

## **RUOLO DELLE NANOVESCICOLE NEL TRASPORTO DI FARMACI E NANOPARTICELLE DI VARIA NATURA**

Stefano Fais, Luana Lugini, Cristina Federici, Mariantonia Logozzi, Tommaso Azzarito, Davide Mizzi, Rossella Di Raimo, Elisabetta Iessi

*Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

La nanomedicina è una delle più importanti aree di studio della ricerca medica, sia a livello di diagnosi che di terapia di pazienti e di soggetti sani. Le nanoparticelle e le vescicole extracellulari possono essere considerate due classi di modelli di biomimetismo della nanomedicina.

Crescenti evidenze dimostrano che i fluidi corporei contengono notevoli quantità di vescicole della dimensione di 30-1000 nm che sono rilasciate dalla maggior parte dei tipi cellulari umani sia di soggetti sani che malati. Tra le vescicole extracellulari molta importanza hanno assunto gli esosomi, di dimensione dai 30 ai 150 nm, derivanti dall'apparato endosomiale cellulare e le microvescicole, di dimensione dai 150 ai 1000 nm, che originano dalla membrana plasmatica. Queste vescicole trasportano molecole, come proteine, lipidi, metaboliti, acidi nucleici, sia costitutivi che cellula-specifici. Tale contenuto può essere trasferito alle cellule bersaglio mediante un processo di fusione e/o endocitosi. Le nanovesicicole sono anche in grado di indurre una funzione specifica nelle cellule bersaglio, mediante un legame recettore-ligando, per es. tra i recettori che inducono la morte cellulare per apoptosi, Fas/FasL (Cd 95 CD 95-L) TRAIL/TRAILR (*Tumor Necrosis Factor- Alfa –Related Apoptosis Ligand*) (1, 2).

Noi abbiamo dimostrato che i componenti lipidici della membrana plasmatica e il pH acido del microambiente cellulare rivestono un ruolo chiave nella regolazione del traffico degli esosomi nel melanoma umano (3).

Le nanovesicicole hanno diverse funzioni biologiche che giustificano il fatto che possano essere usate come agenti terapeutici nella risposta immunitaria, nei *trial* clinici e nel campo della medicina rigenerativa (4,5). Avendo poi anche un contenuto cellula-specifico, gli esosomi possono essere considerati delle riserve di bio-marcatori circolanti per una grande varietà di patologie umane.

I nostri studi precedenti hanno dimostrato che gli esosomi possono essere individuati, caratterizzati e quantificati dal plasma sia di donatori sani che di pazienti con tumore tramite un saggio immunoenzimatico chiamato EXOTEST (6). L'EXOTEST è un test ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) che utilizza una combinazione di due anticorpi, uno per la cattura degli esosomi e l'altro per la loro rivelazione. Generalmente per la cattura si utilizzano anticorpi specifici diretti verso marcatori esosomiali, come Rab5B, CD81 e CD63, oppure diretti contro proteine tumore-specifiche, come la caveolina-1. Per la rivelazione del segnale si usano specifici anticorpi secondari. Tramite questo saggio abbiamo evidenziato che nei pazienti con tumore il livello degli esosomi circolanti è più elevato che nei donatori sani. Risultato confermato anche dagli esperimenti condotti sui topi SCID. I nostri dati supportano quindi l'uso dell'EXOTEST non solo per caratterizzare quantitativamente e qualitativamente gli esosomi circolanti nel plasma di pazienti con tumore, ma anche come nuovo strumento in diagnostica.

Le ultime ricerche suggeriscono che gli esosomi possono veicolare molecole di natura chimica, come la curcumina, il cisplatino e la doxorubicina (7-9). Uno studio dimostra che la curcumina veicolata dagli esosomi è più efficace nel prevenire l'infiammazione al cervello che la curcumina da sola (10). Noi abbiamo dimostrato, inoltre, che gli esosomi rilasciati da tumori

trattati con il chemioterapico cisplatino, contengono il cisplatino nella forma chimica nativa/attiva (8). Quindi gli esosomi possono essere visti allo stesso tempo sia come sorgente di biomarcatori tumorali che come veicoli di sostanze in grado di raggiungere il tumore, di tracciarlo e contrastarlo.

Dati preliminari da noi ottenuti mostrano che gli esosomi di varie origini cellulari possono essere caricati con molecole, quali l'Arancio di Acridina (AO), che fungono allo stesso tempo sia da traccianti, essendo naturalmente fluorescenti, che da sostanze ad azione citotossica, in seguito a stimolazione con la luce ad opportune lunghezze d'onda (11). Questi risultati mostrano inoltre che l'Arancio di Acridina veicolata dagli esosomi è maggiormente concentrata e trattenuta per un tempo più lungo nelle cellule tumorali bersaglio. Evidenze sperimentali mostrano che gli esosomi sono acidi, e quindi molecole acidofile, come l'Arancio di Acridina, potrebbero essere considerate sostanze ideali da essere caricate in questo tipo di vescicole, perché facilmente trattenute e veicolate. Gli esosomi caricati con sostanze citotossiche potrebbero fungere sia da marcatori diagnostici che da agenti terapeutici diretti verso le lesioni neoplastiche.

