

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



FACOLTA' DI FARMACIA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZA DEL FARMACO
XXIII CICLO 2007-2010

IL MINI – BIOARTIFICIAL LIVER (MINIBAL) COME
BIOSENSORE CELLULARE PER LA VALUTAZIONE
DELL'EPATOTOSSICITÀ DI NUOVE MOLECOLE

DOTT.SSA BARBARA ANDRIA

TUTOR

PROF. GIUSEPPE CIRINO

DOTT.SSA ADELE BRACCO

COORDINATORE

PROF.SSA MARIA VALERIA D'AURIA

A mia madre

INDICE

1. INTRODUZIONE	5
1.1. Sistemi <i>in vitro</i>	9
1.2. Configurazioni bidimensionali	11
1.2.1. Sospensioni cellulari	
1.2.2. Colture statiche in <i>monolayer</i>	
1.2.3. Configurazioni <i>sandwich</i>	
1.2.4. Colture dinamiche	
1.2.5. Colture in piastra	
1.3. Configurazioni tridimensionali	18
1.3.1. <i>Liver Slices</i>	
1.3.2. Sferoidi	
1.4. I Bioreattori	20
1.4.1. Bioreattori a fibre cave	
1.4.2. Letti e <i>scaffold</i> perfusi	
1.4.3. Sistemi basati sull'incapsulazione e sospensione	
1.4.4. <i>High-Throughput Systems</i>	
1.4.5. Sistemi cellulari epatici miniaturizzati	
1.5. Caratteristiche del biosensore ottimale	42
1.5.1. <i>Scaffold</i> e membrane	
1.5.2. Bidimensionale o tridimensionale?	
1.5.3. L'ossigenazione	
1.5.4. Equilibrio tra flusso e <i>shear stress</i>	
1.5.5. La matrice extracellulare	
1.5.6. Le co-colture	
1.5.7. Fenotipo cellulare e funzionalità	
1.5.8. Stabilità funzionale nel lungo termine	
1.5.9. La biomassa cellulare ideale	
2. SCOPO DELLA TESI	56
3. MATERIALI E METODI	57
3.1. Il mieloma multiplo	57
3.2. Il BT062	60
3.3. BT062: studi <i>in vitro</i> e sperimentazione clinica	62
3.4. Il miniBAL	64
3.5. Isolamento degli epatociti e caricamento del miniBAL	66

3.6. Analisi istologiche	73
3.6.1. Doppia colorazione immunoistochimica	
3.6.2. Colorazione PAS	
3.6.3. Le Citocheratine	
3.6.4. Le Caspasi	
3.6.5. <i>Tunel Assay</i>	
3.7 Analisi statistica	79
4. RISULTATI	80
4.1. Il BT062	80
4.1.1. La Sperimentazione e la scelta delle concentrazioni	
4.1.2. Test di funzionalità	
4.1.3. Analisi istologiche	
4.2. Il DM-4	89
4.2.1. La Sperimentazione e la scelta delle concentrazioni	
4.2.2. Test di funzionalità	
4.2.3. Analisi istologiche	
5. CONCLUSIONI	99
6. <i>WORK IN PROGRESS</i>	103
6.1 Nuove applicazioni di BT062	103
6.2. Determinazione dell'attività citocromo P450	105
6.3. La Banca di Epatociti	106
7. PROSPETTIVE FUTURE	109
8. BIBLIOGRAFIA	111

1. INTRODUZIONE

Negli ultimi anni l'attenzione della comunità scientifica internazionale è stata volta allo sviluppo di sistemi di coltura di epatociti *in vitro* basati su cellule epatiche funzionali immobilizzate su diversi materiali di supporto (*scaffold*). Questi dispositivi sono stati ampiamente utilizzati in numerose applicazioni:

- supporti epatici temporanei (*bridge*) per pazienti in attesa di un trapianto di fegato a causa di un'insufficienza epatica acuta;
- modelli per studi di metabolismo, di inibizione o induzione enzimatica;
- ricerca di approcci terapeutici innovativi
- metodiche alternative all'uso dell'animale per la valutazione delle sostanze chimiche;
- sistemi di screening farmacologico e tossicologico *in vitro* da utilizzare nelle fasi precoci del processo di sviluppo di nuove molecole.

La valutazione dell'epatotossicità di prodotti farmaceutici, cosmetici e alimentari rappresenta, infatti, un passo obbligato per la loro immissione in commercio. Questo risulta particolarmente stringente in ambito farmaceutico, in cui i lunghi tempi e gli alti costi sostenuti dalle industrie per lo sviluppo di nuovi farmaci (dell'ordine di decine di milioni di euro) impongono, in una ottica di razionalizzazione della spesa, l'ottenimento del migliore risultato utilizzando le risorse, spesso limitate, che sono a disposizione (1). Nella maggior parte dei casi, poi, questi costi vanno moltiplicati a causa dell'elevato numero di molecole che

sono ritirate dal commercio o sospese dalle sperimentazioni cliniche per uno scarso profilo farmacocinetico e/o farmacodinamico (i dati ottenuti sull'animale non sono riproducibili anche nell'uomo), per mancanza di efficacia, per la comparsa di interazioni non favorevoli o di effetti tossici gravi ed indesiderati in fase di monitoraggio *post-marketing* della nuova molecola (rofecoxib, cerivastatina, per citare i casi più eclatanti) (2).

Per questi motivi vi è un crescente interesse da parte della letteratura mondiale per lo sviluppo di sistemi *in vitro* 'low cost' che, attraverso la creazione di condizioni più vicine alla situazione *in vivo*, siano in grado di predire la tossicità di nuove molecole in una fase quanto più precoce del loro processo di sviluppo. Considerati, infatti, i lunghi tempi e l'elevato costo delle fasi cliniche dello sviluppo di un farmaco è, infatti, opportuno anticipare ad un momento preclinico la valutazione dell'epatotossicità, utilizzando sistemi cellulari che non solo siano relazionati alla funzione d'organo, ma soprattutto alla specificità di specie (3).

Il grande interesse, che a livello internazionale lo sviluppo di questi sistemi sta suscitando, è legato anche alla recente entrata in vigore della nuova normativa comunitaria sulle sostanze chimiche e sulla loro utilizzazione sicura: il R.E.A.C.H. (*Registration, Evaluation, Authorization of Chemical*). Si tratta di un sistema integrato per la registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione delle sostanze chimiche che obbliga le imprese che fabbricano ed importano sostanze chimiche a valutare i rischi derivanti dal loro uso ed a prendere le misure necessarie per

gestire qualsiasi rischio venga individuato (Regolamento CE n. 1907/2006) (4).

Presso il Centro di Biotecnologie dell'A.O.R.N. "A. Cardarelli", dove ho svolto attività pratica durante il Dottorato di Ricerca in Scienza del Farmaco, è stato assemblato un "mini BAL", capace di contenere 300 milioni di epatociti umani. Tale dispositivo si inserisce nel complesso e variegato panorama dei biosensori a cellule epatiche quale sistema in grado di predire l'epatotossicità di molecole in una fase quanto più precoce del loro processo di sviluppo, configurandosi come possibile alternativa all'uso dell'animale ai fini sperimentali. Tutto ciò consentirebbe di avere un dispositivo *ad hoc* capace di ridurre l'uso degli animali, salvaguardando l'aspetto etico della sperimentazione, e di ottenere informazioni specie-specifiche relative alla tossicità di nuovi farmaci e molecole con particolare attenzione alle delicate fasi che intercorrono tra la sperimentazione preclinica e clinica, il rilascio dell'autorizzazione all'immissione in commercio ed il monitoraggio *post marketing* del nuovo farmaco.

Il lavoro di tesi di Dottorato si articola in due sezioni: la prima è dedicata all'approfondimento dei sistemi *in vitro* a cellule epatiche sviluppati in ambito europeo ed internazionale e all'individuazione dei criteri ideali che un bioreattore a cellule dovrebbe presentare al fine di garantire la preservazione delle funzioni epatocellulari nel lungo termine. La seconda parte della tesi entra nei dettagli dell'attività di ricerca sperimentale, svolta quasi integralmente presso il Centro di Biotecnologie dell'A.O.R.N. "A. Cardarelli", e riguardante il miniBAL come sistema di screening *in vitro* per la valutazione della tossicità di un anticorpo monoclonale coniugato

ad una tossina (BT062) e della tossina considerata singolarmente (DM-4). Il BT062 è oggetto di studio in un trial clinico, tuttora in corso, per il trattamento dei pazienti affetti da mieloma multiplo recidivante/remittente.

1.1. SISTEMI *IN VITRO*

Il panorama dei sistemi *in vitro* a cellule epatiche per la valutazione della tossicità e delle reazioni di metabolismo si presenta particolarmente variegato (figura 1) (5, 6, 7). I vantaggi e gli svantaggi legati all'applicazione di ciascun sistema sono ampiamente documentati: il fegato isolato e perfuso e i modelli animali sono in grado di riprodurre più fedelmente la funzionalità dell'organo *in vivo*, ma, rispettivamente, presentano problemi di ridotta riproducibilità nel lungo termine e della spesso difficile estrapolazione dei risultati ricavati in un contesto più propriamente clinico.

Model	Advantages	Limitations
Isolated perfused liver	Functions close to those of the <i>in vivo</i> organ (all enzyme equipment preserved) Lobular structure preserved Functional bile canaliculi Collection of bile possible Short-term kinetic studies (extraction)	Short-term viability (2–3 hr) Study of one or a few compounds only Bile excretion decreased after 1 to 3 hr No study on human liver Suitable only for liver of small animals No significant reduction in the number of animals used
Liver slices	Lobular structure preserved (all enzyme equipment preserved) Selective intralobular effects detectable Studies on human liver possible Studies on several compounds at different concentrations	Viability: 6 hr to 2 days No collection of bile possible Not all the cells preserved similarly (interassay variability)
Isolated hepatocytes*	Obtained from whole livers or wedge biopsies Functions close to those of <i>in vivo</i> hepatocytes Studies on several compounds at different concentrations Interspecies studies Representative of different lobular subpopulations Cryopreservation	Short-term viability (2–4 hr) No bile canaliculus
Primary hepatocyte cultures*	Functions expressed for several days in certain conditions Induction/inhibition of drug metabolizing enzymes Interspecies studies	Early phenotypic changes Altered bile canaliculi
Liver cell lines	Unlimited cell number Some functions preserved	Various drug enzyme activities lost or decreased Genotype instability
Subcellular fractions S9000 × g fraction Microsomes	Drug enzyme activities preserved Drug enzyme activities preserved Production of metabolites for structural analysis	Short-term studies Short-term studies No cytosolic phase II enzyme reactions Cofactors required for activity
Genetically engineered cells	One or more human enzymes expressed Available mainly for CYPs Unlimited cell number	Use for specific purposes only No physiologic levels of enzymes

*Other cell types, e.g., Kupffer, endothelial, stellate, and bile duct cells, can also be isolated, cultured, and even cocultured with hepatocytes.

Figura 1. Overview dei sistemi *in vitro*

Tra gli altri sistemi *in vitro*, le colture di cellule isolate, le linee cellulari e le frazioni subcellulari (membrane, microsomi, sezioni di tessuti, proteine e acidi nucleici) non sono in grado di rappresentare il complesso insieme delle reazioni metaboliche e i

pattern di espressione genica propri dell'epatocita e, in genere, sono impiegate solo quando è richiesta l'espressione di funzioni altamente specializzate (figura 2-3) (8).

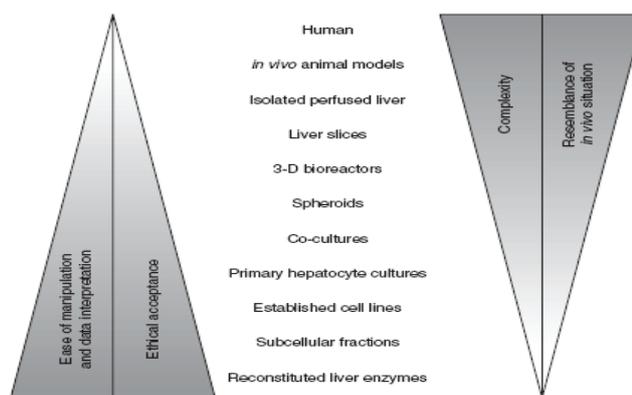


Figura 2. Valutazione dell'impatto di alcuni parametri sui principali modelli *in vitro* e *in vivo* usati per la valutazione dell'epatotossicità

Gli enormi passi in avanti, che sono stati realizzati nelle procedure di isolamento degli epatociti dal protocollo di Seglen ad oggi, hanno reso ormai possibile l'ottenimento di un'enorme quantità di epatociti che, posti in coltura in configurazioni bi- e tri-dimensionali, consentono l'espressione di un ampio range di funzioni epatocellulari (biotrasformazione, sintesi e detossificazione) (9, 10, 11).

Assay	<i>In vitro</i> liver preparation ^a			
	Slices	Suspended hepatocytes	Cultured hepatocytes	Microsomes
Metabolic profile	+	±	+	±
Comparative interspecies metabolism	+	±	+	±
Kinetic studies	±	+	+	+
Drug–drug interactions	±	+	+	+
Induction studies	± ^b	–	+	–
Toxicity screening	±	+ ^b	+	–
Mechanistic studies	+	+ ^b	+	–
Unscheduled DNA synthesis test	±	±	+	–

Abbreviations: ±, possible to some extent; +, currently used; – not suitable. ^aIsolated organs not included because of lack of availability. ^bShort-term study.

Figura 3. Applicazioni dei sistemi epatici *in vitro* in studi farmacologici e tossicologici

1.2. CONFIGURAZIONI BIDIMENSIONALI

1.2.1. Sospensioni cellulari

Le sospensioni cellulari, costituite da epatociti isolati a fresco e/o criopreservati posti in mezzi di coltura idonei, rappresentano sistemi *in vitro* maneggevoli e semplici da allestire che sono frequentemente utilizzati per la caratterizzazione del metabolismo di specifiche sostanze test.

L'uso delle colture cellulari primarie di epatociti per lo studio delle funzioni epatiche ha mostrato diversi vantaggi rispetto ai modelli animali *in vivo*:

- le condizioni sperimentali possono essere rigorosamente controllate;
- è richiesta una quantità inferiore di materiale;
- è possibile una semplificazione della sperimentazione;
- si riducono gran parte delle variabili presenti negli esperimenti *in vivo* (come ad esempio: contributi di altri tessuti o di altri tipi cellulari);
- si possono ricavare più campioni provenienti da un singolo tessuto o organo, differentemente dall'animale *in toto*.

Il vantaggio dell'impiego di epatociti isolati a fresco è dovuto anche alla analogia metabolica con lo stato nativo *in vivo*, al punto che il metabolismo delle cellule isolate riflette lo stato del fegato prima dell'isolamento cellulare.

Tuttavia è noto che epatociti in sospensione nel medium di coltura vanno incontro rapidamente a cambiamenti morfologici e biochimici, limitando così il loro impiego negli studi metabolici

che implicano la valutazione di correlazioni tra vie metaboliche diverse o l'effetto di farmaci su di esse per tempi più protratti (12). Il mantenimento a lungo termine *in vitro* della funzionalità metabolica degli epatociti richiede l'adesione cellulare a matrici di supporto idonee, come collagene o matrici di tipo extracellulare. Tuttavia gli epatociti, anche se coltivati in aderenza come mostrato su tali substrati, subiscono fenomeni di adattamento morfo-funzionali fino alla totale perdita della funzione differenziata.

Negli ultimi 20 anni diversi approcci sperimentali sono stati esplorati per ottenere colture in cui gli epatociti potessero riorganizzarsi, ricostituire la loro citoarchitettura e mantenere per lunghi periodi di tempo le loro funzioni specifiche. Tali approcci hanno riguardato la modifica della composizione e della geometria della matrice extracellulare, l'interazione con cellule epatiche non-parenchimali, o, infine, la promozione dei contatti cellula-cellula al fine di favorire la formazione di aggregati cellulari. La ricostruzione *in vitro* di una appropriata citoarchitettura tridimensionale degli epatociti ed il mantenimento a lungo termine di alcune attività funzionali, quali la sintesi di albumina, di urea e l'attività citocromo P-450 dipendente, sono state realizzate secondo diverse modalità.

1.2.2. Colture statiche in monolayer

Si tratta di sistemi statici in cui gli epatociti, a contatto con il medium e in atmosfera di carbogeno (95% ossigeno + 5% anidride carbonica), sono fatti aderire ad una membrana impermeabile ai gas, che può essere rivestita o meno con collagene, e sono

sottoposti al rinnovo periodico del mezzo di coltura, al fine di rimuovere i prodotti derivanti dal catabolismo cellulare e favorire l'apporto di sostanze nutrienti.

Il mezzo di coltura è appositamente concepito a seconda dei diversi fini sperimentali: si può trattare di Williams'E medium, Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM), Hanks' balance salt solution (HBSS), *Hepatocyte Maintenance Medium* (HMM), Leibovitz's L15 o Chee's medium; diversi sono anche i componenti aggiunti a questi mezzi (siero fetale, aminoacidi, ormoni, fattori di crescita, peptidi, citochine).

Questi sistemi sono semplici da allestire e sono in grado di preservare le interazioni cellula-cellula e favorire l'espressione e il mantenimento delle funzioni *liver specific* fino a 24 ore. Inoltre sono estremamente versatili e possono essere utilizzati per diverse finalità: per studi di epatotossicità a breve termine e di induzione-inibizione farmaco-metabolica, per la valutazione dei meccanismi di interazione tra farmaci o, infine, per approfondimenti farmacocinetici e farmacodinamici.

Il materiale più comunemente utilizzato per promuovere l'*attachment* degli epatociti in monostrato è la plastica (13), che può essere utilizzata come tale o rivestita con un singolo strato di proteine della matrice extracellulare (collagene, fibronectina, laminina) o componenti più complesse, quali il Matrigel® (preparato di membrana basale in soluzione estratta dal sarcoma di topo di *Engelbreth-Holm-Swarm*, un tumore ricco di proteine della matrice extracellulare) (figura 4). È stato già ampiamente dimostrato che gli epatociti, fatti aderire alle membrane rivestite con proteine della matrice extracellulare, conservano una

morfologia cellulare più vicina a quella *in vivo* ed esprimono funzioni metaboliche e sintetiche più stabili e prolungate nel tempo rispetto agli epatociti seminati sulle stesse superfici non rivestite (5).

Table 4. Matrix proteins affecting survival and liver-specific functions of hepatocytes in primary culture.

Protein	Survival ^a	Effects	
		Functions	Reference
Collagens, fibronectin as substrates	+	Early decrease or loss	Johansson and Hook (111), Michalopoulos and Pitot (112)
Matrigel	++	Many functions well-preserved for at least a few days	Bissell et al. (113)
Collagen gel sandwich	+	Functions improved ^b	Lee et al. (114) Dunn et al. (120)
Collagen for immobilization	+	Functions improved ^b	Koebe et al. (115)

^aIncreased survival: +, a few days; ++ to +++, 1 week to several weeks. ^bIn these two systems, hepatocytes still form a monolayer; results for a limited number of functions e.g., albumin production.

Figura 4. Influenza delle proteine della matrice extracellulare sulle funzioni specializzate di colture primarie di epatociti

1.2.3. Configurazioni sandwich

Quelle a *sandwich* sono particolari tipi di configurazioni in cui gli epatociti sono seminati tra due strati di *scaffold* che possono essere rivestiti entrambi di collagene o di collagene e Matrigel[®]. In particolare, le configurazioni miste a base di collagene e Matrigel[®] hanno evidenziato, oltre ad una prolungata espressione della sintesi di albumina (14) e capacità di induzione dei citocromi CYP1A2 e 3A4 (15), vantaggi aggiuntivi rispetto alle matrici collagene-collagene e ai *monolayer* rivestiti esclusivamente con collagene, tra cui l'espressione del recettore per il fattore di crescita epidermico e di proteine di giunzione cellulari, tra cui la connessina 32 (16). Il Matrigel[®] è, comunque, più costoso rispetto al collagene, presenta variabilità nella composizione dei singoli

lotti e problemi di immunogenicità che ne limitano l'impiego in ambito clinico.

1.2.4. Colture dinamiche

Il problema principale delle colture statiche, e in generale della maggior parte dei sistemi *in vitro*, è rappresentato dalla limitata capacità di riprodurre la complessità di un tessuto o di un organo *in vivo*. Le colture dinamiche rappresentano un approccio per risolvere questa problematica; in questi sistemi gli epatociti sono sempre messi in coltura su *scaffold* rivestiti di collagene, ma sono sottoposti a perfusione continua con il mezzo di coltura. Anche se l'applicazione di un flusso di *medium* parallelo alla superficie cellulare non è fisiologica, poiché gli epatociti *in vivo* non sono a diretto contatto col circolo sanguigno, in questo modo si garantisce l'interscambio di nutrienti e la rimozione dei cataboliti, riproducendo in maniera più fedele la situazione *in vivo*. Rispetto ai sistemi statici discussi in precedenza, i sistemi dinamici consentono di preservare le funzioni epatocellulari per un periodo più prolungato (fino a due settimane) e garantiscono una maggiore sensibilità per lo studio dei processi di induzione enzimatica (17).

1.2.5. Colture in piastra

Le colture in piastra presentano una serie di vantaggi che possono essere così riassunti:

- le cellule sono in grado di aderire alle piastre e creare un microambiente omogeneo;

- attraverso il contatto diretto tra le cellule e il mezzo/plasma, è possibile assicurare un efficiente trasporto dei soluti;
- il sistema presenta un'elevata riproducibilità e consente di studiare i meccanismi coinvolti nella tossicità e nel metabolismo dei farmaci dipendenti dalla zonazione. Per zonazione si intende uno stato morfologico e funzionale variabile del parenchima epatico a livello delle zone centrolobulari e periportalari, con l'esistenza di zone lobulari che presentano specifici compiti metabolici (18).

Il principale svantaggio di tali sistemi è rappresentato dalle elevate forze di *shear stress* (sforzo di taglio), legate alla perfusione del medium, cui le cellule in coltura sono sottoposte. Ciò può causare il distacco delle cellule dalla membrana di cui è costituito lo *scaffold*, con conseguente perdita di vitalità e funzionalità.

Park è venuto incontro a questo problema con il suo *flat plate bioreactor*. Nel suo sistema gli epatociti sono messi in co-coltura con fibroblasti 3T3-J2 su particolari piastre nelle quali sono introdotte nanofibre a base di chitosano mediante *elettrospinning* (figura 5). Gli epatociti, coltivati su queste particolare nano strutture, mostrano una maggiore capacità di adesione rispetto alle piastre non rivestite con le nano fibre; inoltre il particolare *design* del bioreattore consente di ridurre lo *shear stress* di 30 volte e di assicurare rese elevate in termini di sintesi di urea ed albumina fino a cinque giorni di perfusione.

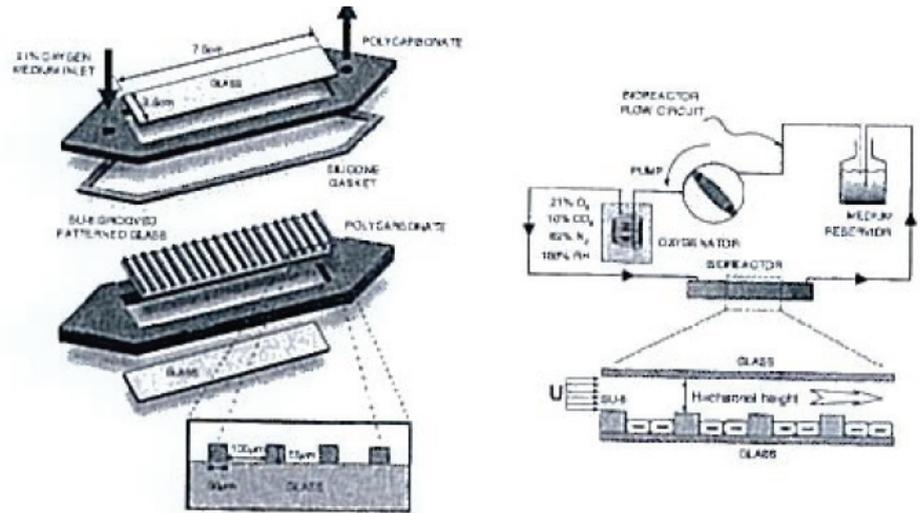


Figura 5. Rappresentazione schematica del bioreattore e del circuito di perfusione

1.3. CONFIGURAZIONI TRIDIMENSIONALI

1.3.1. *Liver slices*

Utilizzate ampiamente a livello sperimentale sin dal 1980, le *liver slices* sono, tra quelli finora descritti, uno dei pochi sistemi capaci di garantire la preservazione dell'integrità delle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare. Costituiti essenzialmente da cellule non parenchimali, che svolgono l'importante ruolo di mediatori della tossicità cellulare, questi sistemi risultano particolarmente indicati, oltre che per studi di metabolismo, anche per quelli di tossicità zonale. A questi vantaggi si contrappongono, però, alcune problematiche legate alla complessità di preparazione, alla ridotta reperibilità e alla limitata diffusione di ossigeno e nutrienti dovuta al ridotto spessore di ciascuna sezione (150-250 μM) che ne limita l'espressione funzionale (5).

