República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019013469-7 A2

(22) Data do Depósito: 09/01/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 07/01/2020

(54) Título: NANOCONJUGADOS DE OURO COM DOXORRUBICINA DIRECIONADA PARA TERAPIA DE TUMOR

(51) Int. Cl.: G01N 33/48; A61K 47/00; A61K 47/64.

(30) Prioridade Unionista: 09/01/2017 US 62/444,114.

(71) Depositante(es): THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF MISSOURI.

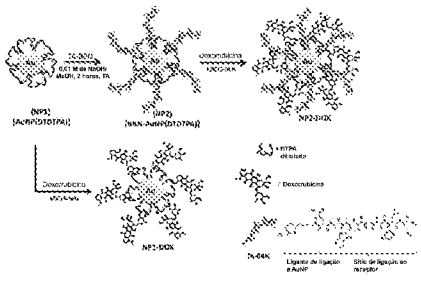
(72) Inventor(es): RAGHURAMAN KANNAN; AJIT ZAMBRE; ANANDHI UPENDRAN.

(86) Pedido PCT: PCT US2018012882 de 09/01/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/129501 de 12/07/2018

(85) Data da Fase Nacional: 27/06/2019

(57) Resumo: A presente revelação fornece nanoconjugados de ouro com doxorrubicina que podem ser usados para tratamentos do câncer. A presente revelação fornece métodos para a produção e o uso dos nanoconjugados.



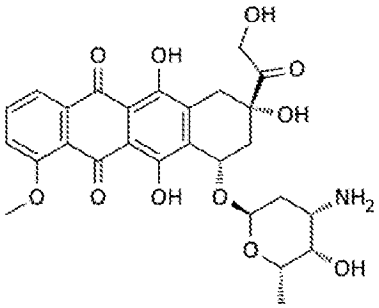
Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"NANOCONJUGADOS DE OURO COM DOXORRUBICINA DIRECIONADA PARA TERAPIA DE TUMOR"**

CAMPO DA REVELAÇÃO

[0001] A presente revelação se refere a nanoconjugados de ouro com doxorrubicina que podem ser usados em tratamentos do câncer. A revelação se refere, também, a métodos para produção e uso dos nanoconjugados.

ANTECEDENTES

[0002] A doxorrubicina (DOX) é um fármaco quimioterápico atualmente em uso clínico para vários tumores, incluindo câncer de mama, câncer de ovário, câncer de fígado, câncer de rim e outros.



Doxorrubicina

[0003] Um dos principais efeitos colaterais associados à doxorrubicina é a sua cardiotoxicidade. A cardiotoxicidade pode ser minimizada por administração direcionada ou pela diminuição da concentração do fármaco. Entretanto, reduzir a quantidade de fármaco administrada reduz de modo correspondente a citotoxicidade e a eficácia. Foram desenvolvidos conjugados de fármaco com anticorpos para aplicação direcionada, mas ainda há uma necessidade de desenvolver uma plataforma de aplicação de doxorrubicina com baixa cardiotoxicidade e/ou alta eficácia.

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 87/147

SUMÁRIO

[0004] A presente revelação fornece nanoconjugados de ouro para a aplicação direcionada de doxorrubicina. A presente revelação fornece um nanoconjugado que compreende: uma nanopartícula de ouro (AuNP), ácido dietilenotriamina pentacético ditiolado (DTDTPA), um peptídeo terminado com ácido tioico e doxorrubicina, sendo que o DTDTPA está diretamente ligado à superfície da nanopartícula de ouro por meio de ao menos uma ligação Au-S, o peptídeo terminado com ácido tioico está diretamente ligado à superfície da nanopartícula de ouro por meio de ao menos uma ligação Au-S e a doxorrubicina está ligada ao DTDTPA.

[0005] Em algumas modalidades, o peptídeo terminado com ácido tioico é bombesina tioica. Em algumas modalidades, a bombesina tioica tem uma sequência: ácido lipoico-Gln-Trp-Ala-Val-Gli-His-Leu-Met-NH_2.

[0006] Em algumas modalidades, a doxorrubicina está ligada ao DTDTPA por meio de uma ligação amida.

[0007] A presente revelação também fornece um processo para preparar um nanoconjugado aqui revelado, sendo que o processo compreende a conjugação de uma nanopartícula de AuNP-DTDTPA com o peptídeo terminado com ácido tioico, sendo que o ouro na nanopartícula de ouro e o peptídeo terminado com ácido tioico estão presentes em uma razão estequiométrica de cerca de 1:0,5 a cerca de 1:4. Em algumas modalidades, o ouro na nanopartícula de ouro e o peptídeo terminado com ácido tioico estão presentes em uma razão estequiométrica de cerca de 1:2.

[0008] Em algumas modalidades, o nanoconjugado aqui revelado compreende cerca de 1% a cerca de 40% do peptídeo terminado com ácido tioico, em peso, do nanoconjugado. Em algumas modalidades, o nanoconjugado aqui revelado compreende cerca de 20% a cerca de 30% do peptídeo terminado com ácido tioico, em peso, do nanoconjugado.

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 88/147

[0009] Em algumas modalidades, o nanoconjugado aqui revelado compreende cerca de 0,01% a cerca de 0,05% de doxorrubicina, em peso, do nanoconjugado. Em algumas modalidades, o nanoconjugado aqui revelado compreende cerca de 0,03% de doxorrubicina, em peso, do nanoconjugado.

[0010] Em algumas modalidades, o nanoconjugado tem um diâmetro hidrodinâmico de cerca de 110 nm a cerca de 140 nm, conforme medido por dispersão dinâmica de luz (DLS - dynamic light scattering, em inglês). Em algumas modalidades, o nanoconjugado tem um diâmetro hidrodinâmico de cerca de 120 nm a cerca de 130 nm, conforme medido por dispersão dinâmica de luz (DLS).

[0011] Em algumas modalidades, o nanoconjugado tem um valor de potencial zeta de cerca de -15 mV a cerca de -30 mV. Em algumas modalidades, o nanoconjugado tem um valor de potencial zeta de cerca de -20 mV a cerca de -25 mV.

[0012] A presente revelação também fornece uma composição farmacêutica que compreende o nanoconjugado aqui revelado e um veículo farmaceuticamente aceitável.

[0013] A presente revelação fornece adicionalmente um método para tratamento de um câncer que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz do nanoconjugado, aqui revelado, a um indivíduo que precisa do mesmo.

[0014] Em algumas modalidades, o câncer é selecionado do grupo que consiste em leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloblástica aguda (LMA), sarcoma ósseo, câncer de mama, câncer de endométrio, câncer gástrico, câncer de cabeça e pescoço, linfoma de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, câncer de fígado, câncer de rim, mieloma múltiplo, neuroblastoma, câncer de ovário, câncer de pulmão, sarcoma de tecidos moles, timomas, câncer de tireoide, câncer de bexiga, sarcoma uterino, câncer de próstata, câncer de cólon, câncer

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 89/147

de ovário, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de pâncreas, tumor de Wilms e macroglobulinemia de Waldenström.

[0015] Em algumas modalidades, o nanoconjugado é administrado ao indivíduo por injeção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0016] A seguir, encontra-se uma breve descrição dos desenhos que são apresentados com o propósito de ilustrar as modalidades exemplificadoras reveladas na presente invenção e não com o propósito de limitar as mesmas.

[0017] A Figura 1 mostra a síntese de BBN-AuNP-DTDTPA-DOX (NP2-DOX).

[0018] A Figura 2 mostra uma estrutura esquemática de BBN-AuNP-DTDTPA-DOX (NP2-DOX).

[0019] A Figura 3 mostra um gráfico de titulação de bombesina terminada com ácido tioico (TA-BBN) com [AuNP(DTDTPA)] para determinar a quantidade de TA-BBN a ser acomodada por [AuNP(DTDTPA)] conforme medido por HPLC. As razões estequiométricas entre Au:BBN estão apresentadas dentro dos parênteses.

[0020] As Figuras 4A e 4B mostram imagens de MET de nanoconjugados NP1 e NP2, respectivamente. A Figura 3C mostra o espectro de absorção UV-visível dos nanoconjugados NP1 e NP2.

[0021] A Figura 5A mostra o espectro de pesquisa de XPS do nanoconjugado NP2. A Figura 5B mostra o espectro de alta resolução de XPS da região C1s do nanoconjugado NP2.

[0022] A Figura 6A mostra o espectro de alta resolução de XPS da região S2p do nanoconstruto NP2. A Figura 6B mostra o espectro de alta resolução de XPS da região Au4f do nanoconstruto NP2.

[0023] A Figura 7 mostra o espectro de fluorescência de doxorrubicina quando excitado a 580 nm e com emissão a 590 nm.

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 90/147

[0024] A Figura 8 mostra a estimativa da carga de doxorrubicina nos nanoconjugados NP1 e NP2 por espectroscopia de fluorescência.

[0025] A Figura 9 mostra o espectro de fluorescência dos nanoconjugados NP1 e NP1-DOX.

[0026] A Figura 10 mostra o espectro de fluorescência dos nanoconjugados NP2 e NP2-DOX.

[0027] A Figura 11 mostra o espectro de absorção UV-visível de NP1, NP2, NP1-DOX e NP2-DOX.

[0028] As Figuras 12A e 12B mostram estudos de estabilidade *in vitro* dos nanoconjugados NP1 e NP2 por espectroscopia de absorção UV-visível. As Figuras 12C e 12D mostram estudos de estabilidade *in vitro* dos nanoconjugados NP1 e NP2 por tamanho hidrodinâmico. As Figuras 12E e 12F mostram estudos de estabilidade *in vitro* dos nanoconjugados NP1 e NP2 pelo potencial zeta quando incubados em várias soluções biologicamente relevantes.

[0029] A Figura 13 mostra os valores de IC_{50} do nanoconjugado NP2 em várias razões estequiométricas entre Au:BBN (1:0,4, 1:2, 1:4) contra ^{125}I-BBN em receptores de GRP que expressam células PC-3 de tumor de próstata.

[0030] A Figura 14 mostra a citotoxicidade *in vitro* da doxorrubicina sozinha, da NP1-DOX e da NP2-DOX em células de câncer de mama humana MDA-MB-231 que não expressam GRP.

[0031] A Figura 15 compara o efeito da NP1-DOX e da NP2-DOX com a doxorrubicina sozinha em células de câncer de mama humana que não expressam GRP.

[0032] A Figura 16 mostra a citotoxicidade *in vitro* da doxorrubicina sozinha, da NP1-DOX e da NP2-DOX em células de câncer de próstata humana PC3 que expressam GRP.

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 91/147

[0033] A Figura 17 compara o efeito da NP1-DOX e da NP2-DOX com a doxorrubicina sozinha em células de câncer de próstata humana que expressam GRP.

[0034] A Figura 18 compara os valores de IC_{50} de doxorrubicina nos nanoconjugados (NP1-DOX e NP2-DOX) com a doxorrubicina sozinha em células de câncer humanas (PC3) que expressam GRP.

[0035] A Figura 19 compara os valores de IC_{50} de doxorrubicina nos nanoconjugados (NP1-DOX e NP2-DOX) com a doxorrubicina sozinha em células de câncer humanas (MDA-MB-231) que não expressam GRP.

[0036] A Figura 20 compara a diferença de porcentagem de morte celular para NP1-DOX e NP2-DOX em células de câncer humanas que expressam GRP (PC3) e que não expressam GRP (MDA-MB-231).

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0037] Os receptores de peptídeo liberador de gastrina (GRP) são superexpressos em uma variedade de células de câncer humanas, como câncer de mama, câncer de próstata, câncer de cólon e outros cânceres. O peptídeo bombesina e seus análogos são conhecidos por direcionarem os receptores de GRP. Em certas modalidades, a presente revelação fornece um sistema de liberação de nanopartículas multicomponentes (nanoconjugado) que compreende nanopartículas de ouro (AuNP), um agente de direcionamento (por exemplo, bombesina (BBN)) e doxorrubicina (DOX) como um agente terapêutico contra o câncer. As nanopartículas de ouro são estabilizadas com ácido dietilenotriamina pentacético ditiolado (DTDTPA) e pode ter uma estrutura de múltiplas camadas. Dessa forma, em certas modalidades, o nanoconjugado pode ser BBN-AuNP(DTDTPA)-DOX. Ensaios de citotoxicidade *in vitro* executados em células de câncer de mama demonstraram surpreendentemente que a BBN-AuNP(DTDTPA)-DOX é muito mais potente em comparação com a doxorrubicina livre.

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 92/147

[0038] Vários exemplos e modalidades do assunto da invenção aqui revelado são possíveis e serão evidentes para o versado na técnica, dado o benefício desta revelação. Nesta revelação, a referência a "algumas modalidades", "certas modalidades" e expressões similares significa, cada uma, que essas modalidades são exemplos não limitadores do assunto da invenção e há modalidades alternativas que não estão excluídas.

[0039] Os artigos "um", "uma", "o" e "a" são usados na presente invenção para se referir a um ou mais de um (isto é, a ao menos um) dos objetos gramaticais do artigo. A título de exemplo, "um elemento" significa um elemento ou mais de um elemento. O termo "ou" significa "e/ou". Os termos "compreendendo", "tendo", "incluindo" e "contendo" devem ser interpretados como termos não limitados (isto é, que significam "incluindo, mas não se limitando a").

[0040] A palavra "compreendendo" é usada de maneira consistente com seu significado não limitado, ou seja, significa que um dado produto ou processo pode, opcionalmente, também ter recursos ou elementos adicionais além daqueles expressamente descritos. Entende-se que onde quer que as modalidades sejam descritas com a linguagem "compreendendo", modalidades de outro modo análogas descritas em termos de "consistindo em" e/ou "consistindo essencialmente em" também são contempladas e estão dentro do escopo desta revelação.

[0041] Como usado aqui, o termo "cerca de" significa ± 10% do valor observado. Somente a título de exemplo, uma composição que compreende "cerca de 30 por cento, em peso," de um composto poderia incluir de 27 por cento, em peso, do composto até, e incluindo, 33 por cento, em peso, do composto.

[0042] Como usado aqui, o termo "nanoconjugado" se refere a um nanomaterial que compreende uma nanopartícula de ouro e outros componentes, como um agente estabilizante, um agente de direcionamento e um agente terapêutico. Em

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 93/147

certas modalidades, o agente estabilizante e o agente de direcionamento podem ser diretamente ligados à superfície da nanopartícula de ouro por meio de uma ou mais ligações covalentes ou não covalentes. Alguns componentes, como o agente terapêutico, podem ser ligados à nanopartícula de ouro através de um outro componente, como o agente estabilizante.

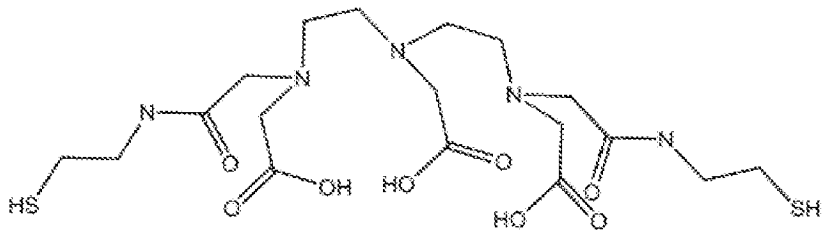
[0043] Como usado aqui, o termo "quantidade terapeuticamente eficaz" significa uma quantidade eficaz, quando administrada a um paciente, para fornecer o benefício terapêutico intencionado. A quantidade que é "eficaz" pode variar de indivíduo para indivíduo, dependendo da idade e condição geral do indivíduo, e similares.

[0044] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um nanoconjugado que compreende: uma nanopartícula de ouro (AuNP), ácido dietilenotriamina pentacético ditiolado (DTDTPA), um peptídeo terminado com ácido tioico e doxorrubicina, sendo que o DTDTPA está diretamente ligado à superfície da nanopartícula de ouro por meio de ao menos uma ligação Au-S, o peptídeo terminado com ácido tioico está diretamente ligado à superfície da nanopartícula de ouro por meio de ao menos uma ligação Au-S e a doxorrubicina está ligada ao DTDTPA.

[0045] Em certas modalidades, o nanoconjugado aqui revelado consiste essencialmente em: uma nanopartícula de ouro (AuNP), ácido dietilenotriamina pentacético ditiolado (DTDTPA), um peptídeo terminado com ácido tioico e doxorrubicina, sendo que o DTDTPA está diretamente ligado à superfície da nanopartícula de ouro por meio de ao menos uma ligação Au-S, o peptídeo terminado com ácido tioico está diretamente ligado à superfície da nanopartícula de ouro por meio de ao menos uma ligação Au-S e a doxorrubicina está ligada ao DTDTPA.

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 94/147

[0046] As nanopartículas de ouro estabilizadas com DTDTPA, isto é, AuNP-DTDTPA, são conhecidas na técnica. Por exemplo, o documento WO 2015/103028 e Debouttiere *et al.*, *Advan. Funt. Mater.* **2006**, 16:2.330-39 descrevem a preparação e o uso de AuNP-DTDTPA, estando ambas as referências aqui incorporadas a título de referência em sua totalidade. A estrutura química do DTDTPA é mostrada abaixo. As moléculas do DTDTPA podem ser ligadas à superfície da nanopartícula de ouro por meio de uma ou duas ligações Au-S.



[0047] Sem se ater à teoria, acredita-se que os laços de DTDTPA que circundam a superfície da AuNP podem incluir uma, duas, três, quatro, cinco ou mais moléculas de DTDTPA. Por exemplo, em algumas modalidades e novamente sem se ater a uma teoria específica, acredita-se que ambos os grupos tióis de uma determinada molécula de DTDTPA podem formar uma ligação Au-S com a superfície de AuNP, formando, assim, um laço com uma molécula de DTDTPA. Em uma outra modalidade, um grupo tiol de uma determinada molécula de DTDTPA pode formar uma ligação Au-S com a superfície da AuNP, enquanto o segundo grupo tiol pode formar uma ligação dissulfeto intermolecular (S-S) com uma segunda molécula de DTDTPA. A segunda molécula de DTDTPA pode ser ligada a ainda outra molécula de DTDTPA por meio de uma ligação dissulfeto ou pode ser ligada à superfície da AuNP por meio de uma ligação Au-S, formando, assim, um laço que consiste em duas ou mais moléculas de DTDTPA. Dependendo de como as moléculas de DTDTPA se organizam, as nanopartículas estabilizadas podem

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 95/147

conter um envoltório orgânico multicamadas de moléculas de ácido pentacético na superfície das AuNPs. Consulte "Debouttiere *et al.*, *Advan. Funt. Mater.* **2006**, 16:2.330-39" e a **Figura 2**.

[0048] Em algumas modalidades, o nanoconjugado aqui revelado compreende cerca de 10% a cerca de 60% de DTDTPA, em peso, do nanoconjugado. Em algumas modalidades, o nanoconjugado compreende cerca de 10%, cerca de 15%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 41%, cerca de 42%, cerca de 43%, cerca de 44%, cerca de 45%, cerca de 46%, cerca de 47%, cerca de 48%, cerca de 49%, cerca de 50%, cerca de 51%, cerca de 52%, cerca de 53%, cerca de 54%, cerca de 55% ou cerca de 60% de DTDTPA, em peso, do nanoconjugado, por exemplo, cerca de 45%, ou uma faixa entre quaisquer dois dos valores anteriores, por exemplo, cerca de 30% a cerca de 60% ou cerca de 40% a cerca de 50%. Em algumas modalidades, o nanoconjugado compreende cerca de 45% de DTDTPA, em peso, do nanoconjugado.

