

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102023000008451
Data Deposito	28/04/2023
Data Pubblicazione	28/10/2024

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	01	N	33	50

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	01	N	15	10

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	01	N	15	14

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	01	N	33	543

Titolo

Metodo per la caratterizzazione di prodotti per la terapia cellulare
--

DESCRIZIONE

Della Domanda di Brevetto per Invenzione Industriale dal Titolo:

“Metodo per la caratterizzazione di prodotti per la terapia cellulare”

a nome : CELLPLY S.R.L.

inventori : BETTELLI Alice, FAENZA Andrea, ROCCHI Laura, Massimo
BOCCHI

* * * * *

Stato dell'arte

I saggi comunemente usati per caratterizzare e comprendere la modalità di azione delle terapie cellulari, per identificare cellule effettrici ottimali o per controllare la potenza delle terapie cellulari durante lo sviluppo del processo o per il rilascio del prodotto, sono saggi di citotossicità e rilascio di citochine che rivelano interazioni tra cellule immunitarie e cellule bersaglio. Questi test possono in genere essere eseguiti per 4-72 ore.

I saggi di citotossicità utilizzati nella terapia cellulare si basano sulla capacità di mantenere la vitalità delle cellule bersaglio a lungo termine. È quindi fondamentale mantenere le condizioni ideali e ridurre al minimo il rumore nella misurazione dovuto alla morte indesiderata e non correlata delle cellule bersaglio e allo stesso tempo garantire che le cellule effettrici siano mantenute in un ambiente dove possano esercitare la loro attività citotossica contro le cellule bersaglio, con minima alterazione dell'ambiente circostante.

Le metodologie attualmente disponibili non permettono di verificare l'eterogeneità funzionale dei prodotti per la terapia cellulare. Vengono infatti utilizzati saggi in *bulk*, dai quali si deriva una informazione che è data dalla media della popolazione cellulare in analisi, senza la possibilità di risalire alla citotossicità di ogni singola cellula effettrice. I saggi di citometria di flusso definiscono sottopopolazioni sulla base di marcatori fenotipici, non sulla base della funzionalità.

I dispositivi microfluidici sono disponibili come strumenti all'avanguardia che consentono di eseguire analisi ad alto contenuto su larga scala. Lavorare con volumi su scala nanometrica, nonostante offra vantaggi unici come la capacità

di co-localizzare singole cellule effettrici con più cellule bersaglio e misurare le citochine secrete dalle singole cellule o di eseguire successivamente più saggi sulle stesse cellule per lunghi periodi, richiede il massimo livello di controllo dell'ambiente locale per ridurre al minimo la morte delle cellule bersaglio a causa di fattori non correlati alle interazioni effettore-bersaglio.

Resta fortemente avvertita la necessità di un metodo in grado di caratterizzare un prodotto per la terapia cellulare con informazioni singola-cellula specifiche.

Descrizione

Costituisce oggetto della presente invenzione un metodo adatto per saggi di citotossicità cellulo-mediata.

In una forma di realizzazione, il metodo viene eseguito in un dispositivo microfluidico a micropozzetti aperto, in grado di consentire un rapido scambio automatizzato di liquido nei pozzetti senza spostamento delle cellule in sospensione caricate. Questa capacità consente di automatizzare la preparazione e l'esecuzione del dosaggio nei pozzetti del campione precedentemente caricato e di alimentare i micropozzetti con i nutrienti agli intervalli di tempo desiderati, ottenendo così una perfusione periodica del mezzo.

Descrizione dei disegni

Figura 1: Schema esemplificativo di un sistema di micropozzetti aperti invertiti utilizzato nel metodo della presente invenzione, vista prospettica (A), sezione verticale (B) e vista dall'alto (C).

Figura 2: Flusso di lavoro che mostra (A) la semina di cellule in micropozzetti, (B) colorazione integrata delle cellule, (C) perfusione di canali con mezzo di coltura supplementato con ioduro di propidio (PI), (D) incubazione senza perfusione. I passaggi (C) e (D) possono essere ripetuti per generare perfusioni periodiche più volte e in momenti specifici.

Figura 3: vitalità cellulare di KG-1 (A) e K562 (B) a 72 ore. Mentre per le cellule K562 i dati non mostrano differenze statisticamente significative tra le condizioni, per KG-1 la perfusione periodica di 24 ore preserva la vitalità cellulare, limitando i cambiamenti all'ambiente che circonda le cellule. (C) Cinetica della vitalità cellulare KG-1 e K562 e conteggio delle cellule nel test a 72 ore. I dati si riferiscono alla condizione di perfusione a 24 ore.

Figura 4: Sequenza di immagini di una linea cellulare KG-1 che mostra che la vitalità cellulare è mantenuta così come la persistenza del marcatore CMAC, con un aumento del numero di cellule nel tempo dovuto alla proliferazione. Il marker PI non è visibile poiché in questo micropozzetto non è stata osservata morte cellulare.

Figura 5: vitalità cellulare misurata dopo 72 ore in coltura, misurata al variare della frequenza di riperfusione. Linea continua: solo cellule bersaglio. Linea tratteggiata: cellule bersaglio co-coltivate con cellule effettrici.

Figura 6: (A) immagine rappresentativa di un set di micropozzetti visualizzati al microscopio a fluorescenza e a contrasto di fase. Le frecce indicano la cellula effettrice, evidenziata con colorazione con Calcein AM e il marcatore CD16/CD56. I pozzetti che contengono una singola cellula effettrice, incorniciati in figura, sono selezionati per l'analisi i cui risultati sono riportati nel grafico. (B) grafico che mostra la % di cellule effettrici che sono in grado di uccidere il numero indicato di cellule target.

Figura 7: immagine rappresentativa di un set di micropozzetti che contengono (A) una cellula effettrice non attiva o (B) una cellula effettrice attiva. LA cellula effettrice è evidenziata dalla freccia.

Figura 8: quantizzazione della potenza delle cellule effettrici ottenute dai donatori D1-D6. (A) cellule effettrici che uccidono 1 o 2 cellule target; (B) cellule effettrici 3 o più cellule target; (C) potenza delle cellule effettrici derivata dai risultati di cui ai grafici (A) e (B).

Figura 9: potenza delle cellule effettrici dai donatori D1-D3.

Figura 10: potenza su due diversi fenotipi delle cellule effettrici (A) ottenute da donatore DA; B) ottenute da donatore DC.

Descrizione dettagliata

Definizioni

Per accoppiamento ad interferenza si intende qui una cooperazione tra due elementi, per cui detti due elementi possono essere considerati come uniti. Quando detti due elementi, in questo caso un puntale ed un canale verticale, sono accoppiati per interferenza, un fluido caricato in detto puntale e rilasciato in detto canale verticale è costretto a muoversi all'interno del canale, detto

accoppiamento ad interferenza essendo tale da impedirne il passaggio di fluido, ovvero detto accoppiamento ad interferenza è tale da sigillare tra loro i due elementi.

Per connettore si intende qui qualsiasi elemento tubolare, cilindrico, più o meno rastremato, convergente o divergente atto a mettere in connessione fluidica due scomparti.

Con ri-perfusione si intende qui la sostituzione del mezzo in cui la coltura si trova con un mezzo fresco. Detto mezzo fresco è uguale oppure è diverso dal mezzo in cui detta coltura già si trova. In una forma di realizzazione, detto mezzo è terreno di coltura. In una forma di realizzazione, è terreno di coltura che comprende uno o più farmaci e/o uno o più coloranti, e/o uno o più anticorpi marcati e/o uno o più marcatori di vitalità cellulare.

Fluidi: qualsiasi sostanza in forma liquida o gassosa.

Campione biologico: campione comprendente cellule ottenute da un microrganismo, un animale e/o un essere umano, preferibilmente umano, in cui detto campione è preferibilmente scelto dal gruppo comprendente fluidi biologici o biopsie. Detto campione comprende cellule sospese oppure è un tessuto. In una forma di realizzazione preferita, si tratta di un campione di sangue o di un aspirato di midollo osseo. In alternativa, detto campione biologico è costituito da cellule in coltura, come una linea cellulare, o una composizione comprendente cellule in coltura e cellule di un paziente.

