

<b>DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO</b>	<b>102021000007304</b>
<b>Data Deposito</b>	<b>25/03/2021</b>
<b>Data Pubblicazione</b>	<b>25/09/2022</b>

Classifiche IPC

<b>Sezione</b>	<b>Classe</b>	<b>Sottoclasse</b>	<b>Gruppo</b>	<b>Sottogruppo</b>
A	61	K	9	51

Titolo

METODO DI APPLICAZIONE DI IMPULSI ELETTRICI ALLO SCOPO DI CARICARE MOLECOLE DI VARIA NATURA IN NANOVESICOLE DI ORIGINE VEGETALE

**METODO DI APPLICAZIONE DI IMPULSI ELETTRICI ALLO SCOPO DI  
CARICARE MOLECOLE DI VARIA NATURA IN NANOVESICOLE DI ORIGINE  
VEGETALE**

5

DESCRIZIONE

Settore tecnico dell'invenzione

La presente invenzione ha per oggetto un innovativo metodo per caricare molecole di varia natura in nanovesicole di origine vegetale. In particolare, le  
10 nanovesicole sono estratte da vegetali biologici e il metodo, oggetto della presente invenzione, permette di caricare al loro interno sostanze di varia natura, ad esempio: vitamine, sostanze per uso cosmetico, farmaci e agenti per uso medico, veterinario, farmacologico ed alimentare.

Tecnica nota

15 Com'è noto, l'uso di nanostrutture in grado di trasportare molecole di varia natura nel sito di azione e facilitarne e migliorarne l'efficacia è una dei principali ambiti di investimento dell'industria biotecnologica. Fino ad oggi si è pensato di costruire artificialmente delle "zattere lipidiche" che potessero inglobare la molecola e quindi proteggerla fino al sito di azione previsto. Queste strutture  
20 lipidiche sono state chiamate "liposomi" e sono, ad oggi, l'unico presidio già testato in studi clinici.

I risultati ottenuti non sono stati in realtà incoraggianti per alcune problematiche legate alla natura artificiale dei liposomi che ne hanno favorito la tossicità sistemica piuttosto che l'incremento di efficacia atteso. Alcune  
25 pubblicazioni della stessa scrivente hanno dimostrato la capacità delle

nanovesicole naturali, chiamate esosomi, di trasportare molecole di varia natura, da farmaci (Federici C. et al 2014, Lessi et al 2016) a nanomateriali (Logozzi et al 2020). Si è quindi deciso di sperimentare varie metodiche allo scopo di favorire l'entrata e la permanenza di molecole di varia natura all'interno degli esosomi. Per

5 entrare maggiormente nel merito, a differenza degli esosomi, che sono prodotti naturalmente, i liposomi sono prodotti sinteticamente e hanno una struttura lipidica a doppio strato. I liposomi sono progettati per consentire sia l'incapsulamento di molecole idrofile come siRNA, DNA e RNA, nel nucleo acquoso della vescicola, sia composti bioattivi idrofobici come proteine, peptidi, fenolici e anticorpi, nel

10 doppio strato lipidico (Çağdaş et al., 2014).

Come è noto allo stato della tecnica, i liposomi sono preparati per estrusione di membrana, sonicazione, microemulsificazione e congelamento-scongelo e sono stati utilizzati nel "delivery" di molti farmaci, ad esempio nella formulazione di anfotericina B, doxorubicina, verteporfina, citarabina, morfina solfato e

15 daunorubicina (Fan e Zhang, 2013). La preparazione dei liposomi, tuttavia, può essere problematica in quanto richiede numerosi trattamenti e passaggi chimici per modificare la struttura del doppio strato lipidico usando proteine, ligandi ed anticorpi (Ishida et al., 1999; Theek et al., 2016). Inoltre, l'uso clinico dei liposomi ha dimostrato un alto livello di tossicità, dovuto al fatto che la gran parte dei

20 liposomi entra nel sistema catabolico dell'organismo, venendo in gran parte sequestrati in organi catabolici come milza e fegato; questo ovviamente, oltre ad un alto livello di tossicità, porta ad un bassissimo livello di efficienza.

Le informazioni sulle nanovesicole di derivazione vegetale stanno suscitando molto interesse sul loro possibile utilizzo come trasportatori di molecole a scopo

terapeutico. Infatti, le nanovesicole naturali (“exosomes-like”) e i liposomi hanno proprietà fisico-chimiche simili ma a differenza dei liposomi, gli esosomi derivati dalle piante non entrano nel sistema catabolico degli organi filtro dell’organismo. Inoltre le intrinseche somiglianze biochimiche tra la superficie dell’esosoma e quella delle piante originarie rendono più fattibile, rispetto ai liposomi, indirizzare gli  
5 esosomi verso un target specifico (Keller et al., 2006).

Inoltre, l’uso industriale delle nanovesicole derivanti da piante è bio-rinnovabile e sostenibile. Queste osservazioni suggeriscono che l’uso di piante come sorgente industriale (nanofattorie) per la fabbricazione di nanoparticelle ad  
10 uso preventivo e terapeutico potrebbe rappresentare un nuovo approccio in nanomedicina. Si prevede infatti che la promozione di una attività di ricerca e sviluppo di nanovesicole per il trasporto di molecole terapeutiche contribuiranno in modo significativo allo sviluppo di nanomedicinali naturali. Quindi, le nanovesicole di origine vegetale hanno tutte le caratteristiche per consentire un  
15 adeguato trasporto di molecole terapeutiche con un basso livello di tossicità, e non ultimo con un ridottissimo livello di inquinamento ambientale.

Tuttavia, la purificazione e concentrazione di nanovesicole di origine vegetale comporta un processo di produzione totalmente diverso da quello sintetico dei liposomi.

20 Non è infatti noto un metodo efficiente ed in grado caricare molecole di varia natura in nanovesicole di origine vegetale. Un problema tecnico non ancora superato è legato alla possibilità di consentire un soddisfacente up-take delle molecole di interesse all’interno di nanostrutture integre, mantenendo l’integrità delle strutture stesse.

### Sintesi dell'invenzione

Oggetto della presente invenzione è quindi un innovativo metodo per caricare  
5 molecole di varia natura in nanovesicole estratte da vegetali biologici. In particolare, il metodo consente di caricare in modo soddisfacente, attraverso elettroporazione, all'interno delle nanovesicole, ad esempio vitamine, sostanze per uso cosmetico, farmaci e agenti per uso medico, veterinario farmacologico ed alimentare.

10 Il metodo oggetto della presente invenzione prevede l'uso di una apparecchiatura per il caricamento delle nanovesicole con metodo fisico-chimico, attraverso la destabilizzazione transiente di tali nanovesicole. Secondo la metodologia vengono utilizzate combinazioni di impulsi elettrici singoli e come treno d'onda, a voltaggio variabile tra i 20 e i 400 volts, e durata variabile, in modo  
15 da utilizzare la sequenza più efficiente per il caricamento. I treni d'onda applicati inducono una permeabilizzazione transiente della nanovesicola o esosoma, che ritornerà dopo un tempo variabile e comunque inferiore ai trenta minuti allo stadio iniziale di inerzia elettrica.

