



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00515**

(22) Data de depozit: **25/08/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/01/2023 BOPI nr. **1/2023**

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

(72) Inventatori:
• **CECOLTAN SERGIU,** STR.ARCADIEI,
NR.21A, AP.28, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO;
• **SERBANESCU MIHAELA ISABELA,**
STR.MARGARETELOR, NR.40-44D,
DRAGOMIREȘTI DEAL, IF, RO;

• **CIORTAN LETIȚIA,**
STR.VULCAN JUDETUL, NR.31-35, BL.B3A,
SC.2, AP.62, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• **GAN ANA-MARIA,**
STR.DUMBRAVA NOUĂ, NR.1, BL.M41,
AP.83, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• **TUCUREANU MONICA MĂDĂLINA,**
STR.CETATEA HISTRIA, NR.5,
BL.M2B8/15, SC.A, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **MIHAILA CRISTINA ANDREEA,**
STR.TINERETULUI, NR.1334,
COMUNA ZĂNEȘTI, NT, RO;
• **BUTOI ELENA,** STR.HUEDIN, NR.7, BL.2,
SC.2, AP.83, ET.3, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, Roâ

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI HIDROGEL DIN ȚESUT
CARDIAC FUNCȚIONALIZAT CU UN AGENT
ANTIINFLAMATOR**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui hidrogel funcționalizat utilizat în medicina regenerativă a miocardului deteriorat post infarct miocardic (IM). Procedeu, conform invenției, constă în etapele: decelularizarea miocardului murin sau porcine prin șoc hipotonic, extracția proteică cu detergent, digestie nucleazică cu enzime specifice, înghețarea și liofilizarea matricei aceluare timp de 72 h la -48°C și 0,045 mBar, adăugare unei soluții acide de 10 mM HCl și pepsină porcine la concentrația finală de 160 U/mg matrice, neutralizare a pH acid cu soluție 1M de NaOH, urmat

de incubare timp de 90 min în incubator, din care rezultă un hidrogel care prezintă în compoziție glicozaminoglicani și proteine de matrice extracelulară collagen I și IV, elastină, fibronectină și laminină fiind funcționalizat cu un compus anti-inflamator de tip inhibitorul alarminei S100A9 pentru intervenție în faza inflamatorie de evoluție patologică post IM.

Revendicări: 6
Figuri: 14

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).



DESCRIEREA INVENȚIEI

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr. a 2022	515
Data depozit 25-08-2022	

120.

Descrierea stadiului actual - stadiu actual context științific actual

a) Infarctul miocardic. Bolile cardiovasculare (BCV) reprezintă principala cauză de mortalitate la nivel global, cu aproximativ 18 milioane de victime numai în anul 2017 [Roth et al., 2017]. 85% din decese se datorează bolii cardiace ischemice și bolii cerebrovasculare. Deși programele de informare a populației cu privire la factorii de risc și modalitățile de prevenție au început să aiba un impact din ce în ce mai mare, incidența și răspândirea acestor patologii nu au scăzut, fiind înregistrată o creștere de peste 20% a numărului total de decese în perioada 2007-2017 [Roth et al., 2017]. În timp ce progresele medicale recente au redus riscul de deces în timpul unui atac de cord, modificările structurale și deteriorarea inimii cauzate de moartea cardiomiocitelor și degradarea ulterioară a matricei extracelulare miocardice, caracterizată prin subțierea peretelui ventricular stâng și dilatarea camerei, pot duce la insuficiență cardiacă ulterior, post infarct miocardic (IM). Prin urmare, o problemă importantă a reparării post-infarct miocardic este de a minimiza daunele pe termen lung prin reducerea inflamației și generarea de noi celule miocardice funcționale și matrice extracelulară adecvată.

Regenerarea miocardului deteriorat post-IM rămâne o provocare importantă neabordată suficient.

Infarctul miocardic are loc atunci când fluxul sangvin către mușchiul inimii este blocat sau redus semnificativ [Saleh & Ambrose, 2018], datorită unei ocluzii produse de un cheag de sânge format în lumenul arterelor coronare, ca urmare a leziunilor peretelui vascular coronarian. Destabilizarea placilor aterosclerotice prezente la nivelul arterelor coronare, fie prin ruptură fie prin eroziune, declanșează cascada trombotică și favorizează apariția unui aterotrombus dinamic care obturează artera și împiedică irigarea corespunzătoare a inimii, producând ischemia țesutului cardiac afectat. Ocluzia arterei coronare împiedică transportul de oxigen și nutrienți, conducând în cele din urmă la moartea a numeroase celulele miocardice, datorată ischemiei prelungite (Figura 1).

Figura 1. Schematizare infarct miocardic. Infarctul miocardic apare atunci când un vas major care furnizează sânge către inimă (numit arteră coronară) este blocat, ceea ce duce la privarea de oxigen a unei părți din țesutului inimii. Lipsa de oxigen a țesutului inimii cauzează deteriorarea sau moartea zonei afectate. Blocarea vasului de sânge este un proces de durată în



119

care factorii inflamatori și lipidele din organism se lipesc de pereții arterelor formând ceea ce se numește o placă ateromatoasă. Când o bucată din această placă este ruptă, se formează un cheag (numit tromb) care blochează vasul de sange (sursa www.elitecardiovascular.com).

Capacitatea limitată de regenerare a cardiomiocitelor în țesutul miocardic adult conduce la remodelare dezadaptativă a ventriculului, inclusiv subțierea peretelui ventricular, formarea țesutului cicatricial și în cele din urmă insuficiență cardiacă [Wu T. & Liu W, 2022]. Datorită capacității de regenerare neglijabile a inimii (un turn-over anual de doar 1-2% al cardiomiocitelor), oamenii de știință caută în permanență strategii care să inducă regenerarea și recuperarea funcțională a cordului [Hashimoto et al., 2018; Turner et al., 2020]. De-a lungul timpului aceasta problemă a fost abordată din multiple direcții, una dintre cele mai promițătoare căi fiind terapia celulară. Având în vedere rezultatele contradictorii ale studiilor clinice care au folosit terapii celulare, nevoia de a dezvolta o terapie eficientă rămâne de actualitate. Mai mult decât atât, progresul recent al ingineriei tisulare, care presupune utilizarea în paralel a celulelor și biomaterialelor pentru reconstrucția tisulară, proiectează noi soluții pentru tratamentul afecțiunilor cardiovasculare.

b) Strategii terapeutice pentru infarctul miocardic: terapia celulară și ingineria tisulară

Ischemia locală are consecințe celulare și locale grave, printre care: (i) activarea endoteliului și pierderea funcției sale de barieră selectivă, ceea ce duce la o creștere a permeabilității endoteliale și expresia crescută a moleculelor de adeziune care inițiază inflamația locală; (ii) necroza celulelor miocardice și dezintegrarea treptată a matricei extracelulare, producându-se astfel o pierdere ireversibilă a cardiomiocitelor viabile. Celulele necrotice, precum și matricea extracelulară afectată, eliberează molecule semnal (DAMPs - damage-associated molecular patterns) care sunt recepționate de către celulele sistemului imunitar prin receptorii specifici PRR (pattern recognition receptors) declanșând semnalizări celulare și supra-expresie a chemokinelor și citokinelor, care mai departe produc un proces inflamator (prin recrutarea celulelor sistemului imunitar înăscut și reacții nespecifice ale celui adaptativ). Deși scopul recrutării acestor celule este de a înlătura resturile celulare din zona afectată în urma infarctului, această infiltrare leucocitară, contribuie însă la lezarea suplimentară a endoteliului și țesutului subendotelial, prin exacerbarea inflamației și a speciilor reactive de oxigen care se generează odată cu revenirea fluxului sangvin [Prabhu & Frangogiannis, 2016].

2


Răspunsul inflamator post-infarct poate fi împărțit în trei etape: faza inflamatoare, faza proliferativă și faza de maturare și este definitiv pentru evoluția ulterioară a IM și a remodelării ventriculare. Inflamația timpurie este necesară pentru a realiza înlăturarea celulelor necrotice și pentru repararea tisulară, însă la fel de importantă este stoparea stimulilor pro-inflamatori la timpul corespunzător.

Medicina regenerativă are ca scop recuperarea funcției țesuturilor și organelor afectate în urma bolilor, îmbătrânirii sau traumelor. În cazul infarctului miocardic, **terapiile celulare** s-au făcut remarcate ca o soluție inovatoare și promițătoare, ele având la bază administrarea de celule vii pentru a induce și susține regenerarea țesutului necrozat în urma ischemiei. Față de tratamentele moleculare clasice, transplantul de celule vii are un avantaj semnificativ întrucât acestea sunt capabile să realizeze funcții biologice complexe și pot percepe și reacționa specific la stimulii prezenți în micromediul unde sunt transplantate. Totuși, încă de la primele tentative de a regenera inima prin intermediul diferitelor populații celulare problemele apărute au fost legate de ratele scăzute de grefare a celulelor și de supraviețuirea slabă a acestora după injectarea intramiocardică [Wollert et al., 2010], dar și de marea diversitate la nivel de modele experimentale, ceea ce a condus la rezultate greu de comparat și dificultatea de a trage concluzii vis-a-vis de eficiența terapiei. Astfel că deși promițătoare, rezultatele studiilor clinice care au folosit terapia cu celule vii a dat rezultate modeste sau neutre, sugerând nevoia de reîntoarcere la masa de lucru și de integrare a cunoștințelor dobândite astfel încât abordările terapeutice să poată fi îmbunătățite.

Astfel că, **ingineria tisulară** a apărut ca un domeniu interdisciplinar inovator, care în ultimul deceniu a dus la dezvoltarea a numeroase tehnologii și concepte terapeutice, făcând posibilă depășirea unor obstacole semnificative în medicina regenerativă. Printre aceste obstacole se numarau lipsa unor biomateriale cu proprietăți mecanice și chimice reglabile și imposibilitatea generării unor țesuturi vascularizate biocompatibile care să poată fi conectate la sistemul circulator al gazdei. În timp, aceste direcții au evoluat datorită reacțiilor chimice avansate de incorporare moleculară în structura biomaterialelor, care permit coordonarea biochimică a celulelor încapsulate, dar și dezvoltarea de noi tehnologii de biofabricare și bioprintare 3D, pentru obținerea unor structuri biologice complexe. Prin urmare, s-au făcut încercări extinse de a îmbunătăți retenția celulelor miocardice și rata de supraviețuire, prin implantarea de schele/suporturi populate cu celule [Godier-Furnemont et al, 2011].

MT

Strategiile utilizate în ingineria tisulară pot fi simple, precum încorporarea de biomolecule în rețeaua hidrogelului și eliberarea in vivo a acestora, sau complexe, precum reconstrucția țesutului miocardic uman sau generarea organelor bioartificiale [Pakulska et al., 2016; Salani et al., 2018; Tiburcy et al., 2017]. Diversitatea materialelor, a celulelor și a dispozitivelor care pot fi utilizate permit ca aplicabilitatea ingineriei tisulare să fie extrem de largă, putându-se adresa regenerării diverselor țesuturi ale corpului uman. În ceea ce privește abordările tridimensionale complexe de inginerie tisulară, cele mai reprezentative exemple sunt bioprintarea 3D și decelularizarea organelor reprezentate de alogrefe și xenogrefe pentru repopularea lor ulterioară cu celule.

c) Hidrogeluri folosite în modelele in vivo pentru tratamentul infarctului miocardic.