Saggio ad alto contenuto: saggio fenotipico condotto su cellule.

Time-lapse: tecnica di *imaging* che prevede una serie di riprese dello stesso campo effettuate in una sequenza temporale.

Ex vivo: test eseguito su un tessuto ottenuto da un organismo in un ambiente esterno all'organismo stesso, con minima alterazione delle condizioni naturali. Costituisce oggetto della presente invenzione un metodo adatto per saggi di citotossicità cellulo-mediata a lungo termine, cioè coltura più lunga di 24 h, o 48 h, preferibilmente 72 h.

In una forma di realizzazione, il metodo viene eseguito nel dispositivo microfluidico a micropozzetti aperti descritto in WO2017/216739.

In una forma di realizzazione, i micropozzetti aperti sono micropozzetti aperti

di circa 0,5 nL.

Vantaggiosamente, l'interfaccia a micropozzetti aperta fornisce una fonte di scambio di gas che contribuisce alla vitalità a lungo termine.

In una forma di realizzazione, il metodo qui rivendicato viene eseguito disponendo di un kit comprendente un puntale e un dispositivo microfluidico (1), Figura 1, che comprende almeno un microcanale (3) ed una regione di ingresso (8) che comprende almeno un canale verticale (18), detto puntale e detto canale verticale (18) essendo dimensionati in modo da produrre un accoppiamento ad interferenza tra di essi.

Detto puntale è scelto tra uno dei puntali disponibili in commercio che comprendono almeno una porzione prossimale destinata a cooperare con un sistema di erogazione di fluidi ed una porzione distale rastremata aperta.

Preferibilmente, detta porzione distale di detto puntale e detto canale verticale (18) sono realizzati in plastica e rendono il sistema sufficientemente elastico da garantire la tenuta, evitando guarnizioni. In una forma di realizzazione particolarmente preferita, le geometrie del sistema qui di seguito descritte assicurano che il contatto tra detto canale verticale (18) e detto puntale non avvenga in un unico punto ma sia distribuito su una porzione superficiale, assicurando inoltre un'efficace tenuta. Tale condizione è vantaggiosamente verificata laddove l'angolo di semiapertura di detta porzione terminale di detto puntale e di detto canale verticale (18) sono poco differenti, preferibilmente di meno di 10°. Ancor più preferibilmente, detto canale verticale (18) è un cilindro, eventualmente leggermente rastremato verso il basso.

La modalità di carico/scarico fluidi nel dispositivo microfluidico (1) compreso nel kit descritto comprende le seguenti fasi:

- a) Fornire un kit secondo la presente descrizione;
- b) facoltativamente, caricare un fluido in detto puntale;
- c) Posizionare detto puntale al di sopra di detta regione di ingresso (8) ed inserirlo fino a raggiungere una posizione di accoppiamento ad interferenza tra detta regione distale di detto puntale e detto canale verticale (18) in detta regione di ingresso (8);
- d) Rilasciare il fluido contenuto in detto puntale in detto dispositivo

microfluidico (1) attraverso la detta regione di ingresso (8) o, in alternativa, con lo stesso puntale, aspirare fluido già contenuto in detto dispositivo microfluidico.

Viene anche descritto un dispositivo microfluidico, che è un sistema di micropozzetti aperti invertiti che comprende una matrice di micropozzetti aperti (2), almeno un microcanale (3), almeno una porta di ingresso (8) per reagenti e/o per uno o più campioni biologici e per essi almeno una porta di uscita (10), dette porte di ingresso e di uscita essendo in comunicazione microfluidica con uno o più di detti microcanali (3), in cui detto microcanale (3) ha un'area di sezione trasversale di dimensioni micrometriche e fornisce fluido a detti micropozzetti (2), in cui detto sistema a micropozzetti aperti invertiti è, in una forma di realizzazione, inserito in un sistema di gestione automatizzato che comprende le seguenti caratteristiche: un incubatore a temperatura, umidità e CO₂ controllate, sistema di erogazione del fluido, contrasto di fase e acquisizione di immagini in fluorescenza.

Detto sistema di gestione automatizzato è ottenuto assemblando elementi noti nell'arte come incubatori per il controllo di temperatura, umidità e CO₂, sistemi di pipettaggio per micropiastre, lenti per microscopia a fluorescenza e contrasto di fase collegati ad una telecamera di acquisizione di immagini, come una telecamera CMOS o CCD, dove detti elementi sono gestiti in tutto o in parte da software noti agli esperti del ramo tramite hardware ad essi collegato.

In una forma di realizzazione particolarmente preferita, ciascun microcanale (3) è associato ad una porta di ingresso (8) ed una porta di uscita (10).

In una forma preferita di realizzazione, il dispositivo microfluidico (1) comprende anche serbatoi, in cui detti serbatoi sono almeno un serbatoio per reagenti ed almeno un serbatoio per uno o più campioni biologici. Detti serbatoi sono scelti dal gruppo comprendente: piastre, una o più piastre multipozzetti, come piastre a 96 pozzetti, provette Eppendorf. Detti serbatoi possono essere 2, oppure 4, 8, 16, 24, 48, 96, 384.

In una forma di realizzazione, il metodo secondo la presente invenzione comprende:

- Rendere disponibili almeno due popolazioni cellulari, in cui almeno una prima

popolazione cellulare comprende cellule effettrici che crescono in sospensione, almeno una seconda popolazione cellulare comprende cellule bersaglio;

- Co-cultivare dette cellule per almeno 24h, ad esempio 48h o 72h, riperfondendo periodicamente la coltura, in cui detta riperfusione avviene una volta in un periodo di tempo compreso tra 1 e 30 ore, ad esempio una volta ogni due ore, o una volta ogni 12 ore o una volta ogni 24 ore;
- Valutazione della vitalità cellulare.

In una forma di realizzazione, detto metodo è condotto in un sistema microfluidico.

In una forma di realizzazione, detto metodo viene eseguito in un sistema di micropozzetti aperti invertiti (1) che comprende una matrice di micropozzetti aperti (2), almeno un microcanale (3), almeno una porta di ingresso (8) per reagenti e/o per uno o più campioni biologici e almeno una porta di uscita (10) per gli stessi, dette porte di ingresso e di uscita essendo in comunicazione microfluidica con uno o più di detti microcanali (3), in cui detto microcanale (3) ha un'area di sezione trasversale di dimensioni micrometriche e fornisce fluido a detti micropozzetti (2).

In una forma di realizzazione, detto dispositivo microfluidico comprende 16 microcanali (3).

In una forma di realizzazione, a ciascuno di detti microcanali (3) sono collegati 1.200 micropozzetti aperti (2).

In una forma di realizzazione, detto sistema a micropozzetti aperti invertiti è gestito da un sistema di gestione automatizzato che comprende le seguenti caratteristiche: incubatore a temperatura, umidità e CO₂ controllate, sistema di erogazione del fluido, acquisizione di immagini a contrasto di fase e fluorescenza.

In una forma di realizzazione, detto metodo comprende:

- Fornire un sistema di micropozzetti aperti invertiti (1) che comprende una matrice di micropozzetti aperti (2), almeno un microcanale (3), almeno una porta di ingresso (8) per reagenti e/o per uno o più campioni biologici e almeno una porta di uscita (10) per esse, dette porte di ingresso e di uscita

essendo in comunicazione microfluidica con uno o più di detti microcanali (3), in cui detto microcanale (3) ha un'area di sezione trasversale di dimensioni micrometriche e fornisce fluido a detto micropozzetti (2);

- Fornire un sistema di gestione automatizzato di detto sistema a micropozzetti aperti invertiti che comprende le seguenti caratteristiche: incubatore a temperatura, umidità e CO₂ controllate, sistema di erogazione del fluido, acquisizione di immagini a contrasto di fase e fluorescenza.