Vantaggiosamente, tale periodo di permeabilizzazione porterà ad un aumentato  
20 traffico transmembranario che permetterà il caricamento esosomiale con varie molecole a seconda della finalità necessaria.

Vantaggiosamente i parametri elettrici e chimico fisici (ad esempio il pH) vengono costantemente misurati durante la permeabilizzazione ed il caricamento allo scopo di migliorare l'efficienza della procedura.

Le nanovesicole estratte da vegetali di origine biologica, sono ottenute attraverso una metodologia per la quale è stata richiesta una parallela domanda di brevetto dalla scrivente, che consiste in centrifugazioni ed ultracentrifugazioni seriali, come previsto dalle procedure standard condivise a livello internazionale (Théry C. et al. J Extracell Vesicles. 2018;7(1):1535750). Vantaggiosamente le nanovesicole sono state estratte da succo spremuto da vegetali biologici, quali ad esempio Citrus paradisi, Citrus Lemon (L.), Citrus Reticulata, Citrus Bergamia, Actinidia Chinensis, Mangifera Indica, Carica Papaya Linn, Citrus Sinensis, Malus domestica.

10 Pertanto, secondo la presente invenzione, è definito un innovativo metodo per caricare molecole di varia natura in nanovesicole di origine vegetale, come specificato nella rivendicazione indipendente annessa.

Le rivendicazioni dipendenti delineano particolari e ulteriormente vantaggiosi aspetti dell'invenzione.

15 Breve descrizione dei disegni

Questi ed altri vantaggi dell'invenzione saranno ora descritti in modo dettagliato, con riferimento ai disegni allegati, che rappresentano una forma di attuazione esemplificativa dell'invenzione, in cui:

- la Figura 1 mostra il grafico del caricamento, mediante il metodo oggetto della presente invenzione, di Arancio di Acridina (AO) a concentrazioni crescenti in un numero crescente di nanovesicole isolate da un mix di frutta biologica;
- la Figura 2 mostra il grafico del caricamento, mediante il metodo oggetto della presente invenzione, di Arancio di Acridina (AO) in nanovesicole isolate da un mix di frutta biologica e il confronto con i liposomi commerciali;

- la Figura 3 mostra il grafico del caricamento, mediante il metodo oggetto della presente invenzione, di Vinblastina (VBL) in nanovesicole isolate da un mix di frutta biologica e il confronto con i liposomi commerciali;
- la Figura 4 mostra il grafico del caricamento, mediante il metodo oggetto della  
5 presente invenzione, di un anticorpo legato ad una sonda (AlexaFluor 488) in nanovesicole isolate da un mix di frutta biologica e il confronto con i liposomi commerciali;
- la Figura 5 mostra l'analisi al Nanosight di nanovesicole isolate da un mix di frutta biologica secondo il metodo oggetto della presente invenzione per il  
10 caricamento di Arancio di Acridina (AO);
- la Figura 6 mostra il grafico dell'intensità dell'indice di rifrazione di Arancio di Acridina (AO) in Nanovesicole isolate da un mix di frutta biologica, secondo il metodo oggetto della presente invenzione;
- la Figura 7 mostra le immagini a microscopio a fluorescenza dell'effetto del  
15 trattamento di Arancio di Acridina caricato in Nanovesicole estratte da un mix di frutta biologica su cellule di melanoma umano e il confronto con i liposomi commerciali;
- la Figura 8 mostra il grafico della valutazione della citotossicità sulla linea cellulare leucemica (CEM) e sulla linea cellulare leucemica farmacoresistenti  
20 (CEM/VBL100) da parte di nanovesicole isolate da un mix di frutta biologica e caricate secondo il metodo oggetto della presente invenzione;
- la Figura 9 mostra il grafico della valutazione della citotossicità sulla linea cellulare di melanoma umano da parte di nanovesicole isolate da un mix di frutta biologica e caricate con di Arancio di Acridina, secondo il metodo

oggetto della presente invenzione e il confronto con Arancio di Acridina da solo e con i liposomi commerciali;

- la Figura 10 mostra il grafico delle prove di stabilità della ritenzione del farmaco caricato nelle nanovesicole isolate da un mix di frutta biologica, secondo il metodo oggetto della presente invenzione;
- la Figura 11 mostra il grafico dell'impedenza delle nanovesicole estratte da succo di limoni biologici rispetto all'impedenza registrata nei liposomi.

#### Descrizione dettagliata

10 Secondo la presente invenzione le nanovesicole utilizzate dal metodo oggetto della presente invenzione, estratte da vegetali di tipo biologico, cioè senza l'utilizzo di pesticidi chimici, fertilizzanti sintetici, antibiotici e altre sostanze che sono soggette a rigorose restrizioni.

15 Le figure allegate mostrano i risultati dei test effettuati sulle nanovesicole caricate attraverso l'innovativo metodo oggetto della presente invenzione.

Il metodo per caricare molecole di varia natura in nanovesicole di origine vegetale comprende le seguenti fasi:

- le nanovesicole isolate( da  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^{12}$ ) sono state sospese in un tampone fosfato salino 1x (PBS, (Phosphate-buffered Saline) a pH 7.4, senza calcio e magnesio; il PBS è una soluzione salina acquosa che contiene cloruro di sodio, fosfato di sodio e cloruro di potassio;
- le nanovesicole risospese in PBS 1x sono state analizzate con la tecnica Nanoparticle Tracking Analysis mediante il

Nanosight per la valutazione della concentrazione e della distribuzione dimensionale;

- 5
- da  $10^6$  a  $10^{13}$  nanovesicole risospese da 400 a 1000  $\mu\text{l}$  di PBS 1x sono state trasferite in cuvette sterili da 0,4 cm per elettroporazione ed è stato aggiunto il composto chimico fluorescente da caricare (es. Arancio di Acridina) a concentrazioni da 0,1 a 100  $\mu\text{g/mL}$ ;
  - le cuvette contenenti le nanovesicole ed il composto da caricare sono state sottoposte ad elettroporazione mediante un
- 10
- elettroporatore, utilizzando treni di impulsi di seguito elencati:
    - 300 V con otto impulsi
    - 300 V con un primo impulso
  - una serie di otto impulsi da 20 V, oppure 50 V, oppure 80 V, oppure 100 V;
- 15
- le nanovesicole caricate con la molecola desiderata sono state trasferite in tubi per ultracentrifugazione e sottoposte ad ultracentrifugazione a 110.000 g per novanta minuti per eliminare il composto che non è entrato;
  - il pellet contenente le nanovesicole è stato risospeso in PBS
- 20
- (da 50 a 1000  $\mu\text{l}$ ) e il sovrantante ottenuto dall'ultracentrifugazione è stato conservato come controllo per analisi successive;
  - le nanovesicole sono risospese in PBS 1x per procedere ai test.

Vantaggiosamente i voltaggi utilizzati nel presente metodo sono stati derivati sulla base di esperienze di veicolazione di molecole all'interno di cellule, tenendo in considerazione la minore dimensione e la differente stabilita' della membrana esosomiale. Gli impulsi sono stati generati con la seguente funzione: primo  
5 impulso con funzione di destabilizzare la membrana rendendola permeabile, il treno successivo serve a facilitare il transito ionico (o molecolare) transmembranario.

