



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

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102019000007222
Data Deposito	24/05/2019
Data Pubblicazione	24/11/2020

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	01	N	33	543

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	01	N	33	84

Titolo

COMPOSIZIONE DI LIPOSOMI E METODO DI DOSAGGIO BASATO SULL'USO DEGLI STESSI

DESCRIZIONE

del brevetto per invenzione industriale dal titolo:
"COMPOSIZIONE DI LIPOSOMI E METODO DI DOSAGGIO BASATO
SULL'USO DEGLI STESSI"

di UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO

di nazionalità italiana

con sede: VIA VERDI, 8 - 10124 TORINO (TO)

Inventori: AIME Silvio, DELLI CASTELLI Daniela, FERRAUTO
Giuseppe, TRIPEPI Martina

* * *

La presente invenzione è relativa ad una composizione di liposomi e al loro uso in un metodo di dosaggio, preferibilmente un metodo diagnostico *in vitro*, ad esempio un metodo immunometrico.

Negli ultimi 50 anni sono stati sviluppati numerosi e sempre più raffinati metodi per la rilevazione di marker diagnostici nei fluidi biologici *in vitro*. Queste analisi si basano prevalentemente sul riconoscimento antigene/anticorpo (immunodosaggio). Fra questi metodi, quelli in cui la molecola bersaglio aderisce o lega in modo specifico un supporto solido, sembrano avere la maggiore efficienza. Le analisi immuno-enzimatiche per la rilevazione di analiti di interesse diagnostico sono state oggetto di vari studi e brevetti.^{1,2} Uno dei metodi più utilizzati è il dosaggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) che consiste nel

rilevare variazioni cromatiche indotte dal riconoscimento specifico tra antigene e anticorpo. Ci sono quattro tipi di test ELISA: i) diretto, ii) indiretto, iii) sandwich e iv) competitivo. Tutti questi metodi richiedono l'uso di uno spettrofotometro per quantificare l'antigene (sensibilità pM).³ Poiché molti biomarker rilevanti in termini diagnostici sono presenti nei fluidi biologici a bassa concentrazione, c'è la necessità di sviluppare saggi diagnostici innovativi dotati di maggiore sensibilità. Inoltre, è necessario ridurre il più possibile i costi di analisi.

Alcune varianti del metodo ELISA riportati in letteratura sono i saggi immuno-enzimatici di tipo magnetico e radio, i quali risultano avere una maggiore sensibilità ma richiedono l'utilizzo di una strumentazione più costosa rispetto ad uno spettrofotometro e di personale altamente qualificato.^{4,5}

Un metodo ampiamente investigato negli ultimi decenni per amplificare la sensibilità dei saggi *in vitro* è l'uso di nanosistemi tra cui i liposomi, caratterizzati da una ampia cavità acquosa facilmente adatta a contenere ingenti quantità di piccole molecole.⁶ Una strategia per l'esecuzione di test immunologici basati su liposomi consiste nel sostituire l'enzima in grado di generare la variazione spettrofotometrica con una molecola marker opportunamente incapsulata nei liposomi stessi. La molecola marker può

essere attiva dal punto di vista colorimetrico,⁷ fluorimetrico,⁸ chemiluminometrico⁹ o elettrochimico,¹⁰ così da poter dar vita a diverse tipologie di saggio immunologico basato su liposomi. La scelta dipende spesso dalla strumentazione per la rilevazione disponibile in laboratorio.

Ci sono molte strategie per modificare un antigene o un anticorpo per i saggi immunologici o per introdurlo in una membrana liposomiale.¹¹⁻¹⁵ Queste procedure facilmente riproducibili possono essere applicate a una vasta gamma di antigeni e anticorpi.¹⁶

Liang et al²⁰ hanno sviluppato un metodo di rilevamento e dosaggio dell'enolasi neurone-specifica mediante l'uso di liposomi caricati con glucosio ossidasi. In particolare, una volta che il liposoma lega l'enolasi neurone-specifica mediante l'uso di anticorpi selettivi, alla soluzione di analisi viene aggiunto glucosio. In seguito all'aggiunta di un tensioattivo, si causa la rottura del liposoma e il rilascio della glucosio ossidasi. L'ossidazione del glucosio da parte del suo enzima genera una variazione del pH della soluzione che viene rilevato e quantificato mediante un pHmetro. Lo svantaggio principale di questo metodo è quello di richiedere un'ulteriore fase di processo nel protocollo di analisi con le relative criticità e variabilità (l'aggiunta del substrato (glucosio) alla soluzione di analisi).

Inoltre, i costi di preparazione di un liposoma contenente un enzima sono elevati. L'eventuale stoccaggio di un enzima richiede attenzioni particolari.

E' tuttavia sentita nell'arte l'esigenza di nuove composizioni di liposomi privi degli svantaggi dei sistemi noti.

Lo scopo della presente invenzione è pertanto quello di fornire liposomi che siano facili da realizzare, economici, che consentano il rilevamento e dosaggio di un analita con una buona sensibilità e mediante l'uso di semplice strumentazione presente in qualsiasi laboratorio chimico.

Tale scopo è raggiunto mediante una composizione per l'uso secondo la rivendicazione 1 e un metodo di dosaggio di un analita secondo la rivendicazione 6.

In particolare, viene fornita una composizione di liposomi contenenti una soluzione acquosa avente un primo pH e presentanti sulla superficie almeno un ligando specifico per un analita di interesse contenuto in una soluzione avente un secondo pH, detto primo pH essendo differente da detto secondo pH, per l'uso in un metodo di dosaggio.

La soluzione acquosa contenuta nei liposomi può essere costituita da una soluzione acquosa di una base, da una soluzione acquosa di un acido o da una soluzione tampone.

Preferibilmente, la soluzione acquosa di una base è una soluzione acquosa in cui la base è scelta nel gruppo

costituito da idrossido di sodio, idrossido di litio, idrossido di potassio e ammoniaca.

Preferibilmente, la soluzione di un acido è una soluzione acquosa in cui l'acido è scelto nel gruppo costituito da acido cloridrico, acido solforico, acido nitrico, acido iodidrico, acido perclorico, acido bromidrico, acido fosforico e acido acetico.

Preferibilmente, la soluzione tampone è una soluzione scelta nel gruppo costituito da tampone bicarbonato, tampone fosfato, tampone acetato, tampone carbonato e tampone citrato.

Vantaggiosamente, i liposomi secondo l'invenzione non contengono alcuna molecola attiva, come ad esempio enzimi, e non richiedono l'uso di ulteriori componenti. Sono quindi sistemi molto semplici che consentono il rilevamento dell'analita in modo accurato e sensibile, senza richiedere l'uso di strumentazioni sofisticate.

I liposomi dell'invenzione possono essere usati in un metodo di dosaggio quali e quantitativo, anche a fini diagnostici.

In particolare, i liposomi dell'invenzione possono essere utilizzati in immunodosaggi e test *in vitro* per la determinazione di specifici analiti utili come marcatori per la diagnosi precoce e il monitoraggio di stati patologici come tumori, malattie cardiovascolari, malattie infettive,

malattie metaboliche. Tali marcatori possono essere presenti in bassa concentrazione in fluidi biologici come sangue intero, plasma, siero, secrezioni nasali, linfa, espettorato, saliva, urina, sperma, fluido vaginale, sudore, essudato transdermico, liquido sinoviale, liquido cerebrospinale, liquido amniotico, umore vitreo, bile, succo gastrico, colostro e in tutti gli altri fluidi biologici.

Preferibilmente la soluzione contenente l'analita è una soluzione con pH neutro.

I liposomi dell'invenzione possono essere selezionati nel gruppo costituito da:

- Liposomi unilamellari piccoli (small unilamellar vesicles, SUV) aventi un raggio idrodinamico compreso tra 40 nm e 100 nm;
- Liposomi unilamellari grandi (large unilamellar vesicles, LUV) aventi un raggio idrodinamico compreso tra 100 nm e 500 nm;
- Liposomi unilamellari giganti (giant unilamellar vesicles, GUV) aventi un raggio idrodinamico compreso tra 500 nm e 20 μ m.

Inoltre, i liposomi dell'invenzione possono avere natura lipidica o polimerica (polimersomi o dendrimerosomi).

Viene inoltre fornito un metodo per il dosaggio di un analita di interesse in una soluzione comprendente le fasi di:

a) mettere a disposizione una soluzione di detto analita di interesse legato ad un supporto solido, detta soluzione avendo un primo pH;

b) porre a contatto con detta soluzione di analita una composizione di liposomi contenenti una soluzione acquosa avente un secondo pH diverso da detto primo pH e presentanti sulla superficie almeno un ligando specifico per detto analita di interesse, in modo da creare un legame tra detto analita e detto ligando;

c) applicare uno stimolo esterno in modo da causare il rilascio della soluzione acquosa contenuta in detti liposomi nella soluzione contenente detto analita in modo da ottenere un terzo pH;

d) misurare detto terzo pH;

e) calcolare il dosaggio di detto analita.

