



## ***ExoNanoDi***

Studio per l'Identificazione di **Nano**materiali Funzionalizzati idonei alla Purificazione, Quantificazione e Caratterizzazione degli **Exo**somi dai Fluidi Biologici: Approccio Innovativo nella **Di**agnostica del Cancro

***Giorgia Radano***  
**Researcher**

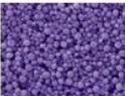
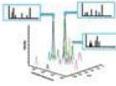
# Nuovo Paradigma della Diagnostica di Cancro Non-invasiva

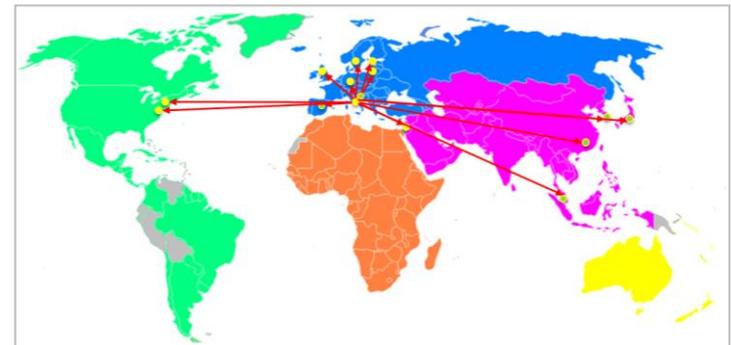


**1. Reagenti e dispositivi per purificazione di esosomi da liquidi biologici (compresa l'identificazione dei pannelli di marcatori tumorali)**

**2. Assay immunometrici per la quantificazione di sottopopolazioni di esosomi tumorali**

**3. Progetti di R&S, collaborazioni strategiche**

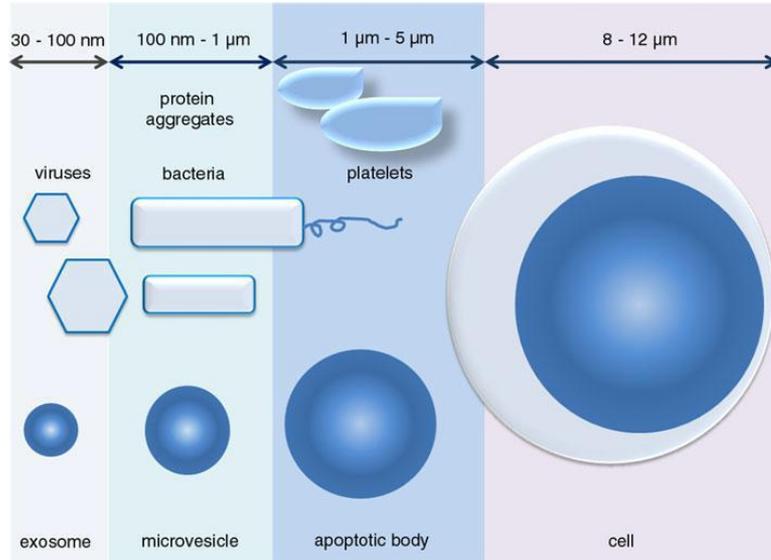
				
<b>ELISA</b>	<b>Point-of-care</b>	<b>mRNA, miRNA profiling</b>		
				
<b>Beads based assays</b>	<b>Label free assays</b>	<b>Glyco/metabolites profiling</b>		



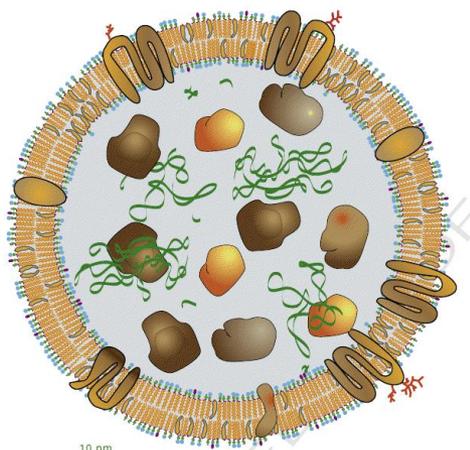
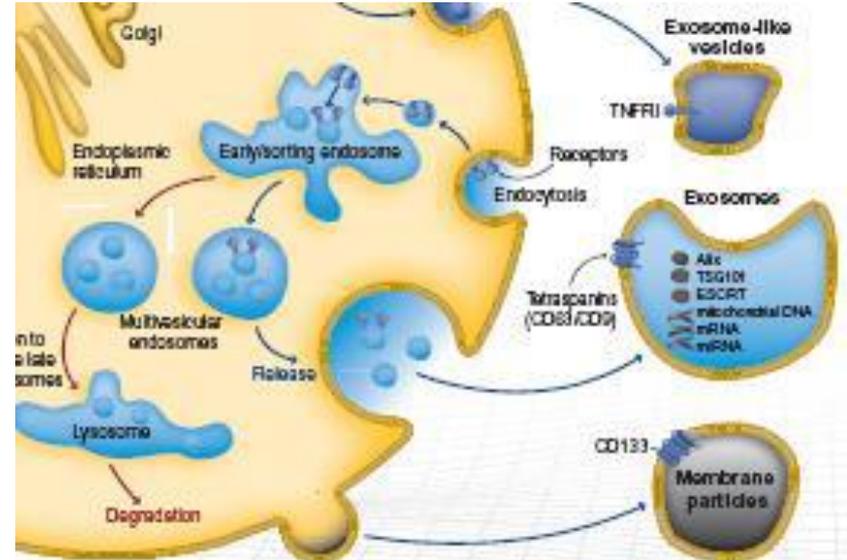
# Esosomi: nuova frontiera della diagnostica.

