

# ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902023051A1

Publication Date

20130815

Applicant

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO

Title

PROCEDIMENTO DI IDENTIFICAZIONE DI CELLULE APOPTOTICHE

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:  
"Procedimento di identificazione di cellule apoptotiche"

Di: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO, nazionalità italiana, via Verdi 8, 10124, Torino, Italia

Inventori designati: GIACHINO, Claudia; ACCOMASSO, Lisa; CAPUTO, Giuseppe; MARTRA, Gianmario; ALBERTO, Gabriele

Depositata il: 15 febbraio 2012

\* \* \*

#### DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda un procedimento di identificazione di cellule apoptotiche.

L'apoptosi è una forma di morte cellulare - differente dalla necrosi - regolata da complessi meccanismi cellulari. Nel processo apoptotico si possono distinguere tre fasi: inizio, decisione, esecuzione. La rivelazione dell'apoptosi nella fase di esecuzione è piuttosto semplice poiché si basa su evidenze morfologiche, quali il restringimento della cellula, la condensazione della cromatina e la produzione di corpi apoptotici, o su evidenze biochimiche, quali l'attivazione della caspasi e la frammentazione enzimatica del DNA intranucleosomiale. Le cellule che si trovano in una fase precoce

dell'apoptosi sono invece molto più difficili da identificare, giacché possono non presentare le caratteristiche morfologiche classiche dell'apoptosi e poiché in questo caso non può essere utilizzata la valutazione biochimica.

Metodologie per l'identificazione precoce di cellule apoptotiche sono descritte nello stato della tecnica. Tali metodologie si basano sull'interazione calcio-dipendente fra Annessina V, o una molecola capace di mimare l'Annessina V quale esempio Zn(II)-DPA, con la fosfatidilserina, che viene esternalizzata sul foglietto esterno della membrana cellulare all'avvio del processo apoptotico. Questi procedimenti prevedono la marcatura dell'Annessina V con una molecola rivelabile, generalmente un fluorocromo quale ad esempio FITC.

Gli svantaggi dei procedimenti di identificazione di cellule apoptotiche basati sull'impiego di Annessina V risiedono principalmente nell'insoddisfacente stabilità chimica dell'Annessina V, nell'insoddisfacente fotostabilità del coniugato fluorocromo-Annessina V e nell'elevata concentrazione di ioni calcio (circa 2,5 mM) necessaria per il legame fra Annessina V e fosfatidilserina. Una concentrazione così elevata

di ioni calcio può determinare falsi positivi, in quanto gli ioni calcio possono attivare i meccanismi cellulari che causano l'esternalizzazione della fosfatidilserina, anche in assenza di apoptosi.

Scopo della presente invenzione è quindi quello di mettere a disposizione un procedimento per l'identificazione di cellule apoptotiche che superi gli inconvenienti della tecnica anteriore.

Più in particolare, uno scopo della presente invenzione è quello di mettere a disposizione un procedimento per l'identificazione di cellule apoptotiche che non soffra dei problemi di stabilità chimica e fotostabilità sopra menzionati.

Un altro scopo è quello di mettere a disposizione un procedimento per l'identificazione di cellule apoptotiche che non richieda una elevata concentrazione di ioni calcio nell'ambiente di reazione.

Ancora un altro scopo è quello di mettere a disposizione un procedimento per l'identificazione di cellule apoptotiche che consenta la loro identificazione anche in uno stadio molto precoce del processo apoptotico.

Questi ed altri scopi sono raggiunti tramite un procedimento di identificazione di cellule apoptotiche, caratterizzato dal fatto di comprendere i

passaggi di:

- a) provvedere un insieme di cellule da analizzare e porre detto insieme di cellule in contatto con una pluralità di nanoparticelle di silice non funzionalizzate marcate in modo rivelabile;
- b) incubare l'insieme di cellule con le nanoparticelle; e
- c) rivelare le cellule con le quali le nanoparticelle di silice non funzionalizzate marcate in modo rivelabile interagiscono in corrispondenza della superficie esterna della membrana cellulare senza essere internalizzate nel citoplasma cellulare, identificando per mezzo di ciò le cellule apoptotiche presenti nell'insieme di cellule.

