



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

(21) BR 132020012751-8 E2



(22) Data do Depósito: 22/06/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 08/03/2022

(54) **Título:** COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA NANOMÉTRICA NA FORMA DE LIPOSSOMAS OU NANOEMULSÃO QUE CONTÉM SEQUÊNCIAS ESPECÍFICAS DE RNA DE INTERFERÊNCIA

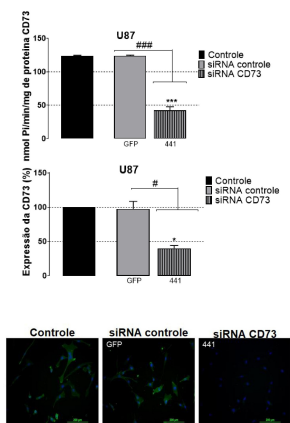
(51) **Int. Cl.:** A61K 48/00; C12N 15/113; A61K 9/127; A61P 35/00.

(71) **Depositante(es):** FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE; UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS; UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA.

(72) **Inventor(es):** ELIZANDRA BRAGANHOL; ANA MARIA OLIVEIRA BATTASTINI; HELDER TEIXEIRA; MARCO ANTÔNIO STÉFANI; FERNANDA BRUXEL; ROSELIA MARIA SPANEVELLO; FERNANDA CARDOSO TEIXEIRA; JULIANA HOFSTATTER AZAMBUJA.

(61) **Pedido original do CA:** BR102018001541-9 - 24/01/2018

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA NANOMÉTRICA NA FORMA DE LIPOSSOMAS OU NANOEMULSÃO QUE CONTÉM SEQUÊNCIAS ESPECÍFICAS DE RNA DE INTERFERÊNCIA. A presente invenção está inserida nos campos da nanotecnologia, farmácia e genética e refere-se a sequências específicas de RNA de interferência (siRNA), capazes de silenciar o gene responsável pela expressão de uma proteína de adesão, produtora de adenosina extracelular superexpressa em tumores, a enzima ecto-5'-nucleotidase/CD73 (CD73). As sequências específicas de siRNA para a CD73 são propostas em uma composição em escala nanométrica na forma de lipossomas ou nanoemulsões de forma a promover um complexo de liberação sítio-direcionado capaz de ser incorporado a diversos tipos de formulação, como injeção intratumoral, intravenosa ou administração nasal. As sequências siRNA para silenciar a CD73 também poderão ser aplicadas na manufatura de kits e/ou em ensaios de silenciamento da CD73 para a pesquisa científica utilizando lipossomas, nanoemulsões ou outros reagentes de transfecção.



**Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

**COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA NANOMÉTRICA NA FORMA DE  
LIPOSSOMAS OU NANOEMULSÃO QUE CONTÉM SEQUÊNCIAS  
ESPECÍFICAS DE RNA DE INTERFERÊNCIA**

“CERTIFICADO DE ADIÇÃO DE INVENÇÃO DO PEDIDO DE PATENTE BR102018001541-9  
DEPOSITADO EM 24 DE JANEIRO DE 2018”

**Campo da Invenção**

**[001]** A presente invenção situa-se nos campos da Nanotecnologia, Farmácia e Genética, sendo relacionada a uma composição em escala nanométrica de liberação de moléculas de RNA de interferência capazes de silenciar genes responsáveis pela expressão de proteínas e enzimas superexpressas em tumores. A composição da invenção contém lipossomas ou nanoemulsões que interagem de forma eficaz com o RNA de interferência, formando complexos de liberação sítio-direcionada. A composição proporciona compatibilidade com uma pluralidade de formulações farmacêuticas, além de ser mais segura que os métodos tradicionais.

**Histórico da Invenção**

**[002]** O câncer ou cancro é um grupo de doenças que envolvem o crescimento celular anormal, com potencial para invadir e espalhar-se para outras partes do corpo, além do local original. Uma massa celular com esse crescimento anormal é denominada de tumor.