## Caratteristiche particolari:

### 1. Nanovesicicole



### 2. Origine intracellulare

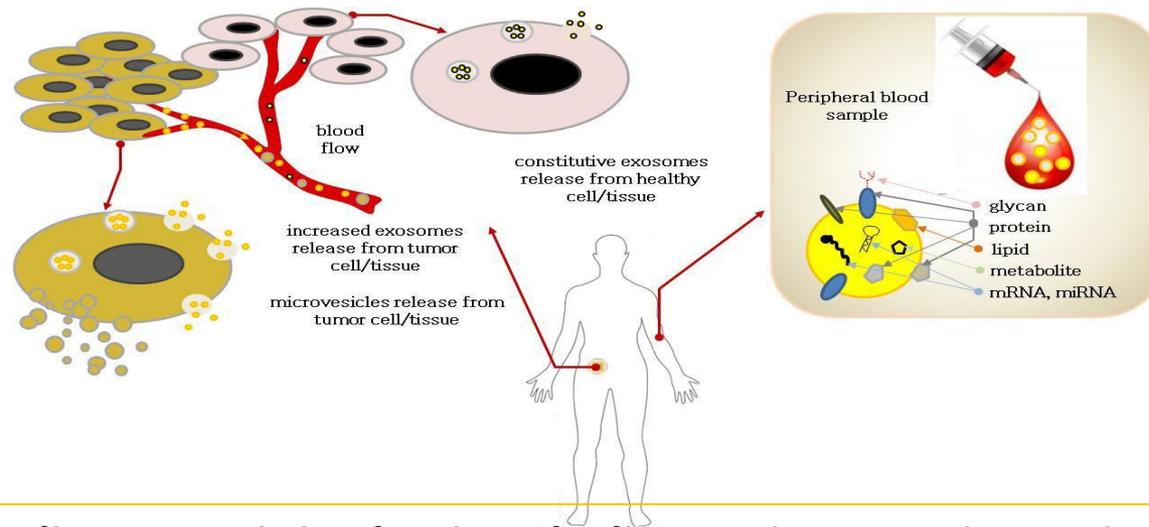


### 3. Composizione molecolare riflette il tipo e la condizione della cellula di origine

- Proteine (di membrana e citosoliche),
- Acidi nucleici (mRNA, miRNA e DNA),
- Lipidi

**= premessa per l'utilizzo di esosomi in diagnostica**

- quantità e “qualità” degli esosomi rilasciati dipende dallo stato funzionale della cellula madre:

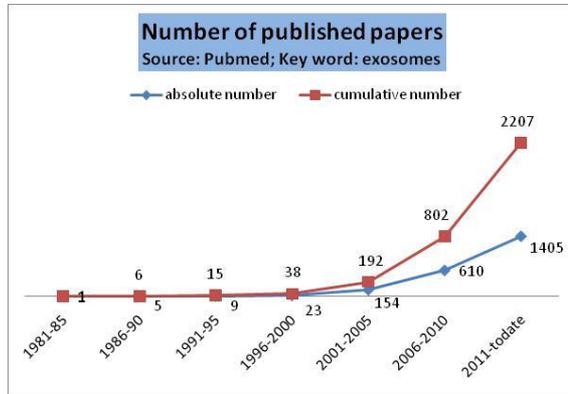


## Esosomi: nuova fonte di marcatori circolanti per la diagnostica e monitoraggio NONINVASIVI

- presenti in vari liquidi biologici (sangue e urine)
- arricchiti in proteine di membrana
- esosomi sono un campione di scelta per analisi “omiche”

**= esosomi permettono BIOPSIA LIQUIDA**

# Aumento esponenziale dell'interesse verso gli esosomi nel mondo accademico, industriale, investitori privati e grandi enti pubblici