I presenti inventori hanno osservato che nanoparticelle di silice non funzionalizzate, ossia nanoparticelle sulla cui superficie non è presente alcuna biomolecola atta ad interagire in modo specifico con recettori od altre biomolecole espresse specificamente dalle cellule apoptotiche, sono sorprendentemente in grado di interagire in maniera differente con le cellule vive e con le cellule apoptotiche. In particolare, gli inventori hanno osservato che le nanoparticelle di silice non funzionalizzate si attaccano alla superficie esterna del-

la membrana delle cellule apoptotiche, mentre vengono internalizzate nelle cellule vive tramite un processo di endocitosi. Ciò consente di distinguere le cellule apoptotiche dalle cellule vive. Nell'ambito della presente descrizione, il termine "interagiscono" significa che le nanoparticelle di silice non funzionalizzate marcate in modo rivelabile si attaccano stabilmente alla superficie esterna della membrana cellulare, senza staccarsi quando le cellule vengono sottoposte a lavaggio in soluzione isotonica. Ciò indica che il legame fra le nanoparticelle e la membrana cellulare non è un artefatto.

Un vantaggio estremamente importante del procedimento della presente invenzione è che esso consente di identificare le cellule apoptotiche anche in una fase molto precoce del processo apoptotico.

In una forma di realizzazione preferita, le nanoparticelle di silice utilizzate nel procedimento dell'invenzione hanno dimensioni (cioè un diametro) inferiori o uguali a 200 nm, più preferibilmente comprese fra 20 e 100 nm, ancor più preferibilmente comprese fra 45 e 55 nm.

In un'altra forma di realizzazione preferita, le nanoparticelle di silice impiegate nel procedi-

mento dell'invenzione sono di silice amorfa.

In un'ulteriore forma di realizzazione preferita, le nanoparticelle di silice impiegate nel procedimento dell'invenzione sono particelle non porose. In alternativa le nanoparticelle di silice possono essere porose, preferibilmente mesoporose.

A titolo di esempio preferito ma non limitativo, si citano le nanoparticelle di silice per imaging ottico commercializzate con il nome IRIS Dots da Cyanine Technologies (Cyanine Technologies S.p.A., Torino, Italia). Si tratta di nanoparticelle di silice amorfa non porose, non funzionalizzate, altamente stabili, dopate con uno o più coloranti del tipo cianina.

Per rilevare l'interazione fra le nanoparticelle e le cellule, le nanoparticelle sono marcate in modo rivelabile, ad esempio con un marcatore fluorescente, chemiluminescente, elettrochemiluminescente o fosforescente. E' preferito un marcatore fluorescente, più preferibilmente un fluorocromo che emetta nel vicino infrarosso. Esempi di fluorocromi preferiti per l'uso nell'ambito della presente invenzione sono fluoresceine, cianine, rodamine, squaraine, complessi fluorescenti di metalli di transizione o di lantanidi, quantum dots.

In una forma di realizzazione preferita del procedimento dell'invenzione, il marcatore rivelabile, ad esempio il fluorocromo, è incapsulato all'interno della nanoparticella.

In alternativa, la nanoparticella può essere decorata in superficie con il marcatore rivelabile.

In un'ulteriore forma di realizzazione preferita, la nanoparticella di silice ha un primo fluorocromo incapsulato all'interno della matrice di silice ed un secondo fluorocromo, diverso dal primo, legato sulla superficie della nanoparticella (doppia marcatura).

Come sarà descritto in dettaglio nella sezione relativa alla parte sperimentale che segue, le nanoparticelle di silice non funzionalizzate sono risultate prive di qualsivoglia effetto citotossico. Pertanto, esse sono particolarmente idonee all'impiego nell'identificazione di cellule apoptotiche in colture cellulari *in vitro* o campioni tissutali *ex vivo* (quali ad esempio biopsie tissutali) ed anche in applicazioni *in vivo*, ad esempio volte allo studio o al monitoraggio degli effetti di molecole sulla proliferazione e/o la morte cellulare. Un'applicazione che rientra nell'ambito della presente invenzione è ad esempio una nanoparticella di

silice non funzionalizzata per l'impiego in un procedimento diagnostico e/o prognostico di una patologia in cui la proliferazione e/o la morte cellulare giocano un ruolo importante, come ad esempio una patologia tumorale.

La parte sperimentale che segue è fornita a scopo puramente illustrativo e non limitativo della portata dell'invenzione come definita dalle annesse rivendicazioni. Nella parte sperimentale sono descritte sperimentazioni effettuate con cellule staminali mesenchimali umane (hMSC). Tuttavia, il procedimento di identificazione di cellule apoptotiche della presente invenzione è idoneo all'identificazione di qualsiasi tipo di cellula in apoptosi, dal momento che l'apoptosi è un processo comune a tutti i tipi cellulari noti.

