

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

(21) **PI0900815-2 A2**

(22) Data de Depósito: 23/04/2009
(43) Data da Publicação: 28/12/2010
(RPI 2086)



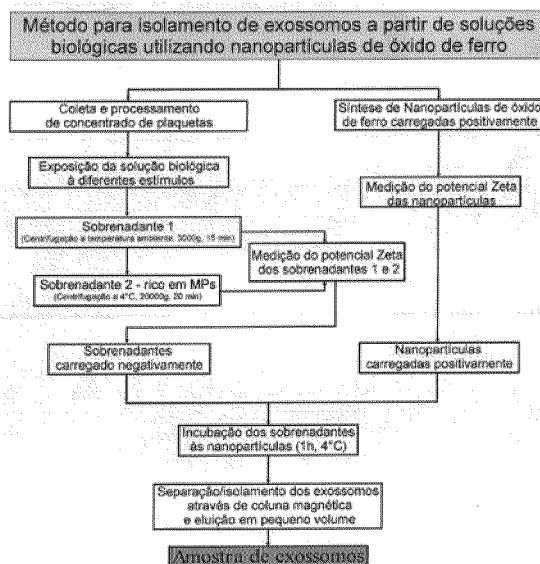
(51) *Int.Cl.:*
B82B 1/00
G01N 33/48

(54) Título: **MÉTODO PARA ISOLAMENTO DE EXOSSOMOS A PARTIR DE SOLUÇÕES BIOLÓGICAS UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO**

(73) Titular(es): Sociedade Benef Israelita Bras Hospital Albert Einstein

(72) Inventor(es): DAIANE DONÁ GUILHEN, LIONEL FERNEL GAMARRA CONTRERAS, LORENA FAVARO PAVON, LUCIANA CAVALHEIRO MARTI, MARIANO JANISZEWSKI

(57) Resumo: MÉTODO PARA ISOLAMENTO DE EXOSSOMOS A PARTIR DE SOLUÇÕES BIOLÓGICAS UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO. Esta patente descreve um método para o isolamento de exossomos provenientes de plaquetas utilizando nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (Fe_3O_4), através de um mecanismo de atração de cargas baseado no potencial Zeta pré-determinado dos exossomos; o método consiste na utilização das nanopartículas de óxido de ferro previamente sintetizadas com carga positiva pré-determinada que se ligam aos exossomos carregados negativamente, contidos na amostra biológica; durante a incubação, as nanopartículas magnéticas catiônicas são absorvidas para a superfície da membrana dos exossomos por meio das interações eletrostáticas; a exposição do material a um campo magnético permite a separação dos exossomos que se ligaram às nanopartículas; o sucesso da técnica é confirmado pela caracterização dos exossomos por citometria de fluxo; o método mostrou ser adequado para tal finalidade, uma vez que permite que exossomos sejam isolados e purificados e não foram observadas alterações nas características morfológicas e estruturais originais dos exossomos.



“MÉTODO PARA ISOLAMENTO DE EXOSSOMOS A PARTIR DE SOLUÇÕES BIOLÓGICAS UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO”.

CAMPO DE APLICAÇÃO

Trata a presente patente de invenção de um método para o isolamento de exossomos provenientes de plaquetas utilizando nanopartículas superparamagnéticas de magnetita (Fe_3O_4), através de um mecanismo de atração de cargas baseado no potencial Zeta pré-determinado dos exossomos.

10 FUNDAMENTOS DA TÉCNICA

Exossomo é um tipo de micropartícula produzida por diversos tipos celulares normais e tumorais (linfócitos, plaquetas, células dendríticas, neurônios, mastócitos, células intestinais, macrófagos, entre outras) com ampla função sinalizadora. Possui aproximadamente 100 nm de diâmetro, é composto de uma dupla camada lipídica associada a proteínas de membrana, contendo internamente proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. Estudos recentes mostram ampla capacidade de induzir resposta imune mais eficiente, assim como promover imunotolerância. Essas propriedades fizeram com que se propusessem o preparo de vacinas anti-tumorais baseadas em exossomos de células previamente sensibilizadas. Mais recentemente, exossomos mostraram-se capazes de promover angiogênese, apoptose de células vasculares, disfunção de células cardíacas e de transmitir inclusive informações genéticas entre células. Por fim, acredita-se também, que sejam via de transmissão de doenças priônicas e micobacterianas.