Gli strumenti utilizzati per i test sono:

- lo spettrofluorimetro, per la valutazione del caricamento del composto  
10 fluorescente ottenuto in seguito ad elettroporazione. Il caricamento di Arancio di Acridina, negli esosomi è stato valutato allo spettrofluorimetro come emissione di fluorescenza a 535 nm in seguito ad una eccitazione a 485 nm. Le concentrazioni finali caricate nelle nanovesicole vegetali sono state calcolate mediante la costruzione di una curva di taratura ottenuta dalla lettura della fluorescenza  
15 emessa dal farmaco o anticorpo contestualmente allo stesso esperimento;
- il Nanosight (Nanoparticle Tracking Analysis), per la valutazione della concentrazione, della distribuzione dimensionale e dell'indice di rifrazione delle nanovesicole caricate (controllo di qualità).

Le stesse fasi del metodo sopra descritto sono stati utilizzati per caricare nei  
20 liposomi commerciali (da  $10^6$  a  $10^{13}$  liposomi) il composto (ad es. Arancio di Acridina,) a concentrazioni da 0 a 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , per poter essere utilizzati come controllo del caricamento e dell'effetto sulle cellule target.

I test effettuati sulle nanovesicole trattate secondo il metodo sono mostrati nelle Figure allegate 1-11.

In particolare, la Figura 1 mostra le prove di caricamento mediante il metodo descritto nella presente invenzione di Arancio di Acridina (AO) a concentrazioni crescenti in un numero crescente di nanovesicole isolate da un mix di frutta biologica. Quantità crescenti di nanovesicole (da  $10^{10}$  a  $2 \times 10^{11}$ ) isolate da un mix di frutta biologica (vedi protocollo sperimentale) sono state caricate, mediante lo stesso impulso di elettroporazione (300 V con 1° impulso bifasico seguito da una serie di impulsi, da 20V a 100 V), con concentrazioni crescenti di AO (da 1 a 100  $\mu\text{g/mL}$ ). I risultati rappresentati in Figura 1 mostrano come le nanovesicole vegetali riescano a caricare una concentrazione di AO progressivamente maggiore all'aumentare della dose di AO e del numero di nanovesicole fino al raggiungimento di una saturazione.

La Figura 2 mostra il caricamento secondo il metodo descritto nella presente invenzione, di Arancio di Acridina (AO) in nanovesicole isolate da un mix di frutta biologica: confronto con i liposomi commerciali. Lo stesso numero di nanovesicole (da  $10^8$  a  $10^{11}$ ) isolate da un mix di frutta biologica (vedi protocollo sperimentale) e di liposomi commerciali è stato caricato, mediante lo stesso impulso di elettroporazione (300 V con 1° impulso bifasico seguito da una serie di impulsi, da 20V a 100 V), con una concentrazione iniziale di 100  $\mu\text{g/mL}$  di AO. I risultati rappresentati in figura 2 mostrano come le nanovesicole vegetali riescano a caricare una concentrazione di AO significativamente superiore (> 5 volte) rispetto ai liposomi.

La figura 3 mostra il caricamento secondo il metodo descritto nella presente invenzione, di Vinblastina (VBL) in nanovesicole isolate da un mix di frutta biologica e il confronto con i liposomi commerciali. Lo stesso numero di

nanovesicole (da  $10^6$  a  $10^{11}$ ) isolate da un mix di frutta biologica e di liposomi commerciali è stato caricato, mediante lo stesso impulso di elettroporazione (300 V con 1° impulso bifasico seguito da una serie di impulsi, da 20V a 100 V), con una concentrazione iniziale di 10  $\mu\text{g/mL}$  di VBL. I risultati rappresentati in figura 5 mostrano come le nanovesicole vegetali riescano a caricare una concentrazione di AO significativamente superiore (21 volte) rispetto ai liposomi.

La figura 4 mostra il caricamento secondo il metodo descritto nella presente invenzione, di un anticorpo legato ad una sonda (AlexaFluor 488) in nanovesicole isolate da un mix di frutta biologica e il confronto con i liposomi commerciali. Lo stesso numero di nanovesicole (da  $10^6$  a  $10^{11}$ ) isolate da un mix di frutta biologica e di liposomi commerciali è stato caricato, mediante lo stesso impulso di elettroporazione (300 V con 1° impulso bifasico seguito da una serie di impulsi, da 20V a 100 V), con una concentrazione iniziale di 50  $\mu\text{g/mL}$  di un Anticorpo legato ad una sonda fluorescente (AlexaFluor 488). I risultati rappresentati in figura 15 mostrano come le nanovesicole vegetali riescano a caricare una concentrazione di Anticorpo significativamente superiore (3 volte) rispetto ai liposomi.

Vantaggiosamente, il caricamento di Arancio di Acridina, Vinblastina e di anticorpi negli esosomi è stato valutato allo spettrofluorimetro come emissione di fluorescenza a 535 nm in seguito ad una eccitazione a 485 nm. Le concentrazioni finali caricate nelle nanovesicole vegetali sono state calcolate mediante la costruzione di una curva di taratura ottenuta dalla lettura della fluorescenza emessa dal farmaco o anticorpo contestualmente allo stesso esperimento.

La figura 5 mostra l'analisi al Nanosight di Nanovesicole isolate da un mix di frutta biologica secondo il metodo oggetto della presente invenzione, per il

caricamento di AO. Lo stesso numero di nanovesicole (da  $10^6$  a  $10^{11}$ ) isolate da un mix di frutta biologica e di liposomi commerciali è stato caricato, mediante lo stesso impulso di elettroporazione (300 V con 1° impulso bifasico seguito da una serie di impulsi, da 20V a 100 V), con una concentrazione di 82 ng/mL e 140  
5 ng/mL di AO. Le nanovesicole sono state controllate al Nanosight per la distribuzione dimensionale, la concentrazione e l'indice di rifrazione. Il caricamento con AO ha indotto una distribuzione a doppio picco delle nanovesicole vegetali (B1 e C1), a differenza delle nanovesicole di controllo (A1) la cui distribuzione è più uniforme. Gli indici di rifrazione delle nanovesicole caricate con il farmaco (B2  
10 e C2) presentano una leggera diminuzione nell'intensità rispetto alle nanovesicole di controllo (A2).

La Figura 6 mostra il caricamento, secondo il metodo oggetto della presente invenzione, di AO in nanovesicole isolate da un mix di frutta biologica induce una diminuzione dell'intensità dell'indice di rifrazione. In (A) e in (B) vengono  
15 rappresentati gli indici di rifrazione tra nanovesicole di controllo e nanovesicole caricate con una concentrazione di AO pari rispettivamente a a 82 ng/mL (A) e 140 ng/mL (B). L'intensità delle nanovesicole caricate con il farmaco diminuisce rispetto al loro controllo.