**Ostacolo principale all'utilizzo degli esosomi in prassi diagnostica clinica: Metodi obsoleti e subottimali di isolamento e quantificazione degli esosomi**

**Filtrazione, precipitazione o ultracentrifugazione → bassa resa, tempi lunghi, campioni non sufficientemente puri.**

**IMMUNOCATTURA → cattura specifica e quantità di materiale ottimale, identificazione immediata di fenotipo di vescicole d'interesse, ma mancano ancora dispositivi e saggi ottimizzati e clinicamente validati**

# Scopo del progetto ExoNanoDi

- *evoluzione di piattaforma EXOTEST™ tramite realizzazione di una nuova generazione di assays immunometrici in grado di migliorare:*
  - cattura e di concentrazione degli esosomi e loro sotto-popolazioni
  - quantificazione degli esosomi
  - caratterizzazione di esosomi, rilevando marcatori multipli (multiplex)
- *Modello:* cancro alla prostata e cancro all'ovaio
- *Realizzazione:* Interazioni privilegiate tra diversi tipi di nanostrutture – biologiche e sintetiche



## **UNISI** *Obiettivo Operativo 2*

- Dipartimento di Biotecnologie, Chimica e Farmacia  
gruppi Prof. Magnani e Prof. Campiani



## **Scuola Normale Superiore**

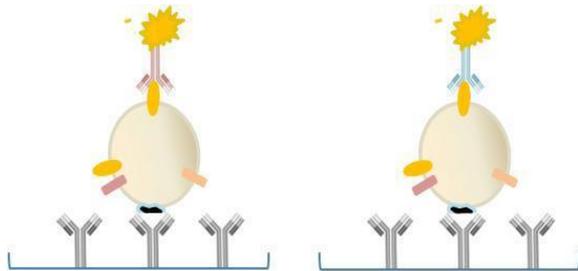
- **lab. NEST** *Obiettivo Operativo 3*  
- Prof. Luin



## **UNISI** *Obiettivo Operativo 4*

-Dipartimento di Ingegneria dell' Informazione Prof. Rocchi  
in collaborazione con DBCF Prof. Magnani

## PRINCIPIO:



Ab1 Tumor exosomes specific (i.e. TUCAP1)

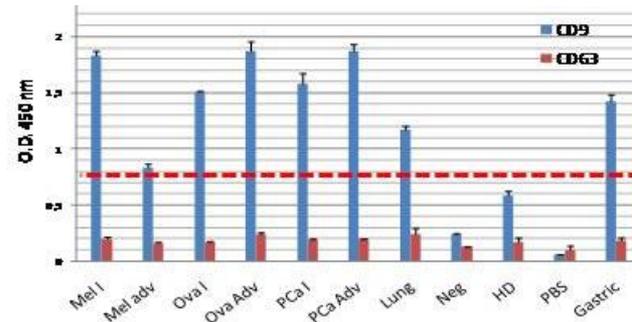
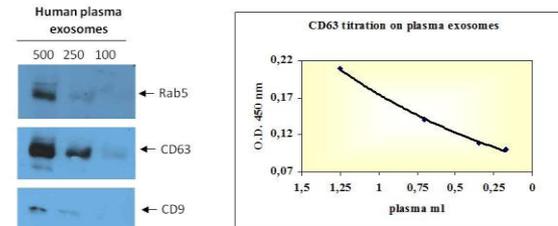


Ab2 Tumor marker specific (i.e. PSMA)



Ab3 Tumor tissue specific (i.e. PSA)

## ESEMPIO:



## STATE OF ART: ELISA

EXOTEST 2-step sandwich immunoassay per la quantificazione in vitro di proteine associate agli esosomi in fluidi biologici (siero, plasma, urine, surnatanti cellulari)

### CARATTERISTICHE

Veloce (~4h)

Precisione (< 12%CVs)

Alta sensibilità (< pg)