#### **PARTE SPERIMENTALE**

##### 1. Adsorbimento di proteine del siero su IRIS Dots

Le nanoparticelle IRIS Dots sono state sintetizzate come descritto precedentemente in G. Alberto, I. Miletto, G. Viscardi, G. Caputo, L. Latterini, S. Coluccia, G. Martra, *The Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113*, 21048-21053. In breve, nanoparticelle di silice sferiche (NPs) contenenti coloranti fluorescenti trimetidini

indocianina ( $\lambda_{\text{ex}} = 547 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 570 \text{ nm}$ ) sono state preparate tramite un metodo di microemulsione acqua-in-olio. Le NPs avevano un diametro di  $50 \pm 2 \text{ nm}$  e in una soluzione acquosa a pH 5,5 erano altamente disperse. L'intrappolamento delle molecole di colorante nella matrice di silice aveva l'effetto di stabilizzare la fotoemissione durante parecchie ore di irraggiamento. L'intensità della fotoemissione dell'indocianina era aumentata di 13 volte rispetto a quella registrata in soluzione. Poiché ciascuna nanoparticella conteneva circa 110 molecole di colorante, la brillantezza della fotoemissione di ciascuna particella era aumentata di tre ordini di grandezza.

E' noto che le proteine del siero possono essere adsorbite sulla superficie di nanoparticelle di silice e che, a seconda delle condizioni in cui si trovano le nanoparticelle, l'adsorbimento può procedere fino alla formazione di una sorta di corona che, in tal caso, è la vera superficie "vista" dalle cellule. Pertanto sono state valutate le capacità di adsorbimento delle nanoparticelle IRIS-Dots nei confronti delle proteine del siero, ed è stato trovato che in presenza di siero all'1% la quantità di proteine adsorbite rappresenta una frazione tra-

scurabile del monostrato teorico formato dalle molecole di sieroalbumina bovina (BSA) adsorbite, che sono le più abbondanti nel siero. Tale basso livello di adsorbimento veniva sostanzialmente mantenuto anche in presenza di  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  nella soluzione di siero all'1%, una condizione più vicina a quella realmente incontrata dalle nanoparticelle nei test cellulari. Questi risultati indicano che l'interazione fra nanoparticelle e membrana cellulare non è mediata dalle proteine presenti nell'ambiente biologico in cui è realizzato il procedimento di identificazione delle cellule apoptotiche secondo l'invenzione.

## 2. Rilevazione dell'uptake cellulare di IRIS Dots in cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs) tramite citometria a flusso, microscopia confocale e microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

Sono state utilizzate hMSCs isolate dal midollo osseo di donatori sani acquistate da Lonza Walkersville Inc. (Maryland, Stati Uniti d'America) e coltivate in terreno di crescita standard consistente di alphaMEM supplementato con 10% di siero fetale di vitello (siero), 1% di aminoacidi non essenziali, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  di kanamicina e 0,1% di  $\beta$ -mercaptoetanololo (tutti da Gibco® Invitrogen, Pai-

sley, Regno Unito). Tutte le colture sono state tenute in un'atmosfera di 5% CO<sub>2</sub> e 95% aria a 37°C.

In un primo set di esperimenti di uptake cellulare, le hMSCs sono state piastrate a 10.000 cellule/cm<sup>2</sup> in piastre a 24 pozzetti e poi sono state incubate con differenti concentrazioni di sospensioni di IRIS Dots (10, 20 e 40 µg/ml) in terreno alfa-MEM contenente 1% di siero per vari tempi di incubazione (2-4-6-8-24-48 h) a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, in un incubatore umidificato. Dopo il tempo indicato, le cellule sono state tripsinizzate e l'uptake delle IRIS Dots nelle cellule è stato determinato tramite citometria a flusso (CyAn ADP 7-colori).

La procedura impiegata per la citometria a flusso è descritta qui di seguito.

Le hMSCs sono state seminate a 10.000 cells/cm<sup>2</sup> in piastre a 24 pozzetti e lasciate aderire per 24 h. Le cellule sono state incubate con differenti concentrazioni di sospensioni di IRIS Dots in terreno con 1% di siero per vari tempi di incubazione. Le cellule sono poi state lavate due volte con soluzione salina tamponata al fosfato (PBS) (Gibco® Invitrogen) e raccolte mediante tripsinizzazione. Le cellule sono poi state risospese in PBS e l'emissione di fluorescenza delle IRIS Dots (FL-2)

è stata analizzata con un citometro a flusso CyAN ADP usando il software Summit 4.3 (Beckman Coulter, Fullerton, California, Stati Uniti d'America).

I risultati ottenuti sono mostrati nella tabella 1 sottostante.