[0049] Em uma modalidade típica, e conforme discutido acima, o nanoconjugado aqui revelado pode compreender um peptídeo terminado com ácido tioico como um agente de direcionamento. Em certas modalidades, o peptídeo de direcionamento pode ser um peptídeo bombesina. O peptídeo bombesina pode ser usado para funcionalizar nanomateriais de ouro para direcionar certas células tumorais. Consulte "Chanda *et al.*, Nano Lett. **2009**, 9(5): 1.798-1.805", "Chanda *et al.* PNAS **2010**, 107(19): 8.760-8.765", "Suresh *et al.*, Bioconjuate Chem. **2014**, 25, 1.565-1.579" e "Silva *et al.*, Bioconjuate Chem. **2016**, 27, 1.153-1.164". Todas essas referências estão aqui incorporadas a título de referência em sua totalidade. O peptídeo bombesina de 14 aminoácidos isolado da pele de anfíbio Bombina e os peptídeos liberadores de gastrina (GRP) relacionados exibem uma resposta melhorada em uma variedade de tecidos tumorais, por exemplo, em câncer de pulmão de células pequenas, de próstata,

de mama e de cólon. Foi relatado que análogos de bombesina com estruturas modificadas exibiram uma afinidade similar ou mesmo maior pelos receptores de GRP. Consulte, por exemplo, "Chanda *et al.*, Nano Lett. **2009**, 9(5): 1.798-1.805" e referências citadas no mesmo. Em certas modalidades aqui descritas, um análogo de bombesina truncado de sete aminoácidos (BBN), mostrado na Figura 1, foi usado como um agente de direcionamento.

[0050] Em algumas modalidades, o peptídeo terminado com ácido tioico pode ser bombesina com terminação tioica (TA-BBN, alternativamente chamada de BBN na presente invenção) que tem uma sequência: ácido lipoico-Gln-Trp-Ala-Val-Gli-His-Leu-Met-NH_2.

[0051] Em algumas modalidades, o peptídeo terminado com ácido tioico (por exemplo, TA-BBN) pode estar diretamente ligado à superfície da nanopartícula de ouro por meio de uma ou duas ligações Au-S.

[0052] Em algumas modalidades, o nanoconjugado aqui revelado compreende cerca de 1% a cerca de 40% do peptídeo terminado com ácido tioico, em peso, do nanoconjugado. Em algumas modalidades, o nanoconjugado compreende cerca de 1%, cerca de 5%, cerca de 10%, cerca de 11%, cerca de 12%, cerca de 13%, cerca de 14%, cerca de 15%, cerca de 16%, cerca de 17%, cerca de 18%, cerca de 19%, cerca de 20%, cerca de 21%, cerca de 22%, cerca de 23%, cerca de 24%, cerca de 25%, cerca de 26%, cerca de 27%, cerca de 28%, cerca de 29%, cerca de 30%, cerca de 35% ou cerca de 40% de peptídeo terminado com ácido tioico, em peso, do nanoconjugado, por exemplo, cerca de 20% ou cerca de 25%, ou uma faixa entre quaisquer dois dos valores anteriores, por exemplo, cerca de 10% a cerca de 30%, cerca de 20% a cerca de 30% ou cerca de 15% a cerca de 25%. Em algumas modalidades, o nanoconjugado compreende cerca de 20% ou cerca de 25% do peptídeo terminado com ácido tioico, em peso, do nanoconjugado.

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 97/147

[0053] Em algumas modalidades, o construto AuNP-DTDTPA-BBN, que pode ser subsequentemente ligado à doxorrubicina, pode ser preparado por um processo que compreende a conjugação da nanopartícula de AuNP-DTDTPA com o peptídeo terminado com ácido tioico, sendo que o ouro na nanopartícula de ouro e o peptídeo terminado com ácido tioico podem estar presentes na reação de conjugação em uma razão estequiométrica de cerca de 1:0,5 a cerca de 1:4. A razão estequiométrica usada na presente invenção se refere a uma razão molar.

[0054] Em algumas modalidades, a razão estequiométrica entre o ouro na nanopartícula de ouro e o peptídeo terminado com ácido tioico usado na reação de conjugação pode ser cerca de 1:0,75, cerca de 1:1, cerca de 1:1,5, cerca de 1:2, cerca de 1:2,5, cerca de 1:3, cerca de 1:3,5, cerca de 1:4, por exemplo, cerca de 1:2, ou uma faixa entre quaisquer duas das razões anteriores, por exemplo, cerca de 1:1 a cerca de 1:4, cerca de 1:1 a cerca de 1:3, cerca de 1:1 a cerca de 1:2, cerca de 1:1,5 a cerca de 1:4, cerca de 1:1,5 a cerca de 1:3, cerca de 1:1,5 a cerca de 1:2,5 ou cerca de 1:1,5 a cerca de 1:2.

[0055] Em algumas modalidades, a quantidade do peptídeo terminado com ácido tioico usada na reação de conjugação está em uma razão com o ouro na nanopartícula de ouro de ao menos cerca de 1:1,5, ao menos cerca de 1:2, ao menos cerca de 1:2,5 ou ao menos cerca de 1:3.

[0056] Em algumas modalidades, a razão estequiométrica entre o ouro na nanopartícula de ouro e o peptídeo terminado com ácido tioico usado na reação de conjugação é de cerca de 1:2.

[0057] Tipicamente, a doxorrubicina no nanoconjugado está ligada ao DTDTPA por meio de uma ligação amida, formada entre um grupo carboxilato do DTDTPA e o grupo amino da doxorrubicina.

[0058] Em algumas modalidades, o nanoconjugado aqui revelado compreende cerca de 0,01% a cerca de 0,05% de doxorrubicina, em peso, do nanoconjugado.

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 98/147

Em algumas modalidades, o nanoconjugado pode compreender cerca de 0,01%, cerca de 0,015%, cerca de 0,02%, cerca de 0,025%, cerca de 0,03%, cerca de 0,035%, cerca de 0,04%, cerca de 0,045% ou cerca de 0,05% de doxorrubicina, em peso, do nanoconjugado, por exemplo, cerca de 0,03%, ou uma faixa entre quaisquer dois dos valores anteriores, por exemplo, cerca de 0,01% a cerca de 0,04%, cerca de 0,01% a cerca de 0,03%, cerca de 0,02% a cerca de 0,05%, cerca de 0,02% a cerca de 0,04%, cerca de 0,02% a cerca de 0,03% ou cerca de 0,025% a cerca de 0,035%. Em algumas modalidades, o nanoconjugado compreende cerca de 0,03% de doxorrubicina, em peso, do nanoconjugado.

[0059] Os nanoconjugados podem ser caracterizados por seu diâmetro hidrodinâmico (isto é, tamanho hidrodinâmico). Em algumas modalidades, o nanoconjugado aqui revelado tem um diâmetro hidrodinâmico de cerca de 100 nm a cerca de 150 nm ou cerca de 110 nm a cerca de 140 nm, conforme medido por dispersão dinâmica de luz (DLS). Em algumas modalidades, o nanoconjugado tem um diâmetro hidrodinâmico de cerca de 100 nm, cerca de 110 nm, cerca de 115 nm, cerca de 120 nm, cerca de 125 nm, cerca de 130 nm, cerca de 135 nm, cerca de 140 nm, cerca de 145 nm ou cerca de 150 nm, conforme medido por dispersão dinâmica de luz (DLS), por exemplo, cerca de 125 nm, ou uma faixa entre quaisquer dois dos valores anteriores, por exemplo, cerca de 120 nm a cerca de 125 nm, cerca de 120 nm a cerca 130 nm ou cerca de 125 nm a cerca de 130 nm. Em algumas modalidades, o nanoconjugado tem um diâmetro hidrodinâmico de cerca de 125 nm, conforme medido por dispersão dinâmica de luz (DLS).

[0060] Os nanoconjugados também podem ser caracterizados por seu potencial zeta. Em algumas modalidades, o nanoconjugado aqui revelado tem um valor de potencial zeta de cerca de -15 mV a cerca de -30 mV. Em algumas modalidades, o nanoconjugado tem um valor de potencial zeta de cerca de -

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 99/147

15 mV, cerca de -16 mV, cerca de -17 mV, cerca de -18 mV, cerca de -19 mV, cerca de -20 mV, cerca de -21 mV, cerca de -22 mV, cerca de -23 mV, cerca de -24 mV, cerca de -25 mV, cerca de -26 mV, cerca de -27 mV, cerca de -28 mV, cerca de -29 mV ou cerca de -30 mV, por exemplo, cerca de -23 mV, ou uma faixa entre quaisquer dois dos valores anteriores, por exemplo, cerca de -15 mV a cerca de -25 mV, cerca de -20 mV a cerca de -25 mV ou cerca de -20 mV a cerca de -30 mV. Em algumas modalidades, o nanoconjugado tem um valor de potencial zeta de cerca de -20 mV a cerca de -25 mV.

[0061] Em uma modalidade, o nanoconjugado aqui revelado consiste essencialmente em uma nanopartícula de ouro (AuNP), ácido dietilenotriamina pentacético ditiolado (DTDTPA), um peptídeo bombesina terminado com ácido tioico (TA-BBN) e doxorrubicina, sendo que o DTDTPA está diretamente ligado à superfície da nanopartícula de ouro por meio de ao menos uma ligação Au-S e a doxorrubicina está ligada ao DTDTPA, sendo que o precursor do nanoconjugado AuNP-DTDTPA-BBN é preparado por um processo que compreende conjugar as nanopartículas de AuNP-DTDTPA com o TA-BBN, sendo que o ouro na nanopartícula de ouro e o peptídeo bombesina terminado com ácido tioico estão presentes na reação de conjugação em uma razão estequiométrica de cerca de 1:2.

[0062] Em certas modalidades, o nanoconjugado descrito acima pode compreender uma nanopartícula de ouro (AuNP), ácido dietilenotriamina pentacético ditiolado (DTDTPA), um peptídeo bombesina terminado com ácido tioico (TA-BBN) e doxorrubicina, sendo que o nanoconjugado compreende cerca de 15% a cerca de 25% de TA-BBN, cerca de 25% a cerca de 35% de DTDTPA e cerca de 0,01% a cerca de 0,05% de doxorrubicina, em peso, do nanoconjugado.

[0063] Em uma outra modalidade, o nanoconjugado aqui revelado pode compreender uma nanopartícula de ouro (AuNP), ácido dietilenotriamina

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 100/147

pentacético ditiolado (DTDTPA), um peptídeo bombesina terminado com ácido tioico (TA-BBN) e doxorrubicina, sendo que o nanoconjugado compreende cerca de 20% de TA-BBN, cerca de 30% de DTDTPA e cerca de 0,03% de doxorrubicina, em peso, do nanoconjugado.

[0064] Embora o peptídeo de direcionamento esteja tipicamente presente nos nanoconjugados aqui descritos, em algumas modalidades, o nanoconjugado aqui revelado não compreende um peptídeo terminado com ácido tioico. Por exemplo, em algumas modalidades, o nanoconjugado compreende uma nanopartícula de ouro (AuNP), ácido dietilenotriamina pentacético ditiolado (DTDTPA) e doxorrubicina, sendo que o DTDTPA está diretamente ligado à superfície da nanopartícula de ouro por meio de ao menos uma ligação Au-S, e a doxorrubicina está ligada ao DTDTPA, conforme descrito em outra parte na presente invenção. Esse construto é chamado na presente invenção de AuNP(DTDTPA)-DOX.

[0065] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um método para preparar o nanoconjugado aqui revelado, sendo que o método compreende o acoplamento de doxorrubicina com uma nanopartícula funcionalizada com DTDTPA. Em algumas modalidades, o método compreende (1) conjugar AuNP-DTDTPA com um peptídeo terminado com ácido tioico (por exemplo, TA-BBN) para formar um conjugado e (2) acoplar o conjugado à doxorrubicina para formar o nanoconjugado.

[0066] Em algumas modalidades, a etapa de acoplamento forma uma ligação amida entre um grupo carboxila de DTDTPA e o grupo amina de DOX. Em algumas modalidades, a etapa de acoplamento ocorre com o uso de um agente ativador, como EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodi-imida) e sulfo-NHS (N-hidroxissulfossuccinimida).

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 101/147

[0067] Em certas modalidades, a presente revelação fornece uma composição farmacêutica que compreende o nanoconjugado aqui revelado e um veículo farmaceuticamente aceitável.

[0068] Em certas modalidades, a presente revelação fornece também um método para tratar um câncer que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz do nanoconjugado aqui revelado a um indivíduo que precisa do mesmo. Em algumas modalidades, o indivíduo é um ser humano.

[0069] Em algumas modalidades, o câncer tratado pode ser selecionado do grupo que consiste em leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloblástica aguda (LMA), sarcoma ósseo, câncer de mama, câncer de endométrio, câncer gástrico, câncer de cabeça e pescoço, linfoma de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, câncer de fígado, câncer de rim, mieloma múltiplo, neuroblastoma, câncer de ovário, câncer de pulmão (por exemplo, câncer de pulmão de células pequenas e câncer de pulmão de células não pequenas), sarcoma de tecidos moles, timomas, câncer de tireoide, câncer de bexiga (por exemplo, câncer de bexiga de células de transição), sarcoma uterino, câncer de próstata, câncer de cólon, câncer de ovário, câncer de pâncreas, tumor de Wilms e macroglobulinemia de Waldenström.

[0070] Em algumas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos na presente invenção está associado à superexpressão de GRP. Em algumas modalidades, o câncer associado à superexpressão de GRP pode ser câncer de pulmão de células pequenas, câncer de próstata, câncer de mama, câncer de cólon, câncer de ovário, câncer de pulmão de células não pequenas ou câncer de pâncreas.

[0071] O nanoconjugado ou a composição farmacêutica revelados na presente invenção podem ser administrados a um indivíduo por vários métodos conhecidos pelo versado na técnica. Por exemplo, o nanoconjugado ou a

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 102/147

composição farmacêutica da presente revelação podem ser administrados por injeção ou por administração via oral.

[0072] Os exemplos a seguir são meramente ilustrativos das composições e dos métodos revelados na presente invenção e não se destinam a limitar o escopo da mesma.

Exemplos

[0073] Métodos gerais: Os materiais usados para a síntese de nanopartícula de ouro (AuNPs) foram adquiridos junto a fornecedores padrão. Ácido tetracloroáurico tri-hidrato ($HAuCl_4.3H_2O$), boroidreto de sódio ($NaBH_4$), ácido dietilenotriamina pentacético (DTPA), anidrido acético, piridina anidra, cloridrato de 2-aminoetanotiol, trietilamina, ácido acético glacial (CH_3COOH), nitrato de gálio ($Ga(NO_3)_3$), hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl), metanol (MeOH), éter dietílico (Et_2O), cloreto de sódio (NaCl), dimetilformamida (DMF) e sulfóxido de dimetila (DMSO) foram adquiridos junto à Aldrich e usados conforme recebido. Para a preparação de soluções aquosas e para o enxágue de nanopartículas de ouro, foi usada água Milli-Q (DI) (ρ>18MΩ). O kit de ensaio de proliferação celular MTT foi obtido junto à Promega Corporation, EUA.

[0074] Espectroscopia UV-visível: Os espectros de absorção UV-visível foram registrados em temperatura ambiente com o uso de um espectrofotômetro Cytation 3 (Biotek) em placa de 96 poços descartável com correção de comprimento de trajetória.

[0075] Microscopia eletrônica: As imagens de microscópio eletrônico de transmissão foram obtidas com um microscópio eletrônico de transmissão (MET) JEOL 1400, JEOL LTD., Tóquio, Japão. As amostras de MET foram preparadas colocando-se 5 µl de solução de nanopartículas de ouro sobre a grade de cobre revestida com carbono de 300 mesh. O excesso de solução foi removido cuidadosamente e permitiu-se que a grade secasse por mais cinco minutos. O

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 103/147

tamanho médio e a distribuição de tamanho das nanopartículas foram determinados pelo processamento do Adobe Photoshop de imagem de MET com plug-ins Fovea.

[0076] Dispersão dinâmica de luz (DLS) e análise de potencial zeta: As medições de DLS foram executadas com um Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., EUA) equipado com um laser de He-Ne de 633 nm e que operava em um ângulo de 173°. O software usado para coletar e analisar os dados foi o Dispersion Technology Software (DTS) versão 5.10 da Malvern. Seiscentos (600) µl de cada amostra foram medidos em cadinhos de dimensionamento semimicro descartáveis de baixo volume (Fisher Scientific, EUA) com um comprimento de trajetória de 10 mm. As medições em triplicata foram feitas em uma posição de 4,65 mm distante da parede do cadinho com um atenuador automático. Foram realizados realizados 15 ciclos de 10 segundos para cada amostra. A distribuição de tamanho, o diâmetro médio Z e o índice de polidispersidade (PDI, de "polydispersity index") foram obtidos a partir da função de autocorrelação com o uso do "modo de uso geral" para todas as amostras de nanopartículas. O fator de filtro padrão de 50%, o limite padrão mais baixo de 0,05 e o limite superior de 0,01 foram usados. As medições do potencial zeta foram realizadas em triplicatas usando água como dispersante e o modelo de Huckel. Foram realizados 20 ciclos com modo de autoanálise para cada amostra.

[0077] Análise de rastreamento de nanopartículas: Os diâmetros hidrodinâmicos das AuNPs foram medidos com o uso do sistema LM10-HSGFT da NanoSight configurado com uma unidade de visualização de amostra LM14G de temperatura controlada equipada com um laser de 532 nm (verde) (NanoSight Limited, Amesbury, Reino Unido). O rastreamento de vídeo das AuNPs com base na dispersão de Rayleigh foi capturado com uma câmera Marlin CCD monocromática (Allied Vision Technologies, Alemanha). Uma seringa de 1 ml

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 104/147

(Becton Dickinson, NJ, EUA) foi usada para aplicar as amostras à câmara de visualização e a temperatura foi mantida constante em 22°C. O programa NanoSight 2.2 foi usado para coletar e analisar os dados da amostra. Cada medição de tamanho foi baseada em um vídeo de 30 segundos e a equação de Stokes-Einstein foi usada para calcular o diâmetro hidrodinâmico médio. Conforme observado abaixo, as amostras foram diluídas 30 vezes em relação à concentração de AuNP de estoque antes das medições de NTA. Essa diluição foi selecionada de modo que as ~900 partículas fossem rastreadas em um vídeo de 30 segundos. Estas condições forneceram uma amostragem representativa de toda a amostra e são confirmadas pelo fato de que a distribuição de tamanho não mudou com vídeos mais longos nos quais significativamente mais nanopartículas foram analisadas. Três medições foram conduzidas para cada amostra para fornecer um tamanho médio e desvio padrão.

[0078] Cultura celular: Células de carcinoma de próstata humana PC-3 e de mama humana MDA-MB231 (ATCC, EUA) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (obtido junto à Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA) suplementadas com 4,5 g/l de D-glicose, 25 mM de Hepes, 0,11 g/l de piruvato de sódio, 1,5 g/l de bicarbonato de sódio, 2 mM de L-glutamina, 10% de soro bovino fetal inativado por calor (Atlanta Biologicals, EUA) e 1% de solução antibiótica de penicilina/estreptomicina. As células foram cultivadas em uma atmosfera umidificada de 95% de ar e 5% de Co_2 a 37°C (Thermo Scientific, EUA), com o meio alterado a cada dois dias. As células eram aderentes em monocamadas, e quando confluentes, foram colhidas dos frascos de cultura celular com tripsina-EDTA (Invitrogen) e semeadas mais distantes.

[0079] Medições de IC_{50}: A afinidade de ligação ao receptor dos conjugados foi determinada por um ensaio de ligação celular competitiva em culturas de células PC-3 com o uso de ^{125}I-Tir4-bombesina como o ligante de rádio específico

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 105/147

para GRP. Aproximadamente 30.000 células foram incubadas a 37°C durante 40 minutos sob 5% de CO_2 na presença de 20.000 cpm de ^{125}I-Tir4-bombesina (2.200 Ci/mmol) e aumento de concentração do conjugado testado. Após a incubação, o meio de reação foi aspirado e as células foram lavadas três vezes com tampão modificado de RPMI 1640 frio. A radioatividade associada a células foi determinada por contagem em um sistema de contagem Packard Riastar γ. Os valores de IC_{50} foram calculados com o uso do software de representação gráfica Graph Fit 4.0. A porcentagem de ^{125}I-Tir4-bombesina ligada a células foi plotada contra o aumento de concentração do conjugado testado para determinar seu valor de IC_{50}.

