ROMÂNIA

(19) OFICIUL DE STAT
PENTRU INVENŢII ŞI MĂRCI
Bucureşti

(11) **RO 135871 A0**

(51) Int.Cl.
A61K 48/00 (2006.01);
A61K 38/17 (2006.01);
A61P 5/50 (2006.01)

(12) # CERERE DE BREVET DE INVENŢIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00161**

(22) Data de depozit: **28/03/2022**

(41) Data publicării cererii:
29/07/2022 BOPI nr. **7/2022**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA TITU MAIORESCU-INSTITUTUL DE CERCETĂRI ŞTIINŢIFICE MEDICALE "ACADEMICIAN NICOLAE CAJAL"**, *CALEA VĂCĂREŞTI, NR.187, SECTOR 4, BUCUREŞTI, B, RO;*
• **INSTITUTUL CLINIC FUNDENI**, *CALEA BUCUREŞTI, NR.258, BUCUREŞTI, B, RO*

(72) Inventatori:
• **DIMA SIMONA OLIMPIA**, *STR.NĂVODULUI, NR.5A, CONSTANŢA, CT, RO;*
• **ŞERBAN ANDREEA-MĂDĂLINA**, *DRUMUL BINELUI, NR.184-188, BL.3, AP.17, SECTOR 4, BUCUREŞTI, B, RO;*
• **LIXANDRU DANIELA MIOARA**, *ALEEA FIZICIENILOR, NR.1, BL.B, ET.10, AP.1011, SECTOR 3, BUCUREŞTI, B, RO;*
• **COMAN CRISTIN**, *STR.PANTAZICA GABRIEL NR.13A, POPEŞTI- LEORDENI, IF, RO;*
• **FLOREA IOANA RALUCA**, *STR. DECEBAL, NR.7BIS, CÂMPULUNG, AG, RO;*
• **ASPRITOIU VERONICA MĂDĂLINA**, *BD.NICOLAE GRIGORESCU, NR.19, BL.V18, SC.2, AP.40, SECTOR 3, BUCUREŞTI, B, RO;*
• **NEGOIŢĂ VALENTINA**, *CALEA 13 SEPTEMBRIE NR. 231, BL. VI, SC. 2, ET. 7, AP. 63, SECTOR 5, BUCUREŞTI, B, RO;*
• **POPESCU IRINEL**, *STR. DOMNIŢA RUXANDRA NR. 30, ET. 1, AP. 2, SECTOR 2, BUCUREŞTI, B, RO*

(54) # METODĂ DE INDUCERE A VASCULARIZAŢIEI SUBCUTANATE PRIN UTILIZAREA CELULELOR HEPATICE UMANE PRIMARE PRODUCĂTOARE DE VEGF

(57) **Rezumat:**

Invenţia se referă la o metodă de creştere a supravieţuirii şi funcţionalităţii implanturilor prin stimularea vascularizaţiei locale în situsuri cu vascularizaţie slabă (subcutanat) cu aplicabilitate în medicina regenerativă pentru pacienţii cu diabet. Metoda, conform invenţiei, include: obţinerea celulelor hepatice adulte, infectarea acestora cu factori de transcripţie pancreatici în vederea inducerii transdiferenţierii celulelor infectate, co-implantarea celulelor *in vivo* la nivel subcutanat, într-un mediu murin imunodeficient, cu celule co-producătoare şi secretoare de VEGFA. Celulele producătoare de VEGFA sunt generate *in vitro* 2 zile anterior implantării *in vivo*. Producţia şi secreţia locală de VEGFA determină inducerea vascularizaţiei la locul implantării.

Revendicări: 8
Figuri: 7

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

RO 135871 A0

METODĂ DE INDUCERE A VASCULARIZAȚIEI SUBCUTANATE PRIN UTILIZAREA CELULELOR HEPATICE UMANE PRIMARE PRODUCĂTOARE DE VEGF

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2022 00161
Data depozit 28-03-2022

I. DOMENIUL INVENȚEI

[001] Invenția descrisă oferă a metodă de creștere a supraviețuirii și funcționalității implanturilor subcutanate non-tumorale prin promovarea vascularizației locale la sediul injectării. Concluziile cercetării ar putea fi aplicate și altor tipuri de țesuturi non-tumorale și non-proliferative, ca, de exemplu, celule secretante de hormoni, careG, spre deosebire de celulele canceroase, nu induc vascularizație. Implanturile celulare în situsuri cu vascularizație slabă, ca de exemplu, cel subcutanat, restricționează supraviețuirea și funcționarea celulelor implantate. Generarea celulelor umane transdifenențiate producătoare de insulină este protejată de alte patente aprobate sau în curs de evaluare și este prezentată aici ca un exemplu pentru supraviețuirea și funcționalitatea țesuturilor non-tumorale post implantare în situsuri slab vascularizate. Invenția presupune co-implantarea acestor celule cu celule care exprimă și produc VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor A*, Factorul de Creștere al Endoteliului Vascular A), care promovează vascularizația locală subcutanată a implanturilor celulare. Această vascularizație locală promovează supraviețuirea celulară și funcționarea pe termen lung, *in vivo*. Acest situs de implantare accesibil promovează formarea *de novo* de vase sanguine în implant și oferă o metodă relativ ușoară de recuperare a implanturilor celulare în vederea analizei impactului mediului *in vivo* asupra maturării și funcționalității celulelor implantate, precum și efectul terapeutic al celulelor implantate în ameliorarea diabetului într-un scenariu preclinic.

80

II. STADIUL TEHNICII INVENŢIEI

[002] Medicina regenerativă reprezintă "procesul înlocuirii sau regenerarii celulelor, ţesuturilor sau organelor umane în vederea restabilirii funcţionalităţii normale". Acest domeniu aduce promisiunea restabilirii funcţiei unor ţesuturi afectate prin înlocuirea lor şi/sau prin stimularea propriilor mecanisme de vindecare ale organismului, ceea ce face posibilă regenerarea unor ţesuturi sau organe anterior considerate lipsite de opţiuni de vindecare.

[003] Medicina regenerativă include posibilitatea cultivării de ţesuturi şi organe în laborator, cu implantarea lor în condiţii de siguranţă atunci când mecanismele de vindecare ale corpului sunt depăşite. Aceasta reprezintă o alternativă viabilă în contextul unei disponibilităţi extrem de limítate a organelor pentru donare, precum şi pentru scenariile clinice de rejet de transplant.

