República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 10 2012 009598-0 A2

BR102012009598A2

(22) Data de Depósito: 24/04/2012
(43) Data da Publicação: 03/12/2013
(RPI 2239)

(51) Int.Cl.:
A61K 31/35
A61K 47/30
A61K 47/02
A61P 35/00
B82Y 5/00
G01N 33/533

(54) Título: NANOCOMPLEXOS CONJUGADOS E SEU USO

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP

(72) Inventor(es): VALTENCIR ZUCOLOTTO, IÊDA MARIA MARTINEZ PAINO, VALERIA SPOLON MARANGONI

(57) Resumo: NANOCOMPLEXOS CONJUGADOS E SEU USO. A presente invenção se refere a nanocomplexos, os quais compreendem nanopartículas metálicas ou magnétcias associadas a um polímero e conjugadas com uma lectina e um fluoróforo, bem como o seu uso no preparo de um medicamento para o diagnóstico e o tratamento de tumores. Mais especificamnete, a invenção relata a conjugação de nanopartículas de ouro e nanopartículas magnétcias de óxido de ferro, asscoiadas com o poliemro PAGAM-G4 e conjugadas com a lectina jacalina, e marcada com o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína.

NANOCOMPLEXOS CONJUGADOS E SEU USO

Campo da invenção:

A presente invenção se aplica ao campo de diagnósticos e terapia e se refere à nanocomplexos, os quais compreendem nanopartículas metálicas ou magnéticas associadas a um polímero e conjugadas com uma lectina e um fluoróforo, bem como o seu uso no preparo de um medicamento para o diagnóstico e o tratamento de tumores.

Fundamentos da invenção:

A convergência da biotecnologia e da nanotecnologia promove o desenvolvimento de nanomateriais híbridos, que incorporam as propriedades catalíticas e de reconhecimento dos biomateriais (tais como as proteínas e enzimas) com as propriedades magnéticas, eletrônicas, ópticas e catalíticas das nanopartículas.

A funcionalização de nanopartículas com biomoléculas resulta em mudanças nas suas propriedades e interações com o meio ambiente, o que faz com que as mesmas apresentem um elevado potencial para aplicações na biomedicina.

Assim, a transferência de energia e/ou transferência eletrônica entre nanopartículas e biomoléculas conjugadas podem resultar na fotoexcitação de um dos componentes, afetando as propriedades do nanomaterial híbrido e fazendo com que este possua potencial para uma grande variedade de aplicações biotecnológicas.

As lectinas correspondem a uma classe estruturalmente diversa de proteínas ou glicoproteínas, as quais se ligam específica ou reversivelmente a mono e oligossacarídeos. Por apresentarem especificidade, as lectinas tornam-se interessantes para aplicações na biomedicina, uma vez que

auxiliam na diferenciação entre células normais e tumorais, devido à glicosilação alterada na superfície celular destas últimas.

A jacalina é uma proteína nativa encontrada na semente da jaca, que apresenta massa molar de 66000 g mol^{-1} e possui diversas atividades, como estimulante potente e seletivo de funções distintas das células T, habilidade de reconhecer especificamente IgA de soro humano e interagir com regiões específicas do CD4.

Além disso, a jacalina tem se mostrado específica no reconhecimento e ligação de oligossacarídeos α ligados a algumas células tumorais.

Biomoléculas e complexos de biomoléculas têm sido associados a detecção de câncer, como, por exemplo, por meio de dispositivos que utilizam sondas baseadas em lectinas. Neste caso, a lectina se liga preferencialmente a carboidratos da superfície de células anormais e, então, um anticorpo específico para esta lectina e marcado com um fluoróforo se liga, dando o resultado positivo.

