



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETA' INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	102015902344749
Data Deposito	16/04/2015
Data Pubblicazione	16/10/2016

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	P		

Titolo

ATTIVITA ANTINEOPLASTICA DI NANOVESICOLE ISOLATE DA CITRUS LIMON

Titolo: Attività antineoplastica di nanovesicole isolate da *Citrus Limon*

Campo Tecnico dell'invenzione

La presente invenzione riguarda l'ottenimento di prodotti vegetali aventi attività
5 farmacologica ed il loro uso terapeutico. In particolare l'invenzione si riferisce a
vescicole di dimensioni nanometriche ottenute dal succo di piante della famiglia delle
Rutaceae.

Stato della Tecnica Anteriore

Il cancro rappresenta, dopo le patologie dell'apparato cardiovascolare, la seconda causa
10 di morte nei paesi industrializzati. Esistono più di 100 isotipi differenti di cancro incluso
polmone, colon, mammella, pancreas, fegato e leucemia. La chirurgia, la chemioterapia
e la radioterapia sono i più comuni approcci chemioterapeutici adottati per il trattamento
dei pazienti oncologici. Dati dell'Organizzazione Mondiale della Sanità stimano che la
15 sopravvivenza media a 5 anni dalla diagnosi sia di circa il 60% nonostante i progressi
compiuti in terapia ed i notevoli investimenti effettuati in campo farmaceutico. Il
trattamento convenzionale con chemioterapici spesso causa effetti tossici sulle cellule
normali.

Pertanto, vi è un urgente bisogno di individuare nuovi composti e/o trattamenti più
efficaci al fine di 1) inibire la crescita e la progressione del cancro e 2) avere pochi
20 effetti collaterali sulle cellule normali.

Gli esosomi sono piccole vescicole rilasciate dalle cellule animali nel versante
extracellulare. Gli esosomi hanno dimensioni di 30-100 nm e sono presenti in molti
fluidi biologici. E' noto che queste vescicole veicolano i prodotti molecolari della
cellula che li produce, tra cui proteine, lipidi, mRNA e microRNA (miRNA). Numerosi
25 dati mostrano che esosomi giocano un ruolo importante nella comunicazione cellula-
cellula influenzando processi fisiologici e patologici. Precedenti studi suggeriscono che
le nanovesicole rilasciate da cellule vegetali sono simili agli esosomi (1). Zhang e
colleghi hanno riportato che le nanovesicole derivate da piante commestibili quali uva,
pompelmo, zenzero e carote mostrano proprietà anti-infiammatorie nelle malattie
30 infiammatorie croniche intestinali (2, 3). Zhang et al. hanno inoltre riportato nella
domanda di brevetto statunitense US2014/0308212 l'uso di vescicole vegetali come

carrier per medicinali, anche antitumorali, incapsulati nelle stesse o come carrier che incorporano delle molecole marcati utilizzabili in metodi diagnostici. Tuttavia il ruolo potenziale antineoplastico di tali nanovesicole di origine vegetale nell'influenzare la progressione del cancro non è mai stato investigato fino ad ora.

5 Dati in letteratura hanno dimostrato che composti e/o estratti acquosi da diverse varietà vegetali, incluso *Citrus limon* L.(famiglia delle Rutaceae), esercitano un attività anti-proliferativa e antitumorale (4, 5) essenzialmente legata alla presenza dei flavonoidi.

Pertanto, un approccio alternativo per superare gli effetti collaterali di composti chimici potrebbe essere l'uso di agenti naturali, che forniscono un eccellente contributo alle
10 moderne terapie. Inoltre, è noto che alcuni composti naturali sono in grado di inibire lo sviluppo del cancro in modelli animali di carcinogenesi (6). È noto inoltre che la proteina TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induca l'apoptosi mediante legame a specifici recettori (TRAIL-R). Tale famiglia è emersa come mediatore chiave della sopravvivenza cellulare, avviando le cellule verso la via estrinseca di apoptosi (7).

15 È importante sottolineare che, a differenza di molti farmaci chemioterapici, TRAIL ha la capacità di indurre l'apoptosi in cellule tumorali ma non nelle cellule normali (8).

Scopo della presente invenzione è quindi quello di fornire nuovi strumenti farmacologici che offrano una maggiore efficacia nell'inibizione dello sviluppo e progressione della neoplasia e che al tempo stesso abbiano pochi effetti collaterali nei
20 confronti dell'organismo.

Sommario dell'Invenzione

L'impiego di sostanze naturali nel trattamento di neoplasie rappresenta ad oggi un'alternativa terapeutica all'impiego dei comuni chemioterapici.

La presente invenzione si basa sulla scoperta che nanovesicole di origine vegetale
25 ottenute dal succo di piante della famiglia delle *Rutaceae*, specificatamente della sottofamiglia *Aurantioideae*, specialmente del genere *Citrus*, esercitano un effetto citotossico e/o citostatico e/o sensibilizzante nel trattamento di varie neoplasie. Inoltre la presenza di dette vescicole in succo di piante del genere *Citrus* non è mai stata precedentemente dimostrata.

30 Pertanto sono oggetti della presente invenzione:

Un procedimento di ottenimento di nanovesicole dal succo di frutti di pianta del genere *Citrus* comprendente i seguenti passaggi:

- a) si centrifuga e si filtra il succo in uno o più cicli consecutivi;
- b) si ultracentrifuga il succo ottenuto al passaggio (a) con ottenimento di un liquido surnatante e di un pellet di sedimentazione contenente le nanovesicole e si recuperano le vescicole.

Il procedimento può anche comprendere i seguenti passaggi aggiuntivi:

- c) si sottopone il pellet recuperato a ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio;
- d) si isola la frazione avente densità compresa tra 1.12 e 1.19g/ml;
- e) opzionalmente si sottopone la frazione ad ultracentrifugazione; e
- f) opzionalmente si lava la frazione con soluzione fisiologica.

Un procedimento in cui l'ultracentrifugazione al passaggio (b) e/o (e) è eseguita ad un valore di g (i.e. accelerazione di gravità) tra 100.000xg e 150.000xg per un tempo tra 120 e 60 min.

- 15 Un procedimento in cui l'ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio al passaggio (c) è eseguita ad un valore di g (accelerazione di gravità) tra 100.000xg e 150.000xg per un tempo compreso tra 60 min e 120 min ad un gradiente di densità tra 30% e 45%.

- 20 Un procedimento in cui il passaggio (a) comprende almeno una centrifugazione ad un valore g tra 15.000x g e 20.000x g per un tempo tra 60 e 180 min e una filtrazione con filtro a pori non minori di circa 0.45 µm (micron).

- 25 Un procedimento in cui il passaggio (a) comprende un primo ciclo di centrifugazioni da 3000xg a 10.000xg per un tempo tra 30 e 90 min/centrifugazione seguito da una prima filtrazione con filtro a pori non minori di 0.8 micron, ed un secondo ciclo di centrifugazioni da 15000xg a 17000xg per un tempo tra 70 e 100 min/centrifugazione seguito o intercalato da filtrazioni con filtro a pori non minori di circa 0.45 micron.

Rappresentano ulteriori oggetti dell'invenzione:

- 30 Nanovesicole aventi densità compresa tra 1.12 e 1.19g/ml e dimensioni tra 50 e 70 nm ottenute col procedimento dell'invenzione per uso in un trattamento terapeutico come principio attivo unico o in combinazione con uno o più principi attivi addizionali, a condizione che detti uno o più principi attivi addizionali non siano incapsulati nelle nanovesicole stesse.

Le sopra viste nanovescicole per uso in un trattamento terapeutico preventivo o curativo di tumori solidi o ematologici, in particolare per uso in un trattamento in cui il tumore è un cancro del colon-retto, del pancreas, del polmone, del rene, delle ovaie, del fegato, della tiroide, della vescica, del seno, dell'esofago, della pelle, leucemia acuta, leucemia
5 mieloide cronica o mieloma multiplo; vantaggiosamente per uso in un trattamento in cui il cancro è resistente ai comuni chemioterapici.

Rappresentano ulteriore oggetto dell'invenzione :

Le nanovescicole dell'invenzione per uso in un trattamento di sensibilizzazione delle cellule tumorali ad un successivo o concomitante trattamento con uno o più
10 chemioterapici, vantaggiosamente di sensibilizzazione di cellule tumorali resistenti ai comuni chemioterapici.

Rappresenta ulteriore oggetto dell'invenzione una composizione farmaceutica contenente le nanovescicole dell'invenzione ed un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

15 L'invenzione qui descritta si basa sull'identificazione nel succo di piante, preferibilmente del genere *Citrus*, per esempio del *Citrus limon* L., di una frazione selezionata di vescicole ottenuta in seguito a successivi passaggio di centrifugazioni e filtrazione, che presenta un'elevata attività antitumorale *in vitro* su linee cellulari tumorali sia sensibili che resistenti ai comuni chemioterapici oggi utilizzati.

20 Ad oggi, le terapie antitumorali in uso per il trattamento di differenti neoplasie solide ed ematologiche prevedono l'impiego di sostanze (chemioterapici) che inducono citotossicità non solo in cellule tumorali ma anche in cellule normali. Inoltre, sebbene il trattamento con chemioterapici abbia avuto alte percentuali di successo per il trattamento di diverse neoplasie, l'acquisizione della resistenza farmacologica
25 rappresenta ad oggi uno degli aspetti cruciali nel trattamento del cancro. Per esempio l'acquisizione della resistenza ai farmaci nei pazienti affetti da leucemia mieloide cronica, osservata con una frequenza annuale del 4%, ha posto negli ultimi anni la necessità di sviluppare nuove strategie terapeutiche.