**[003]** Glioma é um termo geral para um grupo de tumores cerebrais que apresentam características fenotípicas e de expressão gênica similar as células gliais. Os gliomas podem ser classificados de acordo com as características de malignidade em grau I, II, III ou IV, sendo o glioma de grau IV também conhecido como glioblastoma. Os glioblastomas estão entre os tumores cerebrais de maior taxa de crescimento, invasão e letalidade.

**[004]** O glioblastoma é o tipo mais comum e agressivo de tumor maligno cerebral que acomete os seres humanos. Os sinais e sintomas iniciais são inespecíficos e podem incluir cefaleia, alterações de personalidade, náuseas e sintomas similares aos de um acidente vascular cerebral. O agravamento dos sintomas é geralmente rápido, podendo evoluir para um quadro de inconsciência. O prognóstico para portadores desse tipo de tumor é reservado e o tempo de sobrevida médio após o diagnóstico é de 12 a 15 meses.

**[005]** Os métodos de tratamento atuais consistem basicamente na neurocirurgia, na utilização de substâncias que inibem o crescimento tumoral, seja na inibição da angiogênese necessária para a demanda de recursos desse tipo de tumor, ou seja, na ação citotóxica que impede a replicação – e, por conseguinte crescimento – do tumor.

**[006]** A neurocirurgia para retirada das células tumorais, apesar de ser um método eficaz de tratamento para promover o aumento da sobrevida do paciente, possui alguns complicadores clássicos, como a localização do tumor e o grau de invasividade. Dependendo da região de crescimento, alguns tumores podem ser inoperáveis, ou ainda operáveis, mas com elevado perigo cirúrgico e/ou grande desconforto pós-cirúrgico para o paciente.

**[007]** O uso de substâncias que inibem o crescimento tumoral também apresenta desvantagens. A substância de primeira linha para o tratamento de glioblastoma é a temozolomida, um quimioterápico oral e agente alquilante antineoplásico. Apesar de ser um fármaco com poucos efeitos colaterais, ainda apresenta riscos, uma vez que é genotóxica e teratogênica. Sua eficácia também é limitada devido à velocidade de replicação do tumor, e sua principal utilização visa aumentar a sobrevida do paciente, uma vez que a resistência intrínseca ou desenvolvida a esse quimioterápico é inevitável, resultado em elevadas taxas de recorrência do tumoral e consequente óbito do paciente.

**[008]** Em relação às formulações contendo as referidas substâncias inibidoras de crescimento, a temozolomida se apresenta na forma oral e as demais na forma intravenosa. Dependendo da substância que está sendo administrada,

algumas desvantagens também podem ser percebidas. No caso da temozolomida, por exemplo, uma administração oral deve ter dosagem capaz de minimizar o metabolismo primário hepático, além de se espalhar na corrente sanguínea, inibindo a divisão celular de outras células saudáveis e gerando o desconforto de medicamentos quimioterápicos, desvantagem essa também presente na administração intravenosa. Outros medicamentos podem apresentar baixa biodisponibilidade no sistema nervoso central devido à presença da barreira hematoencefálica, sendo pouco efetivos para o tratamento do glioblastoma, uma vez que o mesmo se encontra no cérebro.

**[009]** Para ser ideal, uma formulação antineoplásica deveria ser capaz de entregar apenas a quantidade eficaz do ativo quimioterápico no sítio específico de ação, além de ser capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e ser de fácil administração.

**[010]** Além disso, a toxicidade do ativo quimioterápico escolhido deve ser rigorosamente analisada. Idealmente, o ativo quimioterápico deveria ser eficaz apenas as células tumorais, inibindo seletivamente a replicação celular.

**[011]** Contudo, a maior parte das formulações antineoplásicas atuais possuem ação sistêmica e carregam altas dosagens de ativos quimioterápicos tóxicos, trazendo efeitos colaterais significativos para os pacientes.

**[012]** A presente invenção pretende abordar todos os problemas acima explicitados. A invenção compreende um sistema de lipossomos ou de nanoemulsão, contendo uma quantidade específica e eficaz de ativo quimioterápico de ação genética. A invenção se utiliza de fitas de RNA de interferência capazes de silenciar o gene responsável pela transcrição da proteína de adesão e enzima geradora de adenosina, uma molécula promotora tumoral, ecto-5'-nucleotidase/CD73, superexpressa em diversos tumores, incluindo o glioblastoma.