Infine, ricerche recenti mostrano che gli esosomi sono in grado di trasportare diversi tipi di RNA (12, 13) e una grande varietà di virus, tra cui l'EBV (*Epstein Barr Virus*) (14). Si può quindi ipotizzare che in un futuro molto vicino le nanovesicole possano rappresentare uno strumento utile anche per lo screening e la diagnosi di malattie virali.

Abbiamo inoltre evidenziato la presenza negli esosomi della proteina prionica (15) e di molecole di RNA capaci di essere trasferite dalle cellule somatiche alle cellule germinali, per mezzo degli esosomi (16, 17). Tutti questi dati suggeriscono fortemente che saggi basati sull'utilizzo degli esosomi, possono rappresentare dei nuovi strumenti per lo screening di malattie trasmissibili.

Alla luce di queste premesse, gli obiettivi della ricerca che verrà effettuata nell'ambito del presente progetto sono:

- 1) verificare se gli esosomi sono in grado di veicolare nanomateriali (come ad esempio il titanio) tramite studi preclinici, sia *in vitro* utilizzando i macrofagi e gli esosomi da questi rilasciati, sia *in vivo* usando topi trattati a diversi dosaggi con nanomateriali;
- 2) verificare se nel plasma di pazienti a cui sono state impiantate protesi a base di nanomateriali, ritroviamo tale materiali negli esosomi circolanti.

I nostri studi preliminari sulle vescicole extracellulari, considerate come marcatori diagnostici e come possibili vettori terapeutici, hanno stimolato l'interesse e l'attenzione di diverse industrie farmaceutiche. Infatti, piccole e grandi compagnie farmaceutiche, il cui elenco è riportato di seguito, stanno sfruttando questi risultati al fine di renderli commercializzabili. Tali industrie stanno investendo nella valutazione delle tecnologie attualmente in uso, per l'individuazione e la caratterizzazione degli esosomi nei diversi fluidi biologici e nello sviluppo di nuove tecnologie da applicare a scopo diagnostico.

Le industrie che stanno attualmente investendo sugli esosomi sono:

- Exosome Diagnostics, Inc.;
- Aethlon Medical Inc.;
- System Biosciences
- HansaBiomed;
- Exothera;
- Exosomics
- Codiack;
- Bioscience;
- Izon;

- Invitrogen;
- Biovision.

La partecipazione attiva delle industrie farmaceutiche supporterà sicuramente il futuro sviluppo del filone della ricerca sugli esosomi, portando diversi benefici in termini di:

- 1) produzione su larga scala di nanovesicole a scopo terapeutico;
- 2) sviluppo di nuove tecniche per l'isolamento e la caratterizzazione di queste nanovesicole;
- 3) standardizzazione nella raccolta del campione.

Considerando che gli esosomi: i) sono strumenti naturali, acellulari, non tossici, capaci di trasportare in maniera autocrina e paracrina diverse molecole nelle cellule bersaglio; ii) possono indurre cambiamenti fenotipici e genotipici nelle cellule bersaglio; iii) possono contenere specifici marcatori di malattie; iv) possono veicolare potenziali molecole terapeutiche, è verosimile ipotizzare che essi potranno svolgere un ruolo chiave nel futuro sviluppo della nanomedicina.

In particolare gli esosomi possono essere considerati innovativi strumenti di teranostica, che come dice la parola, inglobando terapia e diagnosi, consentiranno l'individuazione e il monitoraggio della malattia negli stadi precoci e il trasporto specifico del farmaco più adatto a curare la malattia.