Outros materiais inteligentes, os quais fazem uso de nanopartículas magnéticas biocompatíveis, também têm sido reportados, como por exemplo, estruturas do tipo M-S-L-Z, nos quais M representa as nanopartículas magnéticas, S representa um composto biocompatível, L representa um grupo de conexão e Z representa um grupo que pode ser constituído de proteínas, ácidos nucléicos ou outro componente capaz de se ligar de forma específica ao domínio de uma biomacromolécula intracelular.

Ainda, sondas biológicas que incluem um substrato e nanopartículas inorgânicas imobilizadas permitem que as

nanopartículas funcionem como conectores para a ligação de uma molécula específica, permitindo a detecção de células tumorais.

Desta maneira, complexos formados por nanopartículas associadas a polímeros e conjugadas à lectina marcada com um fluoróforo são promissores para aplicações no diagnóstico e tratamento de câncer.

Estado da técnica:

O documento de anterioridade US 2009/0208409 descreve um agente de detecção que inclui um lipossoma polimerizado ou um polímero, uma lectina ou anticorpo e um agente de imagem, no qual a lectina conjugada é capaz de se ligar a carboidratos ou glicoproteínas expressas por neoplasmas ou pólipos gastrointestinais.

O documento inglês GB 2427157 A descreve microesferas revestidas, para serem usadas no tratamento do câncer. As esferas apresentam uma camada de base e uma camada funcional, compreendendo um agente magnetizante, colorido, fluorescente ou radiativo e um agente efetor que compreende uma proteína, anticorpo, lectina, enzima, dentre outros.

O documento de anterioridade WO/2007/097593 se refere a um nanocompósito magnético, solúvel em água, que pode ser utilizado tanto como agente de contraste para diagnosticar câncer por meio de ressonância magnética como também como um sistema de liberação de fármacos para, simultaneamente, diagnosticar e tratar o câncer pela polimerização de um medicamento.

O documento WO 2007082057 A2 ensina um método de identificação de câncer, que consiste em um ensaio compreendendo uma pluralidade de lectinas, dentre elas, a

jacalina.

O documento brasileiro BR PI 05180422 A revela uma técnica histoquímica para diagnóstico de neoplasmas, que se baseia na luminescência de lectinas de ocorrência natural e/ou sintéticas conjugadas com compostos luminescentes.

O estudo intitulado "*Análise digital de imagens de neoplasias da pele avaliadas pela histoquímica com lectinas: marcador potencial para alterações bioquímicas e diagnóstico diferencial de tumores*" ensina que modificações nos glicoconjugados de superfície celular estão associadas à adesão de células alteradas e ao desenvolvimento de características de tumores invasivos.

O artigo "*Alteração dos sítios de ligação da lectina no cólon normal e na colite ulcerativa*" mostra que lectinas apresentam um padrão de reconhecimento para tecidos lesionados por meio de diferenças na expressão de carboidratos, o que as torna marcadores histológicos promissores para diferenciar um epitélio glandular normal de um tecido inflamado.

Nenhum dos documentos do estado da técnica relata o uso de nanopartículas metálicas ou magnéticas associadas a polímeros, lectinas e fluoróforos, as quais permitem o uso de diferentes técnicas para o diagnóstico e tratamento de câncer, como a detecção por microscopia de fluorescência e por imagens de ressonância magnética.

Sumário da invenção:

A presente invenção se refere a nanocomplexos os quais compreendem nanopartículas metálicas ou magnéticas associadas a um polímero e conjugadas com uma lectina e um fluoróforo, bem como o seu uso no preparo de um medicamento para o

diagnóstico e o tratamento de tumores.

Breve descrição das figuras:

A figura 1 é uma imagem de microscopia de transmissão eletrônica que demonstra o nanocomplexo de nanopartículas de ouro associadas à lectina jacalina.

A figura 2 é uma representação gráfica dos espectros de ultravioleta-visível do nanocomplexo de nanopartículas de ouro associadas à lectina jacalina (a), a nanopartícula livre (b) e a lectina livre (c).

