROGENITOARE ENDOTELIALE MODIFICATE GENETIC

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor celule progenitoare endoteliale modificate genetic folosite în terapia celulară în contextul complicațiilor cardiovasculare ale unor boli metabolice, în special la tratamentul valvulopatiei diabetice.

Diabetul zaharat este o afecțiune care afectează în prezent 387 de milioane de persoane din întreaga lume iar, până în 2035, se estimează că acest număr va crește la 592 milioane (Guariguata, Whiting și colab. 2014).

Boala afectează 11,6% din populația românească (Mota, Popa și colab. 2016). La pacienții cu diabet zaharat se constată o frecvență semnificativ mai mare a tulburărilor cardiovasculare, inclusiv a bolilor valvulare cardiace.

În prezent nu există un tratament medicamentos pentru disfuncțiile valvelor cardiace, singura opțiune fiind repararea sau înlocuirea prin intervenții chirurgicale. Diabetul zaharat (DZ) este un factor de predicție a degenerării structurale/functionale a valvei, factor de prognostic rezervat în boala valvulară cardiacă idiopatică, accelerând degenerarea bioprotezelor de valva aortică implantate (Lorusso, Gelsomino și colab. 2012, Schulte, Simionescu și colab. 2013).

Este cunoscut faptul că celulele progenitoare endoteliale (EPC) constituie un sistem endogen important cu rol în menținerea integrității endoteliului și a homeostaziei vasculare (Urbich și Dimmeler 2004). Mobilizarea EPC din maduva osoasă și recrutarea lor la situsurile lezate sunt mediate de factorul de creștere a endoteliului vascular (VEGF), angiopietina-1 (Ang1), factorul de creștere a fibroblastelor (FGF), factorul de stimulare a coloniilor de granulocite și macrofage (GM-CSF), activitatea metaloproteinazei 9 (MMP-9), factorul derivat din celula stromală-1 (SDF-1) și de agenți farmacologici cum ar fi statinele și eritropietina (EPO) (Carmeliet, Ferreira și colab. 1996, Asahara, Masuda și colab. 1999, Hattori, Heissig și colab. 2001, Szmítko, Wang și colab. 2003).

EPC facilitează neovascularizarea și angiogeneza, iar efectul lor benefic poate fi mediat atât prin înlocuirea directă a celulelor lezate, cât și prin secreția paracrină a factorilor angiogenici și a citokinelor. Există studii care sugerează că la pacienții cu stenoză aortică, regenerarea celulelor endoteliale (CE) valvulare este afectată nu doar de amplificarea senescenței CE valvulare, dar și de reducerea numărului și funcției EPC circulante. Recrutarea celulelor la situsul lezat și integrarea sunt determinate de numărul de EPC circulante (Matsumoto, Adams și colab. 2009), dar și de capacitatea de adeziune a EPC, care suferă modificări în timpul maturării celulelor.

Este cunoscut că integrinele sunt receptori pentru adeziunea celulară care leagă în principal liganzi din matricea extracelulară dar și de la suprafața celulară. La oameni, familia de integrine este compusă din 24 de heterodimeri $\alpha\beta$ transmembranari, formați din subunități 18α și 8β (Takada, Ye și colab. 2007), care leagă ținte așa cum sunt motivul RDG al fibronectinei, vitronectina, fibrinogenul, epitopul GFOGER al colagenului, laminina, molecula de adeziune a celulelor vasculare 1 (VCAM-1), molecula de adeziune celulară 1,2,3,5 (ICAM-1,-2,-3,-5) și altele (Barczyk, Carracedo și colab. 2010). Integrinele joacă roluri atât în interacțiunea dintre celule și între celule și matricea extracelulară, dar și în modificarea formei celulare, migrare, diferențiere, proliferare și apoptoză, prin semnalizare din interiorul celular spre exterior și din exterior către interiorul celular (Miranti și Brugge 2002). Pentru mobilizarea EPC din măduva hematogenă și aderarea la celulele endoteliale activate și matricea extracelulară sunt importante diferite integrine.

Astfel, Abplanalp și colab. au arătat în 2016 că fosforilarea integrinei VLA-4 ($\alpha4\beta1$) mediată de protein kinaza dependentă de c-AMP (PKA) și indusă de hiperglicemie duce la sechestrarea EPC în măduva hematogenă (Abplanalp, Conklin și colab. 2016). Proteina VLA-4 este un heterodimer format dintr-o subunitate integrină $\alpha4$ și o subunitate integrină $\beta1$ care are ca ținte de legare fibronectina și molecula VCAM-1 exprimată la suprafața celulelor endoteliale activate.

Tringhi, Hely, Chruscu CA, C. f. A. B. C.

Dezavantaje ale stadiului tehnicii

1. Valvulopatia diabetică este o boală cronică degenerativă fără metode considerabile de prevenire
2. Singurul tratament disponibil pentru valvulopatia diabetică constă în protezare atunci când valva aortică este afectată sever
3. Bioprotezele de valvă aortică sunt la rândul lor degenerate accelerat în diabet
4. Bioprotezarea necesită deseori tratament cu imunosuprimante pe perioadă nedeterminată.

Problema tehnica pe care o rezolva inventia este obtinerea printr-un procedeu a unor celule progenitoare endoteliale modificate genetic care sa permita un tratament mult mai eficient în special la tratamentul valvulopatiei diabetice, care previne necesitatea tehnicilor de protezare sau bioproteze, a unor tratamente imunosuprimante, oferă posibilitatea țintirii mai multor situsuri cu leziuni înainte ca acestea să devină clinic simptomatice, oferă posibilități de tratament care sunt minim invazive și au citotoxicitate mică.

Procedeul de obținere a unor celule progenitoare endoteliale modificate genetic rezolva aceste probleme prin aceea ca are o prima **etapă** de recoltare a sângelui de la pacient, de la un donator, dintr-o colecție de sânge de la mai mulți donatori, urmată de o **etapa** de separare a monocitelor prin centrifugare, unde densitatea mediului de separare în gradient de densitate este cuprinsă între 1 și 1.2 g/cm³, cu un optim cuprins între 1.05 și 1.1 g/cm³. Pentru eliminarea suplimentară a posibilelor eritrocite care contaminează celulele mononucleare purificate în aspectele invenției prezentate mai sus este utilizată o **etapă** de liză celulară, urmată de o **etapa** de izolare EPC, în care celulele progenitoare endoteliale (EPC) sunt izolate din monocitele sanguine pe baza exprimării la suprafața lor celulară a proteinelor marker de celule progenitoare, CD34, CD133 și a markeriilor de celule endoteliale, CD31, VEGFR2, urmată de o **etapa** de identificare EPC, pentru care sunt selectati anticorpii utilizați pentru identificarea EPC din categoria anticorpi primari conjugați cu fluorofori, anticorpii specifici care sunt neconjugați, care sunt la rândul lor legați de anticorpi secundari care recunosc izotipul anticorpului primar, urmată de o **etapa** de procese specifice de transfer deliberat de acid nucleic, unde celulele progenitoare endoteliale (EPC) izolate sunt transfectate pentru a supra-exprima proteina VLA-4, un heterodimer alcătuit din subunitățile proteice, integrina α4 (Itgα4) și integrina β1 (Itgβ1), acizii nucleici care codifică (Itgα4) și (Itgβ1) pot fi clonați într-un vector, de tip: plasmidă, cosmidă, bacmid, fag, cromozom artificial sau virus, care permite inserarea unui secvențe genetice (ADN), (ARN) pentru a se obține replicarea și translația secvenței atașate. Într-o **etapă** are loc administrarea EPC modificate genetic către pacient prin injecție, perfuzare intravenoasă.

Într-o **primă variantă** separarea monocitelor se face prin centrifugare în gradient de densitate, într-un recipient tubular pentru o durată cuprinsă între 5-60 minute, utilizând forțe de la 100 la 1000 x g, unde se obține în partea superioară a tubului o bandă de plasma sanguină, o bandă care conține monocite, o bandă unde se găsește mediul de separare în gradient care poate conține celulele polimorfonucleare, iar în partea de jos o banda a eritrocitelor sedimentate. Pentru prelevarea monocitelor din banda corespunzătoare este necesar a îndepărta banda de plasma de la suprafața benzii de monocite și apoi să fie aspirate monocitele, evitând aspirarea mediului de separare pentru a evita contaminarea cu celule polimorfonucleare.

Într-o **a doua variantă**, separarea monocitelor se face prin centrifugare împotriva curgerii, prin utilizarea principiului de funcționare al unui elutriator, ce constă în stabilirea unui echilibru între forțele centrifuge și de frecare la curgere dintr-o cameră specială, montată într-o centrifugă, care este alimentată cu suspensie celulară. Inițial, celulele sunt menținute prin forța centrifugă în partea camerei cu raza cea mai mare de centrifugare, apoi este crescut debitul soluției în care sunt suspendate celulele iar acestea sunt antrenate astfel către centrul rotorului de centrifugare, nivel la care sunt eluate prin sistemul de tuburi al elutriatorului. Deoarece particulele cu densitate mică pot să părăsească camera la viteze de curgere mai mici decât cele necesare pentru particulele cu

Arzuffi *Blay* *Cruscu* *et al* *Blay* *et al*

densitate mai mare, se poate face separarea diferitelor fracții de celule sanguine, limfocitele și eritrocitele sunt eluate în primele fracții, iar neutrofilele în fracții mai târzii.

Etapa de izolare este realizată într-o variantă prin separarea prin adsorbție la suprafețe acoperite cu anticorpi CD34, CD133, CD31, anti-VEGFR2.

Etapa de izolare într-o altă variantă este realizată prin sortarea celulară activată de fluorescență a celulelor care au fost puse anterior în contact cu anticorpi solubili CD34, CD133, CD31, anti-VEGFR2.

Într-o variantă a etapei de identificare EPC, cantitatea de anticorpi utilizată este între 0.001 μg de anticorp/ 10^6 celule și 100 μg de anticorp/ 10^6 celule, un optim este între 0,1 μg de anticorp/ 10^6 celule și 1 μg de anticorp/ 10^6 celule, se poate varia concentrația de celule din timpul etapei de colorare cu anticorpi, concentrația celulelor din timpul etapei de colorare cu anticorpi este între 10^7 celule/ml și 10^5 celule/ml un optim este între 10^8 celule/ml și 10^6 celule/ml.

Într-o variantă de sortare celulară activată de fluorescență a celulelor care au fost puse anterior în contact cu anticorpi solubili CD34, CD133, CD31, anti-VEGFR2, sortarea celulară activată de fluorescență este o tehnică adaptată a citometriei în flux, utilizată pentru separarea celulelor dintr-o populație heterogenă de celule pe baza diferențelor de împrăștiere a luminii și de fluorescent. Aceste diferențe de fluorescență pot fi date de colorarea diferențială a celulelor cu anticorpi specifici pentru proteine de la suprafața celulară.

Într-o variantă a proceselor **specifice**, transfecția este făcută cu vectori individuali pentru exprimarea celor două subunități ale VLA-4, respectiv Itg α 4 și Itg β 1.

Pentru reglarea exprimării, vectorul conține un segment promotor activ constitutiv, o secvență promotor inductibil, gene care codifică pentru rezistența la antibiotice pentru selectarea celulelor transfectate, secvențe reglatoare, de exemplu, un situs intern de intrare ribozomală.

Intr-o altă variantă a proceselor specifice, transfecția poate fi făcută cu un singur vector de exprimare care conține ambele integrități membranare Itg α 4 și Itg β 1. Cele două fragmente de acid nucleic sunt unite astfel încât să rămână în cadru, pentru translația celor două proteine, opțional unite cu un linker flexibil, ca un singur produs de translație.

