

CONSIGLIO
NAZIONALE
DELLE
RICERCHE



Istituto di Farmacologia Traslazionale
Institute of Translational Pharmacology

IFT

U.O.S. di Cagliari – Pula

Parco Scientifico e Tecnologico della Sardegna - Polaris - Edificio 5- Loc. Piscinamanna - 09010
Pula (CA)

Tel. +39 070 9242025 Fax +39 070 9242206

Capitolato Tecnico

Acquisizione di servizi di ricerca e sviluppo per la
realizzazione del progetto *“Robotica e 3D-bioprinting per la
valutazione dell’efficacia e tossicità in vitro di
nuove terapie e cosmetici”*
- POR SARDEGNA FESR 2014-2020 – Azione 1.3.1”

Cig 8037777768

Cup B76C18000320008



Descrizione introduttiva

La Sede secondaria di Cagliari dell'Istituto di Farmacologia Traslazionale del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR-IFT-CA) è impegnato nell'espansione del proprio potenziale tecnologico, optando preferenzialmente per i sistemi hardware e software di tipo open-source in quanto permettono un rapido ampliamento e affinamento della strumentazione di ricerca grazie all'apporto spontaneo della comunità scientifica. Attualmente, il CNR-IFT-CA necessita di un avanzamento tecnologico che gli consenta di attuare saggi di screening farmacologico/tossicologico che siano al contempo innovativi e personalizzabili alle esigenze di un possibile committente esterno. Per questo motivo si richiede un servizio di ricerca e sviluppo che includa la progettazione e l'implementazione di una piattaforma di screening *in vitro* che utilizzi la robotica e il 3D-bioprinting per valutare la tossicità e l'efficacia di nuovi principi terapeutici e prodotti di cosmetica.

Obiettivi

Il CNR-IFT-CA ha l'obiettivo di ottenere un servizio di ricerca e sviluppo che porti alla messa a punto di:

A) Un sistema robotico in ambiente sterile che consenta di valutare in tempi brevi e a costo moderato l'efficacia e la tossicità *in vitro* di composti di nuova sintesi, mediante l'automazione del trasferimento dei reagenti; l'analisi della densità ottica dei campioni; l'archiviazione e il trasferimento dei dati.

- Il sistema robotico dovrà essere in grado di eseguire il test della cito-tossicità del Neutral Red (vedi protocollo in ref. 1) in presenza e assenza di raggi ultravioletti (UV), eseguito su microplates dove crescono cellule BALB/T3.
- I dati risultanti dovranno essere archiviabili attraverso modalità cloud.
- Il progetto dovrà dare la possibilità di condurre altre tipologie di sperimentazioni *in-vitro* su colture cellulari 2D, mediante la gestione software delle combinazioni delle funzionalità elementari.

Durante la fase di progettazione e sviluppo, ai soli fini della messa a punto del macchinario, il CNR-IFT-CA fornirà a titolo gratuito i reagenti, le cellule in coltura e la disponibilità dei propri locali e attrezzature di ricerca necessari per l'esecuzione del test del Neutral Red. Ai fini del collaudo, sarà richiesto di eseguire la suddetta procedura sperimentale presso i laboratori del CNR-IFT-CA, e sarà valutata la coerenza dei risultati con quanto indicato nella letteratura scientifica in merito alla cito-tossicità del sodio-dodecil-fosfato SDS (vedi ref. 1).

B) Una stampante 3D per bioprinting di strutture cellulari tridimensionali progettate *ad hoc* e incluse all'interno di scaffold biocompatibili. In particolare, il servizio di ricerca e sviluppo sarà focalizzato sulla progettazione e implementazione di un macchinario capace di creare strutture sottili o ultrasottili costituite da una soluzione solidificabile (tramite variazioni di temperatura o irradiazione con raggi ultravioletti) di scaffold + cellule viventi e che utilizzi gel granulari soffici di sostegno (vedi referenza 3) durante la fase di stampa.

- La stampante 3D per bioprinting dovrà essere gestibile in remoto e dovrà essere possibile visualizzare il macchinario e il suo funzionamento durante la fase operativa.