A figura 3A é uma imagem de microscopia óptica do nanocomplexo de nanopartículas de ouro associadas à lectina jacalina incubado com células do tipo Hela.

A figura 3B é uma imagem de fluorescência do nanocomplexo de nanopartículas de ouro associadas à lectina jacalina incubado com células do tipo Hela.

A figura 3C é uma imagem de microscopia óptica do nanocomplexo de nanopartículas de ouro associadas à lectina jacalina incubado com células do tipo fibroblastos L929.

A figura 3D é uma imagem de fluorescência do nanocomplexo de nanopartículas de ouro associadas à lectina jacalina incubado com células do tipo fibroblastos L929.

A figura 3E é uma imagem de microscopia óptica do nanocomplexo de nanopartículas de ouro associadas à lectina jacalina incubado com células do tipo K562.

A figura 3F é uma imagem de fluorescência do nanocomplexo de nanopartículas de ouro associadas à lectina jacalina incubado com células do tipo K562.

A figura 3G é uma imagem de microscopia óptica do nanocomplexo de nanopartículas de ouro associadas à lectina jacalina incubado com células mononucleares do sangue.

A figura 3H é uma imagem de fluorescência do nanocomplexo de nanopartículas de ouro associadas à lectina jacalina incubado com células mononucleares do sangue.

Descrição detalhada da invenção:

A presente invenção se refere a nanocomplexos, os quais compreendem nanopartículas metálicas ou magnéticas associadas a um polímero e conjugadas com uma lectina e um fluoróforo, bem como seu uso.

As partículas metálicas são selecionadas do grupo que consiste em nanopartículas ou nanobastões ("*nanorods*") de ouro. Dentre as partículas magnéticas que podem ser utilizadas, tem-se nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4, $CoFe_2O_4$ e $MnFe_2O_4$.

Os polímeros são selecionados do grupo que consistem em poli(amidoamina) de geração 4 (PAMAM-G4), polialilamina hidroclorada (PAH), polidialil dimetil cloreto de amônio (PDDA), quitosana, polivinil álcool (PVA), polivinil sulfônico (PVS) e poliestireno sulfonado (PSS).

Dentre os fluoróforos, pode-se destacar o isotiocianato de fluoresceína ou alexalflúor488.

Mais especificamente, a invenção relata a conjugação de nanopartículas de ouro e nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, associadas com o polímero PAMAM-G4 e conjugadas com lectinas, incluindo a Jacalina, PNA (peanut agglutinin) e ConA (Concanavalin A). Em uma modalidade específica da invenção, faz-se uso da jacalina, encontrada na semente da jaca, a qual é marcada com o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína.

O nanocomplexo da presente invenção apresenta elevada especificidade por células leucêmicas (leucemia mielóide

crônica - K562) e do câncer cervical humano (Hela), quando comparadas com células saudáveis mononucleares do sangue ou fibroblastos saudáveis.

Ainda, o nanocomplexo apresenta alta versatilidade, possibilitando a detecção de células tumorais por microscopia de fluorescência ou ressonância magnética nuclear, devido a presença do marcador fluorescente e das nanopartículas.

Em uma modalidade específica da invenção, um fármaco pode ser adicionado a este complexo, sendo ligado à proteína por complexação.

A doxorrubicina, a qual é utilizada no tratamento de câncer, apresenta grupamentos hidroxila e amino em sua estrutura, e pode ser facilmente ancorada.

Método de obtenção do nanocomplexo:

Os nanocomplexos desta invenção podem ser obtidos pela conjugação da lectina marcada com nanopartículas de ouro ou nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, associadas ao polímero PAMAM-G4.

As nanopartículas de ouro são obtidas em uma única etapa, por meio da redução dos íons na presença do dendrímero PAMAM-G4, enquanto as nanopartículas de Fe_3O_4 são obtidas pelo método da coprecipitação na presença do polissacarídeo Dextran.