[004] Forme de terapii celulare sunt în prezent în uz pentru pacienţii cu patologii hepatice sau cu diabet. Terapiile celulare cu celule mature (hepatocite pentru ficat şi insule pancreatice pentru diabet) oferă beneficii tranzitorii, însă efectelor lor sunt limitate în timp, întrucât pot fi grevate de complicaţii ale procedurilor de transplant şi necesită tratamente imunosupresoare. În prezent se fac eforturi pentru explorarea posibilităţilor de utilizarea a medicinei regenerative pentru validarea unor noi surse celulare provenind din celule stem embrionare, celule progenitoare şi ţesuturi adulte, cu potenţial impact atât în tratamentul diabetului, cât şi al patologiilor hepatice. Un obstacol major în domeniul medicinei regenerative este prezentat de faptul că amestecurile celulare generate sunt cel mai adesea heterogene şi imature (Ferber, et al., 2000) (Ber, et al., 2003) (Berneman-Zeitouni, et al., 2014). Acest fapt nu este, de altfel, surprinzător, întrucât mediul *in vivo* nu poate fi reprodus în întregime în cadrul culturilor *in vitro*. Organogeneza la nivel embrionar şi diferenţierea şi maturarea organelor nou-formate este dependentă de mediul extracelular (Meivar-Levy, Zoabi, Nardini, & al., 2019). În mod particular, nişa vasculară joacă un rol esenţial în organogeneză, nu doar din prisma fluxul sangvin, ci şi a factorilor tisulari secretaţi de

anumite tipuri celulare, care constituie elemente fundamentale în apariția de noi vase de sânge.

[005] WO2016/108237 A1 descrie tehnologia noastră inovatoare cu viză terapeutică bazată pe tarnsdiferențierea de celule adulte extrapancreatice in celule funcționale producătoare de insulină, prin mecanism controlat de glucoză. Studiile noastre au demonstrat pentru prima dată că markerii celulei pancreatice adulte pot fi activați în țesut hepatic adult folosind expresia genei regulatoare pancreatice (*master regulator*) PDX-1 (*pancreatic and duodenal homeobox gene 1*). Aceste studii au demonstrat că expresia ectopică adenovirus- mediată a factorilor de transcripție pancreatici (pTF- *pancreatic transcription factors*) induce transdiferențierea celulelor adulte hepatice în celule producătoare de insulină într-o manieră glucozo-dependentă, atât în modele murine, cât și în țesuturi umane *in vitro.* Aceste concluzii au fost confirmate în repetate rânduri și de alte studii (Aviv, et al., 2009) (Berneman-Zeitouni, et al., 2014) (Aamodt & Powers, 2017).

[006] Invenția vizează stimularea componentelor nișei vasculare în vederea creșterii/ menținerii maturării celulare și promovarea supraviețuirii culturilor primare și celulelor reprogramate, cu potențiale aplicații în medicina regenerativă și abordările legate de screeningul medicamentelor.

III. EXPUNEREA PE SCURT A INVENȚIEI

[007] Într-o primă aplicație, invenția utilizează o metodă patentată de producere de celule umane producătoare de insulină într-o manieră glucozo-dependentă, ca un exemplu de celule umane primare, a căror funcție poate fi monitorizată prin dozarea peptidului C uman în serul provenind de la modelul murin. Metoda implică următoarele etape: (a) obținerea de celule hepatice adulte; (b) infectarea celulelor hepatice adulte cu factori de transcripție pancreatici în vederea inducerii transdiferențierii celulelor infectate în celule beta pancreatice; (c) implantarea acestor celule *in vivo* la nivel subcutanat, într-un model murin imunodeficient, împreună cu celule care secretă VEGF pentru stimularea vascularizației locale.

[008] Într-o altă aplicație, invenția descrie o metodă de tratare a subiecților cu deficiență hormonală relativă, incluzând implantarea în subiecți a unui mix de (i) o matrice proteică, (ii) celule hepatice adulte primare, infectate cu factori de transdiferențiere pancreatici și celule având capacitatea de a produce și secreta VEGF.

[009] Alte funcționalități și avantaje ale prezentei invenții devin aparente din următoarea descriere, exemple și figuri. Trebuie înțeles că descrierea detaliată și exemplele specifice sunt oferite cu scop ilustrativ, întrucât o serie întreagă de modificări și variații în spiritul și scopul invenției vor deveni aparente celor cu expertiză în domeniul vizat.

IV. DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

[0010] Invenția descrie o metodă de obținere de celule umane producătoare de insulină în manieră controlată de glucoză, metoda incluzând: (a) obținerea de celule hepatice primare umane; (b) infectarea celulelor hepatice umane cu factori de transcripție pancreatici pentru inducerea transdiferențierii în celule β pancreatice; (c) co-implantarea celulelor cu celule hepatice netransdiferențiate infectate cu 100-250 moi Ad-VEGF care produc și secretă VEGF (genă livrată de un adenovirus, care codifică expresia Factorului A de Creștere a Endoteliului Vascular- *Vascular Endothelial Growth Factor A*, a cărui expresie este determinată de un promotor heterolog); sau co-infecția celulelor cu 100 moi Ad-VEGF, 2 zile anterior implantării *in vivo*.

[0011] Invenția oferă și o metodă de obținere a unei populații de celule producătoare de insulină, conform metodei descrise. Celulele producătoare de insulină obținute ar putea fi implantate într-un subiect cu o patologie caracterizată de niveluri crescute de glucoză serică, rezistență la insulină sau producție insuficientă de insulină, precum diabetul, iar pentru această aplicație celulele sunt mixate o matrice proteică, precum Matrigelul, pentru a forma cu implant de tip celule-matrice.

[0012] De asemenea, celulele producătoare de insulină sunt implantate subcutan sau la nivelul peritoneului, țesutul care acoperă organele abdominale, pentru a produce astfel

insulină şi a trata subiectul. hVEGFA secretat din celulele co-implantate poate promova vascularizaţia locală, susţinând supravieţuirea şi funcţionarea implantului în situsuri ale organismului *a priori* slab vascularizate.

[0013] În acelaşi timp, invenţia descrie o metodă de tratament pentru subiecţii cu diabet, incluzând: implantarea în subiect a unui amestec de (i) matrice proteică, (ii) celule hepatice adulte primare, infectate cu factori de transcripţie pancreatici pentru a induce transdiferenţierea celulelor infectate în celule β pancreatice, celule infectate cu Ad-VEGFA, pentru a forma un implant celule-matrice, care supravieţuieşte şi funcţionează pentru perioade lungi de timp.

[0014] Modelul non-tumoral de izolare de celule hepatice este cel descris în publicaţii anterioare (Sapir, Shternhall, Meivar-Levy, & Blumenfeld, 2005) (Berneman-Zeitouni, şi alţii, 2014).

[0015] În anumite aplicaţii, factorul de transcripţie este codat de un acid nucleic. De exemplu, acidul nucleic codifică PDX-1, MafA sau polipeptidul NeuroD1. Acidul nucleic care codifică factorul de transcripţie sau o combinaţie a acestor acizi nucleici pot fi livrate în celulă prin orice metode descrise anterior. În anumite aplicaţii, acidul nucleic este încorporat într-un vector de expresie sau într-un vector viral bine cunoscut în domeniu (ex. un vector adenoviral, FGAD- first generation adenoviral vector).