L'analita e il ligando possono essere scelti nel gruppo costituito da antigene/anticorpo, immunoglobulina/proteina A, biotina/avidina, ormone/recettore, sequenze complementari di acidi nucleici, aptamero/molecola target. Tuttavia, qualsiasi coppia analita/ligando può essere utilizzata nel presente metodo.

Il legame tra l'analita e il ligando può essere un legame di tipo diretto o indiretto, ovvero mediato attraverso ulteriori ligandi. Ad esempio i liposomi dell'invenzione possono essere utilizzati in saggi del tipo ELISA di tipo

diretto, indiretto, a sandwich o competitivi.

Vantaggiosamente il metodo dell'invenzione si presta anche ad essere utilizzato in test diagnostici domestici usando degli indicatori per la visualizzazione delle variazioni di pH anche ad occhio nudo.

La preparazione dei liposomi può essere realizzata con il metodo di idratazione di film sottile in presenza della soluzione acida o basica o tampone (300 mOsm/L). La purificazione da $\text{OH}^-/\text{H}_3\text{O}^+$ non internalizzati è effettuata tramite:

- i) neutralizzazione (in caso di soluzioni di basi o acidi forti; viene aggiunto un equivalente di HCl o NaOH rispettivamente) o
- ii) dialisi o ultrafiltrazione (in caso di soluzioni tampone).

La sospensione dei liposomi purificati è quindi neutra in presenza di liposomi integri. I liposomi sono indotti a rilasciare il loro contenuto per mezzo di uno stimolo esterno, preferibilmente selezionato nel gruppo costituito da ultrasuoni, calore, presenza di tensioattivi, stress osmotico e cicli di congelamento-scongelo.

Il rilascio del contenuto liposomiale induce una variazione del valore di pH misurabile tramite l'uso di un pH-metro o visualizzabile attraverso il cambiamento di colore indotto da un indicatore di pH

colorimetrico/fluorescente o, più in generale, rilevabile da qualsiasi test che sia sensibile al pH.

La presente invenzione verrà ora descritta in modo dettagliato con riferimento alle figure dei disegni annessi, che riportano esempi realizzativi puramente illustrativi e non limitativi, in cui:

- la Figura 1 illustra la curva di calibrazione che correla la quantità di liposomi dell'invenzione che rilasciano OH^- e la variazione del pH.

- la Figura 2 illustra la curva di calibrazione che correla la quantità di liposomi dell'invenzione che rilasciano OH^- e la variazione del pH per liposomi dell'invenzione con diametro medio di 1 μm e contenenti 100 mM di NaOH (GUVs) e liposomi dell'invenzione con diametro medio di 100 nm e contenenti 100 mM di NaOH (LUVs);

- la Figura 3 illustra la curva di calibrazione che correla la quantità di liposomi dell'invenzione che contengono una soluzione tampone di bicarbonato e la variazione del pH;

- la Figura 4 illustra la curva di calibrazione che correla la quantità di liposomi dell'invenzione che contengono una soluzione tampone di bicarbonato e la variazione del pH per liposomi dell'invenzione con diametro medio di 1 μm e contenenti 150 mM di NaOH (cerchi) e confrontato con liposomi aventi un diametro medio di 100 nm

e contenenti 150 mM di NaHCO_3 (quadrati);

- la Figura 5 illustra una prima forma di realizzazione del metodo dell'invenzione;

- la Figura 6 illustra una seconda forma di realizzazione del metodo dell'invenzione;

- la Figura 7 illustra una terza forma di realizzazione del metodo dell'invenzione;

- la Figura 8 illustra i valori di pH misurati per la sospensione di liposomi dell'esempio 1A;

- la Figura 9 illustra i valori di pH misurati per la sospensione di liposomi dell'esempio 1B;

- la Figura 10 illustra i valori di pH misurati per la sospensione di liposomi dell'esempio 1C;

- la Figura 11 illustra i valori di pH misurati nell'esempio 3A.

In figura 1 è riportata la correlazione tra la quantità dei liposomi dell'invenzione che rilasciano il loro contenuto e il conseguente aumento di pH in una soluzione neutra calcolato per una preparazione di liposomi con un diametro medio di 150 nm e contenenti 100 mM o 50 mM o 10 mM o 1 mM di NaOH.

Le curve sono state ottenute considerando che il numero di liposomi in 1 L di soluzione che rilasciano il loro contenuto è correlato alla concentrazione di OH^- secondo la seguente relazione (1):

$$\begin{aligned}
[OH^-]_{rilasciato} &= N^\circ \text{ liposomi} \cdot (\text{mol di base forte})_{\text{nel singolo liposoma}} = \\
&= N^\circ \text{ liposomi} \cdot [base forte]_{\text{nel singolo liposoma}} \cdot V_{\text{interno del liposoma}}
\end{aligned}
\tag{1}$$

Il numero di liposomi può essere convertito in moli semplicemente dividendo per il numero di Avogadro (NA) e poiché la precedente relazione (1) si riferisce a 1 L di soluzione, il valore in moli, corrisponde al valore di concentrazione molare (relazione 2).

$$(N^\circ \text{ liposomi}/NA)/1 \text{ L} = [\text{Liposomi}]$$

(2)

Nel presente metodo, il pH è misurato prima e dopo aver indotto il rilascio del contenuto dei liposomi. Il pH della soluzione di analita è neutro fintanto che il composto basico è intrappolato all'interno dei liposomi.

Poiché:

$$[H_3O^+] = \frac{K_w}{[OH^-]_{\text{equilibrio}}}$$

dove K_w è la costante di equilibrio dell'acqua e $[OH^-]_{\text{equilibrio}}$ è la concentrazione di OH^- all'equilibrio, una volta noto il pH è possibile calcolare $[OH^-]_{\text{equilibrio}}$ e da questo valore, tramite la seguente equazione (3), è possibile ottenere $[OH^-]_{\text{rilasciato}}$:

$$[OH^-]_{\text{rilasciato}} = \frac{([OH^-]_{\text{equilibrio}})^2 - K_w}{[OH^-]_{\text{equilibrio}}}$$

(3)

Tramite la sostituzione dell'equazione 3 nell'equazione 1 è possibile ottenere la calibrazione riportata in Figura 1.

La sensibilità può essere nell'ordine del pM ed è influenzata dalla concentrazione di $\text{OH}^-/\text{H}_3\text{O}^+$ intrappolato.

La possibilità di aumentare drasticamente la quantità di $\text{OH}^-/\text{H}_3\text{O}^+$ consiste nell'impiego di vescicole più grandi come le vescicole unilamellari giganti (GUVs) (Figura 2).

La sensibilità che può essere raggiunta utilizzando i liposomi giganti (GUVs) è nell'ordine di grandezza del fM, adatto per il dosaggio di biomolecole meno concentrate.

Analogamente, lo stesso tipo di calibrazione e sensibilità può essere riportata in caso di liposomi contenenti una soluzione acquosa di HCl al posto di NaOH.

La Figura 3 riporta la calibrazione utilizzando un tampone bicarbonato ed è stata ottenuta nel seguente modo:

- i) sono sciolti in acqua 150 mM di bicarbonato di sodio;
- ii) la soluzione è basificata con NaOH fino a pH 10.0; e successivamente
- iii) la soluzione è diluita con acqua bidistillata a pH 7.0 e per ogni diluizione è stato misurato il pH.

La curva mostra una regione di sensibilità compresa tra 1 mM e 10 μM di NaHCO_3 iniziale in soluzione.

Una volta noto il diametro delle vescicole e la concentrazione di NaHCO_3 , analogamente a come fatto

precedentemente, è possibile correlare il numero di liposomi che rilasciano il loro contenuto alla concentrazione di NaHCO_3 tramite la seguente relazione (4):

$$\begin{aligned} [\text{liposomi}] &= N^\circ \text{ liposomi per litro} / \text{NA} = \\ &= ((\text{mol tampone})_{\text{rilasciate}} / (\text{mol tampone})_{\text{singolo liposoma}}) / \text{NA} = \\ &= (\text{mol tampone})_{\text{rilasciate}} / ([\text{tampone}]_{\text{singolo liposoma}} * V_{\text{intra liposoma}}) / \text{NA} \end{aligned} \quad (4)$$

In Figura 4 è riportata la corrispondente curva di calibrazione.

La sensibilità per i liposomi GUVs è nell'intervallo del fM mentre per i LUVs è nell'intervallo del pM .

Molte altre diverse soluzioni tampone possono essere utilizzate come soluzioni di idratazione per questo metodo.

I liposomi dell'invenzione possono essere utilizzati in metodi di dosaggio del tipo ELISA di tipo diretto, indiretto o a sandwich che sono schematizzati nelle figure 5-7.