- Il macchinario dovrà dare la possibilità di applicare altre tecniche di stampa tridimensionale per bioprinting mediante la gestione software delle combinazioni delle funzionalità elementari.

Ai fini della corretta realizzazione della stampante 3D per bioprinting, durante la fase di progettazione e sviluppo il CNR-IFT-CA fornirà a titolo gratuito i reagenti, le cellule in coltura e la disponibilità dei propri locali e attrezzature di ricerca necessari per le prove di stampa. Ai fini del collaudo, sarà richiesto di stampare una sfera cava (diametro = 1 cm; spessore pareti = 2 mm) presso la sede del CNR-IFT-CA, dove sarà valutata la coerenza tra il disegno tridimensionale e l'oggetto di stampa.

Caratteristiche generali del servizio di ricerca e sviluppo

Il servizio di ricerca e sviluppo si dividerà in due fasi. In una prima fase saranno effettuate le ricerche necessarie per lo sviluppo dell'intero progetto dei due macchinari e la loro visualizzazione mediante tecniche di modellazione 3D. Verificata la coerenza del progetto con gli obiettivi del bando di gara, si procederà alla implementazione fisica dei macchinari.

Al fine dell'aggiudicazione del servizio di ricerca e sviluppo è richiesto l'invio di un'idea progettuale di massima che sarà analizzata per ogni singolo macchinario (sistema robotico e stampante 3D per bio-printing) in base ai criteri elencati nelle tabelle dei punteggi.

Caratteristiche funzionali/strutturali richieste per le due strumentazioni

Di seguito sono descritte le caratteristiche funzionali e strutturali richieste per le due strumentazioni. Considerato che si tratta di un servizio di ricerca e sviluppo, tali caratteristiche sono da considerarsi esplicative delle esigenze del committente e, in fase di proposta di gara, possono essere comunque valutate favorevolmente delle idee progettuali che utilizzino strategie differenti al fine di raggiungere gli obiettivi.

A) Sistema robotico

Descrizione generale del ciclo operativo sperimentale

Il tipico ciclo sperimentale deve essere condotto in ambiente sterile idoneo alla coltura in vitro delle cellule e può essere composto da tutti o alcuni dei seguenti step:

1. Sosta o incubazione delle cellule in terreni di coltura o reagenti;
2. Trasferimento dei microplate mediante sistema meccanico (braccio robotico o altro) dalla zona di sosta alla zona destinata alla sperimentazione;
3. Effettuazione di una o più delle seguenti lavorazioni sulle wells del microplate:
 - Aspirazione/immissione di reagenti,
 - Agitazione,
 - Attività di risciacquo con buffer di lavaggio ecc.,
 - Esposizione dei campioni alla luce ultravioletta
4. Valutazione della vitalità cellulare mediante rilevazione della densità ottica per mezzo di colorimetria, spettrofotometria o altro

5. Pulizia, sanitizzazione, sterilizzazione del macchinario.

Non saranno necessarie attività di scrapping delle cellule dal substrato o centrifugazioni.

Elementi di valutazione del sistema proposto

Il sistema verrà valutato sulla base delle seguenti caratteristiche:

Sterilità del processo sperimentale: Sebbene le attività sperimentali previste non necessitino di un livello di bio-sicurezza 2 o superiori, l'utilizzo delle colture cellulari richiede un'elevata protezione dalla contaminazione microbica. Risulta quindi necessario che il servizio di ricerca e sviluppo includa il raggiungimento di una sterilità ambientale tale da consentire la corretta esecuzione di saggi sperimentali in vitro da condurre su colture cellulari. La strumentazione deve anche permettere l'eventuale intervento dell'operatore durante la fase sperimentale garantendo la sterilità del processo (es. tramite fori con guanti).