A despeito da evidente importância dos exossomos, sua separação e isolamento de soluções biológicas, com a preservação de sua integridade estrutural e funcional para estudo e

utilização representa um problema. O isolamento convencional de exossomos é trabalhoso, demorado e não garante a preservação estrutural das partículas. Partindo-se da solução biológica original, centrifugações seriadas são realizadas, que garantem a precipitação de células, debris e partículas por sua densidade relativa e tamanho.

Num protocolo padrão, para obtenção de exossomos a partir de uma solução celular, submete-se a solução a centrifugação de: 1000g durante 15 minutos para retirada das células e grandes debris; segue-se então a 4°C 18,000g durante 30 minutos para retirada de partículas subcelulares maiores, corpos apoptóticos e organelas indesejadas; em seguida, o sobrenadante da fração microvesicular é filtrado seqüencialmente através de membranas de náilon de 1µm, 500nm e 220nm e, então, novamente centrifugado a 4°C a 100,000g durante 90 minutos para obtenção do "pellet" de exossomos. O pellet pode ser então ressuspendido para sua utilização.

Todos os resultados da presente invenção foram obtidos a partir de exossomos provenientes de plaquetas. Estudos prévios mostram que na situação clínica de sepse, exossomos de plaquetas podem estar associados à disfunção vascular e cardíaca. Esses exossomos expressam em abundância CD63 (tetraspanina), e expõem fracamente anexina V em sua superfície.

Para melhor entender o princípio do método de isolamento de exossomos a partir de nanopartículas de óxido ferro utilizados na presente invenção, é necessária uma pequena explanação sobre o "potencial Zeta".

Quase todos os materiais macroscópicos ou particulados em contato com um líquido adquirem uma carga elétrica em sua superfície. Essa carga pode aparecer a partir da dissociação de íons na superfície da partícula, da adsorção diferencial de íons da

solução na superfície da partícula, entre outras. A carga líquida na superfície da partícula afeta a distribuição de íons na sua vizinhança, aumentando a concentração de contraíons junto à superfície. Assim, forma-se uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido.

Essa dupla camada divide-se em duas regiões: uma região interna que inclui íons fortemente ligados à superfície e uma região externa onde a distribuição dos íons é determinada pelo equilíbrio entre forças eletrostáticas e movimento térmico. Dessa forma, o potencial nessa região decai com o aumento da distância da superfície até, a uma distância suficientemente grande, atingir o potencial da solução. Esse potencial é convencionado como potencial zero.

Em um campo elétrico, cada partícula e os íons mais fortemente ligados à mesma se movem como uma unidade, e o potencial no plano de interface entre essa unidade e o meio circundante é chamado potencial Zeta. Portanto o potencial Zeta é um indicador útil dessa carga podendo ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais. Quanto maior o potencial Zeta mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera a tendência natural à agregação.

O potencial Zeta não pode ser medido diretamente. Assim usa-se algum tipo de medida indireta, a partir da qual se calcula o potencial zeta. A técnica mais usada e mais aceita é através da mobilidade eletroforética, introduz-se uma suspensão coloidal diluída em uma cuba com dois eletrodos e aplica-se um potencial elétrico à suspensão. As partículas com carga elétrica líquida mover-se-ão na direção do eletrodo de carga contrária. O quociente da velocidade de deslocamento pelo campo elétrico chama-se mobilidade

eletroforética, expressa em $\text{m}^2/\text{V.s}$. Esse valor entra numa equação (as mais usadas são as aproximações de Smoluchowski ou a de Debye) para calcular o potencial Zeta.

BREVE DESCRIÇÃO DO OBJETO

Analizando o atual estado da técnica, o requerente desenvolveu um método para o isolamento de exossomos provenientes de plaquetas utilizando nanopartículas superparamagnéticas de magnetita (Fe_3O_4), através de um mecanismo de atração de cargas baseado no potencial Zeta pré-determinado dos exossomos.