Tabella 1

<b>Dosi</b>	<b>FL-2[a]</b>	<b>FL-2</b>	<b>FL-2</b>	<b>FL-2</b>	<b>FL-2</b>	<b>FL-2</b>
<b>[µg/ml]</b>	<b>2h</b>	<b>4h</b>	<b>6 h</b>	<b>8 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>
<b>10</b>	7,4	10,2	10,9	12,9	20,9	24,4
<b>20</b>	10,3	15,3	16,8	19,3	28,8	35,6
<b>40</b>	17,8	25,5	28,5	40,1	57,0	82,0

**[a] Intensità media della fluorescenza (a.u.)**

I risultati ottenuti mostrano che l'uptake delle IRIS Dots era dipendente dal tempo e dalla dose. L'uptake delle IRIS Dots iniziava già dopo 2 h di incubazione con 20 µg/ml di nanoparticelle, oppure già da una dose di 10 µg/ml di nanoparticelle dopo 4 h di incubazione.

In base a questi risultati, la dose di 20 µg/ml è stata scelta per gli esperimenti successivi.

In un secondo set di esperimenti, le hMSCs sono state piastrate in µ-slides a 8 pozzetti (Ibidi GmbH, Martinsried, Germania) e lasciate aderire per 24 ore. Le cellule sono state incubate con 20 µg/ml di IRIS Dots terreno addizionato di 1% siero per vari tempi di incubazione fino a 5 giorni, dopodi-

ché le cellule sono state lavate due volte per rimuovere le nanoparticelle in eccesso adsorbite passivamente sulla superficie cellulare e sono state ottenute delle immagini mediante microscopia confocale (unità confocale Zeiss LSM 510).

Le IRIS Dots entravano rapidamente nelle cellule e nel giro di 2 h si localizzavano vicino alla membrana cellulare.

Questa osservazione è stata confermata mediante TEM (microscopio elettronico JEOL 1010) dopo 1 h di incubazione. Per la TEM, il pellet di hMSCs è stato processato secondo la procedura descritta in S. Raimondo, C. Penna, P. Pagliaro, S. Geuna, *J Anat* **2006**, *208*,3-12. In breve, il pellet è stato fissato in 1% paraformaldeide, 1,25% glutaraldeide e 0,5% saccarosio in 0,1M tampone fosfato di Sörensen (pH 7,2) per 2 h. Dopo lavaggio in 1,5% saccarosio in 0,1M tampone fosfato di Sörensen (pH 7,2) per 6-12 h, il pellet è stato post-fissato in 2% tetrossido di osmio, disidratato e incluso in miscela di inclusione di Glauert (F. Di Scipio, S. Raimondo, P. Tos, S. Geuna, *Microsc Res Tech* **2008**, *71*, 497-502). Il plastificante dibutil ftalato è stato aggiunto a 0,5%. I campioni sono stati tagliati utilizzando un ultramicrotomo Leica Ultracut UCT e le sezioni sottili sono state colorate

con acetato di uranile e citrato di piombo, ed esaminate con un microscopio elettronico JEM-1010 a trasmissione JEOL 1010 a 80 kW.

Grandi quantità di IRIS Dots, organizzate in piccoli cluster, erano distribuite tutto intorno alle cellule ed a stretto contatto con la membrana plasmatica, che era caratterizzata da pseudopodi lunghi e ramificati. In alcuni punti, l'inizio di ciò che appariva come un processo di endocitosi era visibile come invaginazioni della membrana cellulare, che circondavano i cluster di IRIS Dots. Dopo 5 giorni di incubazione, le IRIS Dots apparivano localizzate in vescicole all'interno del citoplasma cellulare, accumulandosi nella zona perinucleare e mantenendo una brillante fluorescenza per tutto il periodo di incubazione. Tramite osservazione al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) si potevano vedere dei cluster di IRIS Dots densamente impacchettate all'interno di vescicole endocitotiche di varie dimensioni.

L'endocitosi è notoriamente il principale meccanismo di internalizzazione delle nanoparticelle di silice usate come vettori e le osservazioni effettuate tramite TEM suggeriscono che l'entrata delle IRIS Dots all'interno delle hMSCs sia mediata

da endocitosi. Esperimenti di controllo effettuati a 4°C hanno mostrato l'assenza di internalizzazione delle IRIS Dots nelle hMSCs, il che rappresenta una conferma del fatto che l'internalizzazione osservata a 37°C si verifica attraverso un processo che richiede energia. Nel processo di endocitosi, le molecole ingerite sono smistate negli endosomi precoci e poi, attraverso gli endosomi tardivi, si accumulano nei lisosomi. Pertanto, gli inventori hanno studiato tramite microscopia confocale la co-localizzazione delle IRIS Dots (fluorescenza rossa) con il Lyso-Tracker Green (fluorescenza verde), che permea liberamente attraverso le membrane cellulari e si accumula selettivamente negli endosomi/lisosomi intracellulari. Per marcare il compartimento endosomi tardivi/lisosomi le cellule sono state incubate con 2 µM Lyso-Tracker Green (Molecular probes, Invitrogen) in terreno privo di siero per 15 minuti. Poi le cellule sono state lavate tre volte con PBS e fissate con 4% paraformaldeide (Sigma-Aldrich).