As nanopartículas são lavadas em tampão por centrifugação e, posteriormente, conjugadas com a lectina, previamente marcada com o fluoróforo por complexação.

Em uma modalidade específica dessa invenção, as nanopartículas metálicas e magnéticas são conjugadas com a jacalina previamente marcada com o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína.

Para a obtenção dos dois nanocomplexos, as etapas de extração e marcação da jacalina são as mesmas e estão descritas a seguir:

- *Extração da jacalina:*

A lectina jacalina é obtida a partir do extrato bruto das sementes de *Artocapus integrifolia*.

As sementes são lavadas com água destilada, secas a temperatura ambiente e, então, trituradas e ressuspensas em tampão PBS 0,15 mol L^{-1} e pH 7,4.

Esta mistura permanece em agitação por 12 horas a 4°C, sendo, então, centrifugada a 4000 rpm em uma centrífuga refrigerada a 4°C.

O sobrenadante, o qual corresponde ao extrato bruto, é separado e purificado por cromatografia de afinidade, utilizando-se uma resina contendo D-galactose imobilizada equilibrada com tampão PBS.

Após a passagem do extrato bruto, as proteínas presentes no extrato bruto e que não possuem afinidade pela D-galactose são retiradas com tampão PBS e coletados em tubos de 10 mL até que não se observe mais a absorção em 280 nm.

A jacalina é, então, eluída com tampão PBS contendo 0,2 mol L^{-1} de D-Galactose e o eluato passa por uma etapa adicional de purificação utilizando cromatografia de exclusão molecular.

Para isto, volumes de 1 mL da proteína são aplicados em uma coluna de cromatografia de exclusão molecular com resina de dextrose, acoplada a um sistema de cromatógrafo, previamente equilibrado com tampão PBS, em fluxo de 0,5 mL min^{-1}, monitorado pela absorbância em 220 e 280 nm.

- *Marcação da jacalina com o fluoróforo:*

A jacalina é marcada com o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína, cujo comprimento de onda de absorção está na faixa de 450 a 500 nm.

Para tal fim, uma solução de isotiocianato de fluoresceína 0,01 mol.L^{-1} em tampão PBS pH 7,4 é adicionada a suspensão de jacalina 1,0 mg mL^{-1}.

O sistema é mantido em agitação e protegido da luz à temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora. Em seguida, o excesso de isotiocianato de fluoresceína é eliminado por diálise no mesmo tampão em uma membrana de 25 kDa.

- *Obtenção das nanopartículas de ouro associadas ao PAMAM-G4:*

A síntese das nanopartículas de ouro é realizada na presença do PAMAM-G4, que permite não só a estabilização e controle da forma e tamanho das nanopartículas, como também facilita a ligação com a proteína devido a presença de grupamentos amino.

A síntese ocorre pela adição de volumes iguais de $HAuCl_4$ 1,0 mmol L^{-1} e PAMAM-G4 0,07 mmol L^{-1} e, em seguida, uma solução de ácido fórmico 10% v/v sob agitação magnética forte por 4 h.

O sistema é, então, retirado da agitação, mantido em repouso e protegido da luz por 4 horas, sendo, então, centrifugado e ressuspenso em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} e pH 7,4 para eliminar o excesso de polímero e ácido provenientes da síntese.

- *Conjugação das nanopartículas de ouro associada ao PAMAM-G4 com a jacalina:*

Cerca de 200 µL desta solução de nanopartículas de ouro associadas ao PAMAM-G4 (0,3 mmol L^{-1}) são dispersas em tampão

fosfato 10 mmol L^{-1} e pH 7,4 e 1,3 mL de uma solução contendo aproximadamente 1,0 mg mL^{-1} de jacalina.

O sistema é mantido sob agitação a 4°C e protegido da luz por aproximadamente 24 horas. A separação do excesso de jacalina não conjugada com as nanopartículas de ouro associadas é realizado por centrifugação a 13000 rpm e 4°C por 15 minutos.