[0016] Proteina homeodomain PDX-1 (*pancreatic and duodenal homeobox gene 1*), cunoscută şi ca IDX-1, IPF-1, STF-1 sau IUF-1, joacă un rol esenţial în modularea dezvoltării şi funcţionalităţii insulelor pancreatice. PDX-1 este direct sau indirect implicată în expresia specifică la nivelul insulelor pancreatice a mai multor gene, precum insulina, glucagonul, somatostatina, proinsulin convertaza 1/3 (PC1/3), GLUT-2 sau glucokinaza. În plus, PDX-1 mediază transcripţia genei insulinei ca răspuns la glucoză. Surse de acizi nucleici care codifică PDX-1 includ acidul nucleic uman PDX-1 (şi secvenţele proteice codate) disponibil ca GenBank Accession numerele U35632 şi, respectiv, AAA88820.

[0017] Alte surse de secvenţe pentru PDX-1 includ acidul nucleic PDX-1 provenind de la şobolan şi secvenţele proteice GenBank Accession Nr. U35632 şi AAA18355. O sursă

adiţională include acidul nucleic PDX-1 de la peştele zebră şi secvenţele proteice incluse în GenBank Accession Nr. AF036325 şi AAC41260.

[0018] MafA, cunoscut ca omologul A al oncogenei fibrosarcomului musculoaponevrotic V-maf (*V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A*) sau RIPE3B1, este un activator transcripţional al expresiei genei insulinei specific celulei beta, reglat de glucoză. MafA ar putea fi implicat în funcţionarea şi dezvoltarea celulelor beta, precum şi în patogeneza diabetului. Potenţiale surse de acizi nucleici care codifică MafA includ, de exemplu, acidul nucleic uman MafA şi secvenţele proteice codate, disponibile ca GenBank Accession numerele NM_201589.3 şi NP_963883.2.

[0019] NeuroD1, cunoscut şi ca Neuro Diferenţiator 1 sau NeuroD, şi beta-2 (β2) este un factor de trasncripţie de tip Neuro D. Este un factor de transcripţie de tip helix-buclă-helix, care formează heterodimeri cu alte proteine bHLH şi activează transcripţia genelor care conţin o secvenţă specifică de ADN denumită cutia E (E-box). Aceasta reglează expresia genei insulinei, iar mutaţii în această genă determină apariţia diabetului zaharat tip II. Surse de acizi nucleici care codifică NeuroD includ de exempul acidul nucleic NeuroD uman şi secvenţele proteice codate, disponibile ca GenBank Accession numerele NM_002500.4 şi NP_002491.2.

[0020] Într-o aplicaţie, secvenţa de aminoacizi a unei polipeptide NeuroD1 este setată în SEQ ID NO: 5:

[0021] Într-o aplicaţie, implantul promovează formarea *de novo* de vase sangvine la nivelul grefei. Într-o altă aplicaţie, subiectul este un mamifer. Într-o altă aplicaţie, mamiferul este, de exemplu, uman, primat non-uman, şoarece, şobolan, câine, pisică, cal sau vacă.

Angiogeneza

[0022] Într-un aspect, invenţia se centrează pe utilizarea de celule hepatice umane producătoare şi secretante de VEGA pentru stimularea formării de noi vase de sânge la situsul implantării. Vasculogeneza este definită ca formare de vase sangvine *de novo*,

proces indus prin diferențierea celulelor derivate din mezoderm care dau naştere precursorilor endoteliali, cunoscuți ca angioblaşti. Angiogeneza este definită ca procesul formării de noi vase sangvine pornind de la vase anterior existente (Lui, 2014).

Rolul angiogenezei şi vasculogenezei în dezvoltarea pancreasului şi ficatului

[0023] Insulele pancreatice reprezintă un organ intens vascularizat, cu o densitate capilară de 10 ori mai mare decât cea a pancreasului exocrin. Insulele pancreatice vin în contact direct cu celulele endoteliale în timpul procesului de dezvoltare embrionară. În plus, s-a demonstrat că o rețea vasculară normală este esențială pentru dimensiunea normală a insulelor pancreatice şi o funcție endocrină normală (Brissova, şi alții, 2014) (Lammert, şi alții, 2003). Celulele endoteliale aortice, pe lângă fluxul de sânge, determină şi producția de Ptf1a, un factor de transcripție de tip helix-buclă-helix, un factor necesar în dezvoltarea pancreasului exocrin şi endocrin (Brissova, şi alții, 2014) (Lammert, şi alții, 2003). În timpul fazelor ulterioare ale dezvoltării embrionare, agregatele de celule β exprimă cantități mari de VEGF-A pentru a atrage celulele endoteliale care exprimă receptorul VEGFR-2, care astfel formează o rețea vasculară la nivelul insulelor pancreatice. Rolul stratului celular din peretele vaselor sangvine în dezvoltarea şi supraviețuirea insulelor pancreatice este mult mai slab înțeles. Pe culturi 3D de insule pancreatice murine. Kaufman-Francis et al. au demonstrat că adiția de fibroblaste umane şi de celule endoteliale provenind de la nivelul cordonului ombilical uman stimulează supraviețuirea insulelor pancreatice şi secreția de insulină (Kaufman-Francis, Koffler,, Weinberg, Dor,, & Levenberg, 2012). Celulele stem mezenchimale de la nivelul peretelui vascular au avantaje comparativ cu fibroblastele, întrucât acest celule s-a dovedit că oferă o nişă favorabilă prin secreția de factori paracrini şi dezvoltarea matricei extracelulare.

[0024] Orice patent, publicație de aplicație de patent sau publicație ştiințifică citate în cadrul aplicației sunt incluse în referințe.