Il vantaggio principale che l'invenzione oggetto della presente domanda offre risiede
30 nell'utilizzo di nanovescicole di natura vegetale, il cui contenuto risulta non tossico per

le cellule normali inducendo invece l'arresto del processo proliferativo di cellule tumorali, avviandole verso la morte.

Le nanovesicole isolate dal succo vegetale possono essere impiegate come singoli agenti terapeutici, o in combinazione con altri chemioterapici o per sensibilizzare le
5 cellule tumorali al trattamento con i comuni chemioterapici. Tuttavia, è importante notare che le nanovesicole dell'invenzione esercitano autonomamente un'attività antitumorale e quand'anche siano somministrate in una terapia combinata con altri farmaci, la loro funzione terapeutica non è quella del *carrier* che veicola o incapsula detti medicinali aggiuntivi, ma quella di principio attivo autonomo, che esercita
10 funzione terapeutica complementare, aggiuntiva o sinergistica.

Descrizione delle Figure

Figura 1: la figura illustra la caratterizzazione delle nanovesicole mediante microscopio elettronico (figura 1a), analisi al DLS (dynamic light scattering, figura 1b) e mediante approccio proteomico (figura 1c) e l'internalizzazione delle vescicole in cellule tumorali umane
15 A549 e LAMA84 (figura 1d).

Figura 2: la figura illustra l'attività antiproliferativa delle nanovesicole su cellule di cancro al colon (SW480), polmone (A549, CRL2868, CRL5908 resistenti a erlotinib e gefitinib) e leucemia mieloide cronica sensibili e resistenti all'Imatinib (LAMA84S, LAMA84R).

Figura 3: La figura illustra l'espressione di diverse molecole coinvolte nella via apoptotica. Come mostrato in figura 3a, le cellule A549, SW480 e LAMA84 trattate con le nanovesicole, mostrano un aumento dell'espressione dei geni pro-apoptotici, Bad e Bax, e una riduzione dei livelli di mRNA di geni antiapoptotici Survivin e Bcl-XL. L'aumento di espressione della proteina BAX e la diminuzione di BCL-xL sono stati
25 anche confermati da analisi di western blot (Figura 3b).

Figura 4: La figura illustra l'incremento dell'espressione genica di TRAIL (Figura 4a, pannello superiore) e DR5 (Figura 4a, pannello inferiore) indotto dalla nanovesicole dell'invenzione. L'aumento del rilascio della proteina TRAIL è stato confermato anche dal test ELISA, come mostrato in Figura 4b.

Figure 5: La figura illustra la capacità delle nanovesicole di inibire la crescita del tumore in un modello in vivo di leucemia mieloide cronica.

La figura 5a mostra che la crescita tumorale è ritardata nei topi trattati con le nanovesicole, sia localmente che per via intraperitoneale (pannello di sinistra), portando alla formazione di tumori più piccoli rispetto ai topi controllo (pannello destro).

5 La figura 5b illustra l'incremento dei geni proapoptotici Bad e Bax e la diminuzione dei geni antiapoptotici, Survivin e Bcl-XL e l'aumento di TRAIL e DR5 nei topi trattati con nanovesicole. La figura 5c mostra l'aumento del numero di cellule positive a TRAIL (indicate dalle frecce) nei tumori dei topi trattati localmente o per via intraperitoneale rispetto ai topi di controllo.

10 **Figura 6:** La figura illustra la biodistribuzione delle nanovesicole marcate nel sito tumorale (figura 6a- le frecce indicano le nanovesicole marcate che si localizzano intorno al tumore). L'analisi dei tumori mostra che le nanovesicole vengono internalizzate nella massa tumorale e restano nel sito, mentre nessun accumulo di fluorescenza si osserva nel tumore prelevato dal topo trattato con la sonda libera (figura
15 6b).

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Le vescicole vegetali dell'invenzione sono ottenute dal succo di frutti di piante della famiglia delle *Rutaceae*, specificatamente della sottofamiglia *Aurantioideae*, e particolarmente del genere *Citrus*, per esempio, *Citrus limon L.* (limone), *Citrus medica*
20 (*cedro*), *Citrus reticulata* (mandarino), *Citrus paradisi* (pompelmo), *Citrus sinensis* (arancio dolce).

Il procedimento

Il procedimento d'ottenimento delle nanovesicole dell'invenzione prevede passaggi successivi di selezione ed isolamento mediante tecniche di centrifugazione e filtrazione,
25 fino ad ottenere una specifica frazione selezionata. Detta frazione isolata è caratterizzata da una densità compresa tra 1.12 e 1.19 g/ml e uno profilo proteomico che per il 56,7% delle identificazioni, consiste in proteine già descritte negli esosomi di mammifero.

Il procedimento comprende una fase preparatoria (a) del succo in cui si sottopone il succo in uno o più cicli consecutivi di centrifugazione e filtrazione. Tale fase è
30 finalizzata a rimuovere dal succo, per sedimentazione e/o filtrazione ogni componente solida ed ogni elemento del succo ad alta densità.

Il procedimento comprende poi il seguente passaggio (b) e opzionalmente i passaggi (c), e (d) eseguiti sul succo trattato alla fase preparatoria:

b) si ultracentrifuga il succo ottenuto al passaggio (a) con ottenimento di un liquido surnatante e di un pellet di sedimentazione contenente le nanovescicole.

5 Il passaggio di ultracentrifugazione (b) è eseguita ad un valore di g (accelerazione di gravità) compreso tra 100.000xg e 150.000xg per esempio a 110.000xg , 120.000xg, 130.000xg , 140.000xg e per un tempo inversamente proporzionale al valore g, cioè tra 120 e 60 min. In una forma di realizzazione specifica si è scelto per esempio 120.000xg per 90 minuti oppure 130.000xg per 80 min. I passaggi di ultracentrifugazione sono
10 eseguiti a temperatura refrigerata, preferibilmente sotto i 10°C per esempio a 4°C. Il liquido surnatante è scartato ed il pellet sedimentato è recuperato. Il pellet sedimentato così ottenuto contenente le nanovescicole può essere utilizzato per gli scopi terapeutici qui descritti A scopo esemplificativo e non limitativo, l'ultracentrifugazione può essere effettuata utilizzando l'ultracentrifuga Optima™ L-80 XP - Beckman Coulter con rotore
15 Type 70 T1.

c) Al fine d'ottenere le nanovescicole in forma purificata e con maggiore attività biologica, si può sottoporre il pellet recuperato a ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio.

Tale ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio è eseguita ad un valore di g
20 compreso (tra 100.000x g e 150.000x g per esempio a 110.000xg , 120.000xg, 130.000xg , 140.000xg e per un tempo inversamente proporzionale al valore g, cioè tra 120 e 60 min. su un gradiente di saccarosio con densità compresa tra 30% e 45%.

In particolare, le soluzioni di saccarosio da 30% a 45% sono posizionate al fondo di un tubo da ultracentrifuga e il pellet del passaggio b) comprendente le vescicole è
25 stratificato sulla soluzione di saccarosio. A scopo esemplificativo e non limitativo, l'ultracentrifugazione può essere effettuata utilizzando l'ultracentrifuga Optima™ L-80 XP - Beckman Coulter con rotore SW28.. Dopo l'ultracentrifugazione si forma un cuscinetto di saccarosio che comprende le nanovescicole con densità tra 1.12 e 1.19g/ml.

d) Infine si isola dal gradiente di saccarosio la frazione avente preferibilmente densità compresa tra 1.12 e 1.19g/ml e comprendente le nanovesicole dell'invenzione.

Successivamente allo scopo di eliminare i residui di saccarosio presenti nella preparazione, la frazione isolata può essere sottoposta ad un passaggio (e) di
5 ultracentrifugazione alle stesse condizioni descritte per il passaggio (b). Preferibilmente, l'ultracentrifugazione è effettuata a 100.000xg per circa 90 minuti a bassa temperatura: e.g. 4°C.

Infine, il pellet sedimentato al passaggio (e) può essere lavato una o più volte con soluzione fisiologica.

10

Per quanto riguarda la fase preparatoria o preliminare (a) è evidente che questa può comprendere qualsiasi combinazione di centrifugazioni e filtrazioni, di valori di "g", di tempi di centrifugazione e di porosità filtrante, nella misura in cui è tale combinazione permette di rimuovere dal succo ogni componente solida ed ogni elemento del succo ad
15 alta densità.

In particolare, questa fase comprende necessariamente una o più passaggi di centrifugazione ad un valore g compreso tra 15.000 e 20.000 seguiti o alternati ad una o più filtrazioni. Ogni centrifugazione potrà essere eseguita per esempio a 15.500xg, 16.000xg, 16.500xg, 17.000xg, 17.500xg, 18.000xg, 19.000xg, per un tempo
20 inversamente proporzionale al valore "g", compreso tra 240 e 60 min per centrifugazione. I passaggi di centrifugazione sono alternati a passaggi di filtrazione con filtri di porosità compresa tra circa 0.80 µm (micron) e circa 0.45 µm (micron). In una forma di realizzazione dell'invenzione la fase (a) comprenderà una prima centrifugazione per esempio a 16500xg per un tempo di 60-90 minuti, seguita da una
25 filtrazione con pori non inferiori di circa 0.45 micron seguita da una seconda centrifugazione a stesso valore di "g" per un tempo più lungo, per esempio 180-240 minuti.