Hidrogelurile sunt materiale moi, umede, cu proprietăți similare cu cele ale țesuturilor moi umane și sunt intens utilizate în ingineria țesuturilor. În ultimii ani există un interes din ce în ce mai crescut pentru ingineria hidrogelurilor în vederea obținerii de țesuturi și de modele 3D pentru studiul diferitelor boli. Motivația majoră este că astfel de hidrogeluri pot imita mai bine micromediul fiziologic al diferitelor țesuturi umane. Mai mult, modelele de țesuturi 3D realizate cu celulele proprii ale pacienților pot revoluționa modul de tratament și pot dezvolta alternative de diagnostic. Un țesut cardiac ideal va fi implantat eficient în organism, regenerând țesutul și îmbunătățind funcționalitatea inimii fără a provoca efecte secundare, cum ar fi imunogenitatea. Până în prezent, modelele dezvoltate au fost proiectate în principal pe baza biomaterialelor naturale și sintetice [Lewis et al., 2016], care imită componentele biochimice și proprietățile structurale ale matricei extracelulare miocardice native. Biomaterialele nu abordează doar problema grefării celulare, ci ajută și la traducerea clinică a terapiilor bazate pe molecule bioactive. Administrarea sistemică a acestor molecule bioactive are dezavantajul unui timp scurt de înjumătățire in vivo, necesitatea unor injecții repetate și costul ridicat al tratamentului. Deși implantarea biomaterialelor disponibile în prezent, crește într-o oarecare măsură grosimea peretelui ventriculului stâng (VS) și previne dilatarea VS în modelele experimentale de IM, problema fundamentală asociată cu bioactivitatea acestor biomateriale rămâne încă nerezolvată [Badylak et al., 2012]. Rezultate bune s-au obținut cu hidrogelurile derivate din matrici extracelulare (ECM) naturale obținute prin decelularizarea țesutului miocardic, deoarece aceste modele imită proprietățile țesutului (de exemplu arhitectura ECM, indicii biochimici și integritatea mecanică) similare cu inima nativă și favorizează atașarea, creșterea, infiltrarea și diferențierea celulelor [Pawan et al., 2019].

4

116

În ceea ce privește hidrogelurile funcționalizate pentru ingineria țesutului cardiac, în ultimii ani au fost concepute diferite tipuri: i) hidrogeluri sensibile la metaloproteinaze, ii) hidrogeluri de captare a speciilor reactive de oxigen, iii) hidrogeluri imunomodulatoare, iv) hidrogeluri pro-angiogenice și iv) hidrogeluri conductive care pot restabili semnalul electric în zonele de infarct.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția prezentă este dezvoltarea unui hidrogel funcționalizat cu un agent anti-inflamator care să imite structura miocardului natural pentru a înlocui țesutul necrotic, să faciliteze repopularea celulară a zonei infarctate și să limiteze inflamația, pentru recuperarea cardiacă post-infarct. Invenția rezolvă posibilitatea de generare *in vitro* printr-un procedeu netoxic, a unui hidrogel din țesut cardiac compatibil cu celule cardiace precum: fibroblaști cardiaci, cardiomiocite sau celule endoteliale. Astfel, conform invenției s-a dezvoltat un hidrogel din țesut cardiac în care au fost testate celule umane cardiace (cardiomiocite murine și fibroblaști umani), în dorința de a crea un hidrogel care nu doar să asigure matrice extracelulară nativă zonei necrozate post infarct, dar care să poată fi și funcționalizat cu un agent anti-inflamator care să limiteze inflamația post-infarct. Procedul permite studierea interacțiunii celulelor cardiace cu elementele matriceale din compoziția hidrogelului dar și studiul efectelor agentului anti-inflamator ABR-238901 (sau a altor medicamente și inhibitori), în condiții *in vitro*, diminuând folosirea/costurile necesare unor studii efectuate pe modele *in vivo*, oferind totodată condiții de răspuns celular similare cu acestea.

Hidrogelul obținut din țesut cardiac nativ poate fi injectat și folosit în viitor în studiul terapiilor de diminuare sau contracarare a mecanismelor celulare și moleculare care duc la insuficiență cardiacă post infarct.

Noutatea procedurii propusă în această aplicație constă în folosirea de țesut cardiac porcine sau murine pentru obținerea unui hidrogel cu structură similară țesutului nativ și funcționalizarea lui cu un inhibitor anti-inflamator pentru a înlocui țesutul necrotic, pentru a facilita repopularea celulară a zonei infarctate și pentru a limita inflamația, procese esențiale pentru recuperarea cardiacă post-infarct.

Procedul de obținere a unui hidrogel din țesut cardiac înlătură dezavantajele soluțiilor cunoscute și rezolvă problema tehnică astfel: hidrogelul sub formă de gel vâscos este obținut din țesut miocardic nativ pentru o biocompatibilitate maximă cu celulele cardiace, care prin amestecul cu un agent terapeutic (inhibitor de alarmina S100A9), devine hidrogel funcționalizat cu efecte anti-inflamatoare, prin diminuarea recrutării celulelor inflamatoare circulante.

5

 The bottom of the page contains several handwritten signatures and initials. On the left, there is a signature that appears to be 'Cecilia'. In the center, there are initials 'ATB' and another signature. On the right, there is a signature that looks like 'Nelu' and another signature that appears to be 'Alina'.

115

Hidrogelurile sunt materiale moi, umede, cu proprietăți similare cu cele ale țesuturilor moi umane și sunt utilizate pe scară largă în ingineria țesuturilor [Wang et al., 2017]. Studiile din ultimii ani au arătat că hidrogelurile nu oferă doar suport mecanic pentru repararea țesutului miocardic [Wall et al., 2006; Zhu et al., 2017] dar pot servi și ca purtători pentru transportul de celule sau medicamente [Park et al., 2019; Huang et al., 2020]. Hidrogelurile injectabile sunt considerate o tehnologie minim invazivă care pot depăși limitările clinice și chirurgicale ale stentului tradițional, printr-o tranziție controlată din soluție în gel și prin transportul localizat a diferiți compuși sau celule încapsulate, ceea ce duce la o eficiență terapeutică sporită și îmbunătățirea confortului pacientului. Deși în ultimii ani, hidrogelurile injectabile dezvoltate pentru regenerarea țesuturilor au devenit din ce în ce mai sigure, mai inteligente și multifuncționale, încă le mai lipsește unele dintre proprietățile necesare pentru a imita țesutul miocardic. Un hidrogel injectabil ideal pentru repararea cardiacă ar trebui să dețină următoarele proprietăți: i) biocompatibilitate; ii) biodegradabilitate; iii) proprietăți mecanice; iv) conductivitate electrică.

Materialele biologice utilizate în ingineria țesuturilor sunt diverse și pot fi în general clasificate ca materiale naturale (hidrogeluri derivate din surse naturale), materiale sintetice (hidrogeluri obținute prin sinteză - sintetice) sau un amestec de ambele tipuri (hidrogeluri hibride). În general, odată ce biomaterialele sunt implantate în corpul uman, pot apărea unul sau mai multe reacții pozitive sau negative, inclusiv interacțiuni cu sânge (hemoliză), interacțiunea celulelor inflamatorii, formarea țesutului de granulație, reacții cu corpuri străine și stres oxidativ [Anderson et al., 2008; Sheikh et al., 2015]. Materiale naturale pe bază de proteine, polizaharide și țesuturi decelularizate sunt adesea folosite pentru ingineria țesuturilor miocardice din cauza biocompatibilității lor inerente, bioactivitate și imunogenitatea scăzută. Cu toate acestea, ele au, de obicei, proprietăți mecanice slabe și dificultăți în modificarea structurală.

În ceea ce privește invazivitatea minimă, un hidrogel injectat in situ este mai avantajos decât un hidrogel în formă de plasture, deoarece primul se dispersează uniform după injectare pentru a oferi suport mecanic peretelui infarctului. În prezent, hidrogelurile sunt injectate în țesutul miocardic prin trei abordări: injectare epicardică directă, injectare intracoronară transcater și injectare trans-endocardică printr-un cateter combinat cu tehnologia imagistică [Strauer & Steinhoff, 2015]. Timpul de tranziție din soluție în gel este un factor important pentru realizarea tratamentului minim invaziv al miocardului cu hidrogeluri, iar hidrogelul trebuie să treacă fără probleme printr-un ac de dimensiunea 27G pentru a reduce zona traumatismului [Reis et al., 2016].

6
Ceslu
Duce
M72
X
Nenu
Albino

Rezultatele studiilor de cercetare clinică au furnizat dovezi solide care confirmă eficacitatea hidrogelurilor acelulare injectabile, fără biomolecule, în repararea țesutului miocardic și protecția funcțională [Anker et al., 2015; Frey et al., 2014]. Într-un astfel de studiu, peretele miocardic al ventriculului stâng a 11 pacienți cu insuficiență cardiacă a fost injectat cu hidrogelul Algisyl-LVR™ constând în Ca²⁺-alginat și Na⁺-alginat, printr-o intervenție chirurgicală de bypass coronarian. La 3 luni de la tratament, volumele finale diastolice și sistolice au scăzut semnificativ, iar fracția de ejeție a crescut semnificativ la toți pacienții [Lee et al., 2013 ; Lee et al., 2015]. Un alt hidrogel – IK 5001, alcătuit dintr-o soluție de 1% alginat de sodiu plus 0.3% gluconat de calciu – a fost introdus în aria infarctată prin cateter la 27 de pacienți, iar la 6 luni după injectare, pacienții au tolerat bine gelul fără complicații legate de implantare, aritmii grave sau deces; ecografia cardiacă a arătat o reducere a dimensiunii infarctului și a dilatației ventriculare, funcția cardiacă rămânând la niveluri preoperatorii, confirmând că IK-5001 este sigur și eficient pentru tratamentul IM [Frey et al., 2014]. Astfel că, deși cu pacienți puțini, studiile clinice au început să apară. Recent, un studiu care a folosit VentiGel – provenit din matrice celulară cardiacă, a demonstrat siguranța și fezabilitatea injectării transendocardice de VentiGel la pacienții post-IM cu disfuncție ventriculară stângă [Traverse et al., 2019]. Matrigelul este un hidrogel care imită matricea extracelulară, fiind compus din proteine ale membranei bazale și factori de creștere. Datorită capacității sale de a promova angiogeneza, Matrigelul a fost injectat în inimi de șobolan infarctat și s-a arătat o îngroșare semnificativă a peretelui infarctat ventricular stâng, densitatea capilară crescută și dimensiunea redusă a infarctului în comparație cu șobolanii cu infarct, netratați [Copland et al; 2008].

În prezent, limitările majore ale unor agenți biologici pentru tratamentul preclinic al IM sunt efectele secundare toxice și biodisponibilitatea scăzută la doza eficientă. De exemplu, unii factori de creștere pro-angiogeni (de exemplu, bFGF, VEGF și factorul de creștere a hepatocitelor - HGF) sunt ușor de îndepărtat de sistemul imunitar după administrarea vasculară, ducând la concentrații insuficiente sau sunt predispuși la efecte secundare toxice, cum ar fi anevrismele, datorită administrării de doze mari [Mahmarian et al., 2006]. Astfel, *încapsularea agenților biologici* în hidrogeluri are următoarele avantaje: i) protejează activitatea agenților încapsulați de mediul extern advers [Oliva et al., 2017; Dimatteo et al., 2018; Gradinaru et al., 2018], ii) permite încărcarea medicamentelor cu forme și dimensiuni diferite prin interacțiuni fizice și cuplarea chimică, care este esențială pentru realizarea eliberării controlate a medicamentelor la locul țintă

7
Cesalbu
Vau
Dusa MITZ
Alluella

[Rufaihah & Seliktar 2016; Bhattarai et al., 1010] și iii) asigură concentrații eficiente de medicament la locul infarctului după injectare, evitând reacțiile adverse datorate administrării sistemice [Anugrah et al., 2019; Qian et al., 2019].

Reglarea inflamației: recrutarea leucocitelor la locul leziunii miocardice infarctate de către debriurile necrotice și resturile de matrice degradată marchează inițierea răspunsului inflamator [Buckley & Abbate, 2018]. Deși răspunsul inflamator curăță resturile celulare și activează semnalele de reparare, inflamația prelungită accelerează fibroza și ruptura cardiacă [Frangogiannis, 2018 ; Swirski & Nahrendorf, 2019]. Prin urmare, este necesar să se moduleze spațial răspunsul inflamator pentru a împiedica răspândirea factorilor inflamatori dincolo de regiunile infarctate. Unele materiale naturale care compun hidrogelurile sunt în mod inerent anti-inflamatoare; de exemplu, acidul hialuronic cu greutate moleculară mare elimină speciile reactive de oxigen (ROS) in vivo, ceea ce poate explica îmbunătățirea funcției cardiace după injectarea cu hidrogel pe bază de acid hialuronic [Nakamura et al., 2004]. Totuși, pentru majoritatea hidrogelurilor care țintesc inflamația, este necesară încapsularea factorilor imunomodulatori pentru a interfera cu micromediul inflamator al infarctului. Un astfel de hidrogel din alginat, încapsulat cu interleukinele antiinflamatorii IL-4/10/13 și a factorului de stimulare a coloniilor (CSF-1) a demonstrat că poate induce polarizarea macrofagelor către fenotipurile de vindecare, accelerând astfel vindecarea leziunilor și reducând zona fibrotică [Bloise et al., 2020]. Astfel, proiectarea hidrogelurilor injectabile pentru repararea miocardului și identificarea mecanismelor de acțiune al hidrogelurilor încărcate cu substanțe bioactive pentru repararea MI rămâne o provocare.