Celule progenitoare endoteliale modificate genetic sunt caracterizate prin aceea că secvența de acid nucleic care codifică proteina Itg α 4 cuprinde o secvență de acid nucleic care are o identitate a secvenței de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% , 99% , 100% cu secvența de acid nucleic din SEQ ID NR:1 și secvența de acid nucleic care codifică proteina Itg β 1 cuprinde o secvență de acid nucleic care are o identitate a secvenței de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% , 99% , 100% cu secvența de acid nucleic din SEQ ID NR:2.

Celule progenitoare endoteliale modificate genetic sunt caracterizate prin aceea că secvența de acid nucleic care codifică proteina Itg α 4 cuprinde o secvență de acid nucleic are o identitate a secvenței de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% , 100% cu secvența de acid nucleic din SEQ ID NR:3 și secvența de acid nucleic care codifică proteina Itg β 1 cuprinde o secvență de acid nucleic care are o identitate a secvenței de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% , 99% , 100% cu secvența de acid nucleic din SEQ ID NR:4.

Principalele avantaje ale invenției

- Procedul de obținere a unor celule progenitoare endoteliale (EPC) modificate genetic conform invenției oferă o nouă posibilitate de tratament, dar și de prevenire a complicațiilor cardiovasculare ale diferitelor boli metabolice, în particular a valvulopatiilor diabetice.
- Celulele progenitoare endoteliale rezultat al procedurii, oferă posibilitatea țintirii mai multor situsuri cu leziuni înainte ca acestea să devină clinic simptomatice.
- Celulele progenitoare endoteliale rezultat al procedurii, oferă posibilități de tratament care sunt minim invazive și au citotoxicitate mică.
- Celulele progenitoare endoteliale rezultat al procedurii, oferă posibilitatea de a elimina tratamentul cu imunosuprimante.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției în legatură cu figurile: 1-6. descrise în continuare.

Figura 1 : prezintă o diagramă a procedurii de obținere a unor celule progenitoare endoteliale modificate genetic conform invenției;

Figura 2 : prezintă nivelurile proteinei VLA4 la suprafața EPC de la animale martor dislipidemice sau diabetice dislipidemice la doi timpi diferiți de evoluție a patologiei. Diferența statistică semnificativă este prezentată prin $*p < 0.05$, ANOVA one-way, post-testul Bonferroni. MFIR = mediana intensității fluorescenței raportată la autofluorescență.

Figura 3 : prezintă un vector de clonare (PS100001, Origene) exemplificator pentru introducerea secvențelor care codifică Itg α 4 și, respectiv, Itg β 1.

Figura 4 : prezintă nivelurile ARNm pentru Itg α 4 și Itg β 1 din celulele progenitoare endoteliale modificate genetic comparativ cu celulele progenitoare endoteliale native, așa cum a fost măsurat prin RT-PCR.

Figura 5 : prezintă grafice prin bare care indică valorile medii și deviația standard ale valorilor diametrelor valvelor aortice în sistolă și vitezei de ejecție transvalvulară obținute din măsurători în ziua 11, pe animale din grupurile: (1) șoareci diabetici injectați cu EPC modificate genetic pentru a exprima GFP (diabet-EPC-GFP), (2) șoareci martor injectați cu EPC modificate genetic pentru a exprima GFP (martor-EPC-GFP), (3) șoareci diabetici injectați cu EPC modificate genetic pentru a supraexprima VLA-4 (diabet-EPC-VLA4), (4) șoareci martor injectați cu EPC modificate genetic pentru a supraexprima VLA-4 (martor-EPC-VLA4). Diferența statistică semnificativă este prezentată prin $*p < 0.05$, $***p < 0.001$ prin ANOVA one-way, post-testul Bonferroni.

Figura 6 : prezintă grafice prin bare care indică valorile medii și deviația standard ale valorilor plasmaticice ale ALT, AST și creatininei la animalele din grupurile: (1) șoareci diabetici injectați cu EPC modificate genetic pentru a exprima GFP (diabet-EPC-GFP), (2) șoareci martor injectați cu EPC modificate genetic pentru a exprima GFP (martor-EPC-GFP), (3) șoareci diabetici injectați cu EPC modificate genetic pentru a supraexprima VLA-4 (diabet-EPC-VLA4), (4) șoareci martor injectați cu EPC modificate genetic pentru a supraexprima VLA-4 (martor-EPC-VLA4).

Lista prescurtărilor

Ang1 – angiopoietina-1; APC – aloficocianina; ALT – alanin-transaminaza; AST – aspartat-transaminaza; BP - filtru trece-bandă; DZ - diabet zaharat; EPC - celule progenitoare endoteliale; EPO – eritropoietina; c-AMP - adenzin monofosfataza ciclică; CD31 - cluster de diferențiere 31; CD34 - cluster de diferențiere 33; CD133 - cluster de diferențiere 133; CE - celule endoteliale; EDTA - acid etilendiamino tetraacetic; FBS - ser fetal bovin; FGF - factorul de creștere a fibroblastelor; GFP - proteina fluorescentă în verde; GM-CSF - factorul de stimulare a coloniilor de granulocite și macrofage; ICAM - molecula de adeziune celulară; Itg α 4 - integrina alfa 4; Itg β 1 - integrina beta 1; MFIR - mediana intensității fluorescenței raportată la autofluorescență; MMP-9 - metaloproteinaza 9; PBS - soluție salină tamponată cu fosfat; PE – ficoeritrină; PKA - protein kinaza dependentă de c-AMP; RT-PCR - Reacția în lanță a polimerazei cu transcriere inversă; SDF-1 - factorul derivat din celula stromală-1; STZ – streptozotocină; VEGF - factorul de creștere a endoteliului vascular; VEGFR2 - receptorul 2 pentru factorul de creștere a endoteliului vascular; VCAM-1 - molecula de adeziune a celulelor vasculare 1; VLA-4 - antigenul foarte târziu 4 (dimerul dintre Itg α 4 și Itg β 1)

Descrierea detaliată

Invenția furnizează celule progenitoare endoteliale (EPC) modificate genetic pentru tratamentul complicațiilor cardiovasculare ale unei boli metabolice, hipertensiune, dislipidemie, prediabet și/sau diabet zaharat de tip 1 sau 2.

Conform cu figura 1, procedeul are ca primă etapă **recoltarea (1)** sângelui. Sângele din care sunt izolate celulele progenitoare endoteliale pentru a fi modificate genetic, este în **varianta (1a)** sânge recoltat de la pacient, iar într-o **varianta alternativă (1b)**, sângele este obținut de la un donator sau dintr-o colecție de sânge de la mai mulți donatori.

Amuzi
Alexandru CA
4

Urmează o serie de etape de separare a celulelor progenitoare endoteliale, care încep încep cu **separarea monocitelor (2)**.

În această etapă de separare (2), monocitele sunt separate de celelalte componente celulare și aceluare ale sângelui prin una din două variante: **una prin centrifugare în gradient de densitate (2.1)** și alta prin **centrifugare împotriva curgerii utilizând un elutriator (2.2)**

Pentru varianta (2.1) specialistului în domeniu îi sunt cunoscute mai multe formulări disponibile comercial de medii pentru separarea în gradient de densitate sau acestea pot fi ușor produse în laborator.

Din acest motiv este necesara o alegere optimă a unor parametri pentru separarea în gradient după cum este redat în continuare.

În procedeul propus conform invenției, densitatea mediului de separare în gradient de densitate este cuprinsă între 1 și 1,2 g/cm³, preferabil între 1,02 și 1,15 g/cm³ și cel mai preferabil între 1,05 și 1,1 g/cm³.

Centrifugarea se poate face pentru o durată de la 5 minute la 2 ore, preferabil, de la 10 minute la 1,5 ore și cel mai preferabil de la 15 minute la o oră, utilizând forțe de la 100 la 1000 x g, mai preferabil de la 200 la 750 x g și cel mai preferabil de la 250 la 500 x g.

În urma centrifugării într-un recipient în formă de tub, se obține separarea componentelor sângelui în felul următor: în partea superioară a tubului este **o bandă (A)** de plasma sanguină, apoi **o bandă (B)** care conține monocite, în a treia **bandă (C)** se găsește **mediul de separare** în gradient **(C)** care poate conține celulele polimorfonucleare, iar în partea de jos, este **banda (D)** eritrocitelor sedimentate.

Pentru prelevarea monocitelor din banda (B) este necesar să fie întâi o etapă pentru a îndepărta banda de plasma (A) de la suprafața benzii de monocite (B) și apoi să fie aspirate monocitele, evitând aspirarea mediului de separare pentru a nu contamina cu celule polimorfonucleare.

Un alt procedeu de separare a monocitelor de celelalte componente celulare și aceluare ale sângelui **(2.2)**, conform invenției, se realizează prin separarea celulară prin **centrifugare împotriva curgerii**, utilizând un elutriator.

Elutriția este un proces de separare a particulelor în funcție de mărimea, forma și densitatea acestora, folosind un flux de gaz sau lichid care curge într-o direcție de obicei opusă direcției de sedimentare.

Procedeul de **separare a monocitelor în etapa (2.2)** utilizează principiul de funcționare al unui elutriator ce constă în stabilirea unui echilibru între forțele centrifuge și de frecare la curgere dintr-o cameră specială, montată într-o centrifugă, care este alimentată cu suspensie celulară. Inițial, celulele sunt menținute prin forța centrifugă în partea camerei cu raza cea mai mare de centrifugare. Apoi este crescut debitul soluției în care sunt suspendate celulele iar acestea sunt antrenate astfel către centrul rotorului de centrifugare, nivel la care sunt eluate prin sistemul de tuburi al elutriatorului.

Deoarece particulele cu densitate mică pot să părăsească camera la viteze de curgere mai mici decât cele necesare pentru particulele cu densitate mai mare, se poate face separarea diferitelor fracții de celule sanguine.

Caracteristic, **limfocitele și eritrocitele** sunt eluate în primele fracții, iar neutrofilele în fracții mai târzii. Separarea se poate face așa cum este descris de (Stroncek, Fellowes și colab. 2014)

Pentru eliminarea suplimentară a posibilelor eritrocite care contaminatează celulele mononucleare purificate în aspectele invenției prezentate mai sus este utilizată o etapă **suplimentară (3)** de liză celulară.

Specialistului în domeniu îi sunt cunoscute procedeele de lizare a eritrocitelor și acestea includ incubarea în soluții hipotone, în soluții normotone, care conțin dodecil sulfat de sodiu și albumină sau în alta varianta soluții normotone, care conțin clorură de amoniu.

Andrei Ștefan Oțomescu SA

Astfel de soluții sunt disponibile comercial dar pot fi, de asemenea, preparate ușor în laborator.

O altă etapă esențială a procedurii conform invenției, este **de izolare (4) a EPC**. În această **etapă (4)** celulele progenitoare endoteliale (EPC) sunt izolate din monocitele sanguine pe baza exprimării la suprafața lor celulară a proteinelor marker de celule progenitoare, așa cum sunt CD34 și/sau CD133 și a markerilor de celule endoteliale așa cum sunt CD31 și/sau VEGFR2.

Această etapă **de izolare (4)** este realizată într-o **variantă (4a)** prin separarea prin adsorbție la suprafețe (așa cum sunt microsfele din latex sau magnetice, plăci de cultură, ș.a.) acoperite cu anticorpi CD34, CD133, CD31 și/sau anti-VEGFR2 sau într-o altă variantă **(4b)** este realizată prin sortarea celulară activată de fluorescență a celulelor care au fost puse anterior în contact cu anticorpi solubili CD34, CD133, CD31 și/sau anti-VEGFR2.

După etapa **de izolare (4)** urmează o **etapa (5) de identificare EPC**, anticorpii utilizați pentru identificarea EPC sunt aleși într-o variantă **(5a)** ca anticorpi primari conjugați cu fluorofori.

Sunt disponibili comercial un număr mare de anticorpi conjugați cu fluorofori, iar alegerea acestora pentru o suprapunere spectrală minimă reprezintă un optim al fiecărei situații în parte.

Există și varianta **(5b)** alegerii de anticorpii specifici care sunt neconjugați.