O sobrenadante é descartado e o precipitado é ressuspenso em 500 µL de tampão fosfato 10 mmol L^{-1} e pH 7,4. O ciclo de lavagem é repetido para garantir que todo o excesso de proteína seja eliminado.

- *Obtenção das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro associadas ao Dextran:*

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (Fe_3O_4) são obtidas pelo método da coprecipitação, que consiste em uma reação de alcalinização controlada, no qual uma base é adicionada a uma solução de sais ferro II e III.

Assim, à uma solução 3 mmol L^{-1} de sais de ferro II e III na proporção de 1:2, respectivamente, e na ausência de oxigênio (N_2 é borbulhado constantemente a solução para evitar a oxidação da magnetita a maghemita), adiciona-se o polissacarídeo natural Dextran 0,5 g L^{-1}, que, além de ser biocompatível, possui muitos grupamentos hidroxila que são utilizados para ancorar a proteína.

O sistema é mantido em agitação por 20 minutos a temperatura ambiente e, então, adiciona-se hidróxido de amônio até pH próximo a 9.

O sistema permanece em agitação por 7 horas a temperatura ambiente e, então, é centrifugado e ressuspenso três vezes em água para retirar o excesso de base e

polissacarídeo.

- *Conjugação das nanopartículas de Fe_3O_4 associadas ao Dextran com a jacalina:*

Em uma etapa de conjugação análoga àquela executada para as nanopartículas de ouro, as nanopartículas de Fe_3O_4 funcionalizadas com Dextran são ressuspensas em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} e conjugadas com a jacalina.

O sistema é agitado por 12 horas a 4°C e, então, o excesso de proteína é eliminado por centrifugação.

Os nanocomplexos contendo as nanopartículas (ouro e óxido de ferro) estabilizados em polímeros e a jacalina marcada com o fluoróforo possuem uma concentração final da ordem de µmol L^{-1} com relação a proteína.

A Figura 1 mostra uma imagem de microscopia de transmissão eletrônica das nanopartículas de ouro associadas ao PAMAM-G4 e conjugadas com a jacalina.

É possível observar a formação de estruturas do tipo *core-shell* (núcleo e concha), devido à funcionalização das nanopartículas com a proteína.

Na figura 2, são demonstrados os espectros de ultravioleta-visível do nanocomplexo de nanopartículas de ouro associadas à lectina jacalina (a), a nanopartícula livre (b) e a lectina livre (c).

É possível observar a presença da proteína mesmo após vários ciclos de centrifugação e lavagem em tampão, sugerindo uma forte interação desta com as nanopartículas.

Testes e resultados:

Experimentos *in vitro* qualitativos foram realizados por microscopia de fluorescência, utilizando células primárias do sangue, leucêmicas (K562), de câncer cervical humano (Hela) e

fibroblastos saudáveis.

As células foram semeadas em placas de cultura de 24 poços, com volume final de 500 µL, e tratadas com as concentrações de 1,0 µmol L^{-1} do nanocomplexo de nanopartícula de ouro associada ao PAMAM-G4 e conjugada com jacalina e o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína e os controles jacalina/fluoróforo e nanopartícula de ouro / PAMAM.

Os volumes das placas foram centrifugados e lavados em tampão PBS, no mínimo três vezes, e as imagens obtidas no microscópio de fluorescência com objetiva de 40x estão demonstradas nas Figuras 2A a 2H.

Pelas figuras, observa-se que o nanocomplexo se liga apenas às células leucêmicas e as do tipo HeLa, o que as torna importante para aplicações como marcador de células cancerígenas para o tratamento e diagnóstico precoce de câncer.

O acúmulo das nanopartículas nas células possibilita a detecção precoce do câncer por meio da utilização das nanopartículas magnéticas como agentes de contraste em imagens de ressonância magnética e/ou por fluorescência, visto que o complexo está marcado com o fluoróforo.