O método consiste, basicamente, na utilização das nanopartículas de óxido de ferro previamente sintetizadas com carga positiva pré-determinada que se ligam aos exossomos carregados negativamente, contidos na amostra biológica, por força de atração elétrica; a exposição do material a um campo magnético permite a separação dos exossomos que se ligaram às nanopartículas; o sucesso da técnica é confirmado pela caracterização dos exossomos por citometria de fluxo.

O método mostrou ser adequado para tal finalidade, uma vez que permite que exossomos sejam isolados e purificados e não foram observadas alterações nas características morfológicas e estruturais originais dos exossomos.

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A complementar a presente descrição de modo a obter melhor esclarecimento dos detalhes da invenção é feita uma descrição detalhada do presente método, a qual é acompanhada das figuras que constam as análises que evidenciam o sucesso do novo método.

Figura 1 – Fluxograma que mostra o novo método para isolamento de exossomos a partir de soluções biológicas utilizando nanopartículas de óxido de ferro.

Figura 2 – Esquema do princípio de funcionamento do Potencial zeta.

Figura 3 – Gráfico mostrando as diferenças entre os potenciais Zeta obtidos das medições feitas em micropartículas decorrentes de degradação plaquetária (PBS) e da exposição à trombina (5UI/ml) - sobrenadante 1- *versus* exossomos obtidos pela exposição de plaquetas ao LPS (100ng/ml) - sobrenadante 2 - . Resultado de 4 experimentos independentes.

Figura 4 – Dot-plots mostrando a obtenção dos sinais fluorescentes correspondentes, na primeira situação, detecção apenas das nanopartículas ferrosas em tampão PBS com os anticorpos, mostrando a ausência de fluorescência significativa (artefato); e, na segunda situação, a detecção da amostra propriamente dita, já descontado o “background” encontrado na primeira situação.

Figura 5 – Gráficos mostrando claramente a detecção diferencial por citometria de fluxo da expressão dos marcadores de superfície de exossomos, CD63, CD3 e CD9 e baixa expressão de anexina V e HLA-DR, quando comparada com as micropartículas obtidas por degradação de plaquetas. Em ambas as situações, partículas foram capturadas por nanopartículas ferrosas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO OBJETO

Com referências aos desenhos, a presente invenção se refere a um “MÉTODO PARA ISOLAMENTO DE EXOSSOMOS A PARTIR DE SOLUÇÕES BIOLÓGICAS UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO”, sendo que, mais particularmente, o método para o isolamento de exossomos provenientes de plaquetas utilizando

nanopartículas superparamagnéticas de magnetita (Fe_3O_4) é realizado através de um mecanismo de atração de cargas baseado no potencial Zeta pré-determinado dos exossomos.

O método consiste na utilização das nanopartículas de óxido de ferro previamente sintetizadas com carga positiva pré-determinada que se ligam aos exossomos carregados negativamente, contidos na amostra biológica, por força de atração elétrica; a exposição do material a um campo magnético permite a separação dos exossomos que se ligaram às nanopartículas; o sucesso da técnica é confirmado pela caracterização dos exossomos por citometria de fluxo.

Assim sendo, o método pode ser definido nas seguintes etapas:

- (a) Plaquetas foram estimuladas a gerar exossomos típicos e partículas controle;
- (b) Amostras contendo exossomos (sobrenadante 2) e partículas (sobrenadante 1) foram submetidas à medição do potencial Zeta, revelando cargas potenciais bastante negativas, mas diferentes entre elas ($-61 \pm 21,1$) mV para os exossomos *versus* ($-9,2 \pm 3$) mV para partículas de degradação plaquetária, média $\pm$ ep, $n=4$, $p<0,05$);
- (c) Solução de nanopartículas superparamagnética de óxido de ferro foi sintetizada de acordo com a metodologia que consiste basicamente na hidrólise rápida do Fe^{3+} , pela adição de hidróxido de amônio a solução aquosa 0,25 molar de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; a diálise do precipitado permite sua peptização levando à formação de suspensão coloidal com partículas extremamente pequenas ($\sim 200 \text{ \AA}$);
- (d) A obtenção de partículas nanométricas (50-100 $\text{\AA}$) à base de óxido de ferro foram preparadas por meio da hidrólise de soluções alcoólicas

por hidróxido de dietilamônio na presença de um surfactante como o nonilfenoletoxilado;