[0080] Ensaio de citotoxicidade in vitro: A avaliação de citotoxicidade in vitro de NP1-DOX e NP2-DOX com os respectivos controles como NP1, NP2 e doxorrubicina livre foi realizada em células de câncer que expressam e não expressam GRP, PC3 e MDA-MB-231, respectivamente. A avaliação de citotoxicidade foi realizada em triplicatas e o protocolo foi seguido conforme descrito pelo fabricante. Resumidamente, 1 x 10^5 ml^{-1} de células em fase de crescimento exponencial foram colocados em uma placa revestida com poliestireno de 96 poços de fundo plano e foram incubados durante 12 horas e em uma incubadora de CO_2 com 5% de CO_2 e a 37 °C. Uma série de concentrações na faixa de 0 a 10 µg/ml (0, 0,31, 0,625, 1,25, 2,5, 5,0 e 10 µg/ml) de NP1-Dox e NP2-Dox foi preparada no meio. Cada concentração foi adicionada à placa em quadruplicatas. Após uma incubação de 24 horas, 10 µl por poço MTT (conforme recebidos do fabricante, Promega Corporation, EUA) foram adicionados e mantidos durante 4 horas, e os cristais de formazan assim formados foram dissolvidos em 100 µl de tampão de solubilizante/detergente. As placas foram mantidas durante 2 horas no escuro a 25°C para dissolver todos os cristais e a intensidade da cor desenvolvida foi medida por leitor de microplacas (Epoch, BioTek, EUA) operando a 570 nm de comprimento

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 106/147

de onda. Os poços com meio, nanopartículas e MTT completos, mas sem células, foram usados como blocos brutos. As células não tratadas foram consideradas 100% viáveis.

[0081] Estudos de estabilidade in vitro: Os estudos de estabilidade in vitro foram realizados por solução de incubação de NP1 e NP2 em várias condições de pH: 2, 5, 7, 10 e 12 pelo período de 24 horas. O comportamento de estabilidade para ambos também foi monitorado por soluções aquosas de provocação de NP1 e NP2 (0,5 ml) com 0,5 ml cada de 0,2 M de cisteína, 0,2 M de histidina, 0,2 M de HSA e 10% de soluções salinas. A estabilidade foi medida por monitoramento da absorbância UV-visível, do raio hidrodinâmico e das medições do potencial zeta de 0 hora a 96 horas (0, 1, 24, 48, 72 e 96 horas). Uma alteração desprezível na banda de plásmon UV-Vis de NP1 e NP2 confirmou a retenção de composição nanoparticulada com comportamento estável em todas as soluções de provocação, exceto cisteína. As soluções tratadas não mostraram qualquer alteração perceptível em raios hidrodinâmicos, confirmando, assim, a estabilidade desses conjugados.

Exemplo 1

Síntese e caracterização de conjugados de BBN-AuNP-DTDTPA

[0082] As nanopartículas de ouro funcionalizadas com ácido dietilenotriamina pentacético ditiolado (DTDTPA) (AuNP-DTDTPA; **NP1**) foram usadas como um precursor para conjugar o peptídeo de direcionamento, a bombesina (BBN) e um agente quimioterápico, DOX, sobre a superfície da nanopartícula. Consulte a **Figura 1**.

[0083] A primeira etapa foi conjugar o peptídeo de direcionamento com **NP1**. A bombesina terminada com tioctila (TA-BBN) foi usada para conjugar o peptídeo com **NP1** através da ligação ouro-tiol. Três razões estequiométricas diferentes de AuNP:BBN foram usadas (1:0,5, 1:2 e 1:4). O excesso de BBN não reagida foi removido por lavagens repetidas e o BBN-AuNP-DTDTPA (**NP2**) foi isolado como

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 107/147

péletes de nanopartículas puras. A análise por HPLC das soluções sobrenadantes obtidas após a conjugação de TA-BBN a **NP1** foi utilizada para quantificar a ligação de TA-BBN a **NP2**. Uma curva de calibração padrão foi construída com o uso de diferentes concentrações de TA-BBN e a área sob a curva (AUC) de concentrações conhecidas de TA-BBN usada nas reações foi determinada por HPLC. A análise da AUC nos sobrenadantes e a concentração conhecida de TA-BBN foram correlacionadas para determinar a quantidade de TA-BBN conjugada na superfície de **NP2** (**Figura 3**). A conjugação do construto AuDTDTPA com TA-BBN em uma razão de 1:2 (Au:TA-BB) resultou em cerca de 0,26 mg de TA-BBN sendo incorporada ao construto por 1 mg de AuDTDTPA. Consulte a **Figura 3**. O **NP2** preparado com o uso da razão 1:2 mostrou uma estabilidade notável e foi, portanto, escolhido para estudos adicionais.

[0084] Os nanoconjugados foram caracterizados em detalhes por análise de imagens de microscópio eletrônico de transmissão (MET), espectroscopia de absorção UV-visível, dispersão dinâmica de luz (DLS) e medições de potencial zeta. As imagens de MET mostraram uma distribuição de tamanho uniforme dos nanoconjugados, com uma faixa de tamanho de 3 a 5 nm (**Figuras 4A** e **4B**). A **NP2** não mostrou alteração no espectro de absorção UV-visível em comparação com a **NP1** mediante conjugação com BBN. (**Figura 4C**). Uma alteração de 20 nm no diâmetro hidrodinâmico foi observada na **NP2** em comparação com a **NP1** após a conjugação com BBN (1:2, Au:BBN). A alteração de potencial zeta foi desprezível (~3 unidades) em **NP2** em comparação com **NP1**. O tamanho médio de partícula determinado com o uso de análise de rastreamento de nanopartículas (NTA, de "nanoparticle tracking analysis") correlacionou-se bem com as medições de dispersão dinâmica de luz. As propriedades físico-químicas dos conjugados **NP1** e **NP2** estão resumidas na **Tabela 1**.

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 108/147

Tabela 1

	DLS Tamanho hidrodinâmico (*d* nm)	**Carga (mV)**
NP1	78	-72
NP1-DOX	95	-23
NP2	105	-69
NP2-DOX	124	-23

Exemplo 2

Análise de XPS

[0085] Para compreender a natureza da ligação e das interações químicas entre AuNP-DTDTPA e TA-BBN, foi realizada uma análise de XPS detalhada. O espectro de XPS da **NP2** exibe o pico de característica de C, N, O, S e Au (**Figura 5A**). O espectro de alta resolução de XPS das regiões C1s mostra várias regiões C-C, C-H, C-O, C-N, O-C=O, N-C=O conforme esperado do peptídeo TA-BBN conjugado (**Figura 5B**). As composições elementares relativas e as atribuições de pico para espécies de carbono de **NP2** são mostradas nas **Tabelas 2** e **3**, respectivamente.

Tabela 2: Composições elementares relativas de BBN-[AuNP(DTDTPA)], conforme determinado por XPS, [% atômica]

	C	N	O	Na†	Si*	S	Au
BBN-[AuNP(DTDTPA)]	57	14	19	3,0	1,2	3,1	3,6

† Sódio detectado devido à dissolução em solução de NaOH

* Silício detectado devido à deposição na pastilha de silício

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 109/147

Tabela 3: Composições relativas e atribuições de pico com a máxima probabilidade para espécies de carbono, conforme determinado por XPS, região C1s [% atômica]

	C-C, C-H	C-O, C-N	O-C=O, N-C=O
BBN-[AuNP(DTDTPA)]	41	35	24

[0086] A análise do espectro de alta resolução de XPS para a região S 2p sugere que há duas espécies S diferentes (Espécie 1 e Espécie 1), e cada uma é dividida em uma duplicata. A Espécie 1 exibe dois picos de enxofre distintos em 162,3 e 163,5 eV, atribuídos à ligação Au-S do DTDTPA. O pico em duplicata de enxofre, S $2p_{3/2}$ e S $2p_{1/2}$ com acoplamento de 1,2 eV, confirma a adsorção de tióis na superfície do ouro. Os valores de acoplamento e energia de ligação se correlacionam bem com aqueles relatados na literatura para **NP1**; entretanto, os picos se deslocam para uma região de energia de ligação ligeiramente mais alta (0,5 eV) após a conjugação com BBN. Adicionalmente, os dois picos de enxofre distintos para a Espécie 2 em 163,2 e 164,4 eV com uma razão de 2:1 correspondem a Au-S (enxofre coordenado com AuNPs) e S-CH3 (enxofre presente no aminoácido metilcisteína na cadeia principal do peptídeo BBN), respectivamente. Cada classe de pico de enxofre foi adicionalmente dividida na duplicata S2p3/2 e S2p1/2 com acoplamento de 1,2 eV, confirmando a conjugação de BBN com AuNP, conforme relatado na literatura. Tal presença de duplicata com uma área equivalente a uma energia de ligação mais alta indica que ambos os átomos de enxofre de TA-BBN formaram uma ligação Au-S na superfície de AuNP. Após a conjugação com BBN, os valores de energia de ligação se deslocam para uma região de energia mais baixa em comparação com a AuNP-BBN relatada na literatura. Isso pode ser devido à diferença no tamanho do núcleo das nanopartículas que foram usadas para conjugação de BBN. As energias para S

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 110/147

elementar e algumas formas orgânicas de S situam-se na faixa de 162 a 164 eV (**Figura 6A**). Como nenhum pico adicional é observado na região de energia mais alta do espectro que corresponde a enxofre oxidado, essas medições são consistentes com a observação de que o BBN-AuNP-DTDTPA (**NP2**) é o produto exclusivo formado durante a reação de nanoconjugação.

[0087] A região 4f do espectro mostra dois sinais diferentes para o ouro com energias de 83,6, 84,3 e 87,2, 88,0 eV para Au $4f_{7/2}$ e Au $4f_{5/2}$, respectivamente, correspondendo ao átomo de ouro de núcleo Au (0) e ouro de superfície com caráter de Au (I) parcial (**Figura 6B)**. Acredita-se amplamente, a partir de vários estudos recentes, que o dissulfeto em ácido tioico adiciona oxidativamente às AuNPs, resultando em um caráter de Au (I) parcial na superfície da nanopartícula. O sinal que corresponde às energias de ligação de 84,3 e 88 eV para picos de Au na região 4f é similar às AuNPs conjugadas com peptídeo relatadas na literatura, sugerindo que o Au está ligado ao átomo de S de DTDTPA e TA-BBN. Consistente com este fato, dois estados de oxidação diferentes de ouro correspondendo a átomos de ouro de superfície e de núcleo foram observados no espectro de XPS. Os resultados de vários estudos de XPS sobre nanopartículas de ouro confirmaram descobertas similares. As observações acima estabelecem claramente a ligação de TA-BBN no nanoconjugado **NP2**.

Exemplo 3

Síntese e caracterização de conjugados de BBN-AuNP-DTDTPA-DOX

[0088] Os grupos carboxila de DTDTPA sobre a superfície das AuNPs estão disponíveis para funcionalização adicional. Esses grupos carboxila foram utilizados para conjugação da doxorrubicina. A química EDC-sulfoNHS tradicional foi usada para conjugar o grupo amina de DOX com os grupos carboxila de DTDTPA para obter AuNP-DTDTPA-doxorrubicina não direcionada (**NP1-DOX**) e BBN-AuNP-DTDTPA-DOX direcionado (**NP2-DOX**).

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 111/147

[0089] A carga de doxorrubicina em **NP1** e **NP2** foi estimada por espectroscopia de fluorescência. A doxorrubicina mostra uma assinatura de fluorescência a 600 nm quando excitada a 485 nm e emitida a 590 nm (**Figura 7**). Diluições seriais de DOX foram feitas e uma curva de calibração padrão foi construída para registrar as intensidades de fluorescência (**Figura 8**). As intensidades fluorescentes dos sobrenadantes foram registradas e correlacionadas com a curva de calibração padrão para quantificar a quantidade de doxorrubicina conjugada com AuNPs. Através de medições fluorescentes, descobriu-se que 0,53 µg e 0,3 µg de doxorrubicina por mg de AuNP-DTDTPA e BBN-AuNP-DTDTPA foram conjugados, respectivamente. Adicionalmente, diluições seriais de **NP1-DOX** e **NP2-DOX** foram feitas e as intensidades fluorescentes foram registradas. A variação de intensidade de fluorescência foi proporcional e consistente, confirmando a conjugação de DOX com **NP1** e **NP2**. A medição de fluorescência também sugere que a fluorescência de doxorrubicina permanece não afetada após a conjugação nas AuNPs (**Figura 9** e **10**). Os espectros UV-visíveis de **NP1-DOX** e **NP2-DOX** com seus respectivos controles são mostrados na **Figura 11**. Uma alteração de 10 a 20 nm no diâmetro hidrodinâmico foi observada após a conjugação com DOX tanto com **NP1** quanto com **NP2**. O potencial zeta mudou para positivo após a conjugação com DOX. O valor de potencial zeta negativo de -72 e -69 mV para **NP1** e **NP2**, respectivamente, mudou para -23 mV, indicando que as partículas repelem uma à outra e que não há tendência de as partículas se agregarem. As propriedades físico-químicas dos conjugados **NP1-DOX** e **NP2-DOX** estão resumidas na **Tabela 1**.

Exemplo 4

Estudos de estabilidade in vitro

[0090] A estabilidade dos conjugados **NP1** e **NP2** foi investigada em várias soluções biologicamente relevantes. As soluções de **NP1** e **NP2** foram provocadas com 0,9% de NaCl, 0,5% de cisteína, 0,2 M de histidina, 0,5% de albumina sérica

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 112/147

humana (HSA, de "human serum albumin") e 0,5% de albumina sérica bovina (BSA, de "bovine serum albumin"). A estabilidade dos nanoconjugados em diferentes pontos no tempo foi analisada por três técnicas: (i) monitoramento da ressonância de plásmon usando espectroscopia UV-visível, (ii) alterações no diâmetro hidrodinâmico, e (iii) medições de carga eletroforética (potencial zeta). A alteração no comprimento de onda da ressonância de plásmon de superfície, na largura de banda de plásmon e na medição do diâmetro hidrodinâmico está diretamente relacionada ao entendimento do comportamento de agregação das nanopartículas. A medição de potencial zeta é uma indicação de forças repulsivas que estão presentes em solução aquosa e pode ser usada para prever a estabilidade in vitro/in vivo a longo prazo de dispersões nanoparticuladas. Os estudos de estabilidade foram realizados para nanoconjugados preparados com razões estequiométricas entre Au:BBN de 1:2 e 1:4. O uso da razão 1:4 entre Au:BBN mostrou agregação ao longo do período de tempo de 24 horas, enquanto que ambos os conjugados **NP1** e **NP2** [razão 1:2 (Au:BBN)] estavam estáveis nessas soluções biologicamente relevantes. Os picos de absorção UV-visível permanecem inalterados, as alterações no diâmetro hidrodinâmico e no potencial zeta são mínimas, confirmando a integridade estrutural e a robustez do conjugado (**Figura 12**). Entretanto, na presença de cisteína, observou-se que tanto **NP1** quanto **NP2** mostraram um aumento no tamanho hidrodinâmico ao longo de um período de tempo (24 h) devido às interações entre ouro e tiol e o aumento não foi significativo. Os dados de estabilidade *in vitro* indicam que **NP1** e **NP2** têm uma estabilidade cinética ideal para uso em revelações de direcionamento do receptor subsequentes *in vivo*.

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 113/147

Exemplo 5

Estudos de afinidade de ligação ao receptor in vitro de NP2

[0091] As células do tumor de próstata humana PC-3 expressam um grande número de receptores de GRP sobre a superfície das células. A afinidade de ligação de **NP2** foi avaliada através da realização de um ensaio de inibição competitiva e a determinação dos valores de IC_{50}. Foram usadas nanopartículas preparadas com três razões estequiométricas diferentes entre Au:BBN (1:0,5, 1:2, 1:4). Uma comparação de valores de IC_{50} para diferentes razões estequiométricas entre Au:BBN (1:0,5, 1:2, 1:4) foi plotada (**Figura 13**). Os valores de IC_{50} de diferentes razões do conjugado **NP2** são relatados em microgramas, uma vez que os pesos moleculares dos nanoconjugados não podem ser determinados com precisão. É evidente a partir dos dados que os valores de IC_{50} ou a afinidade de ligação celular dos conjugados dependem do grau de revestimento de peptídeo de TA-BBN sobre a superfície das AuNPs. Por exemplo, o conjugado **NP2** com razão Au:BBN = 1:4, que tem um número maior de moléculas de peptídeos TA-BBN sobre a superfície das AuNPs, exibiu um valor de IC_{50} mais baixo (ou uma afinidade de ligação celular mais alta) quando comparado a outros conjugados. Entretanto, este conjugado não é altamente estável e não foi usado para estudos celulares. O estudo de inibição competitiva confirma as propriedades de direcionamento do receptor de **NP2**.

Exemplo 6

Ensaios de citotoxicidade in vitro:

[0092] A citotoxicidade *in vitro* das AuNPs conjugadas com doxorrubicina, NP1-DOX e NP2-DOX, sobre células de câncer humanas que expressam GRP e que não expressam GRP foi examinada com controles adequados por ensaio de MTT. As células do câncer de próstata humana (PC3) têm um grande número de receptores de GRP sobre a superfície das mesmas. Especificamente, a literatura

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 114/147

mostra que 44.000 sítios receptores de bombesina estão presentes sobre a superfície das células de câncer de próstata humana. As células de câncer de mama humana (MDA-MB231) foram usadas como células de câncer que não expressam GRP. A doxorrubicina livre mostrou um IC_{50} de 9,5 µg/ml em PC3 (**Figura 14**) e > 10 ug/ml em células de câncer MDA-MB231 (**Figura 16**). Um gráfico comparativo mostrando o efeito de **NP1-DOX** e **NP2-DOX** com DOX sobre a citotoxicidade tanto das células que expressam GRP quanto das que não expressam GRP é mostrado nas **Figuras 15, 17 e 20**. **NP1-DOX** e **NP2-DOX** mostraram um IC_{50} de 6 µg/ml e 9 µg/ml, respectivamente, nas células de câncer que não expressam GRP, enquanto que nas células PC3, verificou-se que os valores de IC_{50} eram de 10δµ g/ml e 5 µg/ml, respectivamente (**Tabela 4**). Deve-se notar que os valores de IC_{50} aqui representados para **NP1-DOX** e **NP2-DOX** têm por base o peso total do nanoconjugado, e a quantidade de DOX carregada no nanoconjugado é de 0,53 µ g/mg e 0,3 µg/mg, respectivamente. Os valores de IC_{50} dos nanoconjugados em termos de doxorrubicina são mencionados na Tabela 4 e nas **Figuras 18** e **19**.

Tabela 4

	IC_{50} (µg/ml)			
	Células PC3		Células MDA-MB231	
	Conc. de nanoconjugado	Conc. de doxorrubicina	Conc. de nanoconjugado	Conc. de doxorrubicina
NP1-DOX	9,89	0,0052	6	0,00318
NP2-DOX	5	0,0015	9	0,0027
Doxorrubicina	9,5	9,5	> 10	> 10

[0093] Como pode ser visto acima, as AuNPs conjugadas com doxorrubicina exibiram uma citotoxicidade muito mais potente do que a doxorrubicina livre. Por

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 115/147

exemplo, a citotoxicidade da NP2-DOX aumentou 3.000 vezes e 6.000 vezes em comparação com a doxorrubicina livre em células de câncer sem expressão de GRP e com expressão de GRP, respectivamente.