- Collocare detto sistema a micropozzetti aperti invertiti (1) in detto sistema automatizzato;

- Caricare i reagenti attraverso una o più di dette porte di ingresso (8), in cui detti reagenti comprendono: tampone di riempimento e/o soluzione di lavaggio e/o uno o più farmaci e/o uno o più coloranti, e/o uno o più anticorpi marcati e/o uno o più marcatori di vitalità cellulare;

- Caricare dette almeno due popolazioni cellulari,

- Colorazione di dette cellule con uno o più coloranti e/o uno o più anticorpi marcati e/o uno o più marcatori di vitalità cellulare (Figura 2B);

- Acquisire immagini da uno o più di detti micropozzetti (2), in un punto temporale T0;

- Ri-perfondere periodicamente la coltura con terreni freschi, comprendenti facoltativamente uno o più farmaci e/o uno o più coloranti, e/o uno o più anticorpi marcati e/o uno o più marcatori di vitalità cellulare (Figura 2C-D);

- Acquisire immagini da uno o più di detti micropozzetti (2), in un punto temporale T1;

in cui dette fasi di ri-perfusione e acquisizione delle immagini vengono reiterate nel tempo.

In una forma di realizzazione, dette almeno due popolazioni cellulari sono caricate ad una concentrazione di circa 2×10^6 cellule/mL (Figura 2A).

In una forma di realizzazione, una di dette almeno due popolazioni cellulari è una popolazione di cellule effettrici.

In una forma di realizzazione, in almeno 400 dei 1200 micropozzetti (2) connessi a ciascun microcanale (3) è caricata una singola cellula effettrice.

In una forma di realizzazione, una di dette almeno due popolazioni cellulari è

KG-1, una linea cellulare di macrofagi umani.

In una forma di realizzazione, una di dette almeno due popolazioni cellulari è K562, linea cellulare di linfoblasti umani.

In una forma di realizzazione, dette cellule effettrici sono linfociti NK.

In una forma di realizzazione, dette cellule effettrici sono linfociti T.

In una forma di realizzazione, dette cellule T o NK sono geneticamente modificate.

Dette cellule effettrici vengono co-coltivate in presenza di cellule bersaglio.

Dette cellule bersaglio sono cellule primarie ottenute da un soggetto, oppure sono una linea cellulare.

In una forma di realizzazione, dette cellule bersaglio esprimono l'antigene riconosciuto da dette cellule effettrici.

In una forma di realizzazione, il test e il *time lapse* vengono eseguiti per un massimo di 72 ore.

In una forma di realizzazione, detto marcatore viene utilizzato per il rilevamento cellulare ed è 7-ammino-4-clorometilcumarina (CellTracker™ Blue CMAC).

In una forma di realizzazione, detto marcatore viene utilizzato per valutare la morte cellulare, ed è ioduro di propidio (PI).

In una forma di realizzazione, detto marcatore è Calceina AM.

In una forma di realizzazione, vengono selezionate co-culture omogenee, ovvero vengono selezionati quei micropozzetti che contengono una sola cellula effettrice e cellule target in una numerosità compresa in un definito range. A titolo di esempio, con riferimento alla Figura 6A, vengono selezionati i micropozzetti che contengono una sola cellula effettrice NK, evidenziata grazie alla colorazione con Calceina AM. In detti micropozzetti, vengono contate le cellule target morte, colorate con PI. Questo permette di definire la % di cellule effettrici in grado di uccidere 0 cellule target, 1, 2, 3, 4 o oltre 5 cellule target (Figura 6B). Da questo profilo, si calcola il cosiddetto *potency score*, consistente nella media pesata del numero di cellule target uccise da ciascuna cellula effettrice, avendo prima sottratto dal conteggio il numero di cellule target mediamente morte in micropozzetti che non contengono alcuna cellula effettrice.

$$\text{Potency Score} = \frac{\sum_{i=1}^N tk_i}{N}$$

Dove tk_i indica il numero di cellule target uccise dalla cellula effettrice i , normalizzato sulla morte spontanea delle stesse cellule target in assenza di cellule effettrici e N indica il numero totale di cellule effettrici.

Forma pertanto ulteriore oggetto della presente invenzione un metodo per determinare l'efficacia di una terapia cellulare (o immunoterapia), dove detto metodo comprende;

- a. Predisporre un primo set di micropozzetti contenenti ciascuno cellule effettrici e cellule target;
- b. Predisporre un secondo set di micropozzetti contenenti ciascuno cellule target;
- c. Selezionare quei micropozzetti che comprendono una singola cellula effettrice e n cellule target, dove n è compreso tra 1 e 50, preferibilmente tra 1 e 20;
- d. Mantenere le cellule in coltura per un tempo t ;
- e. Misurare la percentuale di cellule target morte in ciascuno dei micropozzetti selezionati per contenere una singola cellula effettrice;
- f. Calcolare un *potency score* consistente nella media pesata del numero di cellule target uccise da ciascuna cellula effettrice, avendo prima sottratto dal conteggio il numero di cellule target mediamente morte nel secondo set di micropozzetti.

In una forma di realizzazione, detti micropozzetti sono micropozzetti aperti invertiti di un dispositivo microfluidico come descritto nei paragrafi che precedono.

In una forma di realizzazione, le cellule effettrici sono selezionate solo se positive, oppure solo se negative, ad un marcatore di superficie che a titolo di esempio è selezionato nel gruppo che comprende CD3, CD4, CD4, CD56, CD45RA, CCR7.

In una forma di realizzazione, le cellule target morte sono conteggiate solo se positive, oppure solo se negative, ad un marcatore di superficie che a titolo di

esempio è selezionato nel gruppo che comprende CD38, HLA-DR, CD34.

Detto *potency score* permette vantaggiosamente di rappresentare in modo assoluto l'efficacia della terapia.

Il *potency score* qui definito è il numero medio di cellule target che una singola cellula effettrice in grado di eliminare, avendo testato questa attività mediante una replica ben controllata delle condizioni di test, ovvero un numero noto di cellule in un volume noto.

Un vantaggio di questo approccio è di consentire il confronto tra diverse varianti di una terapia cellulare, es. diverse fonti di cellule immunitarie (donatori o pazienti), diversi metodi di ingegnerizzazione, diversi processi di produzione. Dai dati di cui disponiamo finora, si osserva per esempio che una terapia CAR-NK può raggiungere uno score >1 per $t=12h$ o $t=24$. In un'altra serie di esperimenti si osserva che cellule NK non ingegnerizzate possono raggiungere uno score tipicamente <1 .

Vantaggiosamente, il metodo secondo la presente invenzione permette una caratterizzazione combinata funzionale e fenotipica.

Ad esempio, avendo la possibilità di osservare 4 diversi colori, si possono valutare fino a 2 marcatori di superficie in combinazione con la citotossicità. In una forma di realizzazione, il citoplasma della cellula target è colorato con CMAC (nel canale DAPI blu), e come marcatore di morte cellulare viene utilizzato il PI (nel canale TRITC giallo). È quindi possibile utilizzare due marcatori di superficie, nel canale del verde e del rosso. In questa forma di realizzazione, è ad esempio possibile selezionare la popolazione cellulare positiva all'anticorpo 1, e in questa identificare le cellule serial killer, le killer e le inattive. Questo ha permesso di osservare che la presenza di un marcatore di superficie ha una correlazione con un incremento del *potency score* (in altre parole, ci sono sottopopolazioni definite in base all'immunofenotipo che hanno *potency score* maggiori del *potency score* medio della popolazione madre).

Secondo il metodo qui descritto, la vitalità delle cellule bersaglio può essere mantenuta per 72 ore al di fuori della presenza di cellule effettrici immunitarie anche in presenza prolungata di coloranti specifici utilizzati per il rilevamento delle cellule, come 7-amino-4-clorometilcumarina (CellTracker™ Blue CMAC)

e valutazione della morte *time-lapse*, ad es. Ioduro di propidio (PI).

L'intera configurazione è stata ottimizzata in termini di metodi di *imaging*, fluidica e colorazione per ottenere una concentrazione di reagente sufficientemente alta da consentire alle cellule di essere rilevate e classificate correttamente, senza influire in modo significativo sulla loro vitalità.

Il metodo qui descritto consente di applicare queste colorazioni per l'intera durata del test per supportare un'analisi a intervalli di tempo.