Compatibile con strumentazione comune

### LIMITI

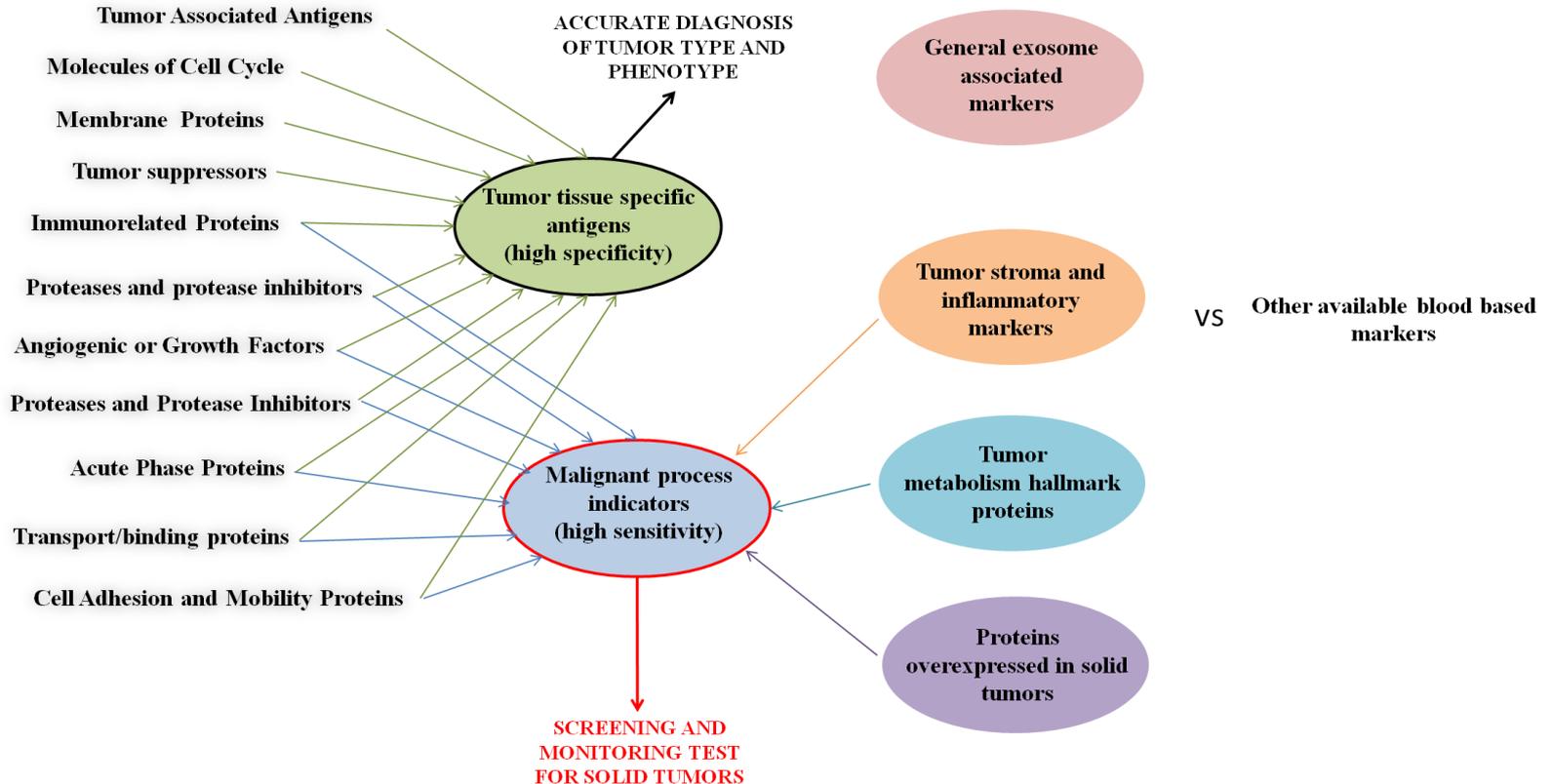
1. Sensibilità

2. Bassa capacità di multiplexing

# OBIETTIVO 1

**Identificazione di marcatori pan-esosomal e marcatori di malattia, compresi marcatori tumorali generici e tumore specifici.**

**Identificazione di migliori anticorpi da usare per la funzionalizzazione di nanoparticelle e nanosensori**



# COMPOSIZIONE PANNELLO BIOMARCATORI PER ESOSOMI DI CANCRO ALLA PROSTATA E ALL'OVAIO

## Letteratura scientifica e banche dati

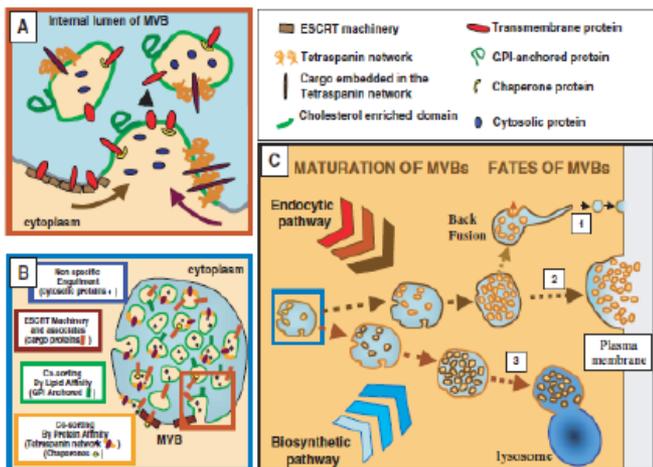
[ExoCarta: Exosome database www.exocarta.org/](http://www.exocarta.org/)