La fase preparatoria (a) può ancora comprendere uno o più cicli preliminari di centrifugazione a basso valore di "g" per rimuovere dal succo i materiali solidi più
30 grossolani o gli elementi del succo a densità maggiore. Questa fase può anche comprendere uno o più passaggi di filtrazione. Le centrifugazioni sono eseguite a valore

“g” compreso tra 2500xg e 11.000xg. In una forma di realizzazione specifica, si possono prevedere più passaggi consecutivi a valore “g” crescente, per un periodo compreso tra 20 e 90 minuti per centrifugazione. Per esempio si potrà eseguire una prima centrifugazione a 2500xg, 3000xg o 3500xg per 20-30 minuti seguita da una seconda centrifugazione a 9500g, 10.000g o 10.500g per 55-70 minuti. Il ciclo di centrifugazioni può essere seguito da una filtrazione su filtro a porosità non inferiore a 0,80 micron.

È chiaro che dopo ogni passaggio di centrifugazione nella fase (a), il surnatante sarà raccolto e sottoposto ai passaggi successivi, mentre i materiali o le frazioni sedimentate saranno scartate.

Una forma di realizzazione esemplificativa del procedimento dell'invenzione nella sua totalità è descritta nella parte sperimentale al capitolo intitolato “Preparazione delle nanovesicole”.

La quantificazione delle nanovesicole è stata determinata mediante Bradford assay.

15 **Le vescicole**

Le nanovesicole dell'invenzione, ottenute attraverso il procedimento sopra descritto, sono caratterizzate da una densità in gradiente di saccarosio, compresa tra 1.12 e 1.19 g/ml e uno specifico profilo proteomico. Le nanovesicole vegetali dell'invenzione sono paragonabili agli esosomi tipici delle cellule di mammifero. Anch'esse hanno un diametro di dimensioni comprese da circa 30 a circa 100 nm, più frequentemente tra 40 nm e 70 nm, per esempio 50 nm o 60 nm. (Le dimensioni sono determinate mediante analisi dynamic light scattering (DLS) come descritto in Viktoriya Sokolova et al (9).

Le nanovesicole presentano anche morfologia simile a quella degli esosomi di mammiferi: vale a dire, piccole vescicole extracellulari costituite da un doppio strato lipidico, da proteine e contenenti al loro interno acidi nucleici. Dalla caratterizzazione proteomica emerge che circa il 56,7% delle identificazioni, consiste in proteine già descritte negli esosomi di mammifero ed appartenenti ai seguenti gruppi funzionali proteici: proteasoma, proteine heat shock, citoscheletro, sistema dell'ubiquitina, trasportatori, enzimi amminoacidi correlati, biogenesi trasferimento RNA, proteine ribosomiali, fattori di traduzione, enzimi metabolici, fosfatasi e proteine ad esse associate, chinasi, proteine leganti il GTP, proteine coinvolte nella biogenesi di

vescicole e traffico di membrana. Inoltre sono caratterizzate da uno specifico profilo proteico che è stato analizzato mediante due differenti approcci proteomici: gel-free e gel-based. Le analisi sono state condotte utilizzando il Triple-TOF 5600 Plus ed hanno evidenziato che le proteine contenute nelle vescicole dell'invenzione sono omologhe a
5 quelle contenute negli esosomi di mammiferi. In particolare, le proteine più frequenti nelle nanovescicole qui descritte sono comprese nel gruppo comprendente la subunità regolatoria 5 non -ATPasica del proteasoma 26S (K06692) ; proteina ARF1 (K07937); annessina A7/11(K17095), acquaporina PIP(K09872), subunità alpha/atp1 della ATP sintasi (E5DK62); subunità beta della ATP sintasi trasportatore H⁺ tipo F (K02133) ;
10 proteina ABCF1 (K06184); citrato sintasi (K01647); fattore dell'inizio della traduzione 4G(K03260); fattore di allungamento1-beta(K03232); fattore di allungamento 1-gamma(K032339; fattore di allungamento 2(K03234); subunità TSG101 del complesso ESCRT-I (K12183); subunità VPS28 del complesso ESCRT-I (K12184); subunità VPS37 del complesso ESCRT-I (K12185); fattore di iniziazione della traduzione
15 2C(K11593); esportina-1(K14290); esportina-2 (K18423); proteina HSP70 (K03283); proteina HSP90(F1CGQ9) ; proteina HSP20 (K13993); proteina ribosomiale L10e (K02866); proteina ribosomiale L13A (K02872); lisofosfolipasi II (K06130),SNARE vegetale (K08494); fosfolipasi C(K01114) ; proteina SEC31 (K14005); proteina Rab-11A (K07904); ; proteina Rab-7a (K07897); serpina B (K13963); proteina ribosomiale
20 S12e (K02951); proteina ribosomiale S5e (K02989);proteina ribosomiale S7e (K02993); proteina ribosomiale S9e (K02997); subunità della succinato deidrogenasi ((K00234); fattore di inizio della traduzione 4A (K03257) ; trasportina-1 (K18752); ubiquitina-C (K08770); attivatore dell'ubiquitina (E1)(K03178); proteina VPS35 (K18468); proteina VPS4 (K12196); proteina di interazione con t-SNAREs 1 (K08493);
25 proteina associata alle membrane delle vescicole 7(K08515).

Attività terapeutica

I dati di seguito riportati dimostrano che le nanovescicole isolate dal succo di frutto di piante del genere Citrus, quale per esempio il *Citrus Limon* L. (famiglia Rutaceae)
30 hanno attività antineoplastica *in vivo* su modello animale e *in vitro*, su un pannello di differenti linee cellulari di tumori solidi ed ematologici, quali cancro (adenocarcinoma)

colon-rettale, cancro del pancreas, del polmone, del rene, delle ovaie, del fegato, della tiroide, della vescica, del seno, dell'esofago, della pelle; leucemia; leucemia mieloide cronica e mieloma multiplo.

In maniera del tutto sorprendente le vescicole dell'invenzione si sono dimostrate attive
5 non soltanto su linee cellulari tumorali sensibili, ma anche su linee resistenti ai comuni chemioterapici, quali l'erlotinib o gefitinib, nonché in un modello *in vivo* di leucemia mieloide cronica (CML) sensibile o resistente all'imatinib.

Pertanto, le nanovesicole dell'invenzione trovano applicazione nel trattamento preventivo e curativo di un ampio spettro di neoplasie sia come singoli agenti terapeutici
10 capaci di sviluppare autonomamente un effetto terapeutico, sia in combinazione con altri chemioterapici al fine d'ottenere un effetto addizionale, complementare o sinergico, sia in un pre-trattamento di sensibilizzazione di cellule tumorali ad un successivo trattamento con un chemioterapico, soprattutto cellule tumorali resistenti al chemioterapico stesso.

15 Senza voler legare e limitare l'invenzione a specifiche teorie, i risultati conseguiti dimostrano che le nanovesicole dell'invenzione inducono l'arresto della proliferazione delle cellule tumorali mediante l'attivazione della via estrinseca di apoptosi mediata dalla proteina TRAIL, sia *in vitro* che *in vivo*. TRAIL induce apoptosi nelle cellule bersaglio che esprimono il recettore di morte DR5, senza influenzare la vitalità delle
20 cellule normali. L'attivazione del pathway mediato da TRAIL porta all'incremento dell'espressione di geni pro-apoptotici (Bad, Bax) e alla diminuzione di geni anti-apoptotici (Bcl-x1, survivin). TRAIL induce apoptosi preferenzialmente in cellule tumorali, ma non in cellule normali. E' stato inizialmente proposto che l'induzione di apoptosi mediata da TRAIL, preferenzialmente in cellule tumorali, sia dovuta al fatto
25 che i recettori di morte TRAIL-R1 e TRAIL-R2 sono espressi soprattutto in tali cellule, quindi la regolazione dell'apoptosi TRAIL-indotta potrebbe, almeno in parte, essere determinata dall'espressione di detti recettori.

[Tutti insieme, questi risultati evidenziano che l'utilizzo di nanoparticelle da *Citrus limon* rappresenta un approccio alternativo per il trattamento del cancro. L'origine naturale del loro
30 contenuto risulta non tossica per le cellule normali inducendo invece l'arresto del processo proliferativo di cellule tumorali, avviandole verso la morte.]

PARTE SPERIMENTALE

Preparazione delle nanovesicole

A titolo esemplificativo, le nanovesicole sono state isolate da succo di *Citrus limon* L.

5 Il succo è stato centrifugato prima a 3000g per 30 minuti, poi a 10000g per 1 ora. Il sovrantante è stato poi sottoposto a filtrazione con filtri con pori da 0.8 μm e centrifugato a 16500xg per 1 ora. Il sovrantante è stato nuovamente sottoposto a filtrazione con filtri con pori da 0.45 μm e centrifugato a 16500xg per 3 ore. Il sovrantante è stato poi ultracentrifugato per 90 minuti a 120000xg. Il pellet così

10 sedimentato e contenente le nanovesicole è stato raccolto e sottoposto a ultracentrifugazione a 100.000 g (forza centrifuga) in gradiente di saccarosio al 30-45% saccarosio, per 90 minuti. Successivamente è stata recuperata la frazione di densità compresa tra 1.12 e 1.19g/ml, sottoposta ad ultracentrifugazione e lavato poi più volte in PBS. La quantificazione delle nanovesicole è stata determinata mediante Bradford

15 assay di seguito descritto.

Vescicole essenzialmente identiche sono state ottenute rimuovendo la centrifugazione a 3000xg, e centrifugando a 10.000xg per 90 minuti; oppure eseguendo la prima centrifugazione a 2500xg per 40 minuti o a 3500xg per 20 min; oppure eseguendo la seconda centrifugazione a 9500xg per 80 minuti o a 10500xg per 50 minuti; oppure la

20 terza centrifugazione a 15500xg o a 17500xg rispettivamente per 70 e 50 minuti; oppure la quarta centrifugazione ugualmente a 15500xg o a 17500xg per 200 minuti e 150 minuti rispettivamente.