**[013]** Dessa forma, a presente invenção aborda não só uma formulação capaz de carrear apenas a quantidade eficaz de ativo como um ativo específico para características tumorais.

Antecedentes da invenção:

**[014]** O documento WO 2004/079013 descreve um método de diagnóstico e predição do estágio de câncer pancreático que compreende a detecção da expressão e atividade da proteína ecto-5'-nucleotidase em uma amostra de células cancerígenas e a comparação dos resultados com células normais. O documento ainda relata composições para o tratamento de tumores contendo fragmentos de RNA de interferência, e que essas composições podem ser lipossomas e emulsões. Contudo, não há menção ao tratamento de glioblastomas ou ao tamanho nanométrico das formulações.

**[015]** O documento PI 0709506-6 descreve o uso de RNA de interferência para a inibição da expressão do mRNA de tirosina quinase do baço (SYK), particularmente para o tratamento de pacientes que têm uma condição inflamatória relacionada com a SYK ou correndo o risco de desenvolver uma condição inflamatória relacionada com a mesma, tal como conjuntivite alérgica, inflamação ocular, dermatite, rinite, asma, alergia, ou doença de células mastoideas.

**[016]** O documento PI 0619738-8 descreve sequências de RNA de interferência (siRNA) isoladas, compreendendo um filamento de RNA sentido e um filamento de RNA anti-sentido complementar, que formam juntos um dúplex de RNA, com fragmentos de 14 a 30 nucleotídeos contíguos da sequência nucleotídica do exon F do gene codificador da proteína miosina V. O documento também descreve composições que compreendem pelo menos um siRNA e a utilização de pelo menos esse siRNA como agente cosmético ou terapêutico para a despigmentação da pele.

**[017]** O artigo científico "Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis", publicado na revista Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS) em 26 de Janeiro de 2010, descreve, como supõe o título, o desenvolvimento de um anticorpo monoclonal seletivo para a proteína de adesão ecto-5'-nucleotidase, que é superexpressa em tumores de mama.

**[018]** Dessa forma, nenhuma das anterioridades descreve, ao mesmo tempo, um sistema de lipossomas/nanoemulsões, contendo fragmentos de RNA de interferência específicos, e utilizados para inibir a atividade da proteína de adesão e enzima geradora de adenosina extracelular, ecto-5'-nucleotidase, em glioblastomas.

**[019]** Em virtude de todas as informações/limitações acima mostradas, os inventores buscaram e desenvolveram a presente invenção, que proporciona soluções a diversos problemas técnicos já apresentados. O presente documento descreve formulações nanométricas antineoplásicas, que visam contornar diversos dos problemas citados acima e promover segurança e eficácia no tratamento de glioblastomas.

### **Sumário da Invenção**

**[020]** A presente invenção refere-se a uma formulação em escala nanométrica contendo filamentos de RNA de interferência capazes de silenciar genes que regulam a expressão de proteínas de adesão superexpressas e a formação de adenosina em alguns tipos de tumores.

**[021]** Em um primeiro aspecto, a presente invenção provê uma composição nanométrica constituída de lipossomas ou nanoemulsões contendo filamentos de RNA de interferência.

**[022]** Em um segundo aspecto, a presente invenção é provê o uso da dita composição para silenciar genes que regulam a expressão de proteínas superexpressas em tumores.

**[023]** Em um terceiro aspecto, a presente invenção apresenta um complexo de lipossomas ou nanoemulsão com o RNA de interferência capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e ser sítio específico.

**[024]** Em um quarto aspecto, a presente invenção provê uma formulação farmacologicamente aceitável contendo a composição nanométrica.

**[025]** Em uma concretização, a formulação farmacologicamente aceitável é uma injeção intratumoral, uma injeção intravenosa ou um spray nasal.