Exemplo 7

Síntese de AuNP-DTDTPA

[0094] As AuNPs funcionalizadas com ácido dietilenotriamina pentacético ditiolado (DTDTPA) foram preparadas por meio de um protocolo modificado por *Brust et. al.*, J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1995**, 1.655-1.656. Resumidamente, 200 mg (0,507 mmol) de $HAuCl_4.3H_2O$ foram dissolvidos em 120 ml de metanol em um frasco de fundo redondo de 500 ml. Em um frasco separado, 482 mg (0,943 mmol) de DTDTPA foram dissolvidos em 40 ml de MeOH e 2 ml de ácido acético glacial. Esta solução foi adicionada com agitação contínua a uma solução aquosa de sal de ouro para produzir uma solução laranja. A essa mistura, 190 mg (5 mmol) de $NABH_4$ dissolvidos em 14 ml de água desionizada foram adicionados sob agitação vigorosa em temperatura ambiente. Imediatamente após a adição de $NABH_4$, a solução se tornou marrom escura, seguida da aparência de floculato preto. A mistura resultante foi deixada em agitação durante 1 hora à temperatura ambiente e, então, 5 ml de 1 M de HCl aquoso foram adicionados. Essa solução preta de nanopartículas de ouro foi, então, submetida a centrifugação a 7.000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi removido e as partículas foram lavadas duas vezes com 0,01 M de HCl, mantendo os parâmetros de centrifugação iguais àqueles acima. As partículas foram adicionalmente lavadas cuidadosa e sucessivamente com água desionizada seguida de éter dietílico. O pó preto resultante de AuNP-DTDTPA foi seco a vácuo e armazenado a - 20 C. Conforme necessário, as partículas foram prontamente dispersas em 0,01 M de NaOH e ficaram estáveis durante mais de um mês.

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 116/147

Exemplo 8

Síntese do peptídeo BBN-Ácido tioico

[0095] A síntese de BBN foi realizada com o uso de síntese de peptídeo de fase sólida empregando a metodologia de química Fmoc, e os peptídeos finais foram purificados por HPLC. Uma resina de 4-hidroximetilfenoxiacetil-4′-metilbenzi-hidrilamina foi usada como o suporte sólido para a síntese. Os aminoácidos protegidos por Fmoc foram ativados com o uso de um equivalente de 0,45 M de soluções de HBTU/HOBt e dois equivalentes de N,N-di-isopropiletilamina. Os aminoácidos foram desprotegidos de Fmoc com o uso de piperidina e acoplados com o uso de NMM.HBTU. Após o acoplamento de todos os aminoácidos na sequência adequada, o ácido tioico (ácido lipoico) foi acoplado com o uso de DIC.HOBt. A clivagem do peptídeo a partir da resina foi realizada com o uso de TFA. Esta etapa de clivagem também removeu grupos protetores de cadeia lateral de aminoácidos. O peptídeo foi purificado em uma coluna de HPLC/C18 de fase reversa com o uso de um gradiente AB de 0% de B, em que A é 0,1% de TFA em água e B é 0,1% de TFA em acetonitrila. Após a purificação, a massa de peptídeo foi medida por cromatografia líquida-espectrometria de massa ou dessorção/ionização a laser assistida por matriz, e a pureza foi medida com o uso de cromatografia de fase reversa HPLC.

Exemplo 9

Síntese de nanoconjugados de ouro específicos para receptor de bombesina estabilizados com DTDTPA (BBN-AuNP-DTDTPA)

[0096] A bombesina terminada com ácido tioico foi reagida com nanopartículas de ouro com razões estequiométricas entre Au:BBN de 1:0,25, 1:0,5, 1:1, 1:2 e 1:4. Tipicamente, em um frasco de vidro de 20 ml, foi preparada uma solução de AuNP-DTDTPA ([Au] = 2,28 µmol) com o uso de uma mistura aquosa/metanólica (1:9) de 0,01 M de NaOH. As quantidades de 0,64 mg (0,57 µmol), 1,28 mg (1,14 µmol),

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 117/147

2,56 mg (2,27 µmol), 5,12 mg (4,54 µmol) e 10,24 mg (9,08 µmol) de bombesina terminada com ácido tioico (TA-BBN) foram dissolvidas em 4 ml de MeOH e, então, adicionadas à solução de nanopartículas. A mistura de reação foi agitada durante 2 horas à temperatura ambiente e a formação de um precipitado marrom escuro foi observada. A mistura foi centrifugada (9.300 g durante 10 minutos a 20°C) e o sobrenadante foi removido. As AuNPs precipitadas foram lavadas duas vezes com MeOH e três vezes com água. O BBN-AuNP-DTDTPA foi seco em baixa pressão e armazenado a - 20°C.

Exemplo 10

Síntese de AuNP-DTDTPA-doxorrubicina e BBN-AuNP-DTDTPA-doxorrubicina

[0097] A síntese de nanopartículas de ouro conjugadas com doxorrubicina com e sem o peptídeo bombesina foi realizada em triplicatas. As nanopartículas de ouro, na proporção de 0,5 mg, foram suspensas em 1X PBS por sonicação. Foram adicionados 2 mg de cloridrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodi-imida (EDC) e 2 mg de sulfo-NHS (N-hidroxissulfossuccinimida) em 0,1 M de tampão de ácido 2-(morfolino)etano sulfônico (MES) (pH 4,6) a 100 µl desta solução. O pH da mistura de reação foi mantido de 5,3 a 5,4 com o uso do tampão de MES. A reação foi agitada durante 3 horas a 37°C a 700 rpm. Após 3 horas, a mistura de reação foi centrifugada em 20.000 g durante 20 minutos a 25°C. Uma quantidade de 0,7 mg de doxorrubicina clínica foi usada para conjugação com nanopartículas. Foram adicionadas nanopartículas com grupos carboxila ativados à solução de doxorrubicina, e a mistura de reação foi submetida a vórtice. O acoplamento foi realizado de um dia para o outro a 25°C a 750 rpm. A mistura de reação foi centrifugada em 20.000 g durante 20 minutos a 25°C, e os péletes foram subsequentemente lavados duas vezes com 1X PBS e ressuspensos em solução 1X PBS. Tanto os péletes quanto os sobrenadantes foram usados para estudar a eficiência da conjugação por meio de análise por espectroscopia de fluorescência.

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 118/147

[0098] Todas as patentes, revelações de patentes e outras referências citadas estão aqui incorporadas a título de referência em sua totalidade. Entretanto, se um termo na presente revelação contradisser ou entrar em conflito com um termo na referência incorporada, o termo da presente revelação tem precedência sobre o termo conflitante da referência incorporada.

[0099] Embora modalidades específicas tenham sido descritas, alternativas, modificações, variações, melhorias e equivalentes substanciais que são ou podem ser atualmente imprevistos podem surgir para os requerentes ou outros versados na técnica. Consequentemente, as reivindicações em anexo, conforme depositadas e uma vez que podem ser emendadas, se destinam a abranger todas essas alternativas, modificações, variações, melhorias e equivalentes substanciais.

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 119/147

REIVINDICAÇÕES

1. Nanoconjugado, caracterizado pelo fato de que compreende: uma nanopartícula de ouro (AuNP), ácido dietilenotriamina pentacético ditiolado (DTDTPA), um peptídeo terminado com ácido tioico e doxorrubicina,

sendo que o DTDTPA está diretamente ligado à superfície da nanopartícula de ouro por meio de ao menos uma ligação Au-S,

o peptídeo terminado com ácido tioico está diretamente ligado à superfície da nanopartícula de ouro por meio de ao menos uma ligação Au-S, e

a doxorrubicina está ligada ao DTDTPA.

2. Nanoconjugado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o peptídeo terminado com ácido tioico é bombesina terminada com ácido tioico.

3. Nanoconjugado, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a bombesina terminada com ácido tioico tem uma sequência: ácido lipoico-Gln-Trp-Ala-Val-Gli-His-Leu-Met-NH_2.

4. Nanoconjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a doxorrubicina está ligada ao DTDTPA por meio de uma ligação amida.

5. Nanoconjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que é preparado por um processo que compreende a conjugação da nanopartícula de AuNP-DTDTPA com o peptídeo terminado com ácido tioico, sendo que o ouro na nanopartícula de ouro e o peptídeo terminado com ácido tioico estão presentes na reação de conjugação em uma razão estequiométrica de cerca de 1:0,5 a cerca de 1:4.

6. Nanoconjugado, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o ouro na nanopartícula de ouro e o peptídeo terminado com

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 120/147

ácido tioico estão presentes na reação de conjugação em uma razão estequiométrica de cerca de 1:2.

7. Nanoconjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o peptídeo terminado com ácido tioico compreende cerca de 1% a cerca de 40%, em peso, do nanoconjugado.

8. Nanoconjugado, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o peptídeo terminado com ácido tioico compreende cerca de 20% a cerca de 30%, em peso, do nanoconjugado.

9. Nanoconjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a doxorrubicina compreende cerca de 0,01% a cerca de 0,05%, em peso, do nanoconjugado.

10. Nanoconjugado, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a doxorrubicina compreende cerca de 0,03%, em peso, do nanoconjugado.

11. Nanoconjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o nanoconjugado tem um diâmetro hidrodinâmico de cerca de 110 nm a cerca de 140 nm, conforme medido por dispersão dinâmica de luz (DLS).

12. Nanoconjugado, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o nanoconjugado tem um diâmetro hidrodinâmico de cerca de 120 nm a cerca de 130 nm, conforme medido por dispersão dinâmica de luz (DLS).

13. Nanoconjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que o nanoconjugado tem um valor de potencial zeta de cerca de -15 mV a cerca de -30 mV.

14. Nanoconjugado, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o nanoconjugado tem um valor de potencial zeta de cerca de -20 mV a cerca de -25 mV.

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 121/147

15. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o nanoconjugado conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

16. Método para tratamento de um câncer, caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz do nanoconjugado conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14, a um indivíduo que precisa do mesmo.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado do grupo que consiste em leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloblástica aguda (LMA), sarcoma ósseo, câncer de mama, câncer de endométrio, câncer gástrico, câncer de cabeça e pescoço, linfoma de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, câncer de fígado, câncer de rim, mieloma múltiplo, neuroblastoma, câncer de ovário, câncer de pulmão, sarcoma de tecidos moles, timomas, câncer de tireoide, câncer de bexiga, sarcoma uterino, câncer de próstata, câncer de cólon, câncer de ovário, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de pâncreas, tumor de Wilms e macroglobulinemia de Waldenström.

18. Método, de acordo com a reivindicação 16 ou 17, caracterizado pelo fato de que o nanoconjugado é administrado ao indivíduo por injeção.

19. Nanoconjugado, caracterizado pelo fato de que compreende: uma nanopartícula de ouro (AuNP), ácido dietilenotriamina pentacético ditiolado (DTDTPA) e doxorrubicina, sendo que o DTDTPA está diretamente ligado à superfície da nanopartícula de ouro por meio de ao menos uma ligação Au-S, e a doxorrubicina está ligada ao DTDTPA.

20. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o nanoconjugado conforme definido na reivindicação 19, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 122/147

21. Método para tratamento de um câncer caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz do nanoconjugado, conforme definido na reivindicação 19, a um indivíduo que precisa do mesmo.