La Figura 7 mostra l'effetto del trattamento di Arancio di Acridina caricato in  
20 nanovesicole estratte da un mix di frutta biologica su cellule di melanoma umano e il confronto con i liposomi commerciali. Lo stesso numero di nanovesicole (da  $10^6$  a  $10^{11}$ ) isolate da un mix di frutta biologica e di liposomi commerciali è stato caricato, mediante lo stesso impulso di elettroporazione (300 V con primo impulso bifasico seguito da una serie di impulsi, da 20V a 100 V), con AO [200 ng/mL]. Le

cellule di melanoma sono state trattate e l'up-take di AO è stata valutata mediante microscopio invertito a fluorescenza. I risultati rappresentati in figura mostrano come le nanovesicole vegetali riescano a trasferire una concentrazione di AO significativamente superiore (maggiore fluorescenza) rispetto ai liposomi e all'arancio di acridina da sola.

La Figura 8 mostra il grafico della valutazione della citotossicità sulla linea cellulare leucemica CEM e sulla linea cellulare leucemica farmacoresistenti CEM/VBL100 da parte di nanovesicole isolate da un mix di frutta biologica e caricate mediante elettroporazione con VBL. Concentrazioni crescenti di VBL da sola e caricata nelle nanovesicole vegetali sono state utilizzate per valutare l'effetto citotossico su cellule leucemiche CEM e CEM/VBL100 mediante Trypan blue assay, rispettivamente dopo 48 e 24 h di incubazione. A) L'effetto citotossico su cellule CEM comincia ad essere evidente alla concentrazione di 1000 ng/mL e risulta essere potenziato nella VBL caricata nelle nanovesicole vegetali (superiore di 2,6 volte rispetto alla VBL da sola). B) L'effetto citotossico su cellule CEM/VBL100, resistenti al farmaco, comincia ad essere evidente (18,1 % di mortalità) a basse concentrazioni di VBL (0,1 ng/mL) quando il farmaco è caricato nelle nanovesicole vegetali, superiore di 26 volte rispetto alla VBL 0,1 ng/mL da sola, che induce una mortalità pressoché assente (0,7 %).

La Figura 9 mostra la valutazione della citotossicità sulla linea cellulare di melanoma umano da parte di nanovesicole isolate da un mix di frutta biologica e caricate mediante il metodo oggetto della presente invenzione con AO e il confronto con l'arancio di acridina da solo e con liposomi commerciali. Cellule di melanoma umano coltivate in terreno di coltura a diversa forza ionica sono state

trattate con una concentrazione di AO pari a 0,1 µg/mL da solo e caricato nello stesso numero di nanovesicole isolate da frutta e di liposomi. L'arancio di acridina non è stata attivata con luce blu. L'effetto citotossico è risultato evidente (55,7 %) soprattutto su cellule coltivate in terreno non tamponato quando AO è caricato  
5 nelle nanovesicole da frutta, mentre alcun effetto citotossico è stato rilevato alla stessa concentrazione di AO (0,1 µg/mL) quando il farmaco viene usato da solo o in combinazione dei liposomi. La percentuale di AO trasferita alle cellule tumorali è risultata notevolmente superiore (59%) quando l'AO è caricata nelle nanovesicole da frutta e le cellule sono coltivate in condizioni di terreno non tamponato. La  
10 quantità di AO in grado di entrare nelle cellule di melanoma è notevolmente ridotta quando il farmaco è stato usato da solo o in combinazione con i liposomi.

La figura 10 mostra le prove di stabilità della ritenzione del farmaco caricato mediante il metodo oggetto della presente invenzione nelle nanovesicole isolate da un mix di frutta biologica. Prove di stabilità del farmaco (AO e VBL) e  
15 dell'anticorpo (AlexaFluor488) caricati nelle nanovesicole vegetali sono state condotte dopo una settimana e dopo un mese dal caricamento mediante elettroporazione. I risultati ottenuti mediante lettura della fluorescenza allo spettrofluorimetro hanno indicato che le nanovesicole vegetali sono perfettamente in grado di ritenere il farmaco senza che vi sia alcun tipo di  
20 dispersione nel mezzo in cui le nanovesicole sono disperse.

La figura 11 mostra il grafico dell'impedenza delle nanovesicole estratte da succo di limoni biologici, che si dimostra notevolmente inferiore all'impedenza registrata nei liposomi. L'impedenza è stata misurata in seguito ad

elettroporazione (300 V con 1° impulso bifasico seguito da una serie di impulsi, da 20V a 100 V) dello stesso numero (da 106 a 1011) di nanovesicole e di liposomi.

Vantaggiosamente è stata registrata l'impedenza ( $\Omega$ ) ottenuta per mezzo del metodo di caricamento delle nanovesicole per Arancio di Acridina (AO).

- 5 Vantaggiosamente sono stati confrontati differenti tamponi a diversa forza ionica per valutare il caricamento per mezzo del metodo oggetto della presente invenzione dei composti, come ad es. Arancio di Acridina, in nanovesicole purificate dal succo estratto da frutta biologica.

- 10 Vantaggiosamente sono state eseguite prove di stabilità della ritenzione del farmaco caricato mediante elettroporazione all'interno delle nanovesicole di origine vegetale, lasciate in PBS 1x Tali prove sono state condotte fino ad un mese dall'elettroporazione mantenendo le nanovesicole caricate a temperatura ambiente e a + 4C°. Le prove di stabilità sono state condotte allo spettrofluorimetro nelle stesse condizioni sopra descritte.

- 15 Vantaggiosamente, le nanovesicole caricate con il composto desiderato sono state utilizzate per il trattamento *in vitro* di cellule tumorali (es. Mel 501, CEM, CEM/VBL-100). L'effetto citotossico del composto caricato nelle nanovesicole è stato valutato dopo un periodo di incubazione da 1 h a 168 h al microscopio ottico mediante trypan blue assay. Il trasferimento del composto fluorescente alle cellule  
20 è stato valutato allo spettrofluorimetro (nelle condizioni descritte in precedenza) in seguito alla risospensione delle cellule in PBS (da 50 a 1000  $\mu$ L). Contestualmente le cellule sono state trattate anche con il composto da solo e caricato nei liposomi, permettendo di confrontare l'effetto citotossico e di trasferimento del composto quando questo è caricato nelle nanovesicole.

Anche se almeno una realizzazione esemplificativa è stata presentata nella descrizione sommaria ed in quella dettagliata, deve essere compreso che esiste un grande numero di varianti rientranti nell'ambito di protezione dell'invenzione. Inoltre, deve essere inteso che la realizzazione o le realizzazioni presentate sono

5 solamente esempi che non intendono limitare in alcun modo l'ambito di tutela dell'invenzione o la sua applicazione o le sue configurazioni. Piuttosto, la descrizione sommaria e quella dettagliata forniscono al tecnico esperto del settore una conveniente guida per implementare almeno una realizzazione esemplificativa, essendo ben chiaro che numerose varianti possono essere

10 apportate nella funzione e nell'assemblaggio degli elementi quivi descritti, senza fuoriuscire dall'ambito di protezione dell'invenzione come stabilito dalle rivendicazioni allegate e dai loro equivalenti tecnico-legali.