**[026]** Estes e outros aspectos, características e vantagens da invenção se tornarão ainda mais evidentes para os técnicos no assunto a partir da descrição detalhada a seguir e das reivindicações anexas.

### **Breve Descrição das Figuras**

**[027]** A figura 1 mostra a análise da atividade/expressão de ecto-5'-NT/CD73 em células de glioma C6 e efeito de AMPCP, um inibidor enzimático da ecto-5'-NT/CD73, sobre a proliferação celular.

**[028]** A figura 2 mostra a avaliação do silenciamento de ecto-5'-NT/CD73 por sequências específicas de siRNA-CD73.

**[029]** A figura 3 mostra a caracterização morfológica dos complexos de nanoemulsão (NE)/siRNA-CD73.

**[030]** A figura 4 mostra a otimização da transfecção de glioma C6 utilizando complexos NE/siRNA.

**[031]** A figura 5 mostra a análise de citotoxicidade do complexo NE/siRNA-GFP em culturas de astrócitos, células gliais normais.

**[032]** A figura 6 mostra a avaliação do silenciamento da enzima ecto-5'-NT/CD73 por complexos NE/siRNA-CD73.

**[033]** A figura 7 mostra a análise do tratamento com NE/siRNA-CD73 na viabilidade celular de glioma C6.

**[034]** A figura 8 mostra a eficiência do tratamento com NE/siRNA-CD73-980 em reduzir a progressão tumoral em um modelo pré-clínico de glioblastoma através da análise de quantificação do tamanho do tumor.

**[035]** A figura 9 mostra a eficiência do tratamento com NE/siRNA-CD73-980 em reduzir a progressão tumoral em um modelo pré-clínico de glioblastoma através de imagens representativas.

**[036]** A figura 10 mostra que o tratamento com NE-siRNA CD73-980 promove o silenciamento da CD73 *in vivo* em um modelo pré-clínico de glioblastoma através de imagens representativas de imunohistoquímica.

**[037]** A figura 11 mostra a eficiência da sequência siRNA-CD73-441 para silenciar a expressão da CD73 em linhagem U87MG de glioblastoma humano.

**[038]** A figura 12 mostra a eficiência da sequência siRNA-CD73-441 para inibir a proliferação celular da linhagem U87MG de glioblastoma humano.

**[039]** A figura 13 indica que o silenciamento da CD73 utilizando a sequência siRNA-CD73-441 potencializa a citotoxicidade da temozolomida, quimioterápico padrão utilizado para o tratamento de glioblastoma, na linhagem de glioblastoma humano U87MG.

**[040]** A figura 14 indica que o silenciamento da CD73 utilizando a sequência siRNA-CD73-441 reduz a migração celular da linhagem U87MG de glioblastoma humano.

### **Descrição Detalhada da Criação Industrial e da Invenção**

**[041]** A presente descrição visa aprofundar o detalhamento sobre o conceito inventivo, prover exemplos que facilitem a cognição/compreensão do mesmo e fornecer dados técnicos precisos sobre algumas das formas de concretizar o conceito inventivo da invenção. A descrição detalhada também visa evitar a repetição, por terceiros, da extensa experimentação, investimentos financeiros, de tempo e de atividade intelectual que os inventores/depositante fizeram para resolver os problemas técnicos ora resolvidos.

**[042]** Para evitar dúvidas quanto à interpretação, qualquer característica descrita em um aspecto da presente invenção pode ser utilizada em outro aspecto da invenção. A palavra “compreendendo” pretende significar “incluindo”, mas não necessariamente “consistindo de” ou “composto apenas por”. Em outras palavras, as etapas ou opções listadas não precisam ser exaustivas. Nota-se que os exemplos fornecidos na descrição abaixo visam esclarecer a invenção, e não devem *per se* ser interpretados como limitantes do escopo da invenção.

**[043]** Em um primeiro aspecto, a presente invenção provê uma composição farmacêutica nanométrica compreendendo lipossomas ou nanoemulsão contendo filamentos de RNA de interferência.