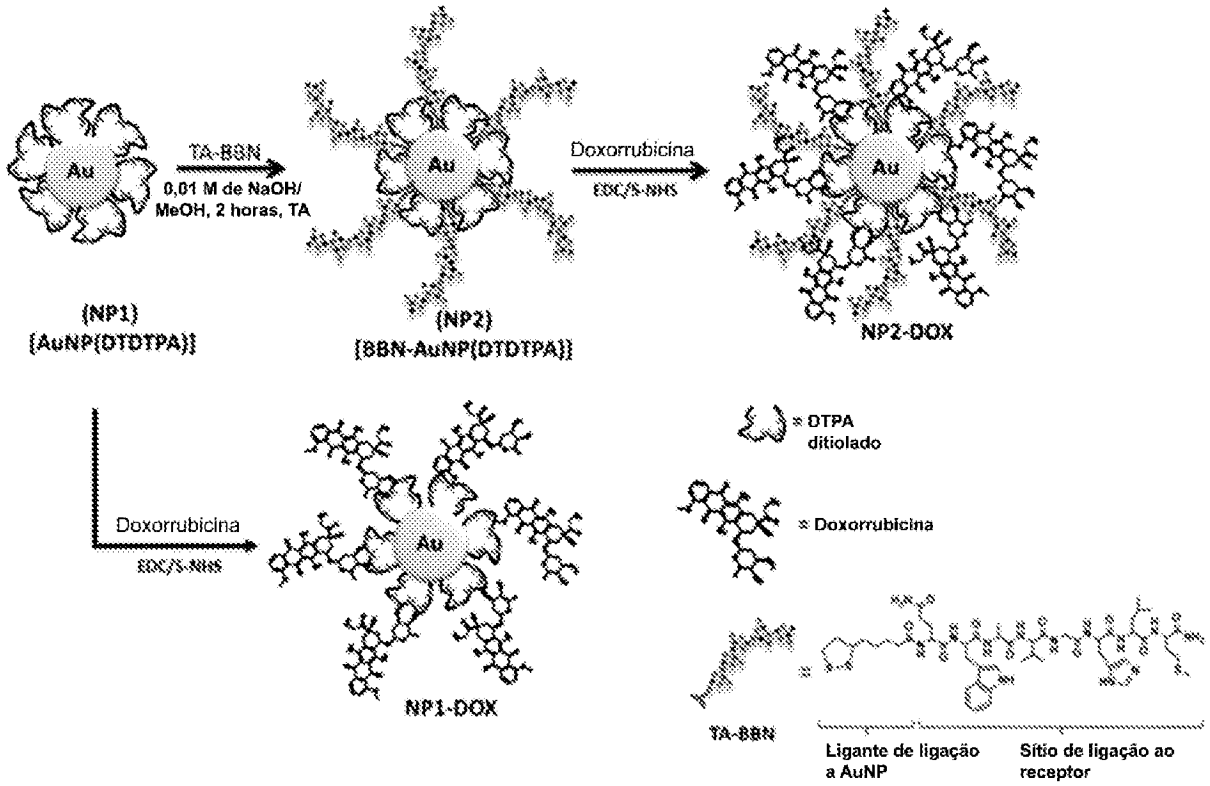


Figura 1

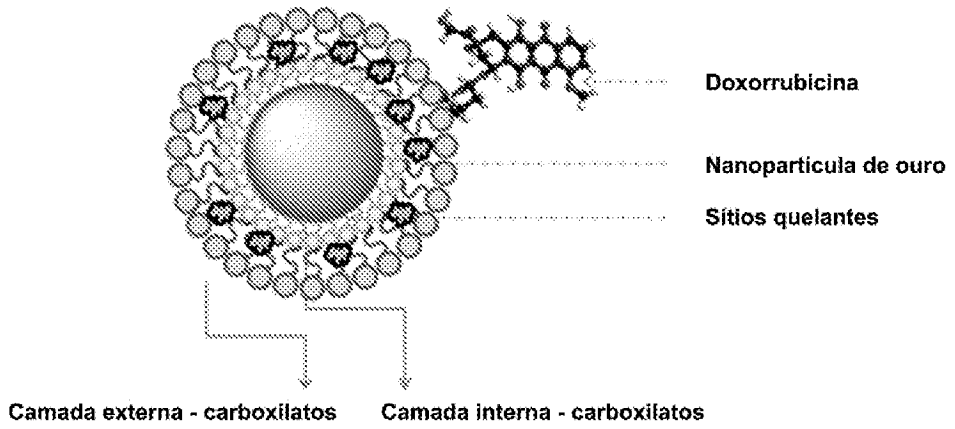


Figura 2

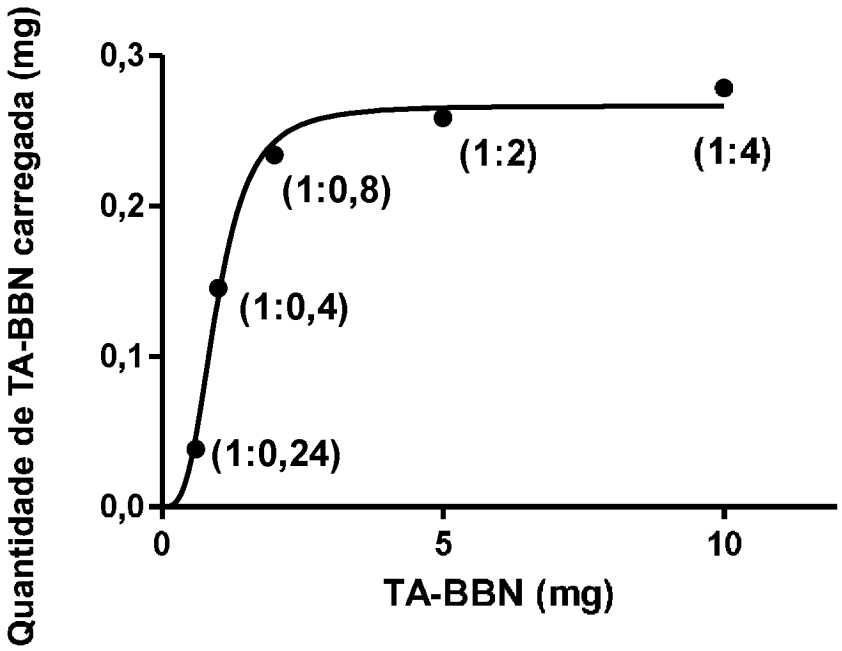


Figura 3

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 126/147

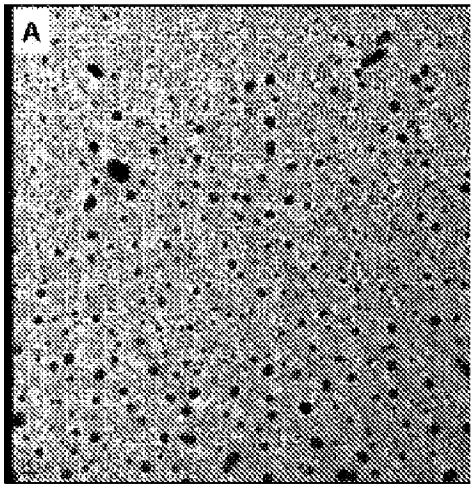


Figura 4A

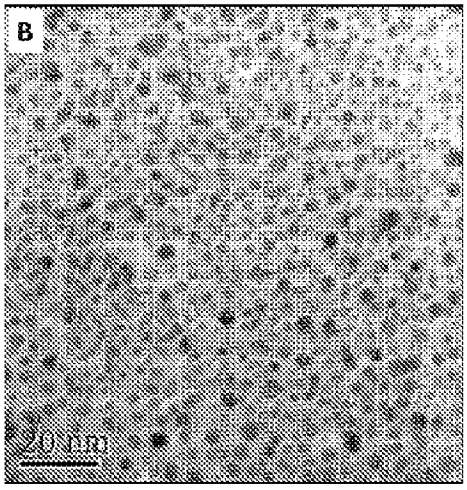


Figura 4B

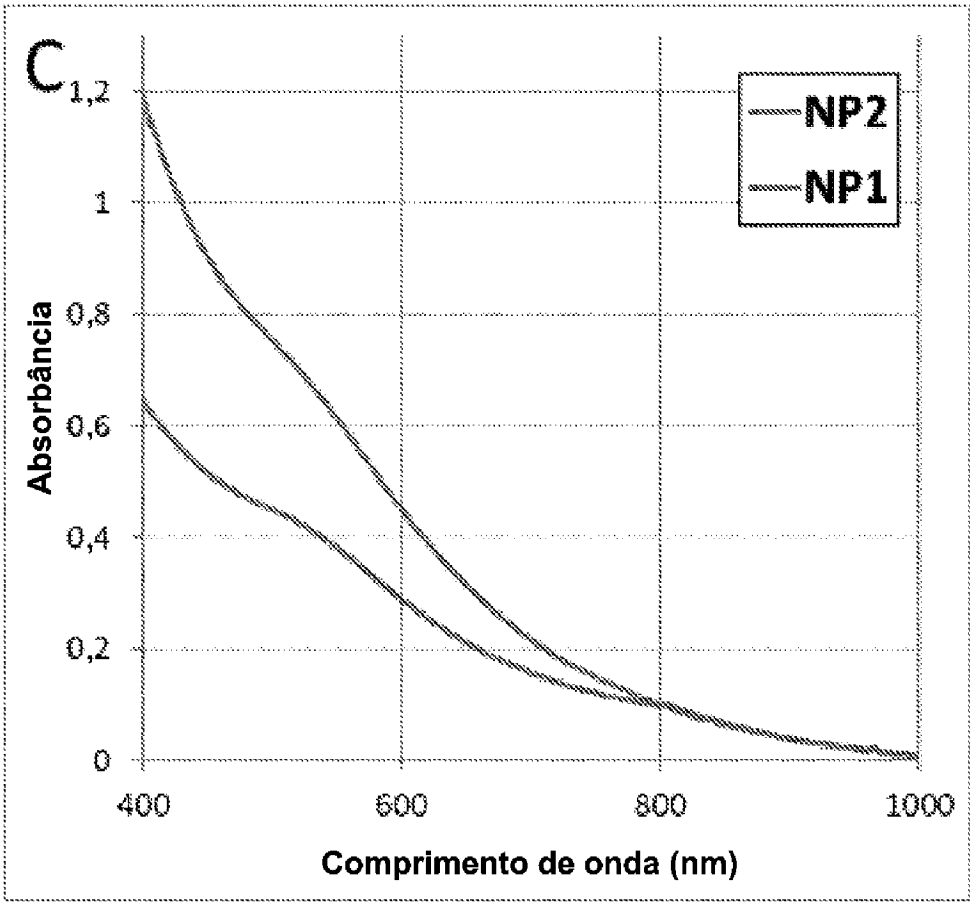


Figura 4C

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 127/147

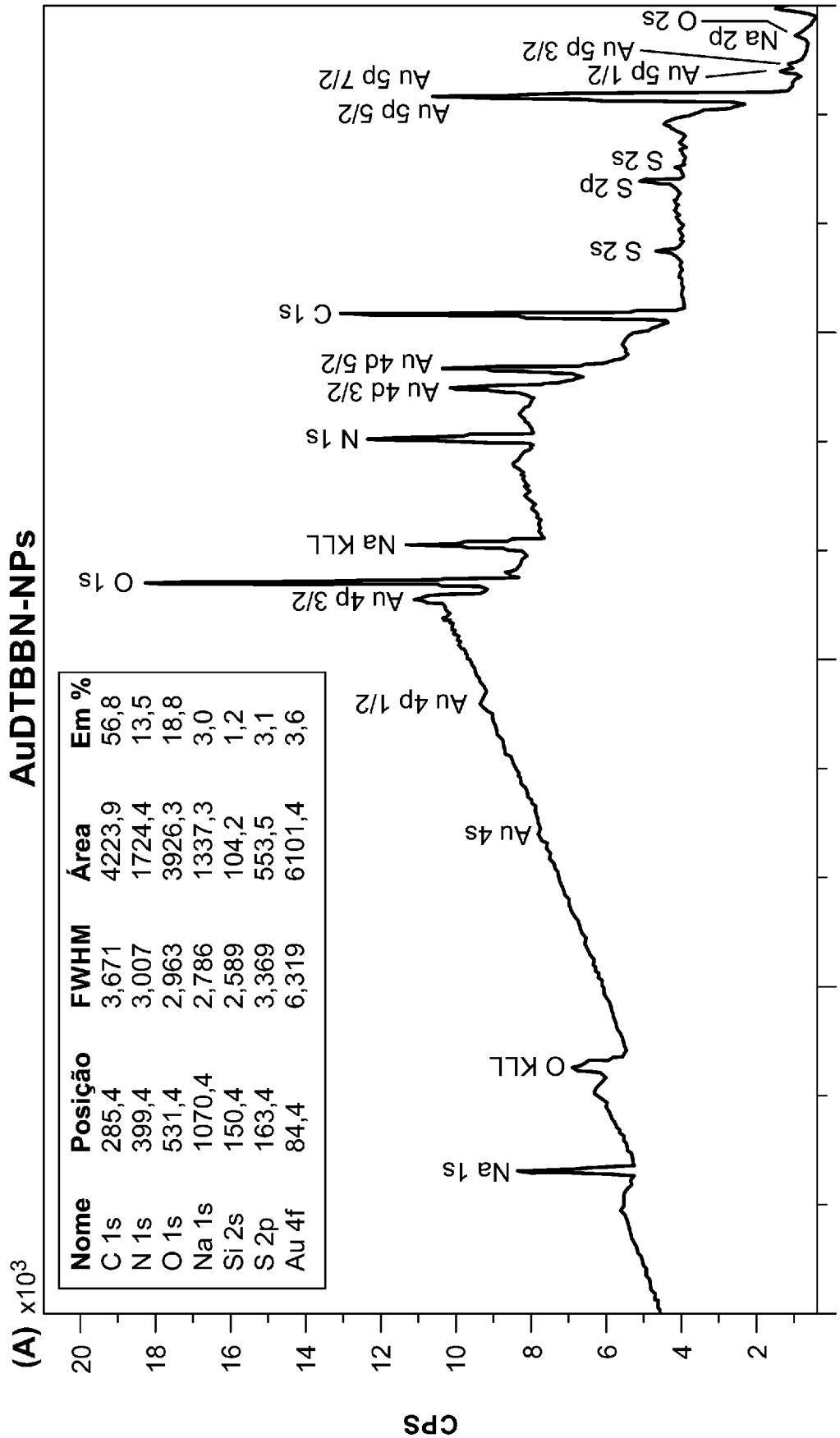

AuDTBBN-NPs
(A) x10^3
CPS
Energia de ligação (eV)
Nome Posição FWHM Área Em %
C 1s 285,4 3,671 4223,9 56,8
N 1s 399,4 3,007 1724,4 13,5
O 1s 531,4 2,963 3926,3 18,8
Na 1s 1070,4 2,786 1337,3 3,0
Si 2s 150,4 2,589 104,2 1,2
S 2p 163,4 3,369 553,5 3,1
Au 4f 84,4 6,319 6101,4 3,6
Na 1s
O KLL
Au 4s
Au 4p 1/2
Au 4p 3/2
O 1s
Na KLL
N 1s
Au 4d 3/2
Au 4d 5/2
C 1s
S 2s
S 2p
S 2s
Au 5p 5/2
Au 5p 7/2
Au 5p 1/2
Au 5p 3/2
Na 2p
O 2s

Figura 5A

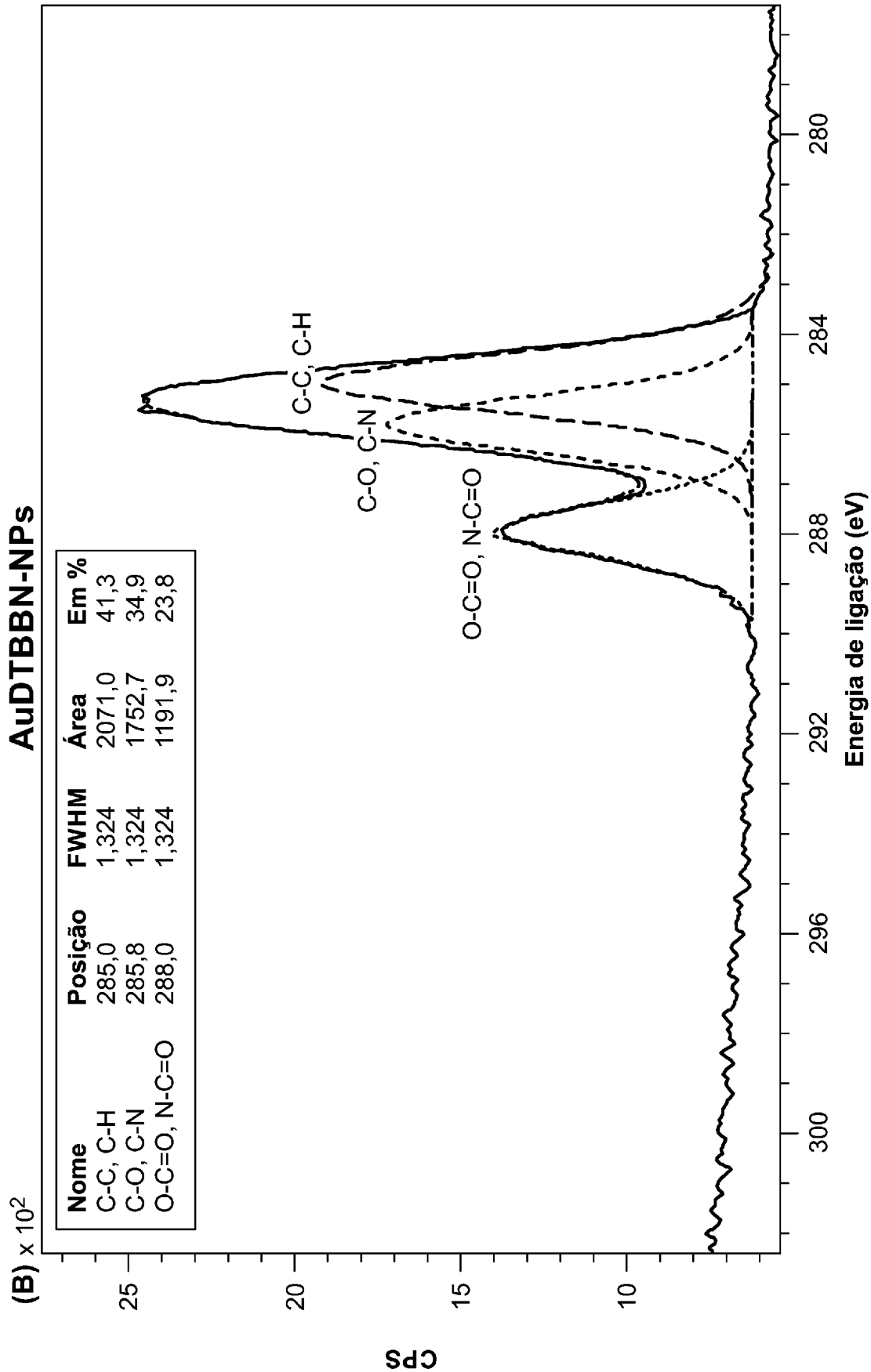

AuDTBBN-NPs
(B) x 10²
CPS
25
20
15
10
300
296
292
288
284
280
Energia de ligação (eV)
C-C, C-H
C-O, C-N
O-C=O, N-C=O
Nome Posição FWHM Área Em %
C-C, C-H 285,0 1,324 2071,0 41,3
C-O, C-N 285,8 1,324 1752,7 34,9
O-C=O, N-C=O 288,0 1,324 1191,9 23,8

Figura 5B

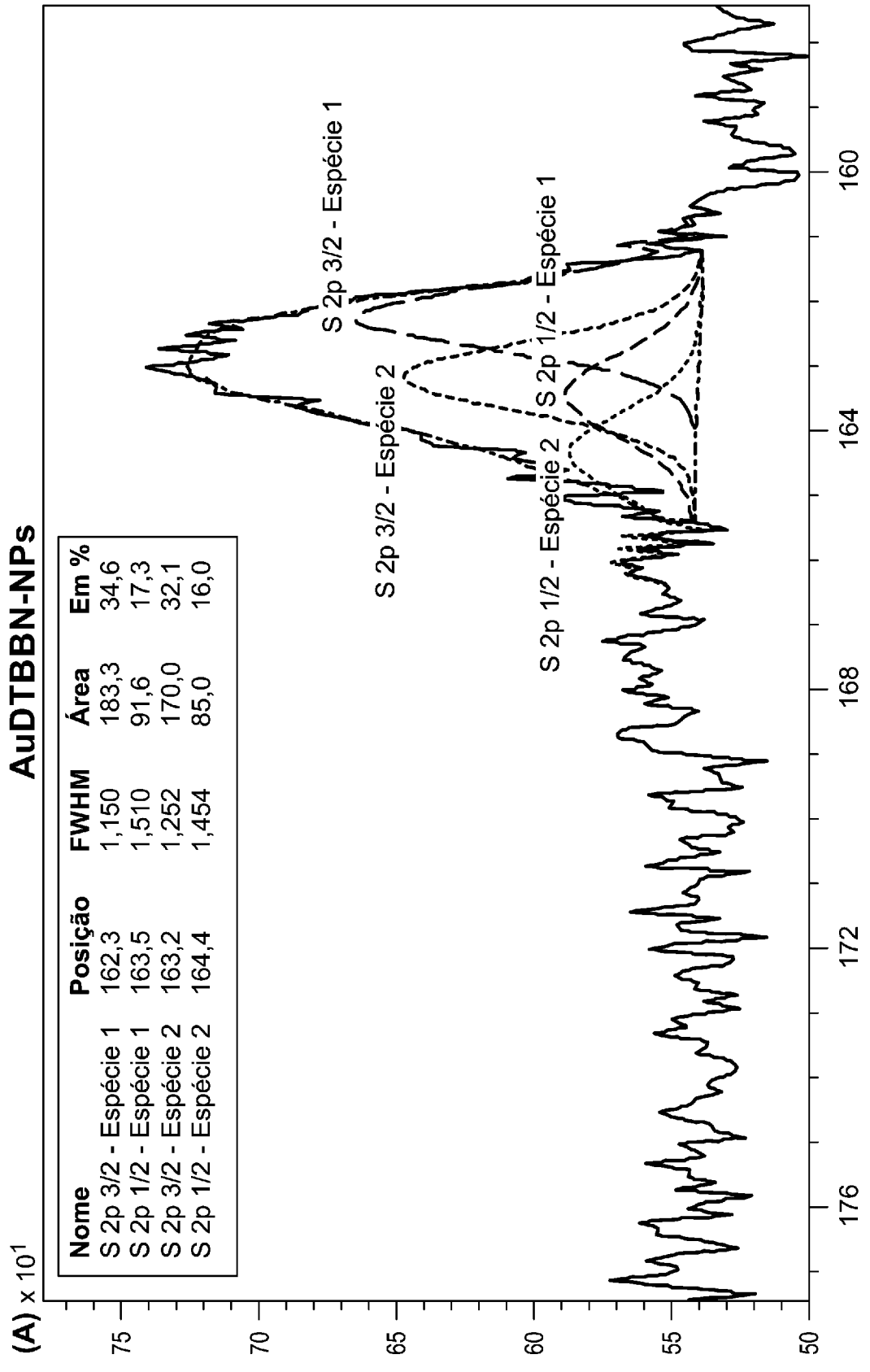

AuDTBBN-NPs
(A) x 10¹
CPS
Energia de ligação (eV)
S 2p 3/2 - Espécie 1
S 2p 3/2 - Espécie 2
S 2p 1/2 - Espécie 1
S 2p 1/2 - Espécie 2
Nome Posição FWHM Área Em %
S 2p 3/2 - Espécie 1 162,3 1,150 183,3 34,6
S 2p 1/2 - Espécie 1 163,5 1,510 91,6 17,3
S 2p 3/2 - Espécie 2 163,2 1,252 170,0 32,1
S 2p 1/2 - Espécie 2 164,4 1,454 85,0 16,0