## RIVENDICAZIONI

1. Metodo per caricare molecole di varia natura all'interno di nanovesicole di origine vegetale, comprende le seguenti fasi:
  - a. sospendere le nanovesicole isolate in un tampone fosfato salino;
  - 5 b. analizzare le nanovesicole sospese con tecnica denominata "Nanoparticle Tracking Analysis" mediante un "Nanosight" per la valutazione della concentrazione e della distribuzione dimensionale;
  - c. risospendere le nanovesicole in un tampone fosfato salino;
  - d. trasferire le nanovesicole in cuvette sterili;
  - 10 e. aggiungere il composto chimico fluorescente da caricare;
  - f. sottoporre le nanovesicole contenute in cuvette contenenti ad elettroporazione mediante un elettroporatore, utilizzando treni di impulsi;
  - g. trasferire le nanovesicole caricate con la molecola desiderata in tubi  
15 per ultracentrifugazione;
  - h. risospendere il pellet contenente le nanovesicole in un tampone fosfato salino e conservare il sovrantante ottenuto dall'ultracentrifugazione come controllo per analisi successive;
  - i. risospendere le nanovesicole in un tampone fosfato salino e  
20 procedere ai test.
2. Metodo secondo la rivendicazione 1, laddove la fase f. di elettroporazione delle nanovesicole è caratterizzata dai seguenti treni di impulsi;
  - 300 V con otto impulsi,
  - 300 V con un primo impulso,

- una serie di otto impulsi da 20 V, oppure 50 V, oppure 80 V,  
oppure 100 V.

3. Metodo secondo la rivendicazione 1 o 2, laddove la fase d. di trasferimento delle nanovesicole è caratterizzata da una quantità di nanovesicole compresa tra  $10^6$  a  $10^{13}$ .  
5
4. Metodo secondo una delle rivendicazioni precedenti, laddove la fase e. di aggiunta del composto chimico da caricare è caratterizzato da una concentrazione compresa tra 0,1 a 100 µg/ml.
5. Metodo secondo la rivendicazione 4 laddove i composti chimici da realizzare sono vitamine, sostanze per uso cosmetico, farmaci e agenti per uso medico, veterinario, farmacologico ed alimentare.  
10
6. Metodo secondo una delle rivendicazioni precedenti, laddove le nanovesicole sono ottenute da almeno uno dei vegetali biologici tra Citrus paradisi, Citrus Lemon (L.), Citrus Reticulata, Citrus Bergamia, Actinidia Chinensis, Mangifera Indica, Carica Papaya Linn, Citrus Sinensis, Malus domestica.  
15

Prove di caricamento di AO con un numero crescente di  
NANOVESICOLE isolate da frutta biologica