E' stato così confermato che le IRIS Dots sono effettivamente internalizzate nelle hMSCs mediante endocitosi, come dimostrato dalla co-localizzazione delle IRIS Dots con il Lyso-Tracker Green negli en-

dosomi tardivi e nei lisosomi, che presentavano una fluorescenza da arancione a gialla. Questi dati dimostrano anche l'eccellente fotostabilità delle IRIS Dots a pH acido, tipico degli endosomi tardivi/lisosomi.

Per marcare il Cis-Golgi i campioni fissati sono stati permeabilizzati con 0,5% Triton X-100, bloccati con 6% siero albumina bovina e 2,5% siero normale di capra e colorati con anticorpo GM-130 (BD Transduction Laboratories) come anticorpo primario e con anticorpo capra-anti-topo coniugato Alexa 488 come anticorpo secondario. Le cellule colorate sono state montate con Mowiol (Calbiochem, San Diego, CA, Stati Uniti d'America). Le immagini in fluorescenza sono state ottenute con un microscopio laser confocale 510 Carl Zeiss usando un obiettivo 63x.

Come atteso, non è stata osservata una co-localizzazione delle IRIS Dots con il marcatore Cis-Golgi.

### 3. Valutazione della biocompatibilità delle IRIS Dots

Per valutare i possibili effetti citotossici delle IRIS Dots, la vitalità cellulare è stata esaminata con il saggio di riduzione CellTiterBlue

(Promega, Leiden, Paesi Bassi). In breve, le cellule sono state seminate in una piastra a 24 pozzetti a 10.000 cellule/cm<sup>2</sup> e lasciate aderire per 24 ore, poi il CellTiterBlue è stato aggiunto al terreno di coltura in un rapporto 1:10 per 2 h a 37°C. La fluorescenza del terreno è stata misurata utilizzando un lettore di piastre Tecan Infinite® F200 (Tecan Group Ltd, Svizzera). Le cellule sono poi state incubate con terreno addizionato di 1% siero da solo o in presenza di 20 µg/ml IRIS Dots per 2 h. Dopo l'incubazione, le cellule sono state coltivate in un terreno standard per differenti periodi di tempo e il saggio Cell Titer Blue è stato ripetuto.

Non è stata osservata alcuna evidenza di citotossicità 2 e 24 h dopo il trattamento con le IRIS Dots. La proliferazione cellulare non risultava modificata dopo trattamento con le IRIS Dots in terreno di crescita per 1-2-5 giorni.

Sono poi state analizzate le possibili alterazioni fenotipiche della superficie cellulare nelle hMSCs trattate con le nanoparticelle. A tale scopo sono stati effettuati degli esperimenti di citometria a flusso, nei quali sono stati rilevati i seguenti antigeni di superficie: CD14, CD44, CD45,

CD90 e CD105.

La procedura impiegata per la citometria a flusso è descritta di seguito.

Le hMSCs sono state seminate a 10.000 cellule/cm<sup>2</sup> in piastre a 24 pozzetti e lasciate aderire per 24 h. Le cellule sono state marcate con 20 µg/ml di IRIS Dots per 48 h in terreno con 1% siero. Le cellule sono poi state lavate due volte con PBS (Gibco® Invitrogen), raccolte mediante tripsinizzazione e colorate a temperatura ambiente per 15 minuti con anticorpi marcati con FITC (da Miltenyi Biotec: CD45, CD14, C90, C105 and C44, tutti a una diluizione di 1:20 in PBS). Le cellule sono poi state risospese in PBS e l'emissione di fluorescenza degli anticorpi marcati con FITC (FL-1) è stata analizzata con un citometro a flusso CyAN ADP usando il software Summit 4.3 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, Stati Uniti d'America).

I risultati ottenuti hanno mostrato che sia le hMSCs di controllo sia quelle trattate con le IRIS Dots esprimevano i marcatori di cellule staminali CD44, CD90 e CD105 e non esprimevano CD14 e CD45, che non sono marcatori di cellule staminali, senza alcuna differenza statisticamente significativa fra i livelli di espressione nei controlli e nelle cel-

lule trattate. Questi risultati suggeriscono che la marcatura delle hMSCs con le IRIS Dots non altera in maniera significativa la loro staminalità, in termini di fenotipo della superficie cellulare.

Successivamente, gli inventori hanno studiato il potenziale di differenziamento delle hMSCs in osteociti, per esaminare i possibili effetti negativi delle IRIS Dots sulle funzioni delle cellule staminali. Il differenziamento osteogenico è stato studiato tramite colorazione Alizarin red (Sigma-Aldrich).