Hidrogelul dezvoltat în procedeu de față combină furnizarea elementelor naturale de matrice extracelulară în scopul refacerii țesutului necrozat cu terapia anti-inflamatoare pentru a limita inflamația și a favoriza rezoluția acesteia. În prezent nu există un hidrogel derivat din țesut miocardic, funcționalizat cu blocant de S100A9, în scopul terapiei post-IM.

Procedeu descris în această invenție permite obținerea unei formule hidrogel cu compoziție matriceală similară miocardului nativ, funcționalizat cu un agent anti-inflamator –ABR25757, un inhibitor specific de S100A9 – o alarmină produsă în exces de neutrofilele infiltrate în zona infarctată, imediat post-IM. Tehnica folosită pentru obținerea formulei de hidrogel cu compoziție matriceală similară miocardului nativ implică, într-o etapă inițială, decelularizarea inimilor miocardului murin sau porcine prin șoc hypotonic, extracție proteică cu detergent și digestie

112

nucleazică cu enzime specifice. La finalul procedurii se obține matrice acelușară, care este înghețată și liofilizată timp de 72h la -48 grade Celsius și 0.045 mBar, în vederea determinării conținutului masic. Hidrogelul se obține prin adăugarea unei soluții acide de 10mM HCl și pepsină porcină la concentrația finală de 160U/mg matrice. Înainte de folosire, se va efectua neutralizarea pH-ului acid pe gheață, folosind soluție de 1M NaOH, urmată de incubarea hidrogelului timp de 90 min în incubator.

Pentru hidrogelul obținut - **MIGEL**- a fost mai întâi caracterizat pentru a identifica prezența glicozaminoglicanilor și a proteinelor matriceale. Glicozaminoglicanii, alături de proteoglicani și proteine matriceale care se găsesc în țesutul nativ, influențează creșterea și funcțiile specifice ale celulei, necesare pentru funcționarea corectă a țesuturilor, precum și regenerarea și repararea miocardului deteriorat. Conform rezultatelor prezentei invenții, hidrogelul dezvoltat prezintă în compoziția sa, atât glicozaminoglicani – evidențiați prin colorația Alcian blue și cuantificați prin tehnica ELISA, cât și proteinele de matrice extracelulară collagen I și IV, elastina, fibronectina și laminina – identificate prin Western Blot.

Pentru studiul de biocompatibilitate, celulele cardiace de tip cardiomiocite sau fibroblaști au fost cultivate pe MIGEL apoi, după 48h a fost evaluată viabilitatea și morfologia acestora.

Pentru obținerea hidrogelului funcționalizat inhibitorul ABR25757 s-a dizolvat în prealabil în DMSO și s-a adăugat ulterior la soluția de hidrogel – MIGEL. Astfel, formarea rețelei de hidrogel și încapsularea medicamentului au fost realizate simultan, inhibitorul fiind încapsulat uniform în hidrogel. Studiul asupra eliberării compusului încapsulat s-a realizat printr-o cinetică de eliberare unde s-a efectuat incubarea hidrogelului funcționalizat cu mediu de cultură pentru diferite perioade de timp, la 37°C în tampon fosfat salin (TFS) și s-a determinat spectrofotometric concentrația compusului eliberat din hidrogel. Eliberarea medicamentului poate avea loc prin difuzie pasivă, prin rețeaua polimerică a hidrogelului, interacțiuni reversibile medicament-polimer sau degradarea legăturilor labile.

Efectul anti-inflamator al hidrogelului funcționalizat s-a urmărit prin cuantificarea transmigrării prin hidrogelul funcționalizat sau nu, a leucocitelor (monocite și neutrofile) atât prin camere duble Boyden de chemotaxie, cât și cu sistemul care măsoară cinetica transmigrării-xCELLigence.

Prin utilizarea hidrogelului obținut din țesut cardiac, funcționalizat cu inhibitorul de alarmină S100A9, obținut folosind procedeul descris în această invenție, se intervine în faza

Handwritten signatures and initials at the bottom of the page, including names like 'Coban', 'Duce', and 'Alușale'.

inflamatorie de evoluție patologică post IM, a cărei prelungire conduce la insuficiența cardiacă, oferindu-se astfel o oportunitate terapeutică promițătoare.

Procedeul de obținere a unui hidrogel cu structură similară țesutului nativ, funcționalizat cu un compus anti-inflamator, prezintă următoarele avantaje :

1. Hidrogelul dezvoltat are structură similară țesutului nativ, furnizând astfel elemente specifice de matrice extracelulară pentru a înlocui țesutul necrotic post infarct, în cazul injectării.
2. Oferă o biocompatibilitate mare cu celulele cardiace, putând astfel facilita repopularea celulară a zonei infarctate.
3. Poate fi funcționalizat pentru a limita inflamația, proces esențial pentru evoluția pozitivă și recuperarea cardiacă post-infarct.
4. Această invenție prezintă potențial pentru a fi implementată și aplicată în: dezvoltarea de terapii țintite pentru rezoluția inflamatiei post-infarct; verificarea unor compuși activi existenți cu potențial farmacologic, eliminarea parțială a numărului mare de modele in vivo folosite în studii și în dezvoltarea terapiilor pentru prevenirea insuficienței cardiace.

Exemple de realizare a procedurii conform invenției:

În cele ce urmează sunt date exemple concrete care arată cum poate fi implementată și aplicată invenția astfel:

Intr-o prima etapa este necesar a se stabili materialele și echipamentele necesare procedurii.

1) Materiale și echipamente folosite pentru obținerea invenției

i) Materiale:

Substanțele folosite în studii au fost achiziționate de la următoarele companii:

- Merk-Sigma: Fibroblaștii cardiaci, mediul pentru fibroblaștii cardiaci, enzime pentru decelularizare, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), albumina serică bovină (BSA), acrilamida/bis-acrilamida, dimetil sulfoxid (DMSO), glicina, ABR-25757, RNase Away pentru biologie moleculară, Dimethylmethylene Blue (DMMB), Tampon fosfat 100mM pH 9, HCl 1M, Antibiotic penicilină și streptomycină 5x;

- Nordic BioSite: kit cuantificare GAG;

10

The bottom of the page contains several handwritten signatures and initials. On the left, there is a signature that appears to be 'Gusa'. In the center, there are initials 'CTD' and a signature that looks like 'Culbu'. On the right, there is a signature 'Vasu' and another signature that appears to be 'Alilau'.

110

- Thermo Scientific – Anticorpi: Colagen 1-PA5-29569, Elastina- MA1-27129, Fibronectina- MA5-11981, Laminina-MABT39, Colagen 3-PA5-278281, Colagen 4-SC-59814; DMEM- 1mg/ml glucoza (Gibco) suplimentat cu penicilină, streptomycină și 10% ser fetal vițel, DAPI, paraformaldehidă, Tampon fosfat salin - TFS și consumabile și reactivi pentru culturi celulare;
- Agilrom: camere CIM plate pentru chemotaxie.
- Abcam: colorantul fluorescent - Cell Tracking Dye Kit - Red – Cytopainter.
- Promega: kit de extracție ADN „ADN genomic Wizard”.
- Inimile porcine au fost achiziționate de la Abatorul Periş.
- Alți reactivi și consumabile au fost achiziționate de la: Sigma Aldrich - Merk, Thermo Scientific, Laboratorium, Vetro design, Elta, Biomedica etc. Camerele duble de chemotaxie - boyden, de la Costar sau Thermo Fisher Scientific.

ii) Echipamente folosite:

- Pentru întreținerea culturilor a fost utilizat un incubator - Thermo Scientific cu umidificare și o concentrație a CO₂ de 5% și o hotă de flux laminar pentru lucru în condiții aseptice.
- Pentru pregătirea hidrogelului a fost utilizată o plită termostatăă cu agitare magnetică.
- Pentru cuantificarea cantității de ADN din țesut s-a utilizat aparatul NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).
- pentru studii de imagistică - microscopul de fluorescență IX81 Olympus.
- pentru studii de chemotaxie - xCELLigence System RTCA (Roche, Basel, Elveția),

2) Într-o succesiune de etape de început ale procedurii are loc decelularizarea țesutului miocardic și obținerea matricei extracelulare cardiace

Etapa 2.1- Decelularizarea miocardului murin și porcine

Tehnica folosită pentru decelularizarea inimilor miocardului murin sau porcine implică șocul hipotonic, extracția proteică cu detergent și digestia nucleazică cu enzime specifice:

Ziua 1: Miocardul porcine a fost obținut din inimi de porc proaspăt sacrificați iar inimile murine din șoareci C57BL, proaspăt sacrificați. Țesuturile au fost tăiate în bucați mici de 3-7mm/3-7mm (**Figura 2**), au fost spălate de 3 ori în apă dublu distilată, și apoi incubate la 4°C peste noapte, pentru realizarea șocului hipotonic.

Handwritten signatures and initials at the bottom of the page, including 'C. Balan', 'M. M.', 'U. M.', and 'M. M.'.

Ziua 2: În ziua 2 după alte 3 spălări în apă dublu distilată (ddH₂O), bucățile din țesutul cardiac au fost incubate în soluție 0,05M NaOH pentru 2 ore. Sunt clătite și incubate pentru 15 minute de 3 ori în ddH₂O pentru eliminarea urmelor de hidroxid de sodiu. După aceste spălări au fost incubate pe un agitator, pentru 48 de ore la temperatura camerei, în soluția de decelularizare: 50mM TRIS; 0,25% SDS; 0,5% DOC; 0,5% Triton X100; 0,2% EDTA; pH 7,4.

Ziua 4: După terminarea celor 48 de ore (± 3 ore) țesuturile decelularizate rezultate (**Figura 3**) au fost spălate și incubate 5 minute, în apă dublu distilată. Spălarea se repetă de 5 ori pentru îndepărtarea soluției de decelularizare și apoi sunt incubate peste noapte în azidă de sodiu 0,02%, la temperatura camerei, pe agitator.

Ziua 5: Au fost realizate 3 clătiri în apă dublu distilată apoi au fost incubate în etanol 70% pentru 2 ore la temperatura camerei pe agitator. La sfârșitul celor 2 ore au fost spălate și incubate 15 minute, în ddH₂O de trei ori. Au fost lasate peste noapte în azidă de sodiu 0,02% pe agitator.

Ziua 6: Au fost realizate 3 incubări a câte 5-minute în 1X DTFS (TFS distilat) după care au fost incubate din nou peste noapte în azidă de sodiu 0,02% preparată în 1X DTFS

Ziua 7: S-au efectuat 3 incubări a câte 5-minute în 1X DTFS. După care bucățile de țesut matriceal rezultat au fost imersate într-o soluție enzimatică preîncălzită (37°C) de DNază/RNază și au fost incubate peste noapte la 37°C.

Ziua 8: Soluțiile de DNază/RNază au fost schimbate și incubarea s-a realizat pentru încă 24 de ore.

Ziua 9: Următoarea etapă a presupus spălarea și incubarea în 1X DTFS pentru 15-minute și o incubare în azidă de sodiu 0,02% preparată în 1X DTFS.

Ziua 10: Utilizând metode, unelte și soluții sterile, bucățile de țesut miocardic decelularizat au fost transferate în tuburi sterile de 50 mL cu PBS distilat 1X și au fost păstrate la 4°C.

Comparativ cu țesutul de miocard murin sau porcine inițial (figura 1 a și b), la sfârșitul procesului de decelularizare (după 10 zile) se obțin structuri acelulare (**Figura 3 a și b**).

Etapa 2.2- Evaluarea eficienței decelularizării

Eficiența procesului de decelularizare s-a investigat prin două metode: i) s-a efectuat extracție de ADN din țesutul decelularizat și din cel intact și s-a măsurat cantitatea de DNA obținută în ambele probe; și ii) au fost obținute secțiuni din bucăți din țesutul intact sau

decelularizat și s-a efectuat colorația cu hematoxină-eozină pentru detectarea celulelor din țesuturi.

i) Evaluarea eficienței decelularizării prin analiza ADN

ADN-ul a fost izolat din miocard proaspăt și din probe de țesut decelularizat. Purificarea a fost efectuată utilizând kitul de purificare ADN genomic Wizard (Promega) și cantitatea de ADN din probe a fost cuantificată prin citirea absorbanțelor la 260 nm pe un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). ADN-ul a fost normalizat la greutatea țesutului hidratat și exprimat ca ng / mg de țesut. Rezultatele obținute au arătat că țesutul proaspăt, nedecelularizat conține 177.5 ng /mg ADN, în timp ce țesutul decelularizat conține 0.456 ng /mg ADN, rezultate care indică o reducere de 99% a conținutului de ADN în țesutul decelularizat, comparativ cu țesutul intact, confirmând eficiența decelularizării țesutului miocardic.

ii) Evaluarea eficienței decelularizării prin coloratii cu hematoxilina-eozina

Țesutul miocardic intact sau decelularizat așa cum a fost descris mai sus, a fost mai întâi fixat în soluție 4% PFA (paraformaldehida) preparată în tampon fosfat 0.1 M, pH 7.4, timp de 24h la 4°C. A urmat crioprotecția în soluții succesive de glicerol: 5% (15 minute, temperatura camerei), 10% (1h, 4°C), 20% (peste noapte, 4°C), 50% (1h, 4°C) și stocarea în glicerol 50% la -20°C până la includerea în OCT și secționarea la criotomul Leica CM1850. În vederea sectionării, au fost parcurse următoarele etape: aducerea la 4°C a țesutului, 6 spălări a câte 15 minute în soluție 3% sucroză preparată în tampon fosfat 0.1M, includerea în OCT timp de 30 minute, la temperatura camerei și înghețarea rapidă în azot lichid. Pentru obținerea secțiunilor pe lame, blocurile înghețate au fost montate pe holder. Secțiunile în care a fost observată prezența țesuturilor, intact sau decelularizat, au fost colectate pe lame la o grosime de 5 μm, incubate timp de 30 minute la o temperatura de 37°C și păstrate în cutii speciale la -20°C, până la analiza microscopică.

Pentru confirmarea/infirmarea prezentei celulelor în secțiunile obținute de la țesut intact / țesut decelularizat secțiunile rezultate au fost colorate cu hematoxilina – eozina (H&E).

Lamele cu secțiunile obținute au fost mai întâi aduse la temperatura camerei, timp de 5-10 minute. A urmat uscarea secțiunilor la 37°C timp de 1h și fixarea în acetona rece (-20°C) timp de 5 minute. Secțiunile au fost spălate în TFS în atmosfera umedă (3 spălări/5 minute) și apoi incubate în soluție de hematoxilina timp de 30 de minute, apoi spălarea excesului cu apa de la robinet

The bottom of the page contains several handwritten signatures and initials in black ink. From left to right, there is a signature that appears to be 'Dana', followed by 'ATP', a signature that looks like 'C. Colbran', and another signature that looks like 'V. V. V.'. To the right of these, there is a signature that looks like 'M. M. M.' and another that looks like 'D. D. D.'.

(„blueing”). Pentru vizualizarea nucleilor celulari, după colorarea cu hematoxilina, lamele au fost colorate cu soluție alcoolică de 1% eozina (15 secunde) pentru evidențierea citoplasmei celulare. După colorare, lamele au fost spălate cu apă distilată, incubate în soluții crescătoare de etanol: 50% (5 minute), 70% (5 minute), 90% (30 secunde), 100% (1 minut), apoi incubate în xilen (5 minute).

Colorarea cu hematoxilină și eozină a confirmat absența nucleilor celulari după procesul de decelularizare, atât în țesutul porcine (**Figura 4 b și b'**) cât și în țesutul murin (**Figura 4 c și c'**), comparativ cu țesutul nativ unde nucleii sunt bine reprezentați (**Figura 4 a și a'**).

3) Urmează o altă serie de etape în vederea dezvoltării și caracterizării hidrogelului miocardic injectabil.

Miocardul porcine sau murin decelularizat așa cum s-a descris mai sus a fost folosit pentru obținerea hidrogelului. Hidrogelul obținut a fost caracterizat structural în ceea ce privește prezența glicozaminoglicanilor (GAG) și a proteinelor matriceale.

Etapa 3.1 Obținerea hidrogelului

Bucățile de miocard porcine sau murin decelularizate au fost înghețate și ulterior liofilizate (72h la -48 grade Celsius și 0.045 mBar), în vederea determinării conținutului masic. După determinarea masei de matrice uscată, a fost adăugată soluție acidă de 10mM HCl și pepsină porcine la concentrația finală de 160U/mg matrice. Suspensia obținută a fost transferată în condiții sterile în vas cu capac și omogenizată, folosind plita cu agitare magnetică timp de 4 zile la TC, până la dizolvarea aproape completă a pieselor de țesut. Conținutul sub formă de gel vâscos (**Figura 5**) a fost centrifugat timp de 30min, 3000g, 4°C și a fost păstrat la frigider.

Înainte de folosire, s-a efectuat neutralizarea pH-ului acid pe gheață, folosind soluție de 1M NaOH, urmată de incubarea hidrogelului timp de 90 min în incubator. Hidrogelul astfel obținut - **MIGEL** - a fost mai întâi caracterizat apoi folosit la studii de bio-compatibilitate cu celule fibroblast-like.

Etapa 3.2 Evaluarea prezenței glicozaminoglicanilor în hidrogelul MIGEL

Pentru a verifica dacă în urma procesului de decelularizare și a digestiei enzimatice a țesutului miocardic, GAG sunt încă prezente în hidrogelul dezvoltat, s-a cuantificat nivelul de

106

GAG prin metoda ELISA. S-a obținut o concentrație de 20.15ng/ml GAG (**Figura 6**) in hidrogelul MIGEL, rezultat care evidentiază menținerea acestor componente in hidrogelul dezvoltat, în urma procesului de decelularizare. Aceste rezultate au fost confirmate și prin coloratii cu Alcian blue pe secțiuni obținute din țesutul nativ sau decelularizat. Astfel, se observă o colorație relativ similară (**Figura 7**) a glicozamino-glicanilor în secțiunile cu sau fără celule.

Etapa 3.3 Identificarea proteinelor matriceale din MIGEL

Pentru a caracteriza hidrogelul MIGEL din punct de vedere al compoziției proteinelor extracelulare, hidrogelul a fost denaturat și încărcat pe gel poliacrilamidă de concentrație 8% și a fost efectuată electroforeza. După liza hidrogelului în tampon Lamelli, omogenatul obținut a fost supus determinării proteice prin metoda Bradford. Probele conținând 30-40 μg proteină au fost separate pe geluri de 10% SDS-PAGE și apoi transferate pe membrane de nitroceluloză. Pentru o bună evaluare a prezentei proteinelor matriceale, au fost încărcate 2 concentrații diferite de lizat de hidrogel, 3.125ug/ml (lane 1) și 6.25ug/ml (lane 2, Fig 7). Pentru collagen 1 și fibronectina, pe lane-ul 3 a fost încărcată proteina respectivă, recombinată comercială. Membranele au fost incubate peste noapte la 4°C cu anticorpi primari monoclonali pentru fibronectina, collagen I și IV, elastină, laminină și actină (pentru normalizare) urmat de al doilea anticorp conjugat cu HRP, timp de o ora. Semnalul a fost vizualizat folosind un substrat chemiluminiscent de la Pierce și Analizorul de Imagine LAS 4000 (Fujifilm) și analizat cu ajutorul softwear-ului - Image reader LAS 4000.

Rezultatele arata ca MIGEL conține proteinele matriceale investigate: collagen I și IV, elastina, fibronectina și laminina (**Figura 8**), proteine existente in tesutul nativ cardiac.

4) Studiul biocompatibilității hidrogelului dezvoltat- MIGEL, cu celule cardiace.

Etapa 4.1 Viabilitatea celulelor cardiace cu MIGEL

Pentru exemplificare, s-au utilizat fibroblasti umani și cardiomiocite murine din linia HL-1 în care s-a urmărit viabilitatea acestor celule pe MIGEL. Hidrogelul obținut așa cum a fost descris mai sus, a fost transferat în tub cu NaOH. După neutralizarea pH-ului, hidrogelul a fost omogenizat cu pipeta și incubat timp de 15min pe gheață. Ulterior s-a tamponat amestecul cu soluția de 10x TFS până la 1x, și s-a omogenizat. A urmat o centrifugare la 1000g timp de 15min la 4°C (pentru

Handwritten signatures and initials at the bottom of the page, including names like 'Coban', 'Gheorghe', 'ATM', 'LX', 'Vener', 'M', and 'Skulala'.

degazare). După centrifugare hidrogelul a fost turnat în formă la volumul dorit, de preferat în vas cu aderență scăzută pentru ușurarea manevrelor ulterioare. Constructul 3D fabricat din MIGEL a fost incubat la 37°C în incubatorul pentru culturi celulare timp de 2h. După incubare, peste constructul 3D obținut au fost cultivate celule cardiace fibroblaste sau cardiomiocite și s-a adăugat mediu de cultură DMEM complet.

Evaluarea viabilității celulelor crescute pe MIGEL s-a făcut prin teste "live/dead" (**Figura 9**) folosind iodura de propidiu (PI) - 1mg/ml și soluție Hoechst 33342 - 10mg/ml (2μg/ml și 5μg/ml concentrație finală). S-a preparat soluția de colorare cu PI/Hoechst în mediu fără ser și fără roșu fenol, a fost substituit mediu, iar probele au fost incubate în incubator pentru 20 min. Imaginile au fost făcute la microscopul de fluorescență IX81 Olympus folosind cubul de filtre de ex/em 360/420 (pentru UV -nuclei) și 565/610 (faloidină - roșu). Cuantificarea celulelor moarte în mai multe câmpuri vizuale de pe mai multe probe arată o viabilitate de aproximativ 98% a celulelor crescute pe MIGEL (**Figura 9**), evidențiind astfel o compatibilitate foarte bună a hidrogelului cu celulele umane.

Etapa 4.2 Morfologia celulelor cardiace cultivate pe MIGEL

Pentru exemplificare, s-au utilizat fibroblaste umane cultivate la suprafața hidrogelului, care au fost colorate cu faloidină (pentru vizualizarea filamentelor de actină ale celulelor cultivate) și hoechst (pentru evidențierea nucleilor celulari), urmată de vizualizarea la microscopul de fluorescență .

Protocol colorare: celulele crescute pe hidrogel au fost incubate cu Hoechst 5μ/ml timp de 15min, apoi spălate în TFS de 2 ori, fixate în 4% PFA timp de 7min 37°C, și în final spălate de 3 ori cu TFS. A urmat incubarea cu faloidină (1:100x cu 0.3% TritonX-100 în TFS timp de 45min, la 37°C) și 3 spalari în TFS, la întuneric. Celulele marcate fluorescent au fost urmărite la microscop, unde s-a observat că la numai 24h după cultivare, celulele au aderat, au proliferat, au adoptat fenotipul specific fibroblastelor și s-au interconectat (**Figura 10**).

5) Funcționalizarea hidrogelului obținut cu un agent antiinflamator.

