



Plant Derived Extracellular Vesicles: a new innovative technological platform for nanomedicine

Dott.ssa Rossella Di Raimo
Head of R&D
Exo Lab Italia



ExoLab Italia una Start-up BioTech Innovativa

Siamo pionieri, con oltre 30 anni di ricerca sui farmaci antitumorali presso l'ISS (Istituto Superiore di Sanità), dell'uso innovativo delle vescicole extracellulari (EVs). In soli 3 anni Exo Lab Italia è diventata la prima azienda in Europa a occuparsi di prodotti basati sull'innovazione, la ricerca, lo sviluppo e la produzione di prodotti a base di Vescicole Extracellulari Vegetali.

1. Ricerca e Innovazione

1. Biologico e Made in Italy

1. Sostenibilità





Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca

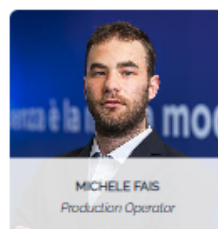
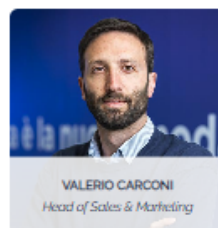


Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



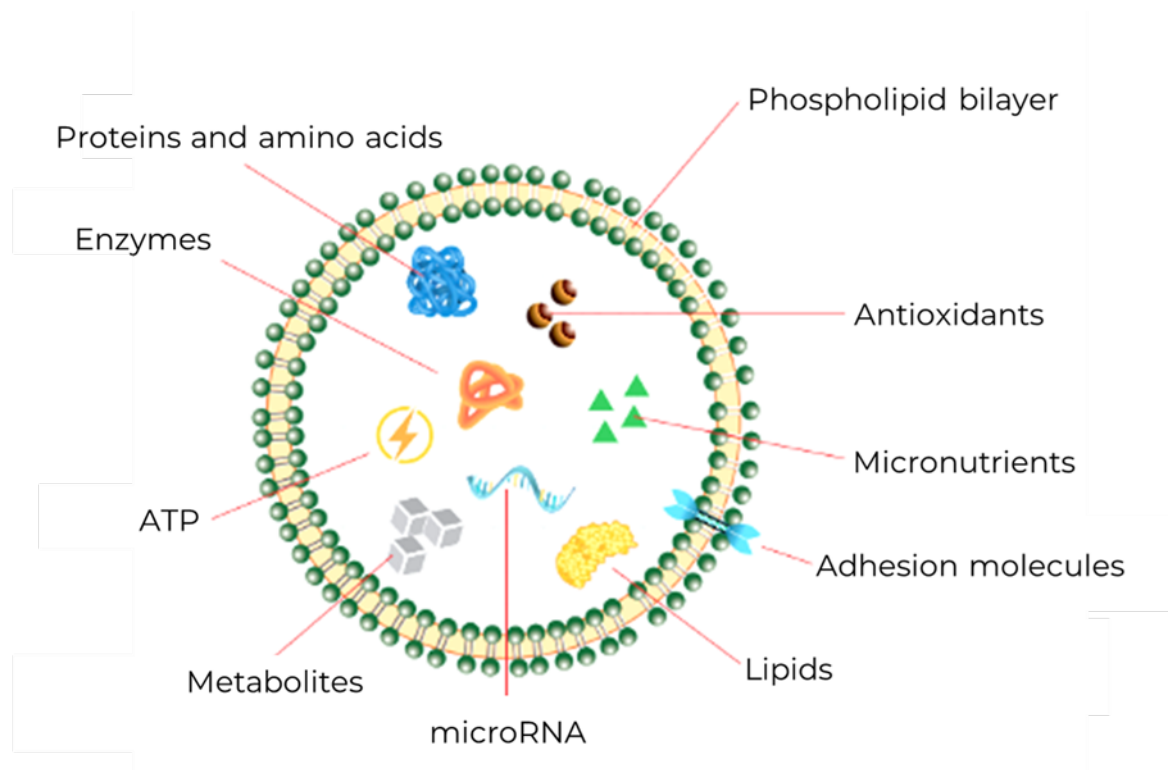
Università degli studi
"G. d'Annunzio"
Chieti - Pescara

Il nostro Team





Le vescicole extracellulari vegetali (PDEVs)



- **Dimensioni:** variano da 40 a 500 nm.
- **Struttura:** presentano una membrana fosfolipidica molto resistente agli stimoli esterni, arricchita in fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina (che contribuiscono al mantenimento della forma sferica) e in acido fosfatidico (coinvolto nell'assorbimento intestinale delle EVs).
- **Contenuto:** racchiudono proteine, acidi nucleici e metaboliti secondari.
- **Funzioni biologiche:** partecipano alla comunicazione sia intraspecifica che interspecifica tra le piante e altri organismi.
- **Attività biologiche:** esercitano effetti antiossidanti, antinfiammatori e antitumorali.



Scopo

Il progetto ha avuto l'obiettivo di sviluppare **sistemi di veicolazione innovativi**, basati su **vescicole extracellulari di origine vegetale (PDEVs)**, per l'incapsulamento di **molecole lipofile** ad attività rigenerante e antiossidante.

A partire da uno screening su 11 matrici vegetali, sono state selezionate le PDEVs di **melograno** e **cardo mariano**, utilizzate rispettivamente per il caricamento di **tocoferolo acetato** (derivato stabile della vitamina E) e **retinil palmitato** (estere stabile della vitamina A), scelti per le loro caratteristiche bioattive e farmacologiche.

Le PDEVs sono state **confrontate con i liposomi commerciali** in termini di **efficienza di caricamento** ed **efficacia biologica in vitro**.