O acúmulo das nanopartículas pode ser utilizado, ainda, para o tratamento por hipertermia ou fototermia. Neste caso, um campo magnético oscilante é aplicado provocando oscilação das nanopartículas magnéticas e, consequentemente, um aquecimento local, ocasionando a morte das células cancerígenas.

Em outras modalidades desta invenção, um fármaco pode ser adicionado a este complexo.

A doxorrubicina, uma droga utilizada no tratamento de

câncer, possui grupamentos hidroxila e amino em sua estrutura, os quais podem ser facilmente ligados a proteína por complexação. Neste caso, o complexo deve ser novamente centrifugado e ressuspenso em tampão para que o excesso da droga seja eliminado.

Além de levar a droga especificamente para a região do câncer, diminuindo os efeitos colaterais relacionados a estes fármacos, a formação de um complexo como este permite a realização do diagnóstico precoce e tratamento por diversas técnicas diferentes, o que aumenta as chances de sucesso no tratamento do câncer.

REIVINDICAÇÕES

1. Nanocomplexo conjugado **caracterizado** pelo fato de compreender nanopartículas metálicas ou magnéticas associadas a um polímero e conjugadas com uma lectina e um fluoróforo.

2. Nanocomplexo conjugado, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que as nanopartículas metálicas são selecionadas do grupo que consiste em nanopartículas ou nanobastões de ouro.

3. Nanocomplexo conjugado, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que as nanopartículas metálicas são nanopartículas de ouro.

4. Nanocomplexo conjugado, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que as nanopartículas magnéticas são selecionadas do grupo que consiste em nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4, $CoFe_2O_4$ e $MnFe_2O_4$.

5. Nanocomplexo conjugado, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que as nanopartículas magnéticas são nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4.

6. Nanocomplexo conjugado, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que os polímeros são selecionados do grupo que consistem em poli(amidoamina) de geração 4 (PAMAM-G4), polialilamina hidroclorada (PAH), polidialil dimetil cloreto de amônio (PDDA), quitosana, polivinil álcool (PVA), polivinil sulfônico (PVS) e poliestireno sulfonado (PSS).

7. Nanocomplexo conjugado, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que o polímero é

poli(amidoamina) de geração 4 (PAMAM-G4).

8. Nanocomplexo conjugado, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a lectina é selecionado do grupo que consiste em jacalina, PNA ou ConA.

9. Nanocomplexo conjugado, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que a lectina é jacalina.

10. Nanocomplexo conjugado, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que os fluoróforos são selecionados do grupo que consiste em isotiocianato de fluoresceína ou alexalflúor488.

11. Nanocomplexo conjugado, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que o fluoróforo é isotiocianato de fluoresceína.

12. Nanocomplexo conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado** pelo fato de que um fármaco pode, ainda, ser ancorado à lectina.

13. Nanocomplexo conjugado, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** por ser o fármaco a doxorubicina.

14. Uso do nanocomplexos conjugado, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizado** por ser no preparo de um medicamento para o diagnóstico e o tratamento de tumores.