Figura 6A

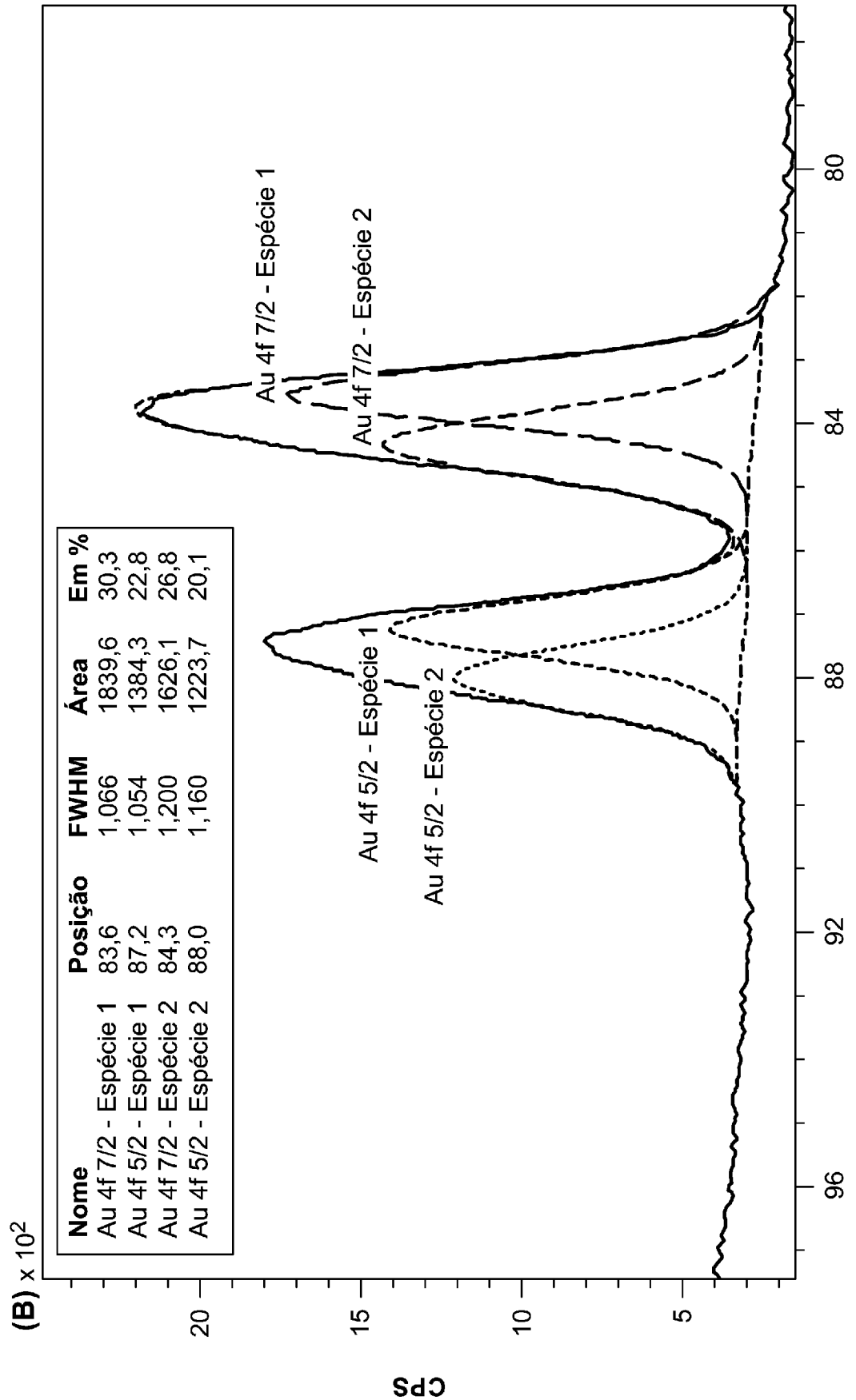


Figura 6B

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 131/147

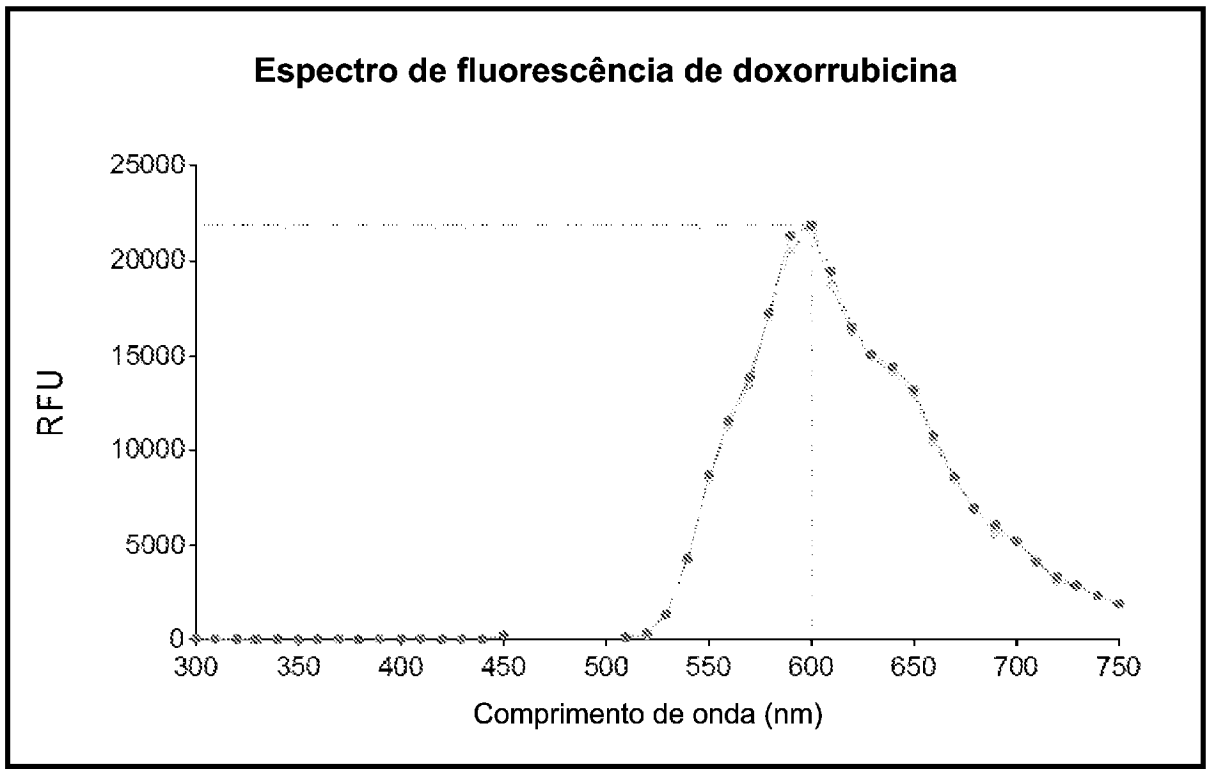


Figura 7

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 132/147

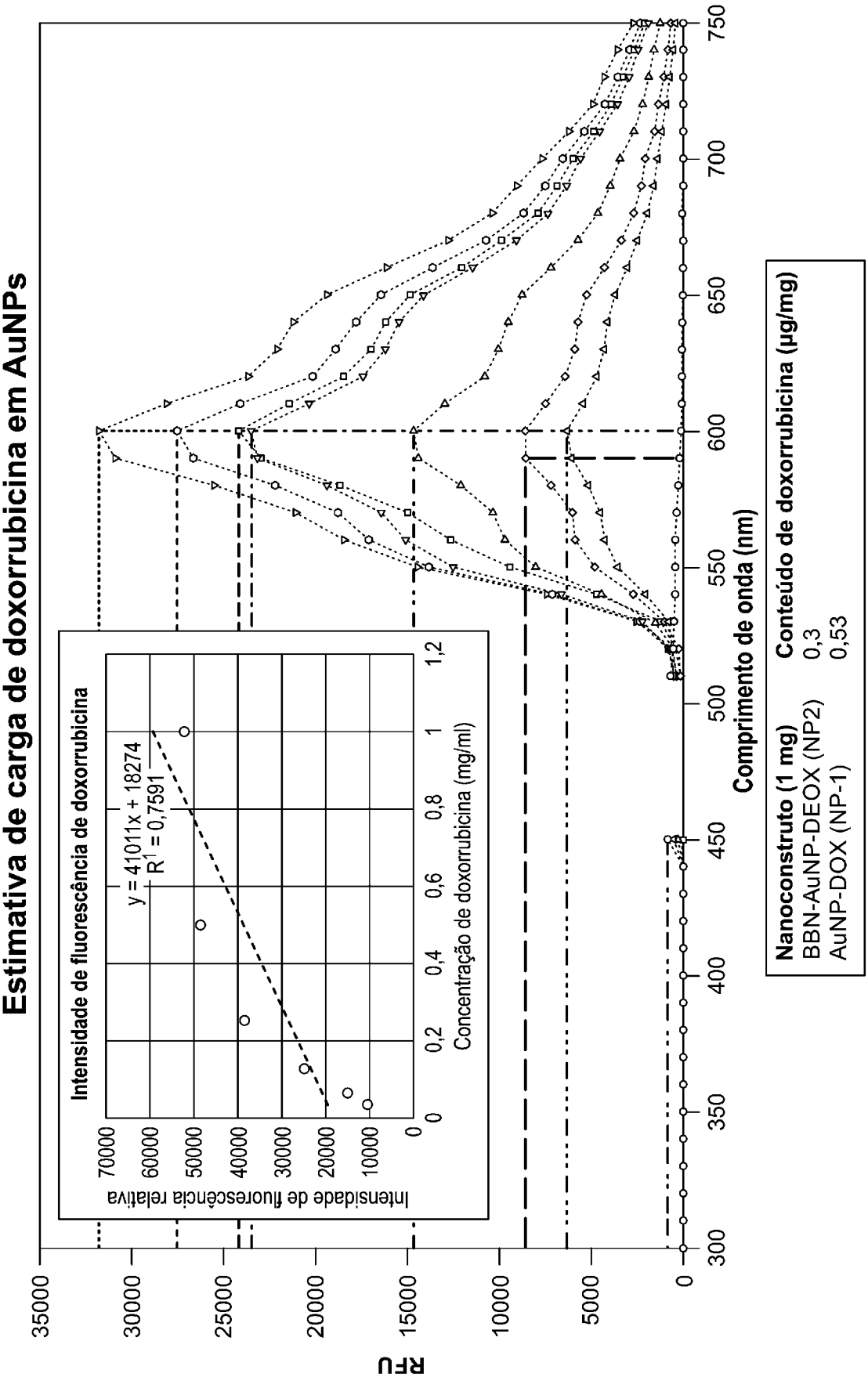


Figura 8

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 133/147

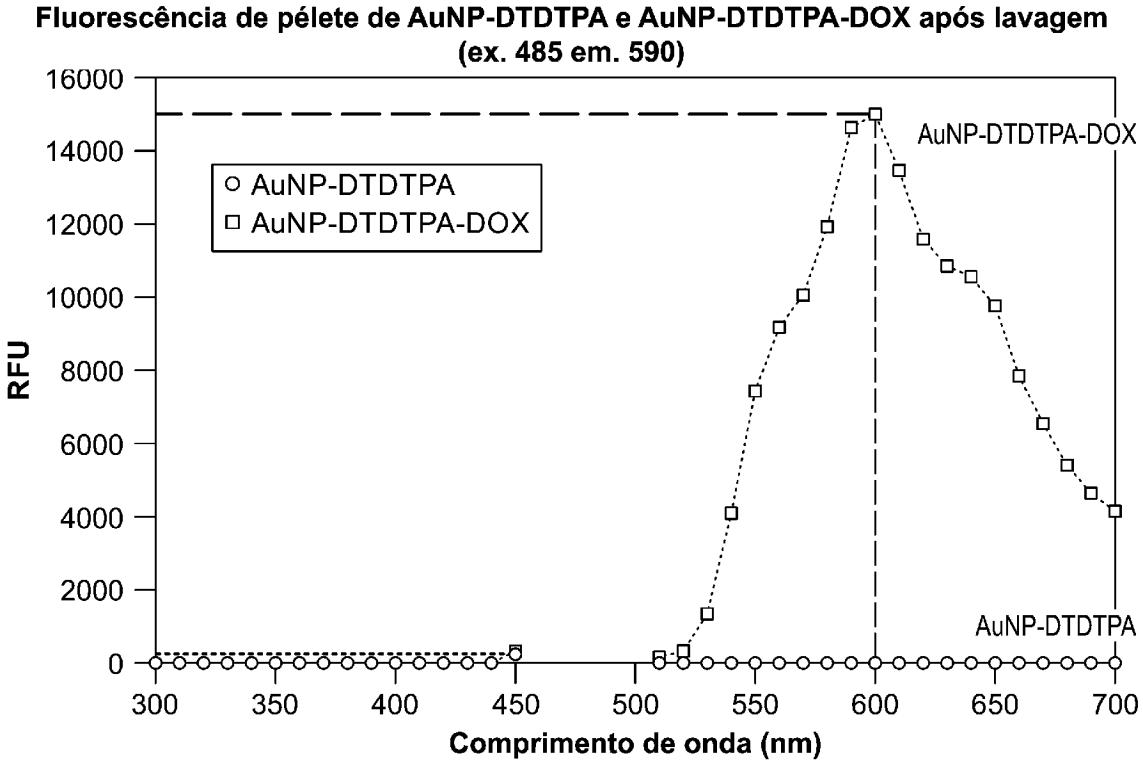


Figura 9

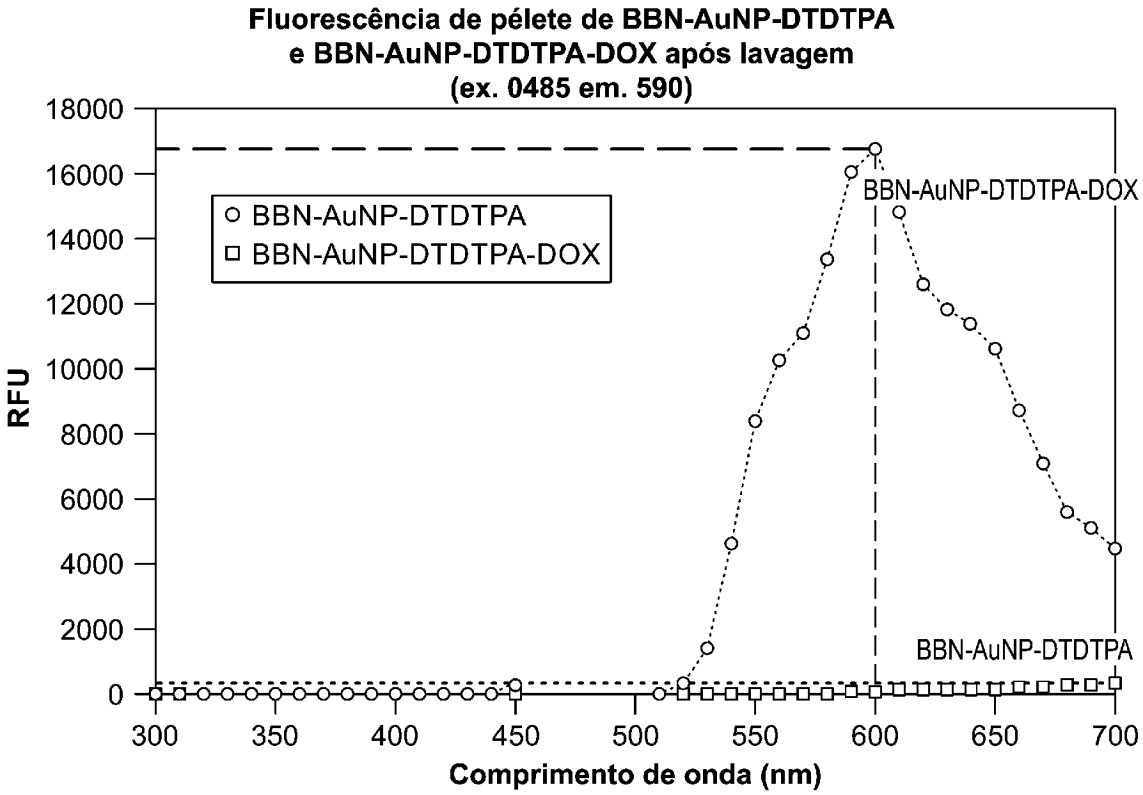


Figura 10

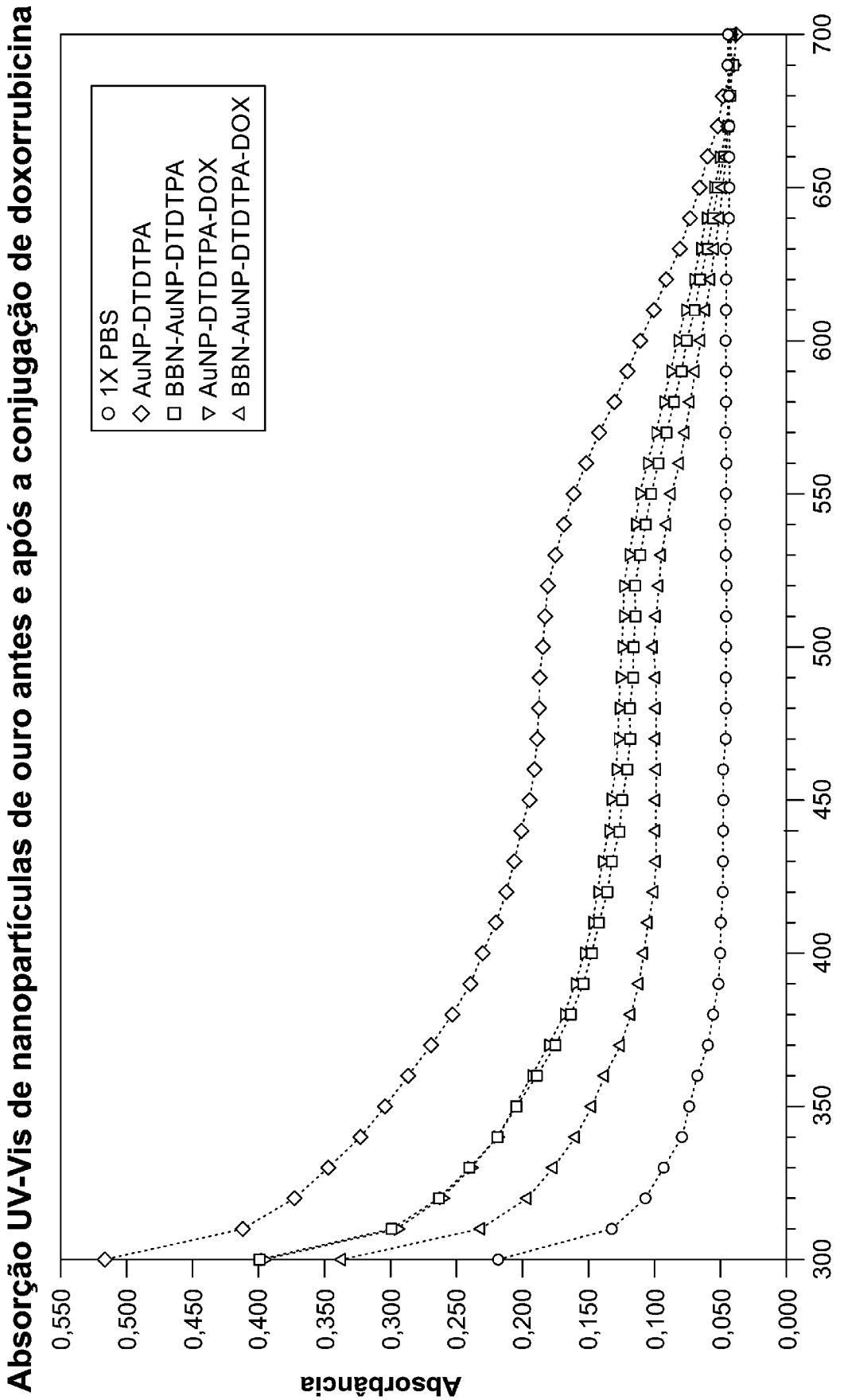


Figura 11

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 135/147

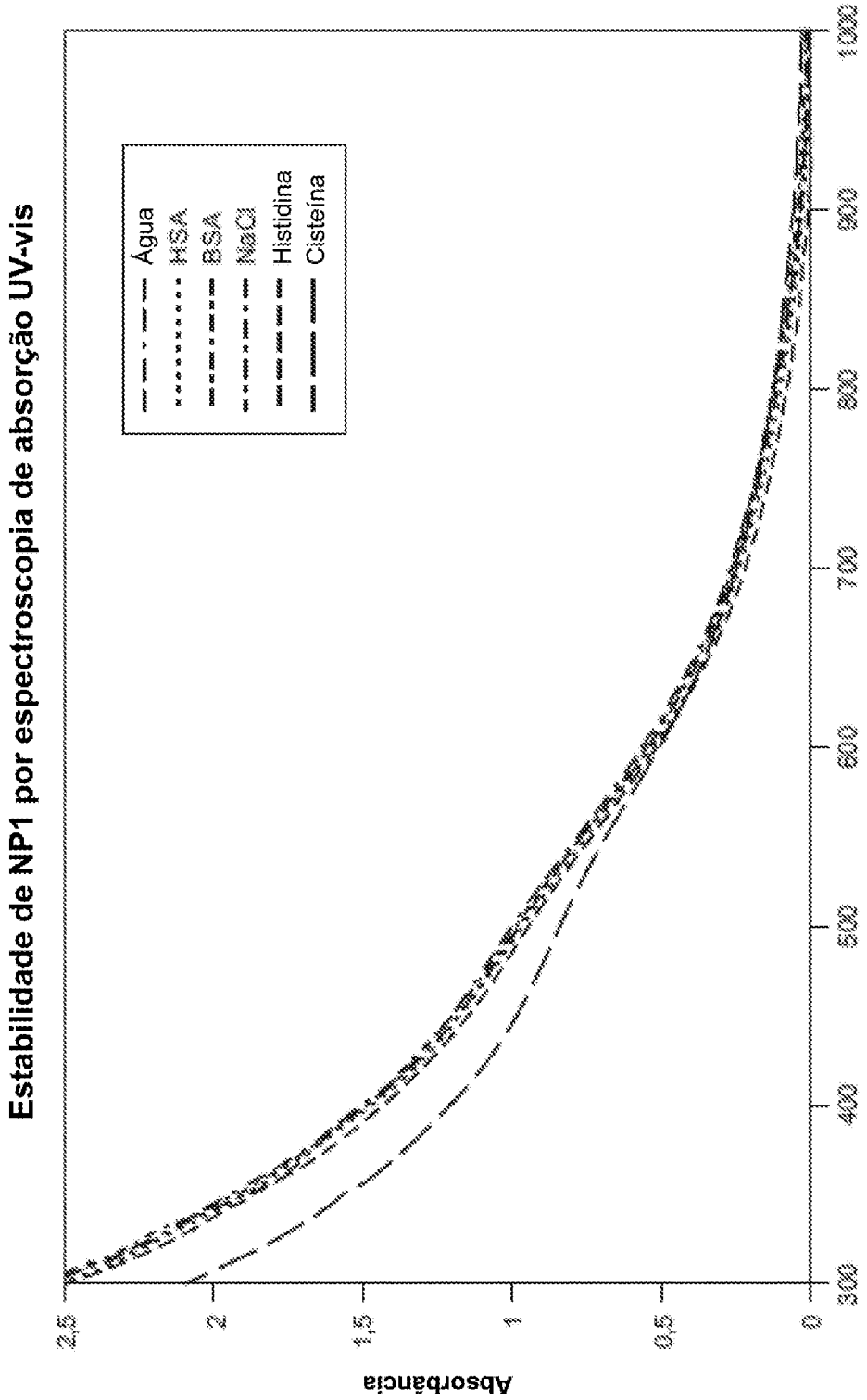


Figura 12A

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 136/147

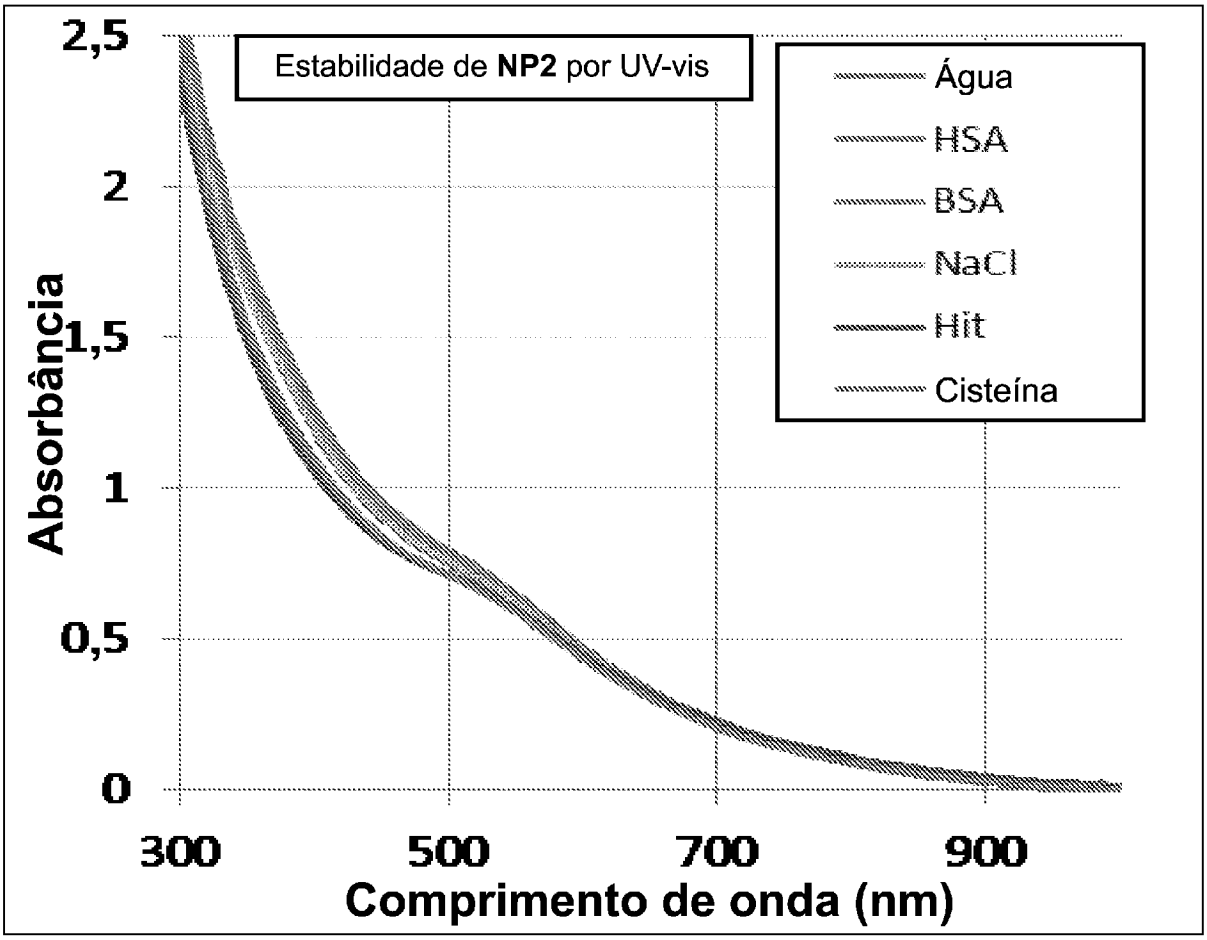


Figura 12B