In particolare, con riferimento alla figura 5, viene fornito un analita 1, ad esempio un antigene, adeso ad un supporto solido 2 in una soluzione 3.

A tale soluzione viene aggiunta una sospensione dei liposomi 4 contenenti una soluzione 5 avente un primo pH, ad esempio un pH acido di 5, e presentanti sulla superficie un ligando 6 (figura 5B).

Dopo un tempo adeguato di incubazione, che dipende dalla cinetica del legame della coppia analita/ligando, i liposomi

non legati sono rimossi tramite cicli di lavaggio, ad esempio con una soluzione di NaCl 0,15 M a pH 7,0. A questo punto viene eseguita una prima misurazione del pH nella soluzione 3.

Il rilascio della soluzione acquosa 5 è indotto da uno stimolo esterno 7, in questo caso ad esempio calore (Figura 5C).

Infine, dopo un tempo adeguato al completo rilascio della soluzione acquosa 5 contenuta nei liposomi nella soluzione 3, viene eseguita una seconda misurazione del pH che viene poi confrontata con il pH prima del rilascio della soluzione 5.

Misurando il pH della soluzione dopo la rottura dei liposomi, la quantità di liposomi legati al ligando è facilmente quantificabile utilizzando le calibrazioni sopra illustrate.

Nella Figura 6 è illustrato una forma di realizzazione alternativa del metodo dell'invenzione. I dettagli simili od uguali a quelli già descritti nella figura 5 sono indicati per semplicità con i medesimi numeri di riferimento. In particolare, alla soluzione 3 dell'analita 1 su supporto solido 2 (Fig. 6A) viene aggiunta una soluzione di un ligando secondario 8 libero (ad es. anticorpo primario) (Fig. 6B).

Dopo un tempo adeguato di incubazione, che dipende dalla cinetica del legame della coppia analita/ligando secondario,

i ligandi secondari 8 liberi non legati sono rimossi tramite cicli di lavaggio, ad esempio con una soluzione di NaCl 0,15 M a pH 7,0.

Viene quindi aggiunta una sospensione di liposomi 4 adeguatamente funzionalizzati con un ligando primario 6 (ad es. anticorpo secondario) e contenuti una soluzione acquosa 5 avente un pH diverso da quello della soluzione 3 per legare il ligando secondario (Fig. 6C). A questo punto, prima della rottura dei liposomi, viene eseguita una prima misurazione del pH.

Il rilascio della soluzione acquosa 5 è indotto da uno stimolo esterno 7, in questo caso ad esempio calore (Figura 6D).

Infine, dopo un tempo adeguato al completo rilascio della soluzione acquosa 5 contenuta nei liposomi nella soluzione 3 (Fig. 6E), viene eseguita una seconda misurazione del pH che viene poi confrontata con il pH prima del rilascio della soluzione 5.

Misurando il pH della soluzione dopo la rottura dei liposomi, la quantità di liposomi legati al ligando è facilmente quantificabile utilizzando le calibrazioni sopra illustrate.

Nella Figura 7 viene illustrata un'ulteriore forma di realizzazione del metodo secondo l'invenzione. I dettagli simili od uguali a quelli già descritti nella figura 6 sono

indicati per semplicità con i medesimi numeri di riferimento.

In particolare, in questo caso l'analita 1 è adeso al supporto solido 2 tramite un legante secondario 9 (Fig. 7A-7B).

Viene quindi aggiunta una sospensione di liposomi 4 adeguatamente funzionalizzati con un ligando primario 6 (ad es. anticorpo secondario) e contenuti una soluzione acquosa 5 avente un pH diverso da quello della soluzione 3 per legare l'analita (Fig. 7C).

A questo punto, prima della rottura dei liposomi, viene eseguita una prima misurazione del pH della soluzione 3.

Il rilascio della soluzione acquosa 5 è indotto da uno stimolo esterno 7, in questo caso ad esempio calore (Figura 7D).

Infine, dopo un tempo adeguato al completo rilascio della soluzione acquosa 5 contenuta nei liposomi nella soluzione 3 (Fig. 7E), viene eseguita una seconda misurazione del pH che viene poi confrontata con il pH prima del rilascio della soluzione 5.

Misurando il pH della soluzione dopo la rottura dei liposomi, la quantità di liposomi legati al ligando è facilmente quantificabile utilizzando le calibrazioni sopra illustrate.

Ulteriori caratteristiche della presente invenzione risulteranno dalla seguente descrizione di alcuni esempi

puramente illustrativi e non limitativi.

ESEMPIO 1

PREPARAZIONE DEI LIPOSOMI

I liposomi della presente invenzione sono ottenuti tramite il metodo di idratazione di film sottile dove la miscela fosfolipidica, polimerica o dendrimerica è sciolta in solvente organico successivamente rimosso sotto vuoto tramite un rotavapor. La soluzione di idratazione contenente il materiale che si vuole incapsulare nei liposomi è aggiunta al film e tramite l'azione di un vortex si formano liposomi multilamellari.

La sonicazione o l'estrusione dei liposomi multilamellari porta alla formazione di SUV (40-100 nm di diametro) o LUV (100-500 nm di diametro) a seconda delle condizioni.

I liposomi possono essere formulati in modo da includere quasi tutti i fosfolipidi disponibili in commercio. Una tipica miscela lipidica usata nella formazione dei liposomi dell'invenzione è la seguente: 95% 1,2-dipalmitoil-sn-glicerolo-3-fosfocolina (DPPC), 5% 1,2 -distearoil-sn-glicerolo-3-fosfoetanolamina-N-[metossi(polietilenglicole)-2000] (DSPE-PEG2000-Metossi).

I lipidi che formano il liposoma vengono sciolti in un solvente organico inerte o in una miscela di solventi per essere facilmente disciolti.

La soluzione acquosa utilizzata nella formazione dei liposomi della presente invenzione contiene un composto basico o acido o una soluzione tampone in una concentrazione compresa tra 0.001 - 1.00 M.

Dopo la formazione dei liposomi, la sospensione viene neutralizzata aggiungendo un equivalente di H_3O^+ o OH^- nel caso in cui la soluzione di idratazione contenga una base o un acido forte rispettivamente, senza modificare l'osmolarità della soluzione. Altrimenti, se il composto internalizzato è un tampone o una base debole o un acido debole, la purificazione da molecole non intrappolate può avvenire mediante: i) dialisi contro soluzione di NaCl iso-osmolare, ii) ultrafiltrazione e sospensione in una soluzione di NaCl iso-osmolare.

Un altro tipo di liposomi che possono essere utilizzati nella presente invenzione sono le Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) il cui metodo di preparazione è descritto in letteratura.¹⁷

I liposomi dell'invenzione sono anche preparati con una membrana contenente delle molecole ligando in grado di legarsi in modo specifico e con elevata affinità agli analiti.

Sono disponibili molti metodi per attaccare molecole di ligando sulla superficie delle vescicole lipidiche o polimeriche.^{18,19}

ESEMPIO 1A:

La sospensione liposomiale dell'esempio 1A è caratterizzata da una membrana fosfolipidica costituita da DPPC/DSPE-PEG2000-Metossi (rapporto molare 95/5) e intrappola al suo interno una soluzione di NaOH 1 mM. La preparazione è stata effettuata sciogliendo 16,64 mg di DPPC e 3,36 mg di DSPE-PEG2000-Metossi (acquistati da AvantiPolar Lipids) in 2 ml di cloroformio. La miscela lipidica è stata essiccata sotto vuoto in un sistema rotavapor e il film sottile formatosi sulla parete del pallone a fondo tondo è stato idratato con una soluzione 1 mM di NaOH. La soluzione è stata agitata su vortex per formare vescicole multilamellari e quindi sottoposta a ultrasuoni per formare vescicole unilamellari grandi (Large Unilamellar Vesicles, LUV). L'eccesso di NaOH non intrappolato è stato neutralizzato aggiungendo un equivalente di HCl. Tre campioni a diverse concentrazioni sono stati sottoposti a riscaldamento a 55 °C per 10 minuti per consentire al contenuto di uscire dal compartimento interno.

Successivamente è stato misurato il pH e i risultati sono riportati in Figura 8 dove i valori di pH della soluzione dell'esempio 1A sono riportati come cerchi mentre i quadrati rappresentano la curva di calibrazione della Figura 1.