Precisione e efficienza del macchinario: Il sistema robotico dovrà essere in grado di dispensare volumi compresi tra da 5 a 1000 µl con un errore non superiore al 5%. In termini di tempo si considera ragionevole la possibilità di processare almeno 3 microplates (Dimensioni: 8.5 cm X 12.5 cm X 2.0 cm; N° pozzetti: 6, 12, 48 o 96 wells) per ogni sessione sperimentale nel test del Neutral Red (ref.1)

Controllo dei parametri ambientali: L'ambiente del sistema robotico deve consentire una vitalità cellulare ottimale e la possibilità di variarla in funzione delle esigenze sperimentali. Il servizio di ricerca e sviluppo deve includere la possibilità di regolare indipendentemente (i) la temperatura (range 25-45 C°), (ii) l'umidità (range 1-10%), (iii) la concentrazione di anidride carbonica (range CO₂ 2—12%) dell'ambiente interno allo strumento dove sono presenti le cellule.

Semplicità di utilizzo: L'intero sistema robotizzato (hardware e software) deve essere concepito in modo da essere utilizzato da un committente esterno del CNR-IFT-CA. A tal fine il sistema robotizzato deve essere sviluppato prevedendo una facilità d'uso tale da permetterne il corretto utilizzo da parte di personale qualificato, ma non specializzato in tecniche di coltura cellulare bidimensionale, dopo un periodo di formazione non superiore alle 8 ore.

Riservatezza dei dati: Considerato che i risultati sperimentali in campo farmacologico hanno spesso un alto valore economico, sono richieste delle strategie che consentano di preservare la riservatezza dei risultati sperimentali.

Requisiti Hardware:

Presenza delle seguenti funzioni elettromeccaniche

- Apertura/chiusura coperchio dei microplate
- Aspirazione liquidi contenuti nei microplate
- Trasferimento delle soluzioni all'interno dei microplate
- Agitazione delle soluzioni dei reagenti
- Agitazione/vibrazione del microplate

- Analisi della densità ottica del campione sperimentale, mediante colorimetro, spettrofotometro o altro (n.b. il test della cito-tossicità del Neutral Red prevede che la lettura dei campioni sia effettuata alla lunghezza d'onda di $540 \text{ nM} \pm 10 \text{ nM}$).
- Lampade a raggi ultravioletti (UV) utili alla sterilizzazione dell'ambiente interno al macchinario e per la valutazione della foto-tossicità cellulare dei composti in presenza di UV (ref. 2)
- Altri sistemi ritenuti opportuni dal progettista

Dimensioni del macchinario: lunghezza 1 m, profondità 0,5 m, altezza 0,8 m, +/- 30%.

Requisiti Software

La gestione software del sistema robotico deve avvenire in remoto mediante browser.

- **Librerie:** Dovrà essere possibile gestire ognuno dei sotto-sistemi elettromeccanici di cui al paragrafo "Requisiti Hardware", mediante librerie documentate invocabili da applicativi remoti sviluppati dall'utente;
- **Demo:** Dovrà essere fornita una demo che includa una GUI semplice ed intuitiva e completa di sorgenti, implementata mediante sistemi di sviluppo RAD liberamente reperibili in rete (es. asp.net, python, ecc.). La demo dovrà gestire singolarmente, mediante le librerie fornite, tutte le funzionalità del macchinario.
- **Archiviazione dei dati:** dovrà essere possibile archiviare i dati raccolti dal sistema colorimetrico o spettrofotometrico espressi come densità ottica (OD). I dati dovranno essere riferibili alle wells dove sono stati raccolti, insieme ai parametri del protocollo sperimentale adottato. I dati devono essere esportabili in un formato compatibile con gli ordinari fogli elettronici di calcolo (.csv, .xml, ecc.).
- **Protocollo del test del Neutral Red:** Dovrà essere fornita l'applicazione completa di sorgente che permetta di eseguire il test della cito-tossicità e della foto-cito-tossicità del Neutral Red (vedi ref 1 e 2).