[Vesiclepedia: Extracellular vesicles database www.microvesicles.org](http://www.vesiclepedia.org/)

(lipid, RNA, and protein) identified in different classes of EVs from more than 300 independent studies

+ banche dati sull'espressione delle proteine nei tessuti

## Mecanismi del "sorting" esosomiale delle proteine



Van Niel et al, 2006

## PANNELLO DI MARCATORI TUMORALI

PROSTATE CANCER		OVARY CANCER	
AULSS	EXS	AULSS	EXS
2-proPSA	ACPP	ANG2	TSTA3
AMACR	CD63	AGR2	Rab11
CLDN3	CD73	APO-A1	TUCAP
KLK2	HSP70	CA125	Tsg101
MMP2	TSTA3	HE4	CD44
PSA	PSA	MIF	CD81
PSGR	CD81	SAA	CD9
PSMA	PSMA	PECAM	Rab5
	CD44		
	TUCAP		
	CEA		

*Analisi biochimiche e molecolari di esosomi dai modelli di cancro in vitro e dai campioni di plasma clinici*

## OBIETTIVO 2



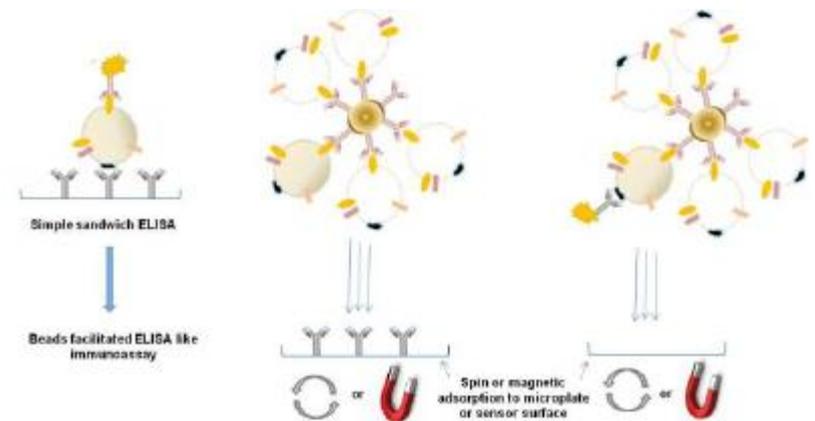
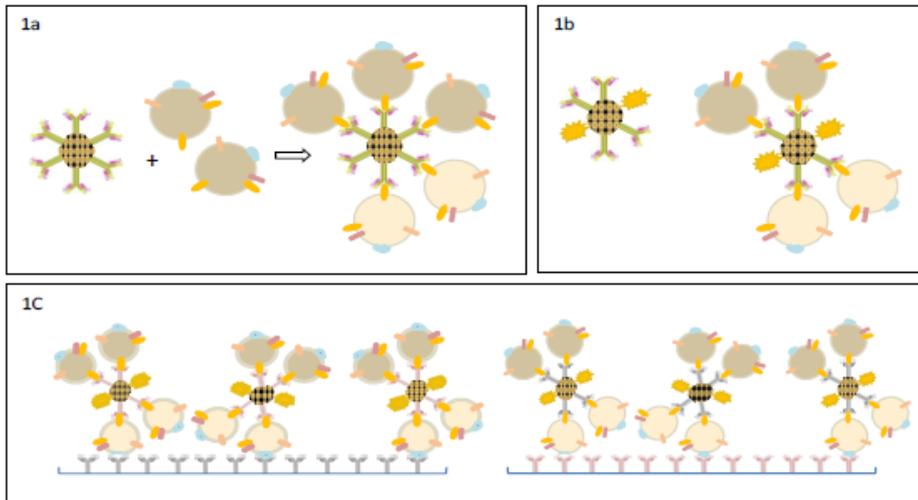
UNISI DBCF  
gruppo Prof. Magnani e Prof. Campiani



**Progettazione e produzione di nanoparticelle multifunzionali per la cattura e/o rilevazione selettiva e degli esosomi.**

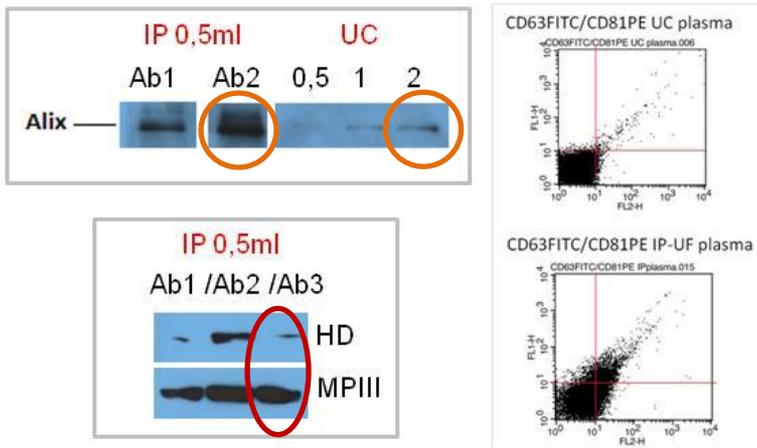
**Lo scopo** – Sfruttare le proprietà di nanoparticelle d'oro per:

- concentrare
- quantificare
- minimizzare il segnale aspecifico
- semplificare il protocollo, ridurre tempi e costi



**Sistemi nanoparticellari, funzionalizzati con anticorpi con elevata affinità per le proteine specifiche esposte sulla membrana esosomiale, sono in grado di catturare il maggior numero di esosomi da fluidi biologici**

Immunoprecipita usando le immuno-biglie aumenta la resa di esosomi di plasma 8 -15x rispetto UC (ultracentrifugazione)



Immuno-biglie sono in grado di selezionare preferenzialmente esosomi di origine tumorale

Passaggio micro → nano + chimica di superficie avanzata aumenta la specificità e l'affinità di interazione tra nanoparticelle

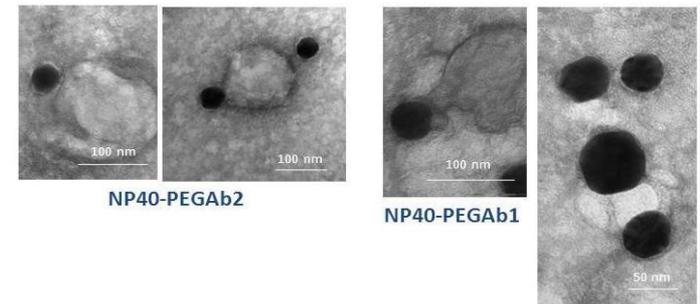


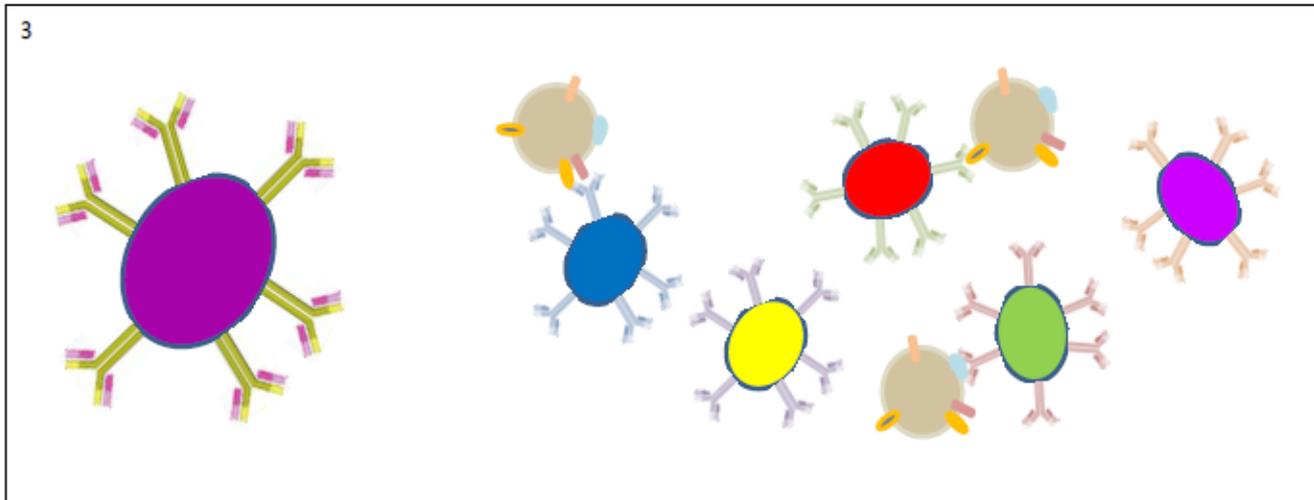
Foto TEM: UNISI-Magnani

**ANALISI TEM di NP40-PEGAb1 e NP40-PEGAb2 + esosomi**

## OBIETTIVO 3

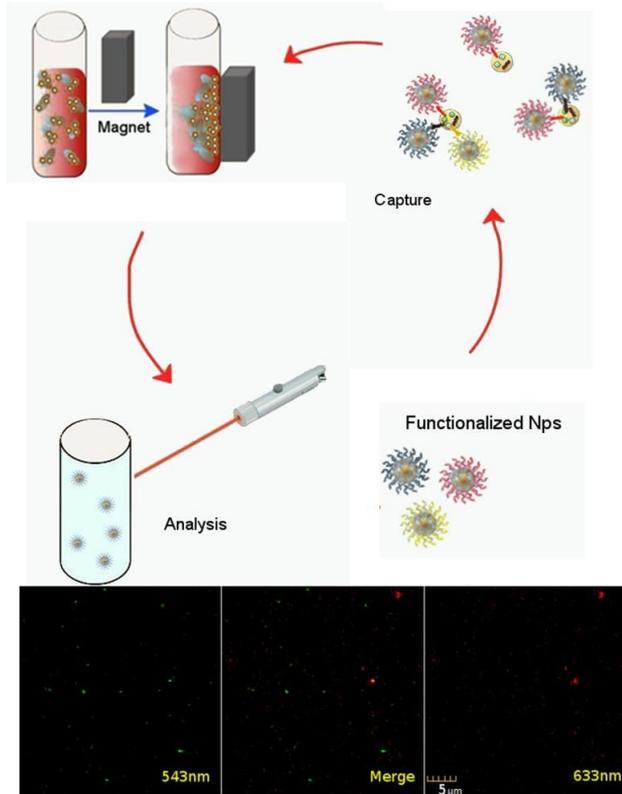