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 137/147

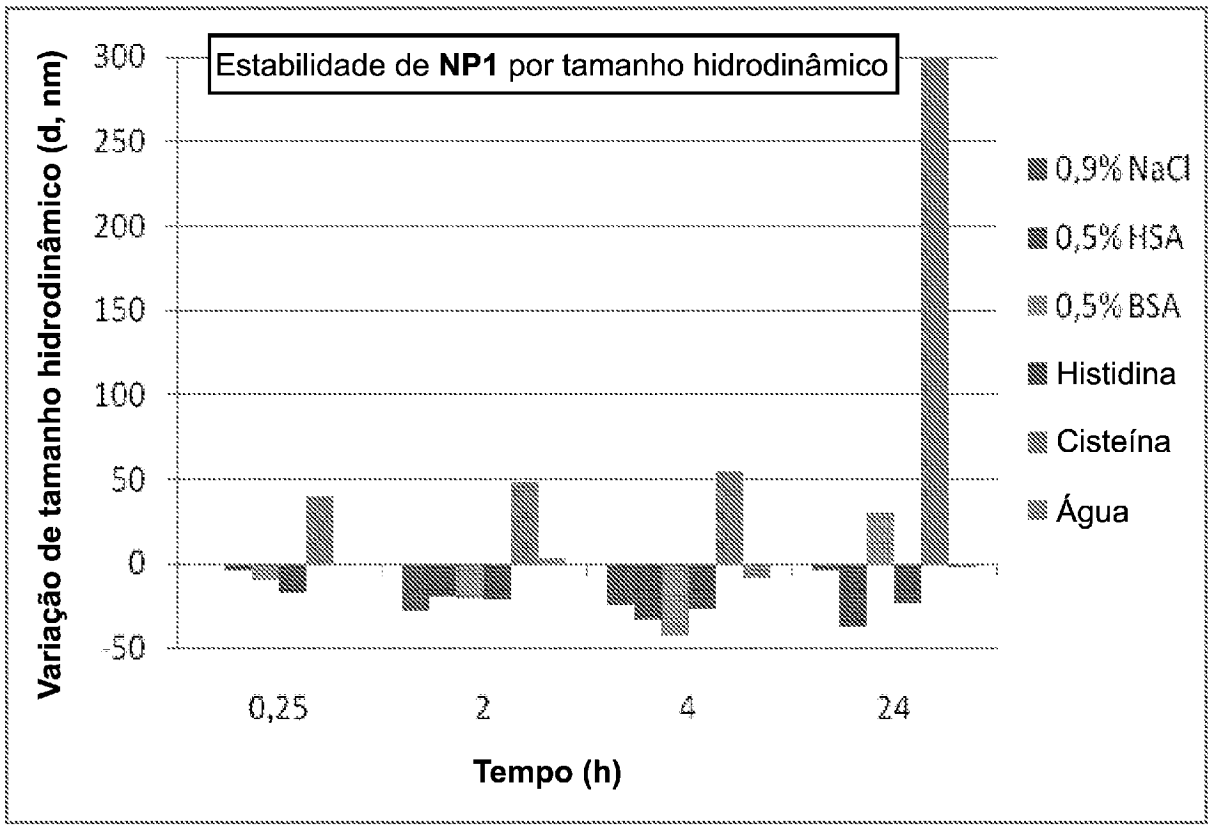


Figura 12C

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 138/147

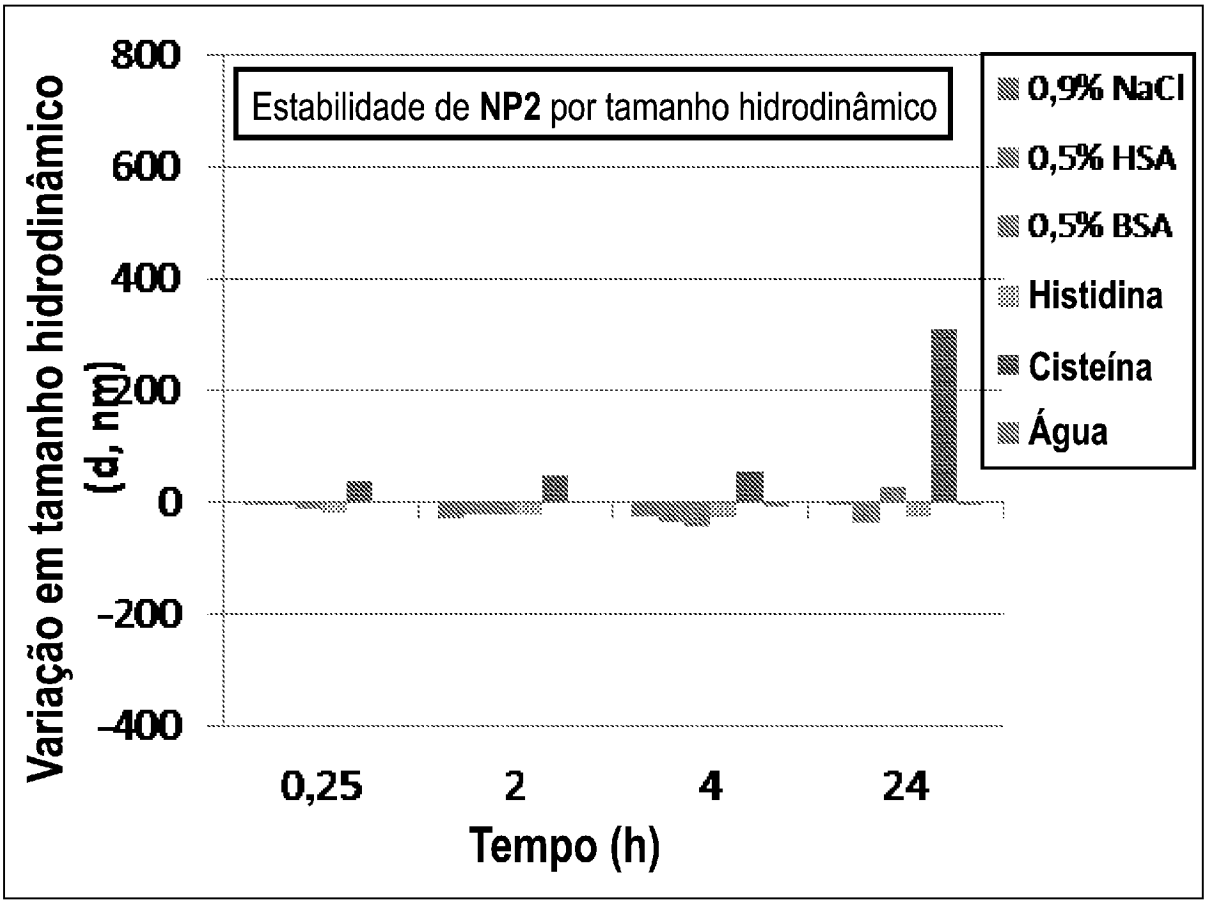


Figura 12D

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 139/147

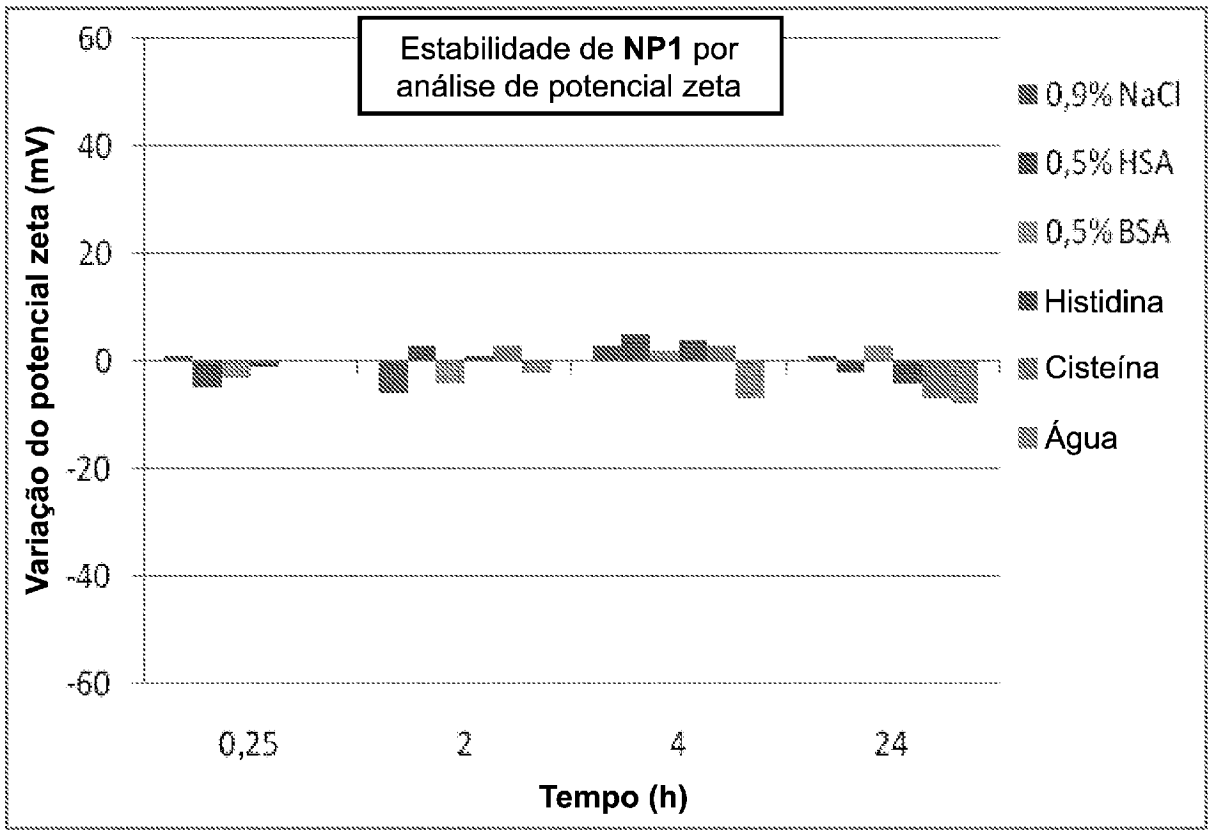

Estabilidade de **NP1** por análise de potencial zeta
Variação do potencial zeta (mV)
60
40
20
0
-20
-40
-60
0,25
2
4
24
Tempo (h)
0,9% NaCl
0,5% HSA
0,5% BSA
Histidina
Cisteína
Água

Figura 12E

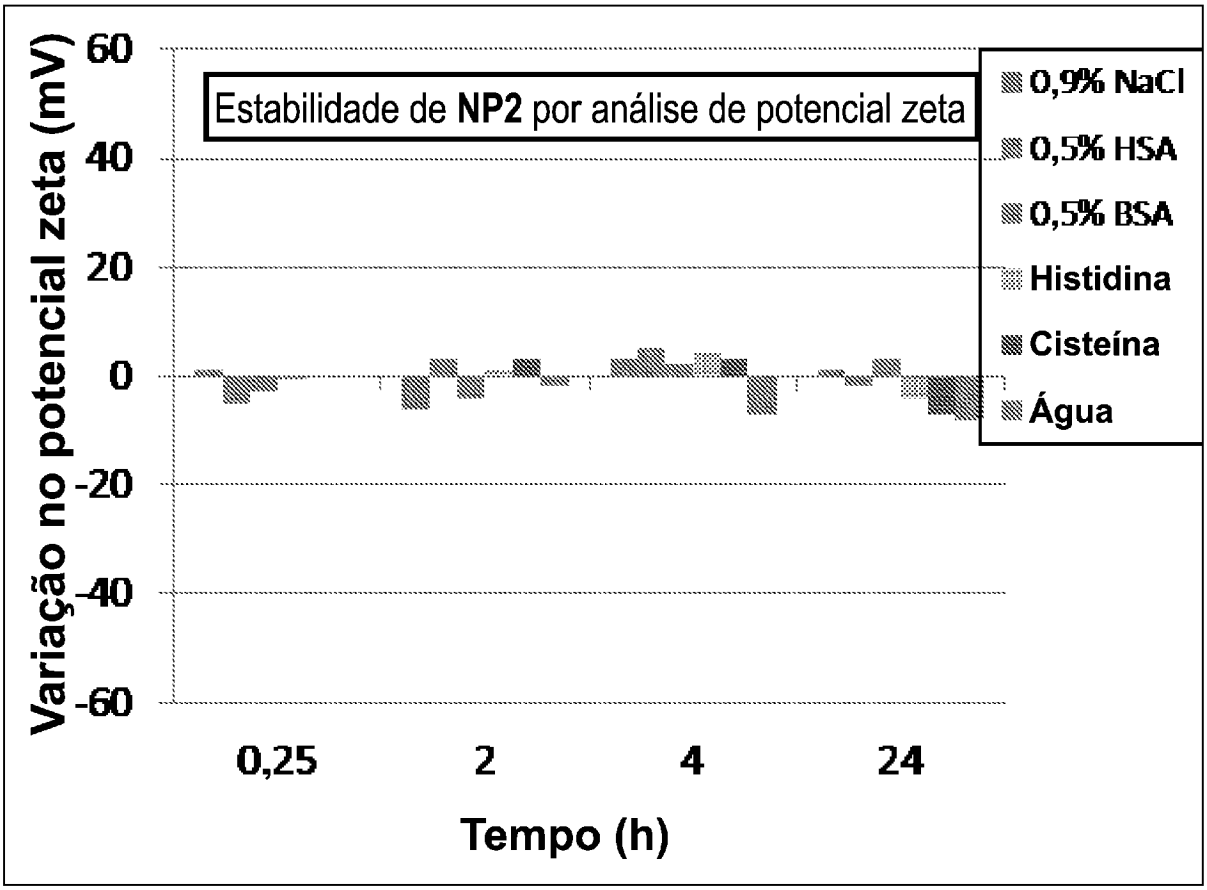


Figura 12F

Petição 870190060314, de 27/06/2019, pág. 141/147

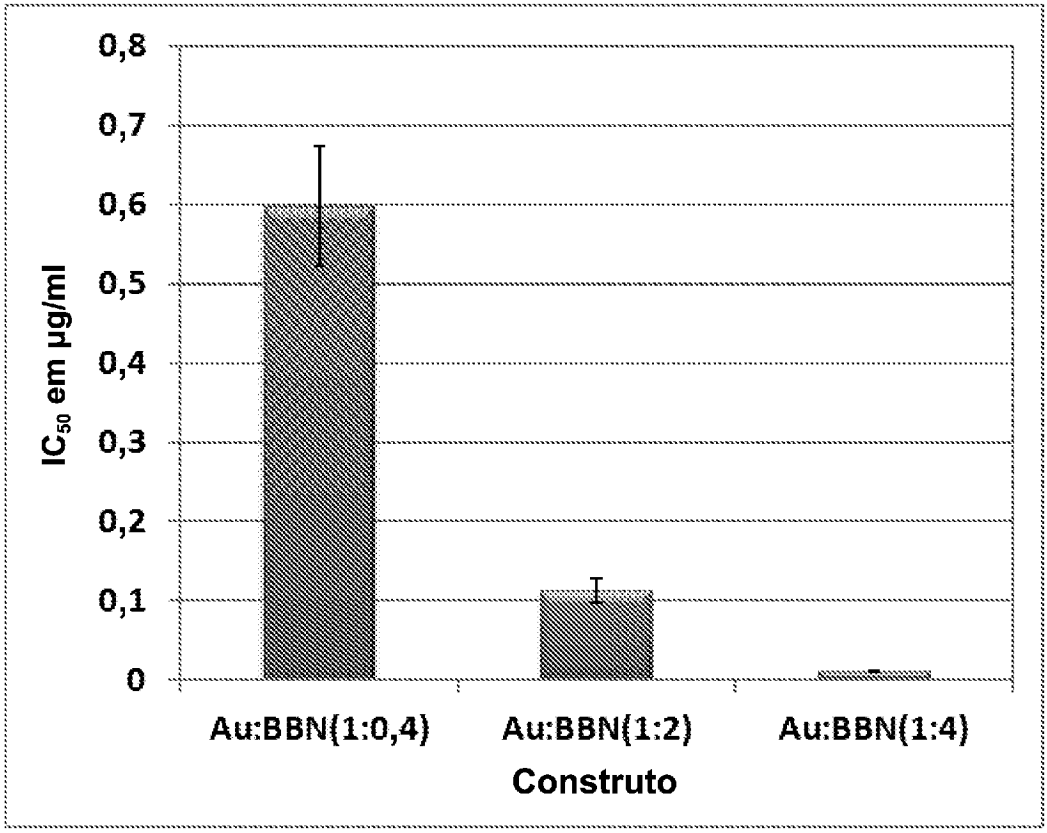

0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
IC50 em µg/ml
Au:BBN(1:0,4)
Au:BBN(1:2)
Au:BBN(1:4)
Construto