Pentru exemplificare s-au utilizat: hidrogelul MIGEL obținut așa cum s-a descris mai sus și ABR25757 - un inhibitor specific de alarmina S100A9. Pentru funcționalizare, inhibitorul

104

ABR25757 s-a dizolvat în prealabil în DMSO (3.5mg/ml, echivalent 10 mM) și s-a adăugat ulterior la soluția de hidrogel – MIGEL, într-o concentrație finală de 100μM. Astfel, formarea rețelei de hidrogel și încapsularea medicamentului au fost realizate simultan, inhibitorul fiind încapsulat uniform în hidrogel. Hidrogelul astfel funcționalizat a fost mai întâi testat pentru biocompatibilitatea cu fibroblastele umane și apoi a fost folosit pentru realizarea studiului de eliberare și pentru evaluarea efectelor asupra transmigrării leucocitelor.

i) *Evaluarea citotoxicității hidrogelului funcționalizat*

Funcționalizarea hidrogelului cu inhibitorul ABR25757 nu a avut efect citotoxic asupra fibroblastelor murine, dimpotrivă nivelul de toxicitate a fost mai mic decât cel al celulelor control, cultivate în condiții bidimensionale (2D) (**Figura 11**).

ii) *Studiu asupra eliberării compusului încapsulat în hidrogelul MIGEL.*

Caracterizarea stabilității gelului și cinetica de eliberare a compusului încapsulat ABR-25757, au fost realizate prin incubarea hidrogelului funcționalizat cu mediu de cultură pentru diferite perioade de timp, la 37°C în TFS. Eliberarea compusului încapsulat a fost evaluată la 2h, 4h și 24h de la incubare. Cuantificarea compusului eliberat s-a efectuat în mediul de incubare colectat la diferite intervale de timp, prin măsuratori spectrofotometrice, cu ajutorul spectrofotometrului TECAN în domeniul UV-VIS (312nm), utilizând o curbă etalon a compusului în tampon fosfat salin (**Figura 12**). Inhibitorul încapsulat are o cinetica de eliberare relativ rapidă, cu un procent de eliberare de 91% după 24h (**Figura 12**), sugerând o rețea poroasă destul de laxă/permisivă a hidrogelului dezvoltat.

6) Evaluarea efectului antiinflamator al hidrogelului funcționalizat

Pentru exemplificare, s-au utilizat hidrogelul MIGEL funcționalizat cu ABR25757, obținut așa cum s-a descris mai sus și celule inflamatoare circulante, neutrofile și monocite. Efectul antiinflamator al hidrogelului funcționalizat, a fost investigată prin cuantificarea transmigrării leucocitelor atât prin camere duble de chemotaxie (i), cât și cu sistemul xCELLigence (ii), unde neutrofilele /monocitele au transmigrat prin MIGEL sau MIGEL funcționalizat cu ABR.

i) *Transmigrarea leucocitelor prin camere duble boyden*

Handwritten signatures and initials at the bottom of the page, including 'Colbu', 'Vauu.', 'M', and 'Alibala'.

Transmigrația monocitelor și neutrofilelor către diferiți chemoatractanți, în prezența sau absența hidrogelului dezvoltat - MIGEL s-a efectuat folosind camerele Boyden de chemotaxie (i), în care monocitele/neutrofilele au fost adăugate în compartimentul de sus al camerei duble, chemoatractantul în compartimentul de jos, iar hidrogelul pe membrana din policarbonat cu pori de $8\mu\text{m}$ ai camerei duble. Monocitele/neutrofilele colorate fluorescent au fost adăugate în concentrație de $500\,000/\text{ml}$, iar după 2h de incubare la 37°C , numărul de monocite transigrate în compartimentul de jos a fost cuantificat la microscopul de fluorescență, în mai multe câmpuri. S-a obținut că S100A9 are efect chemoatractant asupra leucocitelor și că în prezența hidrogelului aceste celule prezintă o transmigrare diminuată. Astfel, în cazul monocitelor, s-a observat că acestea transmigrează în număr foarte mare către S100A9, comparativ cu chemoatractantul clasic N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) (**Figura 13**). De asemenea, în prezența hidrogelului, numărul de monocite care transmigrează în compartimentul de jos al camerei duble este diminuat (**Figura 13**).

i) *Chemotaxia leucocitelor prin sistemul xCELLigence*

Transmigrația în timp real a leucocitelor (monocite și neutrofile) a fost monitorizată folosind CIM-plate-16 și sistemul xCELLigence RTCA DP (Roche). S-au folosit plăci cu 16 godeuri, compuse dintr-o cameră superioară (UC) și o cameră inferioară (LC). UC constă dintr-o membrană microporoasă de polietilen tereftalat-PET care permite translocarea celulelor din partea superioară în partea inferioară. Migrarea celulelor a fost monitorizată de senzori cu microelectrozi de aur interdigitați care generează un semnal de impedanță prin contactul cu celulele migrate care traversează membrana. În LC s-a adăugat S100A9 ($5-10\ \mu\text{g}/\text{ml}$) care să servească drept chemoatractant pentru monocite și neutrofile. Neutrofilele sau monocitele (4×10^5) au fost adăugate în UC al plăcii CIM-16 în mediu RPMI fără ser. Migrarea celulelor a fost monitorizată timp de până la 20 de ore.

Atunci când transmigrarea monocitelor a fost evaluată cu xCELLigence, s-a observat că prezența hidrogelului funcționalizat are ca efect reducerea numărului de monocite care transmigrează prin hidrogel (**Figura 14**), deci reducerea inflamației.

Prezentarea pe scurt a figurilor:

Figura 1. Schematizare infarct miocardic. Infarctul miocardic apare atunci când un vas major care furnizează sânge către inimă (numit arteră coronară) este blocat, ceea ce duce la privarea de oxigen a unei părți din țesutul inimii. Lipsa de oxigen a țesutului inimii cauzează deteriorarea sau moartea zonei afectate. Blocarea vasului de sange este un proces de durată în care factorii inflamatori și lipidele din organism se lipesc de pereții arterelor formând ceea ce se numește o placă ateromatoasă. Când o bucată din această placă este ruptă, se formează un cheag (numit tromb) care blochează vasul de sange.

Figura 2. Inimi murine (a) și miocard porcine obținut din inimi de porc (b), inițiale, nedecelularizate.

Figura 3. Inimi murine (a) și miocard porcine (b) decelularizate; (c) inimi murine în pași intermediari de decelularizare.

Figura 4. Figura 3. Colorație cu hematoxilina eozină a secțiunilor obținute din a) țesut nativ porcine, b) țesut decelularizat porcine și c) țesut decelularizat murin (5x, 20x).

Figura 5. Higrogel – MIGEL obținut din miocard porcine decelularizat, liofilizat și rehidratat

Figura 6. Curba logaritmică de etalonare a concentrației de GAG; concentrația de GAG determinată în hidrogelul MIGEL.

Figura 7. Colorație Alcian blue pe secțiuni obținute din a) țesut nativ porcine, b) țesut decelularizat porcine și c) țesut decelularizat murin (5x).

Figura 8. Compoziția biochimică a hidrogelului derivat din miocard porcine investigată prin SDS-PAGE – Western Blot, folosind anticorpi specifici proteinelor matriceale: colagen I, colagen IV, elastină, fibronectină și laminină.

Figura 9. Imagine reprezentativă compozită folosind obiectiv 10x în contrast de fază (gri), fluorescență Hoechst (cian) și PI (rosu) a fibroblastelor la 24h după cultivarea la suprafața gelului în concentrație de 3×10^4 celule/cm² (stanga). Cuantificarea celulelor moarte pe mai multe câmpuri vizuale (dreapta).

Figura 10. Imagine reprezentativă pentru morfologia celulelor crescute în MIGEL folosind obiectiv 10x și 20x, în contrast de fază (gri) sau fluorescență Hoechst (cian) și Phalloidin (roșu). Celule la densitate de 3×10^4 /cm² au fost cultivate timp de 18h pe suprafața gelului.

Figura 11. Cuantificarea citotoxicității induse de inhibitorul ABR25757 asupra fibroblastelor umane, evaluată utilizând testul Toxi-Light.

Figura 12. Curba etalon de absorbantă (stânga) a inhibitorului de A100A9 - ABR-25757, la diferite concentrații. Graficul din dreapta reprezintă eliberarea în timp (2h, 4h, 24h) a compusului încapsulat calculată atât ca procent din concentrația maximă (verde) dar și concentrația eliberată exprimată în μM (albastru).

Figura 13. Transmigrarea monocitelor prin camere duble către fMLP sau S100A9.

Figura 14. Transmigrarea monocitelor măsurată cu sistemul xCelligence prin hidrogelul nativ (roșu) sau prin hidrogelul funcționalizat cu ABR (verde).

The bottom of the page contains several handwritten signatures and initials in black ink. On the left, there is a signature that appears to be 'C. M. C.' followed by 'M. H.'. In the center, there is a signature that looks like 'C. M. C.' and another that is more stylized. On the right, there is a signature that starts with 'V. M.' and another that is more complex and illegible.

Bibliografie

Anderson J.M., A. Rodriguez, D.T. Chang, Foreign body reaction to biomaterials, *Semin. Immunol.* 20 (2008) 86–100.

Anker S.D., A.J. Coats, G. Cristian, D. Dragomir, E. Pusineri, M. Piredda, L. Bettari, R. Dowling, M. Volterrani, B.A. Kirwan, G. Filippatos, J.L. Mas, N. Danchin, S.D. Solomon, R.J. Lee, F. Ahmann, A. Hinson, H.N. Sabbah, D. L. Mann, A prospective comparison of alginate-hydrogel with standard medical therapy to determine impact on functional capacity and clinical outcomes in patients with advanced heart failure (AUGMENT-HF trial), *Eur. Heart J.* 36 (2015) 2297–2309.

Anugrah D.S.B., K. Ramesh, M. Kim, K. Hyun, K.T. Lim, Near-infrared lightresponsive alginate hydrogels based on diselenide-containing cross-linkage for on demand degradation and drug release, *Carbohydr. Polym.* 223 (2019) 115070.

Badylak, S. F., Weiss, D. J., Caplan, A. & Macchiarini, P. Engineered whole organs and complex tissues. *Lancet* 379, 943–952 (2012).

Bhattarai N., J. Gunn, M. Zhang, Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 83–99

Bloise N., I. Rountree, C. Polucha, G. Montagna, L. Visai, K.L.K. Coulombe, F. Munarin, Engineering immunomodulatory biomaterials for regenerating the infarcted myocardium, *Fron. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020) 292.

Buckley L.F., A. Abbate, Interleukin-1 blockade in cardiovascular diseases: a clinical update, *Eur. Heart J.* 39 (2018) 2063–2069.

Copland I.B., E.M. Jolicœur, M.A. Gillis, J. Cuerquis, N. Eliopoulos, B. Annabi, A. Calderone, J.F. Tanguay, A. Ducharme, J. Galipeau. Coupling erythropoietin secretion to mesenchymal stromal cells enhances their regenerative properties, *Cardiovasc. Res.* 79 (2008) 405–415.

Dimatteo R., N.J. Darling, T. Segura, In situ forming injectable hydrogels for drug delivery and wound repair, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 127 (2018) 167–184.

Frangogiannis N.G., Cell biological mechanisms in regulation of the postinfarction inflammatory response, *Curr. Opin. Physiol.* 1 (2018) 7–13.

Frey N., A. Linke, T. Süsselbeck, J. Müller-Ehmsen, P. Vermeersch, D. Schoors, M. Rosenberg, F. Bea, S. Tuvia, J. Leor, Intracoronary delivery of injectable bioabsorbable scaffold (IK-5001) to treat left ventricular remodeling after ST-elevation myocardial infarction: a first-in-man study, *Circulation. Cardiovascular Interv.* 7 (2014) 806–812.

Godier-Furnémont AF, Martens TP, Koeckert MS, Wan L, Parks J, Arai K, Zhang G, Hudson B, Homma S, Vunjak-Novakovic G. Composite scaffold provides a cell delivery platform for cardiovascular

Handwritten signatures and initials at the bottom of the page, including 'Coulbe', 'Gue', 'H', 'Vun', and 'Stubelle'.

repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 10;108(19):7974-9. doi: 10.1073/pnas.1104619108. Epub 2011 Apr 20.

Gradinaru V., J. Treweek, K. Overton, K. Deisseroth, Hydrogel-tissue chemistry: principles and applications, *Annu. Rev. Biophys.* 47 (2018) 355–376.

Hashimoto, H., Olson, E. N., & Bassel-Duby, R. (2018). Therapeutic approaches for cardiac regeneration and repair. *Nature Reviews Cardiology*, 15(10), 585–600.

Huang, K. et al. An off-the-shelf artificial cardiac patch improves cardiac repair after MI in rats and pigs. *Sci. Transl. Med.* 12, eaat9683 (2020).

Lee R.J., A. Hinson, R. Bauernschmitt, K. Matschke, Q. Fang, D.L. Mann, Dowling R., N. Schiller, H.N. Sabbah, The feasibility and safety of Algisyl-LVR™ as a method of left ventricular augmentation in patients with dilated cardiomyopathy: initial first in man clinical results, *Int. J. Cardiol.* 199 (2015) 18–24.