Anticorpii utilizați pentru identificarea și separarea EPC pot fi anticorpi primari specifici conjugați cu fluorofori sau anticorpi neconjugați care sunt la rândul lor legați de anticorpi secundari care recunosc izotipul anticorpului primar.

Acești anticorpi utilizați pot avea orice izotip și pot fi crescuți în orice animal, de exemplu șoarece, șobolan, iepure, oaie, capră sau cal, în plus, anticorpii pot fi umani sau umanizați. Identificarea legării anticorpilor neconjugați se poate face apoi prin intermediul utilizării unor anticorpi secundari care leagă specific regiunea constantă ce corespunde fragmentului Fc (constant, cristalizabil) a anticorpilor primari, unde anticorpii secundari sunt conjugați cu fluorofori.

Așa cum este cunoscut specialistului în domeniu, cantitatea de anticorpi utilizată pentru identificarea prezenței unei proteine la suprafața membranei celulare poate varia în funcție de mai mulți parametri așa cum sunt tipul fluoroforilor utilizați pentru detecție, raportul moleculă de anticorp : număr molecule de fluorofori, legarea nespecifică și altele.

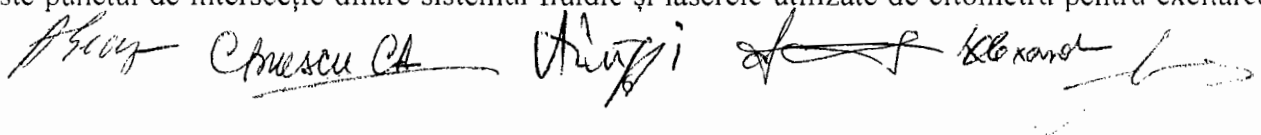
Identificarea cantității de anticorpi care poate fi utilizată este un procedeu în sine cunoscut și este identificată de specialistul în domeniu prin teste de titrare.

Într-o variantă **a etapei (5)**, cantitatea de anticorpi utilizată este între 0,001 μg de anticorp/ 10^6 celule și 100 μg de anticorp/ 10^6 celule, mai preferabil 0,01 μg de anticorp/ 10^6 celule și 10 μg de anticorp/ 10^6 celule și, cel mai preferabil, între 0,1 μg de anticorp/ 10^6 celule și 1 μg de anticorp/ 10^6 celule. Se poate varia concentrația de celule din timpul etapei de colorare cu anticorpi. Concentrația celulelor din timpul etapei de colorare cu anticorpi este preferabil între 10⁹ celule/ml și 10⁵ celule/ml și cel mai preferabil între 10⁸ celule/ml și 10⁶ celule/ml.

În varianta (4b) de sortare celulară activată de fluorescență a celulelor care au fost puse anterior în contact cu anticorpi solubili CD34, CD133, CD31 și/sau anti-VEGFR2, sortarea celulară activată de fluorescență este o tehnică standard, adaptare a citometriei în flux, cunoscută specialistului în domeniu.

Această tehnică este utilizată pentru separarea celulelor dintr-o populație heterogenă de celule pe baza diferențelor de împrăștiere a luminii și de fluorescență. Aceste diferențe de fluorescență pot fi date de colorarea diferențială a celulelor cu anticorpi specifici pentru proteine de la suprafața celulară, așa cum este descris mai jos.

Suspensia celulară este aspirată din proba de sortat prin intermediul unei sonde și apoi circulează în sistemul fluidic al citometrului pentru a fi analizate și ulterior sortate. Datorită volumului mare de soluție de antrenare care este adăugat suspensiei de celule în interiorul sistemului fluidic al unui citometru, celulele sunt individualizate iar datorită concentrării hidrodinamice, sunt constrânse să treacă prin centrul fasciculului de curgere la nivelul camerei de interogare. Camera de interogare este punctul de intersecție dintre sistemul fluidic și laserele utilizate de citometru pentru excitarea



fluoroforilor și pentru măsurarea împrăștierei luminii de către particule. Fluorescența emisă de către celulele care trec prin dreptul laserelor este măsurată utilizând fotomultiplicatoare și această măsurătoare va sta la baza deciziei de sortare. Decizia de sortare se referă la aplicarea unor porți logice parametrilor de fluorescență și împrăștiere a luminii măsurați pentru fiecare celulă pentru a se decide dacă acea celulă este sortată sau este eliminată. Avale de camera de interogare, fasciculul este separat în picături fine prin intermediul vibrațiilor cu frecvență de ordinul kilohertz-ilor (kHz) ale unui dispozitiv piezoelectric. Înainte de separarea unei picături, în funcție de decizia de sortare pentru celula calculată a se desprinde în acea picătură, poate fi schimbat potențialul electric al întregului fascicul, astfel încât picătura care se va desprinde să păstreze acest potențial electric (alternativ, în unele aparate este aplicată sarcina specific picăturii, cu ajutorul unui inel metalic încărcat electric plasat la nivelul la care are loc desprinderea picăturilor). Picăturile încărcate electric trec apoi prin dreptul sistemului de deflecție – un sistem care crează un câmp electrostatic constant – iar picăturile sunt direcționate în funcție de sarcina lor către tuburi de colectare sau către sistemul de evacuare.

După separarea celulelor progenitoare endoteliale, acestea vor fi supuse în ultima etapă unor **procese specifice (6)** de transfer deliberat de acid nucleic în vederea obținerii de celulele progenitoare endoteliale (EPC) modificate genetic.

Prin aceste procese specifice celulele progenitoare endoteliale (EPC) izolate, conform cu etapele anterior descrise, sunt transfectate pentru a supra-exprima proteina VLA-4, un heterodimer alcătuit din subunitățile proteice, integrina $\alpha 4$ (Itg $\alpha 4$) și integrina $\beta 1$ (Itg $\beta 1$).

Acizii nucleici care codifică Itg $\alpha 4$ (așa cum sunt SEQ ID NR:1 pentru secvența murină și SEQ ID NR:3 pentru secvența umană) și Itg $\beta 1$ (așa cum sunt SEQ ID NR:2 pentru secvența murină și SEQ ID NR:4 pentru secvența umană) pot fi clonați într-un vector, așa cum este o plasmidă, cosmidă, bacmid, fag, cromozom artificial sau virus, care permite inserarea unui secvențe genetice (ADN sau ARN) pentru a se obține replicarea și translația secvenței atașate.

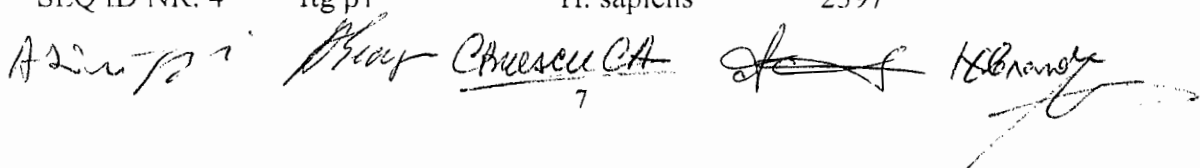
Într-o variantă a **proceselor specifice (6a)**, transfecția este făcută cu vectori individuali pentru exprimarea celor două subunități ale VLA-4, respectiv Itg $\alpha 4$ și Itg $\beta 1$. În aceasta variantă (6a) există două posibilități de realizare.

Conform cu prima posibilitate de realizare (6a1), secvența de acid nucleic care codifică proteina Itg $\alpha 4$ cuprinde o secvență de acid nucleic care are o identitate a secvenței de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% sau 100% cu secvența de acid nucleic din SEQ ID NR:1, iar secvența de acid nucleic care codifică proteina Itg $\beta 1$ cuprinde o secvență de acid nucleic care are o identitate a secvenței de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% sau 100% cu secvența de acid nucleic din SEQ ID NR:2

Conform cu a doua posibilitate de realizare (6a2), secvența de acid nucleic care codifică proteina Itg $\alpha 4$ cuprinde o secvență de acid nucleic care are o identitate a secvenței de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% sau 100% cu secvența de acid nucleic din SEQ ID NR:3, iar secvența de acid nucleic care codifică proteina Itg $\beta 1$ cuprinde o secvență de acid nucleic care are o identitate a secvenței de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% sau 100% cu secvența de acid nucleic din SEQ ID NR:4.

În Listarea Secvențelor sunt listate, în ordine, secvențele prezentate în tabelul 1.
Tabelul 1. Secvențele utilizate în această invenție și detaliate în Listarea Secvențelor

Nume secvență	Proteină codificată	Specie de origine	Lungimea nucleotide	în
SEQ ID NR. 1	Itg $\alpha 4$	M. musculus	3099	
SEQ ID NR. 2	Itg $\beta 1$	M. musculus	2397	
SEQ ID NR. 3	Itg $\alpha 4$	H. Sapiens	3099	
SEQ ID NR. 4	Itg $\beta 1$	H. sapiens	2397	

A220701


Într-o variantă, pentru reglarea exprimării, vectorul conține un segment promotor activ constitutiv (așa cum este, dar nelimitat la CMV, SV40 sau secvențe LTR) sau o secvență promotor inductibil.

Într-o altă variantă, vectorii de exprimare conform invenției cuprind de asemenea gene care codifică pentru rezistența la antibiotice pentru selectarea celulelor transfectate.

Într-o altă variantă vectorii de exprimare conform invenției pot cuprinde suplimentar secvențe reglatoare, de exemplu, un situs intern de intrare ribozomală.

Într-o altă variantă a **proceselor specifice (6b)**, transfecția poate fi făcută cu un singur vector de exprimare care conține ambele integrități membranare, *Itga4* și *Itgβ1*, așa cum sunt descrise mai sus, legate operabil pentru translația celor două proteine, opțional unite cu un linker flexibil, ca un singur produs de translație.

Așa cum este utilizat aici, este intenționat ca termenul "legat operabil" să însemne că cele două fragmente de acid nucleic sunt unite astfel încât secvențele de aminoacizi codificate de cele două fragmente de acid nucleic rămân în cadru.

Specialistului în domeniu va realiza că există și alte metode pentru inserarea materialului genetic care codifică o proteină de interes așa cum sunt electroporarea, biolistica (pistolul genic), expunerea la fosfat de calciu, transfecția pe bază de lipozomi, care pot fi utilizate pentru creșterea exprimării unei proteine, iar aceste metode sunt incluse în unele aspecte ale invenției.

Așa cum este utilizat aici, termenul "transfecție tranzientă" se referă la transfecția în care materialul genetic inserat în interiorul celulei este prezent intracelular pentru perioade de timp suficiente pentru sinteza proteică dar nu este inserat în genomul celulei gazdă.

Odată ce au fost obținute celulele progenitoare endoteliale (EPC) conform invenției acestea pot fi administrate la subiect pentru tratamentul sau prevenirea unor complicații cardiovasculare ale unei boli metabolice, hipertensiune, dislipidemie, prediabet și/sau diabet zaharat de tip 1 sau 2.

Modul de utilizare al celulelor EPC modificate genetic.

Intr-o etapa 7 are loc administrarea EPC modificate genetic către subiect este prin injectare (7a) sau perfuzare intravenoasă (7b). Regimul de dozare pentru administrarea celulelor progenitoare endoteliale conform invenției poate depinde de 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, regimul de dozare va putea varia în funcție de judecata medicului curant. Într-un aspect 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 leziunilor cardiovasculare.

În următoarele Exemple, invenția este ilustrată prin intermediul unor forme de realizare. Acestea sunt în scop exemplificator și nu trebuie interpretate a limita în niciun fel întinderea invenției.

EXEMPLE

Exemplul 1 : Generarea modelului de șoarece diabetic dislipidemic

În toate experimentele au fost utilizați șoareci masculi ApoE^{-/-} din colonia de la Taconic (SUA) cu vârste de la 12 la 14 săptămâni. Toți șoarecii au fost crescuți în biobaza Institutului de Biologie și Patologic Celular (IBPC) 'Nicolae Simionescu' în cuști cu ventilație, în condiții aseptice pentru patogeni specifici, 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. Animalele au avut acces la hrană și apă ad libitum cu excepția privării de hrană timp de 3 ore anterior măsurării glicemiei din sângele venos din vena caudală, cu teste rapide cu stripuri, și anterior injectării intraperitoneale (i.p.) a streptozotocinei (STZ) sau tamponului citrat (CIT), după cum este descris în continuare.