(e) Amostras foram incubadas com as nanopartículas de ferro por 1 hora, na proporção de 0,1 ml solução de concentração 200 µg de ferro/mL para 2 ml de solução contendo exossomos;

(f) Ao final de 1 hora, esse material foi exposto a um campo magnético em coluna LS-MidiMACS (Miltenyi) que permitiu a separação dos exossomos que se ligaram as nanopartículas, por eluição com PBS + força mecânica (embolo da própria coluna);

(g) Submetido à citometria de fluxo (CMF) é confirmado que foram obtidos exossomos (figura 3) através da alta expressão de CD63 com alguma expressão de CD9 e baixíssima expressão de Anexina V (figura 4).

O novo método aqui demonstrado representa significativo avanço para a separação dos exossomos, pois permite sua obtenção de maneira significativamente rápida, através de manipulação única da solução, sem que seja necessária a centrifugação e filtração e sem a formação de pellet, que se contamina de proteínas arrastadas durante o processo de ultracentrifugação, e que acaba por alterar a ultraestrutura das micropartículas. Em contrapartida se adicionam nanopartículas ferrosas no meio. Ainda não está claro se elas apenas se ligam à face externa dos exossomos ou se são incorporadas por estes. Tal definição permitirá subsequente desenvolvimento de método para a separação do material ferroso.

É certo que quando o presente invento for colocado em prática poderão ser introduzidas modificações no que se refere a certos detalhes de construção e forma, sem que isso implique afastar-se dos princípios fundamentais que estão claramente

substanciados no quadro reivindicatório, ficando assim estendido que a terminologia empregada teve a finalidade e não de limitação.

REIVINDICAÇÕES

1a) **"MÉTODO PARA ISOLAMENTO DE EXOSSOMOS A PARTIR DE SOLUÇÕES BIOLÓGICAS UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO"**, caracterizado pelo fato do método para o
5 isolamento de exossomos compreender plaquetas utilizando nanopartículas superparamagnéticas de magnetita (Fe_3O_4) e ser realizado através de um mecanismo de atração de cargas baseado no potencial Zeta pré-determinado dos exossomos onde as nanopartículas de óxido de ferro, previamente sintetizadas com carga positiva pré-
10 determinada, se ligam aos exossomos carregados negativamente, contidos na amostra biológica, por força de atração elétrica; a exposição do material a um campo magnético permite a separação dos exossomos que se ligaram às nanopartículas.

2a) **"MÉTODO PARA ISOLAMENTO DE EXOSSOMOS A PARTIR DE SOLUÇÕES BIOLÓGICAS UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO"**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado
15 pelo método ser definido nas seguintes etapas:

- (a) Plaquetas foram estimuladas a gerar exossomos típicos e partículas controle;
- 20 (b) Amostras contendo exossomos (sobrenadante 2) e partículas (sobrenadante 1) foram submetidas à medição do potencial Zeta, revelando cargas potenciais bastante negativas, mas diferentes entre elas ($-61 \pm 21,1$) mV para os exossomos *versus* ($-9,2 \pm 3$) mV para partículas de degradação plaquetária, média $\pm$ ep, $n=4$, $p<0,05$);
- 25 (c) Solução de nanopartículas superparamagnética de óxido de ferro foi sintetizada de acordo com a metodologia que consiste basicamente na hidrólise rápida do Fe^{3+} , pela adição de hidróxido de amônio a solução aquosa 0,25 molar de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; a diálise do precipitado permite sua

peptização levando à formação de suspensão coloidal com partículas extremamente pequenas ($\sim 200 \text{ \AA}$);