Lee R.J., A. Hinson, S. Helgerson, R. Bauernschmitt, H.N. Sabbah, Polymer-based restoration of left ventricular mechanics, *Cell Transplant.* 22 (2013) 529–533.

Lewis A. Reis, Loraine L. Y. Chiu, Nicole Feric, Lara Fu, Milica Radisic. Biomaterials in myocardial tissue engineering *J Tissue Eng Regen Med. J Tissue Eng Regen Med.* 2016 Jan; 10(1): 11–28.

Mahmari J.J., H.A. Dakik, N.G. Filipchuk, L.J. Shaw, S.S. Iskander, T.D. Ruddy, F. Keng, M.J. Henzlova, A. Allam, L.A. Moye, C.M. Pratt, An initial strategy of intensive medical therapy is comparable to that of coronary revascularization for suppression of scintigraphic ischemia in high-risk but stable survivors of acute myocardial infarction, *J. Am. Coll. Cardiol.* 48 (2006) 2458–2467.

Nakamura K. a, S. Yokohama, M. Yoneda, S. Okamoto, Y. Tamaki, T. Ito, M. Okada, K. Aso, I. Makino, High, but not low, molecular weight hyaluronan prevents Tcell-mediated liver injury by reducing proinflammatory cytokines in mice, *J. Gastroenterol.* 39 (2004) 346–354.

Oliva N., J. Conde, K. Wang, N. Artzi, Designing hydrogels for on-demand therapy, *Acc. Chem. Res.* 50 (2017) 669–679.

Pakulska, M. M., Miersch, S., & Shoichet, M. S. (2016). Designer protein delivery: From natural to engineered affinity-controlled release systems. *Science*, 351(6279), aac4750–aac4750.

Park, S. J. et al. Dual stem cell therapy synergistically improves cardiac function and vascular regeneration following MI. *Nat. Commun.* 10, 3123 (2019).

Pawan KC, Yi Hong, Ge Zhang. Cardiac tissue-derived extracellular matrix scaffolds for myocardial repair: advantages and challenges. *Regenerative Biomaterials*, Volume 6, Issue 4, 2019, Pages 185–199.

Prabhu, S. D., & Frangogiannis, N. G. (2016). The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction. *Circulation Research*, 119(1), 91–112.

The bottom of the page contains several handwritten signatures and initials. On the left, there is a signature that appears to be 'Gina' followed by 'UTR' and another signature. In the center, there is a signature that looks like 'C. H.' and another signature. On the right, there is a signature that looks like 'V. M.' and another signature.

Qian C., T. Zhang, J. Gravesande, C. Baysah, X. Song, J. Xing, Injectable and selfhealing polysaccharide-based hydrogel for pH-responsive drug release, *Int. J. Biol. Macromol.* 123 (2019) 140–148.

Reis L.A., L.L. Chiu, N. Feric, L. Fu, M. Radisic, Biomaterials in myocardial tissue engineering, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 10 (2016) 11–28.

Roth, G. A., Abate, D., Abate, K. H., Abay, S. M., Abbafati, C., Abbasi, N., Abastabar, H., Abd-Allah, F., Abdela, J., Abdelalim, A., Abdollahpour, I., Abdulkader, R. S., Abebe, H. T., Abebe, M., Abebe, Z., Abejie, A. N., Abera, S. F., Abil, O. Z., Abraha, H. N., ... Murray, C. J. L. (2018). Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 392(10159), 1736–1788.

Rufaihah A.J., D. Seliktar, Hydrogels for therapeutic cardiovascular angiogenesis, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 96 (2016) 31–39.

Salani, M., Roy, S., & Fissell, W. H. (2018). Innovations in Wearable and Implantable Artificial Kidneys. 98 *American Journal of Kidney Diseases*, 72(5), 745–751.

Saleh, M., & Ambrose, J. A. (2018). Understanding myocardial infarction. *F1000Research*, 7(0), 1378.

Sheikh Z., P.J. Brooks, O. Barzilay, N. Fine, M. Glogauer, Macrophages, foreign body giant cells and their response to implantable biomaterials, *Mater. (Basel, Switzerland)* 8 (2015) 5671–5701.

Straue B.E. r, G. Steinhoff, 10 years of intracoronary and intramyocardial bone marrow stem cell therapy of the heart: from the methodological origin to clinical practice, *J. Am. Coll. Cardiol.* 58 (2011) 1095–1104.

Swirski F.K., M. Nahrendorf, Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease, *Nat. Rev. Immunol.* 18 (2018) 733–744.

Tiburcy, M., Hudson, J. E., Balfanz, P., Schlick, S., Meyer, T., Chang Liao, M.-L., Levent, E., Raad, F., Zeidler, S., Wingender, E., Riegler, J., Wang, M., Gold, J. D., Kehat, I., Wettwer, E., Ravens, U., Dierickx, P., van Laake, L. W., Goumans, M. J., Zimmermann, W.-H. (2017). Defined Engineered Human Myocardium With Advanced Maturation for Applications in Heart Failure Modeling and Repair. *Circulation*, 135(19), 1832–1847.

Traverse JH, Henry TD, Dib N, Patel AN, Pepine C, Schaer GL, DeQuach JA, Kinsey AM, Chamberlin P, Christman KL. First-in-Man Study of a Cardiac Extracellular Matrix Hydrogel in Early and Late Myocardial Infarction Patients. *JACC Basic Transl Sci.* 2019 Sep 11;4(6):659-669.

Turner, D., Rieger, A. C., Balkan, W., & Hare, J. M. (2020). Clinical-based Cell Therapies for Heart Disease—Current and Future State. *Rambam Maimonides Medical Journal*, 11(2), e0015.

The bottom of the page contains several handwritten signatures and initials. On the left, there is a signature that appears to be 'Goumans'. In the center, there are initials 'CTH' and another signature. On the right, there is a signature that looks like 'Vouu.' and another signature that looks like 'Muller'.

07

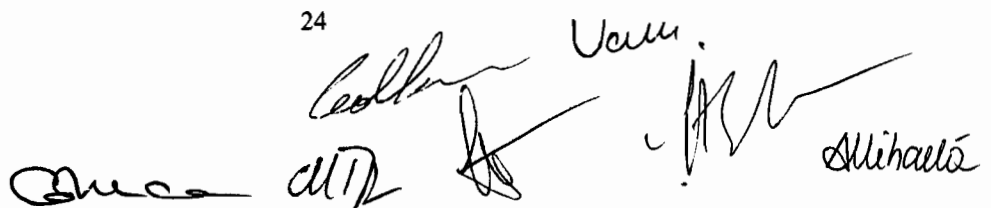
Wall, S. T., Walker, J. C., Healy, K. E., Ratcliffe, M. B. & Guccione, J. M. Theoretical impact of the injection of material into the myocardium. *Circulation* 114, 2627–2635 (2006).

Wang, L. L. et al. Sustained miRNA delivery from an injectable hydrogel promotes cardiomyocyte proliferation and functional regeneration after ischaemic injury. *Nat. Biomed. Eng.* 1, 983–992 (2017).

Wollert, K. C. & Drexler, H. Cell therapy for the treatment of coronary heart disease: a critical appraisal. *Nat. Rev. Cardiol.* 7, 204–215 (2010).

Wu, T., Liu, W. Functional hydrogels for the treatment of myocardial infarction. *NPG Asia Mater* 14, 9 (2022).

Zhu, Y., Matsumura, Y. & Wagner, W. R. Ventricular wall biomaterial injection therapy after MI: advances in material design, mechanistic insight and early clinical experiences. *Biomaterials* 129, 37–53 (2017).

Handwritten signatures and initials at the bottom of the page. From left to right: a signature that appears to be 'Garcia', the initials 'ATP', a signature that appears to be 'Cedillo', the word 'Ucru.', a signature that appears to be 'J.M.', and the name 'Alhailó'.

Revendicări

1. Hidrogel din țesut cardiac murin sau porcine caracterizat de o compoziție asemănătoare cu cea a țesutului cardiac nativ, conținând principalele molecule de matrice extracelulară: colagen I, collagen IV, elastina, fibronectină, laminină și glicozaminoglicani (GAGs);
2. Hidrogelul din țesut cardiac conform revendicării 1 este compatibil cu celulele cardiace umane și murine, atât fibroblastele umane cardiace cât și cardiomiocitele murine prezentând morfologie specifică și o viabilitate de peste 95% atunci când sunt cultivate pe hidrogelul dezvoltat;
3. Hidrogelul din țesut cardiac conform revendicărilor 1 și 2 este caracterizat de o capacitate chemoatractantă redusă, numărul de neutrofile și monocite transmigrate fiind redus semnificativ ca răspuns la diferiți chemoatractanți, în prezența hidrogelului;
4. Hidrogelul din țesut cardiac conform revendicărilor 1 – 3 este caracterizat de posibilitatea de a fi funcționalizat cu inhibitorul alarminei S100A9 sau alți agenți anti-inflamatori pentru terapia infarctului miocardic.
5. Hidrogelul din țesut cardiac conform revendicărilor 1 – 4, funcționalizat cu inhibitorul de S100A9 este caracterizat de capacitatea de a fi utilizat în blocarea procesului inflamator, reducând semnificativ transmigrarea monocitelor către alarma S100A9.
6. Hidrogelul din țesut cardiac conform revendicărilor 1 – 5, folosit pentru utilizare rezoluției inflamației post infarct miocardic.



Handwritten signatures and initials at the bottom of the page, including names like 'Cecilia', 'M. I.', and 'Alina'.

95

Figuri:

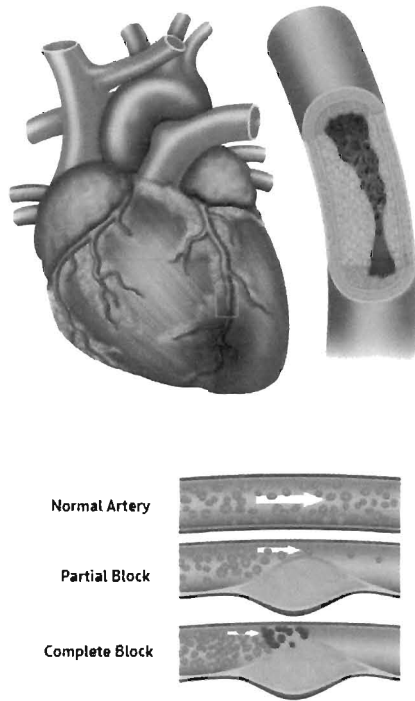
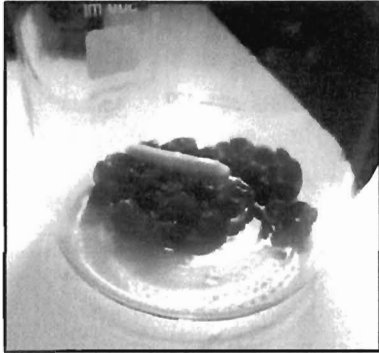


Figura 1.

Redbru
cltB *Voicu* *Alina* *Conica*

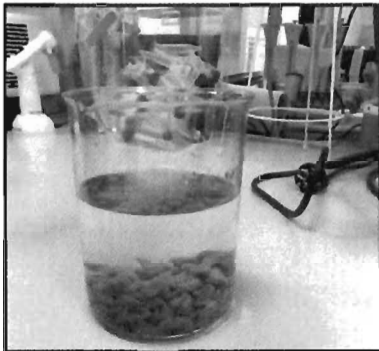
94

a)



- miocard soarece tratat cu
50mM hidrox. de sodiu

b)



- miocard porcine dupa shok
osmotic cu apa dd

Figura 2.

UTB
Cedric
H
Vocan.

Alluata
Shuca
H. H.