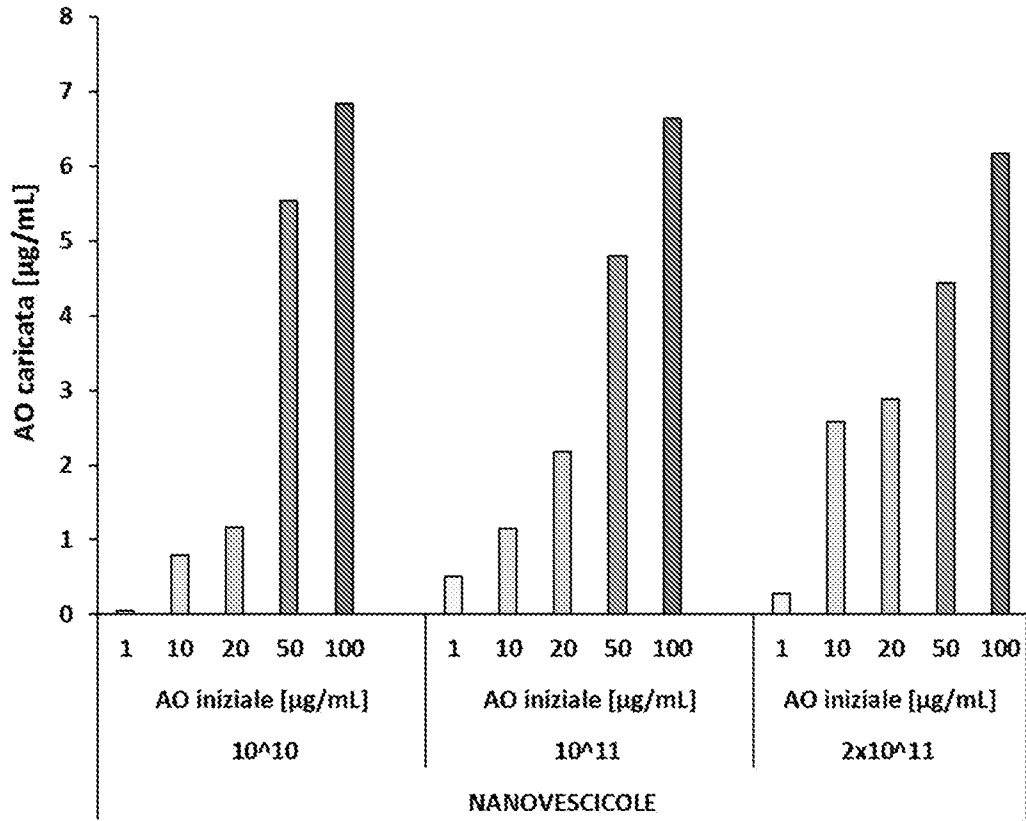


Fig.1

NANOVESICOLE DA FRUTTA vs LIPOSOMI:  
CARICAMENTO AO

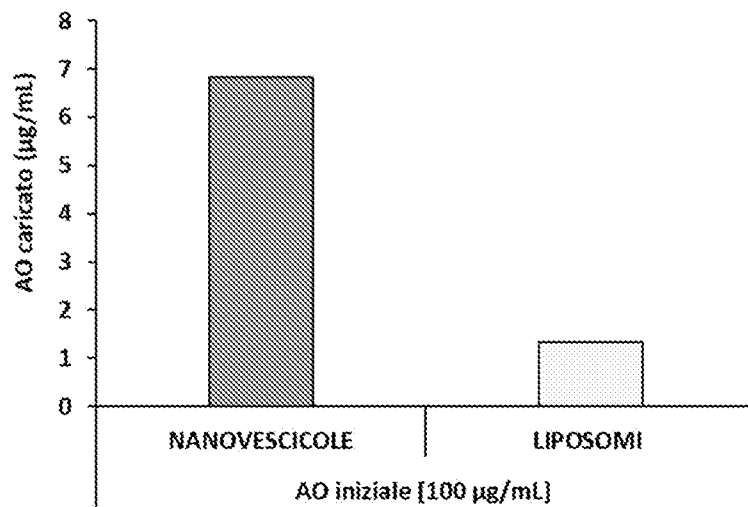


Fig.2

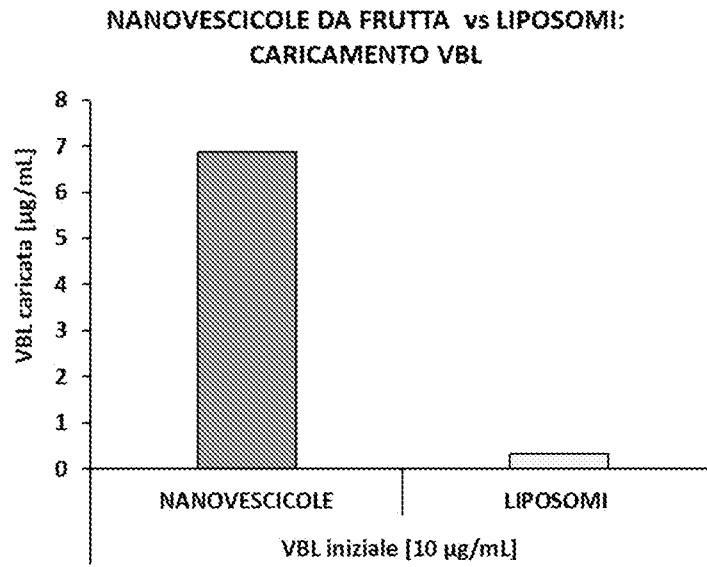


Fig.3