In conclusione, le condizioni qui identificate garantiscono un modello costituito da linee cellulari bersaglio, un insieme di coloranti e metodi di elaborazione cellulare che garantiscono un uso a valle per saggi di potenza basati sull'analisi della morte cellulare.

Esempi

Esempio 1: analisi di fattibilità condotta su KG-1, una linea cellulare di macrofagi umani e K562, linee cellulari di linfoblasti umani, caricate, elaborate e riprese in un lasso di tempo fino a 72 ore.

Le linee cellulari K562 e KG-1 sono state caricate separatamente in più microcanali di un microdispositivo e le fasi del flusso di lavoro sperimentale includevano:

- semina cellulare in micropozzetti ad una concentrazione di 2×10^6 cellule/mL;
- preparazione/diluizione automatizzata del marker del citoplasma, CMAC, a concentrazione 7 μ M;
- colorazione cellulare automatizzata mediante infusione di CMAC in canali microfluidici;
- immunofenotipizzazione automatizzata, con diluizione, preparazione e infusione automatizzata dei reagenti;
- preparazione e diluizione automatizzate del marker di morte cellulare, PI, a concentrazione 5mM con terreno completo (RPMI + 10% FBS + 1% L-Glu + 1% Penstrep);
- colorazione cellulare automatizzata mediante infusione di terreno completo supplementato con PI;
- *imaging time-lapse* in campo chiaro/contrasto di fase e 4 canali fluorescenti ripetuto ogni 12 ore per 72 ore.

La preparazione e la perfusione periodica dei terreni di coltura con PI è stata ripetuta in determinati momenti per rinfrescare i nutrienti e per ripristinare l'intensità di fluorescenza del segnale PI. Per ogni reinfusione sono stati iniettati 100 μ l in ciascun microcanale a una portata di 10 μ l/s (tempo di risciacquo: 10 secondi). La ripetibilità del test è stata valutata replicando il test con prove indipendenti in tre giorni diversi. La vitalità cellulare è stata misurata in un lasso di tempo attraverso il rilevamento unicellulare basato sull'intelligenza artificiale e la quantificazione della percentuale di cellule con assorbimento di PI.

La linea cellulare K562 ha mostrato una vitalità media all'end-point di 72 ore, dopo la normalizzazione a T0, del 90,58% $\pm$ 6,8% per una perfusione ogni 12 ore, 86,24% $\pm$ 7,3% per una perfusione ogni 24 ore e 87% $\pm$ 0,44% per la condizione senza risciacquo.

Non c'era alcuna differenza significativa tra le condizioni (Figura 3B).

I risultati per la linea cellulare KG-1, Figura 3A, con perfusione del mezzo di coltura ogni 12 ore o ogni 24 ore hanno mostrato una vitalità media all'end point di 72 ore, dopo la normalizzazione a T0, rispettivamente dell'80,96% $\pm$ 8,19% e dell'87,54% $\pm$ 3,36%. Per la stessa linea cellulare, la vitalità a 24 ore senza perfusione del mezzo è stata di 96,71% $\pm$ 2,36% dimostrando uno stato di salute ottimale. Tuttavia, la vitalità cellulare è diminuita nel tempo fino a raggiungere una vitalità del 61,11% $\pm$ 14,16% a 72 ore, dimostrando così il vantaggio significativo portato da una perfusione del terreno periodica.

Tra le due strategie di perfusione che abbiamo testato, non c'era alcuna differenza statistica; quindi, l'approccio preferito è risciacquare ogni 24 ore per ridurre al minimo i cambiamenti nell'ambiente cellulare.

In confronto, altre microtecnologie (Halldorsson et al., Biosensors and Bioelectronics, 2015, 63: 218-231) richiedono comunemente una perfusione continua per mantenere condizioni ideali mentre il metodo secondo la presente invenzione preserva la vitalità cellulare applicando brevi e veloci perfusioni periodiche. Come riportato nella Figura 3C, queste condizioni supportano anche la crescita cellulare all'interno dei micropozzetti e, come visibile nella Figura 4, il tracker cellulare CMAC si propaga alle cellule figlie e rimane visibile per il periodo di 72 ore.

Nella Figura 4 sono riportati i risultati di un esperimento di co-coltura, confrontati con un singolo esperimento di coltura.

Le cellule bersaglio sono state co-coltivate con cellule effettrici (secondo l'invenzione) o di per sé'.

La vitalità cellulare è stata valutata dopo 72 ore di incubazione.

Diversi micropozzetti sono stati esposti a una diversa frequenza di ri-perfusione in cui detta frequenza variava da una volta ogni ora a una volta ogni 30 ore.

La linea continua nel grafico rappresenta le celle bersaglio in assenza di celle effettrici. La linea tratteggiata, cellule bersaglio co-coltivate con cellule effettrici.

In assenza di ri-perfusione, si osserva un'elevata % di morte cellulare nei due contesti sperimentali, mostrando la necessità di cambiare il terreno per mantenere una popolazione cellulare sana fino a 72 ore.

Aumentando la frequenza di ri-perfusione, le cellule sono in buona salute.

All'estremo, la ri-perfusione rende discutibile l'effetto della co-cultura.

Sorprendentemente, viene qui dimostrata una "area di lavoro", ovvero una frequenza di ri-perfusione ottimale per massimizzare la possibilità di misurare l'effetto delle cellule effettrici sulle cellule bersaglio, senza che lo stesso venga influenzato da condizioni di coltura subottimali. Detta "area di lavoro" è la frequenza in cui si osserva la differenza massima tra i due settaggi sperimentali. Le cellule effettrici coltivate di per sé o in presenza delle cellule bersaglio mostrano un andamento della loro vitalità paragonabile a quello osservato quando le cellule bersaglio vengono coltivate da sole.

Esempio 2: caratterizzazione di 6 lotti per terapia cellulare, lotti D1-D6.

Sono stati messi a disposizione 3 dispositivi microfluidici, I, II e III, rispettivamente, ciascuno comprendente 16 microcanali. Ciascuno di detti dispositivi microfluidici è stato caricato con cellule effettrici ottenute da donatori, dette cellule essendo CAR-NK. In particolare, 7 microcanali di ciascun dispositivo sono stati caricati con cellule effettrici da un donatore, 7 con cellule effettrici da un diverso donatore. 6 di detti canali caricati con cellule effettrici sono stati altresì caricati con cellule target, mentre il settimo è stato mantenuto come

canale controllo contenente esclusivamente cellule effettrici. Le cellule target utilizzate sono state le cellule Raji, linea cellulare ottenuta da un linfoma umano. I 2 canali restanti su ogni dispositivo sono stati caricati solo con cellule target, come controllo negativo.

Nei micropozzetti della co-cultura, le cellule effettrici sono state caricate in rapporto 1:10 rispetto alle cellule target. Per il tracciamento cellulare, le cellule target sono state colorate con il marcatore CMAC. Cellule effettrici sono invece state visualizzate in campo chiaro, dopo aver valutato che i marcatori CMAC e Calceina AM, che non impattano la vitalità cellulare delle cellule Raji, inducevano invece una quota di morte cellulare nelle CAR-NK.

Tramite processo automatizzato, sono state contate le cellule effettrici contenute in ciascun pozzetto, arrivando così a selezionare un totale di 1079 pozzetti contenenti una singola cellula effettrice ciascuno. Detti 1079 micropozzetti sono stati selezionati per gli step successivi. Sono quindi state contate le cellule target contenute negli stessi pozzetti.

Si noti che si è giunti a detti risultati in termini di piastratura seminando in ciascun micropozzetto 90 μ l di terreno dove cellule CAR-NK erano in sospensione ad una concentrazione di 3×10^6 cellule/ml e 330 μ l di terreno dove cellule Raji erano in sospensione alla stessa concentrazione di 3×10^6 cellule/ml. Nei micropozzetti controllo, sono stati seminati 300 μ l di terreno dove cellule CAR-NK erano in sospensione ad una concentrazione di 1.2×10^5 cellule/ml o 1200 μ l di terreno dove cellule Raji erano in sospensione ad una concentrazione di 3×10^6 cellule/ml.