(d) A obtenção de partículas nanométricas ($50\text{-}100 \text{ \AA}$) à base de óxido de ferro foram preparadas por meio da hidrólise de soluções alcoólicas por hidróxido de dietilamônio na presença de um surfactante como o nonilfenoletoxilado;

(e) Amostras foram incubadas com as nanopartículas de ferro por 1 hora, na proporção de $0,1 \text{ ml}$ solução de concentração $200 \mu\text{g}$ de ferro/ mL para 2 ml de solução contendo exossomos;

(f) Ao final de 1 hora, esse material foi exposto a um campo magnético em coluna LS-MidiMACS (Miltenyi) que permitiu a separação dos exossomos que se ligaram as nanopartículas, por eluição com PBS + força mecânica (embolo da própria coluna);

(g) Submetido à citometria de fluxo (CMF) é confirmado que foram obtidos exossomos através da alta expressão de CD63 com alguma expressão de CD9 e baixíssima expressão de Anexina V.

3a) **"MÉTODO PARA ISOLAMENTO DE EXOSSOMOS A PARTIR DE SOLUÇÕES BIOLÓGICAS UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO"**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato de o método obter exossomos de soluções biológicas mistas.

4a) **"MÉTODO PARA ISOLAMENTO DE EXOSSOMOS A PARTIR DE SOLUÇÕES BIOLÓGICAS UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO"**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato de o método obter exossomos íntegros em sua forma.

5a) **"MÉTODO PARA ISOLAMENTO DE EXOSSOMOS A PARTIR DE SOLUÇÕES BIOLÓGICAS UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO"**, de acordo com as reivindicações 1 e 2,

caracterizado pelo fato de o método obter exossomos íntegros em seu conteúdo protéico.