Stampante 3D

Peculiarità dei materiali utilizzati durante la stampa

Il CNR-IFT-CA intende stampare strutture sottili o ultrasottili tridimensionali costituite da cellule viventi incluse all'interno di uno scaffold di idrogel. A tale scopo, si prevede di avvalersi di gel granulari soffici (es. carbopol) per il sostegno delle strutture durante le fasi di stampa (vedi ref. 3). I gel granulari soffici di sostegno sono necessari in quanto, per ridurre le pressioni, la soluzione costituita da scaffold+cellule deve essere estrusa allo stato liquido durante la fase di stampa, mentre la polimerizzazione dello scaffold viene effettuata solo al termine del bio-printing tramite variazioni di temperatura o irradiazione con raggi UV.

A causa della tendenza dei gel granulari di sostegno a liquefarsi quando soggetti a vibrazioni, è essenziale isolare il tavolino porta-campione da ogni vibrazione meccanica, sia di origine interna che esterna alla stampante 3D. L'esperienza indica che, al fine di migliorare la precisione di stampa, risulta vantaggioso potersi avvalere di una stampante 3D dove il tavolino porta-campione

(tavolino di stampa) rimane immobile durante tutte le fasi di stampa, mentre il movimento sui tre assi degli estrusori risulta autonomo e indipendente. L'operatore economico ha tuttavia ampia facoltà di proporre soluzioni alternative e accorgimenti tecnici adeguati, a condizione di garantire l'assenza di vibrazioni che interessino il gel di sostegno.

Elementi di valutazione del sistema proposto

Il sistema verrà valutato sulla base delle seguenti caratteristiche:

Sterilità del processo sperimentale (da eseguire all'interno di cappa a flusso laminare)

Il processo di bio-printing richiede la protezione del campione da possibili inquinamenti microbici. A tale riguardo, non si richiedono livelli di bio-sicurezza 2 o superiori, tuttavia è indispensabile che la stampante 3D sia progettata e implementata in modo da facilitare e massimizzare l'efficacia delle operazioni di pulizia e sterilizzazione normalmente utilizzate per la coltura delle cellule in vitro. Si prevede di eseguire l'intero processo di stampa all'interno di una cappa a flusso laminare o di un incubatore a CO₂ che non sono oggetto della presente gara.

Precisione nell'esecuzione delle fasi di stampa

Il CNR-IFT-CA intende stampare strutture relativamente piccole e cave (grandezze massime: lunghezza= 2 cm; profondità =2 cm; altezza = 2 cm, spessore pareti 2 mm), mediante un estrusore dotato di un foro da 50-200 µm di diametro (vedi ref. 3). La precisione di stampa deve essere sufficiente per consentire di ottenere delle strutture che mantengano la loro integrità una volta solidificate (n.b. stampe imprecise creano delle strutture costituite da filamenti o parti disunite dopo la polimerizzazione del gel). La stampa dell'oggetto 3D sarà considerata sufficientemente accurata se le variazioni rispetto al disegno 3D saranno inferiori al 15%.

Semplicità di utilizzo

La stampante 3D per bio-printing deve essere concepita in modo da essere utilizzata da un soggetto terzo rispetto al CNR-IFT-CA. Per tale motivo si richiede che la stampante 3D per bioprinting presenti una facilità d'uso tale da permetterne il corretto utilizzo da parte di personale qualificato, ma non specializzato in tecniche di coltura cellulare tridimensionale, dopo un periodo di formazione non superiore alle 8 ore.

Portabilità dello strumento

Deve essere prevista la portabilità dello strumento al fine di consentirne il trasporto e l'utilizzazione presso altre sedi.

Requisiti Hardware

Presenza delle seguenti funzionalità elettromeccaniche:

- **Tavolino di stampa:** dovrà essere sviluppato un tavolino di stampa a vibrazioni ridotte, in modo da non compromettere la stabilità del gel di sostegno e garantire la precisione dell'oggetto di stampa

