



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102006901405940
Data Deposito	13/04/2006
Data Pubblicazione	13/10/2007

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N		

Titolo

METODO PER LA SELEZIONE E/O IL PROCESSAMENTO DI PARTICELLE, IN PARTICOLARE CELLULE.

DESCRIZIONE

di Brevetto per Invenzione Industriale

di SILICON BIOSYSTEMS S.P.A.

13 APR 2006

di nazionalità italiana,

con sede a VIALE ERCOLANI, 3

40138 BOLOGNA

Inventori:

La presente invenzione riguarda un metodo per la selezione e/o il processamento di particelle, in particolare particelle costituite da cellule o includenti cellule o materiale cellulare e trova applicazione principalmente nella implementazione di protocolli con risoluzione su singola cellula. Per "processamento" di cellule deve intendersi qui e di seguito qualsiasi tipo di operazione eseguibile su una singola particella o cellula, o su gruppi di esse.

STATO DELL'ARTE

Il brevetto PCT/WO 00/69565 a G. Medoro descrive un apparato e metodo per la manipolazione ed individuazione/riconoscimento di particelle tramite l'utilizzo di gabbie di potenziale dielettroforetico chiuse ed eventuali sensori integrati. Il metodo descritto insegna come controllare la posizione di ciascuna particella indipendentemente da tutte le altre in uno spazio bidimensionale. La forza utilizzata per intrappolare in so-

PLEBANI Rinaldo
Iscrizione Albo nr 358/BVI

sensione in un mezzo fluido le particelle è la dielettroforesi negativa. Il controllo individuale sulle operazioni di manipolazione avviene tramite la programmazione di elementi di memoria e circuiti associati a ciascun elemento di una schiera di elettrodi e sensori integrati in uno stesso substrato. Il dispositivo consente di isolare cellule, ma richiede la movimentazione di queste verso una seconda microcamera, fluidicamente isolata dalla prima. Inoltre non è previsto un metodo per trasformare le cellule.

Il brevetto US 6,294,063 Becker et al. descrive un metodo ed apparato per la manipolazione di pacchetti di materiale biologico solido, liquido o gassoso mediante una distribuzione di forze programmabili. Il brevetto cita anche l'uso di sensori. Anche in questo caso l'isolamento di cellule può avvenire solo spostando fisicamente le cellule attraverso tutto il dispositivo.

Una ulteriore forza per la manipolazione di particelle, è la forza di attrito viscoso generata da flussi elettro-idrodinamici (EHD), quali i flussi elettro-termici (ETF) o l'AC elettro-osmosi. In NG. Green, A. Ramos and H. Morgan, J. Phys. D: Appl. Phys. 33 (2000) gli EHD sono utilizzati per spostare particelle. Per esempio PCT WO 2004/071668 A1 descrive un apparato per concentrare particelle su degli elettrodi, sfruttando i sud-

LIBRARI Rinaldo
Albo nr 358/BMI

detti flussi elettro-idrodinamici.

Nella domanda di brevetto italiano BO2005A000481, Medoro et al., sono riportati alcuni metodi per manipolare particelle con schiere di elettrodi, e alcuni metodi ed apparati per la loro individuazione.

Nella domanda internazionale di brevetto n. PCT/IT02/00524, è invece descritto un metodo in cui prime entità biologiche possono essere trasformate venendo messe a contatto con seconde entità biologiche (per es. liposomi che contengono DNA, o microbiglie), ove le prime entità biologiche sono immobilizzate su una superficie definita da una matrice di primi elettrodi almeno in parte selettivamente attivabili ed indirizzabili, disposti affacciati ad almeno un secondo elettrodo, e vengono contattate con le seconde entità biologiche spostate tramite gabbie di dielettroforesi.

La domanda di brevetto n. PCT ____IB 2006000636 della stessa Richiedente è relativa ad un metodo e apparato per la caratterizzazione e/o il conteggio di particelle mediante campi di forza non uniformi, tempo variabili e sensori ottici o impedenziometrici integrati. I campi di forza possono essere di dielettroforesi positiva o negativa, elettroforesi o moti elettro-idrodinamici, caratterizzati da un insieme di punti di equilibrio stabili per le particelle (solide, liquide o gassose);

lo stesso metodo si adatta alla manipolazione di goccioline (particelle liquide) sfruttando effetti noti come *Electrowetting* su dielettrico, con l'obiettivo di agire sul controllo della posizione di ciascuna particella presente nel campione, al fine di spostare tali particelle in modo deterministico o statistico, per rilevarne la presenza con i sensori ottici o impedenziometrici integrati e/o caratterizzarne il tipo, al fine di contarle o manipolarle in modo efficiente.

Nella domanda italiana a nome della stessa Richiedente, n. TO2006A000226 del 27.3.2006 vengono descritti metodi ed apparati per il processamento (ad esempio lavaggio, incubazione, ecc.) di particelle in cui le particelle in sospensione in un primo fluido sono introdotte in regime di flusso laminare in almeno una prima microcamera o prima regione della stessa, in cui un secondo fluido viene introdotto in regime di flusso laminare in almeno una seconda regione della microcamera o di una seconda microcamera, in modo da non miscelarsi con il primo fluido, ed in cui si attiva nella/e microcamera/e almeno un campo di forza (F) agente sulle particelle, per provocare uno spostamento delle sole particelle in un verso prefissato e trasferire le stesse in sospensione nel secondo fluido;

si utilizza preferibilmente un apparato includente almeno tre microcamere disposte tra loro in sequenza in una direzione e ciascuna connessa con la microcamera immediatamente precedente e seguente tramite due orifizi sfalsati tra loro in direzione perpendicolare alla direzione di sequenza delle microcamere.