I risultati hanno dimostrato che:

- Le PDEVs mostrano una **maggiore capacità di incapsulamento** delle molecole lipofile rispetto ai liposomi
- Il trattamento con PDEVs caricate ha generato **risposte cellulari più efficaci**
- Il sistema PDEVs offre **migliore stabilità, biocompatibilità e sinergia fitocomponente-molecola**

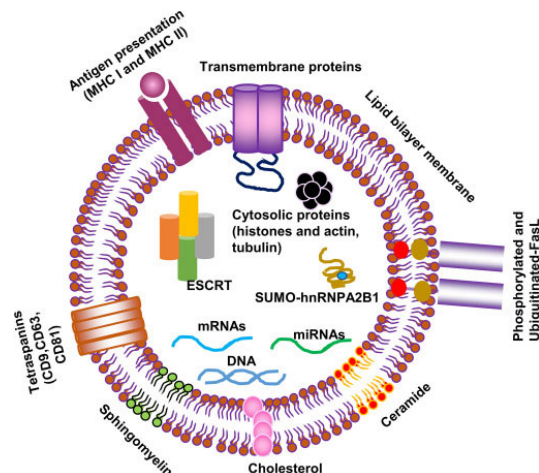
Sono state confrontate due tecniche di caricamento:

- **Diffusione passiva**
- **Elettroporazione attiva**

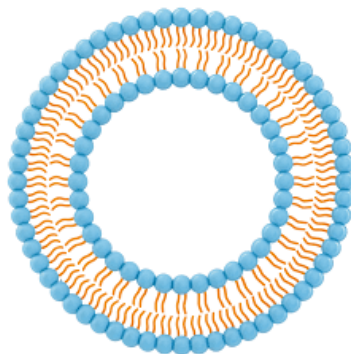


PDEVs vs liposomi

PDEVs



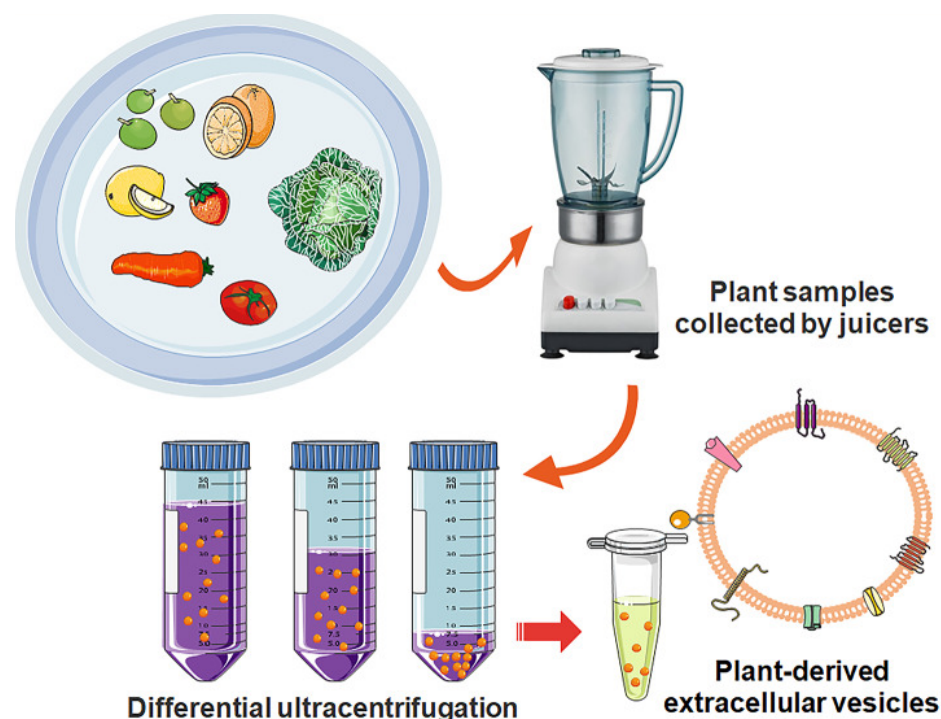
Liposoma



- Le vescicole extracellulari di origine vegetale (PDEVs) sono vettori promettenti per il trasporto di principi attivi grazie a **biocompatibilità**, capacità di attraversare le barriere biologiche e **sinergia** con i composti naturali.
- I liposomi hanno mostrato limiti clinici legati a scarsa biocompatibilità e bassa biodisponibilità delle molecole trasportate.
- Le PDEVs condividono proprietà fisico-chimiche con i liposomi, ma offrono vantaggi in termini di sicurezza, sostenibilità e produzione su larga scala.
- Possono essere ingegnerizzate per il rilascio mirato e, grazie al contenuto naturale di bioattivi e antiossidanti, potenziano l'efficacia dei farmaci veicolati.



Isolamento PDEVs



Schema del processo di isolamento delle vescicole extracellulari di origine vegetale (PDEVs)

I campioni vegetali vengono inizialmente omogeneizzati tramite frullatore, gli estratti così formati vengono sottoposti a centrifugazione differenziale per rimuovere detriti e componenti grossolane.

Dopo centrifugazioni a bassa e media velocità per eliminare residui cellulari, il surnatante chiarificato viene ultracentrifugato ad alta velocità per isolare la frazione vescicolare.

Il pellet contenente le vescicole extracellulari è stato infine risospeso in tampone e conservato per le analisi successive.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

Caratterizzazione chimico-fisica PDEVs isolate

Dimensione e concentrazione: Le PDEVs sono state analizzate tramite NTA (NanoSight NS300/PRO) che determina la distribuzione dimensionale e la concentrazione del campione sfruttando il movimento browniano e la diffusione della luce.

NanoSight NS300: L'NS300 consente un'analisi rapida e automatizzata della distribuzione dimensionale e della concentrazione di tutti i tipi di nanoparticelle con diametro compreso tra 0,01 e 1 μm , a seconda della configurazione dello strumento e del tipo di campione.





Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



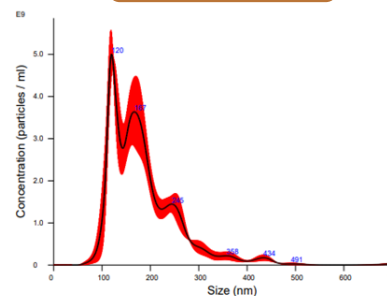
Ministero
dell'Università
e della Ricerca



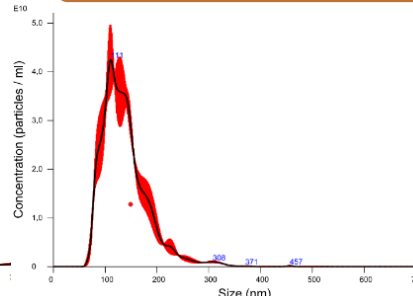
Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

Caratterizzazione delle vescicole extracellulari vegetali: Distribuzione dimensionale

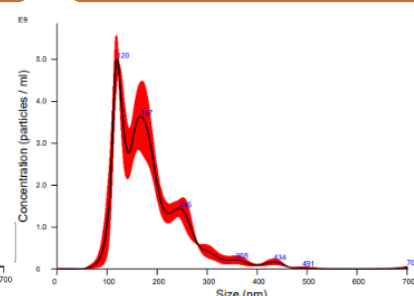
ALOE



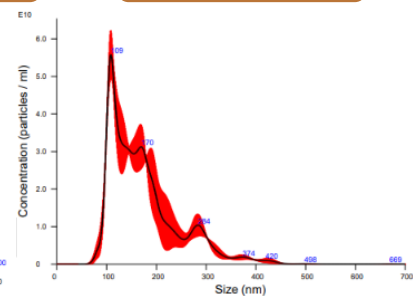
ARANCIA BIONDA



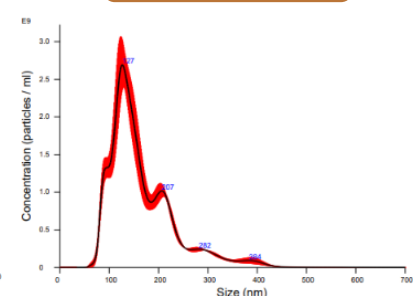
CARDO MARIANO



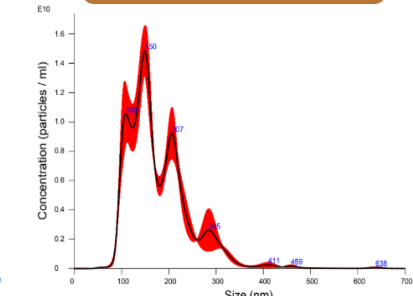
CURCUMA



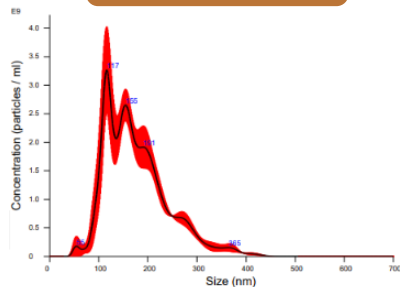
LIQUIRIZIA



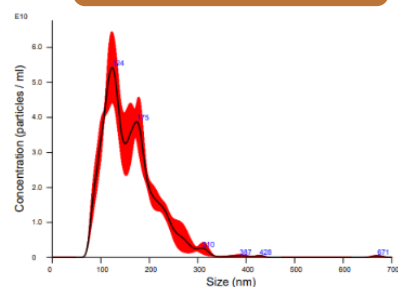
MELOGRANO



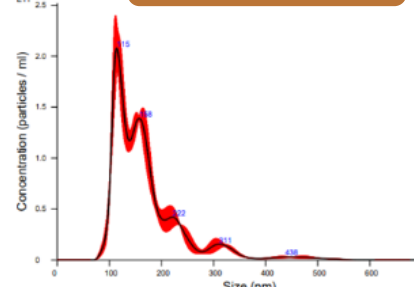
PEPERONE



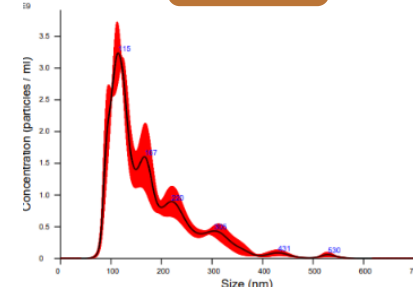
POMPELMO



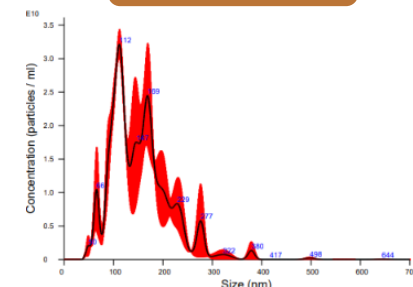
TE' VERDE



UVA



ZENZERO





Caratterizzazione chimico-fisica PDEVs isolate

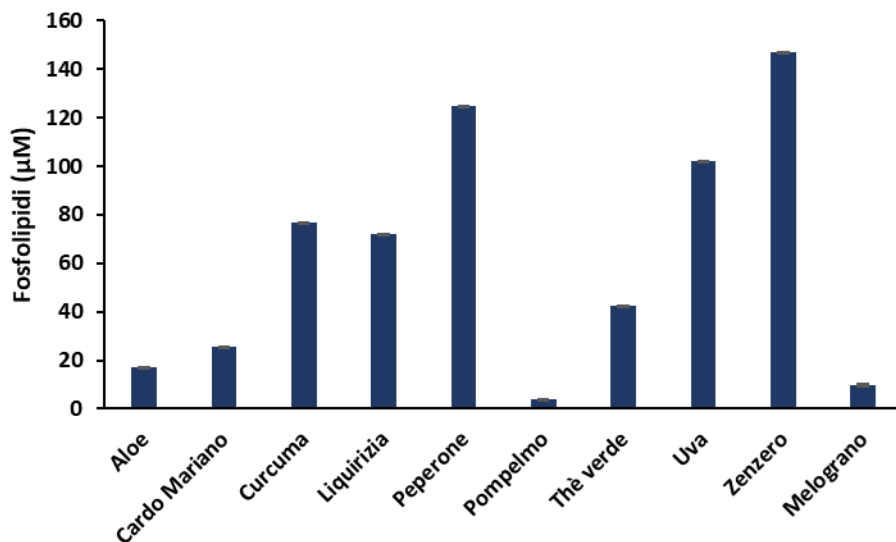
Il DLS consente di misurare dimensioni e potenziale zeta delle vescicole extracellulari. Quest'ultimo, valutato con lo Zetasizer Lab, è indicativo della loro stabilità: valori assoluti elevati riducono il rischio di aggregazione, permettendo di identificare le vescicole più stabili nelle soluzioni di caricamento.