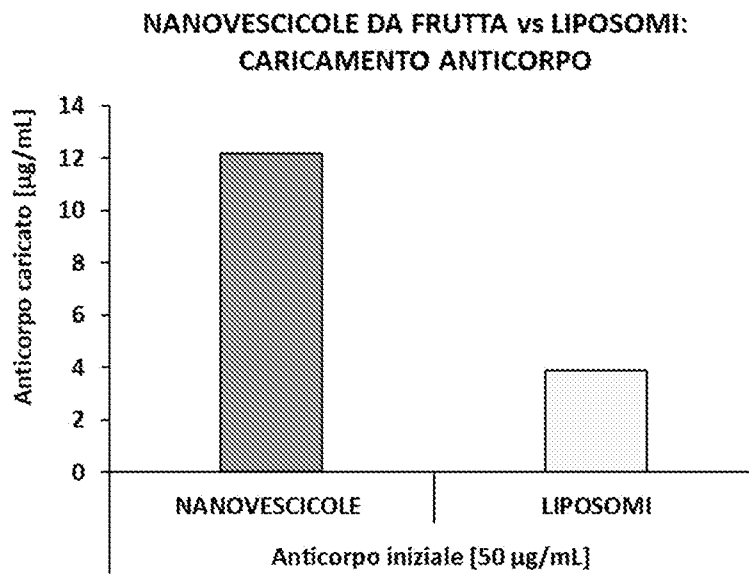


Fig.4

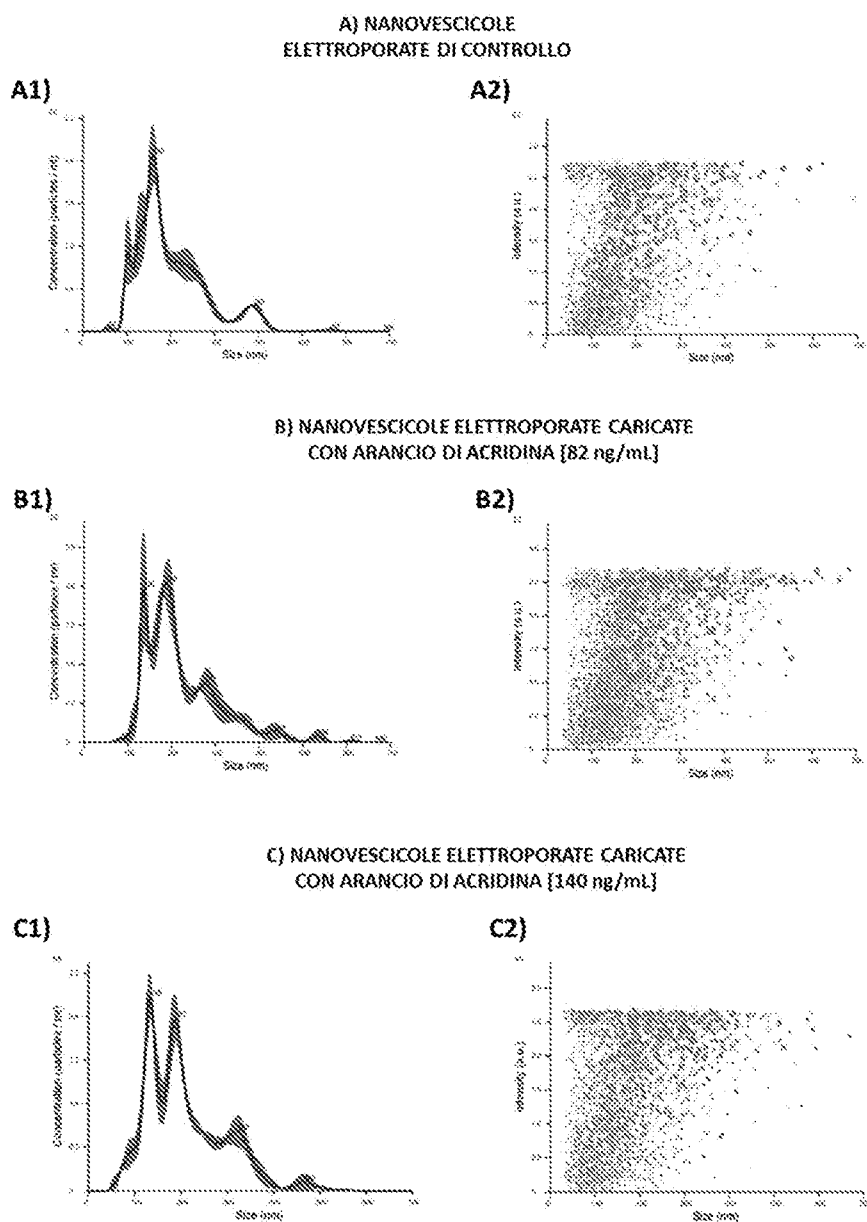


Fig.5

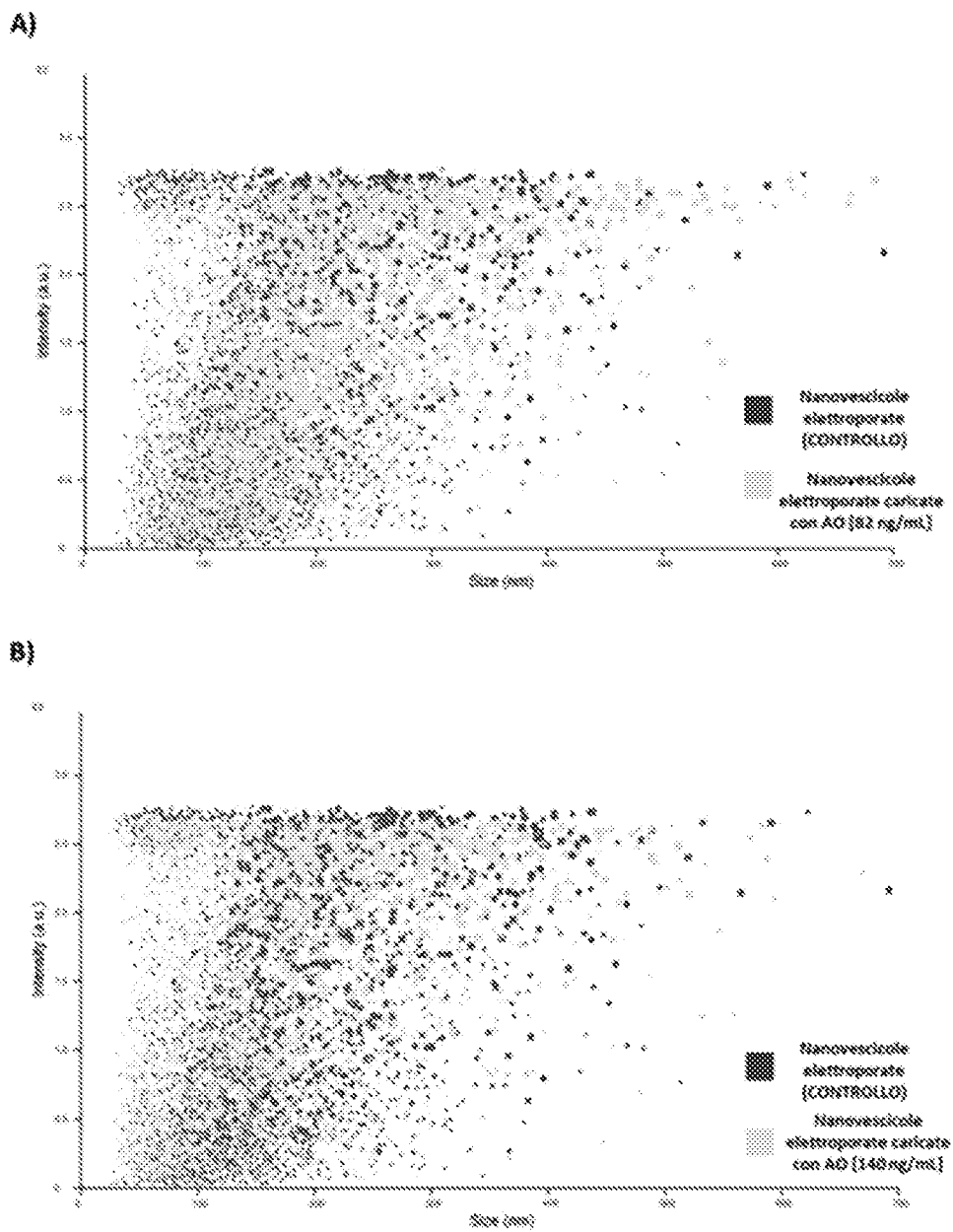
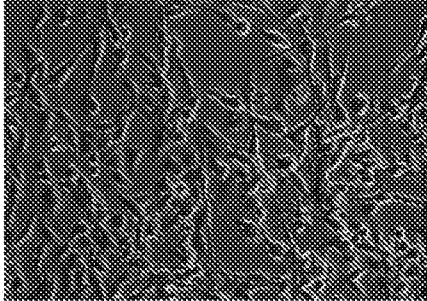
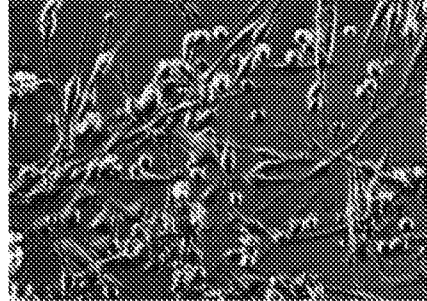