1.3.2. *Sferoidi*

Quando gli epatociti presentano ridotte capacità di adesione ad un substrato tendono a formare aggregati multicellulari in sospensione, detti sferoidi (5, 20). Due caratteristiche nel processo di formazione degli sferoidi risultano fondamentali per il mantenimento delle funzioni differenziate proprie dell'epatocita: la realizzazione di interazioni tridimensionali e la secrezione di proteine della matrice extracellulare all'interno dello sferoide. Le colture sferoidali presentano, però, applicazioni limitate, dovute alla presenza di cellule in ipossia/necrosi nella parte centrale dello sferoide stesso, per la scarsa diffusione di ossigeno negli strati

interni o in conseguenza dell'accumulo di acidi biliari. Sia il bioreattore caricato con gli sferoidi messo a punto da Powers (21) che il *Mayo Spheroid Reservoir Bioartificial Liver* di McIntosh (22), contenente 200-400 grammi di sferoidi ad alta densità ed utilizzato come fegato bioartificiale in pazienti con insufficienza epatica acuta, sono due esempi rappresentativi di come la configurazione tridimensionale sferoidale assicuri all'epatocita una maggiore preservazione della integrità strutturale, della vitalità e funzionalità epatocitarie rispetto ai modelli bidimensionali.

1.4. I BIOREATTORI

I bioreattori utilizzati per colture di cellule epatiche possono essere classificati in quattro grossi gruppi:

- 1) a fibre cave;
- 2) su piastra e monostrato;
- 3) letti e *scaffold* perfusi;
- 4) sistemi basati sull'incapsulazione e sospensione (figura 6).

	Hollow Fiber	Flat Plate and Monolayer	Perfused Beds/Scaffolds	Encapsulation and Suspension
Pros	Attachment surface; Potential for immunoisolation; Well characterized; Cells protected from shear stress	Uniform cell distribution and microenvironment	Ease of scale-up; Promotes 3D architecture; Minimal transport barrier	Potential for immunoisolation; Ease of scale-up; Uniform microenvironment
Cons	2D cell layer; Nonuniform cell distribution; Transport barrier by membranes or gels	Complex scale-up; Potential large dead volume; Cells exposed to shear forces; Low surface area-to-volume ratio	Nonuniform perfusion; Cells exposed to shear forces	Transport barrier due to encapsulation; Degradation of microcapsules over time

Figura 6. Caratteristiche dei diversi design di bioreattori

Alcuni di questi bioreattori, caricati con epatociti suini o umani, hanno avuto un'applicazione clinica come terapia extracorporea di supporto temporaneo delle funzioni epatiche in pazienti affetti da insufficienze epatiche acute di diversa eziologia in attesa di trapianto (23-36). In conseguenza della Moratoria Europea sugli xenotrapianti nel 2003 (37), che ha decretato la sospensione di tutte le sperimentazioni cliniche con il fegato bioartificiale in ambito europeo e a causa della ridotta reperibilità di grosse quantità di materiale umano, l'orientamento attuale è volto all'uso di questi sistemi come biosensori a cellule per la valutazione *in vitro* del metabolismo e della tossicità dei farmaci.

1.4.1. Bioreattori a fibre cave

Nella maggior parte dei bioreattori a fibre cave gli epatociti sono immobilizzati sotto forma di aggregati sulla superficie esterna delle fibre, mentre il lume interno è deputato al passaggio del mezzo di perfusione. Una tale configurazione consente da un lato di ridurre l'intensità delle forze di *shear stress* cui sono sottoposte le cellule, ma dall'altro presenta limitazioni legate al ridotto trasferimento di massa agli epatociti, con conseguente riduzione dell'apporto di sostanze nutrienti e ossigeno e accumulo di sostanze di rifiuto e prodotti di scarto derivanti dal metabolismo energetico e respiratorio.

Anche Sullivan (38) aveva dimostrato che un apporto di ossigeno non adeguato può rappresentare una limitazione di questi tipi di bioreattore. Al fine di risolvere questo aspetto è necessario che la configurazione di questi bioreattori sia definita in maniera tale che lo spazio tra le fibre cave non debba essere né troppo ampio, allo scopo di assicurare il mantenimento di un numero adeguato di epatociti vitali, né troppo ristretto, per fornire un'ossigenazione ottimale alle cellule. Le soluzioni proposte nei diversi sistemi al fine di assicurare l'apporto di un'adeguata pressione parziale di ossigeno (pO_2_{IN}) nei vari sistemi: Gerlach ha utilizzato, in aggiunta alle fibre cave, un altro set di fibre permeabili all'ossigeno strettamente interconnesso con il precedente (39); Nyberg ha utilizzato lo spazio intraluminare sia per realizzare l'*attachment* delle cellule, immobilizzate in un gel di collagene, che per la perfusione del mezzo (40).

I bioreattori a fibre cave sono stati i sistemi più ampiamente utilizzati per le diverse applicazioni in ambito clinico: la stessa

tecnologia è stata, infatti, impiegata sia per la dialisi nei pazienti affetti da insufficienza renale grave, sia come fegato bioartificiale in qualità di *bridge therapy* nelle insufficienze epatiche acute di diversa eziologia. Sebbene attualmente in ambito europeo non ne sia previsto l'uso a livello routinario, nel passato più recente i bioreattori a fibre cave sono stati ampiamente utilizzati in numerosi trial clinici. Il dispositivo che in assoluto è stato il più impiegato è l'*HepatAssist* della Circe Biomedical (oggi Arbios) (41) (figura 7).

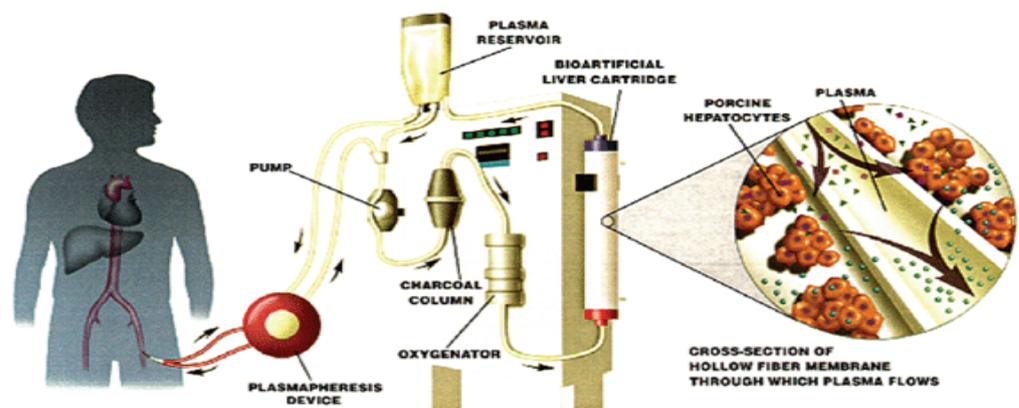


Figura 7. Il sistema HepatAssist

Il sistema HepatAssist, sviluppato da Demetriou e dai suoi collaboratori, si differenzia dagli altri sistemi per quanto riguarda tre principali aspetti:

- la fonte cellulare è costituita da 5-7 miliardi di epatociti di maiale criopreservati immessi in un cilindro di policarbonato composto da una membrana semipermeabile a fibre cave e porose a base di cellulosa nitrato/cellulosa acetato, che separa il compartimento attraverso il quale passa il plasma del paziente da quello dove vengono allocati gli epatociti;

- il perfusato è rappresentato da plasma invece del sangue;
- nel sistema è presente una colonna di carbone con la funzione di filtrare il plasma prima che esso entri nel bioreattore stesso.

In pratica il sistema comprende un separatore di plasma, attraverso cui è separata dal sangue la parte corpus colata; il bioreattore, che, presentando una velocità di flusso elevata (220-500 ml/min.), consente al plasma di realizzare diversi passaggi al suo interno prima di ritornare al paziente; un ossigenatore di membrana; una pompa per la circolazione attraverso il BAL e due colonne di carbone collocate a monte del BAL al fine di depurare previamente il plasma del paziente.

L'utilizzo del sistema *HepatAssist* è stato autorizzato in un *Trial* Multicentrico internazionale in cui sono stati arruolati 171 pazienti. L'*endpoint* primario dello studio, la sopravvivenza a 30 giorni, è stata ottenuta nel 71% dei pazienti del braccio intervento e non è risultata statisticamente significativa rispetto a quella riportata nel gruppo controllo (62%). Inoltre la metodica di criopreservazione, se da un lato presenta il vantaggio di preservare gli epatociti rendendoli immediatamente disponibili per un loro utilizzo nel bioreattore, dall'altro ne riduce drasticamente la vitalità.

Insieme all'*HepatAssist*, un altro sistema ampiamente sviluppato è stato l'ELAD (*Extra-corporeal Liver Assist Device*), sviluppato da Sussman nel 1992 (figura 8).

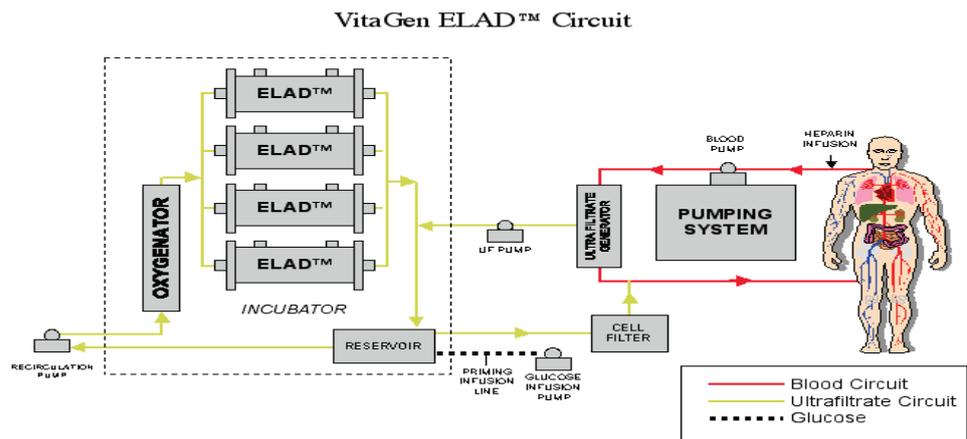


Figura 8. Il sistema ELAD

Tale sistema utilizza la linea cellulare C3A, una popolazione clonale altamente differenziata isolata da una linea cellulare di epatoblastoma umano (HepG2), seminata nello spazio extracapillare di una cartuccia da emodialisi contenente 10.000 fibre cave con un'area superficiale pari a 2 metri quadrati. Lo spazio intracapillare è usato, nel periodo di crescita, per il passaggio del mezzo di coltura e dell'ossigeno e, durante l'uso clinico, per la perfusione col sangue del paziente. Una sperimentazione clinica pilota controllata ha previsto l'applicazione dell'ELAD in 24 pazienti, riportando miglioramenti della funzionalità renale, delle funzioni cognitive e della stabilità emodinamica, ma non nella sopravvivenza (42).

Il sistema di supporto epatico ibrido messo a punto da Gerlach, il MELS, appare un pò più sofisticato rispetto ai precedenti, in quanto distinguiamo un compartimento cellule e un modulo dialisi (figura 9).

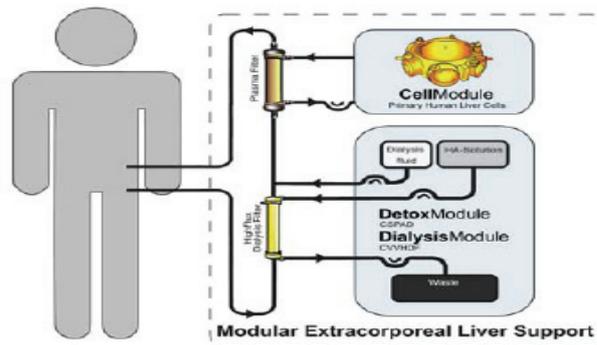


Figura 9. Schema del MELS

Il modulo cellule è costituito da numerosi sistemi capillari in poliuretano, intrecciati e indipendenti, che entrano ed escono dal bioreattore in quattro distinti fasci, ognuno dei quali svolge una specifica funzione: ingresso e fuoriuscita di plasma, apporto di ossigeno, rimozione di anidride carbonica (31, 39). Il MELS è stato il primo sistema di supporto epatico utilizzato nell'ambito di un *Trial* clinico, utilizzando sia epatociti porcini che umani provenienti da fegati scartati per il trapianto. Tale studio di fase I ha previsto l'arruolamento di 8 pazienti che sono stati trattati con il MELS caricato con epatociti primari umani per una durata totale di trattamento compresa tra 7 e 144 ore. Nessun evento avverso è stato riscontrato e in tutti gli otto pazienti trattati è stato riscontrato un miglioramento dello *status* neurologico e dei parametri coagulativi (43, 44).

Numerosi altri bioreattori a fibre cave sono stati utilizzati in *Trial* clinici:

- TECA- *Hybrid Artificial Liver Support System* (TECA-HALSS) (32) e l'*Hybrid-Bioartificial Liver* (HBAL), sviluppati entrambi in Cina (45, 46);

- I sistemi sviluppati da De Bartolo (47), Sullivan (38) e Schwartlander (48).

Qui di seguito è riportata una panoramica delle principali configurazioni dei bioreattori a fibre cave più frequentemente utilizzati (49):

- 1) gli epatociti sono coltivati all'esterno delle fibre cave sotto forma di sospensioni di aggregati cellulari, o legati a *microcarrier*, o sono fatti aderire alla superficie della membrana, mentre il plasma del paziente o il mezzo di coltura sono fatti fluire all'interno delle fibre (figura 10);

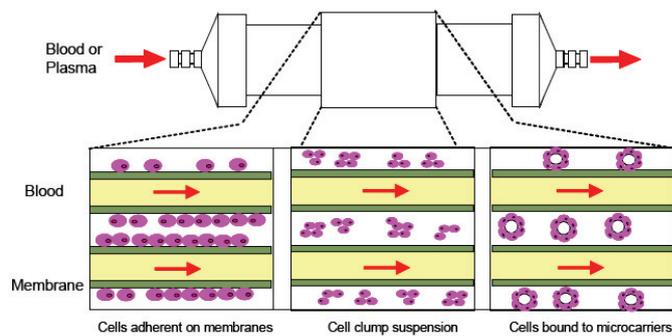


Figura 10. Configurazione 1

- 2) gli epatociti sono inclusi in un gel a base di collagene o alginato e sono assemblati all'interno delle membrane semipermeabili delle fibre cave (40), mentre la perfusione con il plasma del paziente o il mezzo di coltura ha luogo sulla superficie esterna o in mezzo alle fibre (figura 11);

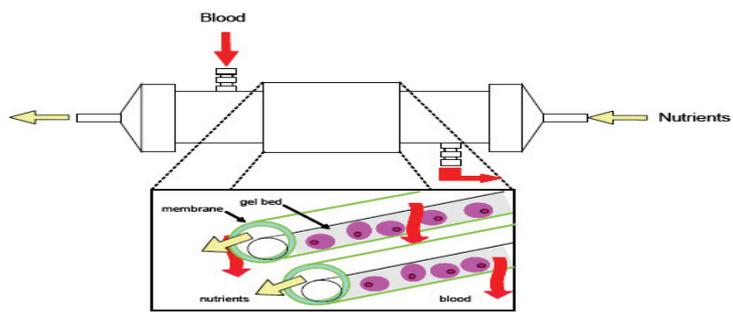


Figura 11. Configurazione 2

3) gli epatociti sono coltivati all'esterno e tra le membrane delle fibre cave, che sono organizzate a formare una rete tridimensionale. Nella configurazione del bioreattore sono previste fibre aggiuntive deputate all'ingresso e alla fuoriuscita del plasma del paziente o del mezzo di coltura, al rifornimento di ossigeno ed alla rimozione di anidride carbonica (31, 39, 43, 44) (figura 12);

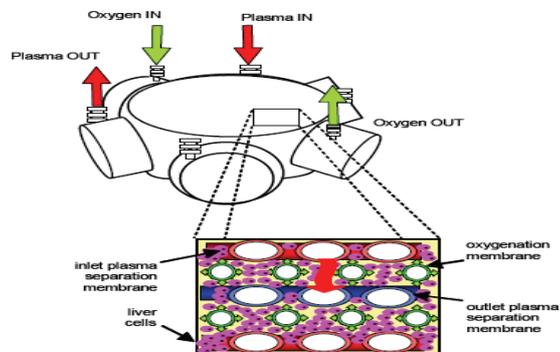


Figura 12. Configurazione 3

4) gli epatociti, sotto forma di aggregati, sono immobilizzati all'interno della matrice tridimensionale avvolta a spirale e sono direttamente perfusi con il mezzo di coltura o il plasma. L'apporto di ossigeno e la rimozione di anidride carbonica sono garantiti attraverso membrane microporose poste all'interno della matrice tridimensionale (34-36) (figura 13);

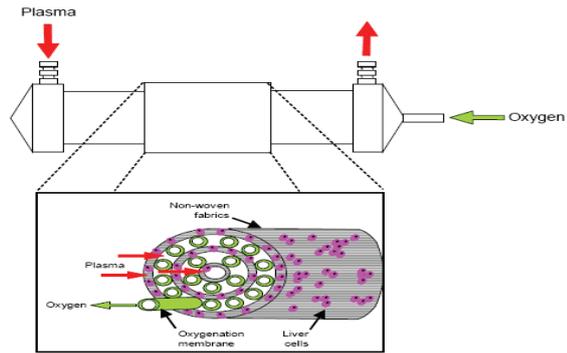


Figura 13. Configurazione 4

5) in questa configurazione è ripreso quanto già riportato nella precedente, con la differenza che la direzione del flusso del mezzo di coltura o del plasma è radiale rispetto alla matrice tridimensionale, allo scopo di ottimizzare il trasporto di ossigeno alle cellule e ridurre le variazioni di pressione di ossigeno tra l'ingresso e l'uscita (50) (figura 14).

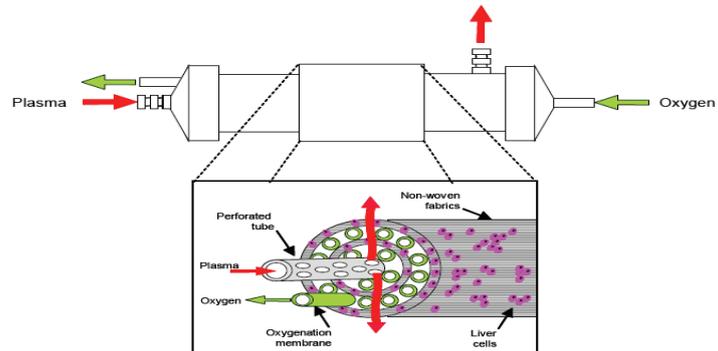


Figura 14. Configurazione 5

1.4.2. Letti e scaffold perfusi

Diversamente dai bioreattori a fibre cave, in questi sistemi gli epatociti sono a diretto contatto con il mezzo di coltura, senza interposizione di una membrana semipermeabile. Questa configurazione, se da un lato consente di bypassare problematiche legate all'insufficiente trasferimento di massa tra il medium e le

cellule, dall'altro risente degli effetti prodotti dallo *shear stress* sulle cellule.

Hoque ha elaborato un sistema costituito da 10 *scaffold*, il cui principale componente è tereftalato di polietilene incorporato in una fibra cava a base di polisulfone, posizionati longitudinalmente all'interno del bioreattore (figura 15).

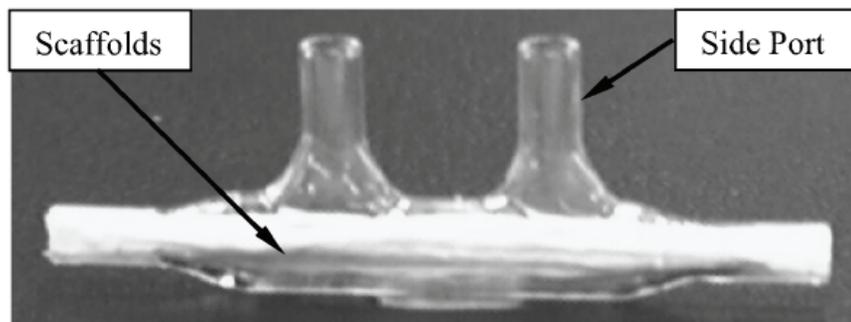


Figura 15. Il modulo bioreattore di Hoque

Questa organizzazione consente di realizzare una configurazione tridimensionale altamente organizzata con un'elevata superficie di ancoraggio per gli epatociti, di creare colture ad alta densità fortemente ancorate al supporto, prevenendo il distacco delle cellule dallo *scaffold* a causa dello *shear stress*, e, nel contempo, è in grado di garantire il mantenimento nel tempo di condizioni ideali di flusso del medium, apporto di ossigeno e nutrienti e rimozione dei prodotti di rifiuto (51).

Un altro *scaffold* particolarmente interessante è quello descritto da Kataoka (52). All'interno del bioreattore la linea cellulare HepG2 è in grado di proliferare, formare *cluster* e, in soli tre giorni di coltura, presenta una produzione di albumina tre volte superiore a quella degli epatociti coltivati in *monolayer*.

Il Fegato Bioartificiale messo a punto a Ferrara (53) è costituito da due componenti (figura 16): quella biologica è rappresentata da epatociti umani isolati a partire da fegati umani scartati da trapianto e criopreservati. La parte artificiale del BAL (Performer O. Liver, RanD S.r.L., Cavezzo, MO, Italia) è costituita da una macchina per plasmateresi; un circuito extracorporeo per la perfusione degli epatociti; il bioreattore, al cui interno sono contenute le cellule; un ossigenatore e una cartuccia di resina che assorbe selettivamente la bilirubina e gli acidi biliari. Il circuito extracorporeo è connesso al paziente tramite un catetere a doppio lume inserito nella vena femorale superficiale.

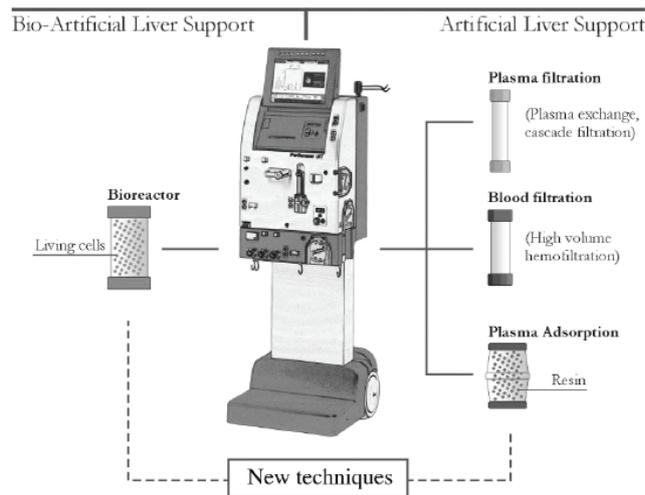


Figura 16. Il fegato bioartificiale di Ferrara

Il bioreattore è stato progettato al fine di permettere il contatto diretto tra il plasma del paziente e le cellule epatiche; per questo è stata adottata la geometria del flusso radiale, secondo la quale il plasma diffonde dall'interno verso l'esterno del bioreattore, dopo aver attraversato il comparto occupato dalle cellule. Date le caratteristiche costruttive del bioreattore, lo spazio disponibile può

essere riempito facilmente con una quantità fino a 200-300 grammi di epatociti, venendosi così a costituire una coltura cellulare ad alta densità.

Il fegato bioartificiale AMC-BAL, nato dalla collaborazione con l'*Academic Medical Center* di Amsterdam, è un sistema di supporto epatico ibrido costituito da fibre in poliestere, per l'annidamento delle cellule sotto forma di piccoli aggregati, e capillari permeabili ai gas come sistema di ossigenazione capace di fornire agli epatociti l'adeguato apporto di ossigeno (25, 34, 35) (figura 17).



Figura 17. L'AMC-BAL e il circuito di plasmaferesi

Due sono le caratteristiche che contraddistinguono questo sistema dai precedenti: il plasma del paziente è a diretto contatto con gli epatociti, mimando la perfusione fisiologica del sangue nei sinusoidi nel fegato *in situ*; inoltre la fonte cellulare è rappresentata da una coltura primaria di epatociti suini e non da cellule criopreservate o da linee cellulari di origine tumorale. Prima di essere testata nell'uomo, la capacità funzionale dell'AMC-BAL è stata valutata in diversi modelli animali d'insufficienza epatica (54):

- ischemia epatica totale, nel ratto;

- devascolarizzazione epatica, nel suino;
- epatectomia totale, nel suino (55).

Negli animali sottoposti a trattamento con il BAL si sono ottenuti risultati statisticamente significativi, in particolare un aumento della sopravvivenza, la riduzione dei livelli plasmatici di ammonio e bilirubina; inoltre sono state anche valutate l'efficacia e la sicurezza del dispositivo.

Tra il 2000 ed il 2003 il Centro di Biotecnologie dell'A.O.R.N. "A. Cardarelli" di Napoli ha coordinato un *Trial* Multicentrico nel quale sono stati arruolati 14 pazienti affetti da epatite acuta fulminante di diversa eziologia che sono stati supportati con l'AMC-BAL caricato con circa 10-15 miliardi di epatociti di suini *Specific Pathogen Free* (SPF), come terapia ponte in attesa di trapianto ortotopico di fegato. L'AMC-BAL, collegato al paziente con un sistema di plasmaferesi, è stato in grado di supportare le funzioni vitali determinando il miglioramento di importanti parametri emodinamici e neurologici (34, 35). Questo ha contribuito a migliorare la sopravvivenza nei pazienti trapiantati dal 50% al 72%.

1.4.3. Sistemi basati sull'incapsulazione e sospensione

Gli epatociti possono essere incapsulati all'interno di *beads* semipermeabili a base di alginato che possono essere poi introdotti all'interno di colonne perfuse con mezzo di coltura ossigenato (56, 57). Sistemi di questo genere possono essere facilmente prodotti in larga scala, esprimono livelli di funzione epatocellulare più prolungati rispetto ai sistemi in *monolayer* e l'involucro di

alginato che avvolge gli epatociti svolge la funzione ulteriore di protezione dallo *shear stress*. Presentano, però, una scarsa stabilità, problemi di trasferimento di massa e sono soggetti a processi di degradazione nel tempo (58).

1.4.4. High-Throughput Systems (HTS)

Le caratteristiche essenziali degli *High Throughput Systems* (HTS) possono essere schematizzate come di seguito riportato:

- possibilità di miniaturizzazione e automatizzazione del sistema e dei saggi, che comporta riduzione dei volumi con un relativo incremento delle aree superficiali;
- opportunità di effettuare molti test utilizzando quantità ridotte di reagenti, materiali e tessuti cellulari;
- capacità di riprodurre più fedelmente le caratteristiche morfologiche, strutturali e funzionali del fegato *in situ* e, in particolare, la fluidodinamica degli organi a perfusione rapida;
- realizzazione di configurazioni tridimensionali;
- standardizzazione e riproducibilità delle metodiche di analisi;
- organizzazione del *design* dei sistemi sotto forma di vetrini da microscopio che, tra le varie peculiarità, offrono la possibilità di effettuare ispezioni visive in continuo dei processi che hanno luogo all'interno del bioreattore, di realizzare uno *scanning* mediante *chip* automatizzati per la preparazione, il trasporto e l'analisi della cinetica e della dinamica di farmaci o reagenti introdotti nel sistema,

nonché di eseguire un controllo dinamico delle condizioni di coltura e del rifornimento di nutrienti. Il sistema che maggiormente rispecchia gli aspetti fin qui descritti è lo *SlideReactor* descritto da Schwartlander (48) (figura 18);

- scelta di materiali biocompatibili;
- utilizzo di materiali semplici da reperire e lavorare e con un buon rapporto costo-efficacia.

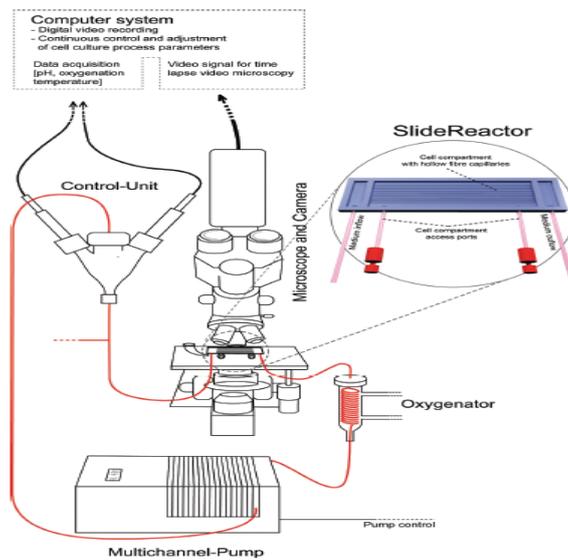


Figura 18. Lo SlideReactor

1.4.5. Sistemi cellulari epatici miniaturizzati

La tendenza attuale è diretta verso la miniaturizzazione dei bioreattori. La microfluidica è, infatti, la scienza che studia il flusso di liquidi semplici o complessi all'interno di micro geometrie. I volumi con i quali l'esperto in microfluidica è pratico a lavorare oscillano in genere tra 100 nanolitri e 100 microlitri e le dimensioni dei vari sistemi, in genere, sono comprese tra 1 e 1.000 μm . Tali sistemi presentano generalmente flusso laminare simile a quello presente *in vivo* e canali microfluidici con elevati rapporti superficie/volume

idonei per il rifornimento di ossigeno e nutrienti e l'apporto di un mix controllato di reagenti che normalmente sono trasportati in quantità limitata attraverso la semplice diffusione.

I sistemi cellulari epatici miniaturizzati sono preparazioni molto semplici da realizzare ed economicamente vantaggiose; consentono, inoltre, un appropriato controllo dei flussi assicurando un adeguato apporto di nutrienti, nonché una costante rimozione dei prodotti di scarto. Sono in grado di assicurare un *management* idoneo dei tempi fisiologici di contatto delle molecole diluite con le cellule e i tessuti, di regolare l'andamento di flussi multipli e di misurare la cinetica e la dinamica di farmaci e/o molecole per studi di tossicità acuta e cronica.

Diverse sono anche le tipologie di materiali, tra i quali il silicone, gli elastomeri e i polimeri biodegradabili, utilizzati per la fabbricazione di sistemi di coltura bidimensionali e tridimensionali ispirati a questa nuova tecnologia.

Leclerc (59), ad esempio, ha utilizzato un elastomero del silicone, il polidimetilsilossano (PDMS) per la realizzazione di 10 *scaffold* impilati l'uno sull'altro utilizzati per la coltura di $3-4 \times 10^7/\text{cm}^3$ cellule HepG2 (figura 19).

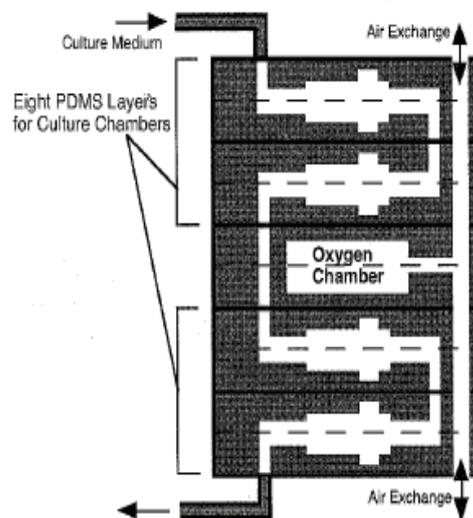


Figura 19. Il bioreattore di Leclerc

Il silicone presenta due caratteristiche peculiari: la biocompatibilità e un'elevata permeabilità ai gas. Dopo 15 giorni di coltura le cellule presentavano una buona adesione allo *scaffold* e una capacità di sintesi di albumina sette volte superiore a quelle delle stesse cellule coltivate in *monolayer* su membrane rivestite con lo stesso polimero.

Materiali che si presentano particolarmente interessanti sono il polietereeterchetone modificato (PEEK-WC) e il polietersulfone (PES), di cui sono composte le fibre cave del sistema di De Bartolo (47) (figura 20). Tali materiali, in virtù della elevata permeabilità, sono in grado di assicurare una rimozione facilitata ed efficiente delle molecole e dei soluti dal compartimento cellulare mediante un processo convettivo.

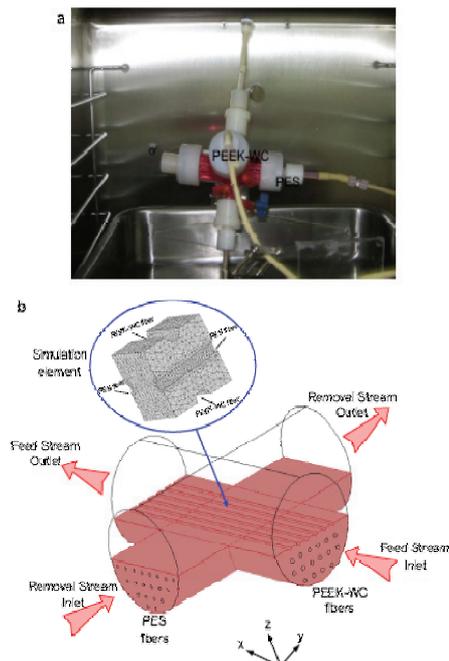


Figura 20. Il bioreattore sviluppato da De Bartolo

Altri sistemi particolarmente interessanti sono i “liver on chip” riportati nel lavoro di Baudoin (60) utilizzando la tecnologia microfluidica già descritta. Questi sistemi risultano costituiti da microcamere riempite con tessuto appositamente ingegnerizzato e cellule connesse tra di loro mediante un *network* microfluidico. La linea cellulare HepaRG, derivante da un carcinoma epatocellulare umano, è in grado di proliferare ed esprimere un fenotipo simil-epatocitario, una volta raggiunta la confluenza; anche le cellule HepG2 sono in grado di ricostituire in tali sistemi strutture tridimensionali attive fino a due settimane in coltura.

Un'estensione di questi sistemi, volta a miniaturizzare e semplificare non più un singolo organo, ma un intero organismo, è il *Micro Cell Culture Analog* (μ CCA) sviluppato da Viravaidya (61) (figura 21). L' μ CCA o “animal-on-a-chip”

è un modello semplice a quattro compartimenti (“polmone-fegato-tessuto adiposo e altri tessuti”) costituito a partire da un substrato a base di silicone, usando le tecniche litografiche standard, racchiuso all’interno di due pezzi in Plexigas.

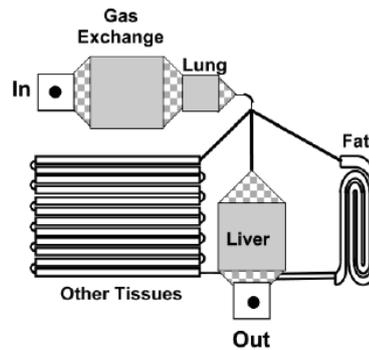


Figura 21. Il Micro Cell Culture Analog (μ CCA)

Le due camere soprannominate “fegato” e “polmone” contengono cellule, mentre le altre due, soprannominate “altri tessuti” e “tessuto adiposo”, non contengono cellule, ma hanno lo scopo di mimare la fluidodinamica *in vivo*. Il sistema comprende, inoltre, un sensore integrato che consente il monitoraggio continuo dei livelli di ossigeno all’interno del sistema.

Un successivo approccio, volto alla miniaturizzazione e semplificazione dell’intero organismo attraverso i *biochip* microfluidici, è rappresentato dall’IdMOC, acronimo per *Integrated Discrete Multiorgan Cell Culture*, descritto da Li (62) (figura 22).

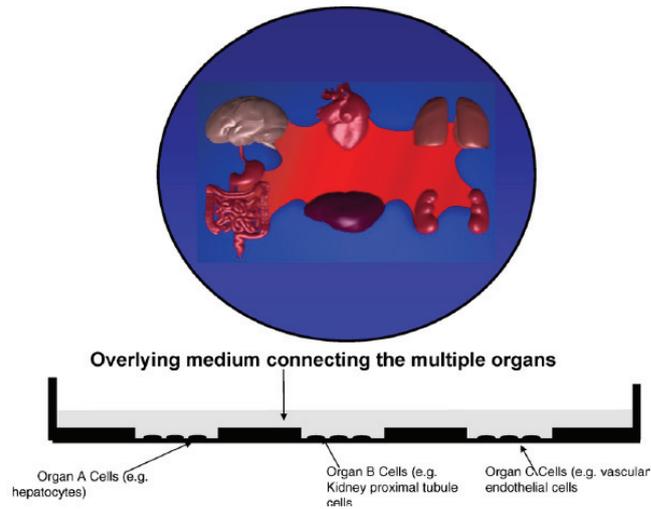


Figura 22. Rappresentazione schematica dell'IdMOC

Questo sistema è costituito da un pozzetto all'interno del quale sono localizzati tanti pozzetti più piccoli in cui sono messe in coltura differenti tipologie di cellule, ognuno nel proprio mezzo di coltura appropriato, in modo tale da riprodurre il complesso delle cellule nell'organismo. In questo modo il sistema permette che tutti i tipi cellulari in esso contenuti siano trattati nelle stesse identiche condizioni ed inoltre che i metaboliti prodotti da uno specifico tipo cellulare possano interagire con altre cellule, così come accade *in vivo*. Inoltre la presenza di una barriera di separazione fisica tra cellule provenienti da tessuti differenti riproduce più fedelmente la situazione fisiologica in cui i diversi organi sono fisicamente separati tra di loro. Tutti queste peculiarità hanno fatto in modo che l'IdMOC possa essere stato riconosciuto come sistema efficacemente utilizzato per la valutazione della tossicità organo-specifica.

Un altro interessante sistema è il "Cell-on-Chip" di Lemaire (63) composto da un singolo strato, spesso pochi nanometri, di

natura idrofobica di perfluoro-octil-silano (FDTS) collocato all'interno di un vetrino di natura idrofilica. Il dispositivo è costruito in maniera tale da consentire il posizionamento sul vetrino di un microscopio automatico munito del software *Pathfinder* capace di realizzare un'analisi sequenziale e automatizzata di tutti i processi metabolici (*High Content Analysis* HCA), nonché di organizzare i dati rilevati. Inoltre la miniaturizzazione dei diversi saggi cellulari dà la possibilità di effettuare *screening* completi e multivariati delle sostanze chimiche analizzate. Infine la scelta di materiali semplici e di basso costo rappresenta un ulteriore vantaggio; a ciò si aggiunge, però, l'elevato livello di variabilità osservato nelle risposte cellulari agli insulti tossici.

Dash (64) e Domansky (65) hanno realizzato un bioreattore ingegnerizzato come modello per gli studi di tossicità (figura 23). Il loro sistema è costituito da una matrice organizzata in vari pozzetti, a ciascuno dei quali corrispondono tante unità di tessuto epatico organizzate in una struttura tridimensionale e continuamente perfuse dal mezzo di coltura. Il *device* ospita 12 bioreattori isolati, ognuno con la sua pompa integrata, che sono in grado di riprodurre i gradienti di ossigeno in maniera analoga a quelli osservati nei sinusoidi epatici. La versione più recente di tale sistema comprende l'integrazione dei diversi bioreattori in una singola piastra allo scopo di incrementare le rese, la riproducibilità e migliorare la semplicità di utilizzo.

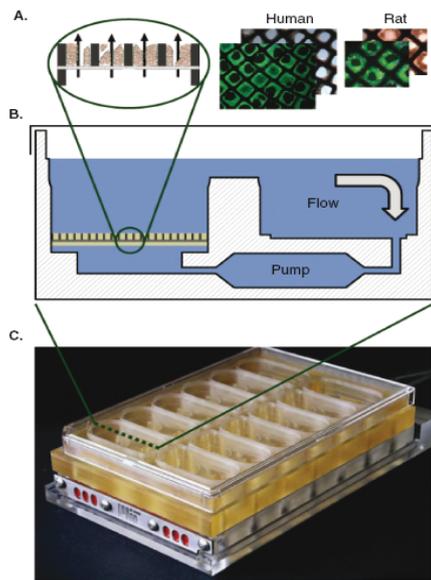


Figura 23.

A: la matrice

B: il sistema

C: la piastra con i bioreattori integrati

Lee e Dordick (66) hanno, infine, sviluppato il *DataChip*, un *microarray* a base di MCF7, una linea cellulare di adenocarcinoma mammario umano positiva al recettore degli estrogeni, e di cellule Hep3B (epatoma umano) incapsulate in un idrogel tridimensionale (collagene o alginato) coltivate all'interno della matrice del bioreattore e inserite in un vetrino da microscopio. Il *DataChip* è stato estensivamente impiegato in studi di citotossicità e per la valutazione dei processi di inibizione ed induzione farmaco-metabolica mediati dalle isoforme enzimatiche del citocromo P450.

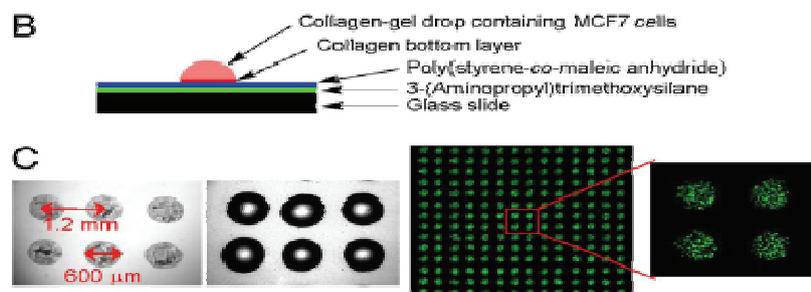


Figura 24. Il *DataChip*

1.5. CARATTERISTICHE DEL BIOSENSORE OTTIMALE

Da quanto visto finora, la progettazione del *design* di un biosensore a cellule epatiche deve necessariamente tenere in considerazione tutta una serie di aspetti che sono in grado di influenzare la vitalità e la funzionalità degli epatociti in esso coltivati.

1.5.1 Scaffold e membrane

Lo *scaffold* rappresenta non solo il supporto al quale le cellule sono fatte aderire, ma è in grado di esercitare una profonda influenza su una serie di funzioni cellulari (morfologia, espressione a livello genico di fattori di crescita e differenziazione cellulari). Inoltre, quando interposto come una membrana tra il compartimento cellulare ed il medium, lo *scaffold* svolge una funzione addizionale: regolare il trasporto di acqua e nutrienti dal mezzo alle cellule e di cataboliti e prodotti di rifiuto in direzione opposta (67).

I primi materiali utilizzati per la composizione delle membrane degli *scaffold* erano a base di acetato di cellulosa (lo stesso materiale utilizzato per le membrane da dialisi) e presentavano basso diametro nominale di passaggio dei pori della membrana e scarsa permeabilità idraulica. L'evoluzione successiva ha portato all'utilizzo di membrane con più elevata permeabilità idraulica, membrane asimmetriche per ultrafiltrazione altamente permeabili con diametro di passaggio dei pori della membrana maggiore o

uguale a 100 kDalton (kDa) e membrane per ultrafiltrazione con dimensione dei pori pari a 0.2 μ m.

Un altro importante aspetto da prendere in considerazione è la composizione chimica delle membrane. La maggior parte di esse sono composte da uno scheletro polimerico idrofobico reso idrofilo mediante aggiunta di gruppi idrofili, in seguito a fusione con polimeri idrofili (polisulfone) o a trattamento fisico (polipropilene). Un numero più limitato di bioreattori presenta membrane a base di polimeri idrofili (cellulosa e i suoi derivati) con un diametro di passaggio dei pori di circa 100 kDa (51).

1.5.2. Bidimensionale o tridimensionale?

Lo sviluppo delle configurazioni tridimensionali può essere considerato un grosso passo in avanti nella ricerca sperimentale sulle colture cellulari perché, rispetto a quelle bidimensionali, consentono di preservare in misura maggiore l'integrità delle funzioni epatocellulari, essendo in grado di riprodurre più fedelmente il microambiente e le condizioni *in vivo*. Schug (68) e Sivaraman (7) sono riusciti ad ottenere nel loro microreattore tridimensionale livelli di espressione funzionale più simili al microambiente tessutale *in vivo* e agli epatociti isolati rispetto a vari tipi di colture bidimensionali (*sandwich* a base di collagene e/o Matrigel[®]) dopo 20 giorni di coltura.

I sistemi bidimensionali sono stati particolarmente apprezzati ed utilizzati in passato per la semplicità di allestimento e perché consentono di tenere sotto controllo le resistenze al trasferimento di massa, effettuare l'ispezione *in situ* delle cellule e studiare gli effetti delle interazioni eterotipiche di diversi tipi cellulari fatti

aderire su *multilayer* o superfici specifiche. Rispetto a tali sistemi, le configurazioni tridimensionali sono sicuramente più complesse da realizzare, così come è più difficile tenere sotto controllo alcuni fenomeni, tra cui il trasporto di ossigeno e nutrienti, l'osservazione *in situ* delle cellule e i profili del *signaling* intracellulare.

L'applicazione dei principi dell'ingegneria tessutale ha reso possibile la creazione di matrici polimeriche altamente porose come *scaffold* tridimensionali e la ulteriore possibilità di derivatizzare gli *scaffold*, ottimizzando forma e composizione in seguito a legame di fattori di crescita, molecole di adesione, peptidi sintetici, zuccheri o proteine della matrice extracellulare, ha dato vita ad un insieme multivariato di strutture tridimensionali che, per un motivo o per l'altro, presentano caratteristiche interessanti (67).

1.5.3. L'ossigenazione

Gli epatociti sono cellule che necessitano dell'apporto di un'adeguata quantità di ossigeno per una ottimale espressione delle loro funzioni. Nel fegato *in situ* ciò è garantito dall'arteria epatica e dalla vena porta; nei sistemi *in vitro* l'ossigeno rappresenta, invece, il fattore limitante a causa della sua scarsa solubilità e diffusione nel mezzo di coltura e degli elevati tassi di consumo di ossigeno da parte degli stessi epatociti. Pertanto la progettazione di sistemi tridimensionali *in vitro* deve tenere conto anche di questi aspetti al fine di garantire le migliori condizioni per l'espressione delle funzioni differenziate proprie dell'epatocita.

Allen e Bathia (69) hanno descritto il fenomeno della zonazione all'interno del sinusoidi epatico, cioè di diversi gradienti di ossigeno, passando dall'ingresso dei sinusoidi, dove si registrano valori di pressione parziale di ossigeno più elevati (60-70 mm Hg) alla zona pericentrale (35-60 mm Hg) fino alla zona efferente perivenosa, la meno ricca sezione di ossigeno di tutto il sinusoidi ($pO_2 = 25-35$ mm Hg). Pertanto la realizzazione all'interno di un bioreattore a fibre cave di un gradiente di ossigeno controllato compreso tra 25 e 70 mm Hg è in grado di assicurare la riproduzione di un ambiente funzionalmente simile a quello osservato *in vivo*.

La frazione di ossigeno che diffonde nel mezzo di coltura non è sufficiente a garantire la sopravvivenza degli aggregati cellulari all'interno dei bioreattori. Questo problema è stato risolto in varie modalità:

- usando come mezzo di perfusione del bioreattore il sangue intero o il plasma;
- perfondendo il bioreattore con plasma addizionato con *carrier* di ossigeno, tra cui globuli rossi bovini nel sistema di Sullivan (38) o di Chu (70), o perfluorocarboni (71);
- aggiungendo al bioreattore un sistema di ossigenazione integrato, come nel MELS (43, 44) e nell'AMC-BAL (34, 35).

1.5.4. Equilibrio tra flusso e shear stress

Si può parlare di una relazione di proporzionalità diretta tra il gradiente di ossigeno che si viene a creare all'interno del

bioreattore e il flusso del medium. E' stato calcolato che, per flussi compresi tra 0.45 e 2.2 ml/min, la concentrazione di ossigeno in uscita da un bioreattore *flat plate* è pari, rispettivamente, a 106 e 144 mm Hg. Ma anche le forze di *shear stress* aumentano proporzionalmente all'aumentare del flusso: ciò determina alte tensioni di ossigeno all'interno del bioreattore e danno cellulare di tipo ossidativo in seguito alla formazione di specie reattive dell'ossigeno. Sappiamo, inoltre, che, in risposta allo stress idrodinamico, le cellule rimodellano la matrice extracellulare e modificano la loro composizione tessutale. Flussi di perfusione elevati influenzano la velocità di degradazione e le caratteristiche strutturali e meccaniche dello *scaffold* e provocano alterazioni nel processo di rimodellamento, causando il deterioramento della qualità del tessuto in fase di rigenerazione e la rimozione degli elementi della matrice sintetizzati *de novo*, che sono trascinati via dal flusso di mezzo.

Dall'altro verso, basse velocità di perfusione concorrono a ridurre le forze di *shear stress*, ma limitano l'apporto di ossigeno e il rifornimento di nutrienti, riducendo la vitalità e la sopravvivenza cellulari.

Nel suo bioreattore caricato con epatociti murini (72), Tilles ha dimostrato che, quando le forze di *shear stress* superavano i 5 dyn/cm², si osservava una riduzione significativa della sintesi di urea e albumina già dopo 3 giorni di perfusione, mentre valori di tali forze compresi tra 0.01 e 0.33 dyn/cm² non esercitavano alcuna influenza sulle funzioni epatocitarie fino a 10 giorni di coltura. Il bioreattore messo a punto da Park (19) è composto da micro scala nature, fabbricate usando tecniche fotolitografiche, che

sono in grado di ridurre le forze di *shear stress* di 30 volte in corrispondenza della superficie cellulare, permettendo di raggiungere elevati flussi volumetrici per garantire un adeguato apporto di ossigeno.

La definizione della configurazione ideale di bioreattore deve, quindi, tenere conto di tutta questa serie di aspetti e cercare di realizzare un equilibrio perfettamente bilanciato tra la velocità di flusso del mezzo, l'apporto di ossigeno e nutrienti e lo stress di taglio cui le cellule sono sottoposte.

1.5.5. La matrice extracellulare

La ricostruzione dei componenti la matrice extracellulare all'interno dei bioreattori permette di creare un microambiente in cui gli epatociti, in virtù delle interazioni che stabiliscono tra di loro e con la matrice, sono in grado di esprimere capacità funzionali ottimali. Allo scopo, quindi, di riprodurre i diversi componenti della matrice extracellulare sono utilizzate proteine (collagene, fibronectina, laminina), gel a base di proteoglicani o polisaccaridi (alginato) che favoriscono l'*attachment* e promuovono la differenziazione e la polarizzazione degli epatociti, anche se possono ridurre la diffusione di ossigeno e carbogeno e aumentare la resistenza idraulica nel compartimento cellulare (49). Questi problemi sono stati superati da McClelland (73) mediante l'incorporazione di microsferi porose e cave in polistirene che causano un'aumentata diffusione dell'ossigeno all'interno del gel di collagene tipo I in virtù dell'elevata area superficiale. Un'altra modalità di approccio al problema dell'ossigenazione non adeguata si è basata sull'aggiunta al gel di collagene di

un'emulsione di perfluorocarbone (PFC) previamente ossigenata; in questo caso si verifica rilascio di ossigeno sia dal PFC che dal gel di collagene che accumula il gas quando la richiesta di ossigeno da parte delle cellule è elevata.

I materiali sintetici polimerici rappresentano una valida alternativa a quelli di origine naturale, a causa della maggiore riproducibilità nella composizione e della loro nano- e micro-struttura ben definita e caratterizzata. Presentano diverse analogie con le membrane biologiche, tra cui il trasporto selettivo delle molecole, la resistenza meccanica e termica, la biocompatibilità, l'elasticità. A queste proprietà si aggiunge, poi, il vantaggio della loro plasticità e adattabilità alle più svariate applicazioni. De Bartolo (47) ha dimostrato che gli epatociti umani, messi in coltura per 19 giorni su membrane a base di polietereeterchetone (PEEK) e poliuretano (PU), mostravano una migliore efficienza di adesione e capacità biosintetiche e metaboliche paragonabili a cellule coltivate su substrati naturali, come il collagene. Chu (70) ha sviluppato un bioreattore multistrato a flusso radiale contenente nanofibre derivatizzate con galattosio in grado di riprodurre artificialmente il microambiente biochimico della matrice extracellulare. Vinci (74) ha utilizzato nel suo sistema polimeri biodegradabili composti da due soluzioni a base di poli-DL-lattide-co-glicolide (PLGA) 20% e di poli-L-lattide (PLLA) 10% in cloroformio. Questi *scaffold* artificiali sono stati posizionati in una matrice tridimensionale all'interno di un bioreattore modulare multi-compartimentale (MCmB), il cui componente principale è il polidimetildisilossano. La linea cellulare HepG2 ha evidenziato

una maggiore stabilità metabolica nello *scaffold* artificiale a base del copolimero rispetto ai sistemi di coltura statici in monostrato.

1.5.6. Le co-culture

Nel fegato l'epatocita è sicuramente la cellula maggiormente rappresentata. Occorre, però, considerare che anche le cellule non parenchimali rivestono un ruolo di fondamentale importanza nel mantenimento delle funzioni differenziate e nella preservazione dell'omeostasi attraverso un continuo e proficuo processo di comunicazione con l'epatocita che ha luogo mediante le interazioni tra le cellule e la matrice extracellulare in cui sono coinvolte diverse molecole solubili che fungono da segnale.

Tra le cellule non parenchimali distinguiamo:

- le cellule endoteliali che, attraverso la secrezione di citochine, ossido di azoto (NO) e componenti della matrice, sono indispensabili per la riorganizzazione degli epatociti in coltura;
- le cellule di Kupffer, che mediano l'infiammazione e l'immunità innata attraverso la secrezione di molecole di segnale e la presentazione dell'antigene;
- le cellule stellate, che fungono da deposito per la vitamina A, modulano la matrice extracellulare e la risposta infiammatoria in seguito a conversione a miofibroblasti (43) e sintetizzano l'*Hepatocyte Growth Factor* (HGF).

Hirose (75) e Harimoto (76) hanno dimostrato che la co-cultura tra epatociti e cellule endoteliali è in grado di preservare la morfologia cellulare e la capacità di secernere le proteine della

matrice extracellulare in misura più elevata rispetto agli epatociti in monocultura. Anche Novik (77) ha recentemente dimostrato che gli epatociti, durante 6 giorni di coltura con cellule non parenchimali, mostravano una capacità metabolica (reazioni di fase I e II) più sostenuta rispetto ai sistemi statici e alle monoculture.

La co-coltura tra epatociti (in questo caso porcini) e cellule non parenchimali è stata testata anche in un bioreattore: Geir (78) ha dimostrato che è in grado di migliorare l'attività biosintetica e metabolica cellulare ed è responsabile del rilascio di ammonio nella circolazione sanguigna, individuando in questo modo una nuova funzione svolta dalle cellule non parenchimali.

1.5.7. Fenotipo cellulare e funzionalità

Gli epatociti, ai fini dell'espressione di un fenotipo funzionale, dipendono dall'ancoraggio ad un substrato di origine naturale o artificialmente riprodotto. Per questo l'ipossia, un mezzo di coltura non idoneo, la perdita delle interazioni cellula-cellula o una ridotta composizione della matrice extracellulare sono tutte cause responsabili di una ridotta espressione delle funzioni *liver specific*. I biomarker che da anni sono classicamente utilizzati come predittivi della funzionalità epatocellulare sono:

- il tasso di *uptake* dell'ossigeno (OUR);
- la determinazione della vitalità cellulare mediante il test di esclusione al Trypan Blue;
- la determinazione dell'attività metabolica (degradazione di ammonio in urea, di galattosio in glucosio) e sintetica (albumina) della cellula epatica;

- il consumo dei lattati;
- le reazioni di detossificazione (attività del complesso enzimatico del citocromo P450, determinazione delle reazioni di coniugazione di fase II e delle proteine di trasporto);
- la produzione di bile;
- la necrosi cellulare: aumento dei livelli plasmatici di lattato deidrogenasi (LDH) ed aspartato amino transferasi (AST);
- l'apoptosi (determinazione attività della caspasi 3 clivata);
- lo stato energetico (ATP).

La ricerca di nuovi test di screening per la valutazione della funzionalità epatica rappresenta una prospettiva molto allettante in questo ambito. Le nuove metodiche, che si stanno mettendo a punto, alla luce anche dei progressi compiuti dalla biologia molecolare, devono presentare alcune caratteristiche importanti, tra cui predittività, riproducibilità, sensibilità e specificità.

O'Brien (79) ha sviluppato una metodica *in vivo* per la determinazione dei meccanismi di epatotossicità dei farmaci o delle nuove entità chimiche utilizzando epatociti di ratto isolati a fresco trattati con induttori o inibitori degli enzimi deputati al metabolismo dei farmaci.

Più di recente (47) si sono approcciate nuove metodiche di analisi, tra cui il *Resident Time Distribution* (RTD), mediante introduzione di un tracciante che consente di valutare la fluidodinamica all'interno del bioreattore, e nuove tecniche, come la microscopia a due fotoni. Powers (21) ha sviluppato un sistema fabbricato in due differenti versioni: un micro- e un milli-reattore. Una caratteristica peculiare di questo sistemi è data dalla possibilità di osservare *in situ* le cellule, poste in *scaffold* tridimensionali

sottoposti a perfusione continua, mediante l'utilizzo della microscopia a due fotoni. Il flusso uniforme e le concentrazioni di sostanze nutritive costanti all'interno dello *scaffold* permettono la creazione di un microambiente in cui gli aggregati di epatociti mantengono la loro morfologia e funzionalità fino a 2 settimane.

Infine un altro approccio molto utilizzato, in particolare negli ultimi anni, è quello tossico genomico. Tale disciplina permette di osservare il modo in cui una determinata sostanza chimica altera la funzione dei geni all'interno di una cellula, la risposta biologica che ne consegue, le reazioni di riparazione e di protezione della cellula, oltre alle sue modifiche a lungo termine mediante l'uso di DNA *microarray* o della *real-time quantitative Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) (80). Applicando questo approccio a colture o co-culture di epatociti, si ottiene la lista completa delle aggressioni biologiche provocate dal prodotto in esame, con particolare riguardo alla sua potenziale azione epatotossica.

Un altro approccio è rappresentato dal programma *ToxCast* (81) dell'*U.S. Environmental Protection Agency* (EPA). Si tratta di un esperimento in larga scala che prevede l'utilizzo di una batteria di nove test *in vitro* e *in silico* ad HTS che siano capaci di predire la potenziale tossicità delle sostanze chimiche, riducendo l'impiego degli animali ed utilizzando colture e co-culture primarie di vari tipi cellulari (epatociti compresi). Sono inclusi saggi biochimici e cellulari ad HTS che misurano le interazioni molecolari con specifiche proteine *target*, tecniche di *imaging* cellulare ad alta prestazione per visualizzare il fenotipo cellulare, saggi di espressione genica per gli enzimi del citocromo P450 e per specifici trasportatori; saggi di genotossicità ad HTS e, infine,

saggi per la determinazione dei fattori di trascrizione, dei profili di attività biologica, delle cinetiche di crescita, delle variazioni morfologiche cellulari, dei livelli dei *biomarkers* e dell'attività degli enzimi metabolizzanti di fase I e II.

1.5.8. Stabilità funzionale nel lungo termine

Condizioni sfavorevoli di coltura possono essere accompagnate dalla perdita della differenziazione cellulare e conseguente perdita delle funzioni specializzate dell'epatocita. Pertanto la valutazione della funzione epatocitaria rappresenta un momento di fondamentale importanza nei biosistemi in coltura e, in particolare, la definizione dei tempi di preservazione di tali funzioni differenziate consente di caratterizzare l'efficienza di un bioreattore rispetto ad un altro. Tre-cinque giorni rappresentano il tempo minimo in cui è stato possibile preservare in un sistema *in vitro* le funzioni *liver-specific* (19, 52, 70) ; in altri bioreattori l'osservazione è stata prolungata fino a 14 (21, 82), 18 (7, 47) e 28 giorni (83, 84). Miranda ha dimostrato che l'incapsulazione di aggregati di epatociti di ratto (100-500 μm) in matrici di alginato ad alta viscosità e la coltura all'interno di un bioreattore sottoposto a perfusione dinamica è in grado di garantire il mantenimento del fenotipo epatocitario e di promuovere per oltre un mese di coltura lo sviluppo di tutti i processi metabolici ossigeno-dipendenti, tra cui la sintesi di urea e albumina e le reazioni di biotrasformazione di fase I (57).

1.5.9. La biomassa cellulare ideale

Gli epatociti umani isolati a fresco rappresentano il “gold standard” per la valutazione *in vitro* dei meccanismi fisiologici che regolano i processi biosintetici, funzionali e metabolici della cellula epatica e per la determinazione dell’epatotossicità. Queste cellule presentano, però, una serie di problematiche legate alla loro scarsa e non prevedibile disponibilità, al limitato potenziale di crescita, alla variabilità tra le preparazioni, ai ridotti tempi di coltura e, infine, alla propensione a subire alterazioni fenotipiche precoci e di varia tipologia. Infatti, probabilmente a causa di fenomeni di adattamento cellulare all’ambiente in coltura, si osserva la rapida riduzione dell’espressione dell’attività degli enzimi del citocromo P450, nonché una differente espressione genica basale nelle varie colture primarie di epatociti umani isolati a fresco.

Tutto ciò ha spinto gli studiosi verso la ricerca di fonti cellulari alternative per lo studio *in vitro* dei processi fisio-patologici che riguardano la cellula epatica nel lungo termine.

Le linee cellulari, derivanti in massima parte da tumori epatici umani, rappresentano in genere una valida alternativa, anche se sono carenti di molte funzioni epatocellulari: in particolare l’attività degli enzimi del citocromo P450 è molto ridotta. Le linee più utilizzate sono le HepG2 e le HepaRG, entrambe derivanti da carcinoma epatocellulare. Più recentemente, mediante l’analisi dei profili di espressione genica, si è dimostrato che le HepaRG, più delle HepG2, sono in grado di esprimere funzioni *liver specific* in maniera paragonabile alle colture primarie di epatociti umani (85). Possibili alternative possono essere rappresentate da:

- cellule staminali pluripotenti, epatoblasti e cellule ovali, capaci di differenziarsi in epatociti e colangiociti, e cellule staminali embrionali umane, capaci di dare luogo a cellule simil-epatocitarie;
- linee cellulari (HepG2 e C3A) rese immortalizzate mediante tecniche di ingegneria genetica (86, 87);
- tessuti e cellule di origine animale, che però presentano problemi di variabilità inter-specie e scarsa funzionalità.

Ad oggi nessuna di queste cellule è stata in grado di esprimere capacità funzionali stabili e paragonabili alle colture primarie di epatociti umani.

2. SCOPO DELLA TESI

Il programma di ricerca nell'ambito del Dottorato in Scienza sul Farmaco è stato svolto quasi interamente presso il Centro di Biotecnologie dell'A.O.R.N. "A. Cardarelli" di Napoli e si è focalizzato sulla valutazione delle potenzialità del mini Bioartificial Liver (miniBAL) come biosensore per la determinazione dell'epatotossicità di nuove molecole che abbiano effetto diretto sulla capacità sintetica e/o metabolica della cellula epatica e per lo studio delle reazioni di biotrasformazione citocromo P450-dipendenti.

In particolare, sono state valutate le azioni epatotossiche sugli epatociti umani caricati nel miniBAL di un anticorpo monoclonale coniugato ad una tossina (BT062) e della tossina ad esso legata (DM-4), su commessa di una multinazionale leader nel settore degli immunoderivati in Europa. L'immunoconiugato è attualmente impiegato nell'ambito di un *Trial* clinico nel trattamento delle forme recidivanti o recidivanti/refrattarie di mieloma multiplo, per le quali non esistono valide alternative terapeutiche.

3. MATERIALI E METODI

3.1. IL MIELOMA MULTIPLO

Il mieloma multiplo è una neoplasia caratterizzata dalla proliferazione ed accumulo di linfociti B e plasmacellule. Essa rappresenta il 10% di tutte le neoplasie ematologiche (88).

Tale patologia può presentarsi con gravità notevolmente variabile da soggetto a soggetto e ciò dipende essenzialmente dalla velocità di proliferazione delle plasmacellule, dalla quantità di immunoglobuline e dal tipo e dalla quantità delle citochine prodotte dalle plasmacellule e da altre cellule del midollo emopoietico.

Le plasmacellule tendono ad accumularsi nel midollo dove crescono generalmente in ammassi, visibili come focolai d'osteolisi alla radiografia dello scheletro, determinando maggiore fragilità delle ossa, che sono predisposte a fratture spontanee ed ipercalcemia. Questo, a sua volta, può comportare calcolosi, ulteriori disturbi a carico dei reni e problemi neurologici. Quando le plasmacellule diventano molte numerose possono, inoltre, impedire la crescita delle altre cellule sane del midollo con conseguente anemia, leucopenia e piastrinopenia. Per di più le immunoglobuline, notevolmente aumentate, sono responsabili di un incremento della viscosità del sangue, causando ipertensione arteriosa, oltre a fragilità capillare e tendenza alle emorragie spontanee.

Il mieloma multiplo rimane, purtroppo, una malattia inguaribile a prognosi infausta, nonostante le numerose opzioni terapeutiche oggi a nostra disposizione. L'unica eccezione è rappresentata dal

trapianto allogenico, procedura che ha il limite di essere gravata da una non trascurabile mortalità precoce e di essere riservata ai pochi soggetti in giovane età che hanno un donatore familiare o da registro compatibile.

La chemioterapia, assieme alle altre misure di supporto, è in grado di migliorare la sopravvivenza e la qualità di vita, ma è stata per molti anni finalizzata esclusivamente al contenimento della massa neoplastica. L'associazione terapeutica più frequentemente utilizzata è quella composta da un cortisonico con il melfalan: 0,25 mg/Kg/die per os x 4 giorni ogni 4-6 settimane, oppure 16 mg/mq ev ogni 2 settimane. Si tratta di una terapia semplice, di basso costo e limitata tossicità, ma con risposte lente e parziali nel 40-50% dei casi, in pazienti spesso sintomatici.

Con l'avvento di nuovi farmaci, più efficaci rispetto agli antineoplastici tradizionali, e della chemioterapia ad alte dosi seguita dall'infusione di cellule staminali emopoietiche autologhe nei pazienti fino ai 65-70 anni, le opzioni terapeutiche sono aumentate e la chemioterapia del mieloma multiplo è diventata abbastanza complessa.

Tra i nuovi farmaci è stato recentemente introdotto sul mercato il bortezomib, che agisce con un meccanismo d'azione completamente diverso dai citostatici classici, andando ad inibire a livello molecolare il proteasoma 26S e svolgendo un ruolo essenziale nel ricambio di proteine specifiche e nel mantenimento dell'omeostasi cellulare. Oltre al bortezomib, altre molecole da poco riscoperte per nuovi utilizzi terapeutici, come la talidomide e la lenalidomide, stanno cambiando lo scenario e offrono nuove speranze ai pazienti affetti da questa patologia.

Nonostante ciò, il trattamento del mieloma multiplo rappresenta ancora una grande sfida terapeutica; difatti l'introduzione dei nuovi farmaci costituisce solamente uno dei tanti passi in avanti che sono stati compiuti ai fini di rallentare l'evoluzione fatale di questa neoplasia, peraltro altamente aggressiva.

In questo contesto la TAP (*tumor-activated prodrug*) *technology* può fornire un importante contributo. Un TAP *compound* (figura 25) è costituito da un anticorpo monoclonale, in grado di interagire in maniera specifica con un target localizzato sulle cellule tumorali, a cui è legata una tossina molto potente. Questa nuova tecnologia combina la direzionalità dell'anticorpo monoclonale con l'effetto tossico legato al farmaco ad esso legato, permettendo di ottenere un effetto congiunto rappresentato da alta tossicità diretta solo sulle cellule tumorali. In questo modo si minimizzerebbe l'effetto tossico aspecifico, caratteristico della chemioterapia tradizionale, e diretto principalmente nei riguardi delle cellule in rapida proliferazione (tossicità ematologica, mucosale, gastrointestinale, alopecia) o nei riguardi di tessuti target (ne possono essere alcuni esempi la cardiotoxicità da antracicline e la cistite emorragica da ciclofosfamide).

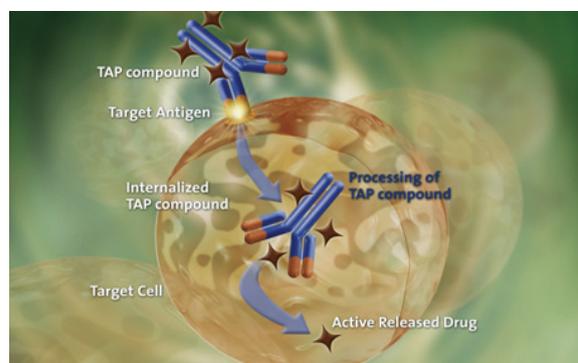


Figura 25. La TAP technology

3.2. IL BT062

Nel caso del nostro studio il *TAP compound* è un anticorpo monoclonale (BT062) diretto contro l'antigene CD138, altamente espresso sulle plasmacellule mielomatose.

Attraverso *linker* specifici, sono legate alla frazione costante dell'anticorpo, da 2 a 4 molecole di una tossina molto potente, il derivato DM-4 [N2-deacetil-N2'-(3-mercapto-1-ossopropil)] della maytansina, che svolge la sua azione tossica mediante inibizione della polimerizzazione della tubulina ed induzione di apoptosi (88, 89).

La citotossicità della maytansina, alcaloide naturale derivato dall'arbusto coltivato in Etiopia *Maytenus serrata*, è da 200 a 1.000 volte più elevata di quella degli altri farmaci antitumorali utilizzati in clinica che interferiscono con la polimerizzazione della tubulina, tra cui gli alcaloidi della Vinca e i tassani. Per di più il derivato DM-4 della maytansina è da 3 a 10 volte più citotossico della maytansina stessa.

DM-4, quindi, per il fatto che non presenta una finestra terapeutica sufficientemente ampia, è stato convertito in un profarmaco mediante legame, attraverso un *linker* specifico, con l'anticorpo monoclonale che lo direziona specificamente sull'epitopo di membrana CD138 altamente localizzato sulle cellule tumorali. Questo immunoconiugato di per sé non è in grado di esplicare alcuna azione tossica nel compartimento plasmatico, dal momento che è attivato solo in seguito al legame con la cellula target. Tale riconoscimento e il successivo legame, infatti, provoca l'internalizzazione del complesso antigene-anticorpo coniugato, il *processing* delle componenti proteiche ed il rilascio della tossina

che può esplicare la sua azione nociva andando ad inibire la mitosi nella cellula bersaglio ed inducendo l'apoptosi per attivazione delle caspasi.

Il CD138 o Syndecan-1 è un membro della famiglia dei proteoglicani transmembrana con catene di eparan solfato che risulta espresso, nei tessuti sani, sulle cellule epiteliali, endoteliali, mesenchimali, sugli epatociti, sulle plasmacellule e, nelle neoplasie ematologiche, è altamente espresso sulla maggioranza delle cellule di mieloma multiplo, ma anche su molte cellule tumorali di linfomi di Hodgkin, leucemie linfocitiche croniche, leucemie linfoblastiche e mieloblastiche acute. Non risulta, però, localizzato sulla superficie delle cellule staminali CD34-(da ciò deriva la ridotta tossicità a livello midollare), dei linfociti B e T, dei granulociti, dei monociti e delle cellule di vari organi, tra cui cuore, rene, cervello, polmone, milza, testicoli, utero (90).

L'immagine di seguito proposta (figura 26) mette in evidenza l'interazione tra le cellule mielomatose e le stromali midollari, responsabile dell'*up-regulation* dei fattori di crescita (tra cui IL-6, *Insulin Growth Factor* IGF-1), dello sviluppo di un fenotipo cellulare proliferativo ed pro-angiogenico, nonché dell'aumentata resistenza delle plasmacellule tumorali verso gli agenti citostatici comunemente utilizzati in terapia.

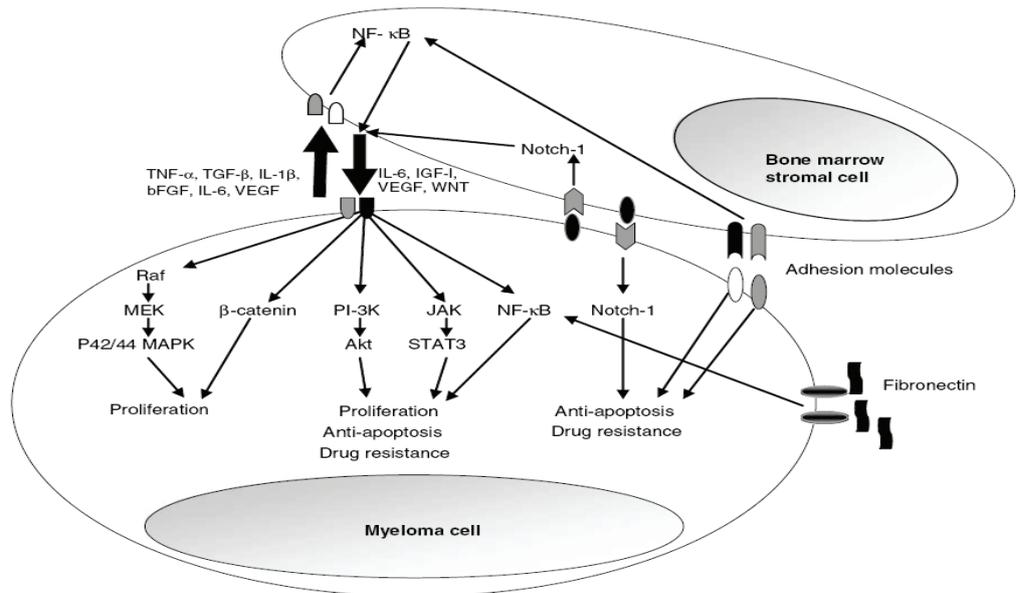


Figura 26. Meccanismi di trasduzione del segnale mediati dall'interazione tra cellule mielomatose e stromali

3.3. BT062: STUDI *IN VITRO* E SPERIMENTAZIONE CLINICA

L'efficacia e la specificità di BT062 sono state già ampiamente dimostrate *in vitro* su linee cellulari (OPM-1 e -2) di mieloma multiplo, nonché su colture e co-culture primarie di cellule di mieloma isolate da 3 pazienti, e *in vivo*, in un modello di impianto xenogenico della linea cellulare mielomatosa MOLP-8 per via sottocutanea in topi SCID (*Severe Combined ImmunoDeficiency*) e seguente iniezione singola di 450 µg/Kg di BT062 in dodicesima giornata. Questi studi *in vitro* ed *in vivo* hanno evidenziato la capacità di BT062 di:

- indurre l'apoptosi nelle cellule di mieloma in modo altamente selettivo ed efficace (IC₅₀ = concentrazione che inibisce la crescita del 50% di cellule tumorali = valori pico- e nano-molari);
- ridurre *in vitro* le interazioni tra plasmacellule mielomatose e cellule stromali del midollo osseo;

- superare la resistenza ai chemioterapici antiblastici da esse mediata.

Inoltre studi preclinici, effettuati su roditori e scimmie, hanno consentito di ricavare dati relativi alla farmacocinetica dell'immunoconiugato e alla tossicità acuta dopo dose singola.

Lo sviluppo clinico di BT062 è essenzialmente consistito nella realizzazione di anticorpi monoclonali chimerici, nel miglioramento del design molecolare, nell'ottimizzazione del processo di produzione dell'anticorpo, nello sviluppo tossicologico preclinico, nella scelta della designazione di farmaco orfano, mediante richiesta all'*European Medicines Agency* (EMA), allo scopo di usufruire di tutta una serie di agevolazioni che sono connesse all'attribuzione della designazione di "orphan drug".

E'attualmente in corso un *Trial* clinico non controllato di fase I/IIa che prevede la somministrazione di una singola dose, ripetuta ogni 3 settimane, di BT062 in pazienti affetti da mieloma multiplo recidivante/refrattario nei quali si è verificato fallimento delle due precedenti linee terapeutiche a base di un immunomodulatore e dell'inibitore del proteasoma (Bortezomib) (91).

L'obiettivo primario dello studio è la determinazione della dose limitante la tossicità (DLT) e della massima dose tollerata (MTD); tra gli obiettivi secondari la determinazione dei principali parametri farmacocinetici e dell'efficacia antitumorale.

Il numero massimo di pazienti da arruolare è stato fissato a 70; non sono stati finora registrati effetti tossici rilevanti, ad eccezione di anemia e di tossicità epatica e cutanea in soggetti già predisposti; un paziente è tuttora in trattamento da più di sei mesi

con l'anticorpo, senza che si sia verificata progressione della patologia.

3.4. IL MINIBAL

Negli ultimi anni diversi approcci sperimentali sono stati utilizzati per la realizzazione di *scaffold* su cui gli epatociti potessero orientarsi, riorganizzarsi, ricostituire la citoarchitettura e le interazioni con il microambiente, al fine di mantenere per periodi di tempo prolungati le loro funzioni specifiche.

Presso il Centro di Biotecnologie dell'Ospedale Cardarelli, in collaborazione con il prof. Robert Chamuleau dell'Academic Medical Center di Amsterdam, è stato assemblato un mini Bioartificial Liver (miniBAL) (figura 27), in grado di ospitare circa 300 milioni di epatociti umani.

Tra i sistemi descritti in precedenza, il miniBAL rientra nella categoria dei letti e scaffold perfusi. Le caratteristiche che lo identificano sono: la struttura tridimensionale e, a differenza dei sistemi in monostrato, la presenza di un sistema di ossigenazione integrato, finalizzato all'ottimizzazione delle funzioni metaboliche e respiratorie. Gli epatociti umani sono isolati a partire da fegati ritenuti non idonei al trapianto o da resezioni epatiche ottenute chirurgicamente da pazienti affetti da patologie differenti, di origine tumorale e non.



Figura 27. Il miniBAL

Il consenso informato del paziente è stato sempre assicurato.

Il nucleo del sistema è rappresentato da una resina in polisulfone/materiale plastico, all'interno della quale passa un fascio di fibre cave idrofobiche in polipropilene, rivestite di una membrana porosa per l'ossigenazione e la rimozione dell'anidride carbonica, sostenute da una matrice tridimensionale in poliestere, sotto forma di tessuto-non tessuto non intrecciato avvolto a spirale, costruita per favorire l'ancoraggio delle cellule in coltura (figura 28). La struttura tridimensionale di questi microfilamenti in poliestere permette l'annidamento delle cellule nelle sue maglie, la loro riaggregazione in piccoli *clusters* e l'ancoraggio delle cellule stesse alle fibre.

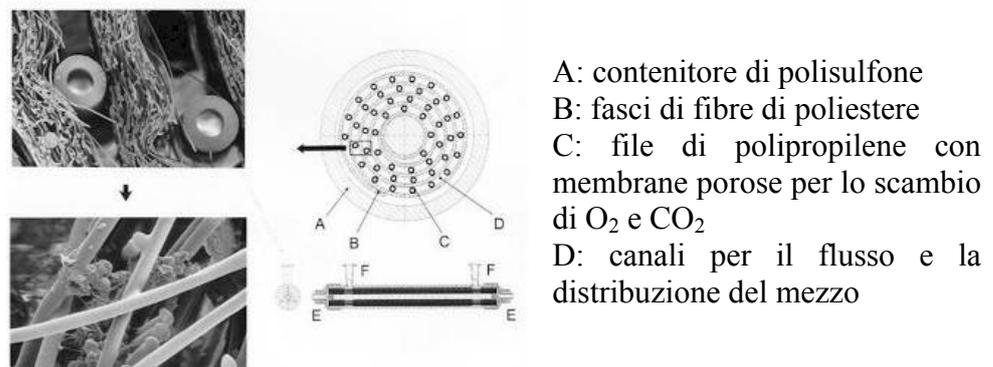


Figura 28. La struttura interna del miniBAL

Il miniBAL è prodotto dalla RanD, azienda italiana con sede in provincia di Modena, specializzata nella produzione di apparati elettromedicali basati sulla tecnologia della circolazione extracorporea. La realizzazione del programma di ricerca ha visto la collaborazione degli ingegneri della RanD che hanno lavorato all'ottimizzazione delle caratteristiche strutturali del bioreattore, al fine di assicurare una omogenea distribuzione cellulare, nonchè

all'implementazione delle caratteristiche architettoniche idonee per la coltura di epatociti umani. Inoltre sono stati progettati e costruiti tubatismi *ad hoc* per il contenimento dei piccoli volumi (35 ml) di mezzo di coltura in ricircolo nel miniBAL.

3.5. ISOLAMENTO DEGLI EPATOCITI E CARICAMENTO DEL MINIBAL

Gli epatociti umani sono stati ottenuti da fegati ritenuti non idonei al trapianto e da resezioni epatiche. Tali campioni sono stati prelevati presso la Camera Operatoria della Unità Chirurgia Epato-Biliare/Centro Trapianti Fegato dell'Ospedale Cardarelli.

Il campione è stato trasferito presso il Centro di Biotecnologie in un contenitore sterile alla temperatura di 4°C (la stessa utilizzata per la preservazione dell'organo durante il trapianto) e, in camera bianca classe 10.000, sono stati effettuati la digestione enzimatica del pezzo, secondo la metodica di Seglen modificata (92), e l'isolamento degli epatociti. La procedura di Seglen prevede varie fasi, durante le quali sono state mantenute rigorosamente condizioni di sterilità:

- lavaggio del campione epatico con soluzione priva di calcio, tamponata, riscaldata a 37°C ed equilibrata con il 5% di CO₂ e il 95% di aria, al fine di rimuovere le cellule ematiche;
- digestione enzimatica con collagenasi (C9891-5G Sigma-Aldrich), mediante perfusione a 37°C con pompa peristaltica. Si verifica, in questo modo, la degradazione

proteolitica del collagene, principale costituente della matrice extracellulare;

- sminuzzamento manuale del fegato, che ha ormai perso la sua consistenza iniziale;
- filtrazione degli epatociti, liberi dalla struttura lobulare epatica;
- lavaggio-separazione-centrifugazione (a 750 RPM per 5 minuti) della sospensione ottenuta per tre volte;
- determinazione della vitalità cellulare mediante il test di esclusione al Trypan Bleu;
- conta degli epatociti in camera di Bürker al microscopio ottico.

Dopo avere valutato se i risultati in termini di vitalità e resa rientrano nel range ritenuto accettabile, sono stati seminati per gravità nel miniBAL, pre-raffreddato a 4°C, 300 milioni di epatociti umani, sospesi in Williams'E medium, con una vitalità superiore all'80%.

Al fine, poi, di mantenere l'intero apparato alla temperatura di 37°C, il bioreattore è stato posizionato in un incubatore e successivamente connesso ad un erogatore di gas (95% aria e 5% di CO₂, flusso: 10 ml/min). Il bioreattore è stato ruotato intorno al suo asse longitudinale alla velocità di una rivoluzione al minuto per un periodo di 150 minuti per assicurare una distribuzione uniforme degli epatociti, per accelerarne l'immobilizzazione, l'intrappolamento, l'attacco e l'autoaggregazione (fase di *attachment*).

Terminata questa fase, il miniBAL è sottoposto a procedura di lavaggio ed a successiva sostituzione della soluzione nutritiva per gli epatociti con medium fresco per allontanare le cellule morte e non adese, per rifornire sostanze nutritive e rimuovere le tossine.

L'attività funzionale del bioreattore è stata valutata sostituendo il medium di coltura cellulare con un specifico mezzo isotonico da noi appositamente disegnato al fine di effettuare una valutazione funzionale degli epatociti caricati nel miniBAL.

Tale mezzo isotonico (test medium) è costituito a partire da Williams'E medium (Biowhittaker) come base addizionato con Fetal Bovine Serum (10% v/v; Euroclone), (L)-ornitina (2 mM; Sigma Aldrich Co.P.O.), (L)-glutamina (2 mM; Sigma Aldrich Co.P.O.), desametasone (1 μ M; Biopharma Futura), insulina (20mU/ml; NovoNordisk); (L)-lattato (2 mM; Sigma Aldrich Co.P.O.), sodio bicarbonato (89 mM; Carlo Erba Spa) ed ammonio cloruro (5 mM; Sigma Aldrich Co.P.O.) (figura 29).

La formulazione del mezzo di coltura, prodotto industrialmente, è stata da noi implementata mediante l'aggiunta di componenti carenti nella formula originaria, nonché importanti precursori e reattivi nel ciclo dell'urea (L-glutamina e L-ornitina), fattori promuoventi la differenziazione epatocitaria e la crescita cellulare (desametasone ed insulina) ed, infine, sodio bicarbonato (al fine di garantire il mantenimento di valori di pH del mezzo compresi nel range 7.35-7.45) e L-lattato, per la valutazione del metabolismo anaerobio del glucosio.

Sali inorganici			
Calcio cloruro	0.2 g/L	Potassio cloruro	0.4 g/L
Solfato cuprico pentaidrato	1×10^{-7} g/L	Sodio bicarbonato	2.2 g/L
Nitrato ferrico nonaidrato	1×10^{-7} g/L	Sodio cloruro	6.8 g/L
Cloruro di magnesio tetraidrato	1×10^{-7} g/L	Sodio fosfato monobasico anidro	0.122 g/L
Solfato di magnesio anidro	0.0977 g/L	Zinco solfato eptaidrato	2×10^{-7} g/L
Aminoacidi			
L-alanina	0.09 g/L	L-leucina	0.075 g/L
L-arginina (base libera)	0.05 g/L	L-lisina	0.08746 g/L
L-asparagina monoidrata	0.02 g/L	L-metionina	0.015 g/L
L-aspartato	0.03 g/L	L-fenilalanina	0.025 g/L
L-cisteina	0.04 g/L	L-prolina	0.03 g/L
L-cistina	0.02 g/L	L-serina	0.01 g/L
L-glutamato	0.0445 g/L	L-treonina	0.04 g/L
Glicina	0.05 g/L	L-triptofano	0.01 g/L
L-istidina	0.015 g/L	L-tirosina	0.05045 g/L
L-isoleucina	0.05 g/L	L-valina	0.05 g/L
Vitamine			
Acido ascorbico	2.27×10^{-3} g/L	Niacinamide	1.0×10^{-3} g/L
D-biotina	5×10^{-4} g/L	Acido D-pantotenico	1.0×10^{-3} g/L
Calciferolo	1×10^{-4} g/L	Idrocloruro di piridossina	1.0×10^{-3} g/L
Colina	1.5×10^{-3} g/L	Retinolo acetato	1.0×10^{-4} g/L
Acido folico	1.0×10^{-3} g/L	Riboflavina	1.0×10^{-4} g/L
Mioinositolo	2.0×10^{-3} g/L	Tiamina idrocloruro	1.0×10^{-3} g/L
Menadione	1.0×10^{-5} g/L	DL- α -tocoferolo fosfato	1.0×10^{-5} g/L
Vitamina B12	2.0×10^{-3} g/L		
Varie			
D-glucosio	2 g/L	Metil linoleato	3.0×10^{-5} g/L
Glutatione ridotto	5.0×10^{-5} g/L	Sodio piruvato	0.025 g/L

Componenti aggiunti	
L-ornitina	2 mM
L-glutamina	2 mM
Desametasone	1 μ M
Insulina	20 mU/ml
L-lattato	2 mM
Sodio bicarbonato	89 mM
Ammonio Cloruro	5 mM

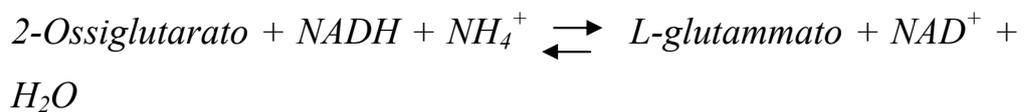
Figura 29. Composizione base del Williams'E medium (in alto) e componenti aggiunti (in basso)

La presenza di una concentrazione definita e prefissata di ammonio nel mezzo ha permesso di rilevare la sua conversione in urea attraverso prelievi seriali del test medium in continuo ricircolo nel miniBAL al tempo 0 e dopo 1, 2 e 3 ore dall'inizio del test di valutazione della funzionalità. Il mantenimento di valori di temperatura (37°C), di velocità di flusso del mezzo di coltura (10 ml/min) e di aria (50 ml/min) sono stati garantiti nel corso dell'intera procedura sperimentale, sia durante il ricircolo della Williams'E medium che nel corso delle tre ore di ricircolo del test medium.

L'analisi spettrofotometrica convenzionale (UV/vis Beckman DU640) ha permesso di misurare il decremento dell'ammonio dal mezzo isotonic specifico, mentre il corrispondente incremento di urea è stato valutato con una nuova metodica che ha previsto l'utilizzo del lettore ELISA (SEAC Sirio S). E' stato, infatti, messo a punto un micro metodo utilizzando piastre a 96 pozzetti, allo scopo di ridurre i volumi di reattivi e campioni da impiegare

nell'analisi. La valutazione della capacità del metodo di dosare le piccole concentrazioni di urea contenute nei ridotti volumi di mezzo in ricircolo nel miniBAL è stata effettuata attraverso l'allestimento di diverse diluizioni scalari a partire da una soluzione madre contenente una concentrazione nota di urea (50 mg/dl).

Per quanto concerne la misurazione del consumo di ammonio, è stato utilizzato il kit specifico (*Ammonia Enzymatic UV-Method – Randox*) che sfrutta la reazione reversibile mediata dalla glutammato deidrogenasi:



Tale reazione genera una quantità di NADH ossidato in rapporto 1:1 rispetto all'ammonio presente, che è, dunque, utilizzata come rilevatore per il dosaggio dello ione ammonio, in quanto il NADH ossidato è determinato attraverso l'assorbimento della luce a 340 nm.

La determinazione dell'urea prodotta dagli epatociti nel miniBAL è stata eseguita con il metodo della diacetilmonossima, come evidenziato nella seguente reazione:



L'urea e gli altri composti con struttura simile (gruppo ureidico) reagiscono con la diacetilmonossima formando un cromogeno: avviene una condensazione tra l'urea e la diacetilmonossima, che si scinde in diacetile e idrossilamina. L'idrossilamina, che si forma nel corso della reazione e che ostacolerebbe la formazione del colore, è eliminata con l'aggiunta di un ossidante.

La concentrazione dell'urea è direttamente proporzionale all'intensità del colore prodotto, che è determinato attraverso l'assorbimento di luce a 520 nm (*QuantiChrom™ Urea Assay Kit DIUR-500*). I risultati sono stati espressi sotto forma di micro moli di urea sintetizzate o di ammonio consumate in tre ore e normalizzati per 100 milioni di epatociti vitali.

In tutti gli esperimenti effettuati sono stati caricati, con un campione cellulare proveniente dalla stessa resezione, due miniBAL (controllo e trattato) che sono stati sottoposti a tutte le procedure operative consistenti nella somministrazione in prima giornata di solo Williams'E medium (miniBAL controllo) e di mezzo di coltura contenente una determinata concentrazione di epatotossico (miniBAL trattato), al fine di valutare gli eventuali effetti sulla funzionalità e sugli indici di vitalità epatica prima dell'insulto e 24 e 48 ore post insulto (figura 30).

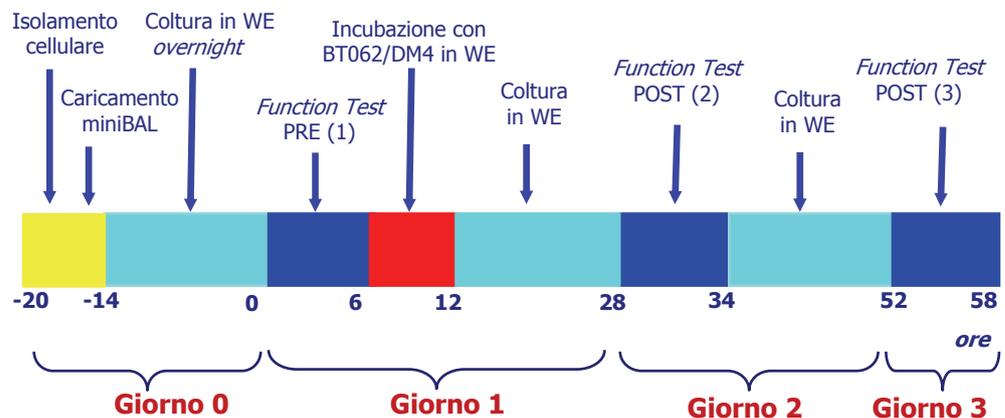


Figura 30. Il design sperimentale

La valutazione quantitativa della vitalità e della proliferazione cellulare a livello mitocondriale è stata condotta utilizzando il WST-1 test (Roche), un saggio colorimetrico messo a punto nei

nostri laboratori adattandolo agli epatociti caricati nel miniBAL. WST-1 è un sale di tetrazolio che, quando è in contatto con cellule metabolicamente attive, è convertito in formazano ad opera delle deidrogenasi mitocondriali; il formazano formatosi, è colorato e, pertanto, assorbe ad una lunghezza d'onda compresa tra 420 e 480 nm. In base alla legge di Lambert-Beer, l'assorbanza misurata sarà direttamente proporzionale alla concentrazione di formazano presente nel campione. Maggiore, quindi, è l'assorbanza del formazano, più elevata sarà la sua concentrazione, maggiore sarà il numero di cellule metabolicamente attive. Il saggio messo a punto nel miniBAL ha previsto l'incubazione dei reattivi in rapporto 1:10 rispetto al volume interno del miniBAL e la raccolta di un volume di mezzo di coltura dal ricircolo del miniBAL pari a 2.5 ml. I campioni sono stati raccolti ogni 5 minuti durante 30 minuti. L'assorbanza del formazano è stata valutata usando una cuvetta in quarzo (cammino ottico 1 cm) e lo spettrofotometro UV/vis (Beckman DU640). L'assorbanza di tutti i campioni è stata determinata utilizzando come bianco il mezzo di coltura in ricircolo prelevato immediatamente prima l'incubazione del formazano nel miniBAL.

3.6. ANALISI ISTOLOGICHE

Al termine delle procedure sperimentali i miniBAL sono stati sottoposti ad analisi istologiche ed immunoistochimiche presso il Dipartimento di Anatomia e Citopatologia dell'Azienda Universitaria "Federico II": Le procedure effettuate sono così schematizzate:

- Prelievo degli epatociti dal miniBAL. Si procede all'estrazione della matrice interna del bireattore, alla quale sono adesi gli epatociti, e al campionamento dei vari pezzi.
- Fissazione. Ha essenzialmente un triplice scopo: immobilizzare i costituenti cellulari e tissutali del campione in uno stato più vicino possibile a quello naturale; consentire al preparato di sopportare gli stress fisici e chimici insiti nelle successive fasi di allestimento; preservare i campioni dall'attacco di muffe e batteri. Il fissativo utilizzato è la formalina (soluzione acquosa di aldeide formica al 10%), che agisce formando ponti aldeidici tra le proteine del tessuto, fissandole nella posizione originaria. Le proteine fissate non avranno più attività enzimatica, né saranno capaci di diffondere, impedendo, così, lo sviluppo dei processi autolitici.
- Processazione e Inclusione. Previa disidratazione del campione con un agente chimico anidro (etanolo in concentrazioni crescenti fino all'alcool assoluto) e lavaggio con xilene, si sostituisce l'acqua presente nel tessuto con la paraffina.
- Sezionamento. Il microtomo consente di ottenere sezioni di 4-5 µm che sono raccolte su vetrino portaoggetti e adagate in un bagnetto termostato a 37°C.
- Sparaffinatura e Reidratazione. Tali operazioni consistono nell'allontanamento della paraffina e nella reidratazione del tessuto (xilene, etanolo 100%, etanolo 96%, etanolo 70%, etanolo 50%, acqua distillata) per la successiva colorazione.
- Colorazioni istologiche. Al fine di rendere le sezioni visibili al microscopio ottico ed elettronico, si utilizzano soluzioni acquose dei coloranti chimici, che formano dei legami con particolari molecole presenti all'interno ed all'esterno delle cellule e dei

componenti extracellulari dei tessuti. La colorazione utilizzata è l'Ematossilina/Eosina che, basandosi su interazioni di tipo acido-base, permette una valutazione morfologica: l'ematossilina (colorante basico) colora i nuclei in blu e l'eosina (colorante acido) colora il citoplasma in rosa/rosso.

3.6.1. Doppia colorazione immunoistochimica

Le tecniche di immunoistochimica sfruttano la capacità degli anticorpi monoclonali di legarsi ad antigeni specifici localizzati sulla superficie cellulare; il legame antigene-anticorpo è visualizzato al microscopio ottico grazie alla reazione di rilevazione del cromoforo legato all'anticorpo. Spesso, per permettere la localizzazione del legame antigene-anticorpo, è utilizzato il metodo indiretto che sfrutta un anticorpo secondario (anticorpo anti-anticorpo), che lega alla frazione costante dell'anticorpo primario, e un enzima associato ad un substrato cromogeno. Il tutto porta alla formazione di un precipitato colorato in corrispondenza del sito in cui avviene il legame, dovuto ad una reazione enzimatica che converte un substrato incolore in un prodotto colorato.

E' stata eseguita una doppia colorazione CD138 e α 1-antitripsina allo scopo di confermare l'espressione del CD138 sugli epatociti e valutare, contemporaneamente sulla stessa sezione, anche l' α 1-antitripsina, una proteina della fase acuta dell'infiammazione. La α 1-antitripsina è sintetizzata quasi esclusivamente dagli epatociti e il suo ruolo è quello di impedire che il rilascio di enzimi proteolitici possa provocare fenomeni di autodistruzione tissutale.

E' stato utilizzato un anticorpo monoclonale murino Anti CD138/sydecan-1 (*Cell Marque Corporation Ventana cod 760-4248*); il complesso CD138/Anti-CD138/Syndecan-1 è stato visualizzato attraverso l'*ultraView Universal DAB Detection Kit*, un sistema di rivelazione indiretto, *biotin-free* attraverso una reazione istochimica tra la perossidasi e il suo substrato, il cromogeno 3,3'-diaminobenzidinatetraidrocloride (DAB) con la formazione di un precipitato marrone facilmente visibile al microscopio.

L'anticorpo monoclonale anti- α 1-antitripsina è costituito da una frazione immunoglobulinica purificata di siero di coniglio, (*Cell Marque Corporation cod 760-2605*); il complesso è stato rivelato attraverso l'*ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit* (Ventana Medical System) e visualizzato con naftolo ed il cromogeno *Fast Red* (substrati della fosfatasi alcalina) attraverso la produzione di un prodotto di precipitazione enzimatica di colore rosso facilmente distinguibile al microscopio.

3.6.2. Colorazione PAS

La sigla PAS indica le due sostanze principali (acido periodico e reattivo di Schiff) utilizzate in questa tecnica. La colorazione PAS (*Periodic-Acid-Schiff*) è uno dei metodi chimici utilizzati più di frequente in istologia per evidenziare i polisaccaridi ed i mucopolisaccaridi ed, in particolare, i polisaccaridi neutri (chitina), il glicogeno, l'amido, la cellulosa, le mucine, le mucoproteine e le glicoproteine. Il metodo si basa sull'ossidazione selettiva con acido periodico di due gruppi glicolici adiacenti in gruppi aldeidici. Nella reazione successiva i gruppi aldeidici

strettamente contigui vengono trasformati dalla fucsina solforosa del reattivo di Schiff in un composto colorato insolubile. Questo è possibile in quanto questo reattivo, di per sè stesso incolore, conferisce un colore rosso-magenta alle sostanze e alle strutture contenenti gruppi aldeidici. Al microscopio ottico i nuclei appaiono blu; invece polisaccaridi, glicogeno, mucopolisaccaridi neutri, mucoproteine, glicoproteine, glicolipidi, fosfolipidi, membrana basale, collagene mostrano un colore rosso porpora.

3.6.3. Le Citocheratine

Le citocheratine sono delle catene polipetidiche che costituiscono i filamenti intermedi, componenti del citoscheletro delle cellule epiteliali, ma anche delle cellule neoplastiche. Il contenuto di citocheratine nei tessuti dipende dal tipo di tessuto e dal grado di differenziamento cellulare. Per la rilevazione è stato utilizzato l'*Anti- Pan Keratin (AE1/AE3/PCK26) Primary Antibody*, costituito da un cocktail di varie citocheratine, che permette di determinare l'origine di tumori maligni scarsamente differenziati.

3.6.4. La Caspasi 3

La caspasi 3 rientra nell'ambito delle fase effettrice del processo apoptotico ed è capace di attivare una DNasi citoplasmatica (*caspase-activated deoxyribonuclease CAD*). In seguito alla degradazione di un inibitore di CAD (ICAD) ad opera della caspasi 3, CAD è libero di entrare nel nucleo e degradare il DNA. Ciò dà origine al caratteristico taglio internucleosomiale del DNA

in frammenti multipli di 180-200 paia di basi che rappresenta il punto di non ritorno del processo apoptotico.

L'anticorpo utilizzato è il *Cleaved Caspase-3 Rabbit mAb*, che permette di rilevare livelli endogeni dei frammenti larghi (17-19 kDa) della caspasi 3 attivata, risultanti dal clivaggio adiacente all'Asp175. L'anticorpo non riconosce frammenti più lunghi della caspasi 3, né altri tipi di caspasi ed è prodotto immunizzando conigli con un peptide sintetico che corrisponde al residuo amminotermiale adiacente ad Asp175 nella caspasi umana.

3.6.5. *Tunel Assay*

Per valutare l'apoptosi attraverso la frammentazione del DNA è stato utilizzato il *Tunel Assay (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling; ApopTag®*, Chemicon International-U.S.A). La frammentazione del DNA, prodotta dalle endonucleasi attivate dalle caspasi durante il processo apoptotico, ha permesso di mettere a punto una tecnologia basata sul principio secondo cui le terminazioni libere 3'-OH, che si vengono a formare in seguito alla frammentazione del DNA, possono servire come substrato per la terminal deossinucleotidil transferasi (TdT). In questo tipo di saggio il campione deve essere preventivamente fissato in formalina 10%, processato, sparaffinato, permeabilizzato ed, infine, incubato con la miscela di reazione Tunel costituita da: TdT (terminal deossinucleotidil transferasi) ed una miscela di nucleotidi contenente il dUTP coniugato con la digoxigenina. Tra tutti i nucleotidi aggiunti sono stati incorporati anche i dUTP marcati. Per visualizzare i siti di frammentazione del DNA è sufficiente incubare il preparato con un anticorpo anti-

digoxigenina (anticorpo policlonale di pecora purificato) coniugato con un tracciante fluorescente, il FITC (isotiocianato di fluoresceina). Il contrasto nucleare è ottenuto utilizzando il DAPI (4'-6'diamino-2-fenilindolo). La fluorescenza associata ai frammenti di DNA è stata misurata mediante microscopio a fluorescenza (LEICA DM-RA2).

3.7. ANALISI STATISTICA

I dati sono presentati come media \pm deviazione standard. L'analisi statistica è stata effettuata usando il test t di Student. Un valore di p (test bilaterale) inferiore a 0.05 è stato considerato statisticamente significativo. I dati sono stati analizzati con il *software GraphPad Prism* (versione 5.0).

4. RISULTATI

4.1. IL BT062

4.1.1. La sperimentazione e la scelta delle concentrazioni

La valutazione dell'epatotossicità dell'anticorpo monoclonale coniugato alla tossina nel miniBAL caricato con epatociti umani è stata effettuata determinando la variazione degli indici di funzionalità epatocitaria (sintesi di urea, consumo di ammonio) in relazione alle concentrazioni di anticorpo utilizzate.

Una fase preliminare è stata dedicata alla:

- messa a punto delle procedure operative, con particolare riguardo al perfezionamento della tecnica di isolamento degli epatociti umani e della procedura di caricamento del miniBAL;
- ottimizzazione delle caratteristiche strutturali del bioreattore allo scopo di realizzare le migliori condizioni per l'annidamento ed assicurare una omogenea distribuzione cellulare, in cooperazione con gli ingegneri della RanD;
- implementazione del sistema di perfusione con riduzione dei volumi interni dei tubatismi allo scopo di ridurre i volumi di mezzo di coltura e i quantitativi di epatotossici da somministrare;
- definizione della biomassa cellulare da caricare nel miniBAL: i risultati di esperimenti pilota effettuati caricando il miniBAL con 100-300 e 500 milioni di cellule vitali hanno evidenziato che 300 milioni di epatociti rappresentano il numero di cellule ottimale per l'espressione di idonee capacità funzionali;
- definizione dei protocolli tossicologici, mediante la somministrazione, nel miniBAL caricato con epatociti umani, di

molecole dal noto potenziale epatotossico, tra cui l'amfetamina (93);

- normalizzazione dei dati ricavati e sviluppo di nuove metodiche per la determinazione della funzionalità epatocitaria: in collaborazione con il prof. Robert Chamuleau, epatologo dell'*Academic Medical Center* di Amsterdam, si è proceduto alla messa a punto di un test di valutazione della vitalità cellulare a livello mitocondriale nel miniBAL e della metodica ELISA per la determinazione della sintesi di urea.

La scelta delle concentrazioni di anticorpo monoclonale coniugato da testare nel miniBAL è stata effettuata in considerazione delle dosi utilizzate nella sperimentazione clinica di fase I/IIa.

Sono stati realizzati 6 esperimenti con 4 differenti concentrazioni di BT062: 100, 50, 12.5 e 2.5 µg/ml, quest'ultima ripetuta in triplicato.

I campioni epatocellulari sono stati ottenuti a partire da resezioni chirurgiche di fegato, di cui 4 dovute a metastasi da carcinoma del colon, una a cancro della colecisti e l'ultima, infine, a cisti da Echinocco. Al termine dell'isolamento è stata determinata la vitalità cellulare (valore medio = $89.33 \pm 3.14\%$) e, per ciascun esperimento, sono stati seminati 600 milioni di epatociti vitali in due miniBAL: uno controllo e l'altro trattato con la concentrazione individuata di BT062 precedentemente solubilizzata in Williams'E medium (figura 31).

N°	Campione epatico	Vitalità (%)	N° cell caricate (10 ⁶)	Gruppo
1	Ca colecisti	88	300	Controllo
2			300	100 µg/ml
3	Metastasi da Ca colon	84	300	Controllo
4			300	50 µg/ml
5	Metastasi da Ca colon	91	300	Controllo
6			300	12.5 µg/ml
7	Metastasi da Ca colon	89	300	Controllo
8			300	2.5 µg/ml
9	Cisti da Echinococco	93	300	Controllo
10			300	2.5 µg/ml
11	Metastasi da Ca colon	91	300	Controllo
12			300	2.5 µg/ml

Figura 31. Esperimenti con il BT062

4.1.2. Test di funzionalità

La valutazione biochimica, eseguita prima della somministrazione del BT062 e successivamente dopo 24 e 48 ore dall'incubazione con il BT062, ha evidenziato una riduzione della funzione epatocitaria correlata con le concentrazioni di anticorpo utilizzate; questo risultava nettamente evidente dopo 48 ore di incubazione (terza giornata). I miniBAL controllo mostravano, un andamento analogo a quello già precedentemente osservato: si evidenziava una parziale ripresa della capacità biosintetica di urea al giorno 3 e un graduale declino del consumo di ammonio nel corso dei tre giorni di osservazione (figure 32, 33).

Anche il test relativo all'attività mitocondriale ha mostrato, in corrispondenza della concentrazione più basse di BT062 (2.5 $\mu\text{g/ml}$), un profilo paragonabile agli esperimenti controllo, mentre ha evidenziato una progressiva riduzione del metabolismo mitocondriale miniBAL che sono stati incubati con concentrazioni più elevate di BT062 (figura 34), confermando una risposta all'insulto farmacologico dose-dipendente.

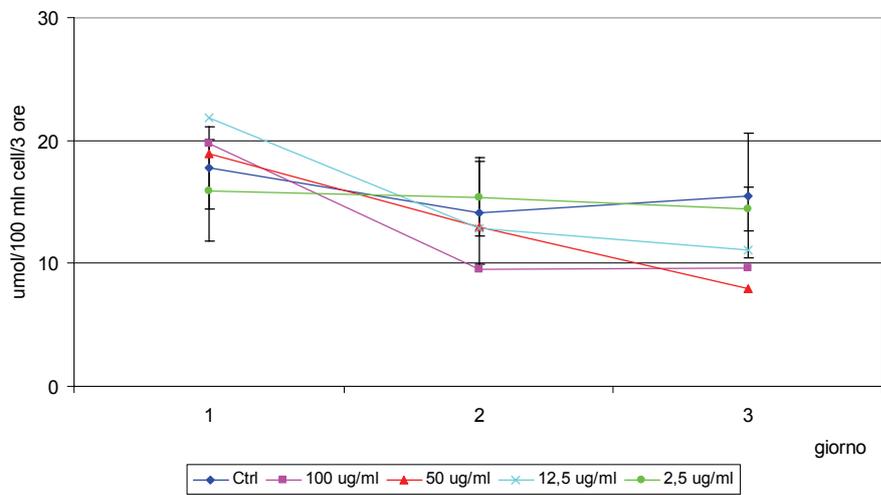


Figura 32. Sintesi di urea

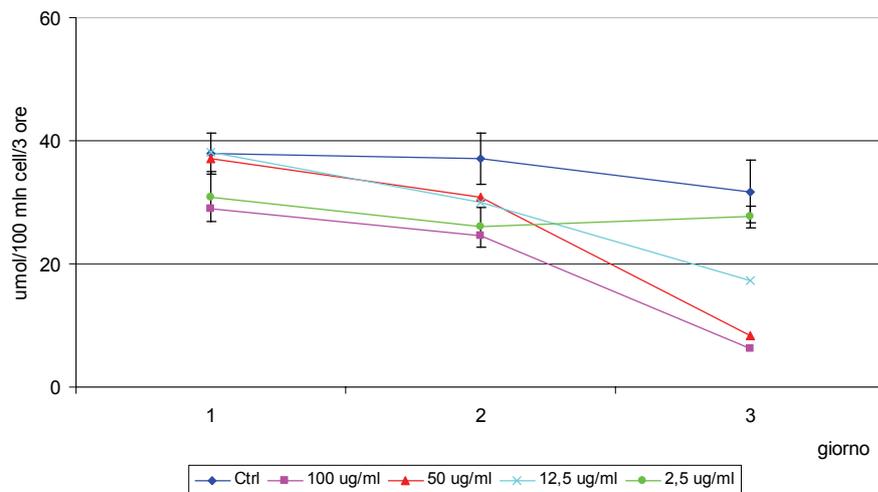


Figura 33. Consumo di ammonio

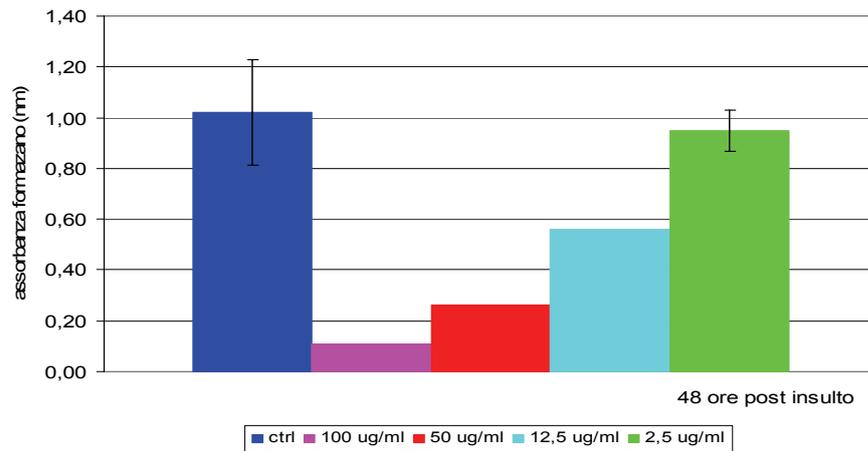


Figura 34. Test di valutazione vitalità mitocondriale

4.1.3. Analisi istologiche

L'analisi istologica è stata condotta in tutti gli esperimenti sopra descritti, sia nei casi controllo che nei trattati con le quattro concentrazioni (100-50-12.5-2.5 $\mu\text{g/ml}$) di BT062.

Per quanto riguarda l'unico esperimento in cui è stata testata la concentrazione di BT062 pari a 100 $\mu\text{g/ml}$, tutte le colorazioni ottenute hanno evidenziato un quadro di forte danno cellulare e di profonda alterazione della architettura epatocitaria, per certi versi sovrapponibile alla situazione emersa dall'analisi della concentrazione di anticorpo 50 $\mu\text{g/ml}$. Si è, pertanto, deciso di considerare come effetto massimo quello prodotto dalla concentrazione di BT062 pari a 50 $\mu\text{g/ml}$ (figura 35).

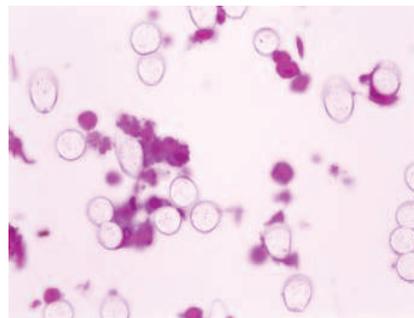


Figura 35. Colorazione ematossilina/eosina miniBAL trattato 100 $\mu\text{g/ml}$

Colorazione Ematossilina/eosina

La colorazione all'ematossilina/eosina nei controlli (figura 36A) rileva la presenza di epatociti dalla morfologia normale che mostrano buona capacità di adesione alle fibre del miniBAL e buona coesione. Il citoplasma appare vescicoloso e i nuclei tondeggianti con evidente nucleolo. Nel miniBAL trattato 50 $\mu\text{g/ml}$ (figura 36B) si evidenziano, invece, epatociti dalla morfologia alterata, con presenza di nuclei picnotici, talvolta del tutto assenti, e molti detriti cellulari. In alcuni nuclei si riscontra la presenza di corpi apoptotici. La cellularità risulta essere di gran lunga inferiore rispetto agli esperimenti controllo ed, inoltre, l'adesione alle fibre è compromessa, così come la coesione tra gli epatociti. Nel trattato 12.5 $\mu\text{g/ml}$ (figura 36C) si rilevano epatociti dalla morfologia alterata, con nuclei ipercromatici e in alcune zone picnotici e si riscontrano corpi apoptotici in alcune aree. Le cellule, però, mantengono una buona adesione alle fibre e una forte coesione tra di loro. Non molto dissimili dal controllo risultano le immagini del trattato 2.5 $\mu\text{g/ml}$ (figura 36D), anche per quanto riguarda la taglia nucleare, l'adesione alle fibre e la coesione tra gli epatociti, che risultano essere lievemente inferiori.

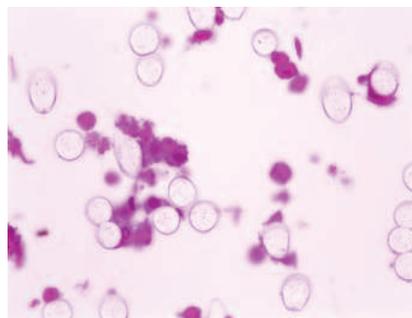


Figura 36A. Controllo

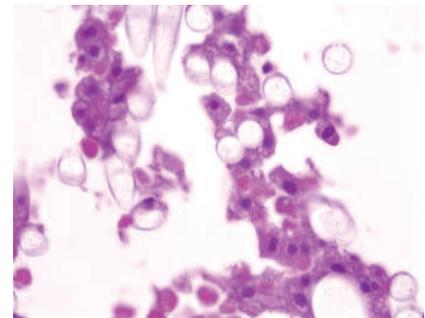


Figura 36B. 50 $\mu\text{g/ml}$

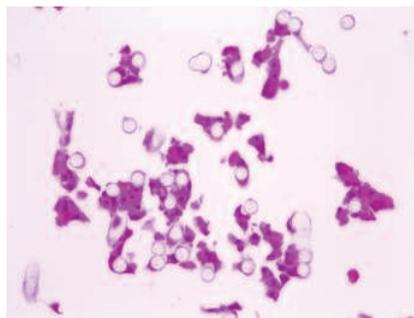


Figura 36C. 12.5 µg/ml

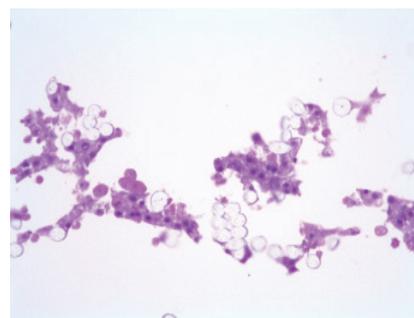


Figura 36D. 2.5 µg/ml

Doppia Colorazione CD138/ α -1 antitripsina

L'espressione di membrana di CD138 nel controllo (figura 37A) è molto rinforzata con un segnale intenso e continuo. La colorazione per α -1 antitripsina, citoplasmatica, risulta marcatamente positiva. Nel caso trattato 50 μ g/ml (figura 37B), invece, l'espressione per CD138 è del tutto assente. Debole, inoltre, appare la colorazione effettuata per α -1 antitripsina. Nell'insieme è possibile osservare il grave deterioramento cellulare, laddove la morfologia è completamente compromessa, confermando quanto osservato con l'ematosilina/eosina. Nel trattato 12.5 μ g/ml (figura 37C), il segnale di membrana si presenta discontinuo e disomogeneo, mentre compare la presenza di immunocomplessi granulari nel citoplasma. Nel trattato (figura 37D) si denota una perdita del segnale del CD138 e permane, comunque, la diffusione del segnale nel citoplasma. La colorazione per α -1 antitripsina è praticamente assente.

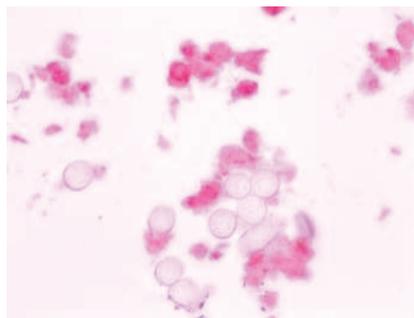


Figura 37A. Controllo

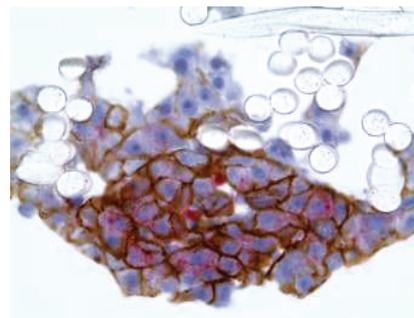


Figura 37B. 50 µg/ml

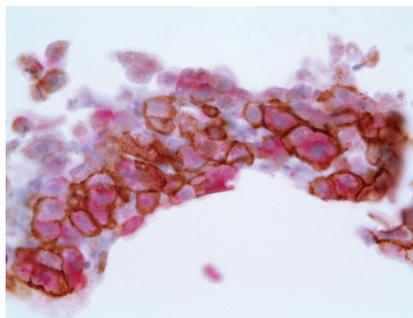


Figura 37C. 12.5 µg/ml

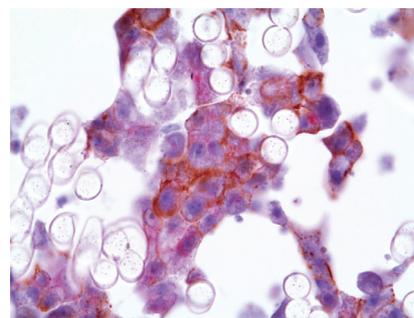


Figura 37D: 2.5 µg/ml

La caspasi 3

La colorazione per caspasi 3 clivata mostra nel controllo (figura 38A) un segnale alquanto basso e compatibile con il solo stress cellulare. Nel trattato 50 µg/ml, invece, (figura 38B), l'espressione è molto più pronunciata rispetto al controllo, confortando l'ipotesi già rilevata all'ematossilina/eosina. L'espressione della caspasi 3 nel trattato 12.5 µg/ml (figura 38C) appare più rilevante sia nel *pattern* osservato sia nel rapporto percentuale, mentre nel trattato 2.5 µg/ml (figura 38D) il segnale di presenza delle caspasi 3 è quasi del tutto irrilevante, confermando una sostanziale sovrapponibilità con il controllo

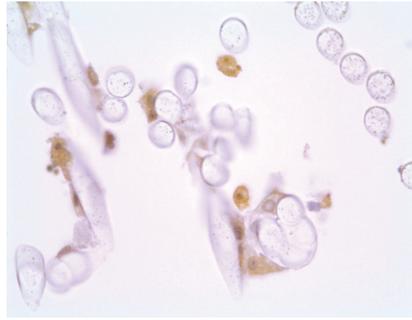


Figura 38A. Controllo

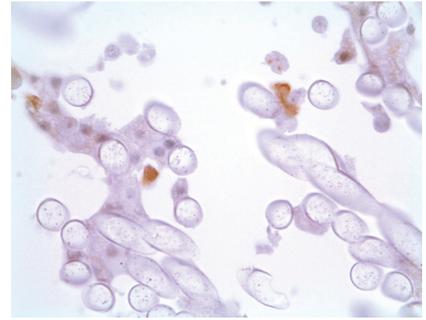


Figura 38B. 50 µg/ml

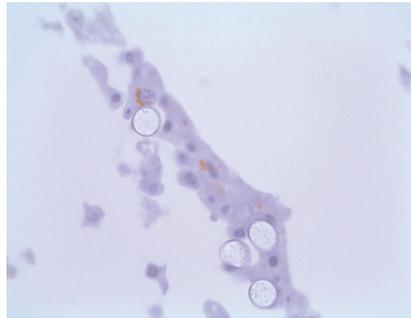


Figura 38C. 12.5 µg/ml

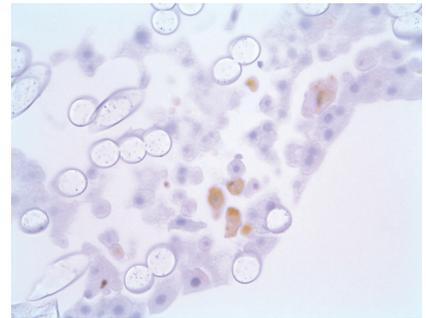


Figura 38D. 2.5 µg/ml

4.2. IL DM-4

4.2.1. La sperimentazione e la scelta delle concentrazioni

Allo scopo di determinare se gli effetti osservati nel miniBAL caricato con epatociti umani erano dovuti all'interazione con il CD138 o alla tossicità non specifica del derivato maytansinoide (DM-4), il miniBAL è stato testato con la sola tossina. La scelta delle concentrazioni di derivato maytansinoide è stata effettuata in relazione alle concentrazioni di anticorpo monoclonale coniugato già utilizzate nella precedente sperimentazione, considerando che il rapporto tra anticorpo monoclonale coniugato e tossina è 1:53.

Le concentrazioni di anticorpo monoclonale coniugato utilizzate nel precedente studio erano 100, 50, 12,5 e 2,5 µg/ml; si è pertanto deciso per il DM-4 di cominciare con i due dosaggi intermedi, escludendo per il momento i due estremi. In sintesi abbiamo, dunque, testato le seguenti concentrazioni di derivato maytansinoide: 0.94 µg/ml, corrispondente a 50 µg/ml di anticorpo coniugato, e 0.24 µg/ml, corrispondente a 12,5 µg/ml di anticorpo coniugato (figura 39).

Concentrazioni di DM-4	Concentrazioni equimolari di BT062 (in base al contenuto di DM-4)
0.047 µg/ml	2.5 µg/ml
0.24 µg/ml	12.5 µg/ml
0.94 µg/ml	50 µg/ml
1.89 µg/ml	100 µg/ml

Figura 39. Rapporto tra le concentrazioni di DM-4 e di BT062

Gli effetti di ogni concentrazione sono stati valutati in tre esperimenti. I campioni epatocellulari sono stati ottenuti a partire da resezioni chirurgiche, di cui 3 di origine tumorale (metastasi da carcinoma del colon e dell'ovaio e carcinoma epatocellulare), due dovute a patologie epatiche benigne (adenoma, angioma) e, infine, l'ultima associata ad un trauma. I campioni sono stati processati come descritto precedentemente e, al termine dell'isolamento, è stata determinata la vitalità cellulare (valore medio = $94.50 \pm 3.08\%$). Due miniBAL, di cui uno controllo e l'altro trattato con una data concentrazione di DM-4 sciolta in Williams'E medium, sono stati caricati ognuno con 300 milioni di epatociti vitali (figura 40).

N°	Campione epatico	Vitalità (%)	N° cell caricate (10^6)	Gruppo
A	Adenoma	98	300	Controllo
B			300	0.94 $\mu\text{g/ml}$
C	Trauma da strada	96	300	Controllo
D			300	0.94 $\mu\text{g/ml}$
E	Epatocarcinoma	94	300	Controllo
F			300	0.24 $\mu\text{g/ml}$
G	Metastasi da Ca colon	97	300	Controllo
H			300	0.94 $\mu\text{g/ml}$
I	Metastasi da Ca ovaio	92	300	Controllo
L			300	0.24 $\mu\text{g/ml}$
M	Angioma	90	300	Controllo
N			300	0.24 $\mu\text{g/ml}$

Figura 40. Esperimenti con il DM-4

4.2.2. Test di funzionalità

Il DM-4, nelle due concentrazioni (0.94 e 0.24 $\mu\text{g/ml}$) corrispondenti alle concentrazioni intermedie di BT062 (50 e 12.5 $\mu\text{g/ml}$), è stato aggiunto al mezzo di coltura e mantenuto in ricircolo per 6 ore. I risultati sono stati ottenuti dopo 24 e 48 ore dalla rimozione della tossina dal circolo. Negli esperimenti trattati si è evidenziata una riduzione statisticamente significativa ($p < 0.05$) delle funzioni epatocitarie rispetto al controllo, con particolare riferimento alla sintesi di urea (figura 41). Stesso discorso vale per quanto riguarda il consumo di ammonio (figura 42), con valori statisticamente significativi solo per quanto riguarda la concentrazione di DM-4 più elevata (0.94 $\mu\text{g/ml}$).

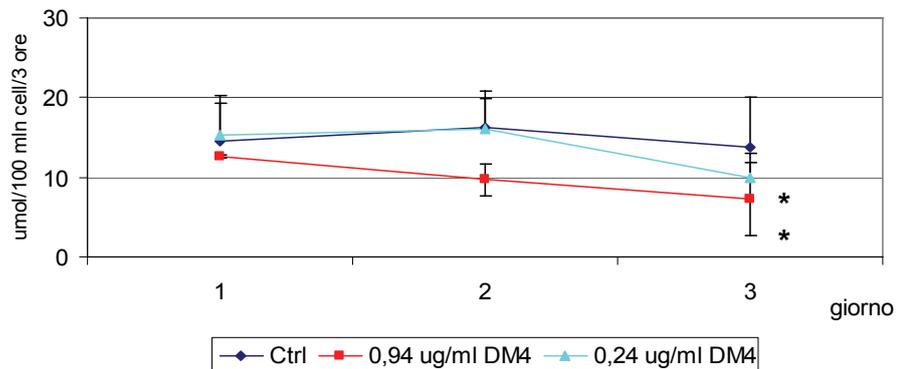


Figura 41. Sintesi di urea

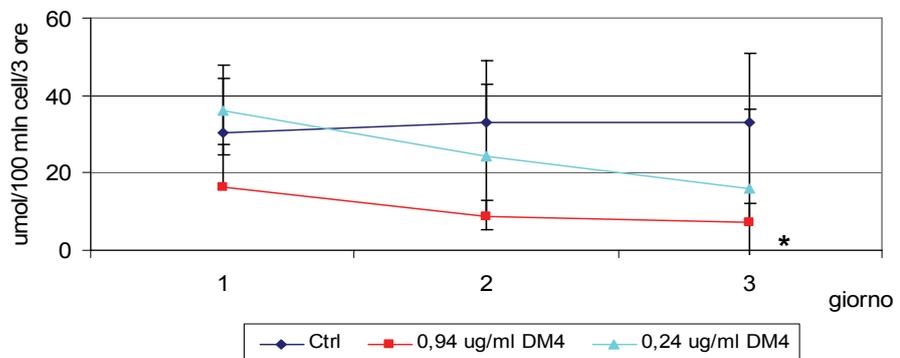


Figura 42. Consumo di ammonio

Anche il test di determinazione della vitalità e della proliferazione cellulari a livello mitocondriale (figura 43) ha evidenziato una correlazione tra le concentrazioni di DM-4 incubate nel miniBAL ed i valori di assorbanza del formazano, che sono direttamente proporzionali al numero di cellule metabolicamente attive presente nel campione. Sia nei miniBAL trattati con la concentrazione di DM-4 di 0.24 $\mu\text{g/ml}$ che 0.94 $\mu\text{g/ml}$, i valori di assorbanza del formazano sono risultati statisticamente significativi ($p < 0.05$) rispetto ai miniBAL controllo.

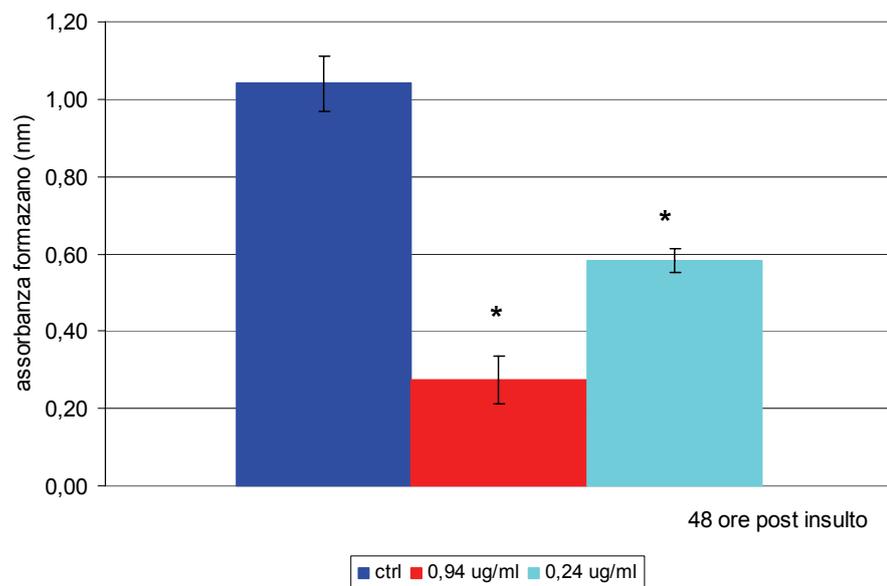


Figura 43. Test di valutazione vitalità mitocondriale

4.2.3. Analisi istologiche

Colorazione Ematossilina/eosina

Nei MiniBAL controllo la morfologia cellulare e la citoarchitettura epatocitaria appaiono conservate. E' evidente, inoltre, una buona vitalità cellulare. Il rapporto nucleo/citoplasma è nella norma: i nuclei appaiono tondeggianti e presentano numerosi nucleoli. Gli epatociti sono ben coesi tra loro e presentano buona adesione alle fibre (figura 44A). In seguito a somministrazione della concentrazione di DM-4 più elevata (0.94 µg/ml) (figura 44B) si evidenzia una marcata riduzione della vitalità cellulare con un aumentato rapporto nucleo/citoplasma, che caratterizza gran parte delle cellule. I nuclei appaiono picnotici, eccentrici e in alcune zone sono assenti. Sono presenti numerosi vacuoli citoplasmatici e detriti tissutali non digeriti. Si evidenzia una ridotta coesione tra gli epatociti e una totale perdita di adesione alle fibre. Nei trattati (0.24 µg/ml) si osserva una discreta e, in alcuni punti, ridotta vitalità cellulare; la morfologia appare alterata rispetto al controllo (figura 44C). Alcuni nuclei sono tondeggianti e presentano ancora i nucleoli, altri sono picnotici ed eccentrici; sono presenti alcuni vacuoli citoplasmatici e porzioni di tessuto non digerito. La coesione tra gli epatociti e l'adesione alla membrana può essere considerata leggermente ridotta rispetto al controllo.

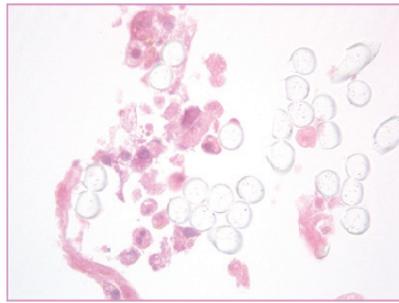


Figura 44A. Controllo

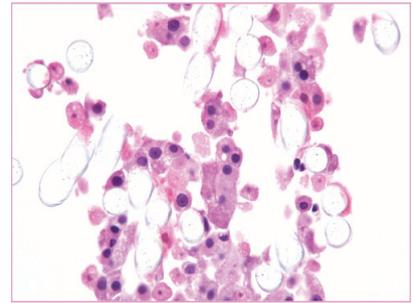


Figura 44B. 0.94 µg/ml

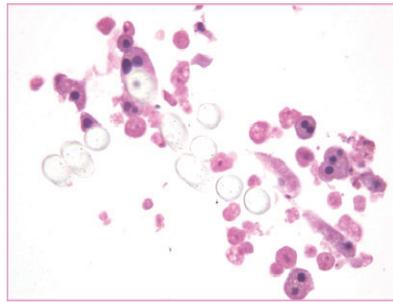


Figura 44C. 0.24 µg/ml

Le Citocheratine

Nei miniBAL controllo si evidenzia una buona espressione citoplasmatica delle citocheratine AE1/AE3: la presenza di un marcato rinforzo di membrana è indice di buona vitalità cellulare (figura 45A). Nei miniBAL trattati con una concentrazione pari a 0.94 µg/ml di DM-4, all'interno del citoplasma degli epatociti l'espressione delle citocheratine AE1/AE3 appare blanda, con riduzione o assenza di rinforzo di membrana (figura 45B). In seguito al trattamento con 0.24 µg/ml di DM-4, l'espressione citoplasmatica delle citocheratine AE1/AE3 si mantiene discreta, anche se si osserva una riduzione del rinforzo di membrana, dovuto all'azione epatotossica della tossina (figura 45C).

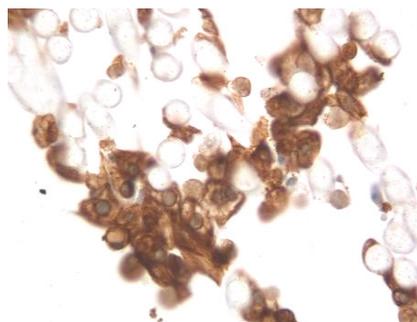


Figura 45A. Controllo

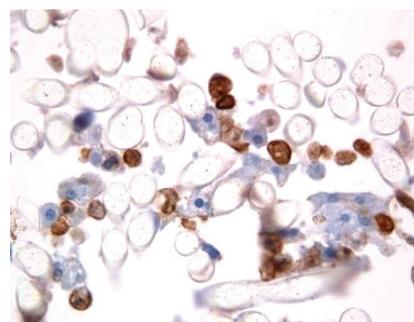


Figura 45B. 0.94 µg/ml

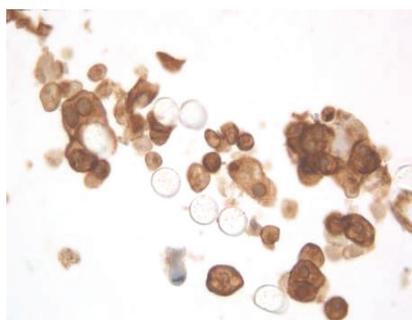


Figura 45C. 0.24 µg/ml

Colorazione PAS

La colorazione PAS evidenzia nei controlli (figura 46A) una ricca presenza di glicogeno all'interno del citoplasma, indice di buona vitalità cellulare.

Nei trattati, invece, si evidenzia una progressiva riduzione dell'accumulo di glicogeno, indice di sofferenza cellulare che, inoltre, risulta aumentata passando dalla concentrazione 0.24 (figura 46C) alla 0.94 µg/ml (figura 46B).

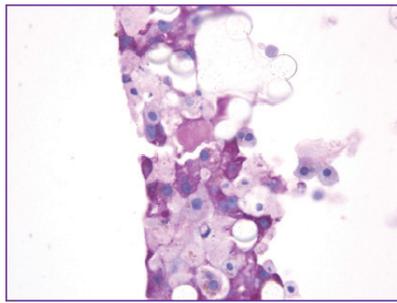


Figura 46A. Controllo

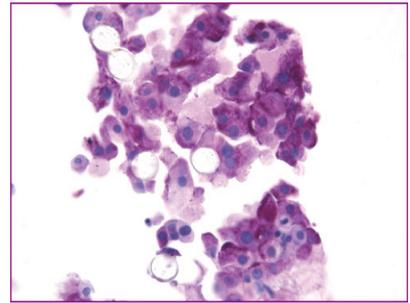


Figura 46B. 0.94 µg/ml

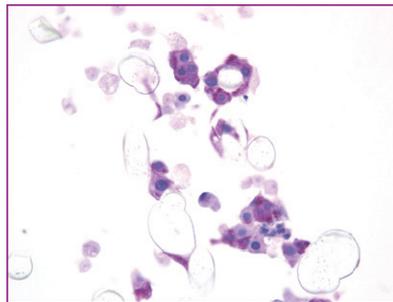


Figura 46C. 0.24 µg/ml

La caspasi 3

Nei miniBAL controllo si osserva una lieve colorazione, indice di scarsa presenza di corpi apoptotici, riconducibile ai soli stress meccanici subiti dal campione (figura 47A). Nel trattato 0.94 µg/ml (figura 47B) l'espressione della caspasi 3 clivata appare molto più intensa rispetto al controllo e la presenza dei corpi apoptotici risulta aumentata, mentre nel trattato 0.24 µg/ml l'espressione è, solo in alcuni punti, più elevata rispetto al controllo (figura 47C).



Figura 47A. Controllo

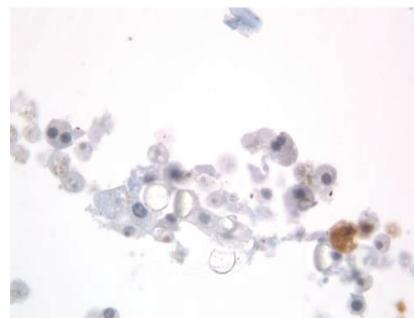


Figura 47B. 0.94 µg/ml

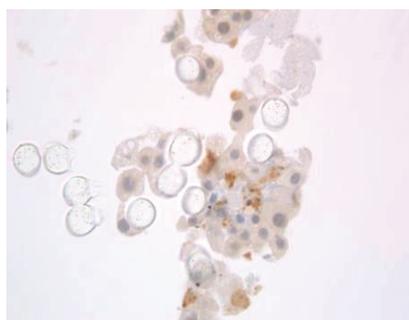


Figura 47C. 0.24 µg/ml

Il Tunel Assay

Il *Tunel Assay* ha confermato quanto già osservato con la valutazione della caspasi 3: nel controllo (figura 48A) le cellule in apoptosi erano in bassa percentuale. Il miniBAL trattato con 0.94 µg/ml di DM-4 evidenziava una marcata sofferenza cellulare, caratterizzata da un aumento delle cellule apoptotiche (figura 48B); infine nel miniBAL trattato con la concentrazione più bassa (0.24 µg/ml) si manifestavano lievi ed occasionali segni di sofferenza e cellule apoptotiche (figura 48C).

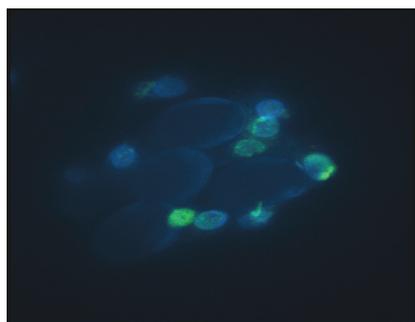


Figura 48A. Controllo

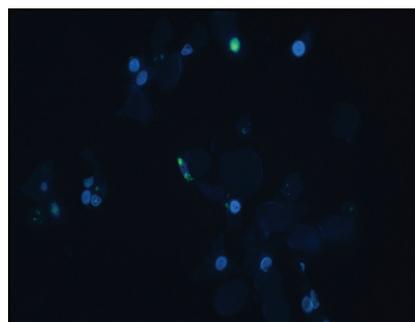


Figura 48B. 0.94 µg/ml

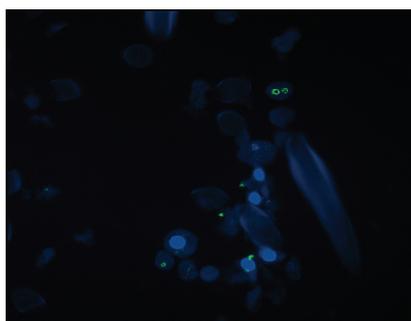


Figura 48C. 0.24 µg/ml

5. CONCLUSIONI

La messa a punto di un biosensore richiede che siano presi in considerazione tutta una serie di aspetti, tra cui la tipologia di *scaffold* cui le cellule devono aderire, l'ottenimento di un equilibrio tra il flusso del mezzo di coltura, il rifornimento di ossigeno e la protezione dalle forze di *shear stress*, nonché l'influenza dei fattori fluidodinamici e dei componenti citoarchitetturali del sistema ai fini dell'espressione di capacità funzionali prolungate nel tempo. In questo contesto il miniBAL, messo a punto presso il Centro di Biotecnologie in collaborazione con l'*Academic Medical Center* di Amsterdam, si propone come biosensore che, sfruttando l'elevata sensibilità e specializzazione degli epatociti umani, consente di verificare la epatotossicità di nuove molecole in una fase precoce del loro processo di sviluppo, permettendo di risparmiare sui costi e di ridurre i tempi delle sperimentazioni precliniche.

L'attività di ricerca svolta nell'ambito del Dottorato in Scienza sul Farmaco è consistita nella progettazione ed ottimizzazione del miniBAL e nella valutazione, nel miniBAL caricato con epatociti umani, della tossicità di un anticorpo monoclonale coniugato (BT062) e della tossina ad esso legata (DM-4), entrambe fornite da una multinazionale che intende sviluppare questi prodotti nel trattamento delle forme recidivanti/refrattarie di mieloma multiplo. Allo scopo di stabilire se l'eventuale effetto tossico del BT062 coinvolge cellule diverse dalle plasmacellule tumorali, che ricordiamo esprimono il recettore CD138, nel nostro caso sugli epatociti, e ricavare informazioni aggiuntive sulla epatotossicità di BT062, è stato utilizzato un sistema *in vitro* specie-specifico, il

miniBAL caricato con epatociti umani, e sono state testate quattro differenti concentrazioni dell'anticorpo coniugato (100, 50, 12.5, 2.5 µg/ml).

Per valutare la specificità dell'immunoconiugato è stato utilizzato il CD138, un marker di alcuni tipi di neoplasie ematologiche caratterizzate dalla proliferazione e dall'accumulo di plasmacellule. Sebbene sia stato dimostrato che il target di questo composto sia altamente overespresso dalle cellule mielomatose, analisi immunoistochimiche hanno messo in evidenza la presenza di questo antigene sulla membrana delle cellule epatiche. Per questo motivo il fegato è stato utilizzato per lo studio di potenziali effetti indesiderati indotti dalla nuova molecola. Inoltre quest'immunoconiugato è specifico per gli antigeni umani e non riconosce antigeni omologhi in altre specie.

E' stata eseguita una valutazione funzionale che ha evidenziato una marcata riduzione degli indici di funzione epatocitaria (sintesi di urea, consumo di ammonio) in relazione alle concentrazioni di anticorpo utilizzate. Lo studio è stato avvalorato da ulteriori analisi di carattere morfo-funzionale, che si sono avvalse del contributo di tecniche immunoistochimiche. I risultati ottenuti da questi studi hanno evidenziato, a partire dalla concentrazione più piccola di BT062 fino ad arrivare a quella più elevata, una progressiva perdita della morfologia cellulare, con sofferenza del tessuto epatico, e sviluppo di fenomeni apoptotici.

Per determinare se gli effetti osservati nel miniBAL caricato con epatociti umani fossero legati in maniera specifica all'interazione con il CD138 o alla tossicità non specifica della maytansina, il passo successivo ha riguardato la valutazione del ruolo svolto

dalla tossina DM-4 nel danno epatotossico. Il miniBAL è stato testato con la sola tossina, utilizzando concentrazioni direttamente correlate a quelle già testate nei precedenti esperimenti con l'immunoconiugato.

I risultati della valutazione funzionale eseguita testando due differenti dosaggi di DM-4 (0.94 e 0.24 µg/ml) hanno evidenziato la sensibilità del sistema miniBAL di rilevare gli effetti tossici prodotti dalla tossina in relazione della concentrazione di tossina utilizzata.

Anche i risultati ottenuti attraverso le analisi istologiche e immunoistochimiche hanno dimostrato la diretta correlazione tra concentrazione ed effetto. Nei miniBAL trattati si è osservato, in maniera proporzionale alle concentrazioni utilizzate, una progressiva marcata alterazione delle caratteristiche morfologiche e funzionali degli epatociti: la vitalità cellulare si è ridotta, si è evidenziata una ridotta espressione citoplasmatica delle citocheratine AE1/AE3, con ridotto o assente rinforzo di membrana, e ridotto accumulo citoplasmatico di glicogeno. Si è evidenziato, infine, un progressivo aumento dell'espressione della caspasi 3 clivata e una più elevata percentuale di cellule in apoptosi rilevate al *Tunel Assay*.

Questi studi hanno consentito di testare l'efficacia del sistema miniBAL per la valutazione dell'epatotossicità di nuove molecole durante le fasi di sviluppo preclinico. Tale efficacia andrà ulteriormente confermata in futuro attraverso la valutazione di ulteriori molecole e mediante una successiva implementazione del sistema.

Sulla scia delle tendenze internazionali che spingono verso una miniaturizzazione e, ancora di più, verso una nanoconversione di questi sistemi, l'obiettivo è quello di ridurre le dimensioni del miniBAL, al fine di creare un sistema in cui più micro fegati bioartificiali, disposti in serie e/o in parallelo, siano in grado di valutare l'epatotossicità di più composti o di diverse concentrazioni di uno stesso composto, riducendo i problemi legati alla variabilità biologica e contribuendo all'abbattimento dei costi e dei tempi delle sperimentazioni animali e cliniche.

6. WORK IN PROGRESS

6.1. NUOVE APPLICAZIONI DEL BT062

Il CD138 è un proteoglicano eparan solfato transmembrana associato con i recettori dei fattori di crescita (recettore per HGF = *Hepatocyte Growth Factor*) e con le integrine, la cui attivazione è responsabile di processi di proliferazione, crescita e migrazione cellulare, angiogenesi e interazioni cellula-matrice extracellulare mediati dai *pathway* intracellulari PI3K-PKB e Ras/MAP chinasi. Il CD138 è risultato essere anche responsabile della regolazione della riorganizzazione del citoscheletro e della crescita cellulare in seguito ad interazione con le integrasi e con le metallo proteinasi della matrice extracellulare (94).

Pertanto la comprensione di questo meccanismo d'azione, insieme alla capacità di legare selettivamente il CD138, indipendentemente dalla tossina legata, fanno sì che l'anticorpo monoclonale non coniugato (nBT062) possa essere utilizzato per incrementare la sensibilità delle cellule tumorali verso i chemioterapici antiblastici convenzionalmente utilizzati in terapia, nonché per ridurre le interazioni tra le cellule di tumori che esprimono CD138 e i fibroblasti stromali, contribuendo alla *down*-modulazione dei processi proliferativi ed invasivi.

In particolare, la prospettiva di utilizzare in terapia l'anticorpo monoclonale non coniugato, sfruttando la sua interazione con il CD138 e i meccanismi di trasduzione del segnale generati dall'interazione antigene-anticorpo, può risultare utile nel trattamento di due tumori: il carcinoma mammario e l'epatocarcinoma.

Un'alta espressione di CD138 nel carcinoma mammario risulta associata (95, 96) ad un fenotipo aggressivo, prognosi sfavorevole, aumentato rischio di mortalità e scarsa risposta alla chemioterapia. Nel processo che porta allo *switch* da carcinoma duttale *in situ* a carcinoma duttale invasivo, circa un terzo delle cellule tumorali conserva overespressione del CD138, mentre sulle restanti cellule di carcinoma mammario si osserva perdita di espressione di CD138 e *shift* corrispondente dell'espressione di CD138 sulle cellule stromali e sui fibroblasti. Tale fenomeno è anch'esso responsabile di sviluppo di fenotipo aggressivo ed è stato osservato in più del 70% dei carcinomi mammari. Inoltre lo stesso *pattern* di espressione del CD138 nelle cellule tumorali lo si è evidenziato anche nei linfonodi metastatizzati. In genere alti livelli di espressione di CD138 sono correlati ad alta sensibilità all'nBT062.

Nel caso dell'epatocarcinoma la *down-regulation* dell'espressione di CD138 è coinvolta nello sviluppo, progressione, metastatizzazione e nella comparsa di un fenotipo aggressivo e non responsivo al trattamento farmacologico convenzionale.

Inoltre, in misura maggiore nel caso dell'epatocarcinoma rispetto al carcinoma mammario, le cellule tumorali sembrano essere più resistenti alla chemioterapia convenzionale; a ciò si aggiunge il fatto che i farmaci a disposizione contro questa patologia tumorale sono pochi e non mostrano vantaggi significativi in termini di miglioramento della sopravvivenza (97).

6.2. DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' DEL CITOCROMO P450

Tra i parametri più indicativi per la valutazione della funzionalità epatocitaria, la determinazione dell'attività del citocromo P450 riveste un ruolo di primaria importanza, considerato che il fegato rappresenta un'importante stazione di passaggio, accumulo e biotrasformazione di tutti gli xenobiotici. Pertanto lo sviluppo di una metodica capace di rilevare l'attività di questa superfamiglia di isoenzimi epatici consente di ottenere informazioni utili per una corretta valutazione dello stato degli epatociti caricati nel miniBAL.

Nel corso dell'ultimo anno di Dottorato è stata messa a punto, in collaborazione con il Dipartimento di Tecnologie e Legislazione Farmaceutiche della Facoltà di Farmacia di Napoli (Prof. La Rotonda e Prof. Quaglia), una metodica per la determinazione quali-quantitativa della sottofamiglia 3A4 del citocromo P450. L'obiettivo è la misurazione dell'attività metabolica degli epatociti caricati attraverso la conversione del testosterone (TS) in 6 β -idrossi-testosterone (OH-TS) ad opera del CYP3A4, isoenzima del citocromo fortemente espresso a livello epatico (98, 99).

Al fine di identificare e determinare quantitativamente TS ed OH-TS:

- è stata messa a punto una metodica analitica in cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa (RP-HPLC) in grado di quantificare TS e OH-TS nel mezzo di coltura di epatociti (Williams'E medium);

- è stata successivamente determinata la percentuale di *recovery* (pari al 100%) di TS e OH-TS da una matrice complessa, quale il Williams'E medium;

- è stato effettuato un esperimento pilota utilizzando 1 milione di epatociti umani, con vitalità pari all'88%, caricati in piastre rivestite con collagene per ricavare informazioni su due importanti parametri: il tempo di incubazione di TS e la concentrazione di TS.

Si è proceduto anche a verificare l'assenza dell'effetto matrice nel caso delle colture di epatociti, al fine di validare ulteriormente la metodica di estrazione di TS e OH-TS.

Stabilita la concentrazione di TS meno dannosa per gli epatociti e, alla luce dei risultati ottenuti dall'analisi HPLC, i passi successivi saranno:

- definire la capacità di *recovery* di TS e OH-TS della colonna;
- stabilire i tempi di esposizione al TS;
- mettere a punto un metodo per la rilevazione dell'attività del citocromo P450 ad un livello microsomiale per migliorare la sensibilità del saggio.

6.3. LA BANCA DI EPATOCITI

Il fegato svolge un ruolo centrale per il mantenimento dell'omeostasi dell'intero organismo: la sua principale componente cellulare, l'epatocita, è una cellula capace di svolgere funzioni altamente specializzate ed, inoltre, è localizzata in una posizione altamente strategica per l'organismo in quanto stazione di passaggio di tutto ciò che viene introdotto, tra cui in particolare farmaci e xenobiotici. L'alta sensibilità di queste cellule preposte

ai processi di biotrasformazione permette, infatti, di rilevare anche basse concentrazioni di una molecola o di valutare gli effetti dei metaboliti provenienti dalla sua biotrasformazione.

Le colture di epatociti rappresentano il *gold standard* in quanto presentano una serie di vantaggi, tra cui la semplicità di preparazione, in seguito all'affinamento delle tecniche di isolamento, e la possibilità di garantire il mantenimento delle funzioni differenziate proprie dell'epatocita per periodi prolungati (>24 ore). Ciò che limita l'utilizzo di queste cellule ai fini sperimentali è la loro limitata e non prevedibile disponibilità, essendo questa legata alle fonti (campioni epatici provenienti da fegati scartati per il trapianto o da resezioni chirurgiche).

Il perfezionamento della tecnica di isolamento degli epatociti ha reso possibile non solo il miglioramento delle percentuali di vitalità cellulare (da 89.33 al 95.50%) negli ultimi tre anni, ma anche l'ottenimento di un elevato numero di cellule, eccedenti rispetto a quelle necessarie per la procedura.

La criopreservazione in azoto liquido degli epatociti rappresenta ad oggi l'unica possibilità di utilizzarli nel lungo termine.

La creazione di una banca di epatociti consente di avere a disposizione cellule da scongelare *on demand* non solo per lo sviluppo del biosensore a cellule epatiche, ma anche per gruppi di ricerca e multinazionali che potranno richiederli per studi di tossicità e/o di metabolismo, virologici, induzione/inibizione enzimatica e così via.

In particolare la realizzazione di lotti di epatociti criopreservati con le medesime caratteristiche funzionali, da scongelare in risposta alle specifiche esigenze sperimentali, renderebbe possibile

testare sul medesimo campione diverse molecole o diverse concentrazioni della stessa molecola, a tutto vantaggio della maggiore riproducibilità e affidabilità del dato ottenuto e riducendo i problemi legati alla variabilità biologica (100, 101). Pertanto lo sviluppo di questo sistema potrebbe consentire di realizzare profili tossicologici multipli e di ricavare in breve tempo informazioni importanti per lo screening tossicologico e farmacologico di un enorme numero di molecole nella fase di sviluppo preclinico.

Nel corso dell'ultimo anno di Dottorato è stata messa a punto una metodica di criopreservazione degli epatociti umani in azoto liquido, allo scopo di utilizzarli nel lungo termine. Il confronto dei dati di vitalità cellulare ha evidenziato una iniziale caduta della vitalità (pari a circa il 20% rispetto a quella iniziale a tre giorni dal congelamento), che è risultata paragonabile negli epatociti congelati immediatamente dopo l'isolamento a -80°C e sottoposti a congelamento graduale in azoto liquido. Tuttavia in questi ultimi, a partire dal terzo giorno, la vitalità si è mantenuta costante per oltre tre mesi, mentre gli epatociti congelati secondo la metodica tradizionale a -80°C hanno mostrato un rapido declino della vitalità cellulare nello stesso periodo di osservazione.

7. PROSPETTIVE FUTURE

Come testimonia la letteratura scientifica, le applicazioni dei biosensori a cellule sono ampie e riguardano molteplici ambiti. Inoltre le tendenze attuali verso la micro e nanoconversione di questi *device* rendono sempre più evidente l'impatto che l'utilizzo routinario di questi sistemi per lo screening *in vitro* delle reazioni tossiche ai farmaci potrà apportare sugli *outcomes*, sui tempi ed i modi delle sperimentazioni cliniche, nonché, più in generale, sui costi sanitari. La segnalazione di eventi avversi gravi ed inattesi, talora letali, sta divenendo una costante che riguarda non solo i farmaci innovativi, ma anche le molecole di uso già validato da molti anni, evidenziando i limiti e le carenze delle sperimentazioni cliniche.

I dati farmacologici e tossicologici ottenuti attraverso l'interpretazione di questi sistemi potrebbero consentire di ricavare informazioni aggiuntive, specie-specifiche e in tempi rapidi, che permetteranno di arricchire il dossier di dati a disposizione dei ricercatori. Tutto ciò contribuirà a superare il principale limite della sperimentazione animale, e cioè la difficile estrapolazione dei dati ricavati nell'animale in un contesto più propriamente clinico. Infine lo sviluppo di biosensori con caratteristiche sempre più sofisticate concorrerà allo sviluppo di metodi alternativi alla sperimentazione animale al fine di ridurre, sostituire con materiale *in vitro* e perfezionare l'uso di animali nelle sperimentazioni.

La realizzazione ed, in modo particolare, l'applicazione di questi sistemi si avvalerà dell'apporto professionale multidisciplinare di varie figure: il farmacista, il ricercatore, il medico, ma anche il fisico, l'ingegnere ed il chimico, che metteranno a disposizione le

competenze settoriali e il *know how* per lo sviluppo e l'applicazione clinica di questi sistemi, favorendo la necessaria integrazione tra le diverse competenze e rendendo possibile la realizzazione di scenari innovativi e sempre più all'avanguardia.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Lasser KE, Allen PD, Woolhandler SJ, Himmelstein DU, Wolfe SM, Bor DH. Timing of New Black Box Warnings and Withdrawals for Prescription Medications. *JAMA* 2002; 287(17): 2215-20.
2. Li AP. Accurate prediction of human drug toxicity: a major challenge in drug development. *Chemico-Biological Interactions* 2004;150: 3–7.
3. Roden DM. An Underrecognized Challenge in Evaluating Postmarketing Drug Safety. *Circulation* 2005;111;246-8.
4. Europa.eu (Internet). Il portale dell'Unione Europea (consultato settembre 2010). Disponibile all'indirizzo: http://europa.eu/legislation_summaries/internal_market/single_market_for_goods/chemical_products/l21282_it.htm.
5. Farkas D, Tannenbaum SR. In vitro methods to study chemically-induced hepatotoxicity: a literature review. *Curr Drug Metab* 2005; 6:111-25.
6. Guillouzo A. Liver cell models in in vitro toxicology. *Environ Health Perspect* 1998; 106(2):511-32.
7. Sivaraman A, Leach JK, Townsend S, Iida T, Hogan BJ, Stolz DB et al. A microscale in vitro physiological model of the liver: predictive screens for drug metabolism and enzyme induction. *Curr Drug Metab* 2005;6:569-91.
8. Guillouzo A, Guillouzo CG. Evolving concepts in liver tissue modelling and implications for in vitro technology. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008; 4(10):1279-94.
9. Donato MT, Lahoz A, Montero S, Bonora A, Pareja E, Mir J et al. Functional assessment of the quality of human hepatocyte preparations for cell transplantation. *Cell Transplant* 2008; 17(10-11):1211-9.
10. Fiegel HC, Kaufmann PM, Bruns H, Kluth D, Horch RE, Vacanti JP et al. Hepatic tissue engineering: from transplantation to customized cell-based liver directed therapies from the laboratory. *Tissue Eng Part B Rev* 2008; 12(1):56-66.

11. Gómez-Lechón MJ, Lahoz A, Jiménez N, Bonora A, Castell JV, Donato MT. Evaluation of drug-metabolizing and functional competence of human hepatocytes incubated under hypothermia in different media for clinical infusion. *Cell Transplant* 2008; 17(8):887-97.
12. Gebhardt R, Hengstler JG, Müller D, Glöckner R, Buenning P, Laube B et al. New hepatocyte in vitro systems for drug metabolism: metabolic capacity and recommendations for application in basic research and drug development, standard operation procedures. *Drug Metab Rev* 2003; 35(2-3):145-213.
13. Goulet F, Normand C, Morin O. Cellular interactions promote tissue-specific function, biomatrix deposition and junctional communication of primary cultured hepatocytes. *Hepatology* 1988; 8:1010-8.
14. Moghe PV, Berthiaume F, Ezzell RM, Toner M, Tompkins RG, Yarmush ML. Culture matrix configuration and composition in the maintenance of hepatocyte polarity and function. *Biomaterials* 1996; 17(3):373-85.
15. LeCluyse E, Madan A, Hamilton G, Carroll K, DeHaan R, Parkinson A. Expression and regulation of cytochrome P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes. *J. Biochem Mol Toxicol* 2000; 14(4):177-88.
16. Sivaraman A, Leach JK, Townsend S, Iida T, Hogan BJ, Stolz DB et al. A microscale in vitro physiological model of the liver: predictive screens for drug metabolism and enzyme induction. *Curr Drug Metab* 2005; 6:569-91.
17. Gebhardt R. Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther* 1992; 53(3):275-354.
18. Allen JW, Khetani SR, Bathia SN. In vitro zonation and toxicity in a hepatocytes bioreactor. *Toxicol Sci* 2005;84:110-9.
19. Park J, Berthiaume F, Toner M, Yarmush ML, Tilles AW. Microfabricated grooved substrates as platforms for bioartificial liver reactors. *Biotechnol Bioeng* 2005; 90(5):632-44.

20. Tong JZ, De Lagausie P, Furlan V, Cresteil T, Bernard O, Alvarez F. Long-term culture of adult rat hepatocyte spheroids. *Exp Cell Res* 1992; 200(2):326-32.
21. Powers MJ, Domansky K, Kaazempur-Mofrad MR, Kalezi A, Capitano A, Upadhyaya A. A microfabricated array bioreactor for perfused 3D liver culture. *Biotechnol Bioeng* 2002;78(3):257-69.
22. McIntosh MB, Corner SM, Amiot BP, Nyberg SL. Engineering analysis and development of the spheroid reservoir bioartificial liver. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2009:5985-8.
23. Carpentier B, Gautier A, Legallais C. Artificial and bioartificial liver devices: present and future. *Gut* 2009;58(12):1690-1702.
24. Chamuleau RA, Poyck PP, Van de Kerkove MP. Bioartificial liver: its pros and cons. *Ther Apher Dial* 2006 ;10(2):168-74.
25. Di Nicuolo G, van de Kerkhove MP, Hoekstra R, Beld MG, Amoroso P et al. No evidence of in vitro and in vivo porcine endogenous retrovirus infection after plasmapheresis through the AMC-bioartificial liver. *Xenotransplantation* 2005;12(4):286-92.
26. Frühauf NR, Oldhafer KJ, Höltje M, Kaiser GM, Frühauf JH, Stavrou GA et al. A bioartificial liver support system using primary hepatocytes: a preclinical study in a new porcine hepatectomy model. *Surgery* 2004 ;136(1):47-56.
27. Jalan R, Sen S, Williams R. Prospects for extracorporeal liver support. *Gut* 2004;53(6):890–8.
28. Jared W, Allen A, Bhatia SN. Improving the next generation of bioartificial liver devices. *Semin Cell Dev Biol* 2002 ;13:447–54.
29. Mullon C, Pitkin Z. The HepatAssist bioartificial liver support system: clinical study and pig hepatocyte process. *Expert Opin Investig Drugs* 1999 ;8(3):229-35.
30. Pless G, Sauer IM. Bioartificial liver: current status. *Transplant Proc* 2005 ;37(9):3893-5.
31. Sauer IM, Gerlach JC. Modular extracorporeal liver support. *Artif Organs* 2002; 26(8):703-6.

32. Sgroi A, Serre-Beinier V, Morel P, Bühler L. What clinical alternatives to whole liver transplantation? Current status of artificial devices and hepatocyte transplantation. *Transplantation* 2009;27;87(4):457-66.
33. Sussman NL, Kelly JH. Extracorporeal liver support: cell-based therapy for the failing liver. *Am J Kidney Dis* 1997;30(5 Suppl 4):66-71.
34. van de Kerkhove MP, Di Florio E, Scuderi V, Mancini A, Belli A, Bracco A et al. Phase I clinical trial with the AMC-bioartificial liver. *Int J Artif Organs* 2002;25(10):950-9.
35. van de Kerkhove MP, Di Florio E, Scuderi V, Mancini A, Belli A, Bracco A et al. Bridging a patient with acute liver failure to liver transplantation by the AMC-bioartificial liver. *Cell Transplant* 2003; 12(6):563-8.
36. van de Kerkhove MP, Hoekstra R, Chamuleau RA. Clinical application of bioartificial liver support systems. *Ann Surg* 2004;240(2):216-30.
37. Raccomandazione con le linee guida alla sperimentazione clinica sugli xenotrapianti n. 2003/10 Working Party on Xenotransplantation, Consiglio d'Europa.
38. Sullivan JP, Gordon JE, Palmer AF. Simulation of oxygen carrier mediated oxygen transport to C3A hepatoma cells housed within a hollow fiber bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 2006; 93(2):306-17.
39. Gerlach JC, Encke J, Hole O, Muller C, Ryan CJ et al. Bioreactor for a larger scale hepatocyte in vitro perfusion. *Transplantation* 1994;58:984-8.
40. Nyberg SL, Shatford RA, Peshwa MV, White JG, Cerra FB, Hu WS. Evaluation of a hepatocyte-entrapment hollow fiber bioreactor: A potential bioartificial liver. *Biotechnol Bioeng* 1993, 41(2):194-203.
41. Demetriou AA, Brown RS Jr, Busuttil RW, Fair J, McGuire BM, Rosenthal P et al. Prospective, randomized, multicenter, controlled

- trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg* 2004; 239(5):660-7.
42. Ellis AJ, Hughes RD, Wendon JA, Dunne J, Langley PG, Kelly JH et al. Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology* 1996;24(6):1446-51.
 43. Sauer IM, Obermeyer N, Kardassis D, Theruvath T, Gerlach JC. Development of a hybrid liver support system. *Ann NY Acad Sci* 2001; 944:308-19.
 44. Sauer IM, Zeilinger K, Obermayer N, Pless G, Grünwald A, Pascher A et al. Primary human liver cells as source for modular extracorporeal liver support—a preliminary report. *Int J Artif Organs* 2002;25(10):1001–5.
 45. Ding YT, Qiu YD, Chen Z, Xu QX, Zhang HY, Tang Q et al. The development of a new bioartificial liver and its application in 12 acute liver failure patients. *World J Gastroenterol* 2003; 9(4):829–32.
 46. Yu CB, Pan XP, Li LJ. Progress in bioreactors of bioartificial livers. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009;15(2):134-40.
 47. De Bartolo L, Salerno S, Curcio E, Piscioneri A, Rende M, Morelli S et al. Human hepatocytes functions in a crossed hollow fiber membrane bioreactor. *Biomaterials* 2009;30:2531-43.
 48. Schwartlander R, Schmid J, Brandenburg B, Katenz E, Wolfgang F, Vondran R et al. Continuously microscopically observed and process-controlled culture within the SlideReactor: proof of a new concept for cell characterization. *Tissue Eng* 2007;13(1):187-95.
 49. Catapano G, Gerlach JC. Bioreactors for liver tissue engineering. Capitolo 8. *Topics in Tissue Engineering*, Vol. 3, 2007. Eds. N Ashammakhi, R Reis & E Chiellini © 2007.
 50. Naruse K, Sakai Y, Nagashima I, Jiang GX, Suzuki M, Muto T. Development of a new bioartificial liver module filled with porcine hepatocytes immobilized on non-woven fabric. *Int J Artif Organs* 1996;19(6):347-52.

51. Hoque ME, Mao HQ, Ramakrishna S. Hybrid braided 3-D scaffold for bioartificial liver assist devices. *J Biomater Sci Polymer Edn* 2007, 18(1):45-58.
52. Kataoka K, Nagao Y, Nukui T, Akiyama I, Tsuru K, Hayakawa S et al. An organic-inorganic hybrid scaffold for the culture of HepG2 cells in a bioreactor. *Biomaterials* 2005;26:2509-16
53. Morsiani E, Brogli M, Galavotti D, Bellini T, Ricci D, Pazzi P et al. Long-term expression of highly differentiated functions by isolated porcine hepatocytes perfused in a radial-flow bioreactor. *Artif Organs* 2001;25(9):740-8.
54. Calise F, Mancini A, Amoroso P, Belli A, Bracco A, Ceriello A et al. Functional evaluation of the AMC-BAL to be employed in a multicentric clinical trial for acute liver failure. *Transplant Proc* 2001;33(1-2):647-9.
55. Flendrig LM, Calise F, Di Florio E, Mancini A, Ceriello A, Santaniello W et al. Significantly improved survival time in pigs with complete liver ischemia treated with a novel bioartificial liver. *Int J Artif Organs* 1999;22:701-9.
56. Falasca L, Miccheli A, Sartori E, Tomassini A, Conti Devirgiliis L. Hepatocytes Entrapped in Alginate Gel Beads and Cultured in Bioreactor: Rapid Repolarization and Reconstitution of Adhesion Areas. *Cells Tissues Organs* 2001,168:126-36.
57. Miranda JP, Rodrigues A, Tostoes RM, Leite S, Zimmerman H, Carrondo MJT et al. Extending hepatocyte functionality for drug-testing applications using high-viscosity alginate-encapsulated three-dimensional cultures in bioreactors. *Tissue Eng Part C Methods* 2010.
58. Guyomard C, Rialland L, Fremond B, Chesne C, Guillouzo A. Influence of alginate gel entrapment and cryopreservation on survival and xenobiotic metabolism capacity of rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996,141(2):349-56.

59. Leclerc E, Yasuyuki S, Fujii T. Microfluidic PDMS (Polydimethylsiloxane) Bioreactor for large-scale culture of hepatocytes. *Biotechnol Prog* 2004; 20:750-5.
60. Baudoin R, Corlu A, Griscom L, Legallais C, Leclerc E. Trends in the development of microfluidic cell biochips for in vitro hepatotoxicity. *Toxicol In Vitro* 2007;21(4):535-44.
61. Viravaidya K, Sin A and Shuler ML. Development of a Microscale Cell Culture Analog To Probe Naphthalene Toxicity. *Biotechnol Prog* 2004; 20:316-23.
62. Li AP. Human hepatocytes: Isolation, cryopreservation and applications in drug development. *Chem Biol Interact* 2007;168:16–29.
63. Lemaire F, Mandon CA, Reboud J, Papine A, Angulo J, Pointu H et al. Toxicity assays in nanodrops combining bioassay and morphometric endpoints. *PLoS ONE* 2007;2(1):163.
64. Dash A, Inman W, Hoffmaster K, Sevidal S, Kelly J, Obach R et al. Liver tissue engineering in the evaluation of drug safety. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2009;10(5):1-16.
65. Domansky K, Inman W, Serdy J, Griffith L. Perfused microreactors for liver tissue engineering. *Conf Proc I.E.E.E. Eng Med Biol Soc* 2005,7:7490-2.
66. Lee MY, Kumar RA, Sumitra MS, Hogg MG, Clark DS, Dordick JS. Three-dimensional cellular microarray for high throughput toxicology assays. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(1):59-63.
67. Zavan B, Brun P, Vindigni V, Amadori A, Habeler W, Pontisso P et al. Extracellular matrix-enriched polymeric scaffolds as a substrate for hepatocyte cultures: in vitro and in vivo studies. *Biomaterials* 2005;26(34):7038-45.
68. Schug M, Heise T, Bauer A, Storm D, Blaszkewicz M, Bedawy E et al. Primary rat hepatocytes as in vitro system for gene expression studies: comparison of sandwich, Matrigel and 2D cultures. *Arch Toxicol* 2008;82(12):923-31.

69. Allen JW, Bhatia SN. Formation of steady-state oxygen gradients in vitro: application to liver zonation. *Biotechnol Bioeng* 2003;82(3):253-62.
70. Chu XH, Shi XL, Feng ZQ, Gu JY, Xu HY, Zhang Y et al.. In vitro evaluation of a multi-layer radial-flow bioreactor based on galactosylated chitosan nanofiber scaffolds. *Biomaterials* 2009;30(27):4533-8.
71. Simoni J. Artificial oxygen carriers: scientific and biotechnological points of view. *J Artif Organs* 2009;33(2):92-6.
72. Tilles AW, Berthiaume F, Yarmush ML, Tompkins RG, Toner M. Bioengineering of liver assist device. *J. Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002;9:686-96.
73. McClelland RE, MacDonald JM, Coger RN. Modeling O₂ transport within engineered hepatic devices. *Biotechnol Bioeng* 2003;82(1):12-27.
74. Vinci B, Cavallone D, Vozzi G, Mazzei D, Domenici C, Brunetto M et al. In vitro liver model using microfabricated scaffolds in a modular bioreactor. *Biotechnol J* 2010;5(2):232-41.
75. Hirose M, Yamato M, Kwon OH, Harimoto M, Kushida A, Shimizu T et al. Temperature-Responsive surface for novel co-culture systems of hepatocytes with endothelial cells: 2-D patterned and double layered co-cultures. *Yonsei Med J* 2002;41(6):803-13.
76. Harimoto M, Yamato M, Hirose M, Takahashi C, Isoi Y, Kikuchi A et al. Novel approach for achieving double-layered cell sheets co-culture: overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes. *J Biomed Mater Res* 2002;62(3):464-70.
77. Novik E, Maguire TJ, Chao P, Cheng KC, Yarmush ML A microfluidic hepatic coculture platform for cell-based drug metabolism studies. *Biochem Pharmacol* 2010;79(7):1036-44.
78. Geir IN, Elvevold K, Ytrebo LM, Fuskevag OM, Pettersen I, Bertheussen K et al. Significant contribution of liver non parenchymal

- cells to metabolism of ammonia and lactate and cocultivation augments the functions of a bioartificial liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:75-83.
79. O'Brien PJ, Irwin W, Diaz D, Howard-Cofield E, Krejsa CM, Slaughter MR et al. High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Arch Toxicol* 2006;80(9):580-604.
80. Fox BC, Devonshire AS, Schutte ME, Foy CA, Minguez J, Przyborski S et al. Validation of reference gene stability for APAP hepatotoxicity studies in different in vitro systems and identification of novel potential toxicity biomarkers. *Toxicol In Vitro* 2010; 24(7):1962-70.
81. Judson RS, Houck KA, Kavlock RJ, Knudsen TB, Martin MT, Mortensen HM et al. In vitro screening of environmental chemicals for targeted testing prioritization: the ToxCast Project. *Environm Health Perspectives* 2010;118(4): 485-92.
82. Bader A, Fruhauf N, Zech K, Haverich A, Borlak JT. Development of a small-scale bioreactor for drug metabolism studies maintaining hepatospecific functions. *Xenobiotica* 1998;28(9):815-25.
83. Prestwich GD. Evaluating drug efficacy and toxicology in three dimensions: using synthetic extracellular matrices in drug discovery. *Acc Chem Res* 2008;41(1):139-48.
84. Ullrich A, Berg C, Hengstler JG, Runge D. Use of a standardized and validated long-term human hepatocyte culture system for repetitive analyses of drugs: repeated administrations of acetaminophen reduces albumin and urea secretion. *ALTEX* 2006;24(1):35-40.
85. Hart SN, Li Y, Nakamoto K, Subileau E, Steen D, and Zhong X. A Comparison of Whole Genome Gene Expression Profiles of HepaRG Cells and HepG2 Cells to Primary Human Hepatocytes and Human Liver Tissues. *Drug Metabolism and Disposition* 2010;38(6):6988-94.

86. Gennero L, Roos MA, Sperber K, Denysenko T, Bernabei P, Calisti GF et al. Pluripotent plasticity of stem cells and liver repopulation. *Cell Biochem Funct* 2010; 28: 178–89.
87. Greenhough S, Medine CN, Hay DC. Pluripotent stem cell derived hepatocyte like cells and their potential intoxicity screening. 2010 Jul 30 [Epub ahead of print].
88. Tassone P, Goldmacher VS, Neri P, Zozzini A, Shamma MA, Whiteman KR et al. Cytotoxic activity of the maytansinoid immunoconjugate B-B4-DM1 against CD138+ multiple myeloma cells. *Blood* 2004;104(12): 3688-96.
89. Derksen PW, Keehnen RM, Evers LM, van Oers MH, Spaargaren M, Pals ST. Cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor binding and promotes Met signaling in multiple myeloma. *Blood* 2002;15;99(4):1405-10.
90. Erickson HK, Park PU, Widdison WC, Kovtun YV, Garrett LM, Hoffman K et al. Antibody-Maytansinoid Conjugates Are Activated in Targeted Cancer Cells by Lysosomal Degradation and Linker-Dependent Intracellular Processing. *Cancer Res* 2006; 66(8); 4426-33.
91. Clinical Trails.gov (Internet). Il portale del Trial Clinici ad opera del National Institutes of Health (consultato novembre 2010). Disponibile all'indirizzo
<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01001442?term=BT062&rank=1>.
92. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976; 13: 31-83.
93. Vitcheva V, Kondeva-Burdina M, and Mitcheva M. D-Amphetamine toxicity in freshly isolated rat hepatocytes: a possible role of CYP3A. *Arh Hig Rada Toksikol* 2009;60:139-45.
94. Derksen PW, Keehnen RM, Evers LM, van Oers MH, Spaargaren M, Pals ST. Cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor binding and promotes Met signaling in multiple myeloma. *Blood* 2002;15;99(4):1405-10.

95. Loussouarn D, Champion L, Sagan C, Frenel JS, Dravet F, Classe JM et al. Prognostic impact of syndecan-1 expression in invasive ductal breast carcinomas. *Br J Cancer* 2008;98(12):1993-8.
96. Nikolova V, Koo CY, Ibrahim SA, Wang Z, Spillmann D, Dreier R et al. Differential roles for membrane-bound and soluble syndecan-1 (CD138) in breast cancer progression. *Carcinogenesis* 2009;30(3):397-407.
97. Li HG, Xie DR, Shen XM, Li HH, Zeng H, Zeng YJ. Clinicopathological significance of expression of paxillin, syndecan-1 and EMMPRIN in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005;11(10):1445-51.
98. Sirén H, Seppanen-Laakso T, Oresic M. Capillary electrophoresis with UV detection and mass spectrometry in method development for profiling metabolites of steroid hormone metabolism. *Journal of Chromatography B*, 871 (2008) 375–382.
99. Sohl CD, Cheng Q, Guengerich FP. Chromatographic assays of drug oxidation by human cytochrome P450 3A4. *Nat Protoc* 2009;4(9):1252-7.
100. Lau Y, Sapidou E, Cui X, White RE, and Cheng K-C. Development of a novel in vitro model to predict hepatic clearance using fresh, cryopreserved and sandwich-cultured hepatocytes. *Drug metabolism and disposition* 2002;30(12):1446-54.
101. Hengstler J-G, Utesch D, Steinberg P, Platt KL, Diener B, Ringel M. Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug Metabolism Reviews* 2000;32(1):81-118.