ESEMPIO 1B:

La sospensione liposomiale dell'esempio 1B è caratterizzata da una membrana fosfolipidica costituita da DPPC/DSPE-PEG2000-Metossi (rapporto molare 95/5) e intrappola al suo interno una soluzione di NaHCO_3 150 mM a pH 10.0. La preparazione è stata effettuata sciogliendo 16,64 mg di DPPC e 3,36 mg di DSPE-PEG2000-Metossi (acquistati da AvantiPolar Lipids) in 2 ml di cloroformio. La miscela lipidica è stata essiccata sotto vuoto in un sistema rotavapor e il film sottile formatosi sulla parete del pallone a fondo tondo è stato idratato con una soluzione di NaHCO_3 150 mM a pH 10.0. La soluzione è stata agitata su vortex per formare vescicole multilamellari e quindi sottoposta a ultrasuoni per formare vescicole unilamellari grandi (Large Unilamellar Vesicles, LUV). La sospensione di liposomi è stata dializzata contro una soluzione di NaCl 150 mM a pH 7.0. È stata calcolata la concentrazione e sono stati preparati più campioni a diversa diluizione aggiustando il pH a 7.0 se necessario.

Ogni campione è stato riscaldato a 55 °C per 10 minuti per consentire al contenuto di uscire dal compartimento interno.

Successivamente, è stato misurato il pH e i risultati sono riportati in Figura 9 (triangoli).

Tutte le procedure sono state ripetute su una seconda preparazione degli stessi liposomi e risultati sono mostrati

in Figura 9 (croci). La sovrapposizione della curva sperimentale con quella estrapolata dalla calibrazione relativa a NaHCO_3 (Figura 9 quadrati) per un liposoma avente stessa dimensione e carico di bicarbonato, mostra una buona coerenza tra i due gruppi di dati.

ESEMPIO 1C:

Nel caso dell'Esempio 1C liposomi giganti sono stati preparati secondo il metodo chiamato "gentle hydration".

In breve: i) DPPC e DSPE-PEG2000-Metossi (rapporto molare 97/3) sono stati disciolti in cloroformio, ii) la miscela di fosfolipidi è posta sul fondo di una beuta ed essiccata usando un flusso di azoto, iii) la soluzione di idratazione (NaHCO_3 0.2 M) viene delicatamente versata nella beuta, iii) i lipidi si idratano, in assenza di stress meccanico, a 60 °C per 2 ore, iv) una volta recuperati, i liposomi vengono centrifugati a 6500 rpm per 15 minuti al fine di trattenere i liposomi giganti come pellet e scaricare piccoli liposomi o impurità eventualmente presenti con il surnatante.

L'ultima operazione viene ripetuta più volte e i liposomi vengono risospesi in 1 ml di NaCl 0.2 M a pH 7.0. La sospensione di liposomi giganti è stata quindi diluita più volte e ad ogni soluzione è stato aggiunto TRITON-X a pH 7.0 per indurre il rilascio del loro contenuto. Il pH delle soluzioni diluite è stato misurato prima e dopo l'aggiunta

di TRITON-X (Figura 10 triangoli) e i risultati sono in eccellente accordo con la calibrazione riportata nella Figura 4 (cerchi).

ESEMPIO 2

VALUTAZIONE DELLA STABILITÀ DELLE VESCICOLE

I liposomi degli esempi 1B e 1C sono stati testati per la loro stabilità al rilascio di contenuto in soluzioni di NaCl 0,2 M. I liposomi preparati di recente, dopo essere stati purificati, sono stati sottoposti a misurazioni del pH in continuo per tre ore. Entrambe le formulazioni (Esempi 1B e 1C) non hanno mostrato alcun aumento significativo del valore del pH dimostrando che durante questo periodo non sono stati rilasciati OH^- dal comparto liposomiale interno. Tutti questi campioni alla fine del monitoraggio del pH (pH 7.0) sono stati riscaldati a 55 °C per dieci minuti e il pH è stato quindi misurato. Un'aliquota della soluzione madre di liposomi preparata di fresco è stata anche riscaldata a 55 °C per dieci minuti come riferimento ed è stato misurato il pH finale. La procedura è stata ripetuta tre volte su ciascun campione: l'analisi statistica consente di dire che il pH finale risulta essere lo stesso per tutti e lo stesso della soluzione madre, dimostrando così che il contenuto liposomiale è stato mantenuto all'interno delle vescicole. La stabilità dei liposomi dell'Esempio 1C è stata anche testata su siero umano. I liposomi sono stati incubati con

siero umano per 1 ora e quindi lavati estensivamente con NaCl 0.2 M a pH 7.0. Successivamente sono stati riscaldati a 55 °C per dieci minuti ed è stato misurato il pH. Come controllo, la stessa condizione sperimentale è stata applicata a una sospensione di liposomi dell'Esempio 1C sostituendo il siero umano con NaCl 0.2 M a pH fisiologico. Il valore finale del pH è risultato essere statisticamente lo stesso in entrambi i casi.

ESEMPIO 3

TEST DIAGNOSTICI ANALITA/LIGANDO

In questo paragrafo viene riportato un esempio di un tipo generale di immunodosaggio utilizzando i liposomi della presente invenzione.

ESEMPIO 3A:

L'esperimento qui riportato è un esempio di dosaggio diretto analita/ligando (Figura 5). L'analita da rilevare è la streptavidina che si lega direttamente alle molecole di biotina (ligando) presenti sui liposomi, per formare complessi analita/ligando. La streptavidina è già adsorbita sulla superficie di una piastra. Per questo esperimento, le micropiastre rivestite di streptavidina sono state acquistate da Greiner Bio-One International. I liposomi giganti contenenti un fosfolipide biotinilato sono stati preparati secondo l'Esempio 1C sostituendo il DSPE-PEG2000-Metossi con 1,2-distearoil-sn-glicerolo-3-fosfoetanolamina-

N-[biotinil(polietilenglicole)-2000] (DSPE-PEG2000-Biotina). I liposomi preparati al momento, ad una concentrazione di circa $1 \cdot 10^{-11}$ M, sono stati incubati nelle micropiastre per 15 minuti sotto delicata agitazione. Quindi le micropiastre sono state lavate 5 volte con NaCl 0.2 M a pH 7.0. Il pH è stato misurato con un microelettrodo (METTLER TOLEDO) ed è risultato essere 7.0. A questo punto una soluzione contenente TRITON-X a pH 7.0 è stata aggiunta alle micropiastre, il pH è stato misurato 15 minuti più tardi ed è stato rilevato un aumento di 0.2 unità di pH. In accordo con la calibrazione riportata nella Figura 10, questo valore indica che circa $1 \cdot 10^{-13}$ M di liposomi erano legati alle piastre. Queste misure sono state ripetute cinque volte e i risultati sono riportati nella Figura 11. Come controllo, lo stesso esperimento è stato ripetuto utilizzando liposomi giganti non funzionalizzati sulla superficie esterna con biotina (esempio 1C) ma mantenendo le stesse dimensioni e il medesimo contenuto. In questo caso la variazione di pH è di circa 0.05 unità. Come ulteriore controllo, le micropiastre sono state trattate solo con la soluzione di lavaggio (NaCl 0.2 M pH 7.0). Entrambi i controlli sono stati ripetuti 5 volte. L'analisi statistica dei risultati mostra che la differenza tra i liposomi funzionalizzati e controllo è statisticamente significativa (test T di Student, $p = 0.0002$).

RIFERIMENTI

(1) Schuurs, A.; Van, W. B. Process for the Demonstration and Determination of Low Molecular Compounds and of Proteins Capable of Binding These Compounds Specifically. US3850752A, November 26, 1974.

(2) Schuurs, A. H. W.; Weemen, B. K. V. Method for the Determination of Antigens and Antibodies. US3654090A, April 4, 1972.

(3) Zhang, S.; Garcia-D'Angeli, A.; Brennan, J. P.; Huo, Q. Predicting Detection Limits of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Bioanalytical Techniques in General. *Analyst* **2014**, 139 (2), 439-445. <https://doi.org/10.1039/c3an01835k>.

(4) Davies, G. E.; Janata, J. Magnetic Particles for Immunoassay. US4177253A, December 4, 1979.

(5) Urdike, S.; Goodfriend, T. Reagent for Radioimmunoassay. US3793445A, February 19, 1974.

(6) Kung, V. T.; Canova-Davis, E. Liposome Immunoassay Reagent and Method. US4622294A, November 11, 1986.

(7) Ren, R.; Cai, G.; Yu, Z.; Tang, D. Glucose-Loaded Liposomes for Amplified Colorimetric Immunoassay of Streptomycin Based on Enzyme-Induced Iron(II) Chelation Reaction with Phenanthroline. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2018**, 265, 174-181. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.049>.

(8) Horie, M.; Yanagisawa, H.; Sugawara, M. Fluorometric Immunoassay Based on PH-Sensitive Dye-Encapsulating Liposomes and Gramicidin Channels. *Analytical Biochemistry* **2007**, 369 (2), 192-201. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.07.007>.

(9) Haga, M.; Hoshino, S.; Okada, H.; Hazemoto, N.; Kato, Y.; Suzuki, Y. An Improved Chemiluminescence-Based Liposome Immunoassay Involving Apoenzyme. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, 38 (1), 252-254.