Vescicole essenzialmente identiche sono state ottenute conducendo l'ultracentrifugazione a 110.000xg o a 130.000xg rispettivamente per 110 e 80 minuti.

25

Quantificazione delle nanovesicole mediante Bradford assay

In particolare, tale saggio consente di conoscere la concentrazione dell'estratto proteico grazie ad una reazione colorimetrica dovuta all'interazione della soluzione Coomassie con specifici aminoacidi (istidina, arginina e aminoacidi aromatici); tale legame produce

30 un viraggio del colore, dal marrone al blue, in modo proporzionale alla quantità di proteine presenti nell'estratto.

Tale saggio è eseguito, diluendo la frazione selezionata di vescicole in PBS, aggiungendo la soluzione di Coomassie e valutando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 595 nm. Preferibilmente, è effettuata una diluizione 1:5 della frazione selezionata in PBS. Circa 50 µl di tale diluizione vengono poi aggiunti a 1.5 ml della soluzione
5 Coomassie protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA) e l'assorbanza valutata al Biofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm. I valori ottenuti sono azzerati contro il bianco (1.5 ml della sola soluzione Coomassie protein assay kit e 50 µl di PBS). La concentrazione finale in µg/µl è ottenuta dividendo il valore medio di assorbanza di ogni campione per il valore di pendenza di una curva di BSA (sieroalbumina bovina),
10 costruita precedentemente da diluizioni seriali di una concentrazione nota della proteina; il valore ottenuto è moltiplicato per il fattore di diluizione.

Le vescicole sono state caratterizzate mediante microscopio elettronico (**Figura 1a**): le nanovesicole risospese in PBS sono state piastrate su un carbon-coated grids e colorate
15 con 2% acido fosfotungstico. La preparazione ottenuta è stata visualizzata mediante microscopio elettronico a trasmissione JEOL JEM-1400 Plus transmission electron microscope, a 110kV.

Le dimensioni delle vescicole (50-70 nm) sono state analizzate al DLS (dynamic light scattering, **Figura 1b**) e mediante approccio proteomico (**Figura 1c**). Come mostrato in
20 figura 1, le nanovesicole isolate rappresentano una popolazione omogenea in dimensioni; inoltre l'analisi della composizione proteica delle vescicole rivela la presenza di proteine omologhe alle proteine caratteristiche degli esosomi di mammiferi. Vescicole equivalenti sono state ottenute attraverso lo stesso procedimento eseguito su *Citrus medica* (cedro), *Citrus paradisi* (pompelmo).

25 **Test di internalizzazione in cellule tumorali**

Linee cellulari:

Le cellule di leucemia mieloide cronica LAMA84 e LAMA84R (resistenti all'Imatinib), di adenocarcinoma del colon SW480 e di adenocarcinoma del polmone A549, CRL2868, CRL5908 (resistenti a erlotinib e gefitinib), sono state coltivate in RPMI
30 10% FBS. Le cellule stromali HS5 sono state coltivate in DMEM 10% FBS, le cellule

endoteliali HUVEC in Endothelial Growth Medium (EGM). Le cellule PBMC sono state isolate mediante tecnica di separazione con Ficoll Paque.

Valutazione dell'internalizzazione delle nanovesicole di Citrus nelle cellule A549 and LAMA84

5 Al fine di determinare se le vescicole di limone vengono internalizzate da cellule tumorali umane, le nanovesicole sono state marcate con il colorante lipofilico PKH26 (rosso) per 10 minuti a temperatura ambiente. Le cellule A549 e LAMA84 sono state seminate in vetrini collagenati e trattate con 20 µg/ml di nanovesicole marcate per 3 e 6h. Le cellule sono state poi marcate con Actin green (verde-actina) e Hoechst (blu-
10 nuclei) e analizzate al microscopio confocale. Come mostrato in **Figura 1d**, le cellule A549 (cellule epiteliali umane di adenocarcinoma del polmone) e le cellule di leucemia mieloide cronica LAMA84, trattate per 3 e 6 ore con le vescicole di limone internalizzano le vescicole di limone (le frecce indicano le cellule che hanno internalizzato le vescicole marcate) con efficacia tempo dipendente.

15 **Test di attività antiproliferativa**

Saggio di vitalità cellulare MTT

La vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio MTT. Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti e trattate per 24,48 e 72h con 5-20 µg/ml di nanovesicole. L'MTT è un colorante vitale che, penetrando nelle cellule, viene ridotto dalla
20 deidrogenasi mitocondriale. Per ogni pozzetto contenente 100 µl di sospensione cellulare sono stati aggiunti 10 µl di MTT e le piastre mantenute per 4 ore in incubatore a 37°C. Al termine dell'incubazione le cellule sono state lisate mediante aggiunta di 150 µl di isopropanolo-HCl 0,05M per pozzetto con conseguente fuoriuscita del colorante dalle cellule stesse. L'enzima mitocondriale è attivo soltanto nelle cellule vive, e la sua
25 funzione consiste nel tagliare l'anello di tetrazolio dell'MTT (sostanza di colore giallo) con la formazione, di conseguenza, di formazano (un sale blu). Pertanto, l'intensità della colorazione è proporzionale al numero di cellule vive e viene valutata tramite un lettore di piastra ELISA alla lunghezza d'onda di 540 nm; i valori di densità ottica (O.D.) sono stati azzerati contro il bianco (100 µl di terreno di coltura cellulare, 10 µl di MTT e 150
30 µl di isopropanolo-HCl). Come mostrato in **Figura 2**, il trattamento di cellule di cancro al colon (SW480), polmone (A549, CRL2868, CRL5908 resistenti a erlotinib e

gefitinib) e leucemia mieloide cronica sensibili e resistenti all'Imatinib (LAMA84S, LAMA84R) con nanovesicole di limone, porta ad una diminuzione dose e tempo dipendente della vitalità cellulare. Lo stesso effetto non si osserva in cellule non tumorali (cellule endoteliali, stromali, cellule mononucleate del sangue periferico).

5 **Test di attività apoptotica**

Estrazione di RNA e Real time PCR

LAMA84, A549 e SW480 sono state piastrate in piaster da 12 pozzetti e trattate con 5 e 20 µg/ml di nanovesicole per 24 e 48 hours. Le biopsie tumorali sono state conservate in RNAlater (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). RNA è stato isolato
 10 mediante l'utilizzo di un kit commerciale RNA spin Mini Isolation Kit (GE Healthcare). L'RNA totale è stato poi retrotrascritto in cDNA (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystem). Il cDNA così ottenuto è stato sottoposto a Real time PCR quantitativa utilizzando piastre da 48 pozzetti Step-One Real-Time PCR system(Applied Biosystem) mediante utilizzato di primers specifici per i seguenti geni:

15

GAPDH:	5'ATGGGGAAGGTGAAGGTCG3' (SEQ ID NO:1), 5'GGGTCATTGAT GGCAACAATAT3' (SEQ ID NO:2);
Bad:	5'CCGAGGAGCAGGAAGACTC'3(SEQ ID NO:3), 5'GGTAGGAGCTGTGGCGACT'3, (SEQ ID NO:4)
Bax:	5'CCTGTGCACCAAGGTGCCGGA ACT3'(SEQ ID NO:5), 5'CCACCCTGGTCTTGGATCCAG CCC3'(SEQ ID NO:6);
Survivin:	5'CTCAAGGACCACCGCATCTC'3(SEQ ID NO:7), 5'CAGCCTTCCAGCTCCTTGAA'3(SEQ ID NO:8);
Bcl-xl:	5'CTGAATCGGAGATGGAGACC'3(SEQ ID NO:9), 5'TGGGATGTCAGGTC ACTGAA'3(SEQ ID NO:10);
TRAIL:	5'GCTCTGGGCCGCAA AAT'3(SEQ ID NO:11), 5'TGCAAGTTGCTCAGGAATGAA'3(SEQ ID NO:12);
Dr5:	5' GGGCCACAGGGACACCTT '3 (SEQ ID NO:13), 5' GCATCTCGCCCGGTTTT'3(SEQ ID NO:14);

Le variazioni del gene di interesse sono state normalizzate rispetto al contenuto di GAPDH utilizzando il metodo comparativo del $\Delta\Delta C_t$ per calcolare i cambiamenti di espressione che sono stati poi espressi come fold of induction.

Per valutare il meccanismo con cui le nanovesicole sono in grado di influenzare la crescita tumorale, abbiamo testato l'espressione di diverse molecole coinvolte nella via apoptotica. Come mostrato in **Figura 3**, le cellule A549, SW480 e LAMA84 trattate per 24 o 48 ore con le nanovesicole, mostrano un aumento dell'espressione dei geni pro-apoptotici, Bad e Bax, e una riduzione dei livelli di mRNA di geni antiapoptotici Survivin e Bcl-XL, in particolare dopo 48h di trattamento.

10 **Western Blot**

Le cellule A549, SW480, LAMA84 sono state trattate per 48 h con 20 μ g/ml di nanovesicole. Il lisato proteico ottenuto è stato analizzato tramite SDS-PAGE e Western Blotting. Gli anticorpi usati negli esperimenti sono: anti-BAX, BCL-xL and β -actin (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

15 L'aumento di espressione della proteina BAX (A549 4,5 fold, SW480 1,65 fold, 3,6 fold in LAMA84) e la diminuzione di BCL-xL (diminuzione 0,7 fold in A549, 0.88 volte in SW480, 0.82 volte in LAMA84) sono stati anche confermati da analisi di western blot (**Figura 3b**).