Mediante colorazione con PI, si è quindi misurata la morte cellulare dopo 24 ore di incubazione della co-cultura.

A scopo indicativo, le immagini di alcuni micropozzetti sono riportati in Figura 7. Nel pannello A, sono presentati micropozzetti dove la cellula CAR-NK presente non è attiva, come evidenziato dall'assenza negli stessi di cellule target morte. Viceversa, il pannello B mostra micropozzetti esemplificativi della presenza di cellule CAR-NK serial killing, laddove, procedendo da sinistra verso destra, si passa da 1 cellula target morta per pozzetto ad oltre 5.

Vantaggiosamente, il sistema di rapido scambio automatizzato di liquido nei

pozzetti permette di ri-marcare con PI ogni 12 ore, così da compensare la naturale perdita di marcatura.

I risultati ottenuti sono stati riportati in grafico, mostrato in Figura 8. Per ogni donatore, viene riportato quante NK uccidono 1 o 2 cellule target (A), quante NK uccidono 3 o più cellule target (B). Infine, il pannello C mostra, per ciascun donatore, il *potency score*, definito secondo la presente invenzione. Il *Potency score* identifica il donatore D4 come il più potente, essendo quello avente il *Potency score* più alto.

Esempio 3: caratterizzazione di 3 lotti per terapia cellulare allogenica, lotti D1-D3.

Su uno stesso dispositivo microfluidico a 16 canali sono state caricate cellule NK da 3 diversi donatori e cellule target. Le cellule target utilizzate sono state la linea cellulare K562.

Dopo 24 ore di incubazione in co-cultura, è stata valutata la % di cellule NK in grado di uccidere 1 cellula target, definite cellule NK killer, e la % di cellule NK in grado di uccidere 2 o più cellule target, definite cellule NK serial killer.

I risultati ottenuti sono riportati in Figura 9 e mostrano la maggior potenza del donatore D1 rispetto agli altri due donatori testati nello stesso saggio.

Esempio 4: analisi multiparametrica fenotipica/funzionale

Cellule NK dal donatore A e dal donatore C sono state messe a disposizione e piastrate in un dispositivo microfluidico come descritto negli esempi che precedono.

Detta popolazione di cellule NK è stata messa in co-cultura con una popolazione eterogenea di cellule target, esprimenti il fenotipo A o il fenotipo B. La potenza delle cellule effettrici è stata quindi calcolata secondo il metodo della presente invenzione.

Come mostrato in Figura 10, per il donatore C, pannello B, è evidente un incremento della potenza di killing su cellule aventi il fenotipo B.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per determinare l'efficacia di una terapia cellulare o immunoterapia, dove detto metodo comprende;
 - a. Predisporre un primo set di micropozzetti contenenti ciascuno cellule effettrici e cellule target;
 - b. opzionalmente, predisporre un secondo set di micropozzetti contenenti ciascuno cellule target;
 - c. Selezionare quei micropozzetti che comprendono una singola cellula effettrice e n cellule target, dove n è compreso tra 1 e 50, preferibilmente tra 1 e 20;
 - d. Mantenere le cellule in coltura per un tempo t;
 - e. Misurare la percentuale di cellule target morte in ciascuno dei micropozzetti selezionati, contenenti una singola cellula effettrice;
 - f. Calcolare un *potency score* consistente nella media pesata del numero di cellule target uccise da ciascuna cellula effettrice.
2. Il metodo secondo la rivendicazione 1, dove per calcolare detto *potency score* il numero di cellule target mediamente morte nel secondo set di micropozzetti è sottratto dalla media pesata del numero di cellule target uccise da ciascuna cellula effettrice.
3. Il metodo secondo la rivendicazione 1, dove t è compreso tra 0 e 120h, o circa 72h, o circa 24h.
4. Il metodo secondo una delle rivendicazioni 1-3 che è condotto in un sistema microfluidico, dove detto metodo comprende:
 - Fornire un sistema di micropozzetti aperti invertiti (1) che comprende una matrice di micropozzetti aperti (2), almeno un microcanale (3), almeno una porta di ingresso (8) per reagenti e/o per uno o più campioni biologici e almeno una porta di uscita (10) per gli stessi, dette porte di ingresso e di uscita essendo in comunicazione microfluidica con uno o più di detti microcanali (3), in cui detto microcanale (3) fornisce fluido a detti micropozzetti (2);
 - Fornire un sistema di gestione automatizzato di detto sistema a micropozzetti aperti invertiti che comprende le seguenti caratteristiche:

incubatore a temperatura, umidità e CO₂ controllate, sistema di erogazione del fluido, acquisizione di immagini a contrasto di fase e fluorescenza.

- Collocare detto sistema a micropozzetti aperti invertiti (1) in detto sistema automatizzato;
 - Caricare i reagenti attraverso una o più di dette porte di ingresso (8), in cui detti reagenti comprendono: tampone di riempimento e/o soluzione di lavaggio e/o uno o più farmaci e/o uno o più coloranti, e/o uno o più anticorpi marcati e/o uno o più marcatori di vitalità cellulare;
 - caricare dette almeno due popolazioni cellulari;
 - colorazione di dette cellule con uno o più coloranti e/o uno o più anticorpi marcati e/o uno o più marker di vitalità cellulare;
 - ri-perfondere periodicamente la coltura con terreni freschi, eventualmente comprendenti uno o più farmaci e/o uno o più coloranti, e/o uno o più anticorpi marcati e/o uno o più marcatori di vitalità cellulare.
5. Il metodo secondo una delle rivendicazioni 1-4, dove in ciascun micropozzetto della co-cultura sono seminati 90 µl di terreno dove cellule effettrici sono in sospensione ad una concentrazione di 3×10^6 cellule/ml e 330 µl di terreno dove cellule target sono in sospensione ad una concentrazione di 3×10^6 cellule/ml.
 6. Il metodo secondo una delle rivendicazioni 1-5, dove dette cellule effettrici sono linfociti NK e/o linfociti T, eventualmente geneticamente modificati.
 7. Il metodo secondo la rivendicazione 1, dove dette cellule sono coltivate per almeno 24h, ad esempio 48h o 72h, ri-perfondendo periodicamente la coltura, in cui detta ri-perfusione avviene una volta in un periodo di tempo compreso tra 1 e 30 ore, ad esempio una volta ogni due ore, o una volta ogni 12 ore o una volta ogni 24 ore.
 8. Il metodo secondo la rivendicazione 4, dove detto sistema microfluidico comprende 16 microcanali (3).
 9. Il metodo secondo la rivendicazione 4, dove detto sistema microfluidico comprende 1.200 micropozzetti aperti (2).