Animalele au fost injectate i.p. zilnic, timp de 5 zile consecutive (zilele 1-5) cu streptozotocină la 55 mg/kg de greutate corporală, dizolvată în soluție tampon citrat, pH 4.5, la o concentrație de 20.7 mM (grup diabetic). Un alt lot de animale a fost injectat cu volumul echivalent de soluție tampon

A. Z. ... Nicolae Simionescu ... Alexandru ...

citrat (grup martor). După ultima injectare i.p., în ambele grupuri experimentale dieta a fost schimbată din peleți standard în dietă hiperlipemiantă (peleți standard la care a fost adăugat colesterol 1% și unt 15%) și menținută până în ziua sacrificării. Pentru ambele grupe experimentale au fost testați doi timpi de sacrificiu diferiți, ziua 9 și ziua 12. Animalele au fost sacrificate prin inducerea anesteziei profunde cu un amestec de ketamină și xilazină, iar sângele a fost colectat prin puncție ventriculară pe soluție anticoagulantă de 250mM EDTA (acid etilendiaminotetraacetic).

Exemplul 2: Caracterizarea exprimării integrinelor în EPC circulante

În urma sacrificării animalelor așa cum a fost descris în Exemplul 1, a fost obținută fracția de celule mononucleare din sângele colectat pe EDTA. Pe scurt, sângele total (0,7-1 ml/ animal) a fost pipetat la suprafața mediului de separare Histopaque 1077 (Merck) și s-a centrifugat timp de 40 de minute la 400 x g, cu accelerare lentă și fără frână. După centrifugare, a fost îndepărtată plasma situată în stratul cel mai de sus și s-a recoltat banda de celule mononucleare de la interfața plasmă-Histopaque. Monocitele au fost spălate în 10 ml de soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) cu 2% ser fetal bovin (FBS). Apoi, monocitele au fost incubate timp de 5 minute în 2 ml de soluție tampon de liză ACK (Thermo Fisher Scientific) pentru lizarea eritrocitelor contaminante și apoi resuspendate în 10 ml de PBS și numărate. După o centrifugare timp de 10 minute la 400 x g, monocitele au fost resuspendate în volumul necesar de PBS pentru o concentrație de 2×10^6 celule/ml și alicotate la 100 μ l/probă. Fiecare probă a fost incubată cu anticorpi anti-CD34 conjugați cu Alexa Fluor 488 (FAB65181G, R&D Systems, SUA) la 5 μ l/ 10^6 celule, anticorpi anti-VEGFR2 conjugați cu APC (FAB4432A, R&D Systems) la 10 μ l/ 10^6 celule și anti-VLA4 conjugați cu PE (103705, BioLegend, SUA) la 5 μ l/ 10^6 celule, conform instrucțiunilor producătorilor. După incubarea cu anticorpi timp de o oră la temperatura camerei, probele au fost măsurate prin citometrie în flux (Gallios, Beckman Coulter) utilizând următoarele lasere și filtre optice: excitație: 488nm, emisie: 525nm BP pentru Alexa Fluor 488, emisie: 575nm BP pentru PE și excitație: 635nm, emisie: 660nm BP pentru APC. În mod surprinzător, așa cum este arătat în (**Figura 2**), s-a observat scăderea marcată a nivelului de exprimare a proteinei VLA4 în EPC-urile de la animalele diabetice dislipidemice comparativ cu cele de la animalele dislipidemice chiar și la timpul scurt de 9 zile după prima injectare cu streptozotocină.

Exemplul 3: Obținerea vectorilor de exprimare care codifica integrinele $\alpha 4$ și $\beta 1$ murine

Mai întâi, au fost introduse fragmentele de ADN complementar (ADNc) care codifică integrinele *Itga4*, *Itgb1* sau, respectiv, GFP ca martor, în regiunea de multiconare a vectorului pCMV6-Entry (PS100001, Origene, (**Figura 3**) utilizând enzimele de restricție SgfI și MluI (Thermo Fisher Scientific). Apoi, pentru obținerea unei cantități mari de vectori de exprimare au fost utilizate bacterii competente *Escherichia Coli* DH5 α care au fost transformate cu vectorii pCMV6-Entry (vector fără insert/martor), pCMV6-*Itga4* murin și pCMV6-*Itgb1* murin și, respectiv, pCMV6-GFP. Pe scurt, bacteriile competente au fost incubate timp de 10 minute la 4°C cu 100 ng din fiecare vector plasmidic. Ulterior, a fost realizată transformarea bacteriană prin șoc termic prin incubarea timp de 45 secunde la 42°C. Bacteriile transformate au fost însămânțate pe placi Petri de cultura care au conținut mediu LB solid (agar) și s-au incubat peste noapte la 37 °C, în atmosfera umedă. Ulterior, coloniile au fost izolate și s-a verificat integrarea corectă a transcripților de 3096 pb (*Itga4*) și, respectiv, 2394 de perechi de baze (*Itgb1*). Clonele pozitive au fost multiplicare și stocate la -80 °C în mediu LB cu 50 % glicerol până în momentul utilizării.

Exemplul 4: Separarea EPC și modificarea genetică

Pentru a verifica dacă restabilirea nivelurilor proteinei VLA4 în EPC-urile animalelor diabetice dislipidemice duce la îmbunătățiri ale funcției cardiovasculare, am recoltat mai întâi sângele total de la animale diabetice dislipidemice la 9 zile de la prima injectare cu streptozotocina, așa cum este descris în Exemplul 1. Apoi, a urmat o etapă de pre-purificare a celulelor mononucleare prin centrifugare în gradient de densitate, așa cum este descris în Exemplul 2. După spălarea finală a monocitelor, acestea au fost resuspendate în PBS la concentrația de 107 celule/ml și incubate cu anticorpi anti-CD34 conjugați cu Alexa Fluor 488 (FAB65181G, R&D Systems) la 5 μ l/ 10^6 celule

Handwritten signatures and notes at the bottom of the page.

25

și anticorpi anti-VEGFR2 conjugați cu APC (FAB4432A, R&D Systems) la 10 μ l/ 10⁶ celule. Celulele dublu-pozitive CD34+/VEGFR2+ au fost apoi sortate utilizând sorter-ul MoFlo Astrios (Beckman Coulter) utilizând excitația la 488 nm și emisia la 513/ BP 26 pentru Alexa Fluor 488 și excitația la 640 nm și emisia la 671/ BP 30 pentru APC.

EPC sortate astfel au fost transfectate tranzient să exprime VLA4 utilizând plasmidele pCMV6-Itg α 4 și, respectiv pCMV6-Itg β 1 așa cum sunt descrise în Exemplul 3. Ca martor au fost utilizate plasmide pCMV6-GFP. Pe scurt, a fost amestecat un volum inițial de 90 μ l de soluție tampon cu plasmidele pCMV6-Itg α 4 și pCMV6-Itg β 1 suspendate la o concentrație de 11 ng/ μ l cu 10 μ l de agent de transfecție Viromer RED (Origene) dizolvat în soluție tampon, conform instrucțiunilor producătorului. Amestecul de plasmide și agent de transfecție a fost lăsat să complexeze timp de 15 minute și a fost adăugat apoi în 200 μ l de suspensie celulară cu concentrație de 2,5 x 10⁵ celule/ml. Celulele au fost apoi incubate timp de 3 zile la 37°C, 5% CO₂, într-un agitator de tuburi "end-over-end" la viteza de aproximativ 6 rotații pe minut pentru a se evita aderarea EPC la plastic. Transfecția a fost verificată prin cuantificarea nivelurilor de ARNm pentru Itg α 4 și Itg β 1 din EPC utilizând tehnica RT-PCR (vezi **Figura 4**).

Exemplul 5: Evaluarea funcției valvei aortice prin ecocardiografie

Pentru a evalua funcția valvei aortice au fost urmăriți parametrii ecocardiografici ai animalelor diabetice dislipidemice sau doar dislipidemice ca martor care au fost injectate cu celule progenitoare endoteliale (EPC) modificate genetic să exprime GFP sau VLA-4. În acest scop au fost alcătuite patru grupuri a câte 3 animale: 1) șoareci diabetici injectați cu EPC modificate genetic pentru a exprima GFP, 2) șoareci martor injectați cu EPC modificate genetic pentru a exprima GFP, 3) șoareci diabetici injectați cu EPC modificate genetic pentru a supraexprima VLA-4, 4) șoareci martor injectați cu EPC modificate genetic pentru a supraexprima VLA-4. La aceste animale diabetul și dislipidemia au fost induse după cum este descris în Exemplul 1 iar măsurătorile ecocardiografice au fost făcute în ziua 11 de la inițierea injectărilor intraperitoneale cu streptozotocină sau tampon citrat utilizând un ecograf pentru animale mici de laborator (Vevo2100). Pentru fiecare animal au fost urmărite valorile vitezei transvalvulare la nivelul valvei aortice și diametrul valvei aortice în sistolă, iar valorile medii pe grupuri sunt prezentate în (**Figura 6**). În mod surprinzător, s-a observat o creștere semnificativă a diametrului în sistolă al valvei aortice a animalelor diabetice dislipidemice injectate cu celule progenitoare endoteliale modificate genetic pentru a supraexprima VLA-4 comparativ cu cel al animalelor diabetice dislipidemice injectate cu celule progenitoare endoteliale martor, modificate genetic cu GFP. De asemenea, surprinzător, s-a remarcat o scădere marcată a vitezei transvalvulare la grupurile de animale diabetice dislipidemice sau doar dislipidemice injectate cu celule progenitoare endoteliale modificate genetic pentru a supraexprima VLA-4 comparativ cu cea de la grupurile de animale diabetice dislipidemice sau doar dislipidemice injectate cu celule progenitoare endoteliale martor, modificate genetic pentru a exprima GFP. Aceste modificări sunt înalt sugestive pentru efectul terapeutic al celulelor progenitoare endoteliale modificate genetic pentru a supraexprima VLA-4 de a preveni și/sau trata valvulopatia asociată dislipidemie și diabetului.

Exemplul 6: Evaluarea citotoxicității tratamentului cu EPC modificate

Pentru a evalua citotoxicitatea tratamentului cu celule progenitoare endoteliale modificate genetic conform invenției, au fost verificate valorile plasmatiche ale transaminazelor TGO (AST) și TGP (ALT) și ale creatininei, ca markeri ai afectării hepatice și, respectiv, renale, la animalele injectate cu celule progenitoare endoteliale transfectate prezentate în Exemplul 5. Așa cum este observat în (**Figura 5**), la nici unul dintre grupurile de animale injectate cu celule progenitoare endoteliale modificate să supraexprime VLA-4 nu au fost observate valori indicatoare de hepato- sau renotoxicitate.