Fig.6

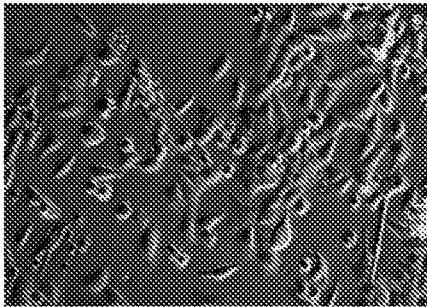
**A) Melanoma non trattato**



**C) Melanoma trattato con Arancio di acridina caricato in Liposomi**



**B) Melanoma trattato con Arancio di acridina**



**D) Melanoma trattato con Arancio di acridina caricato in Nanovesicole isolate da frutta biologica**

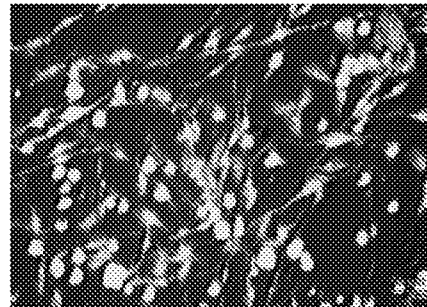


Fig.7

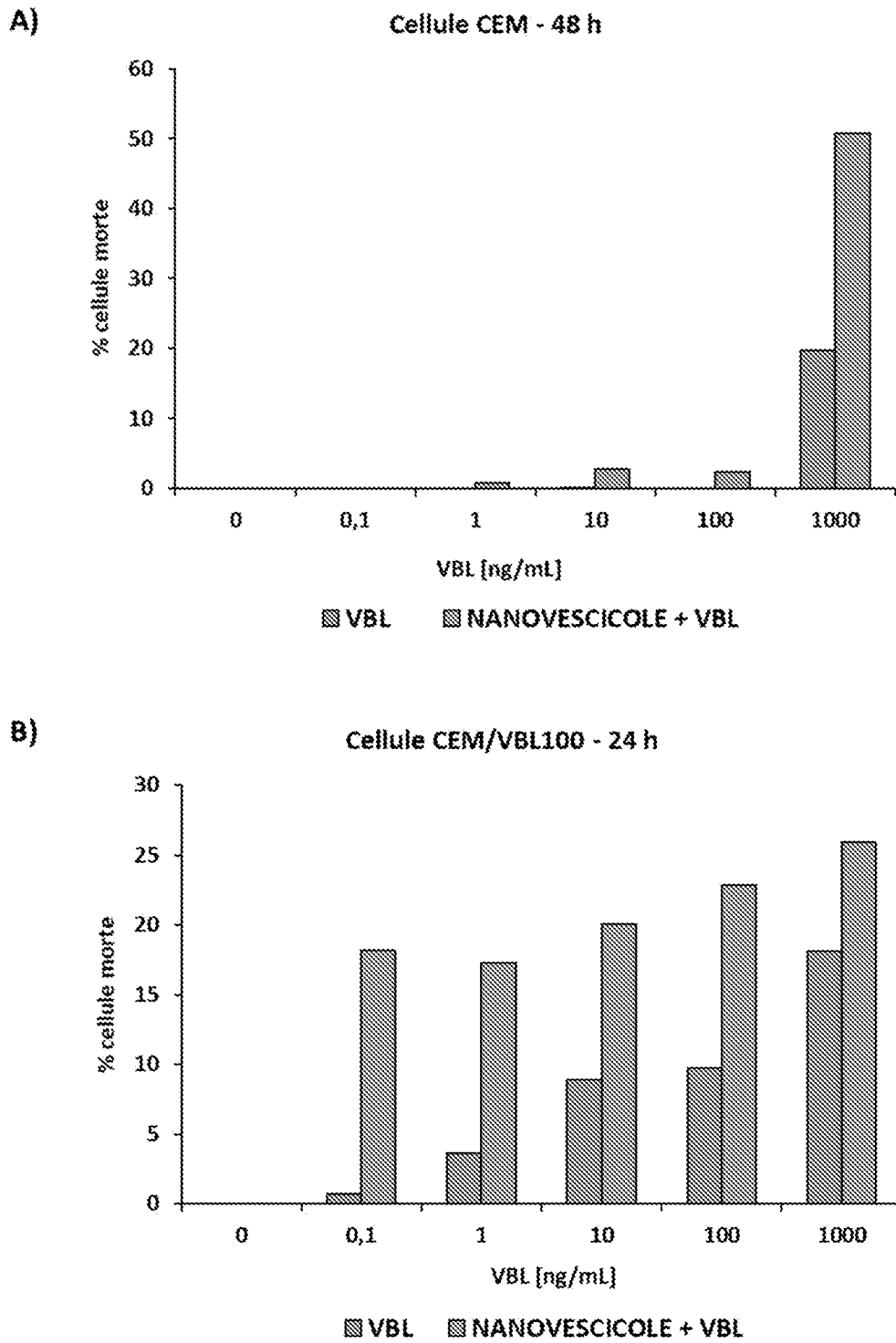


Fig.8

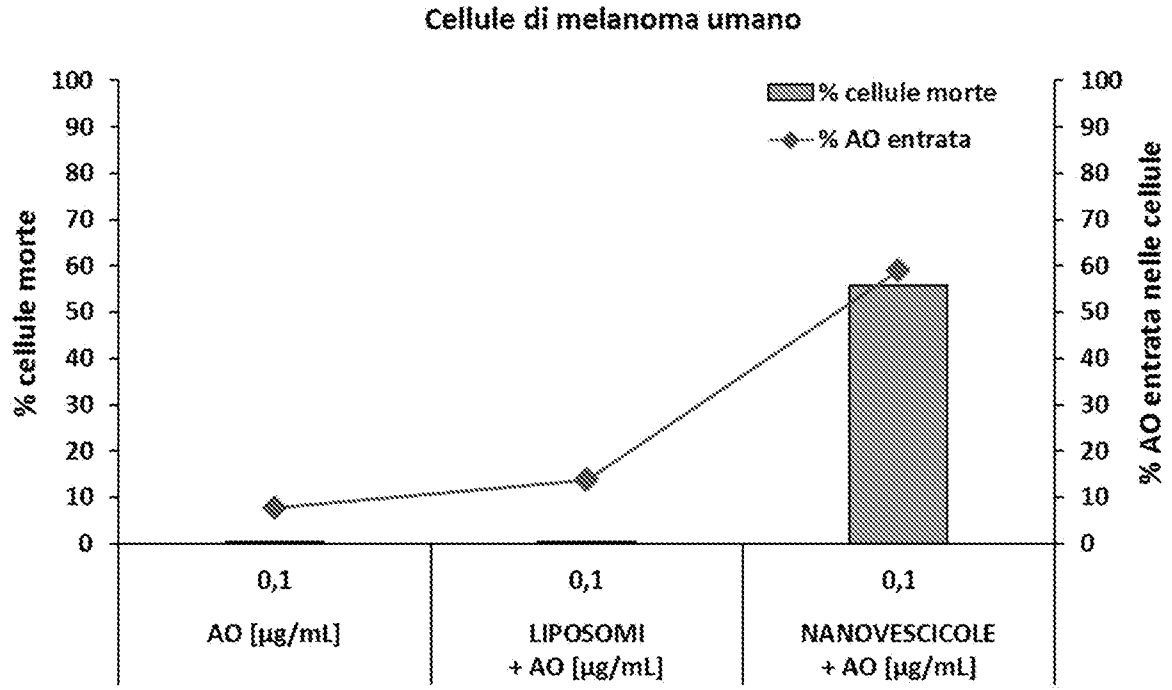


Fig. 9

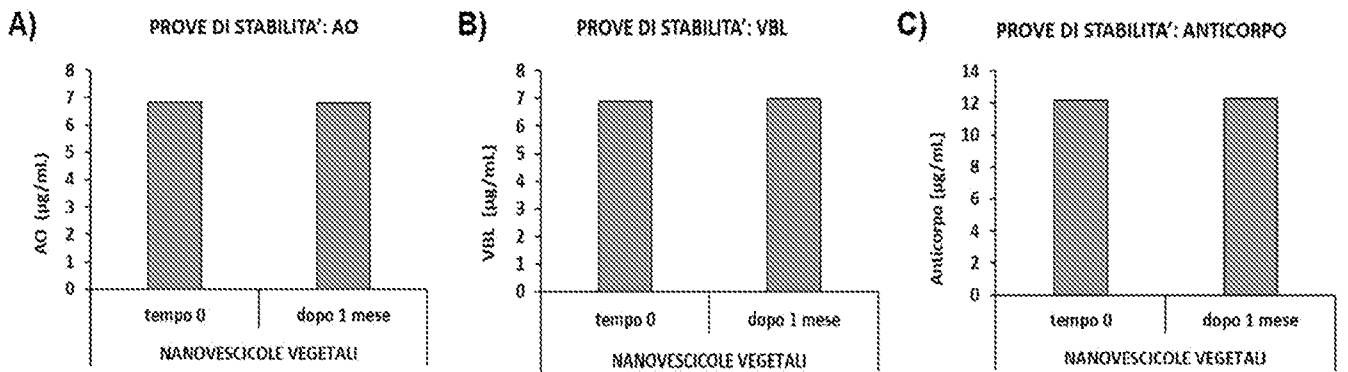


Fig.10

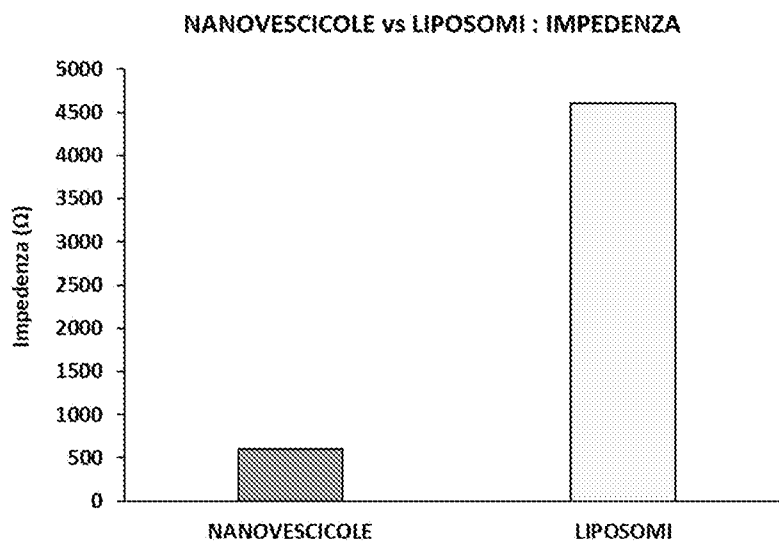


Fig.11