*Progettazione e validazione dei saggi immunometrici per analisi di multimarcatori esosomali (multiplex) basati su nanoparticelle coniugate agli anticorpi specifici*

**Lo scopo** –rilevamento di marcatori esosomali multipli; sfruttano le proprietà ottiche o spettrali di nanoparticelle



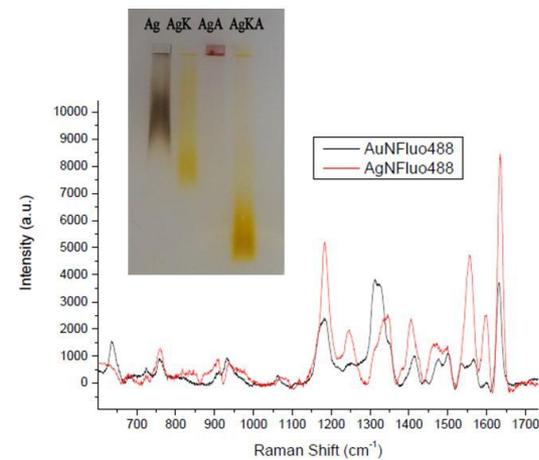
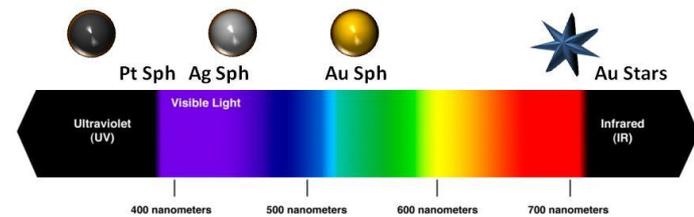
sviluppo di sonde di vario “colore” (ad esempio, marcate con diversi fluorofori o con diversi spettri SERS) basate su nanostrutture metalliche rivestite di materiale per il riconoscimento di esosomi a bassa concentrazione in fluidi biologici.

**Fluorescenza multicolore combinata con Nanoparticle tracking:**



**Sonde SERS o SERRS si basano :**

- i) la struttura metallica (materiale e geometria)
- ii) il coating.



## OBIETTIVO 4



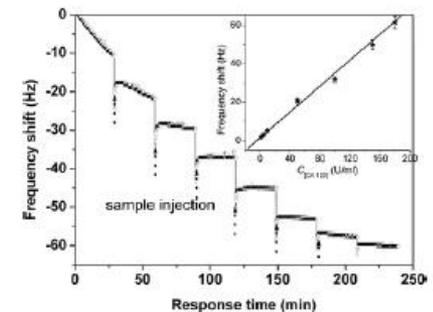
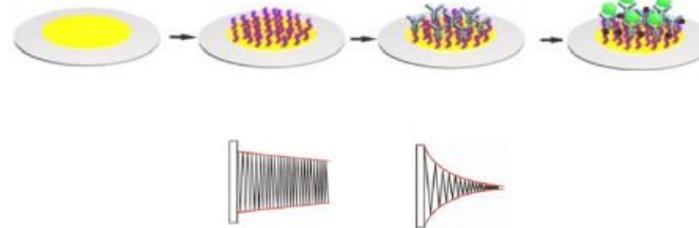
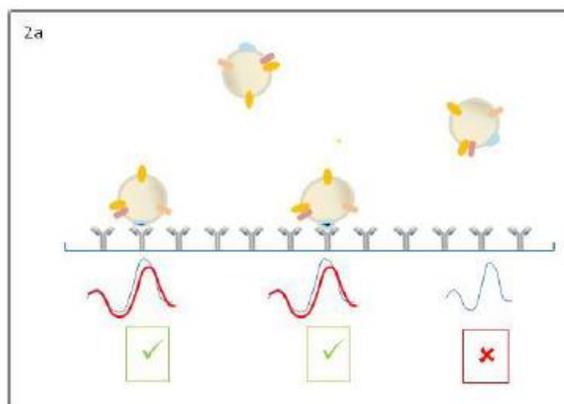
UNISI DIISM Prof. Rocchi  
DBCF Prof. Magnani