(10) Liang, J.; Wang, J.; Zhang, L.; Wang, S.; Yao, C.; Zhang, Z. Glucose Oxidase-Loaded Liposomes for in Situ Amplified Signal of Electrochemical Immunoassay on a Handheld PH Meter. *New J. Chem.* **2019**, 43 (3), 1372-1379. <https://doi.org/10.1039/C8NJ05637D>.

(11) Ishikawa, E.; Imagawa, M.; Hashida, S.; Yoshitake, S.; Hamaguchi, Y.; Ueno, T. Enzyme-Labeling of Antibodies and Their Fragments for Enzyme Immunoassay and Immunohistochemical Staining. *J Immunoassay* **1983**, 4 (3), 209-327.

(12) Poznansky, M. J.; Juliano, R. L. Biological Approaches to the Controlled Delivery of Drugs: A Critical Review. *Pharmacol. Rev.* **1984**, 36 (4), 277-336.

(13) Toonen, P. A. H. M.; Crommelin, D. J. A. Immunoglobulins as Targeting Agents for Liposome Encapsulated Drugs. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific*

Edition **1983**, 5 (6), 269-280.
<https://doi.org/10.1007/BF02074854>.

(14) Connor, J.; Sullivan, S.; Huang, L.
Monoclonal Antibody and Liposomes. *Pharmacology &
Therapeutics* **1985**, 28 (3), 341-365.
[https://doi.org/10.1016/0163-7258\(85\)90058-0](https://doi.org/10.1016/0163-7258(85)90058-0).

(15) Hansen, C. B.; Kao, G. Y.; Moase, E. H.;
Zalipsky, S.; Allen, T. M. Attachment of Antibodies to
Sterically Stabilized Liposomes: Evaluation, Comparison and
Optimization of Coupling Procedures. *Biochimica et
Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1995**, 1239 (2), 133-
144. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(95\)00138-S](https://doi.org/10.1016/0005-2736(95)00138-S).

(16) George, A.; Tan, P. Immunoliposomes Formed
with Aggregated Antibody. WO2003101427A1, December 11, 2003.

(17) Reeves, J. P.; Dowben, R. M. Formation and
Properties of Thin-walled Phospholipid Vesicles. *Journal of
Cellular Physiology* 1969, 73 (1), 49-60.
<https://doi.org/10.1002/jcp.1040730108>.

(18) Zhang, H. Thin-Film Hydration Followed by
Extrusion Method for Liposome Preparation. *Methods Mol.
Biol.* 2017, 1522, 17-22. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-
6591-5_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6591-5_2).

(19) Szoka, F. C. Liposomes with Glycolipid-Linked
Antibodies. US4483929A, November 20, 1984.

(20) Liang, Glucose oxidase-loaded liposomes for in situ amplified signal of electrochemical immunoassay on handheld pH meter. *New J.Chem.*, 2019, 43, 1372.

RIVENDICAZIONI

1.- Composizione di liposomi contenenti una soluzione acquosa avente un primo pH e presentanti sulla superficie almeno un ligando specifico per un analita di interesse contenuto in una soluzione avente un secondo pH, detto primo pH essendo differente da detto secondo pH, per l'uso in un metodo di dosaggio.

2.- Composizione di liposomi secondo la rivendicazione 1 caratterizzata dal fatto che detta soluzione acquosa è costituita da una soluzione acquosa di una base, da una soluzione acquosa di un acido o da una soluzione tampone.

3.- Composizione di liposomi secondo la rivendicazione 2 caratterizzata dal fatto che detta soluzione di una base è una soluzione acquosa in cui la base è selezionata nel gruppo costituito da idrossido di sodio, idrossido di litio, idrossido di potassio e ammoniaca.

4.- Composizione di liposomi secondo la rivendicazione 2 caratterizzata dal fatto che detta soluzione di un acido è una soluzione acquosa in cui l'acido è selezionato nel gruppo costituito da acido cloridrico, acido solforico, acido nitrico, acido iodidrico, acido perclorico, acido bromidrico, acido fosforico e acido acetico.

5.- Composizione di liposomi secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4 caratterizzata dal fatto che detto metodo di dosaggio è un metodo diagnostico.

6.- Metodo per il dosaggio di un analita (1) di interesse in una soluzione (3) comprendente le fasi di:

a) mettere a disposizione una soluzione (3) di detto analita (1) di interesse legato ad un supporto solido (2), detta soluzione (3) avendo un primo pH;

b) porre a contatto con detta soluzione di analita (1) una composizione di liposomi (4) contenenti una soluzione acquosa (5) avente un secondo pH diverso dal primo pH e presentanti sulla superficie almeno un ligando (6) specifico per detto analita (1) di interesse, in modo da creare un legame tra detto analita (1) e detto ligando (6);

c) applicare uno stimolo esterno (7) in modo da causare il rilascio della soluzione acquosa (5) contenuta in detti liposomi (4) nella soluzione (3) contenente detto analita (1) in modo da ottenere un terzo pH;

d) misurare detto terzo pH;

e) calcolare il dosaggio di detto analita (1).

7.- Metodo secondo la rivendicazione precedente, caratterizzato dal fatto che detti analita (1) e ligando (6) sono scelti nel gruppo costituito da antigene/anticorpo, immunoglobulina/proteina A, biotina/avidina, ormone/recettore, sequenze complementari di acidi nucleici, aptamero/molecola target.

8.- Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 6 o 7, caratterizzato dal fatto che detto legame tra detto

analita (1) e detto ligando (6) è un legame di tipo indiretto.

9.- Metodo secondo la rivendicazione 8, caratterizzato dal fatto che detto legame di tipo indiretto avviene mediante un ligando secondario (8).

10.- Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 6 o 9, caratterizzato dal fatto che detto stimolo esterno (7) è selezionato nel gruppo costituito da ultrasuoni, calore, presenza di tensioattivi, stress osmotico e cicli di congelamento-scongelo.