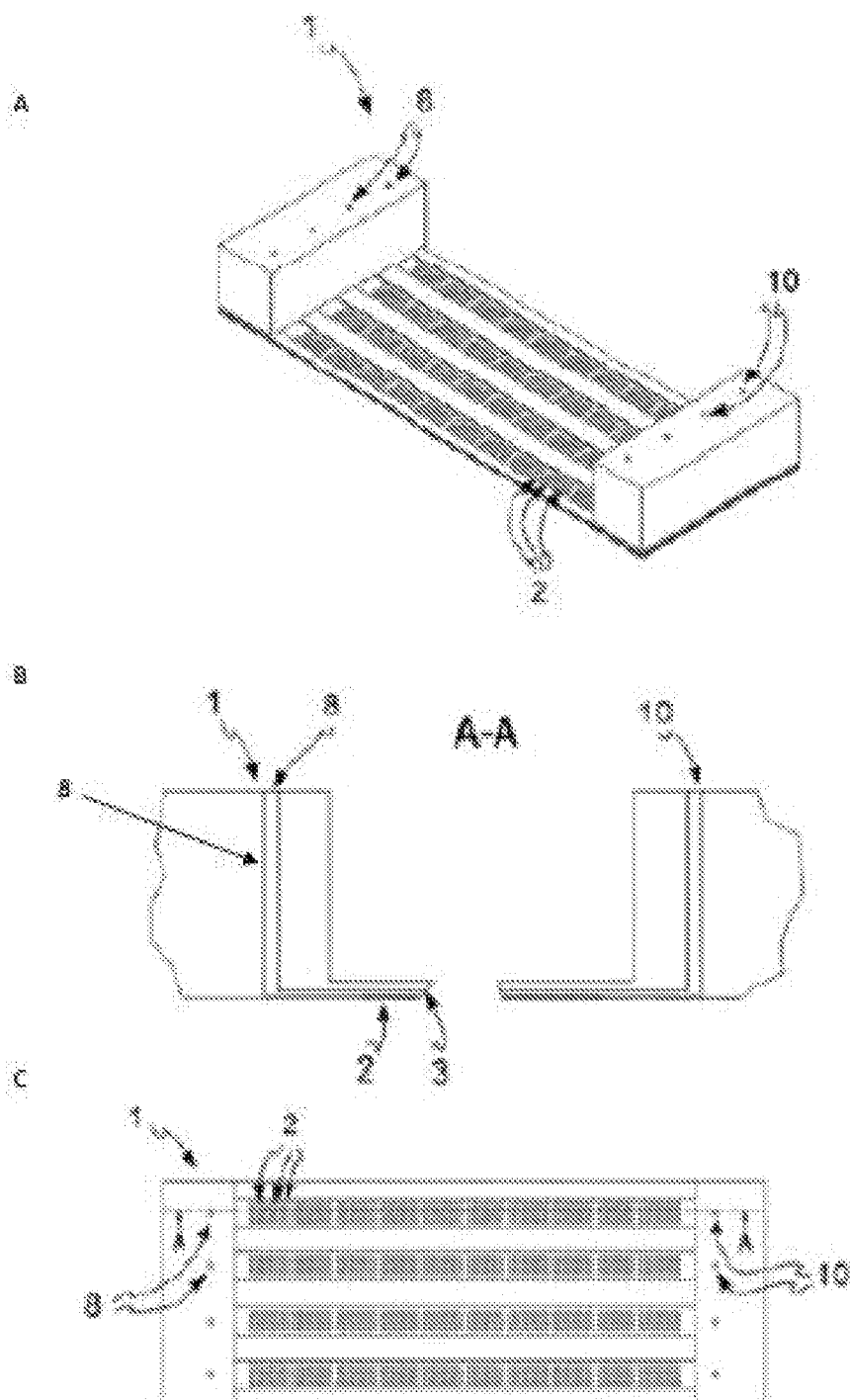


Fig. 1

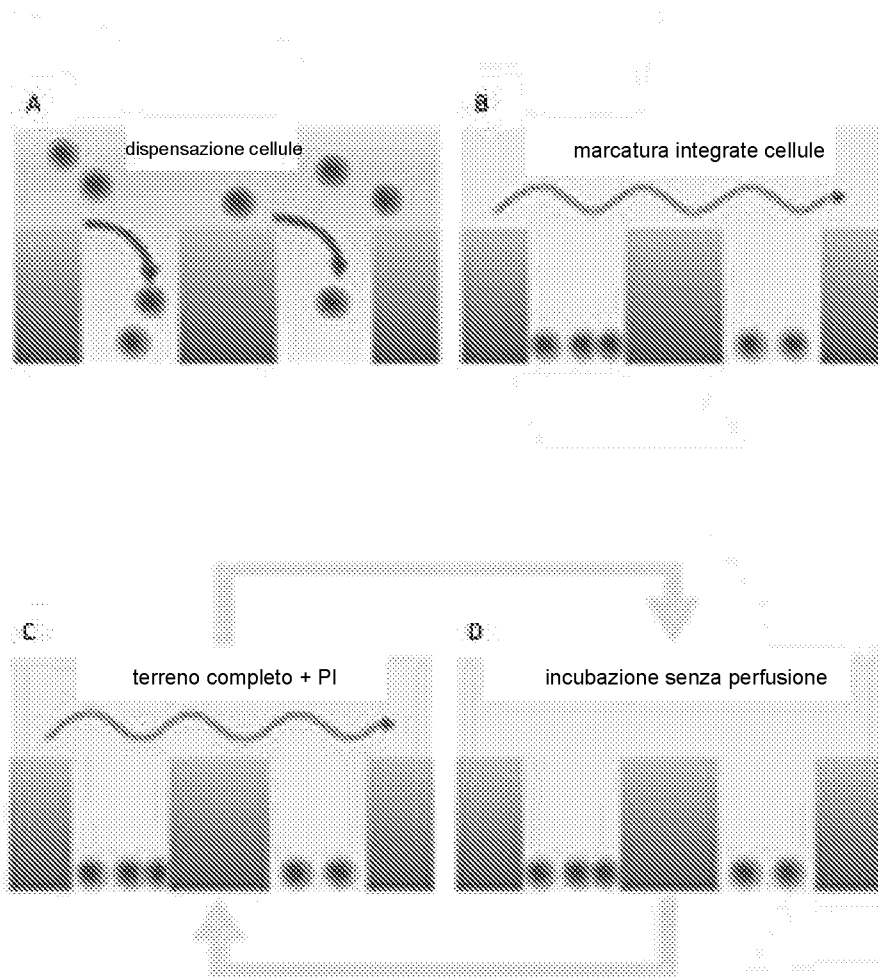


Fig. 2

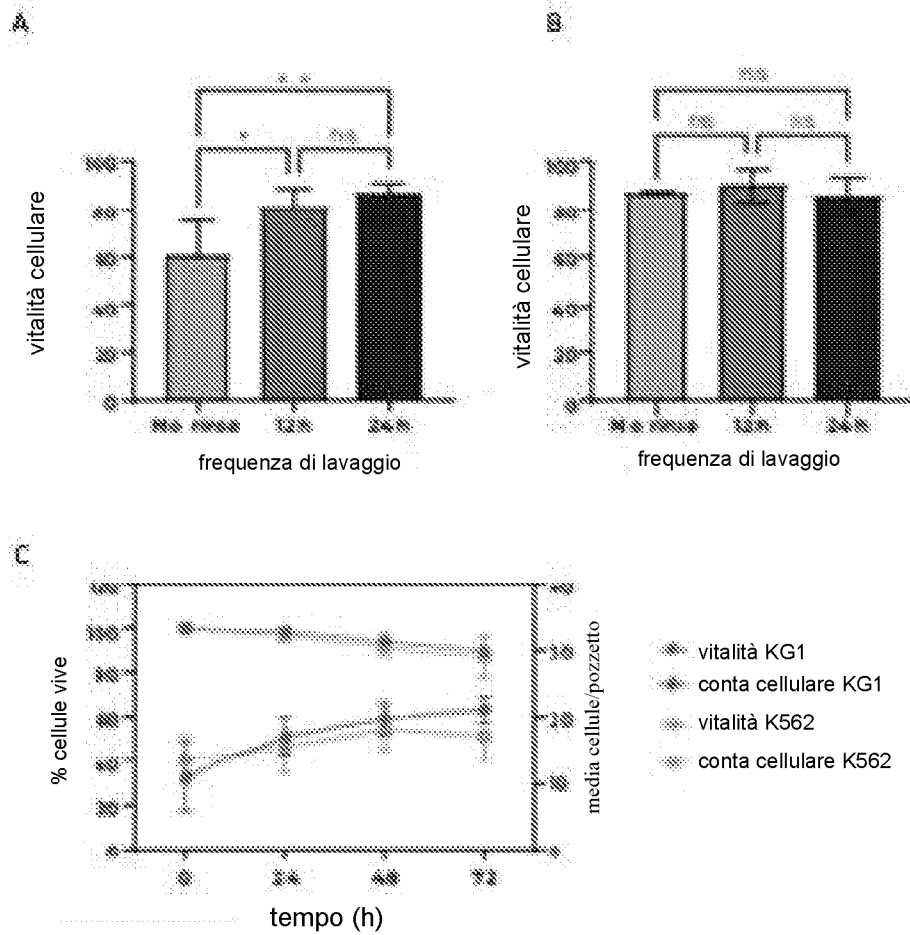


Fig. 3

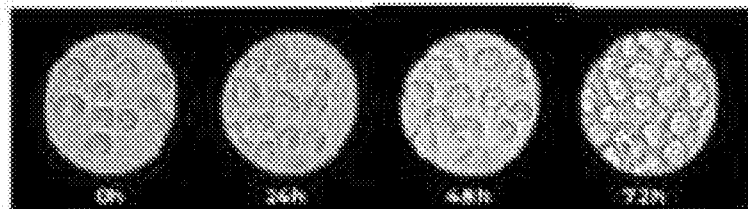
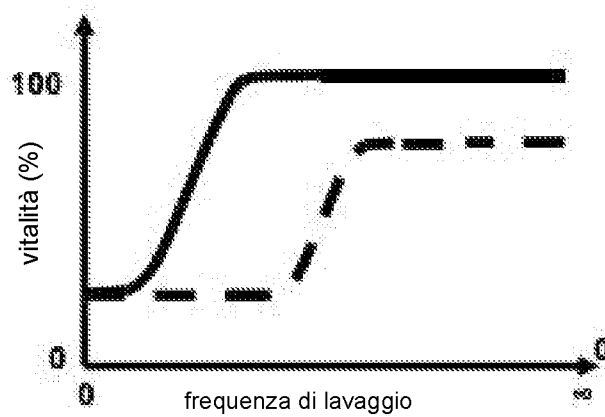


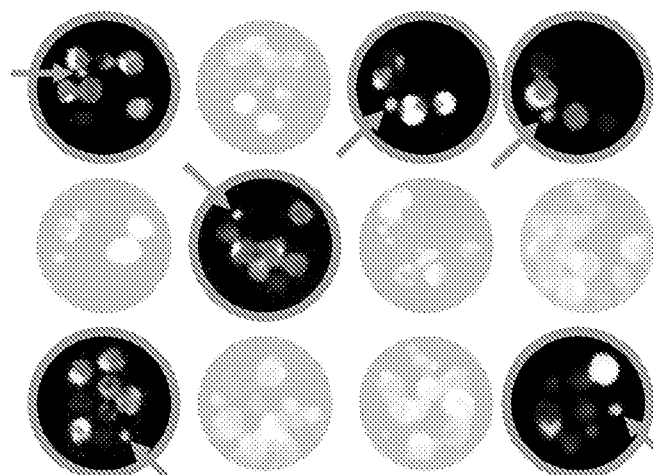
Fig. 4



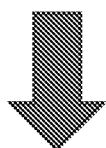
frequenza di lavaggio
0 = no lavaggio
- - - lavaggi continuo

Fig. 5

A



verde: Calcein AM (cellule NK) Giallo: anticorpo anti-CD138
 Blu: CMAC (cellule U266) o (cellule U266)
 anti-CD16/CD56 (cellule NK) Rosso: PI (cellule morte)