93

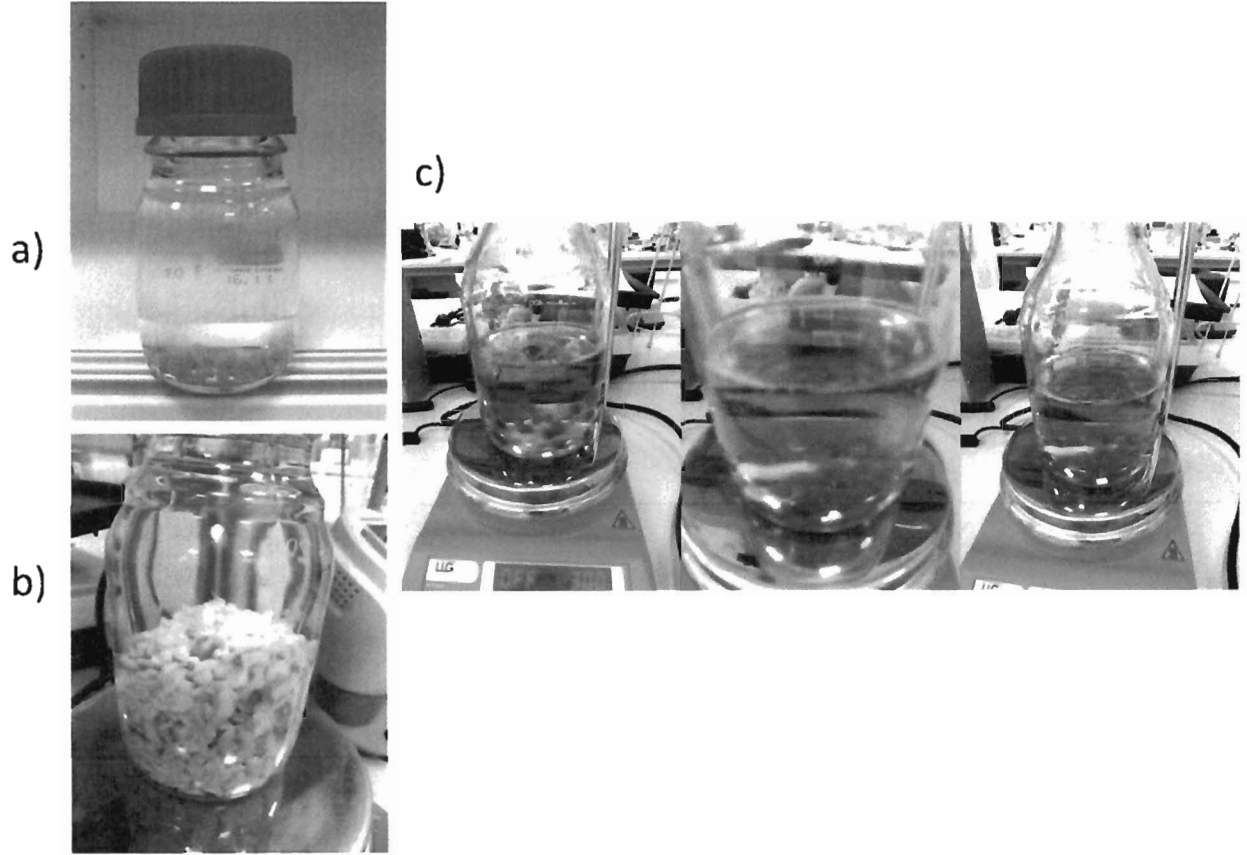


Figura 3.

WZ
Vee.
Colbr
Altole
Quica
Mle

92

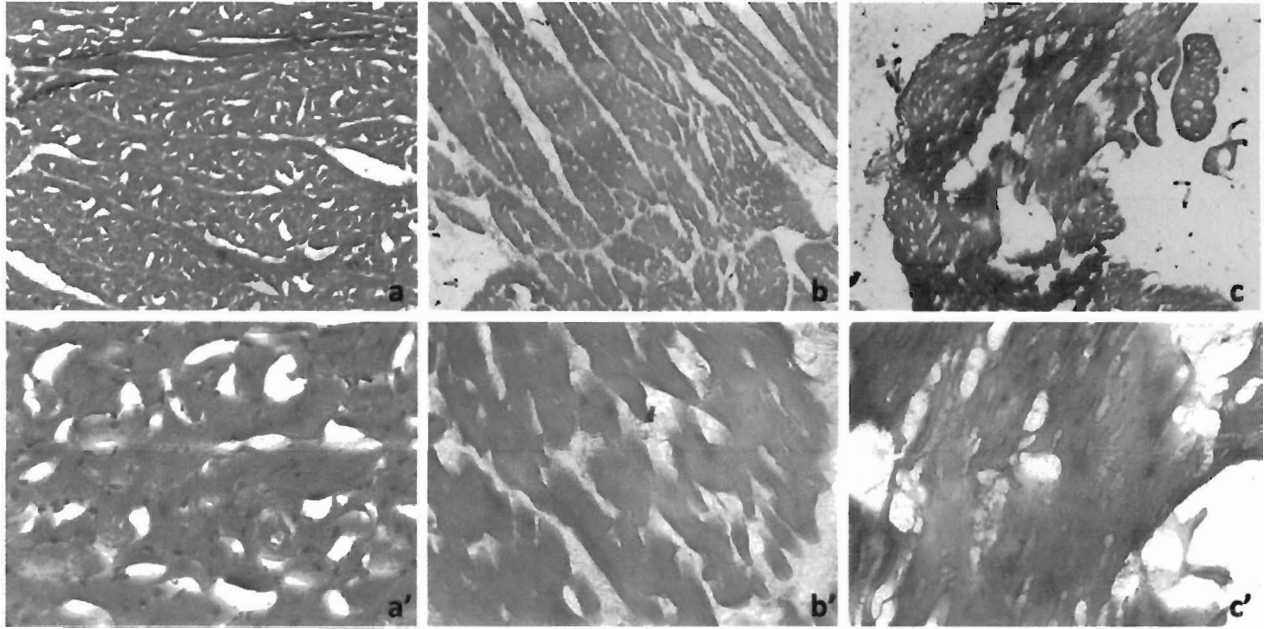


Figura 4.

WZ
A. Collier
Muscle. Embryo
V. -
WZ

91

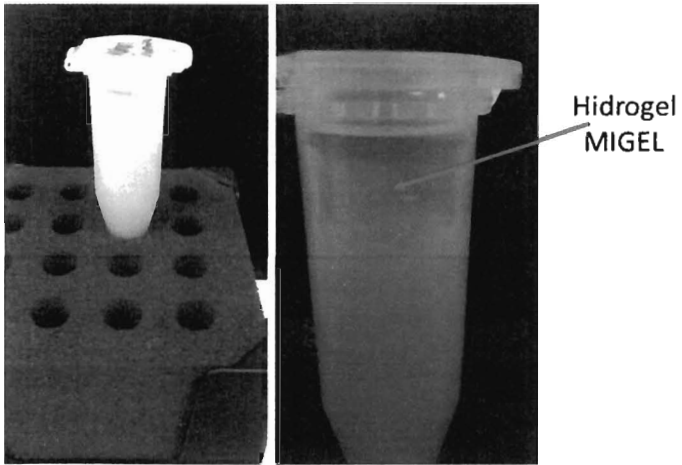


Figura 5.

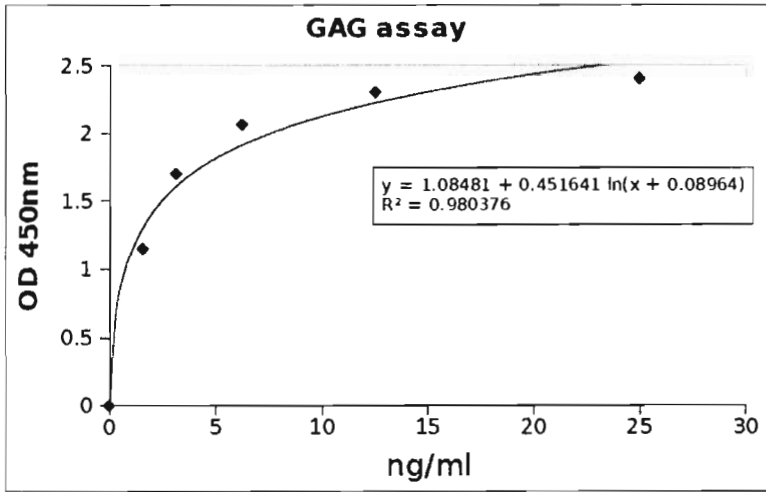
clp

St

Adrian
Mileta
Vann.

Guca
JG

90



Abs	Conc (ng/ml)
0.1778	50
0.1935	25
0.2887	12.5
0.5274	6.25
0.8955	3.125
1.4443	1.5625
2.516	0 balank
1.2101	2.015 MIGEL (1:10 dil)

concentratie finala GAG MIGEL: 20.15ng/ml

Figura 6.

CTP to Collier
 Alucide
 Vee
 Bruce
 [Signature]

89

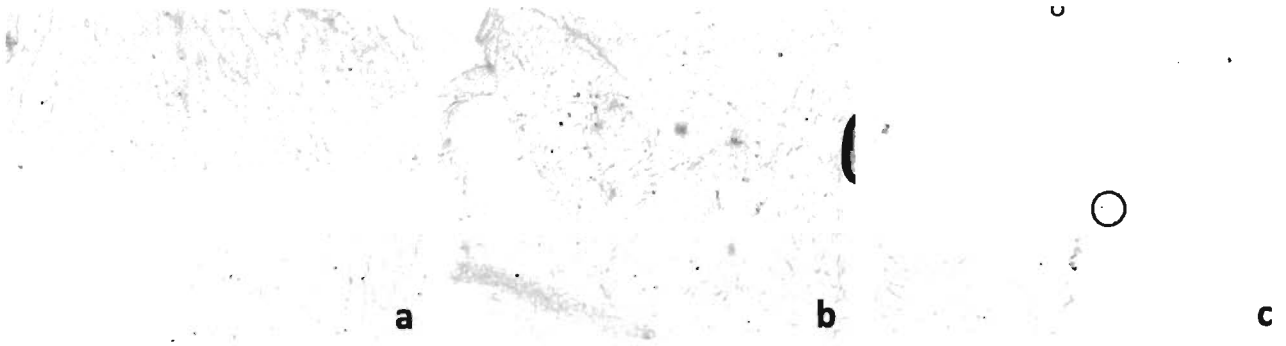


Figura 7.

Handwritten signature

Handwritten signature

Handwritten text: "Albuquerque" and "Vener."

Handwritten signature

88

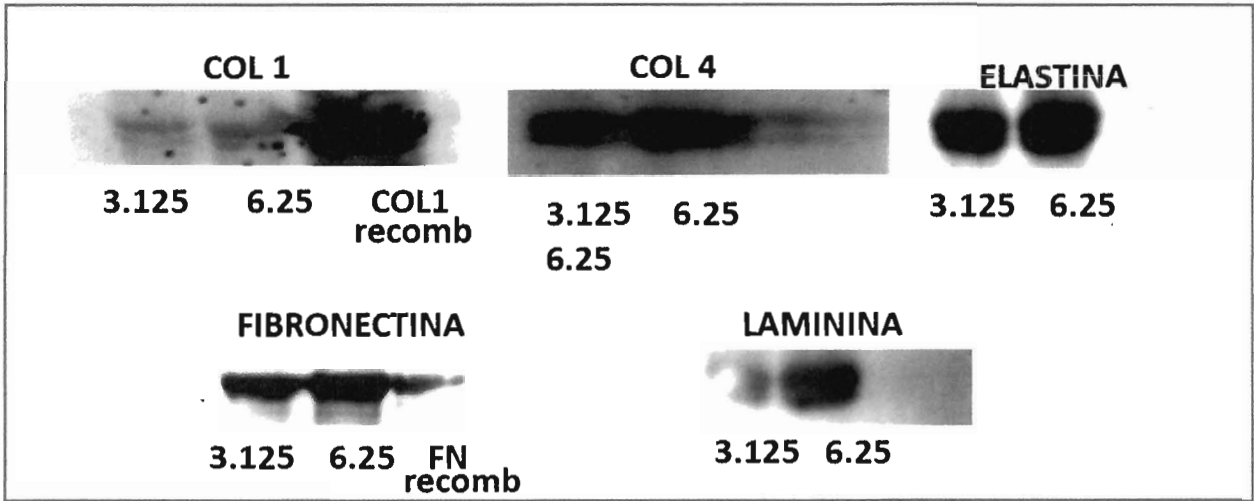


Figura 8.