Attivazione dell'espressione genica di TRAIL

20 I risultati qui riportati mostrano inoltre che il trattamento con le nanovesicole induce un incremento dell'espressione genica di TRAIL (**Figura 4a**, pannello superiore) e DR5 (**Figura 4a**, pannello inferiore). L'aumento del rilascio della proteina TRAIL è stato confermato anche dal test ELISA, come mostrato in **Figura 4b**. La concentrazione proteica di TRAIL è stata determinata mediante ELISA kit (Uscn life Science Inc., Houston, TX, USA).

Nel complesso, i questi dati suggeriscono che le nanovesicole inducono morte cellulare in cellule tumorali attivando la via apoptotica dipendente da TRAIL / DR5.

Attività antitumorale *in vivo* su modello di leucemia mieloide cronica

Modello xenograft in vivo di CML

30 Topi NOD/ SCID mice (Charles River Laboratories International, Inc, MA, USA) sono stati inoculati nel fianco destro con le cellule di leucemia mieloide cronica LAMA84 (2

x 10⁷ cellule in 0.2 ml di PBS). Sette giorni dopo l'inoculo i topi sono stati trattati con le nanovesicole di limone (50µg/topo, 3 volte a settimana per 2 settimane) sia per via intraperitoneale (IP) che intramassa (IT). I tumori sono stati misurati 3 volte a settimana. Alla fine del trattamento i topi sono stati sacrificati e i tumori prelevati per le analisi di espressione genica e immunofluorescenza.

Immunofluorescenza

I tumori sono stati fissati in 10% formalina e inclusi in paraffina. Sezioni di 5-µm sono state usate per analisi di immunofluorescenza. Le sezioni sono state incubate con anticorpo anti-TRAIL (Abcam) e analizzate al microscopio confocale.

10 **Saggio *in vivo***

La capacità delle nanovesicole di inibire la crescita del tumore è stato testato anche in un modello *in vivo* di leucemia mieloide cronica. Le cellule LAMA84 sono state inoculate sottocute in topi NOD / SCID; una settimana dopo l'inoculo, i topi sono stati trattati a livello locale (intra tumore, IT) o per via intraperitoneale (IP) tre volte alla settimana con il veicolo (PBS) o con le nanovesicole di limone. Alla fine del trattamento, i topi sono stati sacrificati ed i tumori rimossi. La **Figura 5a** mostra che la crescita tumorale è ritardata nei topi trattati con le nanovesicole, sia localmente che per via intraperitoneale (pannello di sinistra), portando alla formazione di tumori più piccoli rispetto ai topi controllo (pannello destro). Analisi di Real-time PCR nei tumori isolati in vivo confermano i dati ottenuti in vitro; come mostrato in **Figura 5b**, nei topi trattati con nanovesicole si osserva l'incremento dei geni proapoptotici Bad e Bax e la diminuzione dei geni antiapoptotici, Survivin e Bcl-XL. Inoltre osserviamo l'aumento di TRAIL e DR5. I risultati sono stati confermati da analisi di immunofluorescenza per TRAIL; si è osservato un aumento del numero di cellule positive a TRAIL (indicate dalle frecce) nei tumori dei topi trattati localmente o per via intraperitoneale agrumi rispetto ai topi di controllo (**Figura 5c**). Questi dati suggeriscono che le nanovesicole sono in grado di ridurre la crescita del tumore attivando la via apoptotica TRAIL-mediata.

Studio della capacità di targeting della massa tumorale

30 **Biodistribuzione *in vivo* delle nanovesicole**

Le nanovesicole sono state marcate con il colorante lipofilico DiR per 30 minuti a temperatura ambiente. Le nanovesicole marcate sono state iniettate per via intraperitoneale nei topi con gli xenograft di CML. I topi sono stati anestetizzati e l'acquisizione della fluorescenza è stata effettuata mediante IVIS (Living Image
5 Software; PerkinElmer LifeSciences) dopo 15 minuti, 1 ora o 24 ore dall'inoculo. Dopo 24 ore i topi sono stati sacrificati, gli organi e i tumori prelevati e la fluorescenza misurata.

Saggio *in vivo*

Al fine di valutare se le nanovesicole di limone riducono la crescita tumorale in vivo
10 raggiungendo il sito tumorale, le nanovesicole sono state marcate con il colorante lipofilico DiR (1,10-dioctadecyl-3,3,30,30-tetramethylindotricarbocyanine). La biodistribuzione delle nanovesicole è stata valutata dopo 15 minuti, 1 ora e 24h dall'inoculo intraperitoneale delle vescicole marcate. Come mostrato in **Figura 6a**, le vescicole raggiungono velocemente il sito tumorale (già dopo 15 minuti), rimanendo
15 associate al tumore fino a 24 ore (le frecce indicano la distribuzione delle nanovesicole marcate nel sito tumorale). L'analisi degli organi prelevati 24 ore dopo l'inoculo delle nanovesicole mostra che queste, così come la sonda libera, si accumulano nel fegato, milza e reni. Inoltre, l'analisi dei tumori mostra che le nanovesicole vengono internalizzate nella massa tumorale e restano nel sito, mentre nessun accumulo di
20 fluorescenza si osserva nel tumore prelevato dal topo trattato con la sonda libera (**Figura 6b**).

Analisi statistica

Tutti gli esperimenti in vitro sono stati ripetuti almeno tre volte al fine di ottenere un risultato riproducibile. I dati sono espressi come valori medi \pm deviazione standard di tre
25 esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata eseguita mediante t-test. Le differenze sono state ritenute significative quando $p \leq 0.05$.

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento di ottenimento di nanovesicole dal succo di frutti di pianta del genere *Citrus* comprendente i seguenti passaggi:
 - a) si centrifuga e si filtra il succo in uno o più cicli consecutivi;
 - 5 b) si ultracentrifuga il succo ottenuto al passaggio (a) con ottenimento di un liquido surnatante e di un pellet di sedimentazione contenente le nanovesicole e si recuperano le vescicole.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1 comprendente i seguenti ulteriori passaggi:
 - 10 c) si sottopone il pellet recuperato a ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio;
 - d) si isola la frazione avente densità compresa tra 1.12 e 1.19 g/ml;
 - e) opzionalmente si sottopone la frazione ad ultracentrifugazione;
 - f) opzionalmente si lava il pellet con soluzione fisiologica.

- 15 3. Procedimento secondo la rivendicazione 1 o 2 in cui l'ultrafiltrazione al passaggio (b) e/o (e) è eseguita ad un valore tra 100.000xg e 150.000xg per un tempo tra 120 e 60 min.

- 20 4. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 2 o 3 in cui l'ultrafiltrazione in gradiente di saccarosio al passaggio (c) è eseguita ad un valore tra 100.000xg e 150.000xg per un tempo compreso tra 120 min e 60 min ad un gradiente % di saccarosio tra 45% e 30%.

- 25 5. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti in cui il passaggio (a) comprende almeno una centrifugazione ad un valore tra 15.000x g e 20.000x g per un tempo tra 60 e 180 min e una filtrazione con filtro a pori non minori di circa 0.45 µm (micron).

- 30 6. Procedimento secondo la rivendicazione 5 in cui il passaggio (a) comprende un primo ciclo di centrifugazioni da 3000xg a 10.000xg per un tempo tra 30 e 90

min/centrifugazione seguito da una prima filtrazione con filtro a pori non minori di 0.8 micron, ed un secondo ciclo di centrifugazioni da 15000xg a 17000xg per un tempo tra 70 e 100 min/centrifugazione seguito o intercalato da filtrazioni con filtro a pori non minori di circa 0.45 micron.

5

7. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti comprendente i seguenti cicli:

a) si centrifuga il succo a 3000xg per circa 30 minuti, poi a 10000xg per circa 60 minuti e si sottopone il surnatante a filtrazione con filtri con pori di 0.8 µm;

10 b) si centrifuga il filtrato del passaggio precedente ad un valore 16500xg per circa 60 minuti, si sottopone il surnatante a filtrazione con filtri con pori di 0.45 µm e si centrifuga nuovamente il filtrato a 16500xg per circa 180 minuti;

c) si ultracentrifuga il surnatante del passaggio precedente a 120000xg per circa 90 minuti con ottenimento di un surnatante e un pellet di sedimentazione
15 contenente le nanovesicole;

d) opzionalmente si recupera e si ultracentrifuga il pellet in gradiente di saccarosio tra 45% e 30% di saccarosio, ultracentrifugando ad un valore di circa 100.000x g per 90 minuti a 4°C,

e) si isola la frazione avente densità compresa tra 1.12 e 1.19 g/ml,

20 f) si ultracentrifuga la frazione al passaggio (e) alle stesse condizioni che in (c) ,

g) opzionalmente si lava con soluzione fisiologica.

8. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti in cui il succo è ottenuto da *Citrus limon L.*

25 9. Nanovesicole aventi densità compresa tra 1.12 e 1.19g/ml e dimensioni tra 50 e 70 nm ottenute col procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8 per uso in un trattamento terapeutico come principio attivo unico o in combinazione con uno o più principi attivi addizionali, a condizione che detti uno o più principi attivi addizionali non siano incapsulati nelle nanovesicole stesse.

30

10. Nanovescicole per uso in un trattamento secondo la rivendicazione 9 in cui il trattamento è trattamento preventivo o curativo di tumori solidi o ematologici.
11. Nanovescicole per uso in un trattamento secondo la rivendicazione 10 in cui il
5 tumore è un cancro del colon-retto, del pancreas, del polmone, del rene, delle ovaie, del fegato, della tiroide, della vescica, del seno, dell'esofago, della pelle, leucemia acuta, leucemia mieloide cronica e mieloma multiplo.
12. Nanovescicole per uso in un trattamento secondo le rivendicazioni 10 o 11 in cui il
10 cancro è resistente ai comuni chemioterapici, quali l'erlotinib, il gefitinib o l'imatinib.
13. Nanovescicole per uso in un trattamento secondo la rivendicazione 9 in cui il trattamento con le nanovescicole è un trattamento di sensibilizzazione delle cellule tumorali ad un successivo o concomitante trattamento con uno o più chemioterapici.
15
14. Nanovescicole per uso in un trattamento secondo la rivendicazione 13 in cui il trattamento con le nanovescicole è un trattamento di sensibilizzazione di cellule tumorali resistenti ai comuni chemioterapici.
- 20 15. Composizione farmaceutica contenente le nanovescicole secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 9 a 14 ed un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

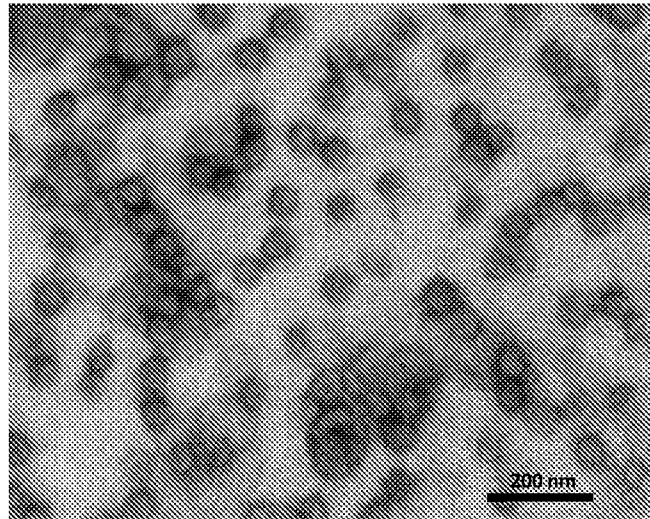


Figura 1a

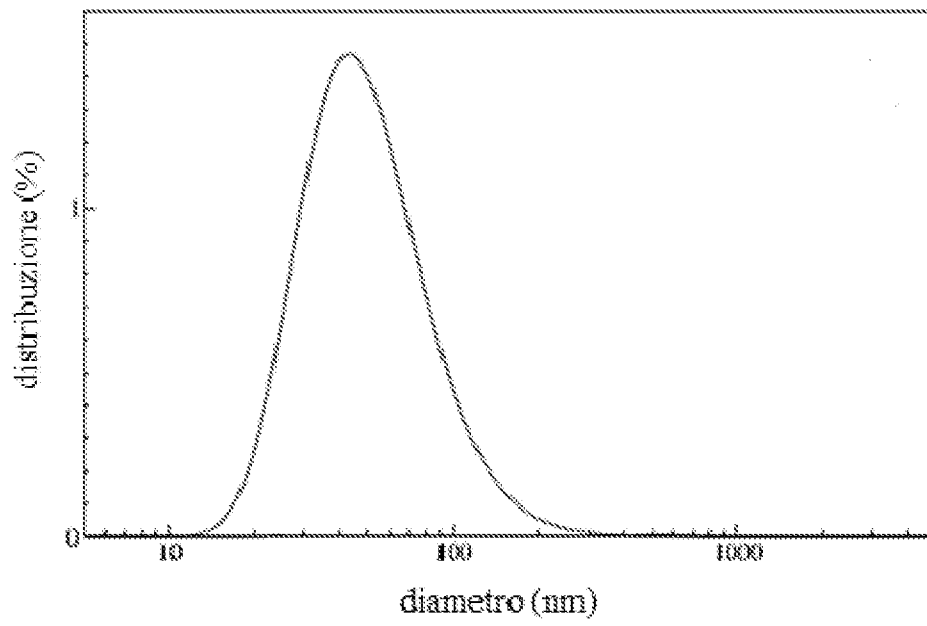


Figura 1b

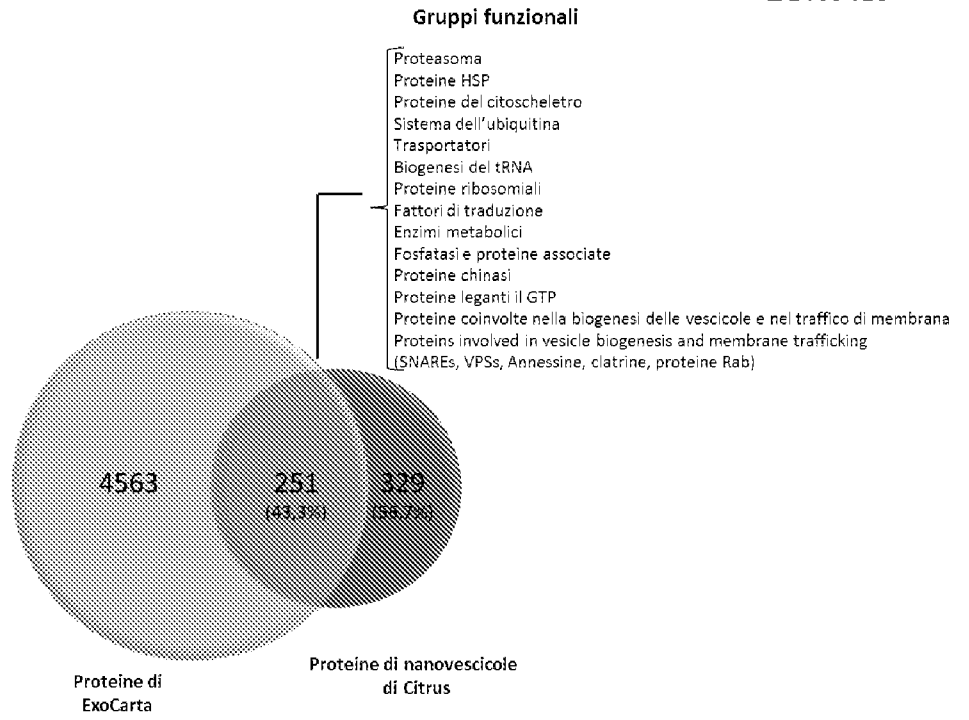


Figura 1c

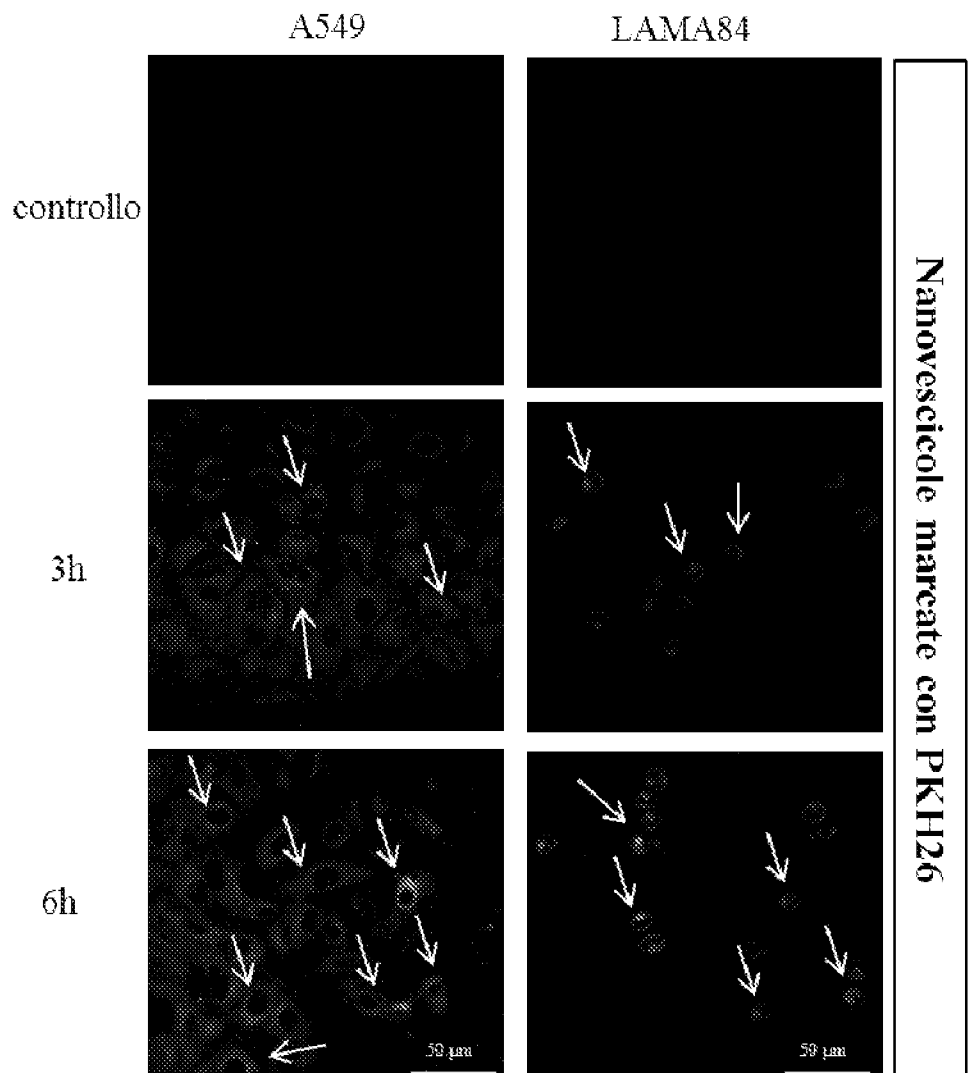


Figura 1d

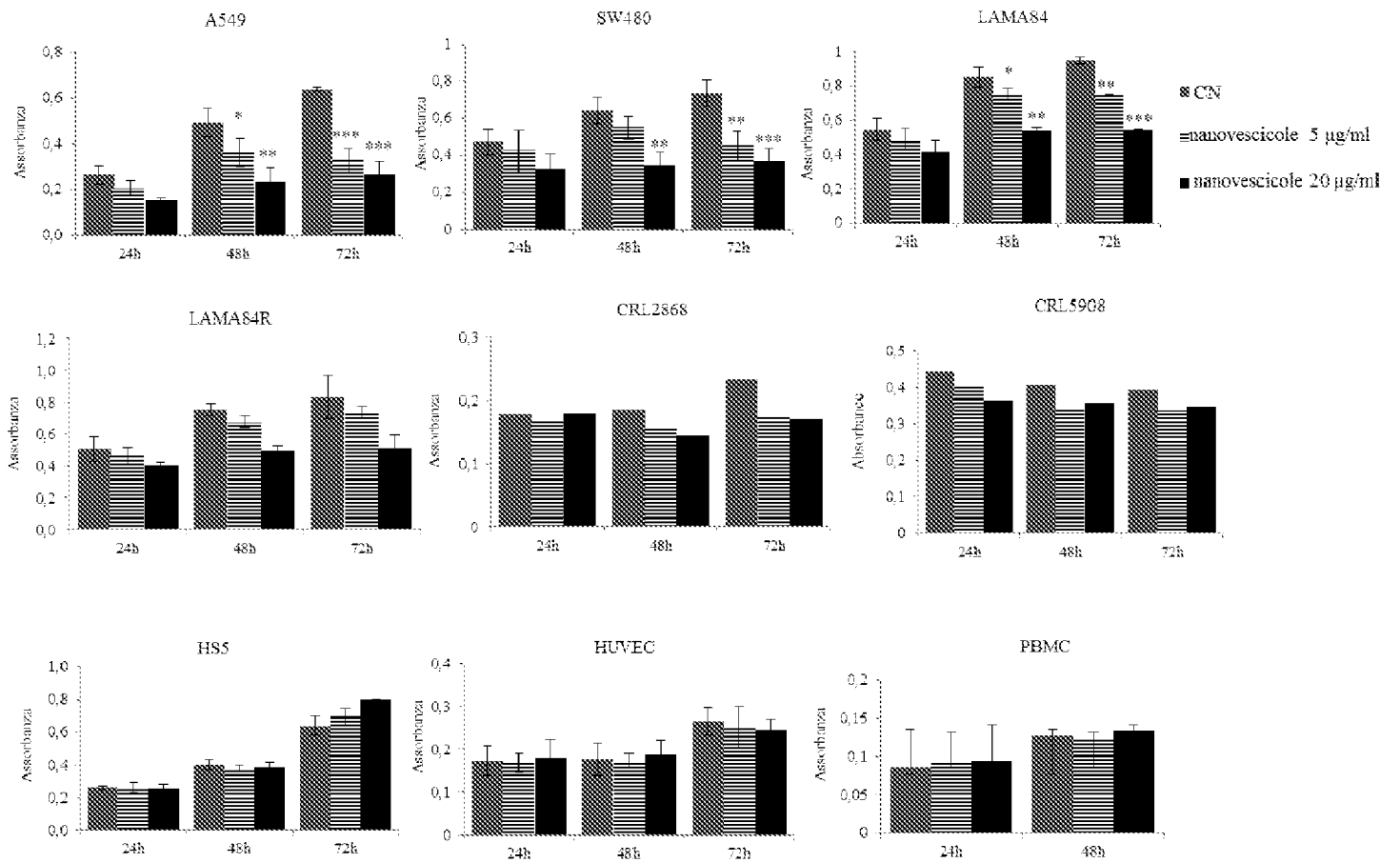


Figura 2

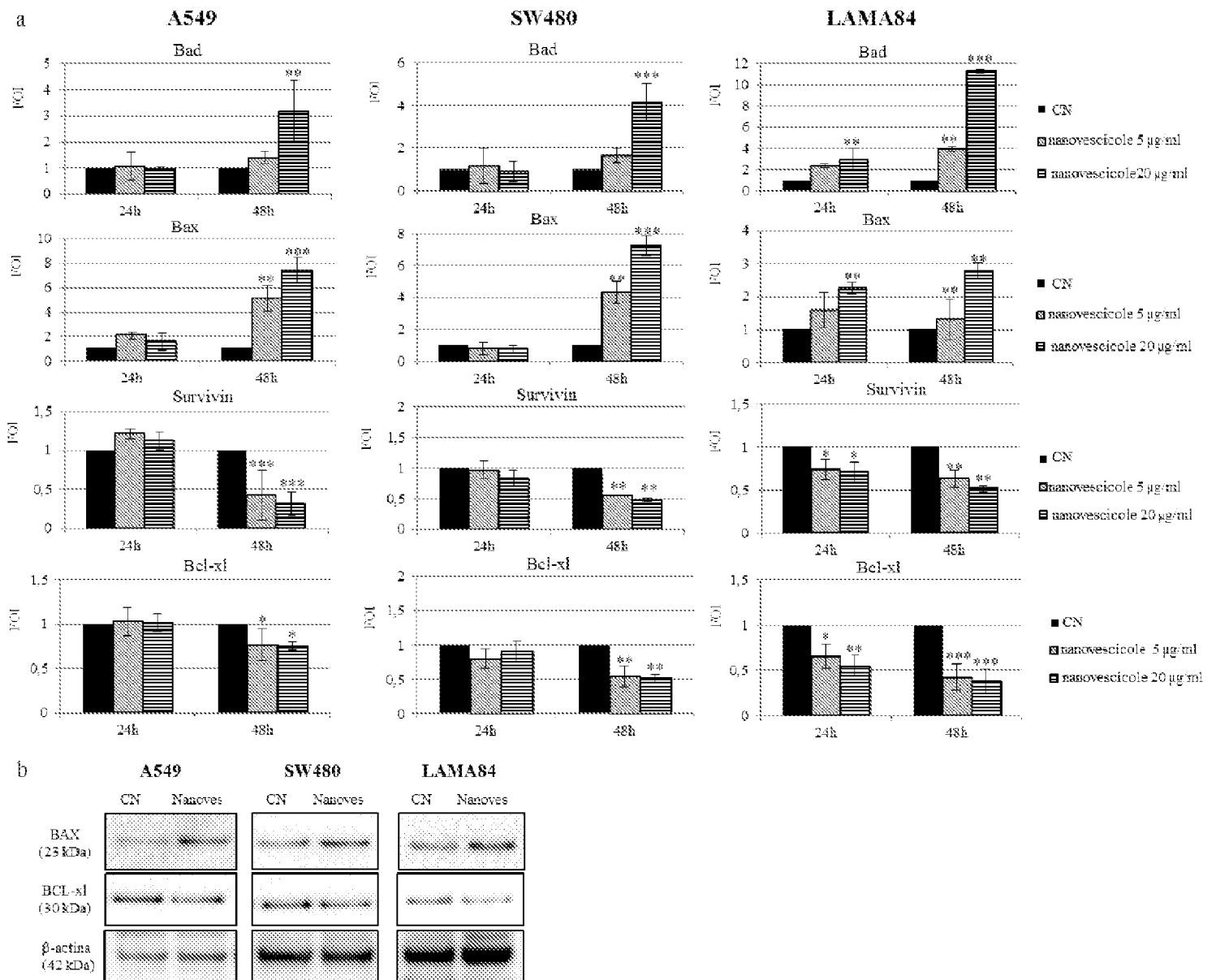


Figura 3

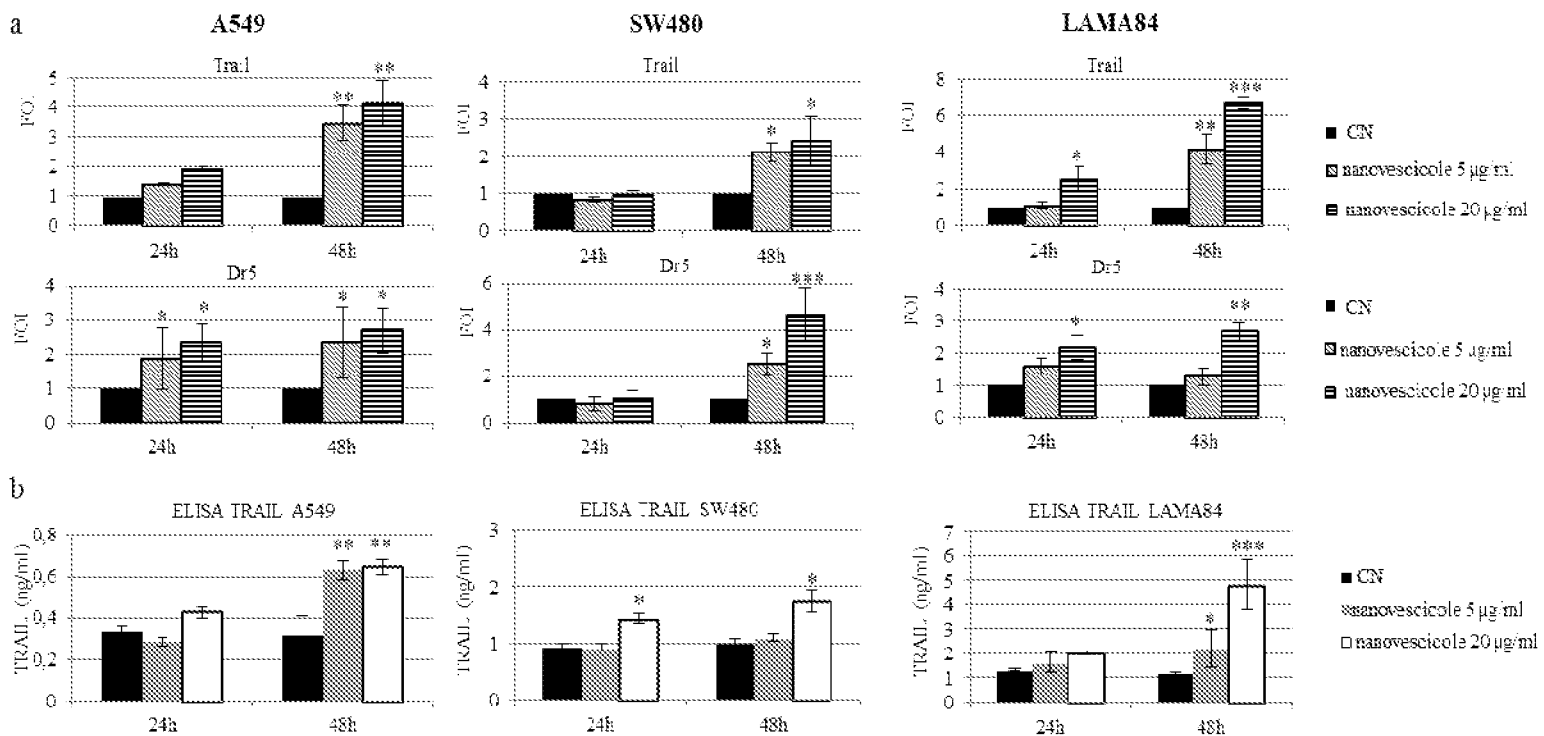


Figura 4

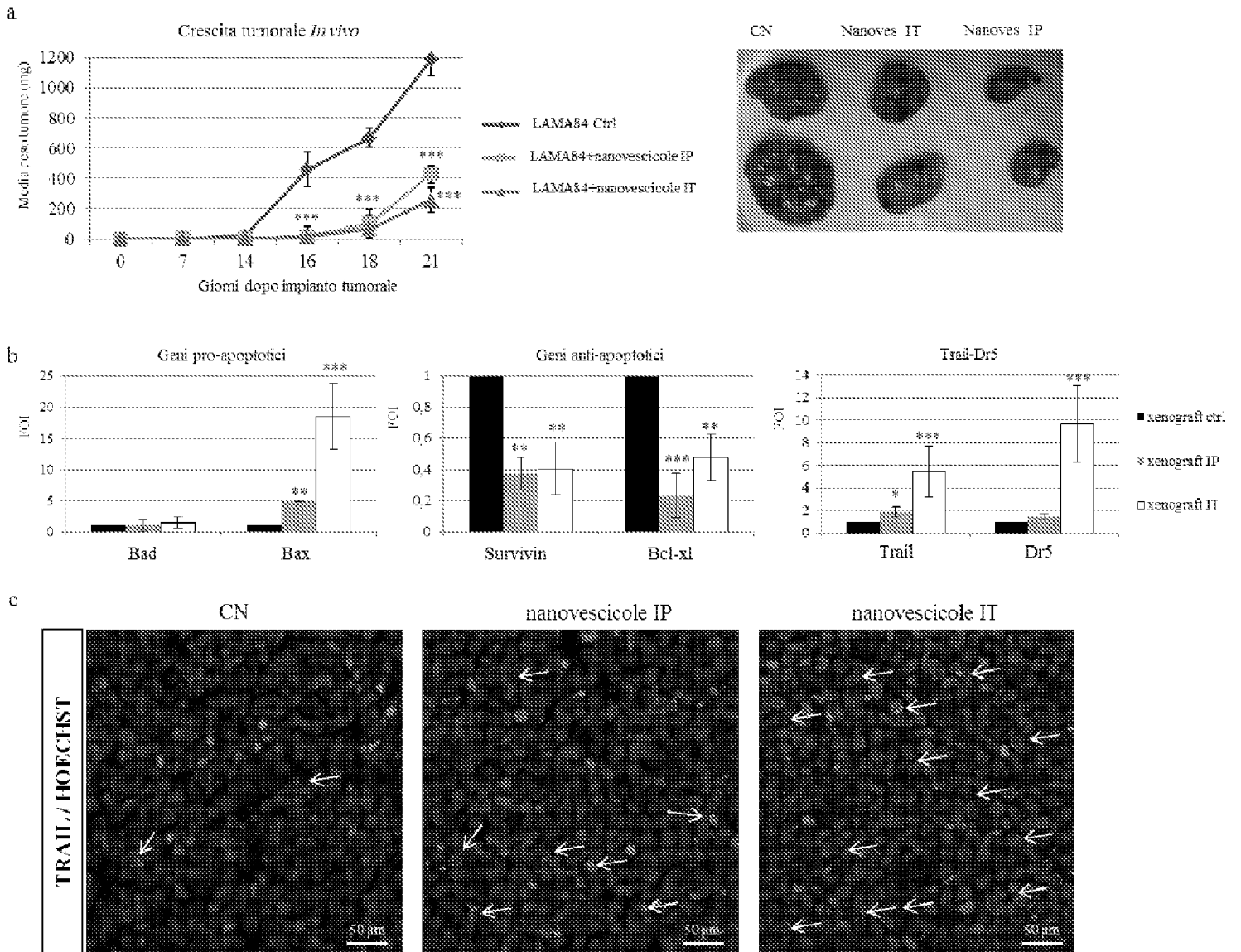


Figura 5

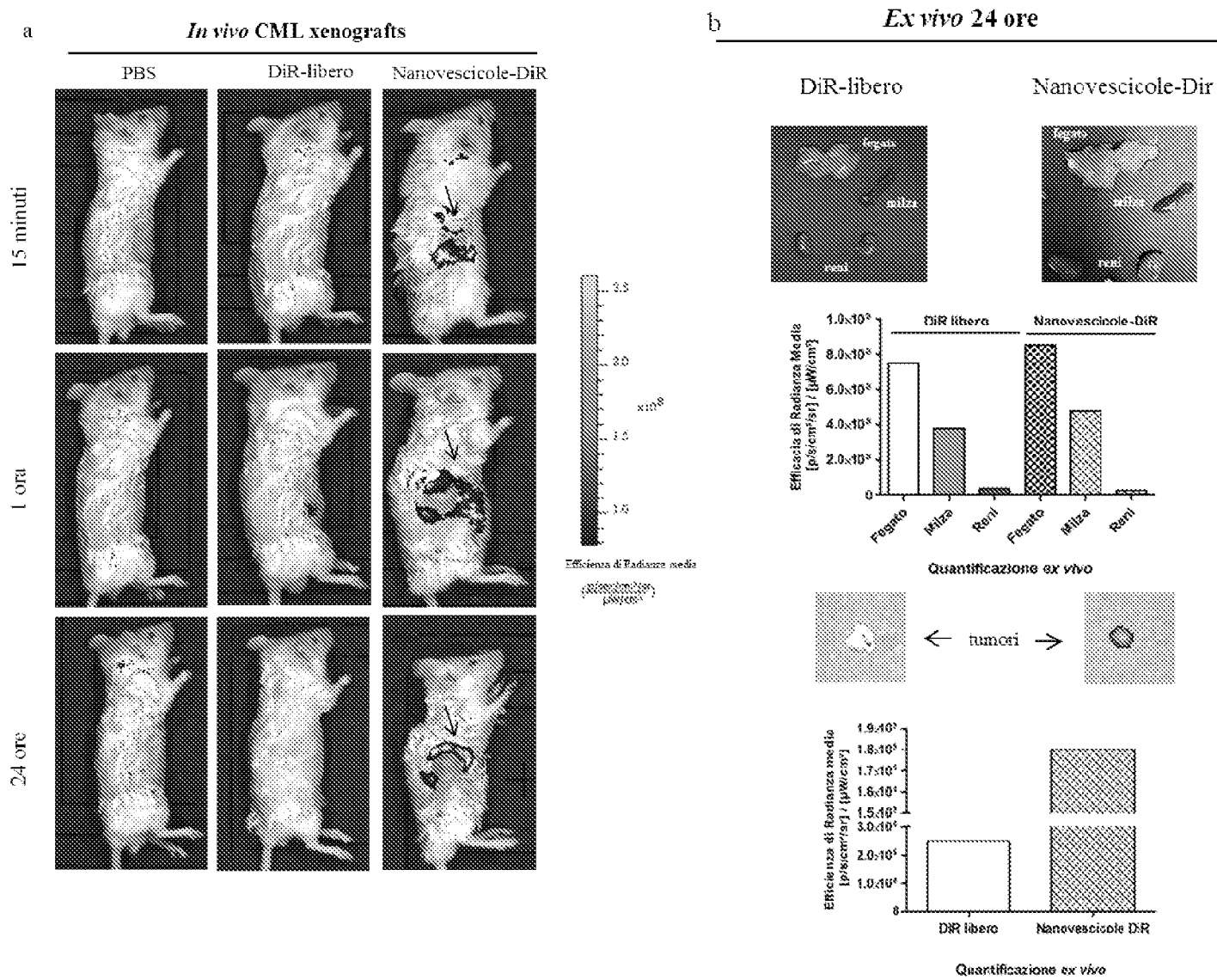


Figura 6