Recentemente, nell'articolo *A single cell electroporation chip, Lab on a Chip*, 2005, 5 (1), 38 - 43, Michelle Khine, Adrian Lau, Cristian Ionescu-Zanetti, Jeonggi Seo and Luke P. Lee è stato descritto come incrementare la permeabilità delle membrane cellulari mediante elettroporazione eseguita su singole cellule; in questo modo, sostanze polari che non potrebbero altrimenti permeare la membrana plasmatica (quali coloranti, medicinali, DNA, proteine, peptidi e aminoacidi) possono essere introdotte nella cellula.

L'articolo *Flow-through micro-electroporation chip for high efficiency single-cell genetic manipulation, Sensors and Actuators A: Physical. Volume 104, Issue 3, 15 May 2003, Pages 205-212*, Yong Huang, Boris Rubinsky descrive in particolare la manipolazione genetica di cellule individuali, che è di grande interesse in campi come la biologia e le biotecnologie, ottenuta attraverso un chip di elettroporazione che impiega canali micro-fluidici per manipolare con precisione

singole cellule; come è noto la elettroporazione è una tecnica che impiega intensi campi elettrici per indurre ri-arrangiamenti strutturali nella membrana cellulare; pori sono così formati attraverso la membrana quando il potenziale di transmembrana supera la tensione di perforazione dielettrica della membrana (0.2-1.5V) permettendo a sostanze esterne di penetrare la membrana e raggiungere il citoplasma in essa contenuto.

La elettroporazione di singole cellule è una tecnica di interesse anche perché permette di studiare le variazioni che occorrono in una popolazione cellulare cellula per cellula, come anche di studiare la chimica intracellulare, ad esempio fornendo specifici fenotipi a cellule individuali attivando o bloccando la espressione di specifiche e singole proteine. Utilizzando una tecnologia basata sull'uso di matrici implementate su chip è pertanto possibile realizzare apparecchiature per test HTS (high throughput screening) correlati sia alla espressione di DNA e proteine, sia a composti chimici (ad esempio medicinali) che sono diretti verso specifici bersagli cellulari (ad esempio recettori).

La elettroporazione di singole cellule è inoltre una tecnologia vantaggiosa rispetto ai protocolli di elettroporazione in bulk normalmente utilizzati, che

richiedono voltaggi molto alti ($>10^3$ V) e che non permettono un controllo efficace della permeabilità delle singole cellule, per cui, ad esempio, la richiusura di pori precedentemente aperti risulta difficile.

I tentativi effettuati finora per conseguire la elettroporazione di singole cellule vanno dall'uso di microelettrodi in fibra di carbonio (Lundqvist et al., 1998) ad altre tecniche quali capillari riempiti di elettrolita, micropipette, e chip microfabbricati.

Dispositivi microfabbricati sono ideali sia per isolare singole cellule che per focalizzare il campo elettrico.

Infine, l'articolo "Controlling cell destruction using dielectrophoretic forces", A. Menachery and R. Pethig, *IEE Proc.-Nanobiotechnol.*, Vol. 152, No. 4, August 2005, riporta uno studio sulla lisi di cellule per diversi tipi di cellule in elettrodi castellati o polinomiali, e propone la lisi o la elettroporazione differenziale di cellule dei diversi tipi presenti in una mistura (scegliendo frequenze ed ampiezze tali da lisarne o elettroporarne un tipo, ma risparmiarne un altro).

Tuttavia, siccome gli elettrodi sono molto più grandi delle cellule, non viene proposto di usare questo

approccio, e probabilmente non è possibile usarlo, per distruggere/elettroporare selettivamente singole cellule indipendentemente dal loro tipo. Di fatto, poiché la posizione rispetto agli elettrodi relativamente grandi (e di conseguenza l'intensità del campo cui sono soggette) varia considerevolmente, tale metodo non può operare in modo omogeneo sulle varie cellule.

La lisi è preferibilmente indotta utilizzando campi in un intervallo di frequenze compreso tra la frequenza di cross-over (oltre la quale le cellule passano da dielettroforesi negativa (nDEP) a positiva (pDEP)), e minori della frequenza oltre la quale il potenziale di membrana risulta attenuato per via del superamento della costante di rilassamento della membrana.

Altri documenti di recente pubblicazione, quali WO2005/075656 e US2005/0070018A1, sono relativi a apparati per elettroporazione di singole cellule basati sull'utilizzo di una schiera o matrice di micro-elettrodi, sui quali le cellule sono coltivate aderenti (secondo la domanda di brevetto internazionale) o muniti di microfilì conduttivi per collegare le cellule da elettroporare agli elettrodi e di canali microfluidici per lo spostamento delle cellule. Tali apparati non danno la possibilità di organizzare le

PIEDANI Rinaldo
Iscrizione Albo nr 358/BMI

cellule in modo deterministico, e la posizione delle cellule rispetto agli elettrodi risulta aleatoria. Pertanto, il campo elettrico cui sono soggette al momento dell'elettroporazione risulta alquanto variabile, così che lo stimolo applicato risulta statisticamente a volte eccessivo (causando la morte della cellula), o insufficiente, mancando di elettroporare la cellula. La percentuale di successo nel processo di elettroporazione risulta pertanto sub-ottimale e meno efficiente.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

Scopo della presente invenzione è quello di fornire un metodo ed un apparato per operare su campioni fluidi contenenti particelle, tipicamente cellule, per effettuare la trasformazione di una o più cellule, che sia privo delle limitazioni e/o degli inconvenienti descritti per l'arte nota.

È in particolare uno scopo della presente invenzione quello di agire sul controllo della posizione di ciascuna particella presente nel campione, al fine di spostare tali particelle in modo deterministico, per operare in modo selettivo su ciascuna cellula e/o operare in modo più efficace operazioni del tipo elettroporazione.

Qui e nel seguito, con i termini "particelle" o

"particella" si vogliono indicare entità micrometriche o nanometriche, naturali o artificiali, quali cellule, componenti subcellulari, virus, liposomi, niosomi, microbiglie. A volte sarà usato il termine cellula, ma ove non altrimenti specificato, esso dovrà essere inteso come esempio non limitante dell'utilizzo per la rilevazione e caratterizzazione di particelle nel senso più ampio sopra descritto.

La presente invenzione è pertanto relativa ad un metodo come specificato nella rivendicazione 1

In particolare, vengono utilizzati campi di forza non uniformi, tempo variabili e sensori ottici integrati. I campi di forza possono essere di dielettroforesi positiva o negativa, elettroforesi o moti elettro-idrodinamici, caratterizzati da un insieme di punti di equilibrio stabili per le particelle (solide, liquide o gassose).

In questo modo le limitazioni dell'arte nota sono superate dalla presente invenzione.

L'implementazione del metodo secondo l'invenzione consente di trasformare cellule in modo efficace e selettivo, ad esempio con l'introduzione di materiale genetico esogeno. Inoltre, permette di purificare in modo accurato un campione di cellule, eventualmente trasformate, anche da contaminanti presenti in bassa

LEANI Riccardo
Iscrizione Albo nr 358/BMI

percentuale. Infine consente di isolare rapidamente poche cellule di interesse da un campione eterogeneo. Il tutto mediante l'adozione di una singola tecnologia basata su una medesima schiera di microelettrodi che vengono utilizzati sia per muoverle le cellule entro una microcamera in cui la schiera di elettrodi è incorporata, che per produrne la elettroporazione. Ulteriori caratteristiche e vantaggi dell'invenzione appariranno chiari dalla descrizione che segue di alcuni suoi esempi di attuazione non limitativi, effettuata con riferimento alle figure dei disegni annessi.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

La figura 1 illustra schematicamente le fasi del metodo secondo il trovato attuato in un apparato di manipolazione illustrato in sezione in alzata;

La figura 2 illustra con sequenze fotografiche prese in pianta dall'alto rispetto all'apparato di figura 1, l'attuazione pratica del metodo di figura 1;

La figura 3 illustra con sequenze fotografiche alcune cellule prima e dopo la elettroporazione;

Le figure 4, 5a, 5b illustrano schematicamente possibili protocolli di attuazione del metodo secondo il trovato. 3

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

La presente invenzione ha come scopo la realizzazione di un metodo per la manipolazione e/o la trasformazione e/o lo studio delle condizioni di elettroporazione ottimali e/o la individuazione di particelle.

Il metodo dell'invenzione si basa sull'utilizzo di un campo di forza (F) non uniforme tramite il quale attrarre singole particelle o gruppi di particelle (BEAD) verso posizioni di equilibrio stabile (CAGE). Tale campo può essere ad esempio un campo di dielettroforesi (DEP) negativa (NDEP) o positiva (PDEP), un campo elettroforetico (EF) oppure un campo di moti elettroidrodinamici (EHD).

Il processamento operato sulle cellule si basa sull'applicazione di campi elettrici localizzati in grado di provocare la permeabilizzazione temporanea della membrana cellulare.

Il metodo può avvalersi anche dell'utilizzo di sensori integrati, preferibilmente di tipo ottico e/o impedenziometrico per esempio in tutti quei passi in cui sia necessario verificare il tipo di particelle in prossimità di certi elettrodi. Alternativamente si può disporre di una informazione simile tramite sensori ottici non integrati, accoppiati ad un microscopio che consente di esaminare il contenuto della microcamera.

Generazione delle forze

Esistono diversi metodi per la generazione di forze per spostare particelle, secondo l'arte nota, mediante schiere di elettrodi (EL), realizzate su un substrato. Tipicamente, secondo precedenti privative della stessa Richiedente (figura 1), viene usato un coperchio (LID), che può essere a sua volta un elettrodo, il quale delimita una microcamera, all'interno della quale si trovano le particelle (BEAD) tipicamente in sospensione liquida. Nel caso di dielettroforesi (DEP), le tensioni applicate sono tensioni periodiche in fase (V_{phip}) indicate con il simbolo di somma (+) e controfase (V_{phin}) indicata con il simbolo di sottrazione (-). Con il termine "tensioni in controfase" s'intende tensioni sfasate di 180 gradi. Il campo genera una forza che agisce sulle particelle in una regione di spazio (CAGE), attraendole verso un punto di equilibrio (PEQ). Nel caso di DEP negativa (NDEP), è possibile realizzare gabbie di forza chiuse, secondo l'arte nota, se il coperchio (LID) è un elettrodo conduttivo; in tal caso il punto di equilibrio (PEQ) si realizza in corrispondenza di ciascun elettrodo connesso a V_{phin} (-) se gli elettrodi adiacenti sono connessi alla fase opposta V_{phip} (+) e se il coperchio (LID) è connesso alla fase V_{phin} (-). Tale punto di equilibrio (PEQ) è normalmente distanziato nel liquido rispetto agli

elettrodi, per cui le particelle (BEAD) sono, in stato stazionario, in levitazione. Nel caso di DEP positiva (PDEP) il punto di equilibrio (PEQ) si trova normalmente in corrispondenza della superficie su cui sono realizzati gli elettrodi, e le particelle (BEAD) sono, in stato stazionario, in contatto con essa. Per la PDEP non è necessario avere ulteriori elettrodi nel coperchio, perché i punti di equilibrio della PDEP corrispondono ai massimi del campo elettrico. Per i moti elettro-idro-dinamici (EHD), le configurazioni di elettrodi, generano dei flussi che spingono le particelle verso punti di minimo del flusso.

Per semplicità, nel seguito si considera a titolo puramente esemplificativo, e pertanto non limitativo ai fini della presente invenzione, l'uso di gabbie chiuse di dielettroforesi negativa come forza di attuazione per la fase di movimentazione delle particelle nella descrizione dei metodi (per questo è necessario usare un coperchio che funga da elettrodo) dell'invenzione. Agli esperti del settore con ordinarie capacità è evidente come sia possibile generalizzare i metodi ed apparati descritti in seguito per l'impiego di diverse forze di attuazione, e diversi tipi di particelle.

Elettroporazione di particelle assistita da

PIEDANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr 358/BMI)

manipolazione dielettroforetica

Le particelle vengono posizionate in prossimità del gap tra due elettrodi da una delle forze di attuazione sopra citate, ad esempio energizzando gli elettrodi stessi con tensioni sinusoidali di una prima ampiezza e frequenza. Il gap è preferibilmente inferiore ai 10 μm , e tipicamente dell'ordine di 1-2 μm , così che anche uno stimolo a bassa tensione, compatibile con la tensione di alimentazione di un circuito integrato (es. 2.5, 3.3 o 5 V) sia sufficiente a determinare un potenziale trans-membrana in grado di provocare la permeabilizzazione reversibile della particella.

Questo stimolo è preferibilmente costituito da un treno di impulsi sinusoidali di una seconda ampiezza ad una seconda frequenza.

Figura 1 mostra in sezione l'evoluzione temporale dei campi di forza e dei "pattern" (ovvero il complesso di configurazioni di stato (+) o (-) degli elettrodi) di tensioni applicati agli elettrodi secondo una realizzazione preferenziale dell'invenzione. In Figura 1(a) le cellule (CELL) sono in nDEP, in sospensione nel liquido in un primo punto di equilibrio (MPEQ). In Figura 1(b) il pattern di tensioni applicato agli elettrodi (EL) muta, così la frequenza ed opzionalmente la ampiezza delle tensioni applicate, così che anche la

FLEANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr 358/BMI)

forza cui le cellule (CELL) sono soggette muta in pDEP (FZAP). Tuttavia, grazie al cambiamento del pattern di tensioni solo la cella da elettroporare (CELLZ) è sottoposta ad una forza significativa, per cui viene attratta verso un nuovo punto di equilibrio stabile (ZPEQ). In prossimità di tale punto il campo elettrico è massimo e la frequenza è tale per cui si provoca un potenziale transmembrana sufficiente ad elettroporare la cellula. In questo modo almeno un composto (PL) presente in sospensione, è in grado di penetrare all'interno della cellula.

Tale composto può essere un composto chimico (colorante, medicinale, peptide) in soluzione nel fluido in cui le particelle sono immerse, oppure potrebbe per esempio essere un plasmide, etc. secondo l'arte nota, ovvero potrebbero essere presenti in sospensione nel fluido seconde particelle PL di tipo e quantità desiderate..

Figura 2 Illustra la elettroporazione di una singola cellula. Le cellule, Figura 2(a), sono intrappolate in nDEP (frequenza = 50 kHz, tensione agli elettrodi 3.3 V picco-picco, Tensione al coperchio 6.6 V picco-picco). Figura 2(b) mostra l'immagine in fluorescenza. Il campo viene poi mutato in pDEP (due impulsi a 500 kHz, ampiezza tensione agli elettrodi 2 V picco-picco,

ampiezza tensione al coperchio 4 V picco-picco), e la cellula selezionata subisce un'apertura dei pori che provoca il rilascio di calceina (precedentemente caricata nelle cellule, ai fini dell'esecuzione dell'esperimento) e la diminuzione della fluorescenza (Figura 2(c)).

Coi sensori integrati, di tipo ottico con rilevamento di fluorescenza (si veda i precedenti brevetti della stessa Richiedente) si può verificare l'effettiva trasformazione, per esempio tramite l'espressione di Green Fluorescent Protein (GFP).

Metodo per l'ottimizzazione degli stimoli di elettroporazione

Sulla schiera di elettrodi si possono posizionare le cellule e provare su ciascuna di esse o gruppi di esse, stimoli con diversi parametri di ampiezza e/o frequenza per determinare rapidamente lo stimolo più efficace.

Per esempio l'elettroporazione può essere verificata con i sensori ottici integrati, come sopra descritto, o con il monitoraggio dell'eventuale ingresso di un dye (tintura o colorante) all'interno della cellula (per esempio Trypan blue), normalmente incapace di penetrare la membrana.

Figura 3 illustra le cellule in Trypan blue prima, Figura 3(a), e dopo, Figura 3(b), l'elettroporazione

secondo il protocollo precedentemente descritto. In Figura 3(b) si nota che il Trypan blue è entrato nella cellula. Con i sensori ottici integrati si può rilevare l'ingresso del colorante e rilevare l'avvenuta elettroporazione.

In alternativa si può verificare la dispersione di un colorante presente all'interno della cellula, causata dalla diffusione del colorante all'esterno all'apertura dei pori. Per esempio potrebbe essere calceina, fluorescente all'interno della cellula, che viene rilasciata all'esterno e determina un calo della fluorescenza della cellula, come precedentemente descritto.

Il metodo prevede di applicare iterativamente stimoli di intensità crescente sulle singole cellule, misurare il numero di cellule elettroporate per definire la curva di dipendenza della percentuale di elettroporazione in funzione degli stimoli applicati.

Metodo per l'aggiustamento degli stimoli di elettroporazione per ciascuna cellula

Sulla schiera di elettrodi si possono posizionare le cellule e provare su di esse stimoli di intensità crescente e verificare con i sensori ottici integrati l'eventuale ingresso di un colorante normalmente incapace di penetrare la membrana.