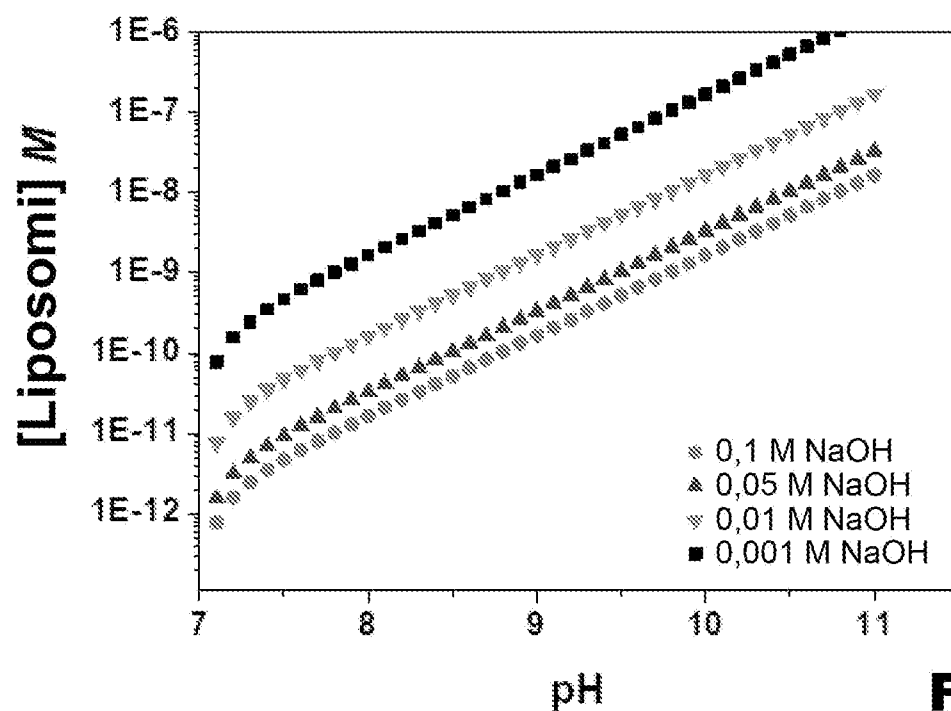


FIG. 1

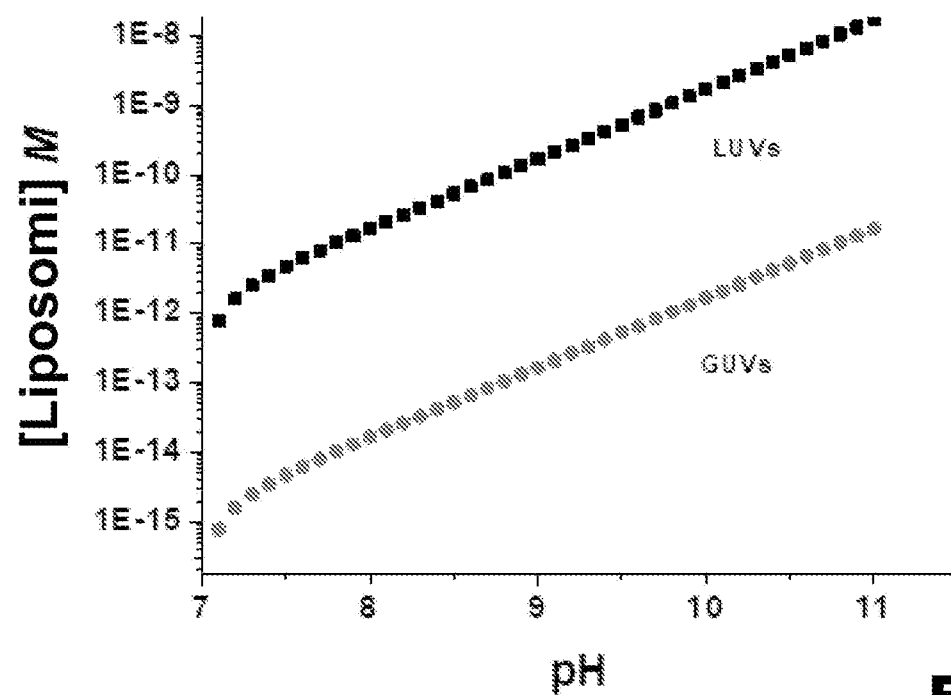


FIG. 2

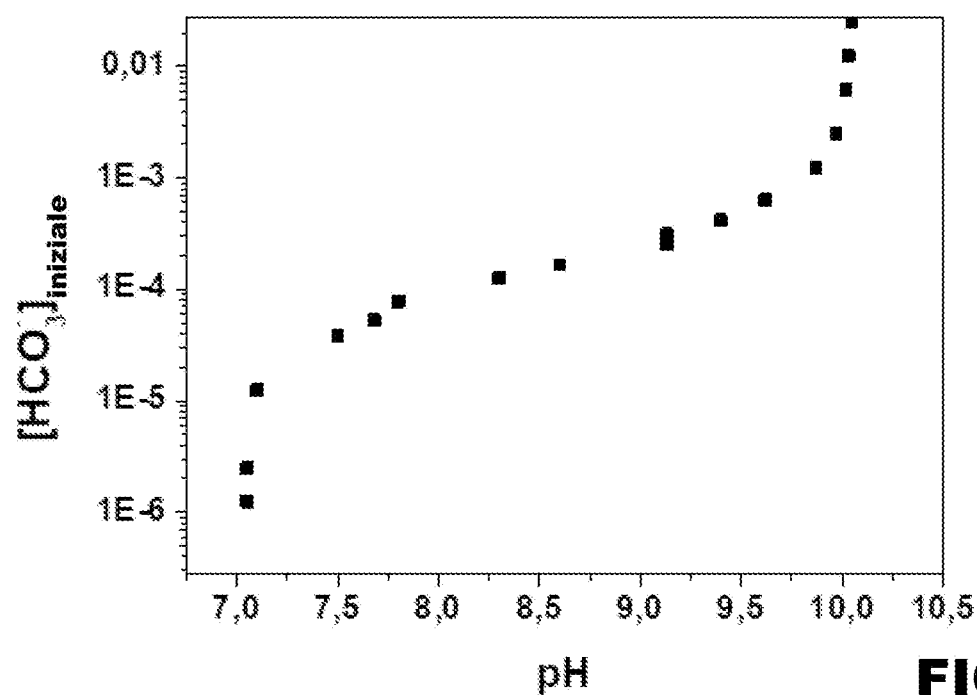


FIG. 3

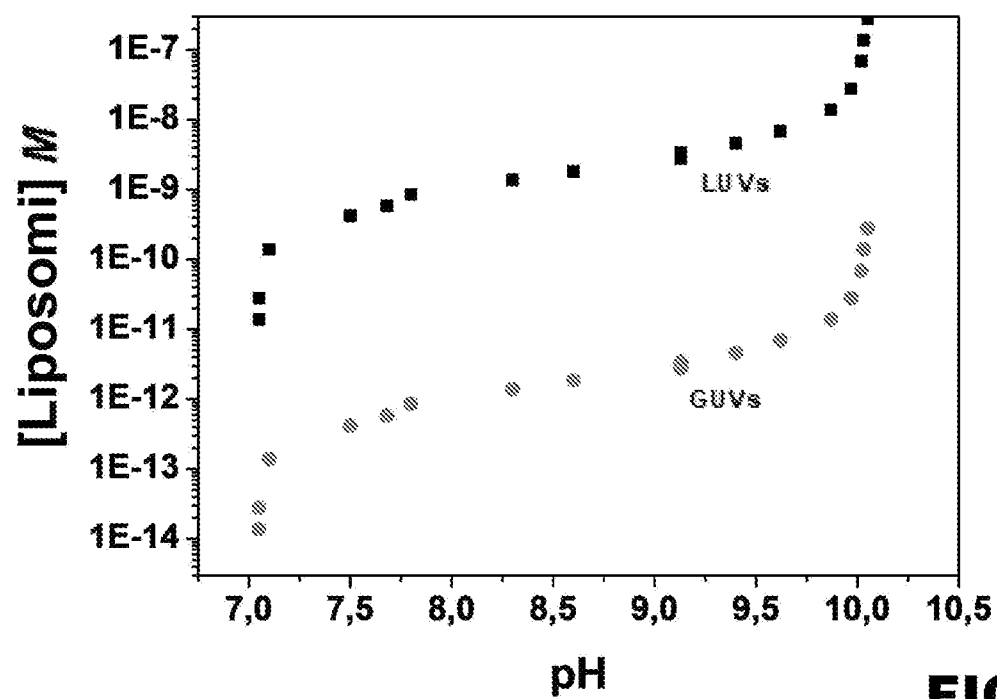


FIG. 4

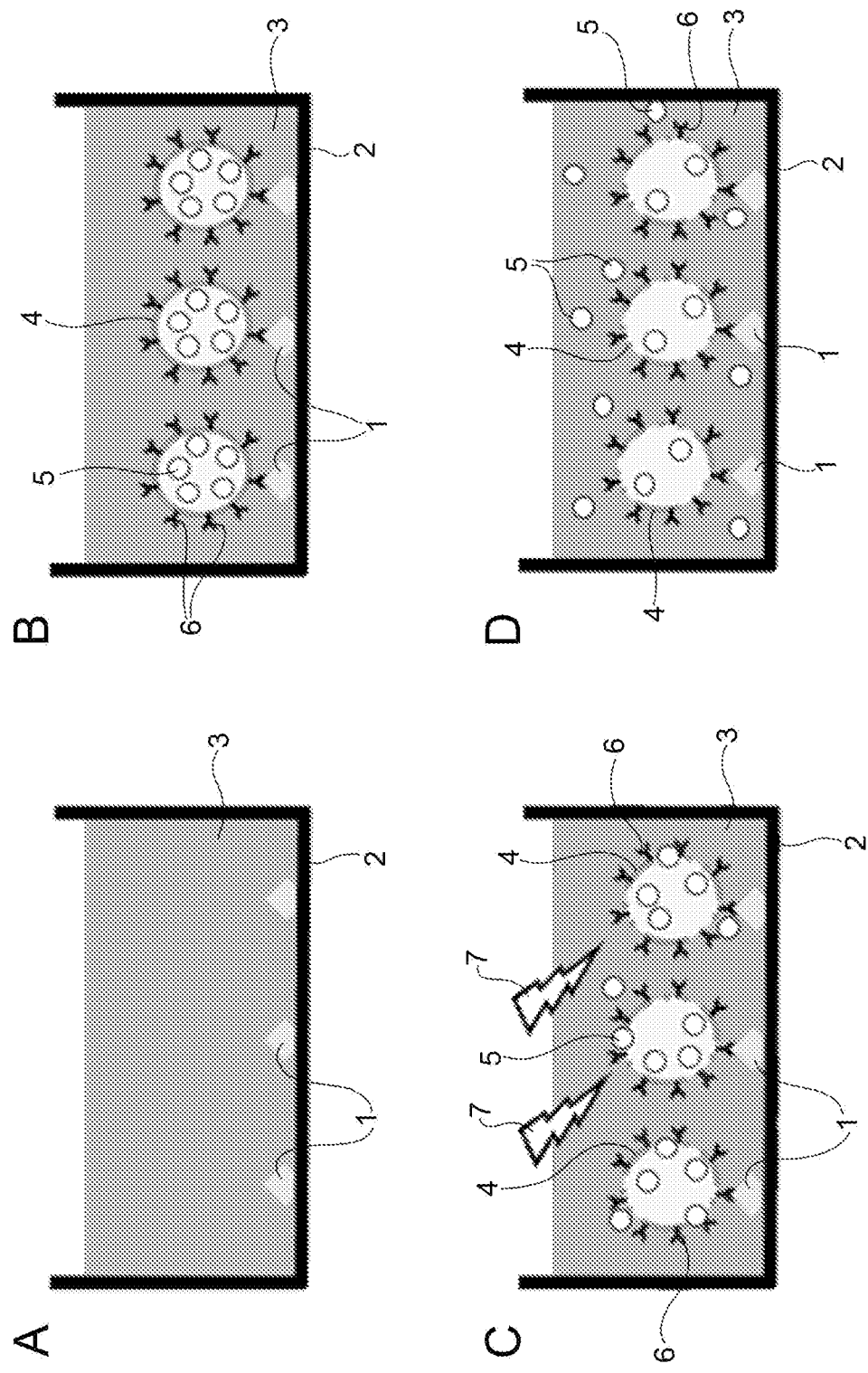


FIG. 5

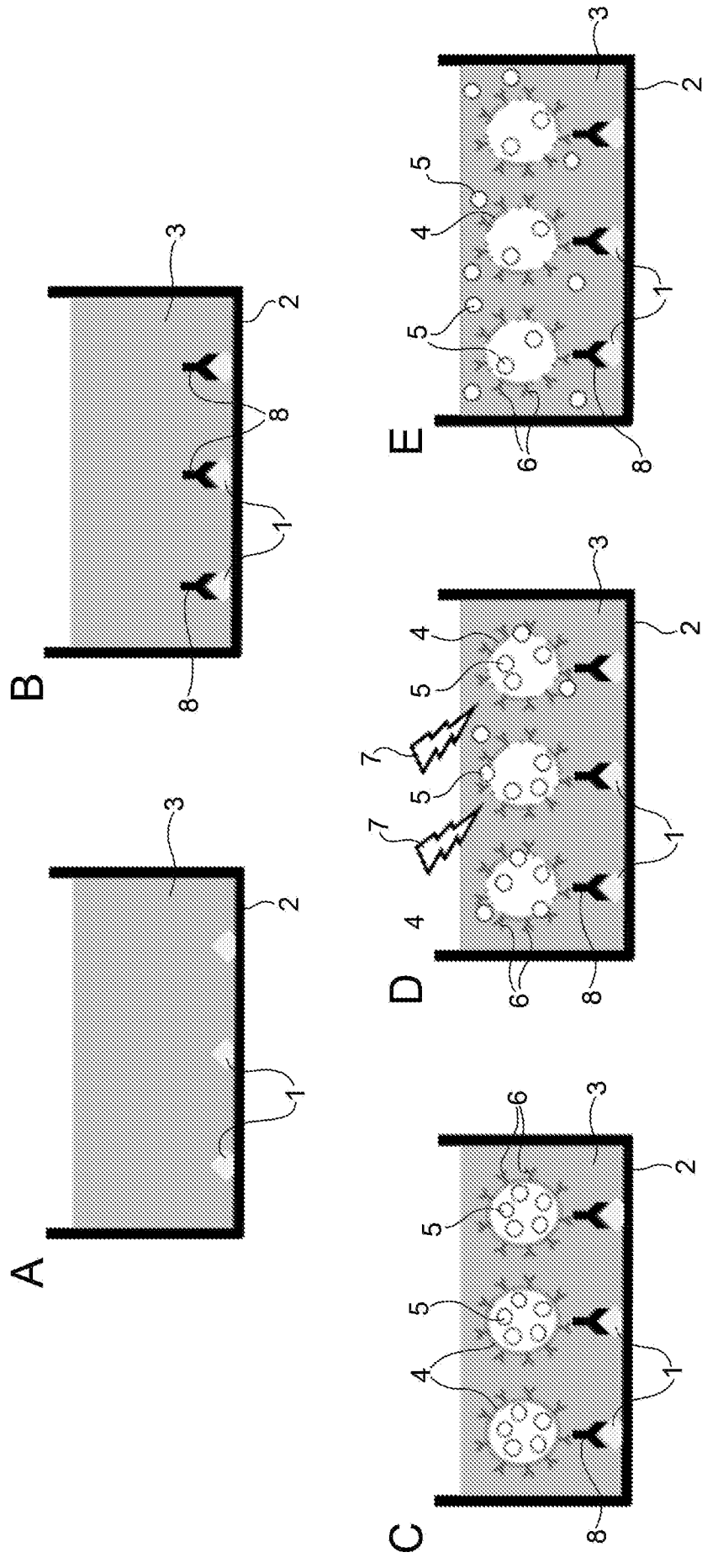


FIG. 6

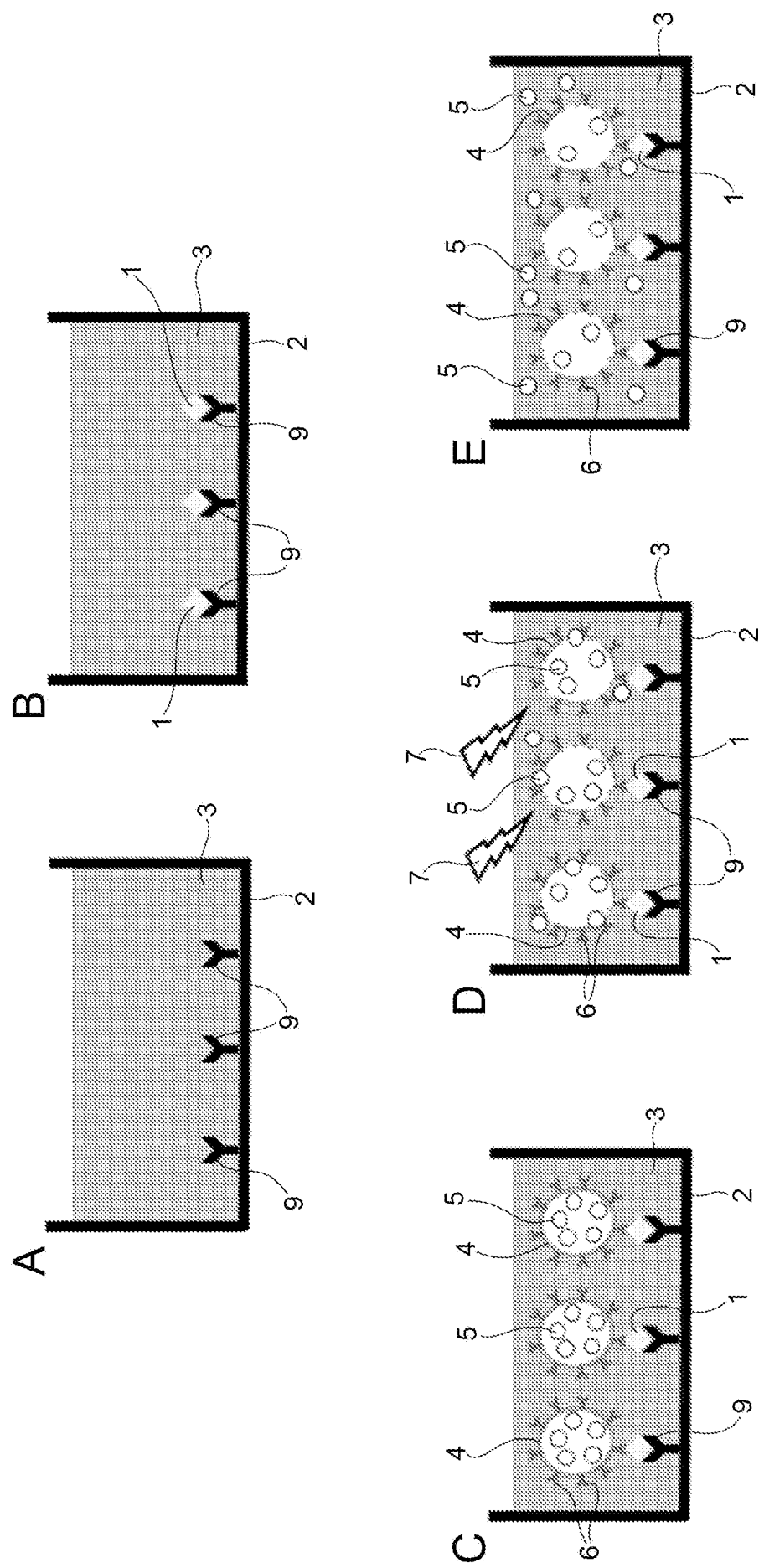


FIG. 7

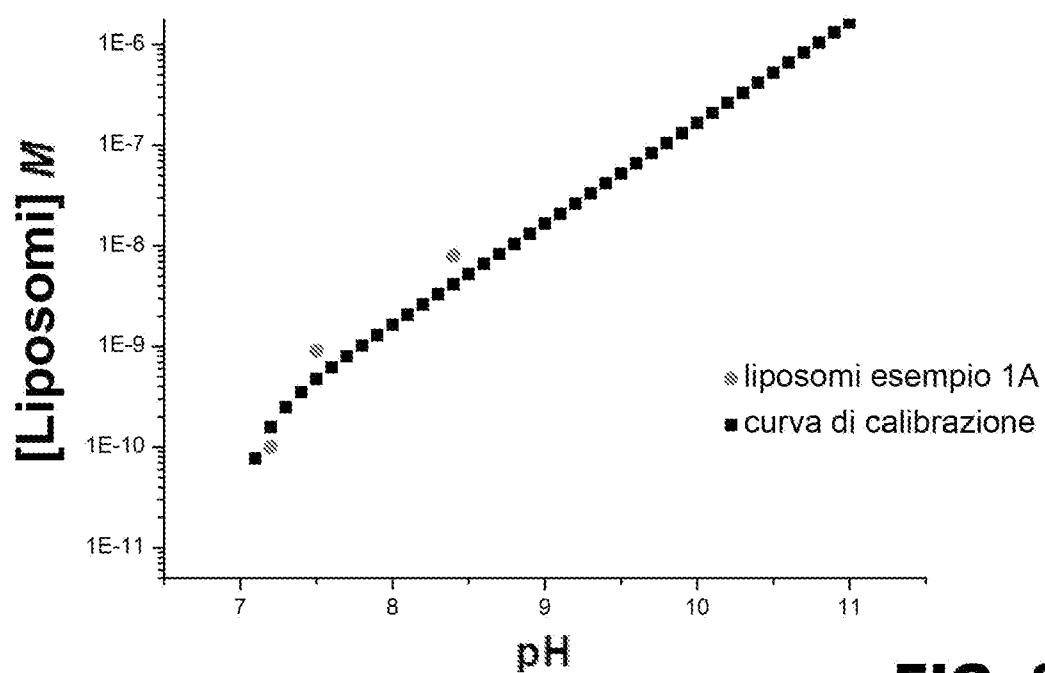


FIG. 8

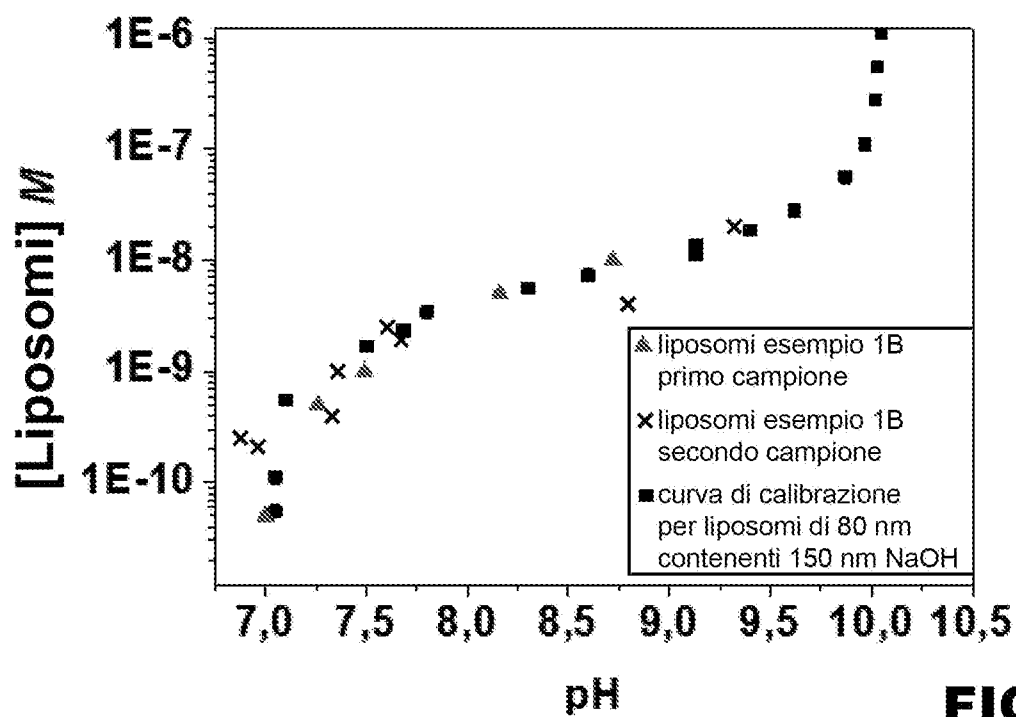


FIG. 9

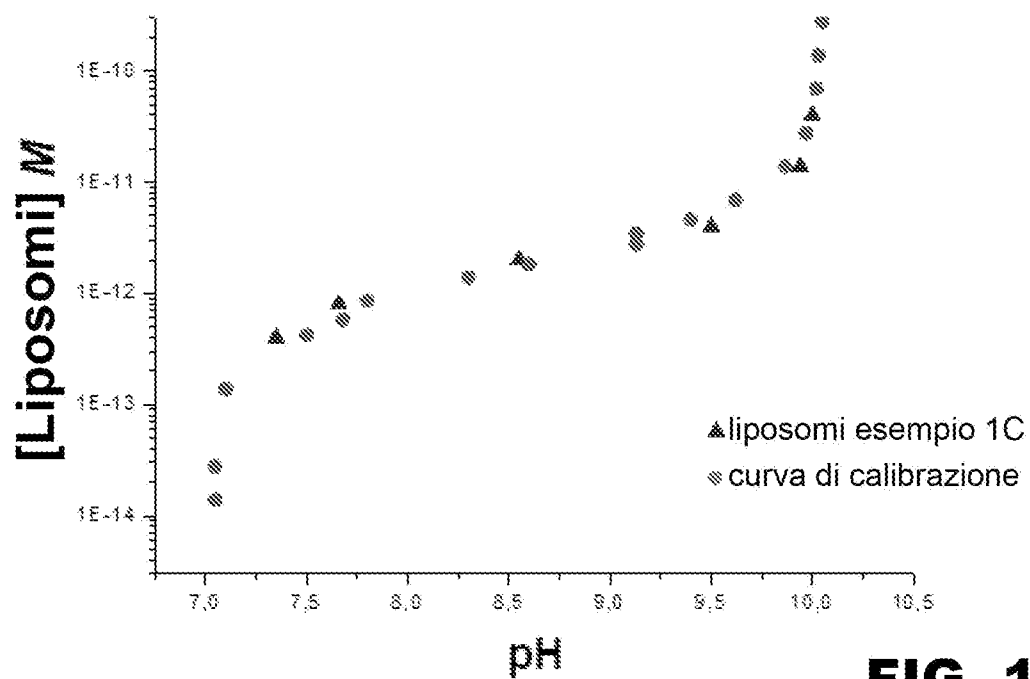


FIG. 10

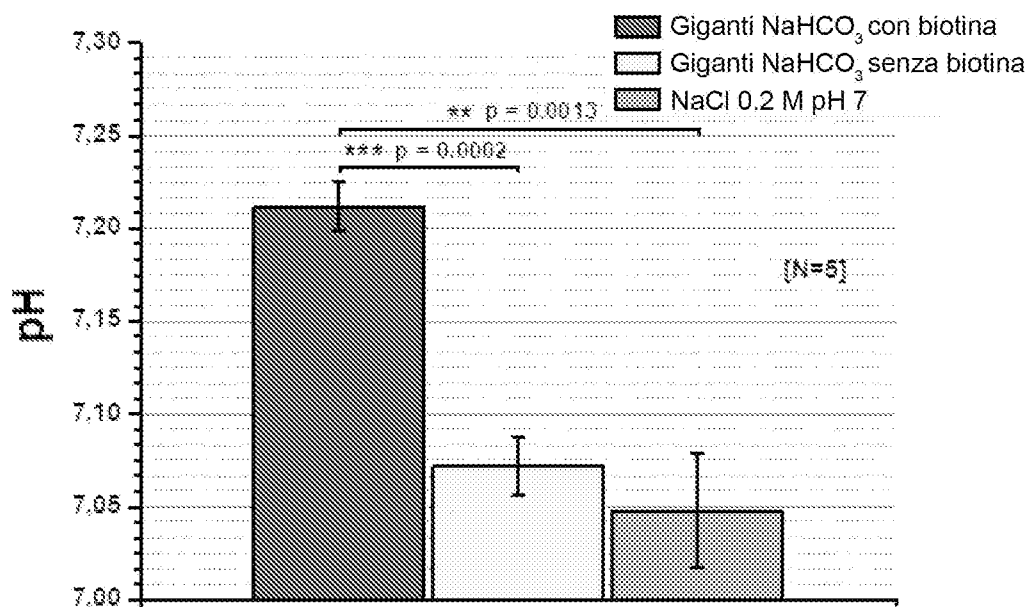


FIG. 11