B

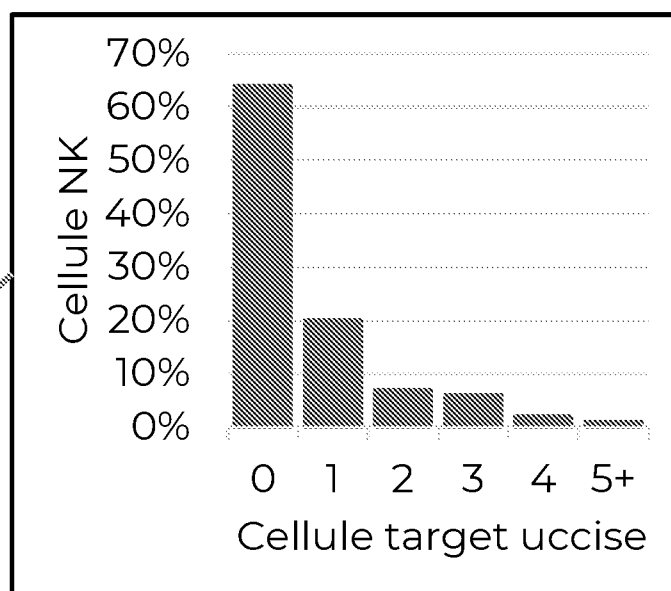


Fig. 6

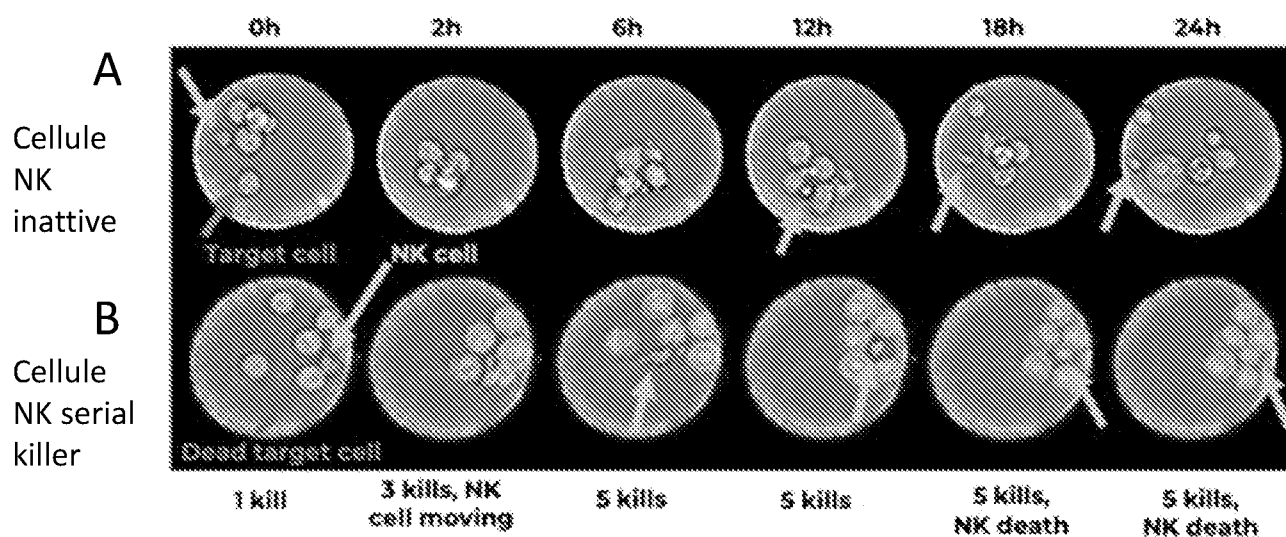


Fig. 7

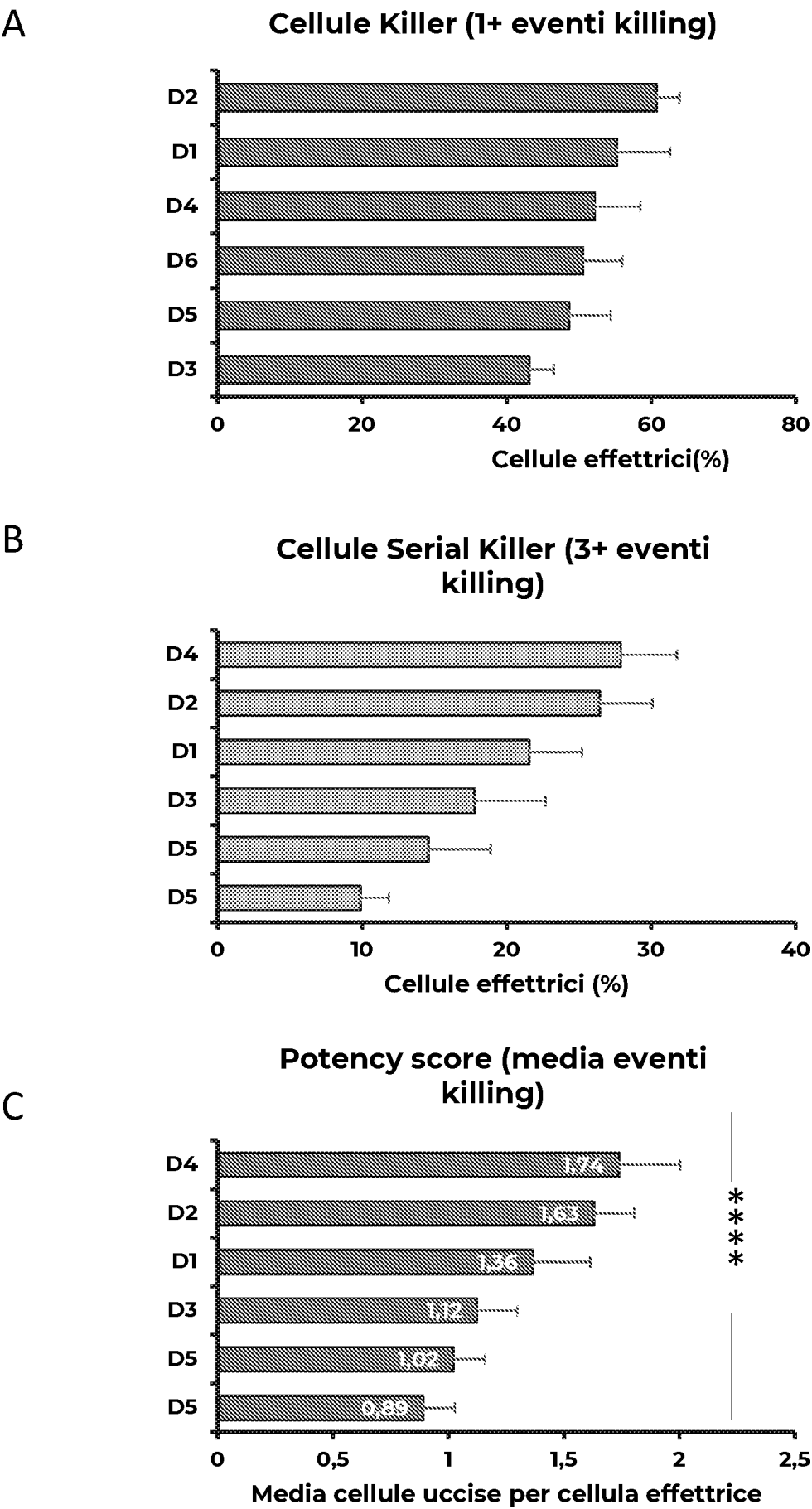


Fig. 8