In base a quanto descritto, è evidente che l'invenzione permette di effettuare la selezione o il processamento di prime particelle sensibili alla applicazione di uno stimolo esterno e prevede il passo di produrre, tramite la applicazione di tale stimolo esterno, la permeabilizzazione di almeno una selezionata detta prima particella; in particolare prevede i passi di:

a) portare le prime particelle (CELL) in prossimità di elettrodi (EL) di una schiera di elettrodi selezionabili aventi dimensioni paragonabili o inferiori a quelle delle dette particelle, ai quali è applicabile una prima configurazione (PMAN) di tensioni per organizzare dette prime particelle (CELL) mediante un primo campo di forza (FMAN) energizzando selettivamente detti elettrodi (EL);

b) applicare a detti elettrodi una seconda configurazione (PZAP) di tensioni, in modo da realizzare un secondo campo di forza (FZAP), localizzato sostanzialmente in prossimità di almeno una selezionata prima particella da permeabilizzare (CELL) e tale da produrre la applicazione a detta almeno una selezionata prima particella di uno stimolo atto a portare detta almeno una prima particella selezionata in uno stato permeabilizzato per almeno una frazione del tempo di durata di detto stimolo.

Il metodo secondo l'invenzione comprende inoltre il passo di:

c) portare in contatto con detta almeno una prima particella selezionata in uno stato permeabilizzato, almeno una seconda particella; ove i passi b) e c) sono eseguiti in modo da produrre la penetrazione della detta almeno una seconda particella entro la detta almeno una prima particella selezionata in uno stato permeabilizzato, come è illustrato schematicamente in figura 1.

Le prime particelle sono immerse in un fluido ed il passo c) viene eseguito immergendo le seconde particelle nel fluido e prolungando detto passo b) per un tempo sufficiente a permettere che almeno una detta seconda particella penetri nella detta almeno una prima particella selezionata, che si trova in uno stato permeabilizzato.

In alternativa, le seconde particelle vengono immerse nel fluido e si sposta poi almeno una selezionata detta seconda particella verso detta almeno una prima particella selezionata tenuta in uno stato permeabilizzato, preferibilmente applicando ad almeno detta selezionata seconda particella un campo di forza (FMAN) ottenuto energizzando selettivamente gli elettrodi (EL) della schiera di elettrodi selezionabili

PLEBANI Rinaldo
Iscrizione Albo nr 358/BMI

applicando agli elettrodi una sequenza di configurazioni di tensioni scelte opportunamente.

Lo stimolo applicato dal campo può essere tale da mantenere le selezionate prime particelle in uno stato permeabilizzato per un tempo prefissato anche dopo la rimozione dello stimolo stesso; il passo c) può pertanto venire eseguito immergendo le seconde particelle nel fluido in cui sono immerse le prime particelle e spostando le prime particelle in uno stato permeabilizzato verso le seconde particelle applicando alle stesse un campo di forza (FMAN) ottenuto energizzando selettivamente gli elettrodi (EL) della schiera di elettrodi selezionabili applicando agli elettrodi una sequenza di configurazioni di tensioni prefissate.

Con riferimento alle figure 4,5a,5b le prime particelle possono essere immerse in un primo fluido, ad esempio possono essere già contenute in sospensione nel primo fluido; e il passo c) venire eseguito immergendo le seconde particelle in un secondo fluido contiguo al primo (nel quale, ad esempio, le seconde particelle possono essere già immerse) e spostando le particelle in uno stato permeabilizzato (elettroporate) nel primo fluido dal primo fluido al secondo applicando alle stesse un campo di forza (FMAN) opportuno energizzando

PLEBANI Rinaldo
Iscrizione Albo nr 358/BMI

gli elettrodi applicando agli stessi elettrodi una sequenza di configurazioni di tensioni prefissate. Successivamente, le prime particelle trasformate alla ricezione al proprio interno delle seconde particelle possono essere riportate nel primo fluido, sempre applicando una opportuna configurazione o sequenza di configurazioni di tensioni agli elettrodi.

Quando le prime particelle sono immerse in un fluido, il metodo descritto può alternativamente comprendere il passo di

- c) introdurre nel fluido in cui le prime particelle sono immerse almeno un composto in soluzione; e
- d) permettere a detto composto di penetrare entro le prime particelle che si trovano in uno stato permeabilizzato (precedentemente elettroporate tramite gli elettrodi).

Quando le prime particelle sono immerse in un primo fluido contenuto in una microcamera provvista della schiera di elettrodi, il metodo secondo il trovato (figura 4) comprende i passi di:

- c) introdurre nella microcamera un secondo fluido operando in moto laminare in modo che il secondo fluido non si mescoli con il primo (figura 5a);
- d) introdurre nel secondo fluido almeno un composto in soluzione (operazione che può ovviamente avvenire anche

prima della fase di introduzione del secondo fluido nella microcamera - figura 5a);

e) spostare le prime particelle in uno stato permeabilizzato dal primo fluido al secondo applicando alle stesse un campo di forza (FMAN) ottenuto energizzando selettivamente detti elettrodi (EL) di detta schiera di elettrodi selezionabili applicando a detti elettrodi una sequenza di configurazioni di tensioni prefissate (figura 5b);

f) permettere a detto composto di penetrare entro selezionate prime particelle in stato permeabilizzato, previa elettroporazione di tali selezionate prime particelle, operazione che può avvenire mentre le prime particelle si trovano immerse nel secondo liquido/fluido oppure, se lo stimolo impartito è atto a mantenere le prime particelle cui è applicato in uno stato permeabilizzato per un tempo prefissato anche dopo la rimozione dello stimolo, mentre le prime particelle si trovano ancora nel primo fluido, per poi spostarle nel secondo mentre si trovano ancora in uno stato permeabilizzato.

Generalizzando, le prime particelle possono venire immerse in una pluralità di fluidi diversi contenuti in una microcamera provvista di detta schiera di elettrodi e che sono stati introdotti in detta microcamera

PLEBANI Rinaldo
/iscrizione Albo nr 358/BMI

operando in moto laminare in modo che detti fluidi diversi non si mescolino tra loro.

Preferibilmente, come descritto, le prime particelle sono entità biologiche provviste di una membrana permeabilizzabile e lisabile, ad esempio una cellula, e lo stimolo consiste nel portare il potenziale di transmembrana delle particelle selezionate ad un valore tale da produrre la permeabilizzazione della membrana.

Il fluido in cui vengono, secondo il trovato, immerse le particelle da elettroporare è sempre scelto in modo da presentare una conducibilità elettrica relativamente bassa, in modo che sia possibile andare in pDEP, così da attrarre le cellule nei massimi di campo, sufficienti a provocare un potenziale transmembrana tale da creare dei pori.

Secondo una possibile variante del metodo del trovato, infine, esso prevede di applicare stimoli di intensità crescente ad una pluralità di selezionate dette prime particelle e di misurare, per ciascuno stimolo applicato, il numero di particelle presenti in uno stato permeabilizzato tramite sensori integrati con detta schiera di elettrodi, in un unico chip. Ad esempio, le prime particelle sono immerse in un fluido e il fluido contiene un composto atto a venire rilevato dai sensori almeno quando penetra entro quelle dette

PLEBANI Rinaldo
Iscrizione Albo nr 358/BMI

prime particelle che si trovano in uno stato permeabilizzato.

Metodo per l'aggiustamento a priori degli stimoli di elettroporazione per ciascuna cellula

Qualora siano disponibili (per esempio a seguito di caratterizzazioni come dai precedenti metodi), informazioni circa il valore ottimale degli stimoli dipendentemente dalle caratteristiche della cellula, si può adottare il seguente metodo "a priori".

Sulla schiera di elettrodi si possono individuare preventivamente con i sensori (preferibilmente integrati nel chip, ottici e/o impedenziometrici), le caratteristiche di ciascuna cellula da elettroporare, quali ad esempio le dimensioni, e programmare gli stimoli da applicare localmente in modo da ottimizzare la percentuale di successo della elettroporazione per ogni specifica cellula, localmente sito per sito, ovvero elettrodo per elettrodo.

PLEBANI Rinaldo
Iscrizione Albo nr 358/BMI

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per la selezione o il processamento di prime particelle sensibili alla applicazione di uno stimolo esterno, comprende il passo di produrre, tramite la applicazione di detto stimolo esterno, la permeabilizzazione di almeno una selezionata detta prima particella, caratterizzato dal fatto di comprendere i passi di:

a) portare dette prime particelle (CELL) in prossimità di elettrodi (EL) di una schiera di elettrodi selezionabili aventi dimensioni paragonabili o inferiori a quelle delle dette particelle, ai quali è applicabile una prima configurazione (PMAN) di tensioni per organizzare dette particelle (CELL) mediante un primo campo di forza (FMAN) energizzando selettivamente detti elettrodi (EL);

b) applicare a detti elettrodi una seconda configurazione (PZAP) di tensioni, in modo da realizzare un secondo campo di forza (FZAP), localizzato sostanzialmente in prossimità di almeno una selezionata prima particella da permeabilizzare (CELL) e tale da produrre la applicazione a detta almeno una selezionata prima particella di uno stimolo atto a portare detta almeno una prima particella selezionata in uno stato permeabilizzato per almeno una frazione

CEBANI Rinaldo
Brevetto Albo nr 358/BMI

del tempo di durata di detto stimolo.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto di comprendere inoltre il passo di

c) portare in contatto con detta almeno una prima particella selezionata in uno stato permeabilizzato, almeno una seconda particella;

detti passi b) e c) essendo eseguiti in modo da produrre la penetrazione della detta almeno una seconda particella entro la detta almeno una prima particella selezionata in uno stato permeabilizzato.

3. Metodo secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che dette prime particelle sono immerse in un fluido; detto passo c) venendo eseguito con dette seconde particelle pure immerse in detto fluido e prolungando detto passo b) per un tempo sufficiente a permettere che almeno una detta seconda particella penetri nella detta almeno una prima particella selezionata, che è in uno stato permeabilizzato.

4. Metodo secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che dette prime particelle sono immerse in un fluido; detto passo c) venendo eseguito con dette seconde particelle pure immerse in detto fluido e spostando almeno una selezionata detta seconda particella verso detta almeno una prima particella selezionata tenuta in uno stato permeabilizzato

applicando ad almeno detta selezionata seconda particella un campo di forza (FMAN) ottenuto energizzando selettivamente detti elettrodi (EL) di detta schiera di elettrodi selezionabili applicando a detti elettrodi una sequenza di configurazioni di tensioni prefissate.

5. Metodo secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che detto stimolo è atto a mantenere detta almeno una prima particella selezionata in uno stato permeabilizzato per un tempo prefissato anche dopo la rimozione dello stimolo; dette prime particelle essendo immerse in un primo fluido; detto passo c) venendo eseguito con dette seconde particelle pure immerse in detto primo fluido e spostando detta almeno una prima particella selezionata in uno stato permeabilizzato verso dette seconde particelle applicando alla stessa un campo di forza (FMAN) ottenuto energizzando selettivamente detti elettrodi (EL) di detta schiera di elettrodi selezionabili applicando a detti elettrodi una sequenza di configurazioni di tensioni prefissate.

6. Metodo secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che dette prime particelle sono immerse in un primo fluido; detto passo c) venendo eseguito con dette seconde particelle immerse in un secondo fluido contiguo al primo e spostando detta almeno una prima

LEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr 358/BMI)

particella selezionata dal primo fluido al secondo applicando alla stessa un campo di forza (FMAN) ottenuto energizzando selettivamente detti elettrodi (EL) di detta schiera di elettrodi selezionabili applicando a detti elettrodi una sequenza di configurazioni di tensioni prefissate.

7. Metodo secondo la rivendicazione 6, caratterizzato dal fatto che detti passi b) e c) sono eseguiti su detta almeno una prima particella selezionata quando questa si trova immersa nel secondo fluido; oppure, alternativamente, quando detta almeno una prima particella selezionata si trova immersa nel primo fluido, a patto che detto stimolo è atto a mantenere detta almeno una prima particella selezionata in uno stato permeabilizzato per un tempo prefissato anche dopo la rimozione dello stimolo, sufficiente per permettere lo spostamento dal primo al secondo fluido..

8. Metodo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che dette prime particelle sono immerse in un fluido; detto metodo comprendendo inoltre il passo di
c) rendere presente nel fluido in cui le prime particelle sono immerse almeno un composto in soluzione; e

d) permettere a detto composto di penetrare entro detta almeno una prima particella selezionata in uno stato

PIRELLA GÖTTSCHE LOWE
Reg. Com. Albo nr. 358/BMI

permeabilizzato.

9. Metodo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che dette prime particelle sono immerse in un primo fluido contenuto in una microcamera provvista di detta schiera di elettrodi; detto metodo comprendendo inoltre i passi di:

c) introdurre in detta microcamera un secondo fluido operando in moto laminare in modo che il secondo fluido non si mescoli con il primo, il secondo fluido contenendo almeno un composto in soluzione;

d) spostare detta almeno una prima particella dal primo fluido al secondo applicando alla stessa un campo di forza (FMAN) ottenuto energizzando selettivamente detti elettrodi (EL) di detta schiera di elettrodi selezionabili applicando a detti elettrodi una sequenza di configurazioni di tensioni prefissate;

e) permettere a detto composto di penetrare entro detta almeno una prima particella in stato permeabilizzato; detti passi a) e b) venendo eseguiti quando detta almeno una prima particella si trova nel secondo fluido o, alternativamente, a patto che detto stimolo sia atto a mantenere detta almeno una prima particella selezionata in uno stato permeabilizzato per un tempo prefissato anche dopo la rimozione dello stimolo, e sufficiente per permettere lo spostamento dal primo al

secondo fluido, quando detta almeno una prima particella si trova nel primo fluido.

10. Metodo secondo una delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che dette prime particelle sono immerse in una pluralità di fluidi diversi contenuti in una microcamera provvista di detta schiera di elettrodi e che sono stati introdotti in detta microcamera operando in moto laminare in modo che detti fluidi diversi non si mescolino tra loro.

11. Metodo secondo una delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che dette prime particelle sono entità biologiche provviste di una membrana permeabilizzabile e lisabile, ad esempio una cellula, in cui detto stimolo consiste nel portare il potenziale di transmembrana di detta almeno una particella selezionata ad un valore tale da produrre la permeabilizzazione della membrana.

12. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto di comprendere un passo di verifica della avvenuta permeabilizzazione di detta almeno una selezionata particella, preferibilmente eseguito tramite sensori integrati con detta schiera di elettrodi, in un unico chip.

13. Metodo secondo la rivendicazione 2 o 8, caratterizzato dal fatto di comprendere un passo di

PIRAM Rinaldo
Iscrizione Albo nr 358/BM

verifica della avvenuta penetrazione di detta almeno una detta seconda particella o di detto composto in detta almeno una selezionata prima particella, preferibilmente eseguito tramite sensori integrati con detta schiera di elettrodi, in un unico chip.

14. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui dette particelle sono sospese in un fluido, caratterizzato dal fatto che detto fluido è scelto in modo da presentare una conducibilità elettrica relativamente bassa.

15. Metodo secondo una delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che prevede di applicare stimoli di intensità crescente ad una pluralità di selezionate dette prime particelle e di misurare, per ciascuno stimolo applicato, il numero di particelle presenti in uno stato permeabilizzato tramite sensori integrati con detta schiera di elettrodi, in un unico chip

16. Metodo secondo la rivendicazione 15, caratterizzato dal fatto che dette prime particelle sono immerse in un fluido e che detto fluido contiene un composto atto a venire rilevato da detti sensori almeno quando penetra entro quelle dette prime particelle che si trovano in uno stato permeabilizzato.

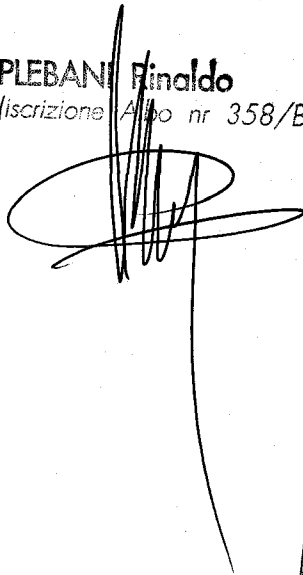
17. Metodo secondo una delle rivendicazioni da 1 a 15,

caratterizzato dal fatto che prevede i passi di

- raccogliere informazioni circa il valore ottimale degli stimoli da applicare tramite detti elettrodi in dipendenza di caratteristiche note delle prime particelle;
- individuare preventivamente, tramite sensori, preferibilmente integrati su chip, dette caratteristiche note per identificare selezionate prime particelle; e
- programmare gli stimoli da applicare localmente in modo da ottimizzare la percentuale di successo della permeabilizzazione di ogni specifica selezionata prima particella.

p.i.: SILICON BIOSYSTEMS S.P.A.

PLEBANI Rinaldo
Iscrizione Albo nr 358/BMI



 CAMERA DI COMMERCIO
INDUSTRIA ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI TORINO

PLEBANI Rinaldo
Iscrizione Albo nr 358/BMI

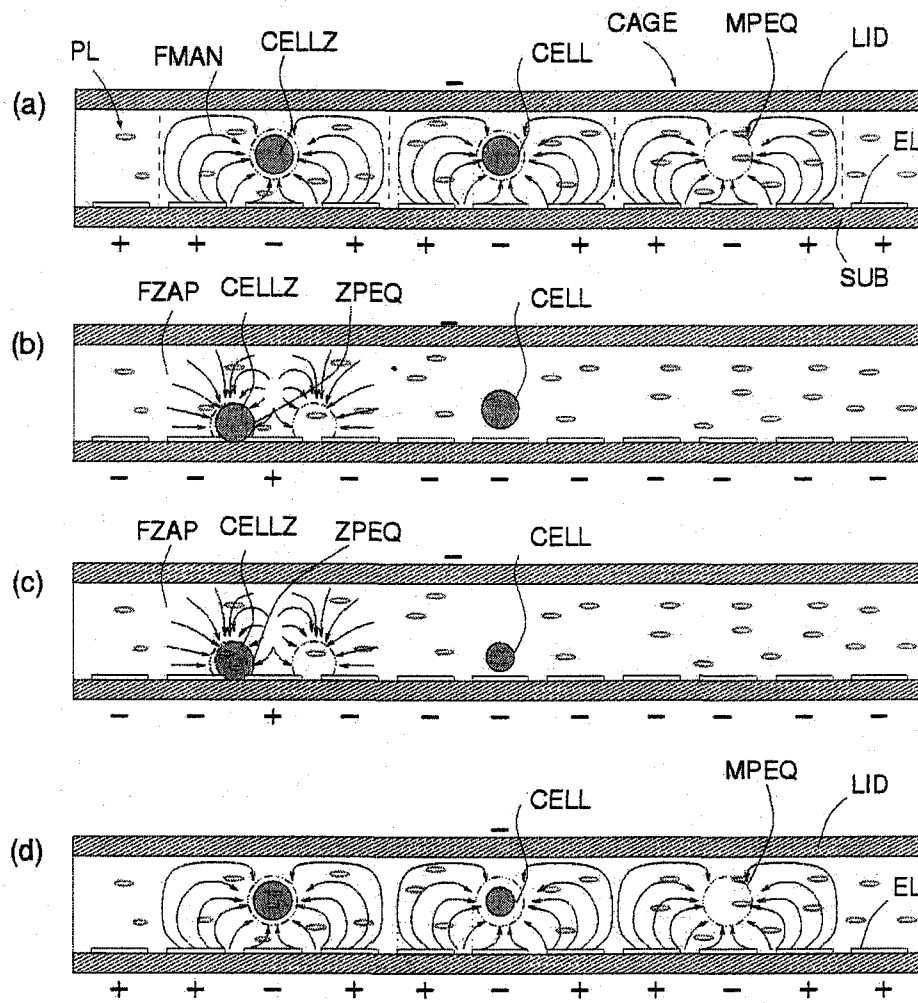


Fig. 1

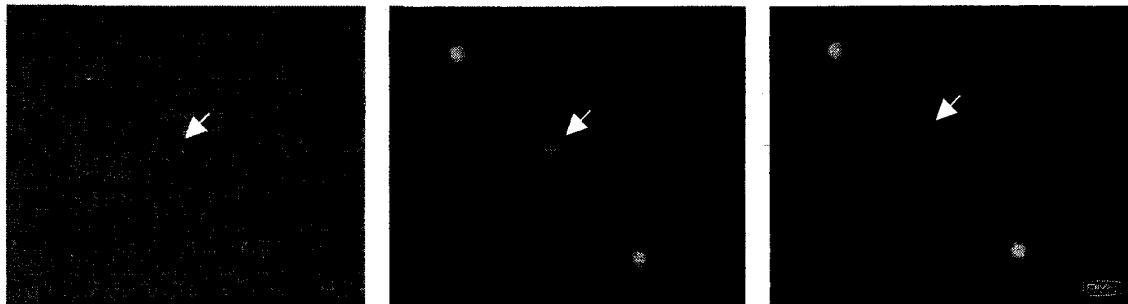


Fig. 2

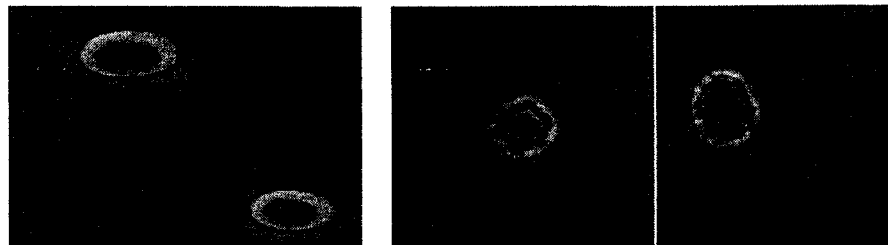


Fig. 3

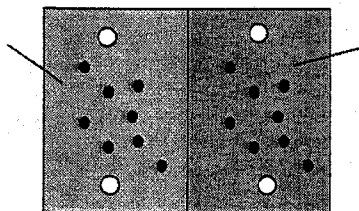
p. 1 - SILICON BIOSYSTEMS S.P.A.

PLEBANI Rinaldo

Iscrizione Albo nr. 358/BMI

**CAMERA DI COMMERCIO
INDUSTRIA ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI TORINO**

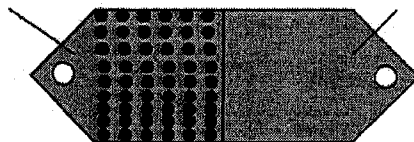
Cellule sospese nel Buffer A
(Buffer a bassa conduttività
+ agente di trasfezione A)



Cellule sospese nel Buffer B
(Buffer a bassa conduttività +
agente di trasfezione B)

Fig. 4

Cellule sospese nel Buffer A
(Buffer a bassa conduttività
+ agente di trasfezione A)



Buffer B (a bassa conduttività
a bassa trasfezione B)

Fig. 5a

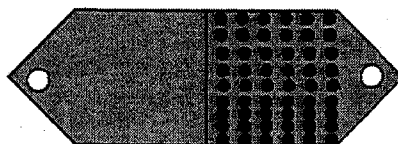


Fig. 5b

p.i.: SILICON BIOSYSTEMS S.P.A.

PLEBANI Rinaldo
Iscrizione Albo nr. 358/BMI

 CAMERA DI COMMERCIO
INDUSTRIA ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI TORINO