74

Nr. Crt.	Titlu	Inventator	Data publicării	Numărul de înregistrare
1.	*Utilizarea unui biorector rotativ pentru stimularea procesului de maturare a celulelor pancreatice obținute prin transdiferențierea celulelor hepatice*	Sarah FERBER, Irit LEVY-MEIVAR, Simona DIMA, Andreea ȘERBAN, Daniela LIXANDRU, Raluca FLOREA, Veronica ASPRIȚOIU, Ioan MATEI, Radu ALBULESCU, Cristiana TĂNASE, Irinel POPESCU	Rezumat publicat în 29 Octombrie 2021	Rezumat publicat în BOPI nr.10/2021, nr. 135274 A0
2.	*Methods of transdifferentiation and methods of use thereof*	Sarah FERBER, Tel Aviv (IL)	24 Septembrie 2020	US 2020/0297777 A1
3.	*Transdifferentiated cell populations and methods of use thereof*	Sarah FERBER, Tel Aviv (IL)	7 Mai 2020	US 2020/0140825 A1
4.	*Cell populations, methods of transdifferentiation and methods of use thereof*	Sarah FERBER , Tel Aviv (IL)	29 Noiembrie 2018	US 2018 / 0340146 A1
5.	*Methods of inducing regulated pancreatic hormone production in non-pancreatic islet tissues*	Sarah FERBER , Tel Aviv (IL)	1 Noiembrie 2016	US 9.481,894 B2

6.	*Methods of inducing regulated pancreatic hormone production in non-pancreatic islet tissues*	Sarah Ferber, Ramat Hasharon (IL)	27 Decembrie 2012	US 2012/0329710 A1
7.	*Method of inducing regulated pancreatic hormone production in non-pancreatic islet tissue*	Sarah Ferber (IL)	7 Aprilie 2011	JP 2011-68660 A 2011.4.7

[0025] Următoarele exemple sunt prezentate pentru a ilustra anumite aplicații ale invenției. Ele nu trebuie însă considerate ca limitative pentru scopul invenției.

72

EXEMPLE

[0026] Datele din studiile noastre precedente sugerează că factorii de transcripție, care joacă un rol esențial în organogeneza pancreasului la embrion și adult, pot induce transdiferențierea pancreatică atunci când sunt exprimați ectopic în țesuturi non-pancreatice, atât *in vivo* utilizând un model murin, cât și *in vitro*, în țesuturi umane (Aviv, și alții, 2009) (Ferber, și alții, 2000) (Sapir, Shternhall, Meivar-Levy, & Blumenfeld, 2005). S-a demonstrat că expresia ectopică mediată de adenovirus a factorilor de transcripție pancreatică induce transdifenreție rea celulelor hepatice adulte în celule producătoare de insulină, într-o manieră controlată de glucoză. Celulele producătoare de insulină derivate din celule hepatice adulte produc, procesează și secretă insulină într-o manieră controlată de glucoză și ameliorează hiperglicemia prin implantarea la șoricei diabetici SCID. Eficiența procesului de transdiferențiere a fost crescută semnificativ când exprsia ectopică de PDX-1 a fost combinată cu factori pancreatici adiționali (NeuroD1 sau MafA), precum și cu factori solubili (Nicotinamidă, EGF, Exendina-4 sau Activina-A).

[0027] Probele sangvine de la modelul murin pentru dozarea insulinei și peptidului C uman au fost prelevate după o perioadă de post de 4 ore. Probele sangvine au fost păstrate pe gheață și centrifugate în recipiente Vacutainer® SST ™ (produse de BD) la 10g pentru 15 minute la 4°C pentru a fi separate de ser.

[0028] Determinarea concentrației serice de peptid C s-a realizat utilizând kit-ul Mercodia.

[0029] Explanturile au fost excizate la una sau două luni post implant (sau conform precizărilor) și s-au efectuat colorații hematoxilin-eozină sau analize imunohistochimice specifice pentru CD31 uman/ murin. Probele au fost spălate de 3 ori în buffer TBS și apoi expuse cu CD31, anti HLA și DAB și acoperite cu lamela de sticlă deasupra unei picături din mediul de montare. Aceste celule au fost utilizate ca un model funcțional publicat pentru urmărirea pe termen lung a co-implanturilor de celule producătoare de hVEGFA, în vederea monitorizării vascularizației subcutanate.

Analiză statistică

[0030] Analiza statistică s-a realizat cu un test t Student, asumând variante diferite pentru cele două grupuri.

[0031] Celulele au fost implantate sub-cutanat la şoricei SCID-NOD. Pentru urmărirea unui control, celulele producătoare de insulină sau de hVEGFA au fost implantate singure (conform ilustraţiei din Figura 1). Celule hepatice infectate cu AD-VEGFA produc şi secretă VEGFA uman *in vitro* anterior implantării (Figura 2). Şoriceii au fost monitorizaţi pentru 2 luni, iar post-implant s-au recolatat probe de sânge pentru dozarea VEGF uman şi murin, precum şi pentru determinarea nivelului de peptid C uman, iar toate implanturile au fost excizate pentru analiză. Macroscopic, implanturile de Matrigel cu mixul celular au fost vascularizate (Figura 3), în timp ce implanturile doar de Matrigel şi celule producătoare de insulină au fost albe sau translucide. Coloraţia hematoxilin-eozină a arătat focare de celule mari în proximitatea capilarelor sangvine din implanturile mixte cu Matrigel (Figura 4).

[0032] Analiza explanturilor a pus în evidenţă expresia continuă şi producţia de VEGFA uman la o lună şi două luni post-implant, precum şi inducerea vascularizaţiei şi creşterea locală a VEGFA murin (Figurile 5-6). Nivelurile locale de VEGFA la nivelul celulelor primare au fost semnificativ mai scăzute comparativ cu celule canceroase de melanom implantate subcutanat (Figurile 5-6).

[0033] În timp ce şoriceii cu melanom au avut niveluri serice crescute de VEGF, celulele primare non-tumorale co-implantate cu celule secretante de hVEGFA nu au determinat o creştere a VEGF murin la nivel sistemic, demonstrând inducerea la nivel strict local a vascularizaţiei.

[0034] Funcţionalitatea pe termen lung a putut fi demonstrată doar în cazul co-implanturilor de celule producătoare de VEGFA, fapt demonstrat de nivelul de peptid C măsurat în serul modelului murin la peste 11 săptămâni post-implant (Figura 8).

[0035] Va fi evident pentru profesioniţtii cu expertiză în domeniu că modificări, substituţii, schimbări sau echivalenţe ar putea fi identificate pentru aplicaţiile descrise anterior fără a părăsi conceptul general descris în cadrul invenţiei. Devine astfel evident că invenţia nu

este limitată strict la aplicaţiie descrise, ci este menită să acopere astfel de variaţii care sunt în scopul şi spiritul invenţiei, aşa cum este dovedit de următoarele revendicări.

References

Aamodt, K., & Powers, A. (2017). Signals in the pancreatic islet microenvironment influence beta-cell proliferation. *Diabetes Obes Metab*, 124-36.

Aviv, V., Meivar-Levy, I., Rachmut, I., Rubinek, T., Mor, E., & Ferber, S. (2009). Exendin-4 promotes liver cell proliferation and enhances PDX-1-induced liver to pancreas transdifferentiation. *J Biol Chem*, 284(48):33509–20.

Ber, I., Shternhall, K., Perl, S., Ohanuna, Z., Goldberg, I., Barshack, I., & al., e. (2003). Functional, persistent, and extended liver to pancreas transdifferentiation. *J Biol Chem*, 278(34):31950–7.

Berneman-Zeitouni, D., Molakandov, K., Elgart, M., Mor, E., Fornoni, A., Dominguez, M., & al., e. (2014). The temporal and hierarchical control of transcription factors-induced liver to pancreas transdifferentiation. *PLoS One*, 9(2):e87812.

Berneman-Zeitouni, D., Molakandov, K., Elgart, M., Mor, E., Fornoni, A., Dominguez, M., & al., e. (2014). The temporal and hierarchical control of transcription factors-induced liver to pancreas transdifferentiation. *PLoS One*, 9(2):e87812.

Brissova, M., Aamodt, K., Brahmachary, P., Prasad, N., Hong, J., Dai, C., & e. a. (2014). Islet microenvironment, modulated by vascular endothelial growth factor-A signaling, promotes beta cell regeneration. *Cell Metab*, 19(3):498–511.

Ferber, S., Halkin, A., Cohen, H., Ber, I., Einav, Y., Goldberg, I., & al., e. (2000). Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med*, 6(5):568–72.

Kaufman-Francis, K., K. J., Weinberg, N., D. Y., & Levenberg, S. (2012). Engineered vascular beds provide key signals to pancreatic hormone-producing cells. *PLoS One*, 7(7):e40741 .

Lammert, E., Gu, G., McLaughlin, M., Brown, D., Brekken, R., Murtaugh, L., & al., e. (2003). Role of VEGF-A in vascularization of pancreatic islets. *Curr Biol*, 13(12):1070–4.

Lui, K. (2014). VEGF-A: the inductive angiogenic factor for development, regeneration and function of pancreatic beta cells . *Current stem cell research & therapy*, 9(5):396–400.

Meivar-Levy, I., Zoabi, F., Nardini, G., & al., e. (2019). The role of the vasculature niche on insulin-producing cells generated by transdifferentiation of adult human liver cells. *Stem Cell Res Ther*, 10, 53.

Pellegrini, S., Cantarelli, E., Sordi, V., Nano, R., & Piemonti, L. (2016). The state of the art of islet transplantation and cell therapy in type 1 diabetes. *Acta Diabetol*, 53(5):683–91.

Sapir, T., Shternhall, K., Meivar-Levy, I., & Blumenfeld, T. (2005). From the cover: cell-replacement therapy for diabetes: generating functional insulin-producing tissue from adult human liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(22):7964–9.

Shapiro, A., Pokrywczynska, M., & Ricordi, C. (2017). Clinical pancreatic islet transplantation. *Nat Rev Endocrinol*, 13(5):268–77.

Shternhall-Ron, K., Quintana, F., Perl, S., Meivar-Levy, I., Barshack, I., C. l., & al., e. (2007). Ectopic PDX-1 expression in liver ameliorates type 1 diabetes. *J Autoimmun*, 28:134–42.

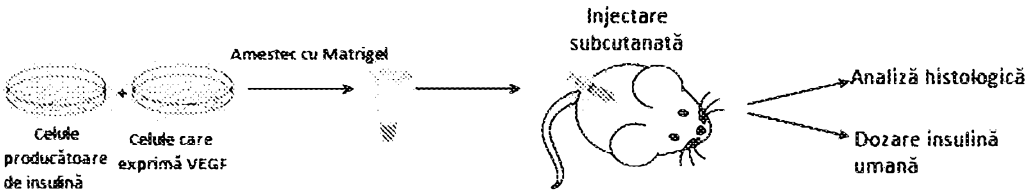
67

V. REVENDICĂRI

1. O metodă de producere a celulelor umane care produc şi secretă VEGFA, incluzând:
   (a) Obţinerea celulelor hepatice adulte primare
   (b) Infectarea celulelor hepatice adult primare cu factori de transcripţie pancreatici pentru a induce transdiferenţierea în celule β pancreatice producătoare de insulină
   (c) Co-implantarea de celule producătoare de insulină împreună cu celule care produc şi secretă VEGF pentru a promova supravieţuirea şi funcţionarea celulelor non-tumorale, capabile să producă şi să secrete un compus terapeutic (precum insulina) după implantarea subcutanată *in vivo.*
2. O metodă a revendicării de la punctul 1 în care la etapa (c) 100-500 moi Ad-VEGFA infectează 10% dintre celulele hepatice introduse.
3. O metodă a revendicării de la punctul 2 în care 100-500 moi co-infectează împreună cu Ad-MafA toate celulele, 2 zile anterior implantării *in vivo.*
4. O metodă a revendicării de la punctul 1, în care etapa (c) promovează fomarea accentuată de vase sangvine la nivel local.
5. O metodă a oricăreia dintre revendicările 1-4, care este sigură pentru subiectul implantat.
6. O metodă de tratament a unui subiect pentru deficienţă hormonală, metoda incluzând:
   implantarea în subiect a unui amestec de (i) matrice proteică, (ii) celule hepatice umane primare adulte, infectate cu factori de transcripţie pancreatici pentru a induce transdiferenţierea în celule β pancreatice, (iii) celule producătoare de VEGF, menite să stimuleze formarea de vase sangvine şi grefa celule-matrice, în care grefa celule-matrice promovează supravieţuirea şi diferenţierea celulelor implantate, obţinându-se astfel celule producătoare de insulină într-o manieră reglată de glucoză, în care implantul mixului celular secretă insulină umană şi VEGFA.

7. O metodă a revendicării 6, în care implantul promovează dezvoltarea de vase sangvine în grefa implantată şi în proximitatea ei, fără să determine creşterea nivelului sistemic de proteine secretante endoteliale.
8. O metodă a revendicării 6, în care subiectul este un mamifer.

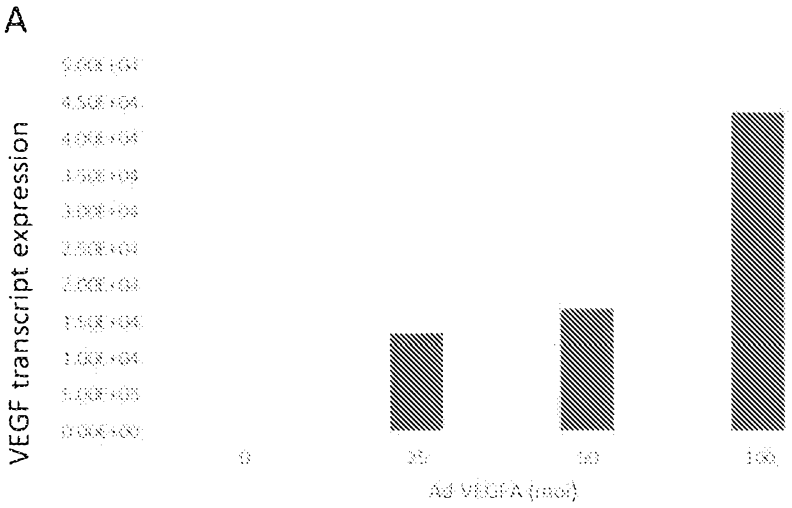
VI. FIGURI



[0036]

[0037] **Figura 1**: Prezentarea schematică a protocolului experimental: celule umane producătoare de insulină şi celule care exprimă VEGFA sunt incluse într-un amestec cu Matrigel. Amestecul celular este injectat subcutanat la şoricei imunodeficienţi SCID Beige. La câteva (4-12) săptămâni post injectare, implantul este îndepărtat şi analizat. Gradul de maturare a celulelor producătoare de insulină este determinat prin dozarea insulinei serice umane.

[0038] **Figura 2**: **Producţia şi secreţia de VEGF *in vitro*** în celule primare hepatice infectate cu Ad-VEGFA (Ad-VEGFA este un virus recombinant purtător al expresiei de hVEGFA sub controlul unui promotor heterolog)

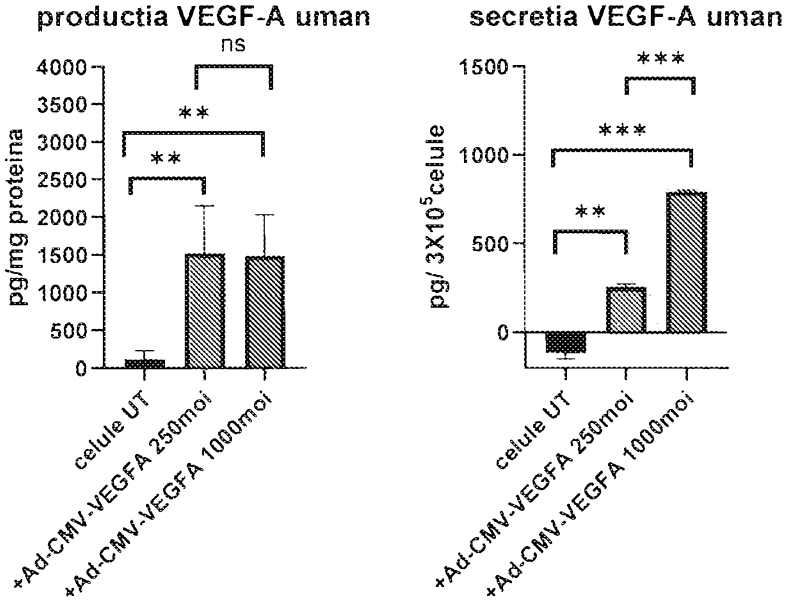


[0039]

[0040] **Figura 2A:** Celulele hepatice umane au fost infectate cu doze progresiv crescânde (moi- *multiplicity of infection*) de Ad-CMV-VEGFA pe o durată de 72 de ore. Transcriptul

VEGFA a fost determinat folosind RT-qPCR (A), iar sinteza proteică a fost măsurată folosind kit-ul specific ELISA pentru VEGFA uman (B).

[0041] **Figura 2B: Producția și secreția de VEGF uman *in vitro***



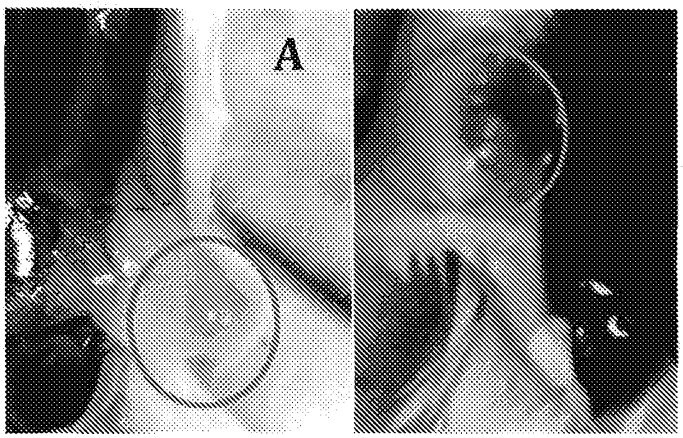
[0042] **Figura 2B: Producția și secreția de hVEGFA *in vitro***

Celulele hepatice umane netransdiferențiate (celule UT) au fost infectate cu cantități crescute (moi- *multiplicity of infection*) de Ad-CMV-VEGFA pentru 72 de ore (250 și 1000 moi). Producția de VEGF (lizatul celular) și secreția sa (în mediu) au fost determinate prin utilizarea kit-ului specific ELISA pentru VEGF uman (ab119566). Nivelurile de hVEGFA au fost normalizate per mg de proteină (determinări utilizând metoda Pierce BCA, kit-ul Thermo Fisher) pentru lizatul celular și per număr de celule colectate în 2 ml de mediu pentru monitorizarea secreției (n=2, fiecare în duplicat); ns- nesemnificativ **$p<0.005$, ***$p<0.001$.

Datele ilustrate în figura 2Ba sugerează că nu există o diferență semnificativă între conținutul de VEGF la nivelul celulelor infectate cu 250 moi raportat la cel din celulele infectate cu 1000 moi din același virus recombinant, deși secreția în mediu la 72 de ore este mult mai mare în cel de-al doilea grup celular- Fig. 2Bb.

Șoriceii SCID-Beige au fost implantați subcutanat cu celule producătoare de insulină (A) sau mix de celule producătoare de insulină și celule care exprimă VEGF (B). Implanturile au fost excizate la 4 și 12 săptămâni post implant.

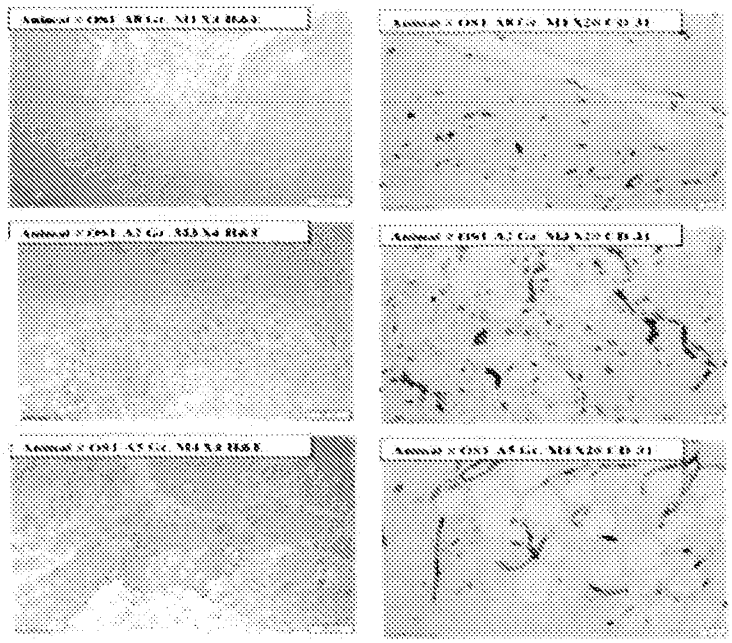
[0043] **Figura 3: Implantarea *in vivo* a celulelor producătoare de insulină (IPC) tratate pentru a secreta VEGF.**



[0044]

[0045] **Figura 3:** Expresia ectopică și locală de VEGFA promovează neoangiogeneza *in vivo* la nivelul implantului subcutanat de IPC. Implanturile au fost extrase la 4 săptămâni de la injectare.

[0046] **Figura 4: Expresia ectopică de VEGF promovează formarea de vase sangvine la nivelul implanturilor *in vitro***

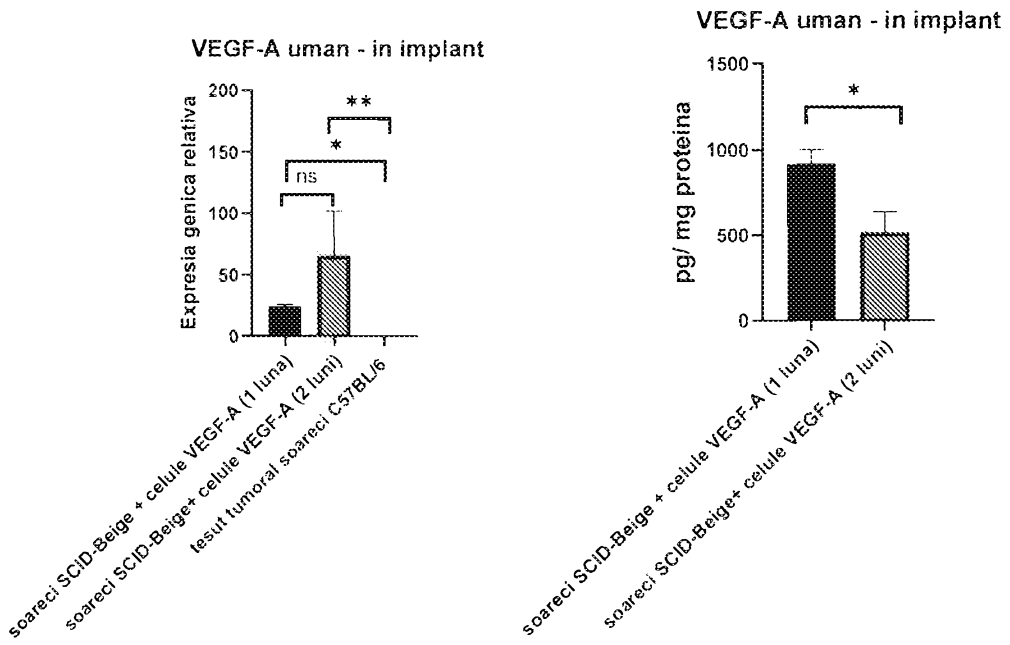


[0047]

[0048] **Figura 4: Expresia ectopică de VEGF promovează vascularizația implanturilor de celule producătoare de insulină *in vivo*:** VEGF induce vascularizația locală la nivelul implantului și în proximitatea sa (hematoxilin-eozină și marcaj imunohistochimic antiCD31 murin). Șoriceii SCID-Beige au fost injectați sub-cutanat cu celule producătoare de insulină (A) sau amestec de celule producătoare de insulină și celule care exprimă VEGF (50% celule infectate VEGF 25 moi (B) sau 10% celule infectate VEGF 100 moi (C)). Implanturile au fost excizate după 4 săptămâni și examinate în colorație hematoxilin-eozină pentru determinarea gradului de inflamație, în marcaj KU80 pentru prezența celulelor umane și respectiv prin marcaj CD31 pentru punerea în evidență a vaselor sangvine neoformate.

[0049] **Figura 5: Expresia și producția de VEGFA uman (hVEGFA) în celule umane implantate *in vivo* într-un model murin persistă pentru cel puțin 2 luni.**

[0050]



[0051] **Figura 5: Expresia locală de VEGFA uman în celulele primare implantate subcutanat *in vivo* într-un model murin**

Celulule hepatice umane și celulele care exprimă VEGFA sunt incluse într-un mix cu Matrigel. Acesta este ulterior injectat subcutanat unor șoricei imunodeficienți SCID-Beige, alături de celule care secretă VEGF. Explanturile sunt analizate una sau două luni post implantare pentru determinarea expresiei VEGFA (qPCR) și producția de proteine (ELISA). Nivelurile de VEGF-A uman din implanturile la o luna (n=3) și 2 luni (n=5) au fost comparate cu nivelurile de VEGF-A din țesut tumoral la șoricei C57BL/6 (n=3), fiecare în duplicat. Transcriptul VEGF a fost determinat ca expresie relativă prin utilizarea qRT-PCR (A), în timp ce sinteza proteică a fost măsurată prin utilizarea kit-ului specific ELISA (ab119566), raportată la mg de proteină din implant (B); proteina TBP umană a fost aleasă ca genă *housekeeping* pentru experimentele qRT-PCRș *p< 0.05, **p<0.005

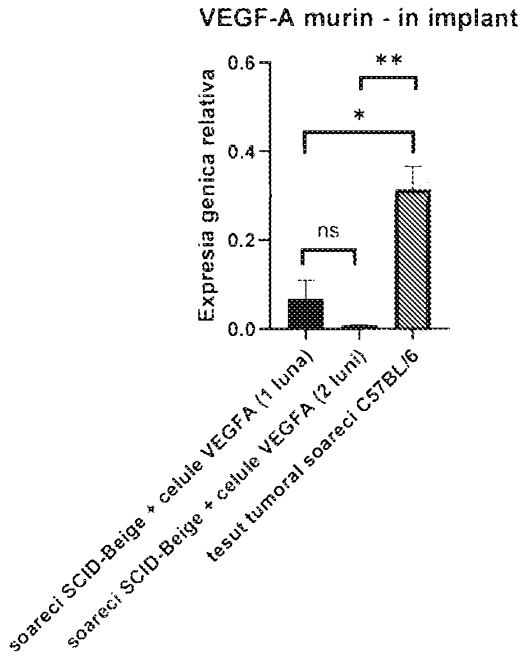
*celulele de melanom servesc ca un control de specificitate pentru VEGF uman, nu se pune în evidență expresie genică de VEGF uman.

Pentru a analiza siguranța implanturilor de celule primare, am comparat inducerea vascularizației prin utilizarea celulelor secretante de hVEGFA cu vascularizația indusă de celulele tumorale. Șoriceii C57/BL6 au fost injectați subcutanat cu celule de melanom. Ambele tipuri celulare promovează dezvoltarea vaselor sangvine, care la rândul ei stimulează producerea și secreția de VEGFA murin în fluxul sangvin la modelul animal. În acest sens, am comparat nivelurile de VEGFA în celulele non-tumorigene care secretă VEGFA uman cu cele din celulele canceroase. Rezultatele noastre sugerează că, în timp ce tumorile derivate din melanom sunt asociate cu o creștere sistemică a nivelurilor de VEGFA murin, această creștere nu se regăsește în cazul celulelor primare care secretă hVEGFA. Acest fapt constituie un argument al siguranței procedurii, cu un risc scăzut de formare de tumori. Inducerea vascularizației la nivelul implanturilor celulare subcutanate rămâne un efect local, care permite supraviețuirea și funcționarea acestor celule în situsuri cu vascularizație slabă.

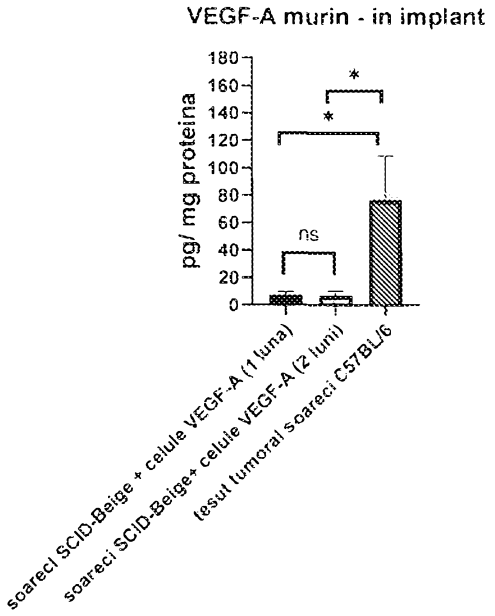
Următorul exemplu sugerează de hVEGFA induce un grad de vascularizație la șoarece net inferior celui indus de implantul tumoral subcutanat.

Figura 6: Comparație între nivelul local de VEGF murin în cazul implantului subcutanat de celule primare și cel de celule de melanom uman

A.



B.



C.

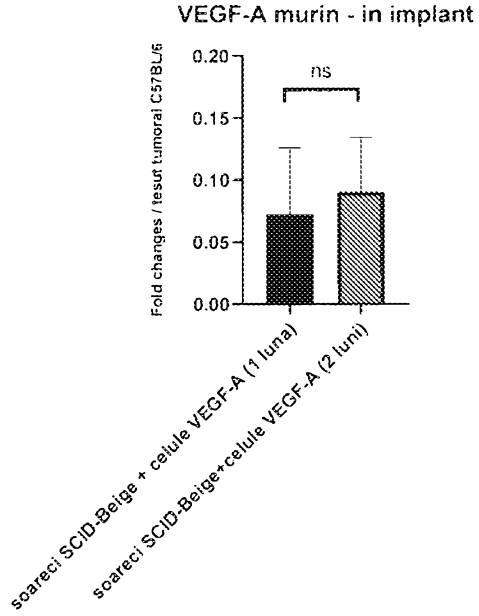


Figura 6: Expresia locală de VEGFA murin evaluată prin formarea de microvase sangvine, stimulată de celulele hepatice primare producătoare de hVEGFA, raportat la neoangiogeneză indusă de celulele tumorale de melanom injectate subcutanat într-un model murin *in vivo:* Celulele hepatice umane și celulele care exprimă VEGFA au fost amestecate cu Matrigel. Mixul celular a fost implantat subcutanat într-un model de șoricei imunodeficienți SCID-Beige, împreună cu celule care secretă VEGF pentru promovarea vascularizației locale. Nivelurile de VEGF-A murin în implanturile celulele excizate la o lună (n=3) și două luni (n=5) au fost comparate cu nivelurile de VEGF-A din țesutul tumoral provenind de la șoricei C57BL/6 cu melanom (n=3), fiecare în duplicat. Transcriptul de VEGF murin a fost determinat ca expresie relativă prin qRT-PCR (A).

Sinteza proteică de VEGFA murin a fost determinată prin utilizarea kit-ului LUMINEX ProCarta Plex pentru VEGF-A murin, iar rezultatele sunt prezentate prin raportare la mg de proteină din implant (B) sau ca o creștere a expresiei raportată la nivelul din țesutul tumoral din șoriceii C57BL/6 (C); gena Rsp18 murină a fost selectată ca genă *housekeeping* pentru experimentele de qRT-PCR; *p< 0.05, **p<0.005

Experimentul prezentat sugerează că celulele umane primare producătoare de hVEGFA induc formarea de vase sangvine într-un număr net inferior celui indus de celule tumorale. Acest fapt este valid și la nivel sistemic, având un nivel de VEGFA net crescut în serul șoriceilor implantați cu celule tumorale, raportat la cei cu implanturi de celule care produc și secretă VEGFA.

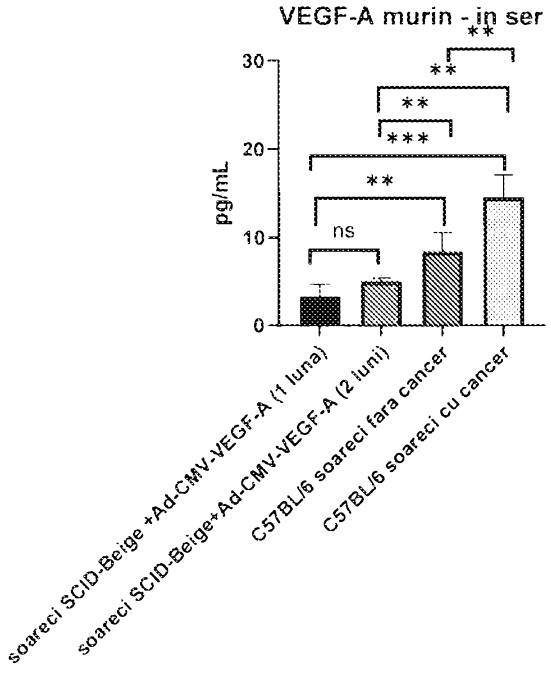


Figura 7: Nivelul de VEGF murin în serul şoriceilor cu implanturi subcutanate

Celulele hepatice umane şi celulele care exprimă VEGFA au fost mixate cu Matrigel. Mixul celular a fost implantat subcutanat la şoricei imunodeficienţi SCID-Beige, împreună cu celule care secretă VEGF pentru promovarea vascularizaţiei locale. Probe de ser au fost colectate la o lună şi două luni post implant. Rezultatele de la o lună (n=3) şi două luni (n=5) au fost comparate cu cele obţinute din serul şoriceilor C57BL/6 fără cancer (n=4) şi al şoriceilor C57BL/6 cu cancer (n=4), fiecare în duplicat.

ns -nesemnificativ, **p<0.005, ***p<0.001