Per indurre il differenziamento osteogenico, le cellule colorate e non colorate con IRIS Dots sono state seminate in piastre a 6 pozzetti a 15.000 cellule/cm<sup>2</sup> e poi sono state trattate con terreno osteogenico per 21 giorni, cambiando il terreno tre volte la settimana. Il terreno osteogenico consisteva di terreno addizionato di 2% di siero supplementato con desametasone (100 nM),  $\beta$ -glicerolo fosfato (10 mM), e acido ascorbico (284  $\mu$ M) (tutti da Sigma-Aldrich). Al giorno 21, il differenziamento osteogenico è stato valutato misurando il livello di deposizione di calcio nella matrice extracellulare. Le cellule sono state lavate due volte con PBS e fissate in 70% etanolo per 1 h a temperatura

ambiente, lavate e colorate con Alizarin Red Solution (Sigma-Aldrich) 40 mM (pH 4,2) per 10 minuti. Le cellule e la matrice sono poi state lavate cinque volte con acqua distillata e poi con PBS per 15 minuti per rimuovere la colorazione non specifica. Per quantificare il grado di mineralizzazione, il sale minerale è stato estratto usando 10% cetilpiridinio cloruro in 10 mM sodio fosfato (pH 7,0) e l'assorbanza è stata misurata a 562 nm su un lettore di piastre Tecan Infinite® F200 (Tecan Group Ltd, Svizzera). I risultati ottenuti indicano che le IRIS Dots non influivano sulla capacità delle hMSCs di differenziarsi in osteociti.

Nel loro insieme, questi dati indicano che le nanoparticelle di silice IRIS Dots sono biocompatibili.

#### 4. Capacità delle IRIS Dots di discriminare fra cellule vive e cellule in una fase precoce di apoptosi

Allo scopo di valutare la capacità delle IRIS Dots di discriminare fra cellule vive e cellule apoptotiche, gli inventori hanno trattato le hMSCs con Actinomicina D (ActD), un agente che induce l'apoptosi, dopodiché hanno aggiunto le IRIS Dots e hanno analizzato le cellule tramite colorazione con Annessina V (una piccola proteina che si lega alla fosfatidilserina in presenza di  $Ca^{2+}$ ) coniugata con

isotiocianato di fluoresceina (FITC).

Più in dettaglio, le hMSCs sono state piastrate in piastre a 6 pozzetti ad una densità di 7.000 cellule/cm<sup>2</sup> e poi sono state trattate per 48 h con 10 µg/ml di Actinomicina D (ActD) in terreno addizionato con 1% di siero. Dopo l'induzione dell'apoptosi, le IRIS Dots sono state aggiunte al terreno ad una concentrazione di 20 µg/ml per 24 h. Per gli esperimenti di doppia-marcatura con Annexina V-FITC (Miltenyi Biotec), sono state raccolte sia cellule che si erano staccate spontaneamente sia cellule tripsinizzate, sono state lavate due volte in Annexin V-Binding Buffer (Miltenyi Biotec) e poi sono state incubate con Annexina V diluita 1:20 in Annexin V-Binding Buffer (per 15 minuti a temperatura ambiente).

Per gli esperimenti di doppia-marcatura con calceina-AM, sono state usate le stesse condizioni di incubazione con le IRIS Dots. La calceina-AM (Calceina Acetossimetil Estere) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, Stati Uniti d'America) è un composto non fluorescente permeabile che viene tagliato dalle esterasi intracellulari a produrre calceina fluorescente verde che viene trattenuta nel citosol.

Calceina-AM 2  $\mu$ M è stata aggiunta al terreno 45 minuti prima della fine dell'incubazione con le IRIS Dots. Sono state raccolte sia cellule che si erano staccate spontaneamente sia cellule tripsinizzate e sono state lavate. Tutti i campioni sono stati fissati con 4% paraformaldeide, lavati di nuovo e trasferiti su vetrini copri-oggetto pretrattati con poli-lisina. I vetrini sono stati montati con Mowiol. Le immagini in fluorescenza sono state ottenute con un microscopio laser confocale 510 Carl Zeiss usando un obiettivo 63x.

Gli inventori hanno osservato che quasi il 98% delle cellule trattate erano Annessina V-FITC positive, come atteso.