## Bibliografia

1. Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, Squarcina P, Accornero P, Lozupone F, Lugini L, Stringaro A, Molinari A, Arancia G, Gentile M, Parmiani G, Fais S. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *Journal of Experimental Medicine* 2002;195(10):1303-16.
2. Huber V, Fais S, Iero M, Lugini L, Canese P, Squarcina P, Zaccheddu A, Colone M, Arancia G, Gentile M, Seregini E, Valenti R, Ballabio G, Belli F, Leo E, Parmiani G, Rivoltini L. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* 2005;128(7):1796-804.
3. Parolini I, Federici C, Raggi C, Lugini L, Palleschi S, De Milito A, Coscia C, Iessi E, Logozzi M, Molinari A, Colone M, Tatti M, Sargiacomo M, Fais S. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *Journal of Biological Chemistry* 2009;284(49):34211-22.
4. Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás E, Cordeiro-da Silva A, Fais S, Falcon-Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NH, Hendrix A, Kierulf P, Kokubun K, Kosanovic M, Kralj-Iglic V, Krämer-Albers EM, Laitinen S, Lässer C, Lener T, Ligeti E, Linē A, Lipps G, Llorente A, Lötvall J, Manček-Keber M, Marcilla A, Mittelbrunn M, Nazarenko I, Nolte-’t Hoen EN, Nyman TA, O’Driscoll L, Oliván M, Oliveira C, Pällinger É, Del Portillo HA, Reventós J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sánchez-Madrid F, Santarém N, Schallmoser K, Ostendorf MS, Stoorvogel W, Stukelj R, Van der Grein SG, Vasconcelos MH, Wauben MH, De Wever O. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles* 2015;4:27066.
5. Lener T, Gimona M, Aigner L, Börger V, Buzas E, Camussi G, Chaput N, Chatterjee D, Court FA, del Portillo HA, O’Driscoll L, Fais S, Falcon-Perez JM, Felderhoff-Mueser U, Fraile L, Gho YS, Görgens A, Gupta RC, Hendrix A, Hermann DM, Hill AF, Hochberg F, Horn PA, de Kleijn D, Kordelas L, Kramer BW, Krämer-Albers EM, Laner-Plamberger S, Laitinen S, Leonardi T, Lorenowicz MJ, Lim SK, Lötvall J, Maguire CA, Marcilla A, Nazarenko I, Ochiya T, Patel T, Pedersen S, Pocsfalvi G, Pluchino S, Quesenberry P, Reischl IG, Rivera FJ, Sanzenbacher R, Schallmoser K, Slaper-Cortenbach I, Strunk D, Tonn T, Vader P, van Balkom BW, Wauben M, Andaloussi SE, Théry C, Rohde E, Giebel B. Applying Extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials – An ISEV Position Paper. *Journal of Extracellular Vesicles* 2015;4:30087.

6. Logozzi M, De Milito A, Lugini L, Borghi M, Calabrò L, Spada M, Perdicchio M, Marino ML, Federici C, Iessi E, Brambilla D, Venturi G, Lozupone F, Santinami M, Huber V, Maio M, Rivoltini L, Fais S. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One* 2009;4(4):e5219.
7. Sun D, Zhuang X, Xiang X, Liu Y, Zhang S, Liu C, Barnes S, Grizzle W, Miller D, Zhang HG. A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Molecular Therapy* 2010;18(9):1606-14.
8. Federici C, Petrucci F, Caimi S, Cesolini A, Logozzi M, Borghi M, D'Ilio S, Lugini L, Violante N, Azzarito T, Majorani C, Brambilla D, Fais S. Exosome release and low pH belong to a framework of resistance of human melanoma cells to cisplatin. *PLoS One* 2014;9(2):e88193.
9. Smyth T, Kullberg M, Malik N, Smith-Jones P, Graner MW, Anchordoquy TJ. Biodistribution and delivery efficiency of unmodified tumor-derived exosomes. *Journal of Controlled Release* 2015;199:145-55.
10. Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, Sun D, Zhang S, Axtell RC, Ju S, Mu J, Zhang L, Steinman L, Miller D, Zhang HG. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Molecular Therapy* 2011;19:1769-79.
11. Kusuzaki K, Hosogi S, Ashihara E, Matsubara T, Satonaka H, Nakamura T, Matsumine A, Sudo A, Uchida A, Murata H, Baldini N, Fais S, Marunaka Y. Translational research of photodynamic therapy with acridine orange which targets cancer acidity. *Current Pharmaceutical Design* 2012;18:1414-20.
12. Valadi, H, Ekstrom, K, Bossios, A, Sjostrand, M, Lee, JJ and Lötval, JO (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology* 2007;9(6):654-9.
13. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhal S, Wood MJ. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology* 2011;29(4):341-5.
14. Canitano A, Venturi G, Borghi M, Ammendolia MG, Fais S. Exosomes released in vitro from Epstein-Barr virus (EBV)-infected cells contain EBV-encoded latent phase mRNAs. *Cancer Letters* 2013;337(2):193-9.
15. Properzi F, Logozzi M, Abdel-Haq H, Federici C, Lugini L, Azzarito T, Cristofaro I, di Sevo D, Ferroni E, Cardone F, Venditti M, Colone M, Comoy E, Durand V, Fais S, Pocchiari M. Detection of exosomal prions in blood by immunochemistry techniques. *Journal of General Virology* 2015;96(Pt 7):1969-74.
16. Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho YJ, Pomeroy SL, Breakefield XO, Skog J. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nature Communications* 2011;2:180.
17. Cossetti C, Lugini L, Astrologo L, Saggio I, Fais S, Spadafora C. Soma-to-germline transmission of RNA in mice xenografted with human tumour cells: possible transport by exosomes. *PLoS One* 2014;9(7):e101629.