Campione	Potenziale Zeta (mV)
Aloe Vera	- 7,384 ± 0,9319
Arancia	-20,11 ± 1,56
Cardo Mariano	- 9,5215 ± 0,2665
Curcuma	- 16,705 ± 1,9586
Liquirizia	- 9,303 ± 0,3634
Peperone	- 18,225 ± 0,4879
Pompelmo	- 14,06 ± 0,9372
Tè Verde	- 13,74 ± 0,6929
Uva	- 16,69 ± 0,8736
Zenzero	- 13,185 ± 0,2616
Melograno	-23,26 ± 0,83

Caratterizzazione chimico-fisica PDEVs isolate

Le vescicole extracellulari sono state analizzate tramite un saggio colorimetrico che permette la quantificazione del contenuto in fosfolipidi della membrana vegetale misurando la concentrazione della colina. In breve, i fosfolipidi sono idrolizzati enzimaticamente per rilasciare la colina, che viene poi rilevata grazie alla colina ossidasi ed un colorante specifico. Questa attività ha permesso di stabilire quali campioni di vescicole extracellulari hanno il più alto contenuto di fosfolipidi.



Campione	Fosfolipidi (μM)
Aloe Vera	17,1428 ± 0,0014
Cardo Mariano	25,3571 ± 0,0049
Curcuma	76,7857 ± 0,0007
Liquirizia	72,1428 ± 0,0113
Peperone	125 ± 0,0233
Pompelmo	3,7812 ± 0,1414
Tè Verde	42,5 ± 0,0049
Uva	102,062 ± 0,0185
Zenzero	147,1428 ± 0,0014
Melograno	9,875 ± 0,49



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

Caratterizzazione chimico-fisica PDEVs isolate

Le PDEVs di melograno e cardo mariano, identificate come particolarmente adatte al caricamento di Tocoferolo acetato e Retinolo, sono state selezionate, insieme ai liposomi, per la caratterizzazione mediante NanoSight Pro.

NanoSight PRO: Ultima generazione di NTA, progettata per semplificare l'uso e aumentare la sensibilità: integra automazione, interfaccia intuitiva e tempi di acquisizione ridotti. Offre analisi più rapide e riproducibili, con un rilevamento migliorato delle particelle fluorescenti rispetto al modello NS300.





Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



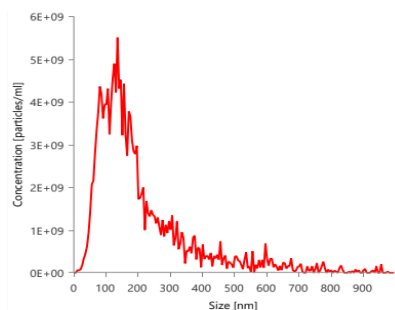
Ministero
dell'Università
e della Ricerca



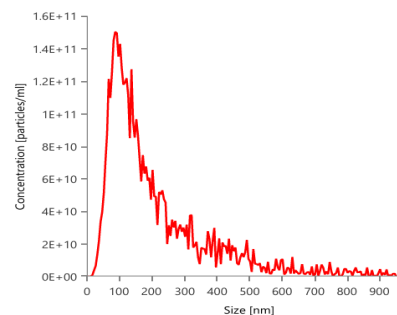
Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

Caratterizzazione veicoli da caricare: Melograno e Cardo Mariano

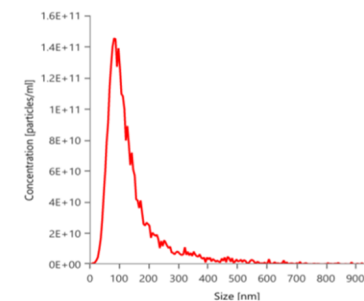
MELOGRANO



CARDO MARIANO



LIPOSOMI



Campione	Dimensione media (nm)	Potenziale Zeta in H ₂ O (mV)	Potenziale Zeta in PBS (mV)	Fosfolipidi in 10 ¹⁰ PDEVs
Melograno	178,3 ± 1,8	-23,3 ± 0,83	-6,99 ± 0,87	9,875 ± 0,49
Cardo Mariano	229 ± 23,3	-27,8 ± 0,82	-15,18 ± 1,64	25,35 ± 0,0049
Liposomi	144 ± 4,5	-32,96 ± 2,19	-3,8 ± 0,34	-



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

Caricamento Tocoferolo Acetato nelle PDEVs da Melograno

Le vescicole extracellulari vegetali di Melograno e i liposomi, dopo essere stati caratterizzati, sono stati sottoposti a due diverse tecniche di caricamento:

Diffusione Passiva

- Meccanismo di caricamento passivo che prevede di inserire nella soluzione di caricamento la molecola da veicolare e il veicolo stesso, la soluzione viene così lasciata in agitazione per un prestabilito lasso di tempo.

Elettroporazione

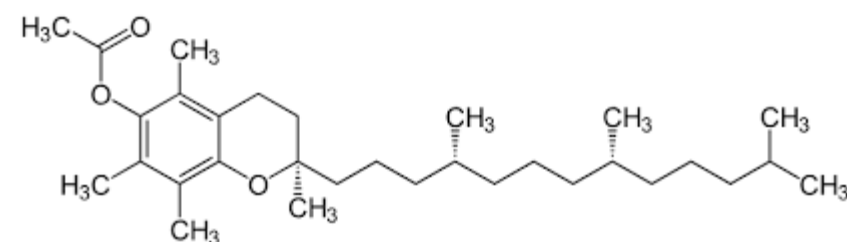
- Tecnica definita “attiva” perché sfrutta l'applicazione di un campo elettrico per aumentare la permeabilità della membrana fosfolipidica, creando pori temporanei che permettono l'entrata delle molecole nelle PDEVs.