L'aspetto più interessante è che è stata osservata una peculiare distribuzione delle nanoparticelle di silice non funzionalizzate IRIS Dots sulla superficie esterna della membrana cellulare di quelle cellule che erano positive per l'Annessina V, cioè le cellule apoptotiche. La calceina-AM (un colorante che viene trattenuto nel citoplasma delle cellule vive e delle cellule nella fase precoce dell'apoptosi, ma non nel citoplasma delle cellule in fase tardiva di apoptosi né delle cellule morte per necrosi, che hanno membrane plasmatiche compro-

messe), è stata utilizzata per dimostrare che le IRIS Dots si localizzavano sulla superficie cellulare esterna delle cellule nella fase precoce dell'apoptosi, mentre si localizzavano nel citoplasma delle cellule vive. I risultati ottenuti hanno dimostrato che le IRIS Dots non co-localizzavano con la calceina-AM nelle cellule apoptotiche, mentre erano completamente co-localizzate con la calceina-AM nelle cellule vive e questi due tipi di distribuzioni erano altamente distinguibili.

La peculiare distribuzione delle IRIS Dots nelle cellule apoptotiche è stata confermata mediante TEM, che ha mostrato che le IRIS Dots erano localizzate tutto intorno alla membrana plasmatica, incluse in una matrice leggermente elettron-densa. Poiché gli inventori hanno dimostrato che l'adsorbimento delle proteine dal terreno di coltura da parte delle IRIS Dots è trascurabile, la natura e la composizione chimica della matrice elettron-densa che circonda le IRIS Dots attaccate alla superficie esterna delle cellule apoptotiche rimane da delucidare.

I risultati ottenuti mostrano che l'Annessina V e le nanoparticelle di silice non funzionalizzate impiegate nel procedimento della presente invenzione

hanno permesso l'identificazione della stessa popolazione di cellule in fase precoce di apoptosi. Tuttavia, mentre l'Annessina V viene facilmente fotodegradata, con una rapida riduzione della sensibilità della colorazione nei primi 10 minuti di eccitazione continua con laser, la rilevazione dell'apoptosi con le nanoparticelle di silice non funzionalizzate risulta essere molto più fotostabile.

## 5. Conclusioni

Gli inventori hanno dimostrato che le IRIS Dots non funzionalizzate possono marcare efficientemente le hMSCs. La procedura di applicazione utilizzata per marcare le hMSCs è veloce (solo 2 h di incubazione in terreno addizionato con 1% siero), la concentrazione delle IRIS Dots necessaria per una marcatura efficiente è bassa (20 µg/ml di mezzo di coltura), e le cellule marcate possono essere visualizzate mediante citometria a flusso, microscopia confocale e TEM. Inoltre, le IRIS Dots non influiscono sulla vitalità cellulare, sulla crescita delle cellule, sul fenotipo della superficie cellulare e sul potenziale differenziativo delle hMSCs, e le cellule marcate rimangono rivelabili dopo crescita a lungo termine. Soprattutto, è stato dimostrato per la prima volta che nanoparticelle di si-

lice non funzionalizzate permettono di discriminare fra cellule vive e cellule apoptotiche, incluse cellule in una fase precoce dell'apoptosi, grazie a una peculiare distribuzione delle nanoparticelle sulla superficie esterna della membrana delle cellule apoptotiche. Infine, le nanoparticelle di silice non funzionalizzate utilizzate nel procedimento della presente invenzione sono più fotostabili di Annessina V-FITC impiegato nel saggio convenzionale per la rilevazione di apoptosi.

Nonostante nella parte sperimentale che precede siano descritte sperimentazioni effettuate specificamente con cellule staminali mesenchimali umane (hMSC), il procedimento di identificazione di cellule apoptotiche della presente invenzione è idoneo all'identificazione di qualsiasi tipo di cellula in apoptosi, dal momento che l'apoptosi è un processo comune a tutti i tipi cellulari noti. E' altresì evidente che, nonostante la parte sperimentale faccia specifico riferimento alle nanoparticelle IRIS Dots di Cyanine Technologies S.p.A., qualsiasi nanoparticella di silice non funzionalizzata è idonea all'impiego nel procedimento della presente invenzione.

## RIVENDICAZIONI

1. Procedimento di identificazione di cellule apoptotiche, caratterizzato dal fatto di comprendere i passaggi di:

a) provvedere un insieme di cellule da analizzare e porre detto insieme di cellule in contatto con una pluralità di nanoparticelle di silice non funzionalizzate marcate in modo rivelabile;

b) incubare l'insieme di cellule con le nanoparticelle; e

c) rivelare le cellule con le quali le nanoparticelle di silice non funzionalizzate marcate in modo rivelabile interagiscono in corrispondenza della superficie esterna della membrana cellulare senza essere internalizzate nel citoplasma cellulare, identificando per mezzo di ciò le cellule apoptotiche presenti nell'insieme di cellule.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui le nanoparticelle di silice non funzionalizzate marcate in modo rivelabile hanno dimensioni inferiori o uguali a 200 nm, preferibilmente comprese fra 20 e 100 nm, più preferibilmente comprese fra 45 e 55 nm.

3. Procedimento secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui le nanoparticelle di silice non funzionaliz-

zate marcate in modo rivelabile sono nanoparticelle di silice amorfa.

4. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 3, in cui le nanoparticelle di silice non funzionalizzate marcate in modo rivelabile sono nanoparticelle di silice non porose.

5. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 3, in cui le nanoparticelle di silice non funzionalizzate marcate in modo rivelabile sono nanoparticelle di silice porose, preferibilmente mesoporose.

6. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 5, in cui le particelle di silice non funzionalizzate marcate in modo rivelabile sono marcate con uno o più marcatori rivelabili.

7. Procedimento secondo la rivendicazione 6, in cui le particelle di silice non funzionalizzate marcate in modo rivelabile sono marcate con uno o più fluorocromi.

8. Procedimento secondo la rivendicazione 7, in cui detti uno o più fluorocromi emettono nel vicino infrarosso.

9. Procedimento secondo la rivendicazione 7 o 8, in cui le particelle di silice non funzionalizzate sono marcate con un fluorocromo che è incapsulato

dentro le nanoparticelle.

10. Procedimento secondo la rivendicazione 7 o 8, in cui le nanoparticelle di silice non funzionalizzate sono decorate in superficie con un fluorocromo.

11. Procedimento secondo la rivendicazione 7 o 8, in cui le nanoparticelle di silice non funzionalizzate sono marcate con un primo fluorocromo che è incapsulato dentro le nanoparticelle e sono decorate in superficie con un secondo fluorocromo.

12. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 11, in cui le cellule sono cellule staminali, preferibilmente cellule staminali mesenchimali (MSC).

13. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 12, in cui le cellule sono cellule umane.

14. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 13 che è effettuato *in vitro* o *ex vivo*.

15. Nanoparticella di silice non funzionalizzata marcata in modo rivelabile per l'uso in un procedimento diagnostico e/o prognostico.

16. Nanoparticella di silice non funzionalizzata marcata in modo rivelabile per l'uso secondo la rivendicazione 15, in cui il procedimento è per la diagnosi e/o prognosi di una patologia tumorale.

## CLAIMS

1. A method of identifying apoptotic cells, characterized in that it comprises the steps of:

a) providing a group of cells to be analyzed and contacting said group of cells with a plurality of non-functionalized detectably-labeled silica nanoparticles;

b) incubating the group of cells with the nanoparticles; and

c) detecting the cells with which the non-functionalized detectably-labeled silica nanoparticles interact on the outer surface of the cell membrane without being internalized into the cell cytoplasm, whereby the apoptotic cells which are present in the cell group are identified.

2. The method according to claim 1, wherein the size of the non-functionalized detectably-labeled silica nanoparticles is less or equal to 200 nm, preferably comprised between 20 and 100 nm, more preferably comprised between 45 and 55 nm.

3. The method according to claim 1 or 2, wherein the non-functionalized detectably-labeled silica nanoparticles are amorphous silica nanoparticles.

4. The method according to any of claims 1 to 3, wherein the non-functionalized detectably-labeled

silica nanoparticles are non-porous silica nanoparticles.

5. The method according to any of claims 1 to 3, wherein the non-functionalized detectably-labeled silica nanoparticles are porous silica nanoparticles, preferably mesoporous silica nanoparticles.

6. The method according to any of claims 1 to 5, wherein the non-functionalized detectably-labeled silica nanoparticles are labeled with one or more detectable labels.

7. The method according to claim 6, wherein the non-functionalized detectably-labeled silica nanoparticles are labeled with one or more fluorochromes.

8. The method according to claim 7, wherein said one or more fluorochromes emit in the near infrared.

9. The method according to claim 7 or 8, wherein the non-functionalized detectably-labeled silica nanoparticles are labeled with a fluorochrome which is encapsulated in the nanoparticles.

10. The method according to claim 7 or 8, wherein the surface of the non-functionalized detectably-labeled silica nanoparticles is decorated with the fluorochrome.

11. The method according to claim 7 or 8, wherein the non-functionalized detectably-labeled silica nanoparticles are labeled with a first fluorochrome which is encapsulated in the nanoparticles and are surface-decorated with a second fluorochrome.

12. The method according to any of claims 1 to 11, wherein the cells are stem cells, preferably mesenchymal stem cells (MSC).

13. The method according to any of claims 1 to 12, wherein the cells are human cells.

14. The method according to any of claims 1 to 12, which is performed *in vitro* or *ex vivo*.

15. A non-functionalized detectably-labeled silica nanoparticle for use in a diagnostic and/or prognostic method.

16. The non-functionalized detectably-labeled silica nanoparticle for use according to claim 15, wherein the method is for the diagnosis and/or prognosis of a tumor disease.