FIGURAS

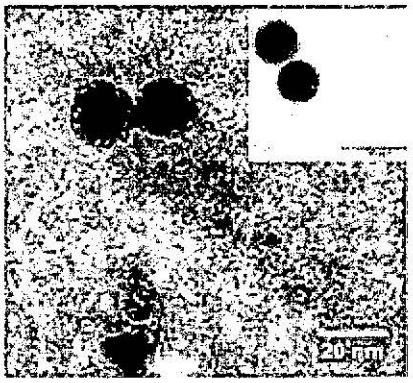

FIGURA 1

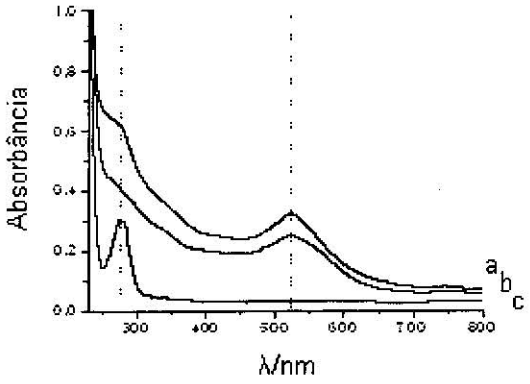

FIGURA 2

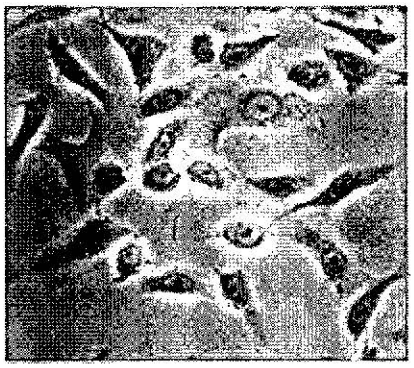

FIGURA 3A

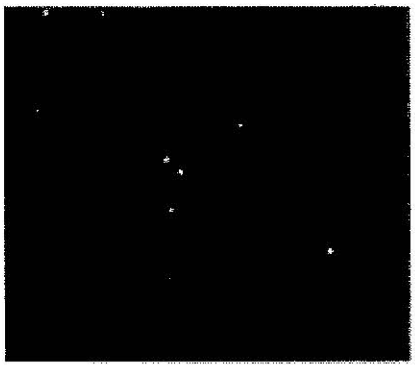

FIGURA 3B

FIGURA 3C

FIGURA 3D

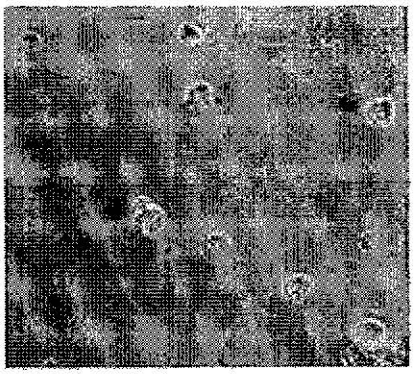

FIGURA 3E

FIGURA 3F

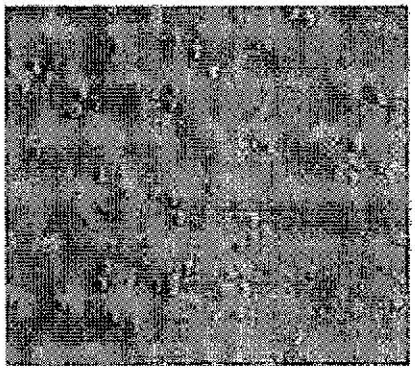

FIGURA 3F

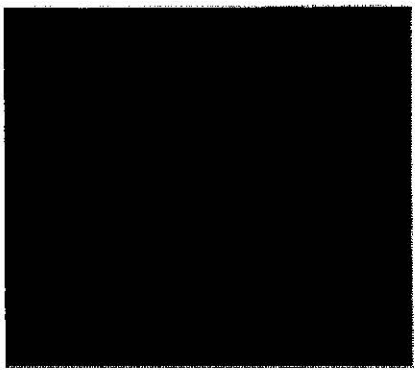

FIGURA 3H

Resumo

NANOCOMPLEXOS CONJUGADOS E SEU USO

A presente invenção se refere a nanocomplexos, os quais compreendem nanopartículas metálicas ou magnéticas associadas a um polímero e conjugadas com uma lectina e um fluoróforo, bem como o seu uso no preparo de um medicamento para o diagnóstico e o tratamento de tumores. Mais especificamente, a invenção relata a conjugação de nanopartículas de ouro e nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, associadas com o polímero PAMAM-G4 e conjugadas com a lectina jacalina, e marcada com o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína.