

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902111210A1

Publication Date

20140617

Applicant

MASELLI DAVIDE

Title

DISPOSITIVO E METODO PER LA SELEZIONE CELLULARE

Dispositivo e metodo per la selezione cellulare

La presente invenzione ha per oggetto un innovativo dispositivo e un metodo per la selezione cellulare. Esso prevede l'utilizzo di biglie paramagnetiche rivestite con anticorpi, ed una piastra in
5 grado di generare un campo magnetico direttamente sul supporto utilizzato per la crescita cellulare. Questo strumento permette l'accorciamento dei tempi di selezione e la minore manipolazione delle cellule, riducendo in questo modo il rischio di danno e di alterazione delle proprietà biologiche della coltura.

10 Com'è noto dalla biologia cellulare, le cellule eucariotiche possono essere mantenute in vita se poste in coltura su adeguati supporti di crescita, solitamente contenitori di plastica opportunamente trattata, se immerse in appropriati medium o terreni di coltura contenenti al loro interno sostanze necessarie
15 alla vitalità e alla crescita delle cellule, e se mantenute in incubatori capaci di controllare la temperatura, la pressione parziale dell'anidride carbonica e l'umidità. Le colture cellulari vengono utilizzate nella ricerca come modello sperimentale in numerosi tipi di esperimenti. Esse sono utilizzate per analizzare
20 l'effetto di farmaci e verificare la mutagenicità e cancerogenicità delle sostanze. Vengono utilizzate come modello su cui studiare l'effetto dell'espressione di particolari geni. Nello specifico viene denominata coltura primaria una coltura *in vitro* di cellule, frammenti di tessuti o organi prelevati direttamente

dall'organismo animale. In tali condizioni la popolazione cellulare sarà rappresentativa di tutti i fenotipi cellulari del distretto corporeo nel quale è avvenuto l'espanto. La selezione di un singolo fenotipo all'interno di una popolazione eterogenea di
5 cellule è una fondamentale necessità per lo studio delle specifiche caratteristiche fisio-patologiche e per l'attuazione di protocolli di ricerca specifici.

Allo stato della tecnica la selezione cellulare si avvale di differenti metodiche: il clonaggio e l'utilizzo di medium colturali
10 selettivi. Tali metodiche, pur essendo efficaci, presentano gli inconvenienti di essere lunghe e dispendiose ed inoltre non sono applicabili in presenza di cellule con ridotta efficienza di semina. Metodiche alternative più comunemente utilizzate si basano su: isolamento fisico per differenze di densità cellulare (Percoll,
15 Ficoll) o proprietà antigeniche (FACS sorting).

Le tecniche di selezione con anticorpi sfruttano l'affinità di questi ultimi per molecole di superficie specifiche espresse dai differenti tipi cellulari, e non prevedono l'uso del citofluorimetro. Queste metodiche sono meglio note come Immune Panning e
20 Magnetic Sorting. Nella prima metodica, le cellule sono selezionate in base alla loro capacità di aderire a piastre rivestite con anticorpi; tali anticorpi sono diretti contro antigeni specifici espressi esclusivamente da una sottopopolazione cellulare. Nel Magnetic Sorting, invece, le cellule aderiscono ad anticorpi

coniugati a sfere paramagnetiche di ossido di ferro e polisaccaridi o ferritina. Gli anticorpi utilizzati, in questo caso, sono adesi a sfere paramagnetiche, le quali vengono incubate con la popolazione cellulare mista formando una sospensione eterogenea. Successivamente, la sospensione viene sottoposta all'azione di un campo magnetico che tratterrà le cellule legate alle biglie e non avrà invece alcun effetto sulle altre. Questo permette di recuperare le differenti popolazioni cellulari ottenendo una popolazione omogenea per l'espressione dell'antigene di selezione.

Sono noti allo stato della tecnica due metodi principali per la separazione magnetica mediante microbeads. Entrambe le tecnologie prevedono la miscelazione delle cellule con biglie paramagnetiche che possono essere acquistate con una affinità specifica, o possono essere rivestite con un anticorpo a scelta. Il primo metodo, definito Tube-based method, prevede che le cellule marcate vengono rimosse dalla sospensione cellulare utilizzando un magnete esterno che attira i complessi al bordo interno del tubo, permettendo di rimuovere il surnatante. La rimozione del tubo dal campo magnetico permette di prelevare le cellule marcate. La separazione con questo metodo non richiede centrifugazione. Nel secondo metodo, Column-based method, i complessi formati dalle cellule adese alle biglie devono passare attraverso una colonna di separazione, posta in un magnete

permanente. La matrice presente nella colonna crea un alto gradiente di campo che trattiene le cellule marcate lasciando fluire la restante frazione cellulare. Dopo la rimozione della colonna dal campo magnetico, le cellule possono essere prelevate. I metodi tradizionali appena illustrati mostrano diversi inconvenienti: primo fra tutti il problema della durata del processo di selezione (Column-based methods) che può limitare fortemente le caratteristiche biologiche delle cellule in esame.

In entrambi i metodi è inoltre previsto un passaggio in provette prima del piastramento, questo implica l'impiego di materiale monouso e particolarmente costoso, oltre che un passaggio in centrifuga delle cellule stesse, strumentazione anche questa molto costosa.

L'innovativo dispositivo oggetto del presente trovato, permette di selezionare cellule *in vitro* tramite anticorpi, apportando miglioramenti ai processi attualmente utilizzati e in commercio.

Il trovato presenta infatti numerosi vantaggi il primo dei quali è dato dalla possibilità di eseguire la selezione cellulare direttamente nel supporto di crescita cellulare.

Un secondo vantaggio è rappresentato da un accorciamento dei tempi di selezione e una minore manipolazione delle cellule.

Un ulteriore vantaggio del dispositivo in oggetto è quello di limitare i costi di gestione per l'acquisto di materiale *ad hoc* per l'impiego nei trattamenti di colture cellulari.

Il dispositivo permette l'applicazione di un protocollo *ad hoc* per la selezione cellulare. Tale protocollo prevede un'incubazione con biglie coniugate con l'anticorpo con il quale si effettua la selezione. L'incubazione può avvenire direttamente nel supporto
5 di crescita cellulare oppure in provetta, in quest'ultimo caso la sospensione cellulare deve essere successivamente piastrata nel supporto che si desidera utilizzare per la crescita della coltura e questo poi viene posizionato sul dispositivo (1'). In questo modo le cellule marcate rimarranno adese alla piastra per effetto del
10 campo magnetico, mentre quelle negative per l'antigene potranno essere facilmente recuperate con il medium. A questo punto, è quindi sufficiente aggiungere il terreno di coltura nel supporto di crescita (per esempio una piastra o una fiasca) e allontanarlo dal campo magnetico, cioè rimuovere il supporto di crescita della
15 coltura dal dispositivo (1').

Con questo metodo si eviterebbero i passaggi in centrifuga delle cellule, l'acquisto di materiale apposito per la selezione e si accorcerebbero in modo considerevole i tempi della stessa.

Il trovato è inoltre adattabile ad ogni tipo di supporto di crescita
20 cellulare, può essere agevolmente inclinato per permettere il prelievo e l'immissione di *medium* di coltura ed è completamente scomponibile nelle sue singole parti per permettere una accurata sterilizzazione.

Questi ed altri vantaggi saranno meglio evidenziati nella descrizione dettagliata dell'invenzione che fa riferimento specifico alle tavole da 1 a 4, figure da 1 a 6, nelle quali è rappresentato un esempio di realizzazione preferenziale del
5 presente trovato assolutamente non limitativo. In particolare:

- La Fig. 1 mostra una schematizzazione del metodo eseguito con l'utilizzo del dispositivo oggetto della presente invenzione;
- La Fig. 2 mostra una vista in esploso delle componenti del
10 dispositivo secondo l'invenzione;
- La Fig. 3 mostra una sezione trasversale della piastra magnetica del dispositivo;
- La Fig. 4 mostra l'orientamento dei poli lungo il magnete presente all'interno della piastra;
- La Fig. 5 mostra il dispositivo nelle sue tre proiezioni e il
15 posizionamento del magnete al suo interno;
- La Fig. 6 mostra una vista tridimensionale del dispositivo.

Come mostrato in Figura 1, il dispositivo (1') si compone di varie parti: una piastra (1) di dimensioni di 190 x 120 x 15 mm avente
20 al suo interno un magnete (4), mezzi di fissaggio (2) a forma di parallelepipedo, normalmente in numero di due, anch'essi magnetici, aventi dimensione 120 x 7 x 7 mm, che hanno la funzione di fissare alla piastra un numero di cinque elementi elastici di materiale non magnetico. L'intero apparato non ha

giunzioni fisse. La piastra (1) secondo una forma di realizzazione preferenziale, presenta sulla superficie di appoggio del supporto di crescita cellulare, delle scanalature da utilizzare come guida per i parallelepipedi di fissaggio (2) dei mezzi elastici (3).

- 5 I mezzi elastici (3), che hanno la funzione di trattenere sulla piastra magnetica (1) i differenti supporti di crescita delle cellule, possono essere inseriti o tolti indipendentemente.

Inoltre, come mostrato nella sezione trasversale della piastra magnetica (Fig.2) la parte inferiore della piastra o base di
10 appoggio è di forma convessa (5), in modo da permettere all'operatore di inclinarla rendendo più agevoli le operazioni di recupero del *medium* di coltura.

L'area individuata dai mezzi elastici ha dimensione pari a 114 x 182 mm e le molle distano tra loro 28,5mm.

- 15 L'impiego di mezzi elastici quali molle elicoidali (3) per mantenere saldo il supporto di crescita delle cellule è estremamente versatile, stante la capacità di estensione delle molle e la loro facile rimovibilità. Infatti, dovendo utilizzare supporti di crescita di grandi dimensioni, per la selezione è
20 sufficiente rimuovere alcune o tutte le molle intermedie mantenendo soltanto le due più esterne. Inoltre, le distanze tra le molle sono state calcolate per poter permettere l'incastro di tipologie di piastre e fiasche di coltura note e più utilizzate.

Il dispositivo (1') è stato realizzato in legno rivestito in plastica, le molle utilizzate sono in materiale non magnetico. All'interno della struttura è stato ricavato l'alloggiamento per il magnete (4) che può essere in formato da un unico pezzo o da più parti
5 singole, il quale non è fissato permanentemente all'interno della struttura. La possibilità di rendere intercambiabile la porzione magnetica della piastra è sembrata la soluzione migliore in fase di sperimentazione del dispositivo. Il magnete (4) utilizzato, a titolo di esempio, è in lega di NdFeB nichelato, sviluppa un
10 campo magnetico compreso tra 1,29 e 1,32 Tesla (12900-13200 Gauss), la sua temperatura massima di esercizio è di 80°C e permette l'utilizzo di anticorpi coniugati con biglie più piccole circa 50 nm. Ulteriori magneti con caratteristiche fisiche differenti (forza magnetica, temperatura di esercizio, ecc.),
15 potranno essere utilizzati a seconda delle specifiche esigenze.

Test di laboratorio per testare l'accuratezza della selezione cellulare sono stati effettuati impiegando il dispositivo e la metodologia oggetto della presente invenzione.

20 Esempio Test 1

Obiettivo del test è quello di riuscire a recuperare una popolazione di cellule endoteliali CD31 positive. Il materiale biologico è stato digerito in agitazione a 37°C in una soluzione di collagenasi/dispasi. La sospensione cellulare, così ottenuta, è stata seminata in piastre da

6 pozzetti pre-collagenate e poste in incubatore per cinque giorni. La selezione per recuperare cellule endoteliali è stata eseguita utilizzando microbiglie paramagnetiche acquistate da Miltenyi Biotec. In breve, la popolazione mista di cellule della semina primaria è stata tripsinizzata e risospesa in 50µl di *medium* EGM, in cui sono stati aggiunti 20µl di microbiglie paramagnetiche rivestite con anticorpi anti-CD31(Miltenyi Biotec). Dopo un'incubazione di 20 minuti a 4°C sono stati aggiunti 1,3 ml di EGM. La sospensione cellulare è stata quindi trasferita in una Petri da 35mm pre-collagenata e sottoposta al campo magnetico generato dal sistema Be Tab. La piastra è stata leggermente agitata in modo da permettere una distribuzione omogenea delle cellule. Successivamente è stato prelevato tutto il *medium* presente nella Petri. Le cellule recuperate in questa fase rappresentano la selezione negativa, ovvero tutte quelle che non esprimendo il marcatore endoteliale CD31 e non risentono del campo magnetico. In seguito, la Petri è stata allontanata dal magnete, sono stati aggiunti 1,5 ml di EGM e la coltura così ottenuta è stata posta in incubatore. Anche la selezione negativa per CD31 è stata piastrata ed incubata.

L'analisi morfologica delle cellule (Fig.6) osservata con il microscopio a contrasto di fase, evidenzia i differenti fenotipi cellulari. La purezza della coltura cellulare saggiata sia mediante immunocitochimica verso l'antigene superficiale pan-endoteliale CD31, utilizzando l'anticorpo mouse anti-human CD31 (Dako), sia

5

mediante saggio di tubulogenesi su Matrigel, mostra nel primo caso la tipica espressione di membrana dell'antigene CD31 ed i nuclei tondeggianti, mentre nel secondo i tubuli formati dalle cellule selezionate a 24h dalla semina su Matrigel.

- 5 Il tempo totale impiegato per selezionare la coltura primaria è stato di 25 - 30 minuti, sono stati utilizzati esclusivamente i supporti di crescita cellulare e subito dopo aver eliminato la frazione CD31 negativa le cellule selezionate potevano essere poste in terreno e messe in incubatore.

RIVENDICAZIONI

- 1) Dispositivo (1') per la selezione cellulare comprendente una piastra (1) avente al suo interno un magnete (4), mezzi elastici (3), che trattengono un supporto di crescita delle cellule, e mezzi di fissaggio (2) alla piastra dei mezzi elastici e caratterizzato dal fatto che detti mezzi elastici sono inseriti o rimossi dalla piastra in modo tra loro indipendente perché il dispositivo (1') si adatti alla tipologia di supporto di crescita delle cellule.
- 2) Dispositivo secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che detti mezzi elastici (3) sono molle elicoidali non magnetiche.
- 3) Dispositivo secondo la rivendicazione 1 o 2 caratterizzato dal fatto che detti mezzi elastici (3) sono in un numero massimo di cinque.
- 4) Dispositivo secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che detta piastra (1) ha la base di appoggio di forma convessa (5).
- 5) Dispositivo secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che detti mezzi di fissaggio (2) sono due parallelepipedi magnetici.
- 6) Dispositivo secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che detto magnete (4) è in lega di NdFeB nichelato.

- 7) Dispositivo secondo la rivendicazione 6 caratterizzato dal fatto che detto magnete (4) esercita un campo magnetico che permette l'utilizzo di anticorpi coniugati con biglie di dimensioni ≥ 50 nm.
- 5 8) Dispositivo secondo una delle rivendicazioni da 1 a 7 caratterizzato dal fatto di non avere giunzioni fisse, per rendere agevole la sterilizzazione di tutte le sue parti.
- 9) Metodo per la selezione cellulare, che utilizza un dispositivo (1') secondo una delle rivendicazioni da 1 a 8
- 10 comprendente le seguenti fasi:
- incubazione della sospensione cellulare con biglie coniugate con l'anticorpo di selezione effettuata direttamente nel supporto di crescita della coltura;
 - posizionamento del supporto di crescita della coltura sul

15 dispositivo (1');

 - recupero del medium e conseguente estrazione delle cellule negative all'antigene incubato;
 - aggiunta del terreno di coltura nel supporto di crescita della coltura;

20 - rimozione del supporto di crescita della coltura dal dispositivo (1').

CLAIMS

1) Device (1') for cell selection comprising a plate (1) having therein a magnet (4), elastic means (3) which retain a cell growth support and attachment means (2) for joining the plate to the elastic means and characterized in that each of said elastic means is inserted or removed from the plate, independently on the others, so that the device (1') is suitable for all kinds of cell growth support.

2) Device according to claim 1 characterized in that said elastic means (3) are non-magnetic coil springs.

3) Device according to claim 1 or 2 characterized in that the number of said elastic means (3) is not greater than five.

4) Device according to claim 1 characterized in that said plate (1) has a convex-shaped support base (5).

5) Device according to claim 1 characterized in that said attachment means (2) are two magnetic parallelepipeds.

6) Device according to claim 1 characterized in that said magnet (4) is made of NdFeB nickel-plated alloy.

7) Device according to claim 6 characterized in that said magnet (4) exerted a magnetic field that allows the use of antibodies, conjugated with balls of size ≥ 50 nm.

8) Device according to one of the claims from 1 to 7 characterized in that it has no fixed junctions, to make easy the sterilization of all its parts.

9) A method for cell selection, that uses the device (1') according to one of the claims from 1 to 8, comprising the following steps:

- incubating the cell suspension with beads, conjugated with the selection antibody, performed directly in the growth cell culture support;
- positioning of the growth cell culture support on said device (1');
- medium recovery and subsequent extraction of the negative cells to the antigen incubated;
- adding the medium in the growth cell culture support;
- removing of the growth cell culture support from the device (1').

TAV. 1/5

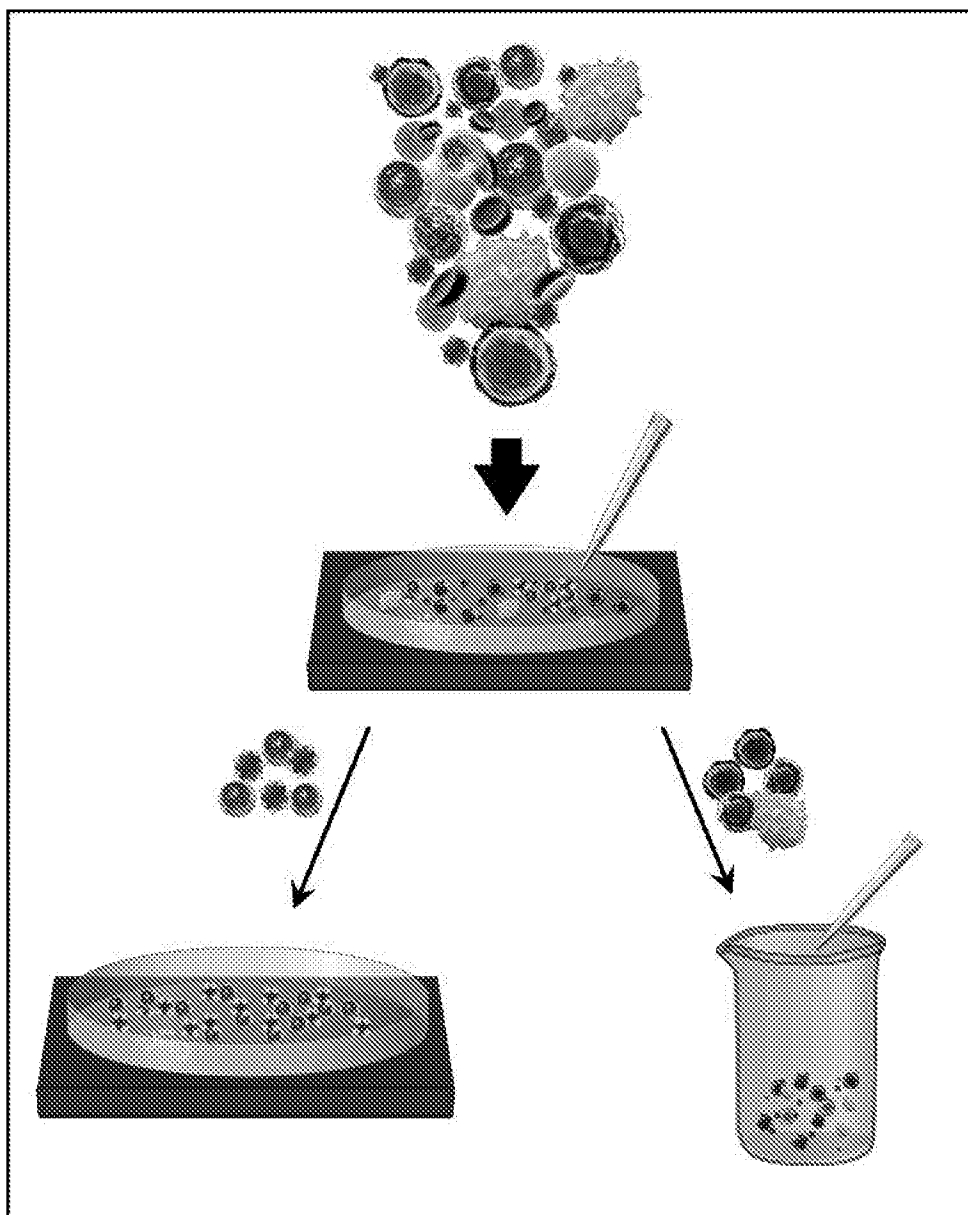


Fig.1

TAV. 2/5

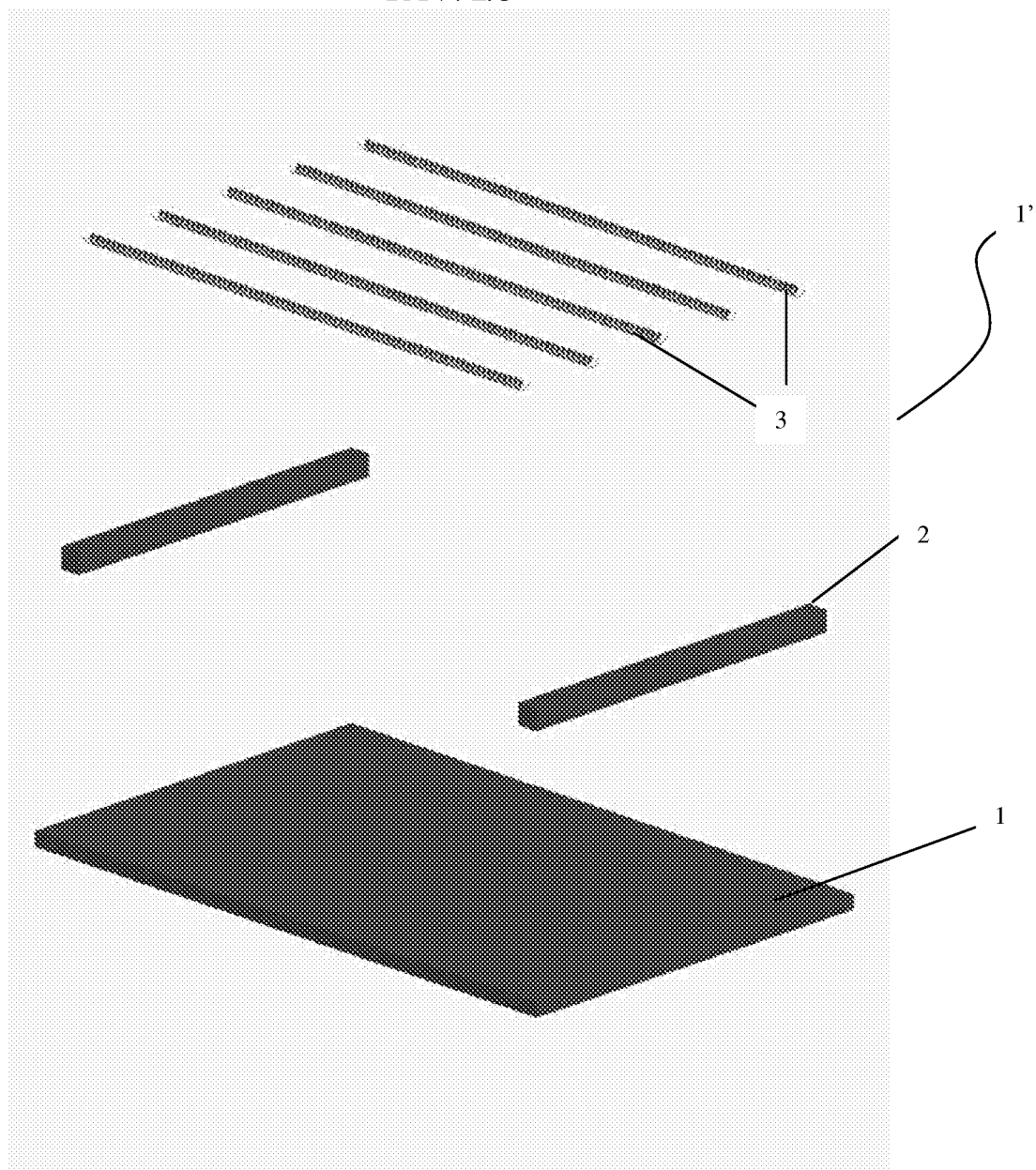


Fig.2

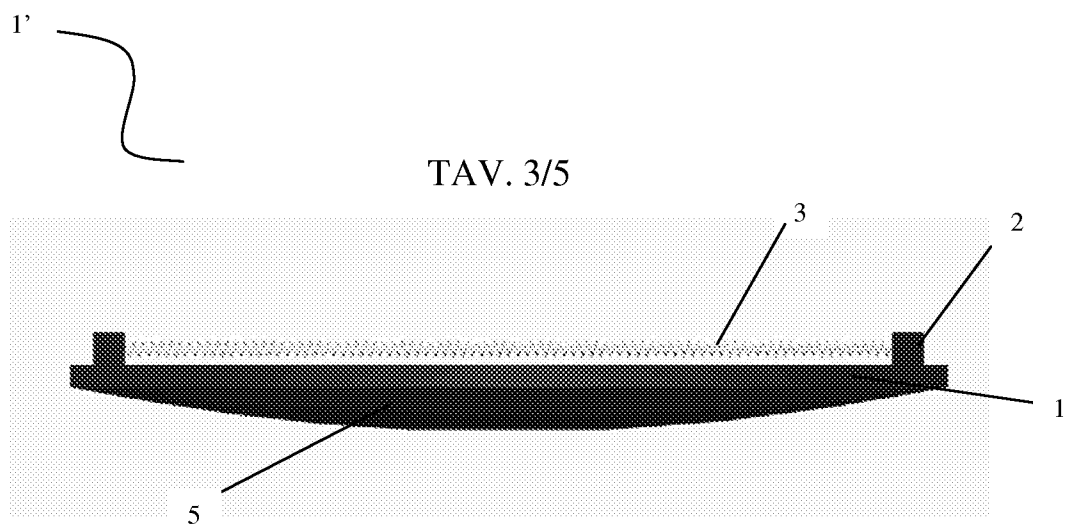
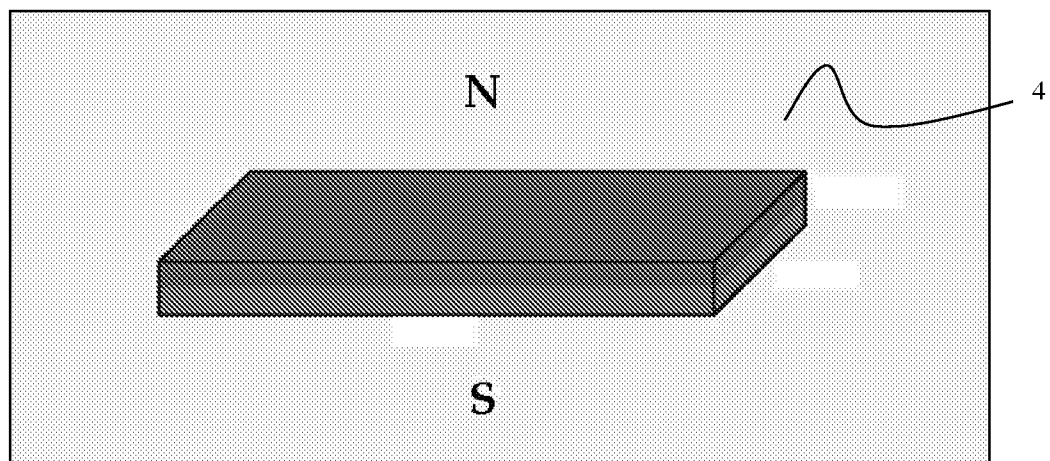


Fig.3

5



10

Fig.4

TAV. 4/5

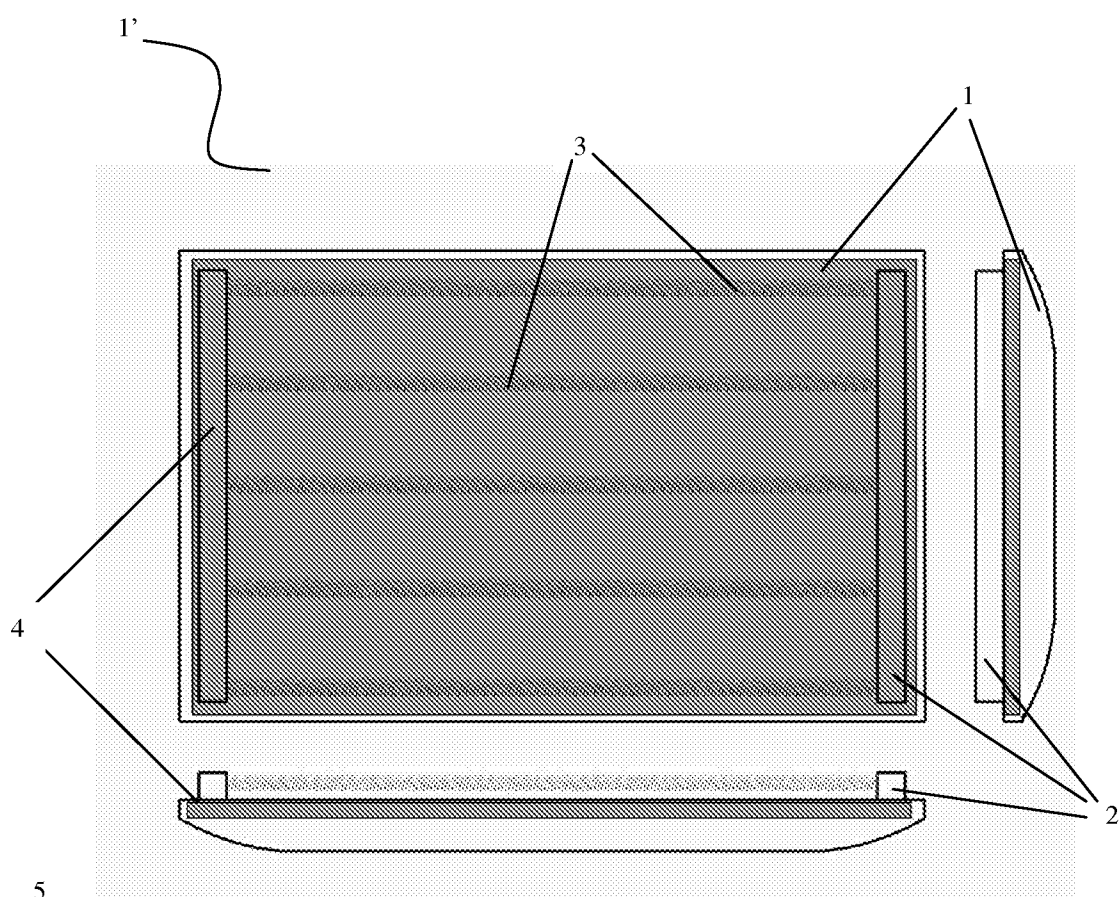
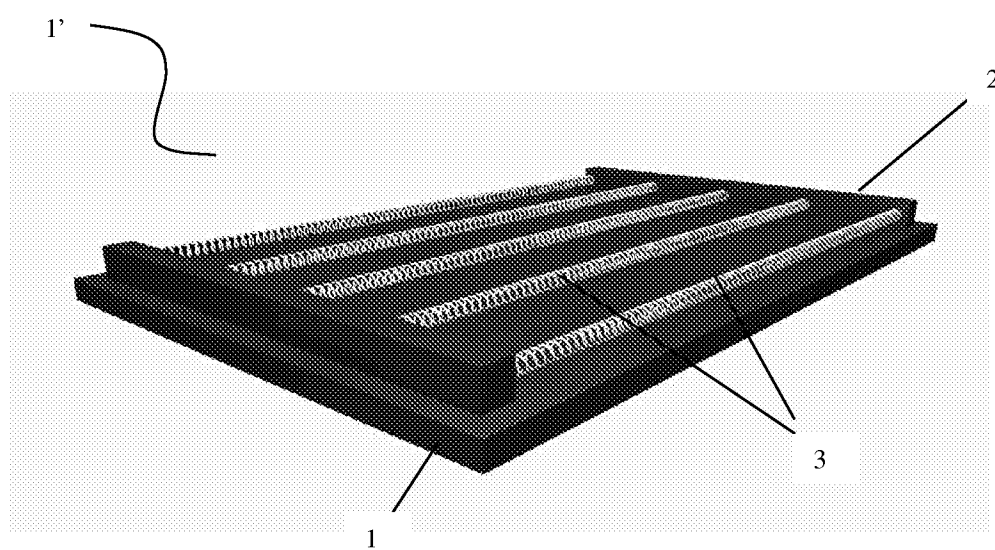


Fig.5

5



10

Fig.6