### *Progettazione e validazione di nanodispositivi per la rilevazione selettiva e quantificazione degli esosomi nei liquidi biologici attraverso sensori QCM*

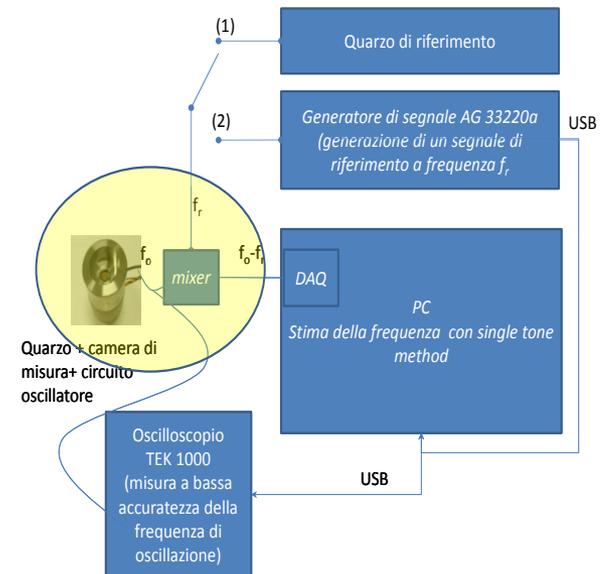
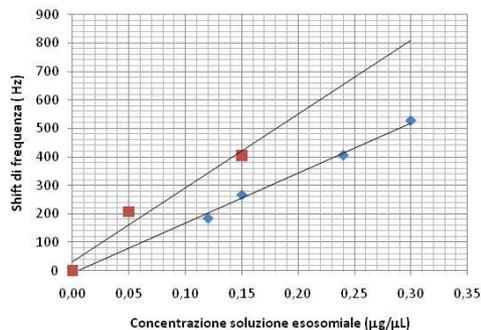
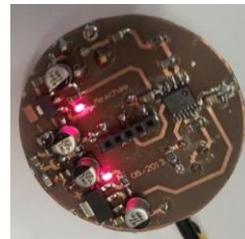
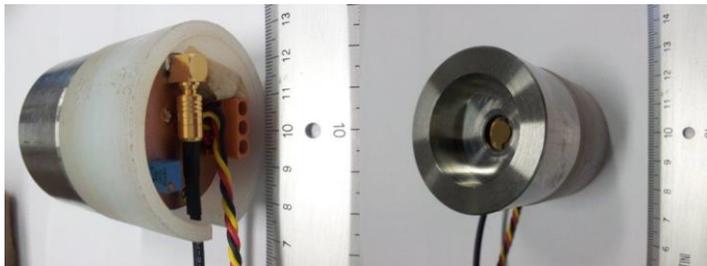
**Lo scopo** – Integrare anticorpi specifici e protocolli di coating ottimizzati con le proprietà del sensore per:

- rapida e sensibile rilevazione e quantificazione di esosomi tumorali
- alternativa ai metodi di quantificazione attualmente presenti sul mercato
- semplice, economico e accurato dispositivo del tipo Point-of-Care



# Realizzazione di un biosensore in grado di catturare esosomi da soluzioni e liquidi fisiologici e di determinarne la concentrazione nella soluzione/liquido in esame

**Prototipo** : Camera di misura a pozzetto con elettronica integrata



**= obiettivo finale – un sensore e sistema di lettura portatile, veloce, sensibile e economico con le applicazioni immediate nell'ambito di ricerca e potenziale di sviluppo in diagnostica**

# Grazie per l'attenzione!



**Antonio Chiesi**

HBM & EXS: CEO

E-mail: [antonio.chiesi@hansabiomed.eu](mailto:antonio.chiesi@hansabiomed.eu)

Mobile: +39 345 3065144

[www.exosomics.eu](http://www.exosomics.eu)

**Natasa Zarovni**

HBM & EXS: Head of R&D

E-mail: [natasa.zarovni@hansabiomed.eu](mailto:natasa.zarovni@hansabiomed.eu)

**Giorgia Radano**

EXS: Researcher

E-mail: [gradano@exosomics.eu](mailto:gradano@exosomics.eu)