Handwritten notes and signatures:
 clp
 At
 Vace.
 Colton
 Aluata
 Guca
 Mde

87

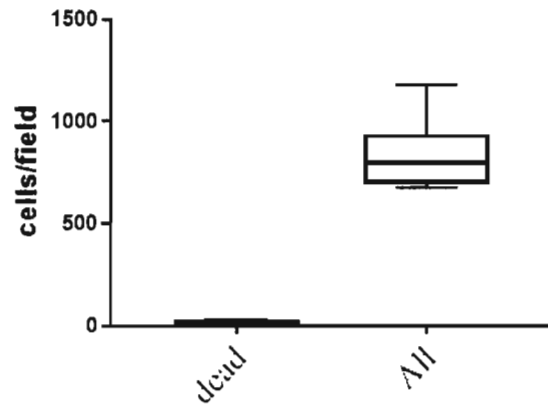
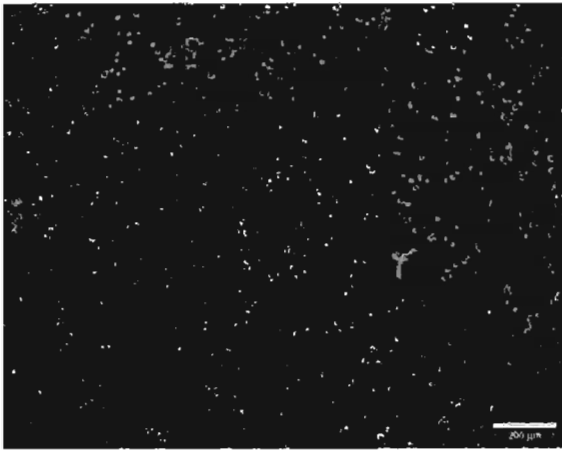


Figura 9.

clp2 *At* *Costa*
Alonso *Quica*
Wall,

86

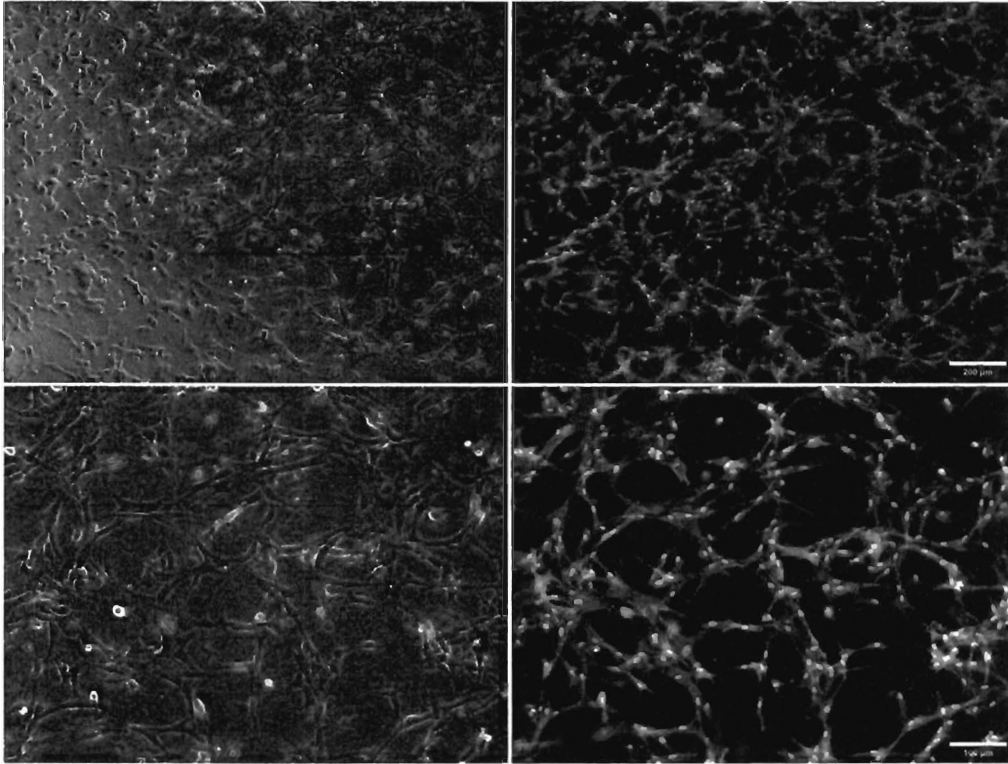


Figura 10.

cell
to
Mucosa
Vall, *[Signature]*

85

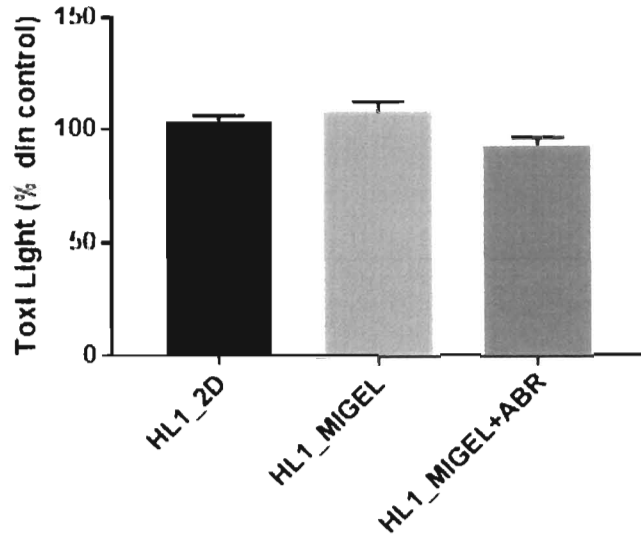


Figura 11.

ADP

St

Calder

Alucida

Shree

Van.

Alu

84

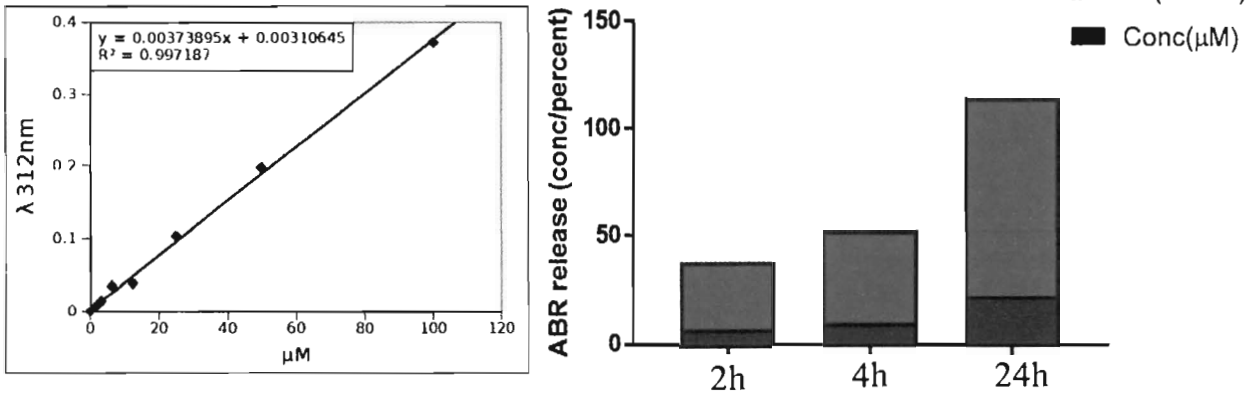


Figura 12.

clt/p

Dr. Calhoun
 Maria Guisca
 Nam. [Signature]

83.

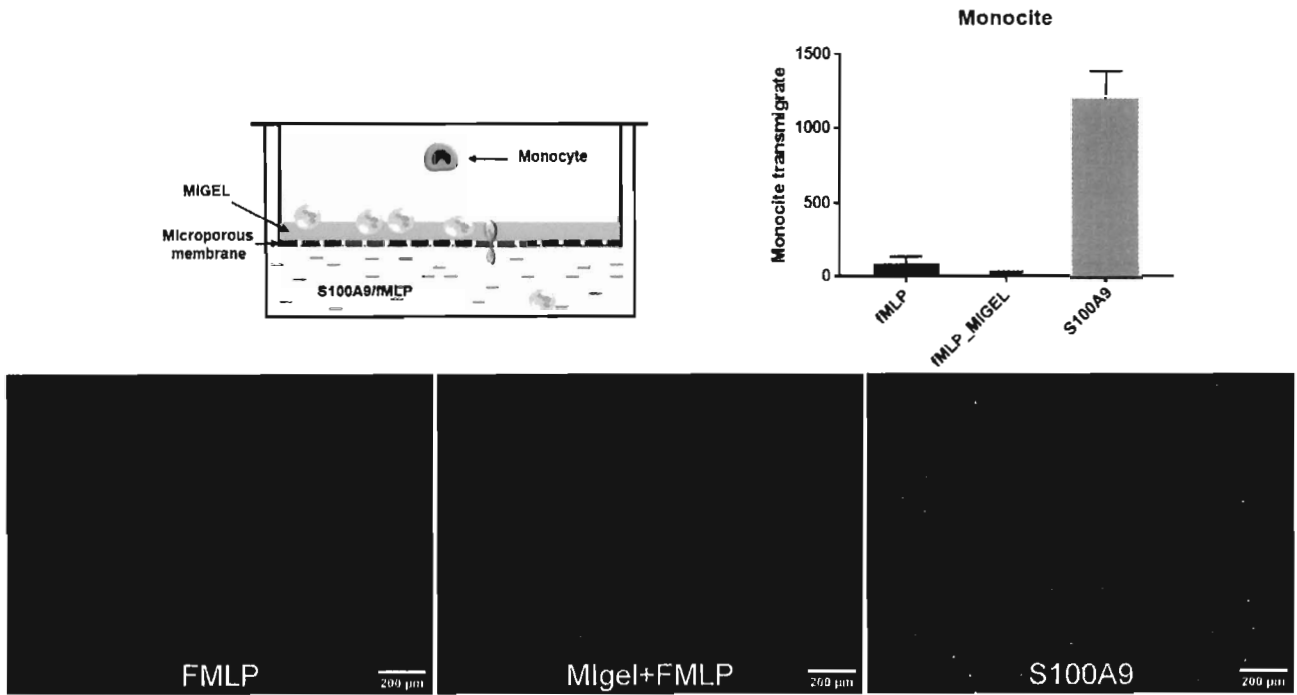


Figura 13.

Handwritten notes and signatures:
CMB
At
Ludlow
Munich
Vance
Shue
[Signature]

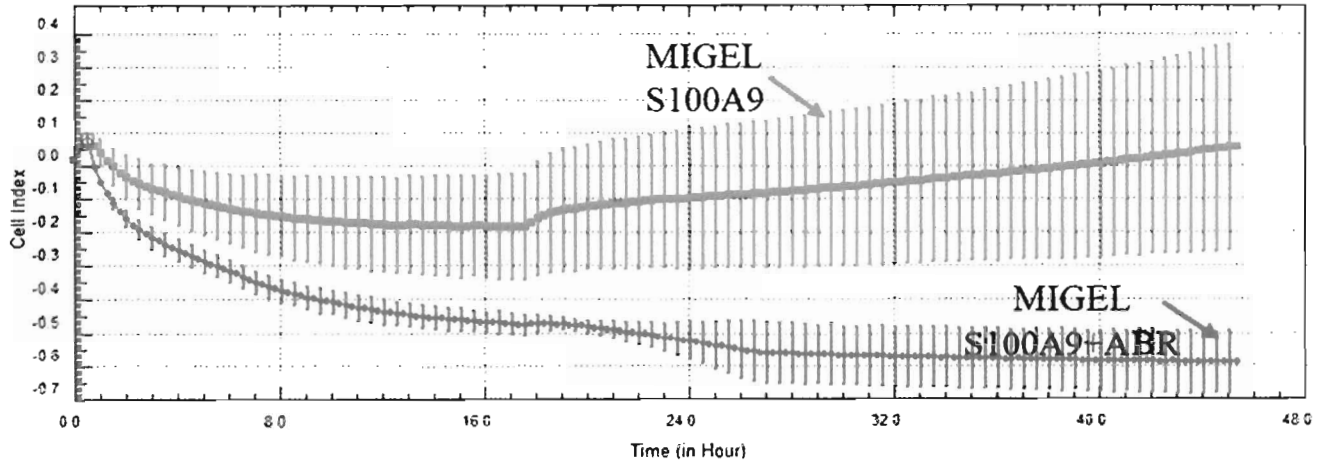


Figura 14.

Handwritten notes and signatures:
CITR
L
C. Colton
Munoz
Vuu.
Gueca