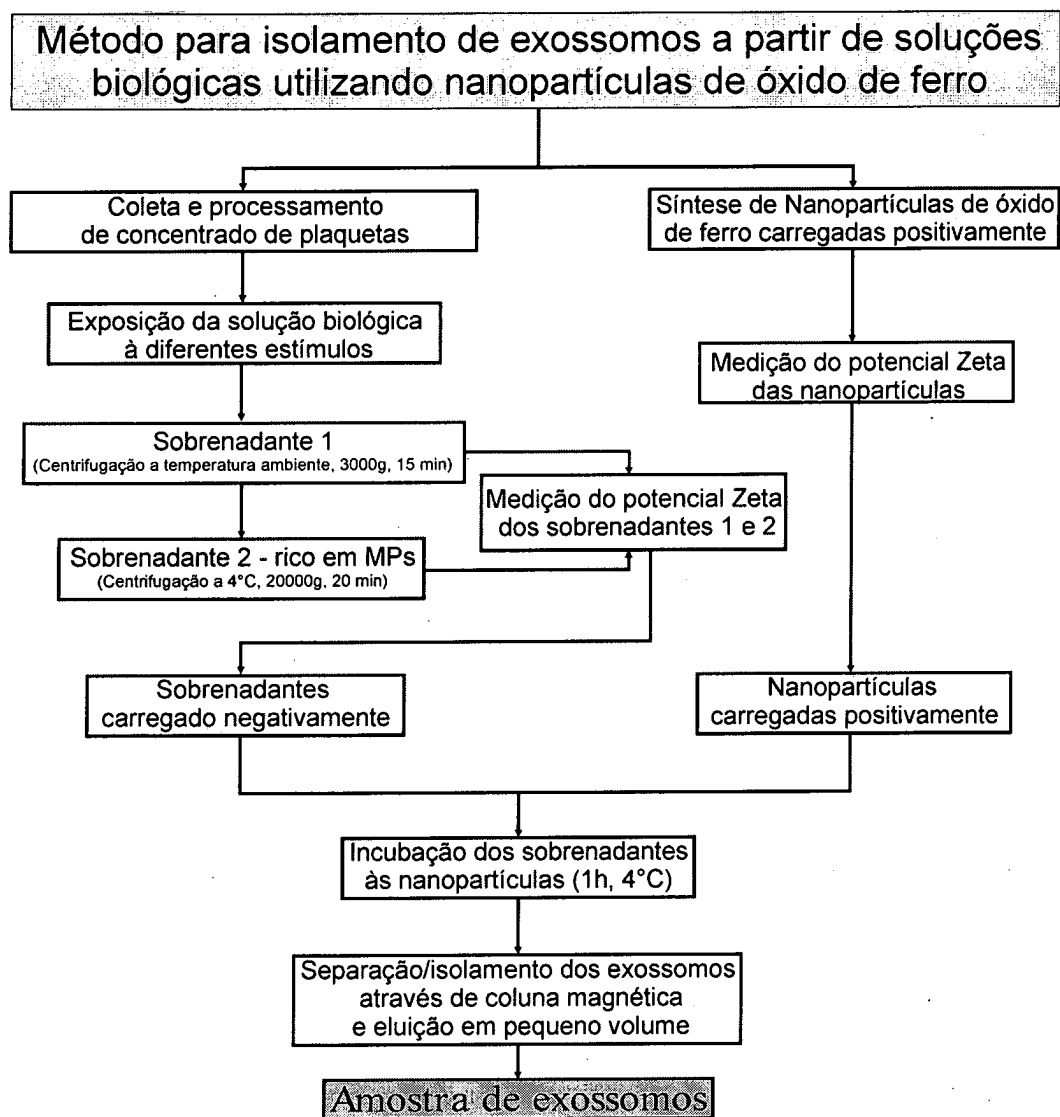
FIG. 1

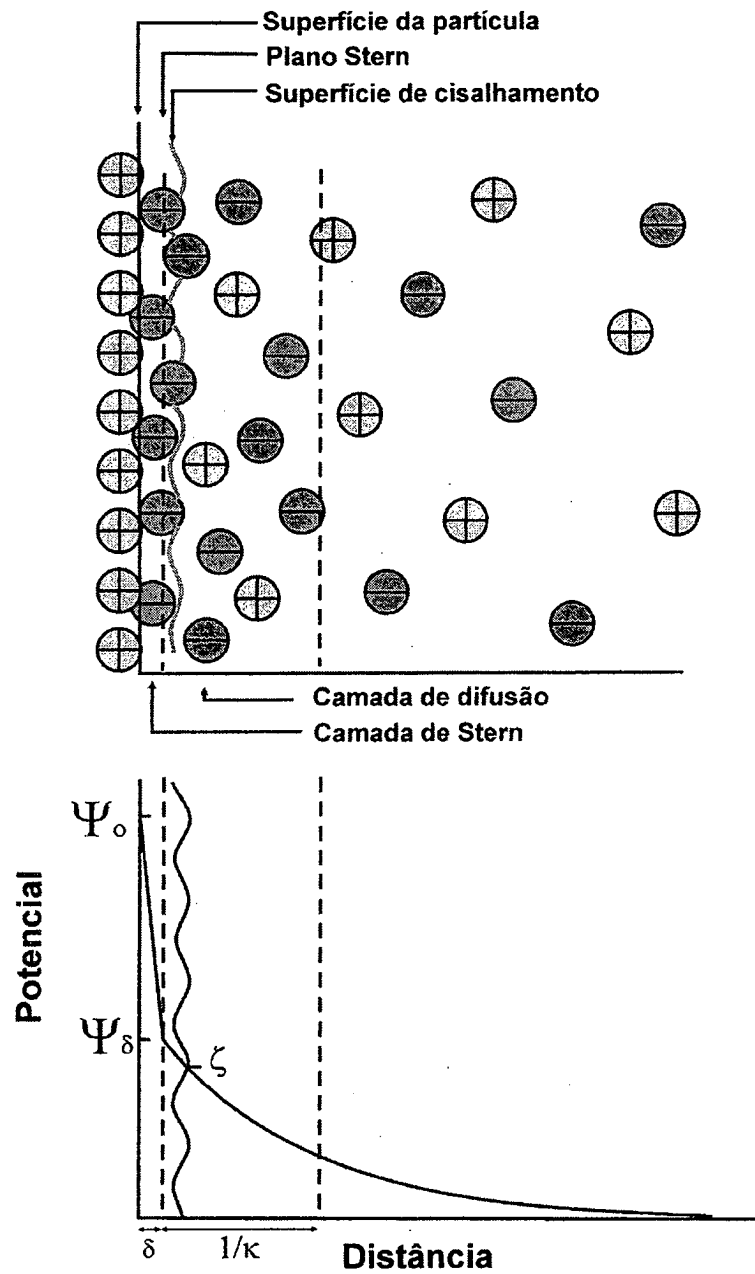
FIG. 2

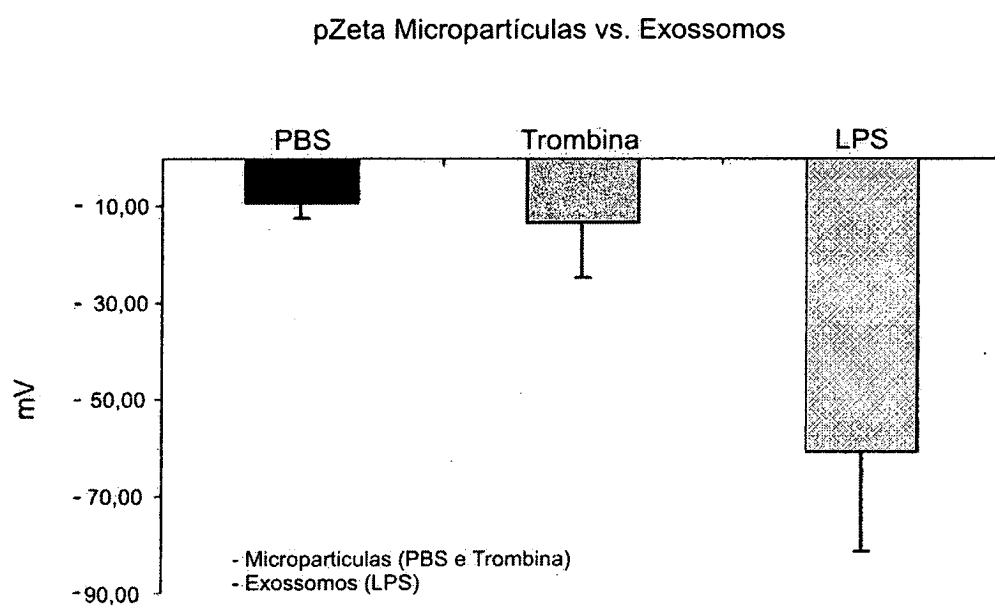
FIG. 3

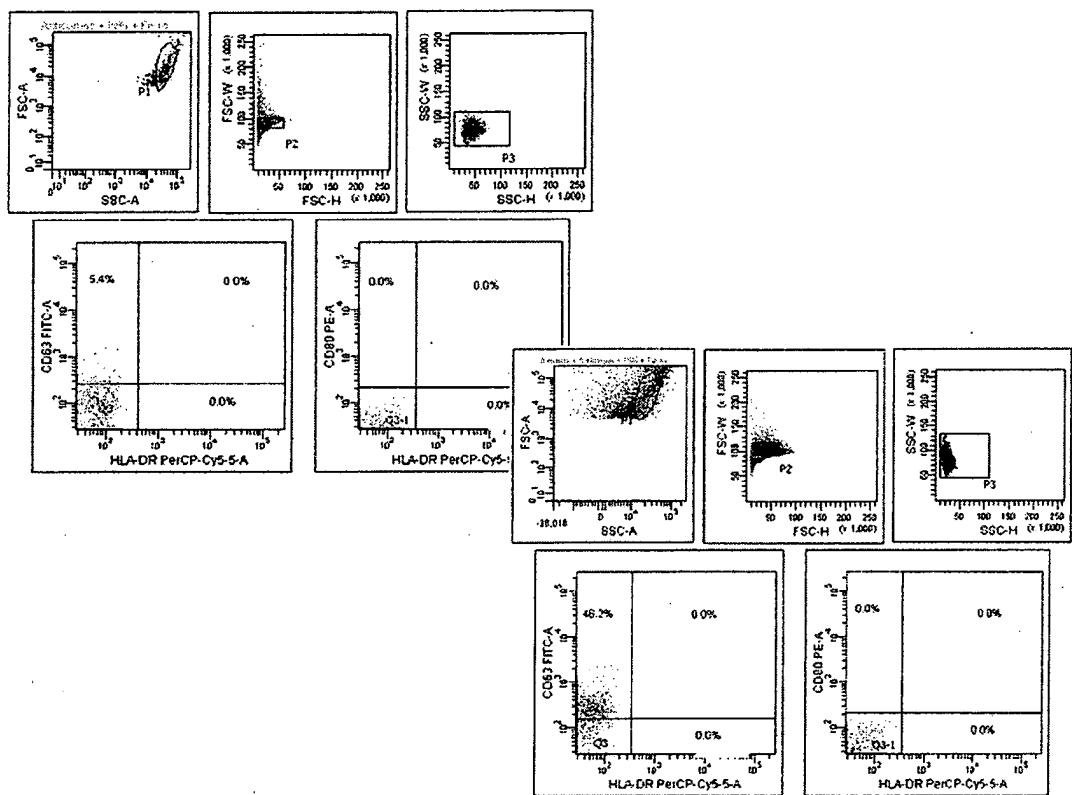
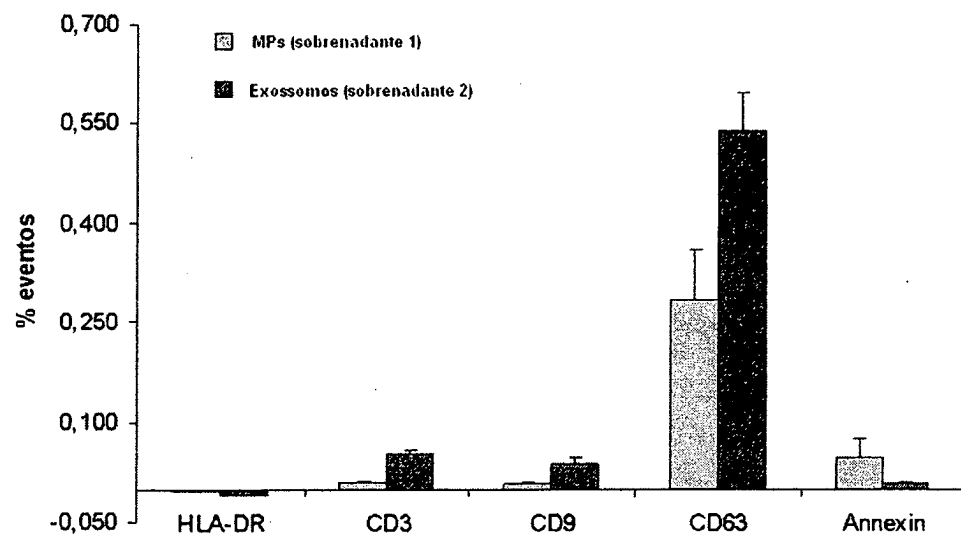
FIG. 4

FIG. 5

"MÉTODO PARA ISOLAMENTO DE EXOSSOMOS A PARTIR DE SOLUÇÕES BIOLÓGICAS UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO".

Esta patente descreve um método para o isolamento de exossomos provenientes de plaquetas utilizando nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (Fe_3O_4), através de um mecanismo de atração de cargas baseado no potencial Zeta pré-determinado dos exossomos; o método consiste na utilização das nanopartículas de óxido de ferro previamente sintetizadas com carga positiva pré-determinada que se ligam aos exossomos carregados negativamente, contidos na amostra biológica; durante a incubação, as nanopartículas magnéticas catiônicas são absorvidas para à superfície da membrana dos exossomos por meio das interações eletrostáticas; a exposição do material a um campo magnético permite a separação dos exossomos que se ligaram às nanopartículas; o sucesso da técnica é confirmado pela caracterização dos exossomos por citometria de fluxo; o método mostrou ser adequado para tal finalidade, uma vez que permite que exossomos sejam isolados e purificados e não foram observadas alterações nas características morfológicas e estruturais originais dos exossomos.