Caricamento Tocoferolo Acetato nelle PDEVs da Melograno

Condizioni di caricamento, sia per la diffusione passiva che per l'elettroporazione:

- Liposomi+ Tocoferolo Acetato 500 μ M, Tampone Fosfato
- Liposomi+ Tocoferolo Acetato 1000 μ M, Tampone Fosfato
- Liposomi+ Tocoferolo Acetato 500 μ M, H₂O
- Liposomi+ Tocoferolo Acetato 1000 μ M, H₂O
- PDEVs Melograno+ Tocoferolo Acetato 500 μ M, Tampone Fosfato
- PDEVs Melograno+ Tocoferolo Acetato 1000 μ M, Tampone Fosfato
- PDEVs Melograno+ Tocoferolo Acetato 500 μ M, H₂O
- PDEVs Melograno+ Tocoferolo Acetato 1000 μ M, H₂O



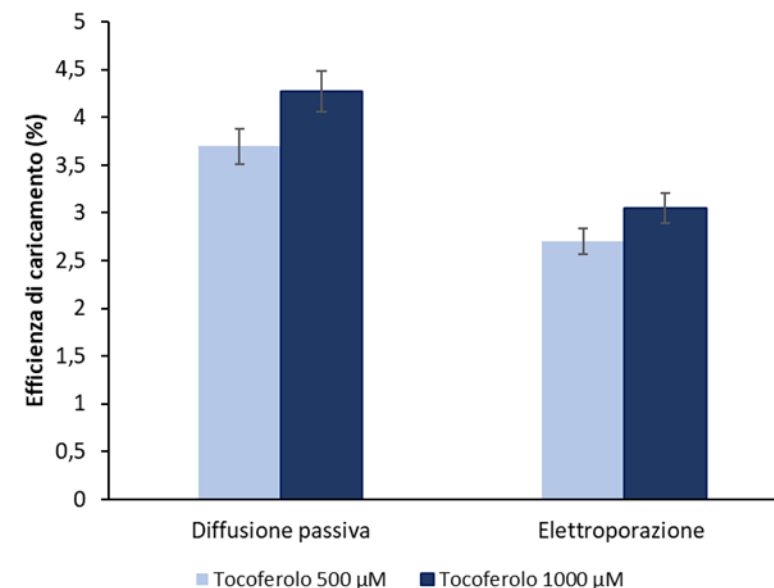


Efficienza di Caricamento Tocoferolo Acetato nelle PDEVs da Melograno

Sia i liposomi che le PDEVs di Melograno sono stati sottoposti ai due metodi di caricamento precedentemente descritti. L'efficienza di caricamento è stata poi calcolata, in seguito al lavaggio per eliminare la molecola non incapsulata, sfruttando il picco di assorbimento del Tocoferolo Acetato a **290 nm**.

Dall'analisi dei dati è emerso che un'efficace incorporazione del Tocoferolo Acetato è stata ottenuta esclusivamente nelle PDEVs. A parità di concentrazione di tocoferolo utilizzato per il caricamento (500 e 1000 μM), l'incapsulamento della molecola attraverso la diffusione passiva (**3,7%** e **4,27%** rispettivamente per 500 e 1000 μM) risulta essere più efficiente rispetto all'elettroporazione (**2,7%** e **3,05%** per 500 e 1000 μM).

L'analisi spettrofotometrica **non ha rilevato** caricamento di Tocoferolo Acetato nei liposomi con nessuna delle condizioni testate, indicando una bassa affinità con la matrice liposomiale o l'inefficacia dei protocolli di incorporazione adottati





Caricamento Retinolo nelle PDEVs da Cardo Mariano

Per il nostro studio abbiamo considerato l'impiego del **Retinolo** come molecola lipofila di riferimento.

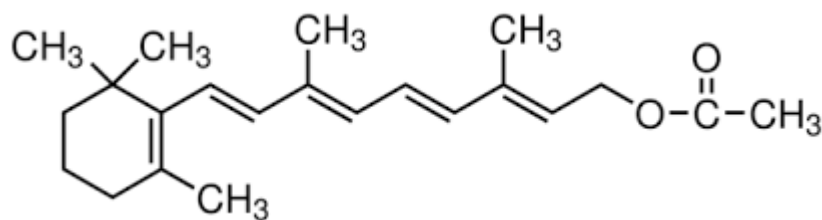
Tuttavia, le sue caratteristiche di scarsa stabilità, la tendenza all'ossidazione e la potenziale irritazione cutanea ne limitano l'utilizzo diretto.

Per superare questi limiti, abbiamo scelto di impiegare i suoi **esteri**, che presentano vantaggi significativi:

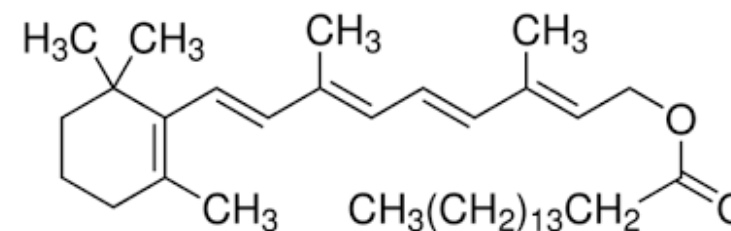
- Maggiore stabilità e migliore conservazione nel tempo,
- Minore irritazione cutanea, adatti anche a pelli sensibili,
- Facile incorporazione nelle formulazioni cosmetiche.

Tra i due principali esteri, **Retinil Acetato** e **Retinil Palmitato**, la scelta è ricaduta sul Palmitato perché:

- È più lipofilo e stabile rispetto all'acetato,
- Garantisce un'azione più graduale e delicata sulla pelle,
- È ampiamente usato in cosmetica grazie alla lunga durata di conservazione.



Retinil Acetato



Retinil Palmitato



Caricamento Retinil Palmitato

Sono state impiegate due diverse forme commerciali della molecola:

- Retinil Palmitato A: Retinil Palmitate 1,7 MIU (**consistenza più cerosa**)
- Retinil Palmitato B: Retinil Palmitate 1,0 MIU (**consistenza fluida e oleosa**)

In una prima fase sperimentale, il caricamento è stato eseguito esclusivamente sulle PDEVs di Cardo mariano, per valutare il comportamento delle due forme molecolari in condizioni controllate.

In una prima fase sperimentale, il caricamento è stato eseguito esclusivamente sulle PDEVs di Cardo mariano, per valutare il comportamento delle due forme molecolari in condizioni controllate.

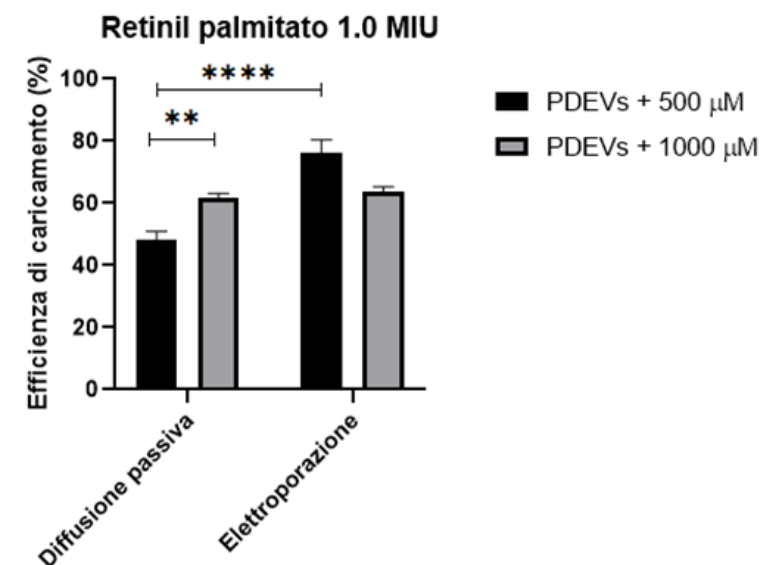
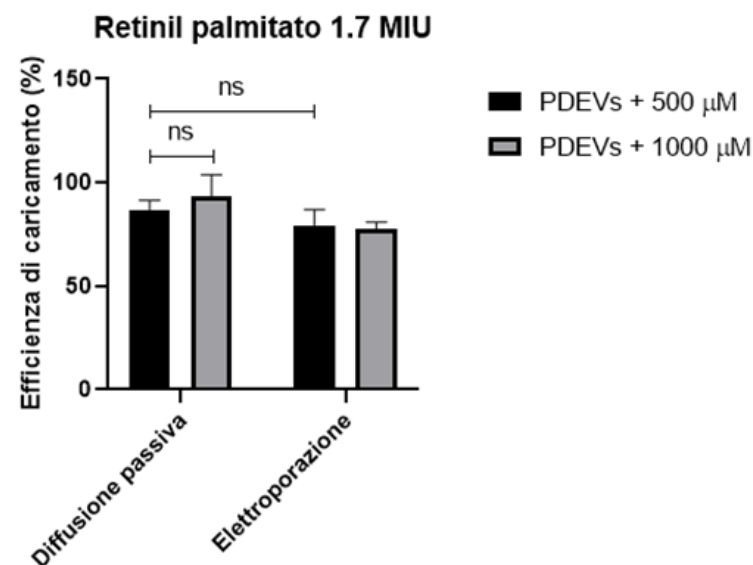
Protocollo di Caricamento per Diffusione Passiva e per Elettroporazione:

- PDEVs Cardo Mariano + Retinil Palmitato A 500 μM
- PDEVs Cardo Mariano + Retinil Palmitato A 1000 μM

- PDEVs Cardo Mariano + Retinil Palmitato B 500 μM
- PDEVs Cardo Mariano + Retinil Palmitato B 1000 μM



Efficienza di Caricamento Retinil Palmitato



I risultati mostrano che entrambi i protocolli di caricamento sono validi, ma il Retinil Palmitato 1,7 MIU risulta poco stabile e con bassa riproducibilità. Al contrario, la forma 1,0 MIU è più stabile e facilmente incapsulabile (**48–75%**). L'elettroporazione ha garantito le migliori performance (**75% vs 48%** della diffusione passiva), dimostrandosi efficace anche per molecole lipofile. Per la maggiore stabilità e affidabilità, è stata selezionata la forma 1,0 MIU (B), da testare anche nei liposomi con entrambe le metodiche.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

Caricamento Retinil Palmitato

A seguito delle analisi, la forma **1,0 MIU** (B) è stata selezionata per proseguire con le prove successive.

Una volta definita la forma della molecola da utilizzare, il caricamento è stato esteso anche ai **liposomi**, sottoponendo entrambi i sistemi vescicolari (PDEVs e liposomi) alle due tecniche di caricamento (passiva e attiva).

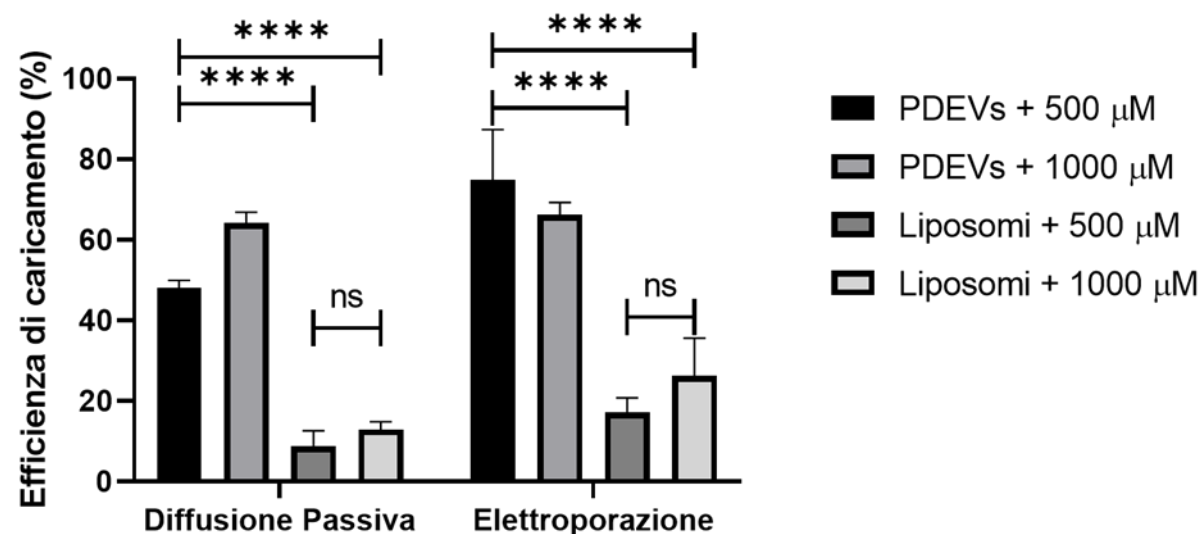
Protocollo di Caricamento per Diffusione Passiva e per Elettroporazione:

- PDEVs + Retinil Palmitato 1,0 MIU 500 μ M
- PDEVs + Retinil Palmitato 1,0 MIU 1000 μ M

- Liposomi + Retinil Palmitato 1,0 MIU 500 μ M
- Liposomi + Retinil Palmitato 1,0 MIU 1000 μ M



Efficienza di Caricamento Retinil Palmitato



I risultati evidenziano che le PDEVs mostrano un'efficienza di caricamento del Retinil Palmitato nettamente superiore ai liposomi, sia con diffusione passiva che con elettroporazione (fino a **62–75%** vs **9–20%**). La loro struttura biologica le rende vettori naturali più efficaci per molecole lipofile, migliorandone stabilità, biodisponibilità ed efficacia terapeutica



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

Esperimenti *in vitro*

Le PDEVs da Cardo Mariano caricate con Retinil Palmitato 1,0 MIU sono state testate su fibroblasti umani normali (NHDF) confrontando diverse condizioni: molecola libera, PDEVs o liposomi caricati e non caricati, e cellule di controllo.

Gli esperimenti includevano:

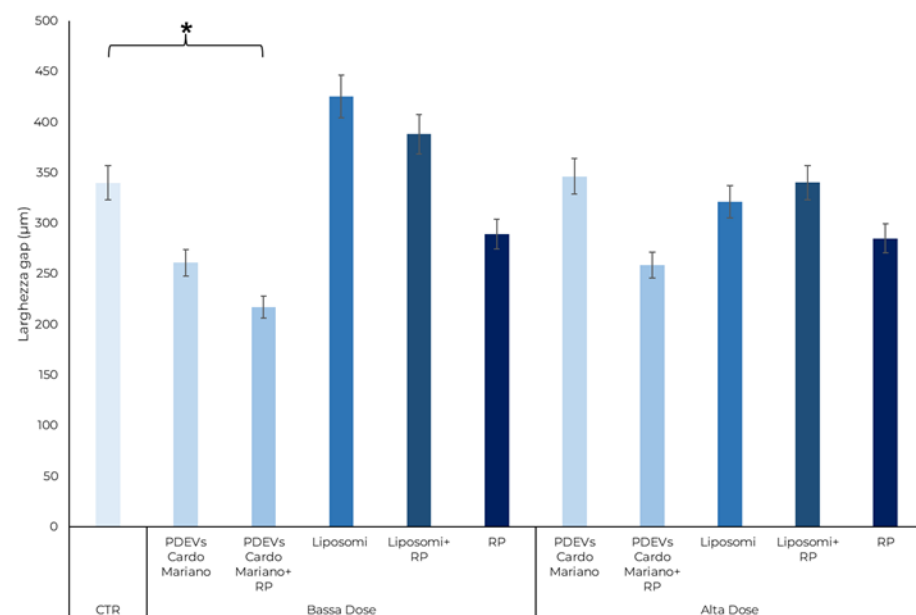
- **Scratch test** per valutare la migrazione cellulare e la chiusura della ferita,
- **Espressione di Collagene I** tramite immunofluorescenza per analizzare la sintesi proteica legata alla riparazione tissutale.

Il Retinil Palmitato agisce come potente agente rigenerante stimolando proliferazione e sintesi di collagene, ma presenta tossicità dose-dipendente se non veicolato. La Silimarina del Cardo Mariano non stimola direttamente la proliferazione, ma protegge le cellule tramite effetti antiossidanti e antinfiammatori.

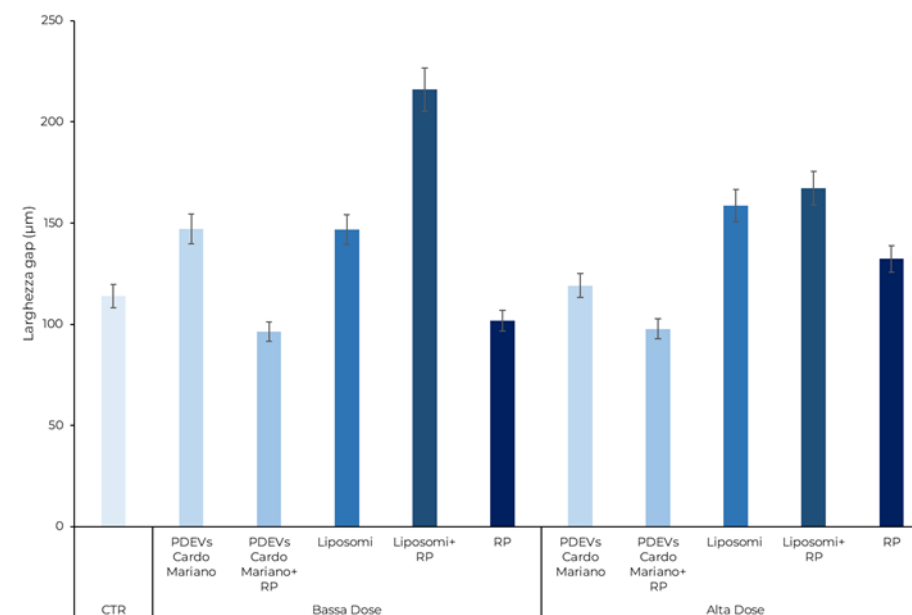
Insieme, PDEVs + Retinil Palmitato offrono un approccio sinergico, combinando effetto rigenerante e protezione cellulare, migliorando stabilità, biodisponibilità e sicurezza della molecola.



Scratch Test: Risultati



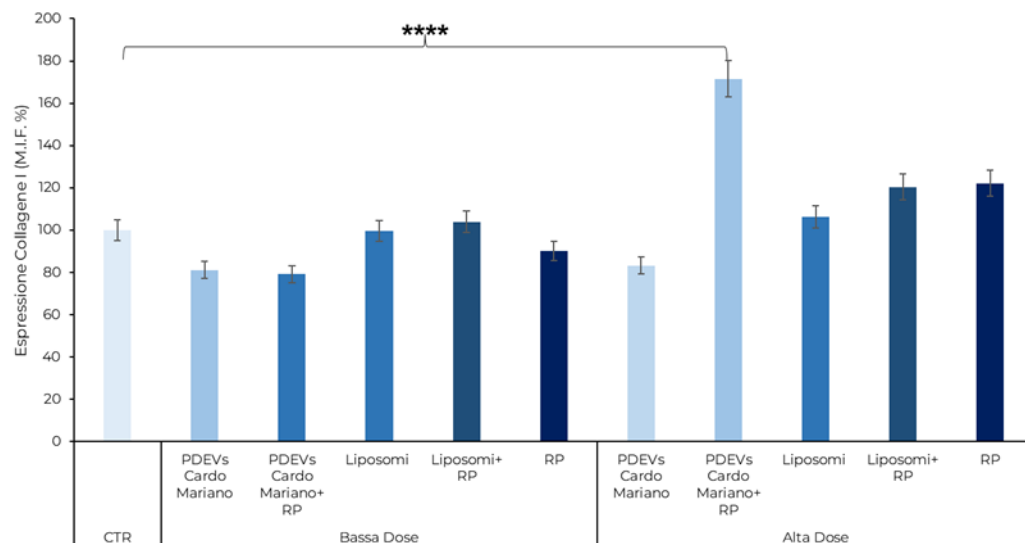
Dopo **24 ore** il trattamento con la dose bassa di PDEVs di Cardio Mariano è stato l'unico a indurre una riduzione statisticamente significativa dell'area lesionata rispetto al controllo con una distanza tra i due fronti cellulari pari a $217 \pm 10,85 \mu\text{m}$ rispetto ai $340 \pm 17 \mu\text{m}$ del controllo non trattato (*, $p < 0,05$).



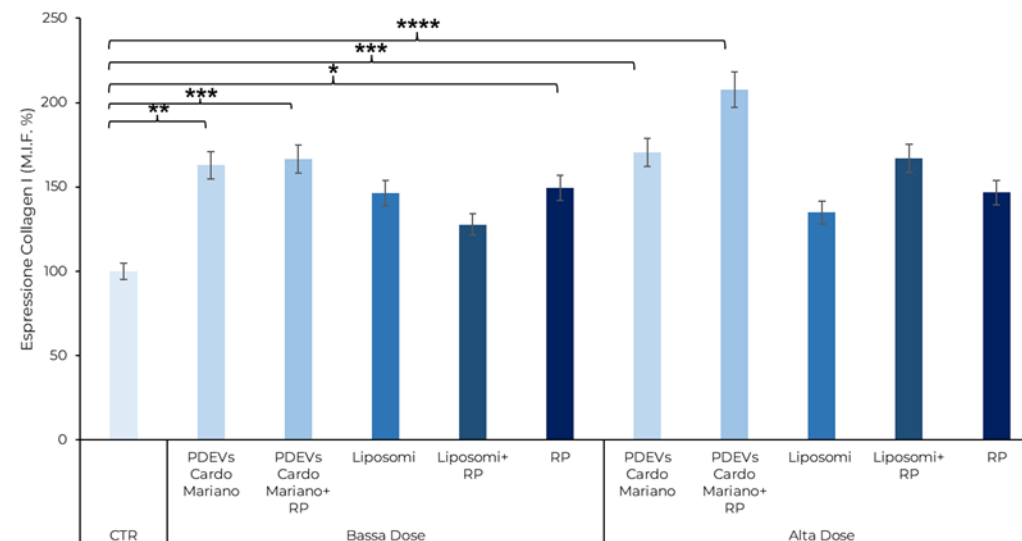
Il trattamento delle cellule dopo **48 ore** di trattamento non ha dato risultati statisticamente rilevanti, né con il trattamento con le PDEVs né con quello dei Liposomi.



Espressione Collagene I: Risultati



Il trattamento con PDEVs ha determinato un aumento dell'espressione di Collagene I in modo dose-dipendente e più marcato dopo trattamento con vescicole caricate. In particolare, dopo **24 ore**, la dose alta di PDEVs di cardo caricate ha indotto l'aumento dell'espressione del collagene I del 70% (****, $p < 0,0001$), mentre la stessa dose di PDEVs non caricate non ha indotto un incremento significativo.



Dopo **48 ore**, le PDEVs di Cardo Mariano stimolano significativamente l'espressione di Collagene I. Con la dose più bassa, le PDEVs non caricate aumentano il Collagene I del 63%, mentre quelle caricate del 66%. Con la dose più alta, le PDEVs non caricate raggiungono il 70%, mentre le caricate arrivano al 107%, evidenziando un effetto potenziato dal caricamento. I liposomi non mostrano alcun incremento significativo.



Conclusioni

Il progetto ha mirato a identificare sistemi di **drug delivery** efficaci per molecole lipofile, focalizzandosi sulla scelta del veicolo più adatto e sulla caratterizzazione fisico-chimica (dimensione, potenziale zeta).



Sono state testate due molecole:

- **Tocoferolo acetato** nelle PDEVs di melograno, con **diffusione passiva** come metodo più efficace;
- **Retinil palmitato** nelle PDEVs di cardo mariano, con **elettroporazione** migliorata tramite un nuovo protocollo, risultata più performante del metodo passivo.



Le PDEVs caricate con Retinil Palmitato hanno mostrato **efficacia superiore *in vitro*** su fibroblasti rispetto alla molecola libera, vescicole vuote e liposomi caricati.



In generale, le PDEVs hanno garantito **miglior caricamento, maggiore biodisponibilità e ridotta tossicità**, confermandosi il sistema di veicolazione più promettente per applicazioni terapeutiche future.



**“Nature is great in the great things,
but is greater in the small ones.”**

Plinio

Exo Lab Italia
Tecnopolo d'Abruzzo
Strada Statale 17
Loc. Boschetto di Pile
67100 L'Aquila (Italy)

<https://exolabitalia.com/>
<https://www.exolabitalia.shop/>

infoRD@exolabitalia.com