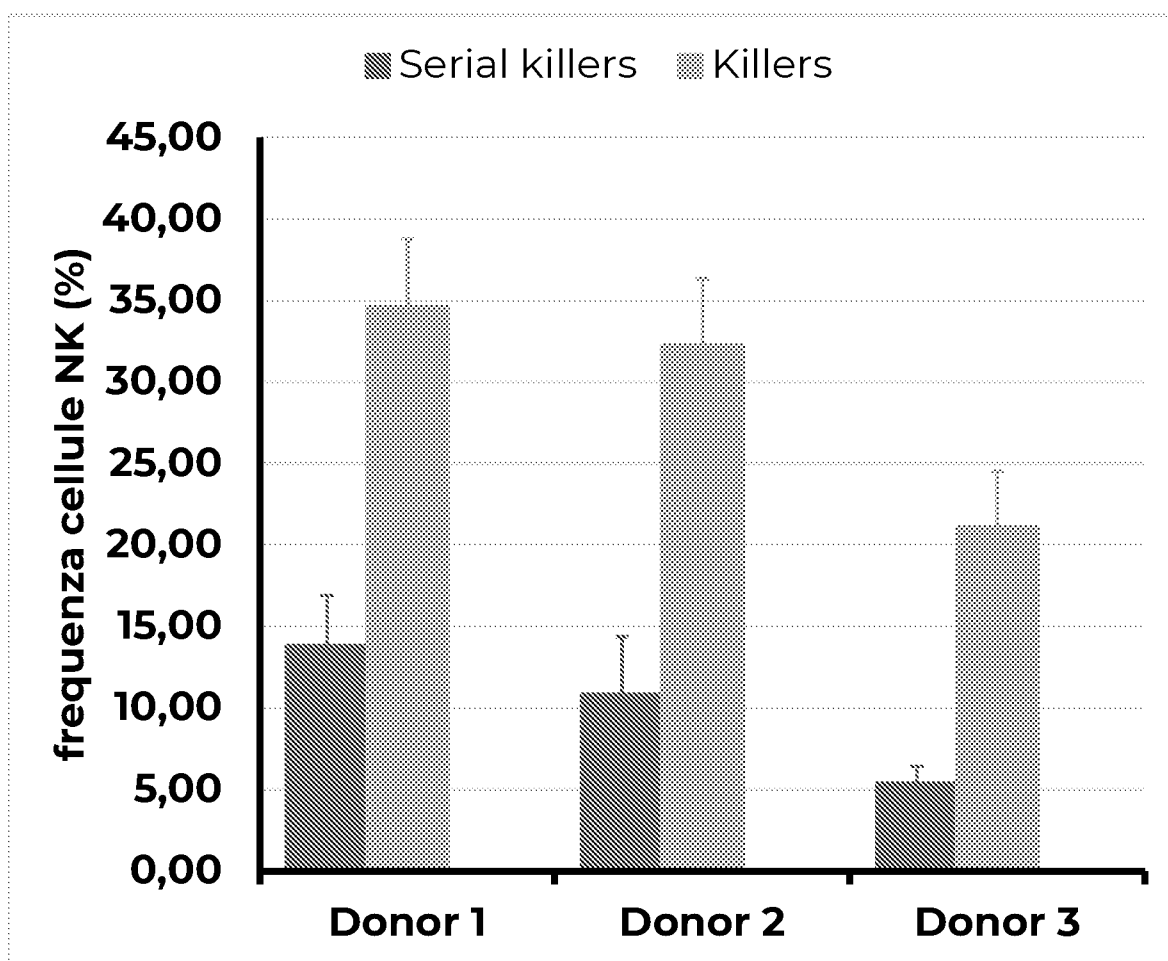
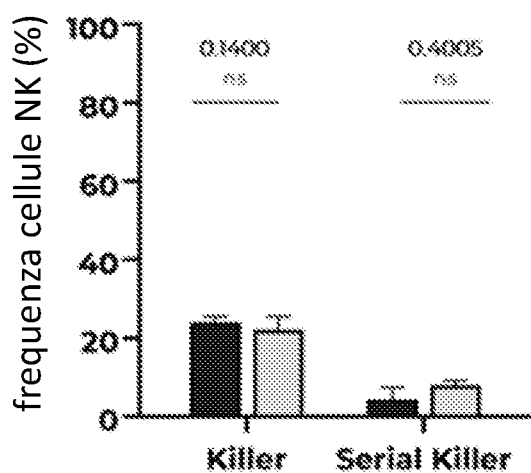


Fig. 9

A



B

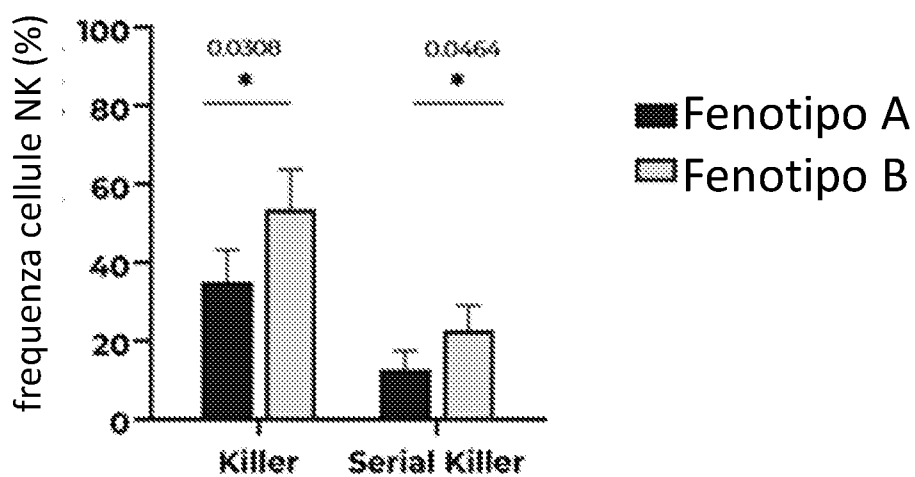


Fig. 10