Figura 13

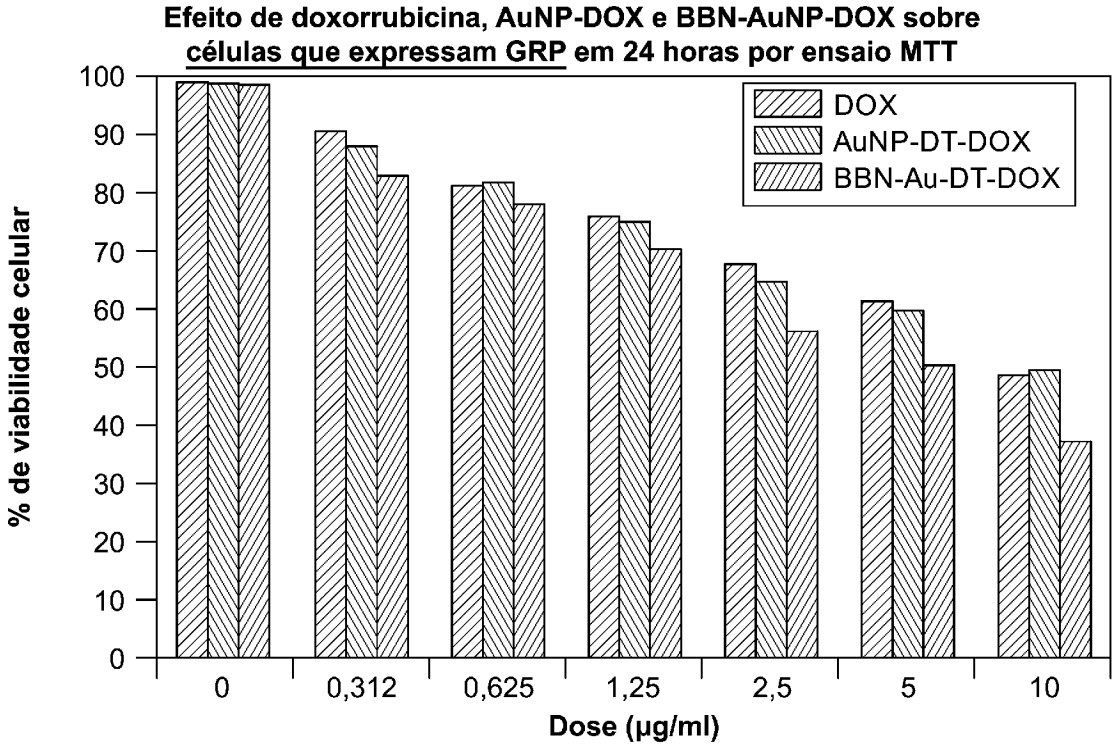


Figura 14

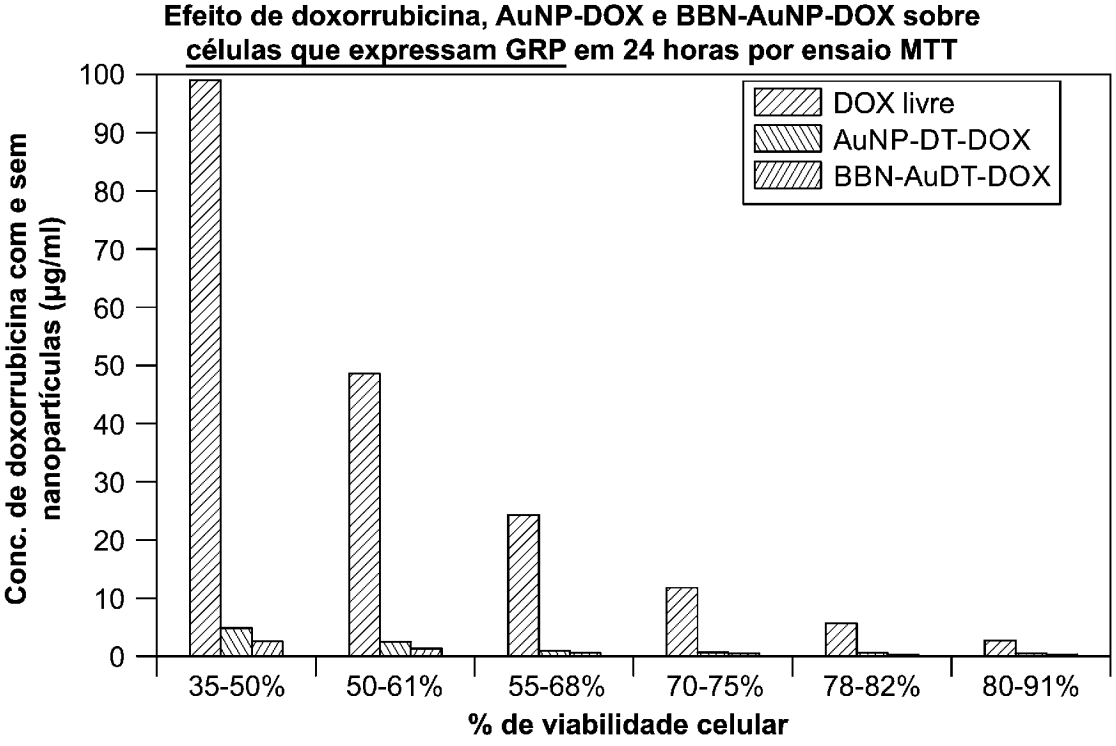


Figura 15

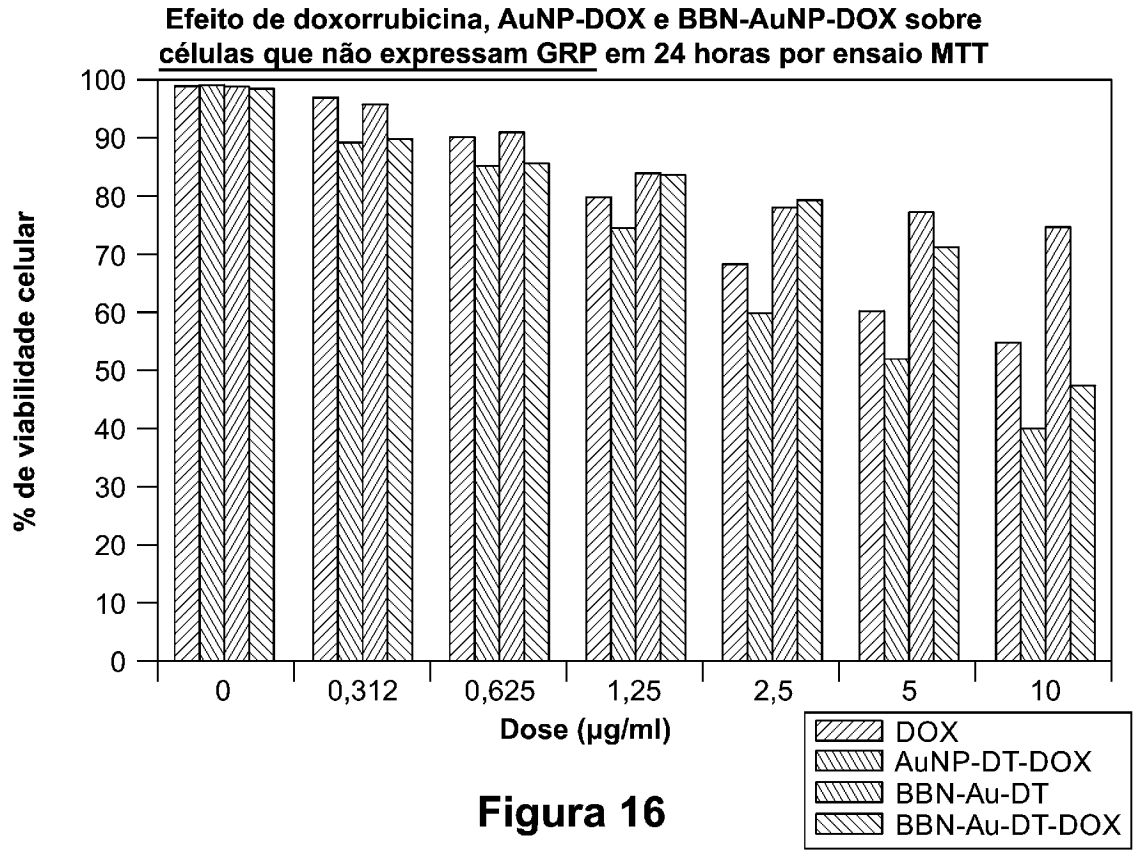


Figura 16

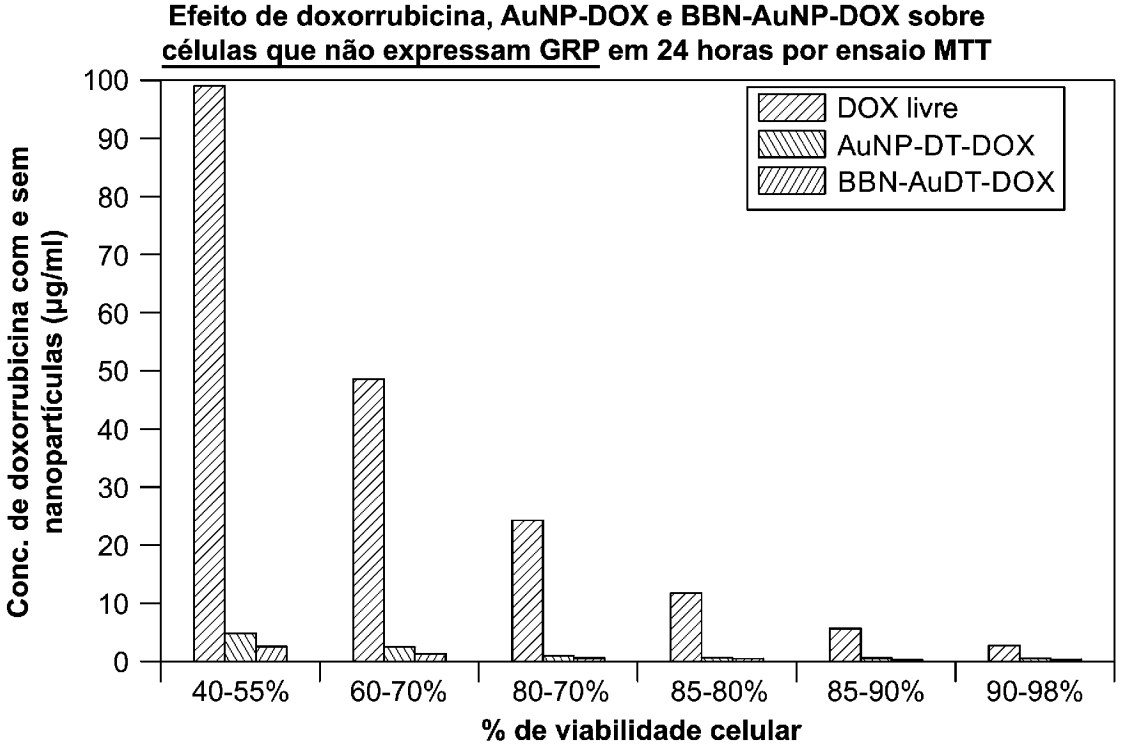


Figura 17

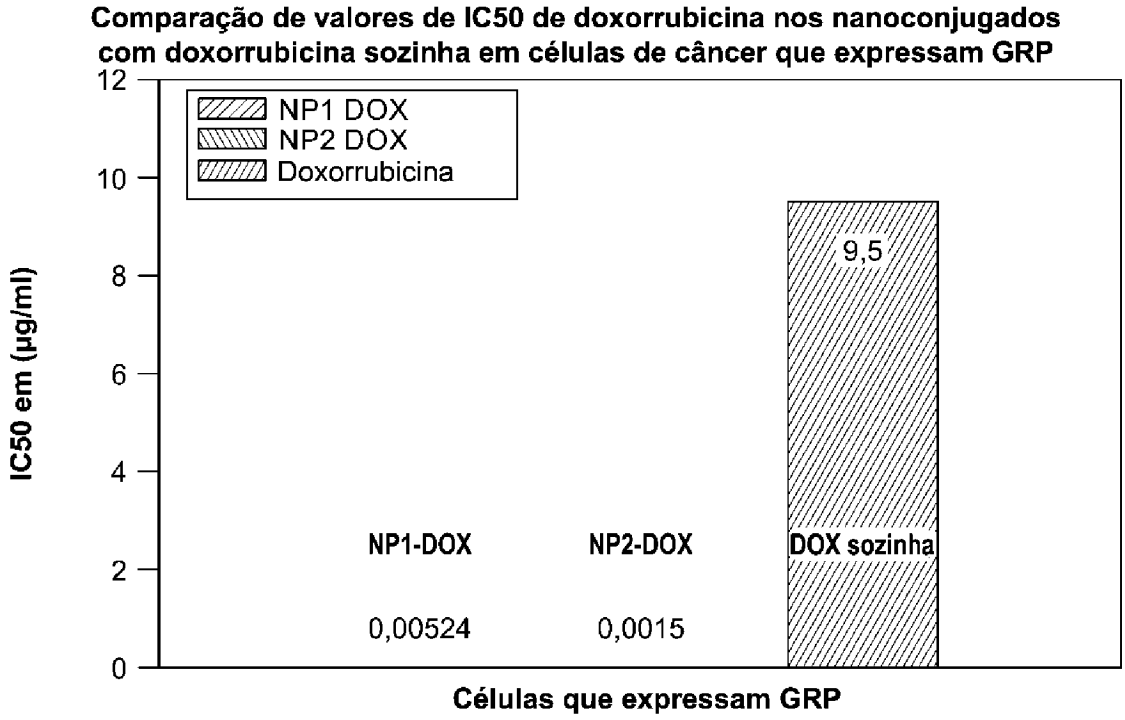


Figura 18

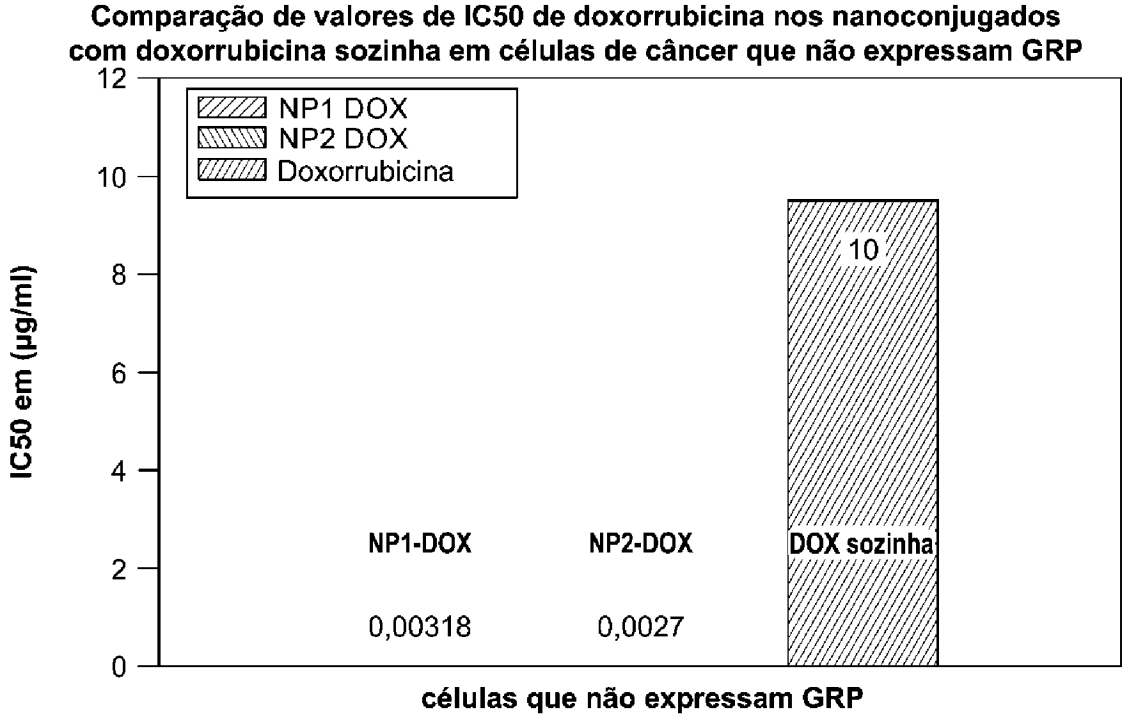


Figura 19

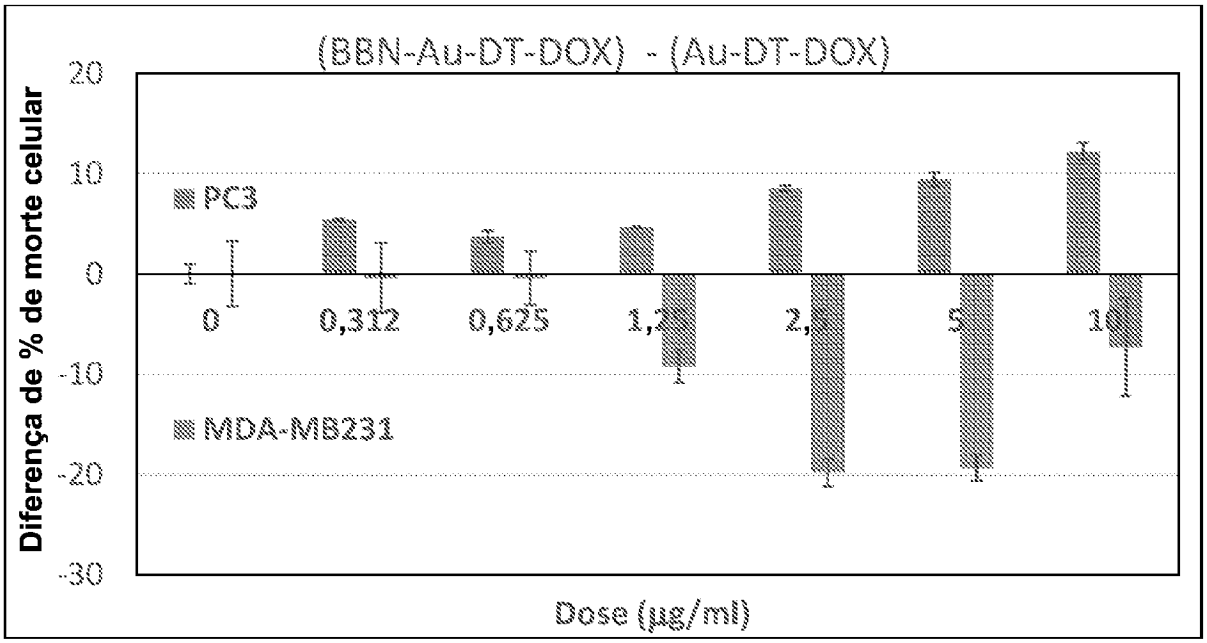

(BBN-Au-DT-DOX) - (Au-DT-DOX)
Diferença de % de morte celular
20
10
0
-10
-20
-30
PC3
MDA-MB231
0
0,312
0,625
1,2
2,
5
1
Dose (µg/ml)

Figura 20

RESUMO

Patente de Invenção **"NANOCONJUGADOS DE OURO COM DOXORRUBICINA DIRECIONADA PARA TERAPIA DE TUMOR"**

A presente revelação fornece nanoconjugados de ouro com doxorrubicina que podem ser usados para tratamentos do câncer. A presente revelação fornece métodos para a produção e o uso dos nanoconjugados.