- **Estrusori:** L'estrusione ad alta precisione di due soluzioni differenti costituite da scaffold+cellule, in modo da creare oggetti costituiti dall'insieme di due estrusati (es. sistema a doppio estrusore)
- **Agitazione contenitori:** dovrà essere prevista la agitazione/vibrazione dei contenitori delle due soluzioni costituite dallo scaffold+cellule durante la fase di estrusione, in modo da garantire una distribuzione omogenea delle cellule all'interno dello scaffold
- **Controllo termico degli estrusati e del tavolino di stampa:** dovrà essere previsto un sistema/i di riscaldamento/raffreddamento da collegare ai recipienti contenenti le due soluzioni costituite dallo scaffold+cellule (variazione temperatura da +4C° a +45 C°). Inoltre, dovrà essere previsto un sistema/i di riscaldamento/raffreddamento da collegare al tavolino porta-oggetto (variazione temperatura da +4C° a 45 C°)
- **Lampada UV:** dovrà essere previsto un sistema di lampada UV finalizzato alla polimerizzazione dello scaffold
- **Telecamera e microscopio:** dovrà essere prevista la presenza di un sistema di telecamera e microscopio USB per la visualizzazione in tempo reale del prodotto di stampa (Telecamera a colori con risoluzione di almeno 720p - Microscopio digitale USB con Zoom ottico fino almeno 300X e risoluzione almeno 1280 * 720 pixel)

Requisiti Software

Il macchinario dovrà essere in grado di stampare oggetti tridimensionali a partire dal g-code fornito dall'utente on line o memorizzato su supporto SD. La stampante 3D dovrà essere settabile e controllabile remotamente attraverso una interfaccia grafica semplice e intuitiva.

- **Librerie:** Dovrà essere possibile gestire ognuno dei parametri delle funzionalità elementari della stampante 3D per bioprinting, mediante librerie documentate invocabili da applicativi remoti sviluppati dall'utente;
- **Demo:** Dovrà essere fornita una demo che includa una GUI semplice ed intuitiva e completa di sorgenti, implementata mediante sistemi di sviluppo RAD liberamente reperibili in rete (es. asp.net, python, ecc.). La demo dovrà gestire singolarmente, mediante le librerie fornite, tutte le funzionalità del macchinario.
- **Monitoring della stampante in tempo reale:** dovrà essere possibile visualizzare "in tempo reale" la stampante 3D e il suo funzionamento durante il processo di stampa

Caratteristiche indispensabili richieste per le due strumentazioni

Di seguito sono descritte delle caratteristiche riferite al sistema robotico e alla stampante 3D per bio-printing che si considerano indispensabili:

Indipendenza delle strumentazioni

Il sistema robotico e la stampante 3D per bio-printing devono potere essere utilizzate indipendentemente da committenti diversi, conseguentemente i sistemi hardware, software e il flusso dei dati devono essere necessariamente distinti e autonomi.

Installazione e collaudo

Si richiede che l'installazione e il collaudo del sistema robotico e della stampante 3D per bio-printing sia effettuata presso la struttura di ricerca del CNR-IFT-CA. Inoltre si richiede che si garantisca la piena operatività delle strumentazioni e dei software ad essi associati per 2 anni.

Piano di lavoro

Dovranno essere presentati i piani di lavoro relativi alla progettazione, realizzazione e messa in funzione del sistema robotico e della stampante 3D per bio-printing. Tali piani di lavoro potranno includere ad esempio:

- cronoprogramma;
- modalità di gestione del progetto;
- strumenti tecnologici e informatici utilizzati;
- altri elementi ritenuti necessari

Referenze

- 1) Test Method Protocol for BALB/c 3T3 Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay Phase III - Validation Study November 4, 2003
<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/methods/acutetox/invidocs/phiiiprot/3t3phiii.pdf>
- 2) OECD/OCDE - OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS - In Vitro 3T3 NR U phototoxicity test
<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd432-508.pdf>
- 3) Bhattacharjee T., Zehnder S.M., Rowe K.G., Jain S., Nixon R.M. , Sawyer W.G., Angelini T.E. Writing in the granular gel medium. Science Advances 25 Sep 2015: Vol. 1, no. 8, e1500655. DOI: 10.1126/sciadv.1500655
<https://advances.sciencemag.org/content/1/8/e1500655>