Amuzis *Gray* *Chesnut* *John* *Alexander*

LISTAREA SECVENȚELOR

<110> Institutul de Biologie si Patologie Celulara

<120> PROCEDEU DE OBTINERE A UNOR CELULE PROGENITOARE ENDOTELIALE MODIFICATE GENETIC

<130> NA

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

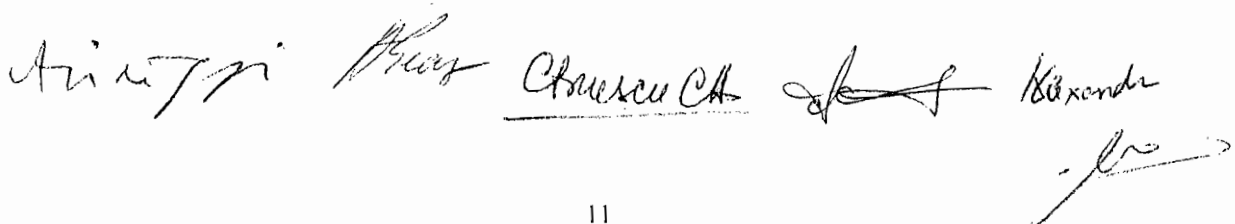
<211> 3099

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

atggctgcgg aagcgagggtg cagaccgagg tcccgagggga tcgccctccg ggaagcggtg	60
atgctgtttgt tgtacttcgg ggtgcccaacc gggcactcct acaacctgga cccggagaat	120
gcactgctgt accagggccc ctccggcacg ctgtttggct actcgggtggt gctgcacagc	180
cacgggtcga agcgtggct catcgtgggg gctcccactg ccagctggct ctctaagcc	240
tcagtgggtca atcctggggc gatttacaga tgcgggatca gaaagaatcc aaaccagacc	300
tgcgaacagc tccagctggg tagccccagt ggagagcctt gtgggaagac atgcctggag	360
gagagggata accagtggct gggggtcacc ctttcagac agcctggaga aaatggctct	420
atcgtgactt gtgggcacag gtggaaaaat attttttaca tgaagagcga taacaaactc	480
cccactggca tttgctacgt catgccttct gatttgcgga cagaactgag taaaaggatg	540
gccccgtgtt acaaagatta tacgagaaaa tttggagaaa attttgcac atgtcaagct	600
ggaatatcta gtttttacac acaggattta attgtgatgg gggccccggg atcatcgtac	660
tggactggca ccgtctttgt ctacaatata actacaaacc aatacaaagc atttgtagac	720



agacagaacc aagtaaaatt tggaagctac ttaggctact cagttggagc tggacatttt	780
cgaagtccac atactaccga agtcgtggga ggagcccctc aacacgaaca gataggaaaa	840
gcatatatat ttagcattga tgaaaacgaa ctgaacatcg tatatgaaat gaaaggtaaa	900
aagcttggct catactttgg agcttctgtc tgcgctgtgg acctcaatgc agatggcttc	960
tcagatctcc ttgttggagc tcccatgcag agcaccatca gggaggaagg aagagtattc	1020
gtgtacatca actctggcat gggagctgtg atggttgaaa tggaaagggt cttgtcggga	1080
agtgacaaat atgctgcaag atttggggag tctatagcga atcttggcga cattgacaat	1140
gacggctttg aagatattgc tattggtgca ccacaagaag acgacttgag aggtgctgtc	1200
tacatttaca atggccgagt cgatggaatc tcctccacct actcacagag aattgaagga	1260
cagcaaatca gcaaatcatt aaggatgttt ggacaatcta tctcaggaca aattgatgca	1320
gacaacaatg gatatgttga tgtagccgtt ggtgcatttc aatctgattc tgcagtgttg	1380
ctaaggacaa ggcctgtagt gattgttgaa gcatctttaa gccatcctga gtctgtaaat	1440
aggacaaagt ttgactgtac tgaaaatgga cttccatctg tgtgcatgca tcttacctg	1500
tgtttctcat ataaaggcaa agaggtccca ggctacatcg ttttgtttta caatgtgagc	1560
ttggatgtgc acaggaaggc agagtctccg tcaagatttt atttcttctc taatgggact	1620
tctgacgtga ttacaggaag catacgagtt tcaagcagtg gagagaaatg taggacacac	1680
caggcattca tgcggaaaga cgtgcgagac atccttacc ccatcatgt agaggccaca	1740
taccaccttg ggcatcatgt gatcacaaa cgaaacactg aggaatttcc accactccag	1800
ccgatccttc agcagaagaa agaaaaagac gttattagaa aatgataaa ctttgcaagg	1860
ttttgtgcct atgaaaattg ctctgctgat ctccaagttt ctgcaaaagt tggatttttg	1920
aagccatatg aaaataaaac ctatcttgct gttgggagca tgaagaccat aatgctaaac	1980
gtgtccttgt tcaacgctgg cgatgatgct tacgaaacca ctctgaatgt ccaactcccc	2040
acaggccttt atttcattaa gatcttagac ctggaagaga aacaaataaa ctgcgaagtg	2100
actgagagct caggcatagt gaagcttgcc tgcagcctag gttacatata tgtggatcgc	2160
ctctcaagga tagacattag ctttctcctg gatgtgagct cactcagcag ggcacatgag	2220
gacctcagca tcagtgtgca tgcctcctgt gaaaacgagg gcgaattgga ccaagtgagg	2280
gacaacagag tgaccttaac gatacctcta aggtatgagg ttatgctgac tgttcatggg	2340

Handwritten signatures and notes:
 At the bottom of the page, there are several handwritten signatures and notes. One signature appears to be "A. S. ...". To the right, there is a signature that looks like "K. ...". There are also some scribbles and lines below the signatures.

72

cttgtgaacc caacttcatt tgtgtatgga tctagcgaag aaaacgagcc agaaacatgc 2400
 atggccgaga agctgaacct cactttccat gttataaaca ctgggattag catggctcca 2460
 aatgttagtg tgaaaataat ggtaccaa at tcttttctcc ctcaagatga taagttgttc 2520
 aacgttttgg atgtccagac aactacaggg caatgccatt ttaaacta tggaagagag 2580
 tgtacatttg cacagcaaaa aggcatagcg gggacgttga ccgatatagt caaattccta 2640
 tcaaagactg ataagagact cctgtattgc atgaaagctg atcaactg tttagatttc 2700
 ttatgcaatt tcggaaaaat ggaaagtggg aaggaagcca gcgttcatat tcagctggag 2760
 ggccaggccat ccatcttggg aatggatgag acctcatcac tcaagtttga aataaaagca 2820
 acagcttttc cagagccaca cccaaaagt attgactaa ataaagatga gaacgtggcc 2880
 catgttttct tggaagggct ccatcatcaa agacccaaac gacatttcac catcattatt 2940
 attaccatca gcttgctact tggacttatt gtacttttat taatttcag tgttatgtgg 3000
 aaggctggat tctttaaag acagtacaaa tctatcctac aagaagaaaa caggagagac 3060
 agctggagtt atgtcaacag caaaagcaat gatgactga 3099

<210> 2

<211> 2397

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

atgaatttgc aactggtttc ctggattgga ttgatcagtt tgatttggtc tgtatttggc 60
 caaacagata aaaatagatg tttaaaagca aatgccaaat cttgcggaga atgtatacaa 120
 gcagggccaa attgtgggtg gtgtacaaat acgacatttt tgcaagaagg aatgcctact 180
 tctgcacgat gtgatgattt agaagctttg aaaaagaagg gttgccagcc aagtgcata 240
 gagaatccca gaggctctca aactataaag aaaaataaaa atgtcaccaa tcgcagcaaa 300

Ricci
Chruscu
 Alexander

gggatggcag agaagctccg gccagaagac attactcaga tccaaccaca acagctgctt 360
 ctaaaattga gatcaggaga accacagaag tttacattaa aattcaagag ggctgaagat 420
 taccctattg atctctacta ctttatggat ctctctact ctatgaaaga tgatctggag 480
 aatgtgaaaa gtcttggaac ggatttgatg aatgaaatga ggaggattac ttcagacttc 540
 cgcattggct ttggctcatt tgtggagaaa actgtgatgc cgtatattag cacaacccca 600
 gcaaagctaa gaaatccttg tacaagtga caaaactgca ccagcccatt tagctacaaa 660
 aatgtgctta gtcttactga cagaggagag tttttcaatg aacttgttgg tcagcaacgc 720
 atatctggaa acttggattc tccagaaggt ggctttgatg caatcatgca ggttgcbggtt 780
 tgtggatcgc tgattggctg gaggaatgta acacgactgc tgggtgttttc cacggatgct 840
 gggtttcact ttgctggaga tgggaaactt ggtggattt gttttacccaa tgatggacaa 900
 tgtcacctgg aaaataatgt atatacaatg agccattact atgattatcc ttcaattgct 960
 caccttgctc agaaactaag tgaaaataat attcagacga tttttgcagt tactgaagag 1020
 ttccaacctg tttacaagga attgaagaat ttgattccta agtcagcagt gggcacactg 1080
 tctggaaact ctagtaatgt gatccagcta atcatcgatg cctacaactc tctttcttca 1140
 gaagtcattc tggaaaatag caaattgcc aacggagtaa caataaatta caaatcctat 1200
 tgcaagaatg ggggtgaatgg gacaggagaa aatggacgaa agtgttccaa catttctatt 1260
 ggagatgagg ttcaatttga aattagcata actgctaata aatgtccaaa taaggagtct 1320
 gaaaccatta aaattaacc tctgggcttc actgaagaag tagaggctgt tcttcagttc 1380
 atctgtaagt gcaattgtca aagccatggc atcccagcca gtcccaagtg ccatgagggg 1440
 aatgggacat ttgagtgtgg agcctgcagg tgcaatgagg ggcgtgttgg gaggcactgt 1500
 gaatgtagca cagatgaagt gaacagtga gacatggacg cttactgcag gaaagagaac 1560
 agttcggaaa tctgcagtaa caatggagaa tgtgtctgtg gacagtgtgt gtgtaggaag 1620
 agagataata caaatgaaat ttactctgga aaattctgcg agtgtgataa cttcaactgt 1680
 gataggctca atggcttaat ttgtggaggc aatggcgtgt gcagggtgtcg tgtttgtgaa 1740
 tgctatcca attacactgg cagtgcattg gactgttctt tggacactgg tccatgtcta 1800
 gcgtcaaatt gtcagatctg caatggccgg ggtatttgtg aatgtgggtgc ttgtaagtgc 1860
 acagatcca agtttcaagg gccaaacttgt gagacatgtc agacctgcct tggcgtctgt 1920

Amir *Becky* *Chrusca* *Stefano* *180xandh*

acagatccca agtttcaagg gccaaacttgt gagacatgtc agacctgcct tggcgtctgt 1920
gcagagcata aagaatgtgt tcagtgacaga gccttcaata aaggagaaaa gaaagacacg 1980
tgtgcacagg agtgctccca cttcaatctc accaaagtag aaagcagggga gaagttgccc 2040
cagccgggtgc aggtcgatcc tgtgacccat tgcaaggaga aggacattga tgactgctgg 2100
ttctatttca cctattcagt gaatggcaac aatgaagcta tcgtgcatgt tgtggagact 2160
ccagactgtc ctactgggcc cgacatcatc ccaattgtag caggcgtggg tgctggaatt 2220
gttcttattg gccttgccct gctgctgatt tggaaacttt taatgataat tcatgacaga 2280
aggggaattg ctaaatttga aaaggagaaa atgaatgcca agtgggacac gggtgaaaat 2340
cctatttaca agagtgccgt gacaactgtg gtcaatccga agtatgaggg aaaatga 2397

<210> 3

<211> 3099

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atggcttggg aagcgaggcg cgaacccggc ccccgaaagg cgcctgccc ggagacgggtg 60
atgctgttgc tgtgcctggg ggtcccgacc ggccgccctt acaacgtgga cactgagagc 120
gcgctgcttt accagggccc ccacaacacg ctgttcggct actcggctgt gctgcacagc 180
cacggggcga accgatggct cctagtgggt gcgcccactg ccaactggct cgccaacgct 240
tcagtgatca atcccggggc gatttacaga tgcaggatcg gaaagaatcc cggccagacg 300
tgccaacagc tccagctggg tagccctaata ggagaacctt gtggaaagac ttgtttggaa 360
gagagagaca atcagtgggt gggggtcaca cttccagac agccaggaga aaatggatcc 420
atcgtgactt gtgggcatag atggaaaaat atattttaca taaagaatga aaataagctc 480
cccactgggtg gttgctatgg agtgccccct gatttacgaa cagaactgag taaaagaata 540

Handwritten signature

Handwritten signature

Handwritten signature

Handwritten signature

gctccgtggt atcaagatta tgtgaaaaaa tttggagaaa attttgcattc atgtcaagct 600
ggaatatcca gtttttacac aaaggattta atttgtatgg gggccccagg atcatcttac 660
tggactggct ctctttttgt ctacaatata actacaaata aatacaaggc ttttttagac 720
aaacaaaatc aagtaaaatt tggaaagtat ttaggatatt cagtcggagc tggtcatttt 780
cggagccagc atactaccga agtagtcgga ggagctcctc aacatgagca gattggtaag 840
gcatatatat tcagcattga tgaaaaagaa ctaaatactt tacatgaaat gaaaggtaaa 900
aagcttggat cgtacttttg agcttctgtc tgtgctgtgg acctcaatgc agatggcttc 960
tcagatctgc tcgtgggagc acccatgcag agcaccatca gagaggaagg aagagtgttt 1020
gtgtacatca actctggctc gggagcagta atgaatgcaa tggaaacaaa cctcgttggg 1080
agtgacaaat atgctgcaag atttggggaa tctatagtta atcttggcga cattgacaat 1140
gatggctttg aagatgttgc tatcggagct ccacaagaag atgacttgca aggtgctatt 1200
tatatttaca atggccgtgc agatgggatc tcgtcaacct tctcacagag aattgaagga 1260
cttcagatca gcaaatcgtt aagtatgttt ggacagtcta tatcaggaca aattgatgca 1320
gataataatg gctatgtaga tgtagcagtt ggtgcttttc ggtctgattc tgctgtcttg 1380
ctaaggacaa gacctgtagt aattgttgac gcttctttaa gccaccctga gtcagtaaat 1440
agaacgaaat ttgactgtgt tgaaaatgga tggccttctg tgtgcataga tctaacttt 1500
tgtttctcat ataagggcaa ggaagttcca ggttacattg ttttgtttta taacatgagt 1560
ttggatgtga acagaaaggc agagtctcca ccaagattct atttctcttc taatggaact 1620
tctgacgtga ttacaggaag catacaggtg tccagcagag aagctaactg tagaacacat 1680
caagcattta tgcggaaaga tgtgcccggac atcctcacc caattcagat tgaagctgct 1740
taccaccttg gtcctcatgt catcagtaaa cgaagtacag aggaattccc accacttcag 1800
ccaattcttc agcagaagaa agaaaaagac ataatgaaaa aaacaataaa ctttgcaagg 1860
ttttgtgcc atgaaaattg ttctgctgat ttacaggttt ctgcaaagat tgggtttttg 1920
aagcccatg aaaataaaac atatcttgct gttgggagta tgaagacatt gatgttgaat 1980
gtgtccttgt ttaatgctgg agatgatgca tatgaaacga ctctacatgt caaactacc 2040
gtgggtcttt atttcattaa gattttagag ctggaagaga agcaaataaa ctgtgaagtc 2100
acagataact ctggcgtggg acaacttgac tgcagtattg gctatatata tgtagatcat 2160

Atsugi *Henry Chiuscu CA* *John Alexander*

ctctcaagga tagatattag ctttctcctg gatgtgagct cactcagcag agcgggaagag 2220
 gacctcagta tcacagtgca tgctacctgt gaaaatgaag aggaaatgga caatctaaag 2280
 cacagcagag tgactgtagc aataccttta aaatatgagg ttaagctgac tgttcatggg 2340
 tttgtaaacc caacttcatt tgtgtatgga tcaaatagatg aaaatgagcc tgaaacgtgc 2400
 atgggtggaga aaatgaactt aactttccat gttatcaaca ctggcaatag tatggctccc 2460
 aatgttagtg tggaaataat ggtaccaaat tcttttagcc cccaaactga taagctgttc 2520
 aacattttgg atgtccagac tactactgga gaatgccact ttgaaaatta tcaaagagtg 2580
 tgtgcattag agcagcaaaa gagtgcaatg cagaccttga aaggcatagt ccggttcttg 2640
 tccaagactg ataagaggct attgtactgc ataaaagctg atccacattg tttaaatttc 2700
 ttgtgtaatt ttgggaaaat ggaaagtgga aaagaagcca gtgttcatat ccaactggaa 2760
 ggccggccat ccattttaga aatggatgag acttcagcac tcaagtttga aataagagca 2820
 acaggttttc cagagccaaa tccaagagta attgaactaa acaaggatga gaatgttgcg 2880
 catgttctac tggaaaggact acatcatcaa agaccctaac gttatttcac catagtgatt 2940
 atttcaagta gcttgctact tggacttatt gtacttctat tgatctcata tgttatgtgg 3000
 aaggctggct tctttaaag acaatacaaa tctatcctac aagaagaaaa cagaagagac 3060
 agttggagtt atatcaacag taaaagcaat gatgattaa 3099



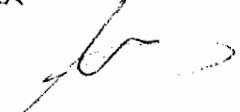
<210> 4

<211> 2397

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4





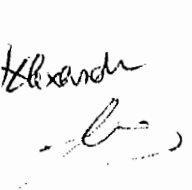
Minis, Prof. Crescuca   Alexander


64

atgaatttac aaccaatfff ctggattgga ctgatcagtt cagtttgctg tgtgtttgct	60
caaacagatg aaaatagatg tttaaaagca aatgccaaat catgtggaga atgtatacaa	120
gcagggccaa attgtgggtg gtgcacaaat tcaacatfff tacaggaagg aatgcctact	180
tctgcacgat gtgatgattt agaagcctta aaaaagaagg gttgccctcc agatgacata	240
gaaaatccca gaggctccaa agatataaag aaaaataaaa atgtaaccaa ccgtagcaaa	300
ggaacagcag agaagctcaa gccagaggat attactcaga tccaaccaca gcagttggtt	360
ttgctgattaa gatcagggga gccacagaca tttacattaa aattcaagag agctgaagac	420
tatcccattg acctctacta ccttatggac ctgtcttact caatgaaaga cgatttggag	480
aatgtaaaaa gtcttggaac agatctgatg aatgaaatga ggaggattac ttcggacttc	540
agaattggat ttggctcatt tgtggaaaag actgtgatgc cttacattag cacaacacca	600
gctaagctca ggaacccttg cacaagtga cagaactgca ccagcccatt tagctacaaa	660
aatgtgctca gtcttactaa taaaggagaa gtatttaatg aacttgttgg aaaacagcgc	720
atatctggaa atttggattc tccagaaggt ggtttcgatg ccatcatgca agttgcagtt	780
tgtggatcac tgattggctg gaggaatggt acacggctgc tgggtgttttc cacagatgcc	840
gggtttcact ttgctggaga tgggaaactt ggtggcattg ttttacaaa tgatggacaa	900
tgtcacctgg aaaataatat gtacacaatg agccattatt atgattatcc ttctattgct	960
caccttgctc agaaaactgag tgaaaataat attcagacaa tttttgcagt tactgaagaa	1020
tttcagcctg tttacaagga gctgaaaaac ttgatcccta agtcagcagt aggaacatta	1080
tctgcaaatt ctagcaatgt aattcagttg atcattgatg catacaattc cttttcctca	1140
gaagtcatth ttgaaaacgg caaattgtca gaaggcgtaa caataagtta caaatcttac	1200
tgcaagaacg ggggtgaatgg aacaggggaa aatggaagaa aatgttccaa tattttcatt	1260
ggagatgagg ttcaatttga aattagcata acttcaata agtgtccaaa aaaggattct	1320
gacagcttta aaattaggcc tctgggcttt acggaggaag tagaggttat tcttcagtac	1380
atctgtgaat gtgaatgcca aagcgaaggc atccctgaaa gtccaagtg tcatgaagga	1440
aatgggacat ttgagtgtgg cgcgtgcagg tgcaatgaag ggcgtgttgg tagacattgt	1500
gaatgcagca cagatgaagt taacagtga gacatggatg cttactgcag gaaagaaaac	1560
agttcagaaa tctgcagtaa caatggagag tgcgtctgcg gacagtgtgt ttgtaggaag	1620

46

agggataata caaatgaaat ttattctggc aaattctgcg agtgtgataa tttcaactgt	1680
gatagatcca atggcttaat ttgtggagga aatgggtgtt gcaagtgtcg tgtgtgtgag	1740
tgcaacccca actacactgg cagtgcattgt gactgttctt tggatactag tacttgtgaa	1800
gccagcaacg gacagatctg caatggccgg ggcattctgcg agtgtggtgt ctgtaagtgt	1860
acagatccga agtttcaagg gcaaactgtg gagatgtgtc agacctgcct tgggtgtctgt	1920
gctgagcata aagaatgtgt tcagtgcaga gccttcaata aaggagaaaa gaaagacaca	1980
tgcacacagg aatgttccta ttttaacatt accaaggtag aaagtcggga caaattacc	2040
cagccggtcc aacctgatcc tgtgtcccat tgtaaggaga aggatgttga cgactgttgg	2100
ttctatttta cgtattcagt gaatgggaac aacgaggtca tggttcatgt tgtggagaat	2160
ccagagtgtc cactggtcc agacatcatt ccaattgtag ctggtgtggt tgctggaatt	2220
gttcttattg gccttgcatt actgctgata tggaagcttt taatgataat tcatgacaga	2280
agggagtttg ctaaatttga aaaggagaaa atgaatgcca aatgggacac gggtgaaaat	2340
cctatttata agagtgccgt aacaactgtg gtcaatccga agtatgaggg aaaatga	2397

Bibliografie

- Abplanalp, W. T., D. J. Conklin, J. M. Cantor, M. H. Ginsberg, M. Wysoczynski, A. Bhatnagar and T. E. O'Toole (2016). "Enhanced Integrin alpha4beta1-Mediated Adhesion Contributes to a Mobilization Defect of Endothelial Progenitor Cells in Diabetes." Diabetes **65**(11): 3505-3515.
- Asahara, T., H. Masuda, T. Takahashi, C. Kalka, C. Pastore, M. Silver, M. Kearne, M. Magner and J. M. Isner (1999). "Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization." Circ Res **85**(3): 221-228.
- Barczyk, M., S. Carracedo and D. Gullberg (2010). "Integrins." Cell Tissue Res **339**(1): 269-280.
- Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoeck, K. Harpal, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau and A. Nagy (1996). "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele." Nature **380**(6573): 435-439.
- Guariguata, L., D. R. Whiting, I. Hambleton, J. Beagley, U. Linnenkamp and J. E. Shaw (2014). "Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035." Diabetes Res Clin Pract **103**(2): 137-149.
- Hattori, K., B. Heissig, K. Tashiro, T. Honjo, M. Tateno, J. H. Shieh, N. R. Hackett, M. S. Quitariano, R. G. Crystal, S. Rafii and M. A. Moore (2001). "Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells." Blood **97**(11): 3354-3360.
- Lorusso, R., S. Gelsomino, F. Luca, G. De Cicco, G. Bille, R. Carella, E. Villa, G. Troise, M. Viganò, C. Banfi, C. Gazzaruso, P. Gagliardotto, L. Menicanti, F. Formica, G. Paolini, S. Benussi, O. Alfieri, M. Pastore, S. Ferrarese, G. Mariscalco, G. Di Credico, C. Leva, C. Russo, A. Cannata, R. Trevisan, U. Livi, R. Scrofani, C. Antona, A. Sala, G. F. Gensini, J. Maessen and A. Giustina (2012). "Type 2 diabetes mellitus is associated with faster degeneration of bioprosthetic valve: results from a propensity score-matched Italian multicenter study." Circulation **125**(4): 604-614.
- Matsumoto, Y., V. Adams, C. Walther, C. Kleinecke, P. Brugger, A. Linke, T. Walther, F. W. Mohr and G. Schuler (2009). "Reduced number and function of endothelial progenitor cells in patients with aortic valve stenosis: a novel concept for valvular endothelial cell repair." Eur Heart J **30**(3): 346-355.
- Miranti, C. K. and J. S. Brugge (2002). "Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction." Nat Cell Biol **4**(4): E83-90.
- Mota, M., S. G. Popa, E. Mota, A. Mitrea, D. Catrinou, D. M. Cheta, C. Guja, N. Hancu, C. Ionescu-Tirgoviste, R. Lichiardopol, B. M. Mihai, A. R. Popa, C. Zetu, C. G. Bala, G. Roman, C. Serafinceanu, V. Serban, R. Timar, I. A. Veresiu and A. R. Vlad (2016). "Prevalence of diabetes mellitus and prediabetes in the adult Romanian population: PREDATORR study." J Diabetes **8**(3): 336-344.
- Schulte, J. B., A. Simionescu and D. T. Simionescu (2013). "The acellular myocardial flap: a novel extracellular matrix scaffold enriched with patent microvascular networks and biocompatible cell niches." Tissue Eng Part C Methods **19**(7): 518-530.
- Stroncek, D. F., V. Fellowes, C. Pham, H. Khuu, D. H. Fowler, L. V. Wood and M. Sabatino (2014). "Counter-flow elutriation of clinical peripheral blood mononuclear cell concentrates for the production of dendritic and T cell therapies." J Transl Med **12**: 241.
- Szmitko, P. E., C. H. Wang, R. D. Weisel, J. R. de Almeida, T. J. Anderson and S. Verma (2003). "New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I." Circulation **108**(16): 1917-1923.
- Takada, Y., X. Ye and S. Simon (2007). "The integrins." Genome Biol **8**(5): 215.
- Urbich, C. and S. Dimmeler (2004). "Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology." Circ Res **95**(4): 343-353.

REVENDICĂRI:

1. **Procedeu de obținere a unor celule progenitoare endoteliale modificate genetic** caracterizat prin aceea ca, o prima **etapă (1)** este de recoltare a sângelui de la pacient, de la un donator (1a), dintr-o colecție de sânge de la mai mulți donatori (1b), urmată de o **etapa (2)** de separare a monocitelor prin centrifugare, unde densitatea mediului de separare în gradient de densitate este cuprinsă între 1 și 1,2 g/cm³, cu un optim cuprins între 1,05 și 1,1 g/cm³; pentru eliminarea suplimentară a posibilelor eritrocite care contaminatează celulele mononucleare purificate în aspectele invenției prezentate mai sus este utilizată o **etapă (3)** de liză celulară, urmată de o **etapa (4)** de izolare EPC, în care celulele progenitoare endoteliale (EPC) sunt izolate din monocitele sanguine pe baza exprimării la suprafața lor celulară a proteinelor marker de celule progenitoare. CD34, CD133 și a markeri-lor de celule endoteliale CD31, VEGFR2, urmată de o **etapă (5)** de identificare EPC, pentru care sunt selectați anticorpii utilizați pentru identificarea EPC din categoria anticorpilor specifici conjugați cu fluorofori (5a), anticorpilor primari specifici care sunt neconjugați (5b), care sunt la rândul lor legați de anticorpi secundari care recunosc izotipul anticorpului primar, urmată de o **etapă (6)** de procese specifice de transfer deliberat de acid nucleic, unde celulele progenitoare endoteliale (EPC) izolate sunt transfectate pentru a supra-exprima proteina VLA-4, un heterodimer alcătuit din subunitățile proteice, integrina $\alpha 4$ (Itga4) și integrina $\beta 1$ (Itgb1), acizii nucleici care codifică (Itga4) și (Itgb1) pot fi clonați într-un vector, de tip: plasmidă, cosmidă, bacmid, fag, cromozom artificial sau virus, care permite inserarea unui secvențe genetice (AND, ARN) pentru a se obține replicarea și translația secvenței atașate; într-o **etapă (7)** are loc administrarea EPC modificate genetic către pacient prin injectare (7a), perfuzare intravenoasă (7b).

2. **Procedeu de obținere a unor celule progenitoare endoteliale modificate genetic**, conform cu revendicarea 1, caracterizat prin aceea că, într-o **primă variantă (2.1)** separarea monocitelor se face prin centrifugare în gradient de densitate, într-un recipient tubular pentru o durată cuprinsă între 5-60 minute, utilizând forțe de la 100 la 1000 x g, unde se obține în partea superioară a tubului o bandă (A) de plasma sanguină, o bandă (B) care conține monocite, o bandă (C) unde se găsește mediul de separare în gradient (C) care poate conține celulele polimorfonucleare, iar în partea de jos o banda (D) a eritrocitelor sedimentate, pentru prelevarea monocitelor din banda (B) este necesar a se îndepărta banda de plasmă (A) de la suprafața benzii de monocite (B) și apoi să fie aspirate monocitele, evitând aspirarea mediului de separare pentru a evita contaminarea cu celule polimorfonucleare.

3. **Procedeu de obținere a unor celule progenitoare endoteliale modificate genetic**, conform cu revendicarea 1, caracterizat prin aceea ca, într-o **a doua variantă (2.2)** separarea monocitelor se face prin centrifugare împotriva curgerii și se utilizează principiul de funcționare al unui elutriator ce constă în stabilirea unui echilibru între forțele centrifuge și de frecare la curgere dintr-o cameră specială, montată într-o centrifugă, care este alimentată cu suspensie celulară, inițial, celulele sunt menținute prin forța centrifugă în partea camerei cu raza cea mai mare de centrifugare, apoi este crescut debitul soluției în care sunt suspendate celulele iar acestea sunt antrenate astfel către centrul rotorului de centrifugare, nivel la care sunt eluate prin sistemul de tuburi al elutriatorului, deoarece particulele cu densitate mică pot să părăsească camera la viteze de curgere mai mici decât cele necesare pentru particulele cu densitate mai mare, se poate face separarea diferitelor fracții de celule sanguine, limfocitele și eritrocitele fiind eluate în primele fracții, iar neutrofilele în fracții mai târzii.

4. **Procedeu de obținere a unor celule progenitoare endoteliale modificate genetic**, conform cu revendicarea 1-3, caracterizat prin aceea ca, **etapa de izolare (4)** este realizată într-o variantă (4a) prin separarea prin adsorbție la suprafețe acoperite cu anticorpi CD34, CD133, CD31, anti-VEGFR2.

Arini
Alex
Omescu
Alexandra

5. **Procedeu de obținere a unor celule progenitoare endoteliale modificate genetic**, conform cu revendicarea 1-3, caracterizat prin aceea ca, etapa de izolare (4) într-o altă variantă (4b) este realizată prin sortarea celulară activată de fluorescență a celulelor care au fost puse anterior în contact cu anticorpi solubili CD34, CD133, CD31, anti-VEGFR2.

6. **Procedeu de obținere a unor celule progenitoare endoteliale modificate genetic** conform cu revendicarea 1-5, caracterizat prin aceea ca, într-o variantă a etapei (5), cantitatea de anticorpi utilizată este între 0,001 μg de anticorp/ 10^6 celule și 100 μg de anticorp/ 10^6 celule, un optim este între 0.1 μg de anticorp/ 10^6 celule și 1 μg de anticorp/ 10^6 celule, se poate varia concentrația de celule din timpul etapei de colorare cu anticorpi, concentrația celulelor din timpul etapei de colorare cu anticorpi este între 10^9 celule/ml și 10^5 celule/ml, un optim este între 10^8 celule/ml și 10^6 celule/ml.

7. **Procedeu de obținere a unor celule progenitoare endoteliale modificate genetic** conform cu revendicarea 1 și 5, caracterizat prin aceea că, în varianta (4b) de sortare celulară activată de fluorescență a celulelor care au fost puse anterior în contact cu anticorpi solubili CD34, CD133, CD31, anti-VEGFR2, sortarea celulară activată de fluorescență este o tehnică adaptată a citometriei în flux, utilizată pentru separarea celulelor dintr-o populație heterogenă de celule pe baza diferențelor de împrăștiere a luminii și de fluorescență, aceste diferențe de fluorescență pot fi date de colorarea diferențială a celulelor cu anticorpi specifici pentru proteine de la suprafața celulară.

8. **Procedeu de obținere a unor celule progenitoare endoteliale modificate genetic** conform cu revendicarea 1-7, caracterizat prin aceea că, într-o variantă (6a) a proceselor specifice (6), transfecția este făcută cu vectori individuali pentru exprimarea celor două subunități ale VLA-4, respectiv Itga4 și Itgb1 în două posibilități de realizare.

9. **Procedeu de obținere a unor celule progenitoare endoteliale modificate genetic** conform cu revendicarea 1-8, caracterizat prin aceea că, pentru reglarea exprimării, vectorul conține un segment promotor activ constitutiv, o secvență promotor inductibil, gene care codifică pentru rezistența la antibiotice pentru selectarea celulelor transfectate, secvențe reglatoare, de exemplu, un situs intern de intrare ribozomală.

10. **Procedeu de obținere a unor celule progenitoare endoteliale modificate genetic** conform cu revendicarea 1-8, caracterizat prin aceea că, într-o altă variantă (6b) a proceselor specifice (6), transfecția poate fi făcută cu un singur vector de exprimare care conține ambele integrități membranare Itga4 și Itgb1, cele două fragmente de acid nucleic sunt unite astfel încât secvențele de aminoacizi codificate de cele două fragmente de acid nucleic rămân în cadru pentru translația celor două proteine, opțional unite cu un linker flexibil, ca un singur produs de translație.

11. **Celule progenitoare endoteliale modificate genetic** conform revendicării 1-10, caracterizate prin aceea că, secvența de acid nucleic care codifică proteina Itga4 cuprinde o secvență de acid nucleic care are o identitate a secvenței de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% cu secvența de acid nucleic din SEQ ID NR:1 și secvența de acid nucleic care codifică proteina Itgb1 cuprinde o secvență de acid nucleic care are o identitate a secvenței de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% cu secvența de acid nucleic din SEQ ID NR:2.

12. **Celule progenitoare endoteliale modificate genetic** conform revendicării 1-10, caracterizate prin aceea că, secvența de acid nucleic care codifică proteina Itga4 cuprinde o secvență de acid nucleic care are o identitate a secvenței de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% cu secvența de acid nucleic din SEQ ID NR:3 și secvența de acid nucleic care codifică proteina Itgb1 cuprinde o secvență de acid nucleic care are o identitate a secvenței de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% cu secvența de acid nucleic din SEQ ID NR:4.



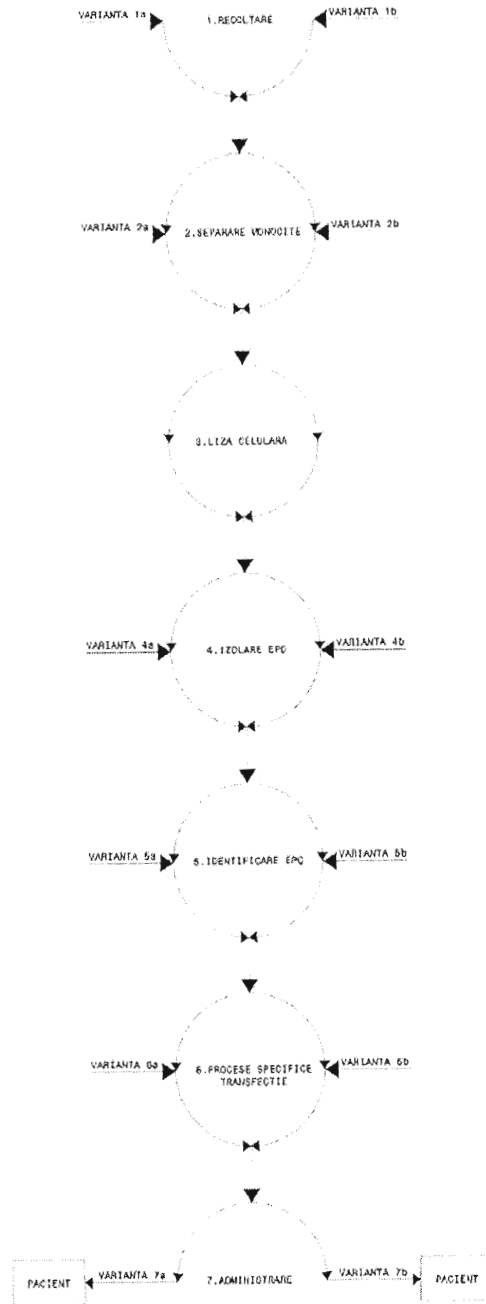


FIG. 1

Attestat Prof. Chiriac CA de Alexandru

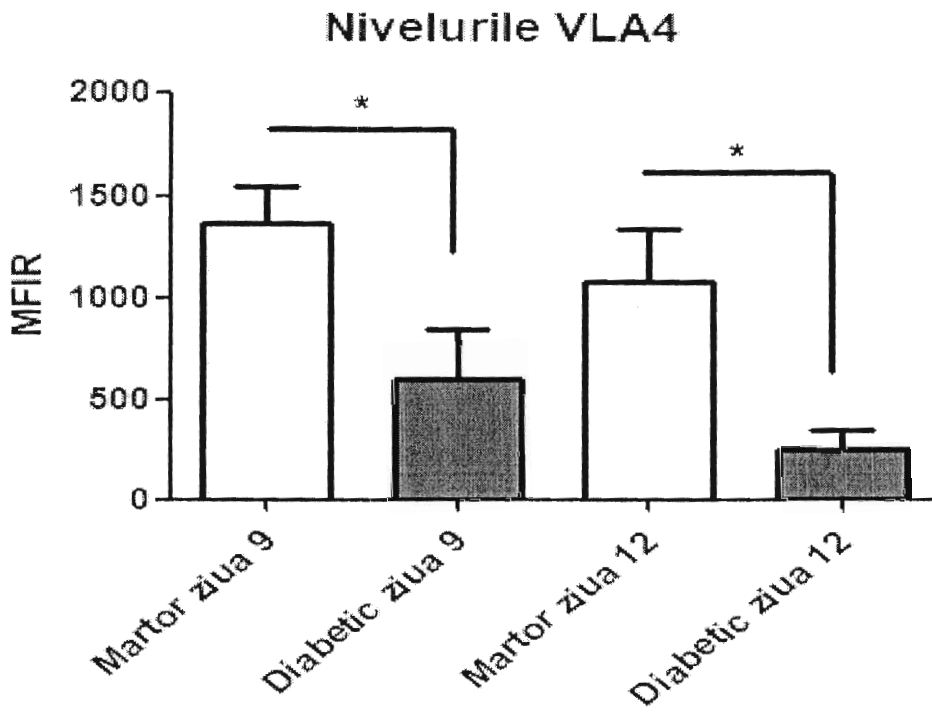


Figura 2

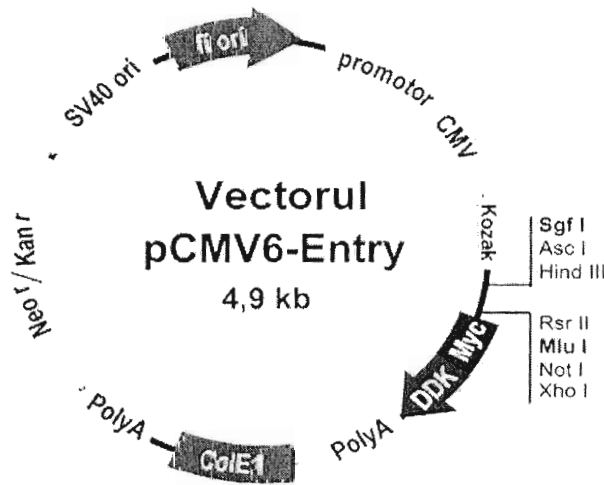


Figura 3

14/07/2011 *Clay Chuescu CA* of *Alexander*

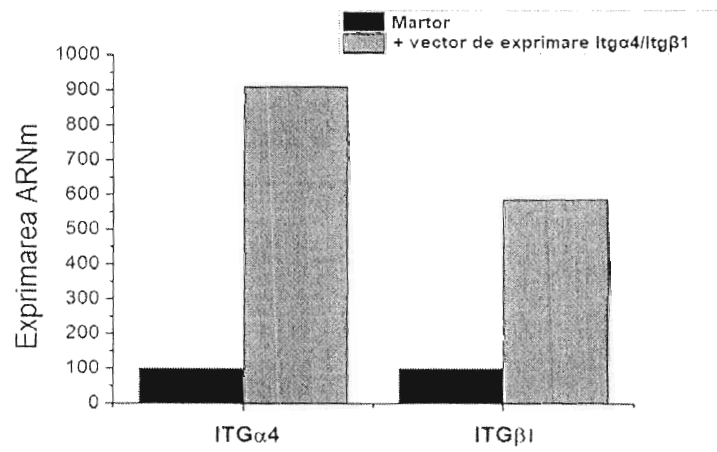


Figura 4

Adriana Beas Chiriac et al. Alexandru

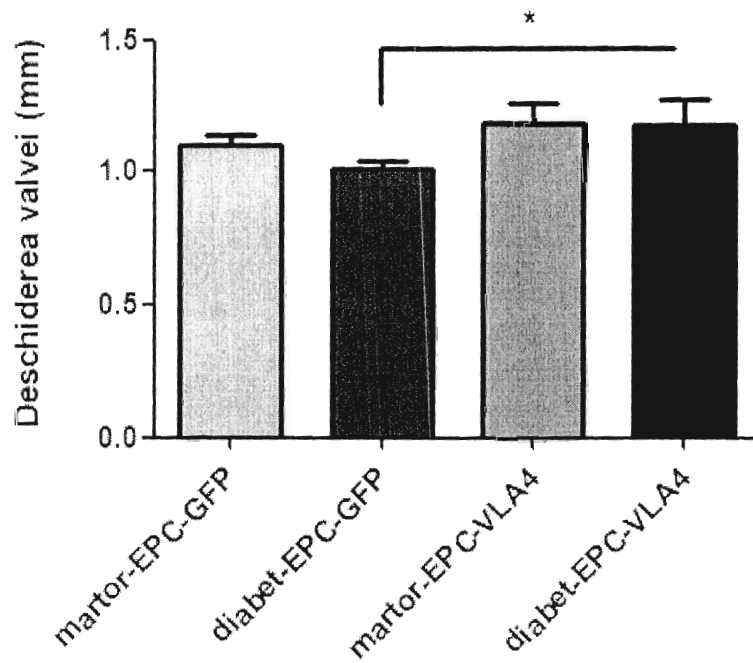
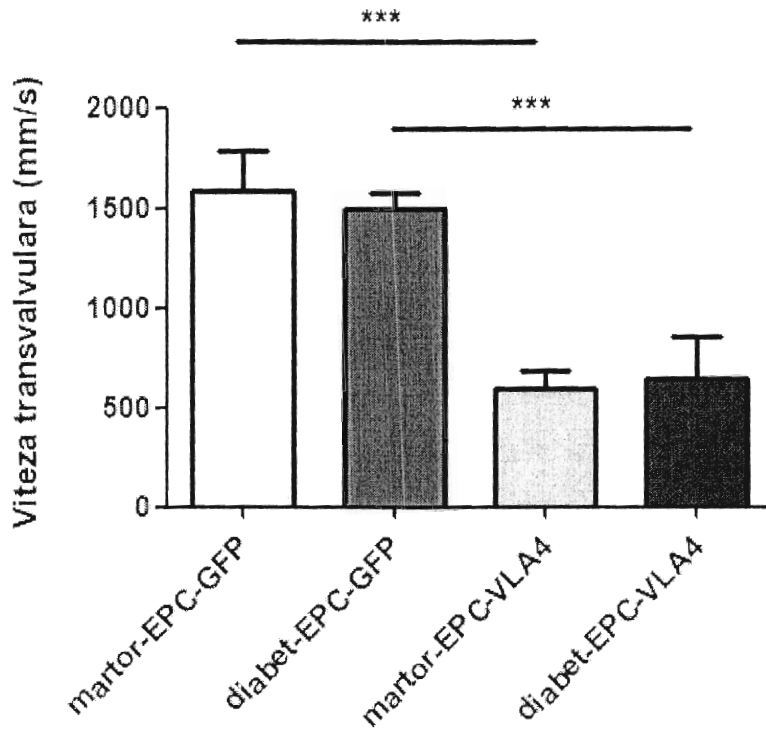


Figura 5

Ardeleanu *Alina* *Abulescu* *Alexandra*

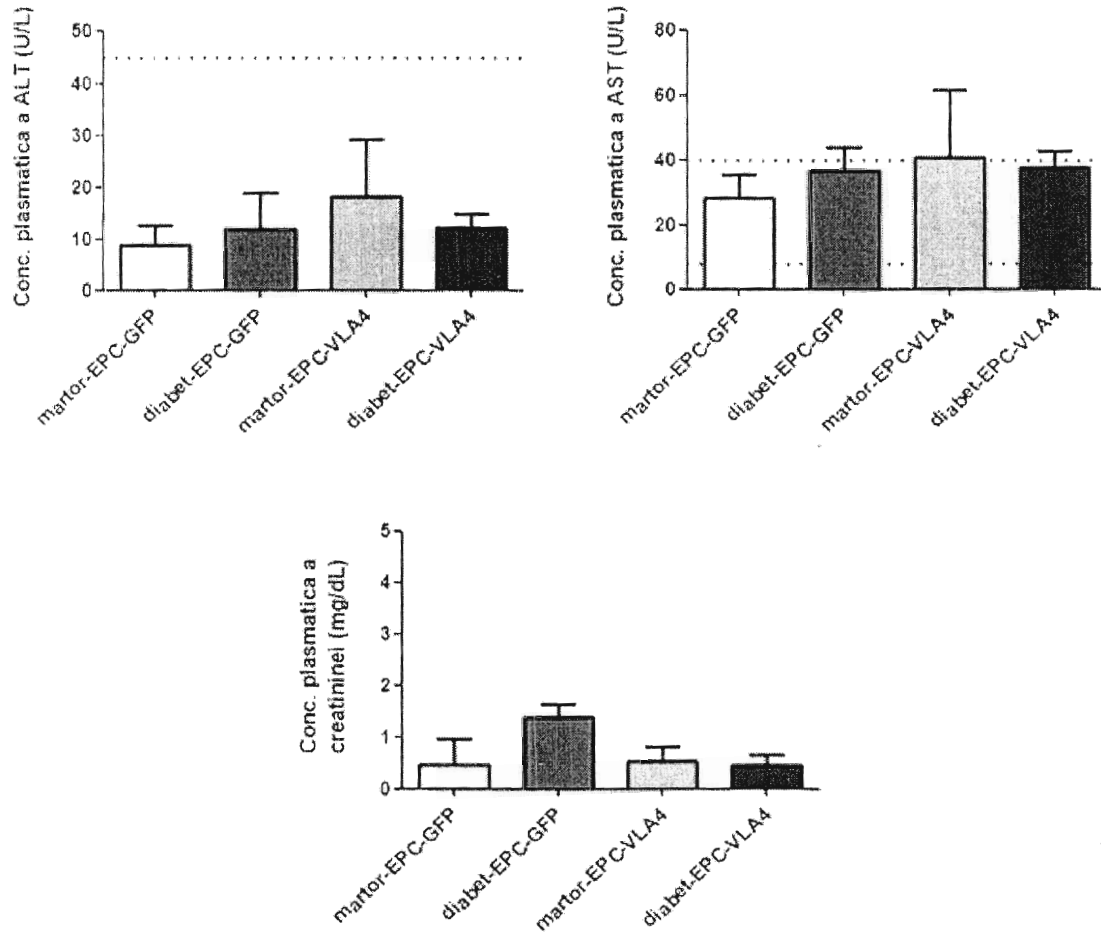


Figura 6

Attestasi *Prof. Chinescu* *Alexandra*