**[044]** Em uma concretização da composição farmacêutica manométrica, os filamentos de RNA de interferência apresentam uma fita sense e antisense composta por 19 nucleotídeos em orientação invertida, separadas por um espaço de 1 par de base definidas de acordo com as SEQ ID No:1, SEQ ID No:2 e SEQ ID No:3.

**[045]** Em uma concretização da formulação farmacêutica manométrica, a mesma compreende adicionalmente um excipiente farmacêuticamente aceitável.

**[046]** Em uma concretização da composição farmacêutica nanométrica, a mesma está na forma de uma injeção intratumoral, parenteral ou spray nasal.

**[047]** Em um segundo aspecto, a presente invenção provê o uso da dita composição farmacêutica nanométrica para preparar um medicamento para silenciar genes responsáveis pela expressão de proteínas superexpressas em tumores.

**[048]** Em uma concretização do uso, o gene silenciado é o NT5E (gene ID: 4907; 5'-nucleotidase-ecto; *Homo sapiens*); ou o Nt5e (gene ID: 58813; 5' nucleotidase, ecto; *Rattus norvegicus*).

**[049]** Em uma concretização do uso, a proteína a ser regulada é a ecto-5'-nucleotidase/CD73.

**[050]** Em uma concretização do uso, o tumor é o glioblastoma.

**[051]** Em uma concretização do uso, a dita composição é administrada na forma de injeção intratumoral, parenteral ou spray nasal.

**[052]** O tratamento do glioblastoma permanece um desafio para a oncologia. As terapias oferecidas atualmente são apenas de caráter paliativo e a sobrevida média dos pacientes diagnosticados é de apenas 12 meses.

**[053]** Dessa forma, a invenção proposta tem como objetivo oferecer uma nova estratégia terapêutica para o tratamento do glioblastoma que também poderá ser utilizada para outras neoplasias ainda sem cura ou refratárias aos tratamentos disponíveis.

**[054]** O alvo da terapia é a enzima e proteína de adesão ecto-5'-nucleotidase/CD73 (CD73). O aumento da expressão e da atividade enzimática dessa proteína tem sido amplamente reportado em tecidos tumorais, inclusive em glioblastomas, e está associado a aumento das características de malignidade tumoral, como migração, adesão, invasão, angiogênese e escape do sistema imune. Assim, estratégias para diminuir a expressão e/ou a atividade da CD73 poderiam ser úteis para o tratamento do glioblastoma e também de outras neoplasias que apresentem o aumento de expressão desse alvo.

**[055]** Uma forma inovadora de silenciamento da expressão gênica é a utilização de sequências de RNA de interferência (siRNA) para um determinado alvo. O RNA de interferência é um mecanismo exercido a partir de duas sequências complementares de 19 nucleotídeos em orientação invertida, desemparelhados por um espaço de 1 par de bases específicas de RNA mensageiro, resultando na inibição da expressão gênica na fase de tradução ou dificultando a transcrição de genes específicos. O resultado final é a diminuição da expressão da proteína alvo que, nessa proposta, é a CD73.

**[056]** Apesar da tecnologia do siRNA ser muito promissora, a sua utilização na clínica esbarra em alguns fatores como a dificuldade em acessar o sistema nervoso central devido as limitações impostas pela barreira hematoencefálica e a degradação das sequências siRNA por nucleases endógenas.

**[057]** Como forma de contornar tais problemas, as sequências de siRNA podem ser administradas localmente, via injeções intracerebrais/intratumorais, via nasal ou sistemicamente, via intravenosa, utilizando sistemas lipossomais ou nanoemulsões como carreadores de dispensação. Tais formulações interagem eficientemente com siRNA, formando complexos que potencialmente cruzam as barreiras celulares e hematoencefálica e facilitam a liberação sítio direcionada, a captação celular e a interação com o alvo intracelular das sequências siRNA.

**[058]** Além disso, a utilização de vetores não-virais como os lipossomas ou nanoemulsões tem sido considerada uma alternativa mais atrativa quando comparada aos vetores-virais, devido a aspectos de biossegurança.

**[059]** Resumidamente, a presente invenção apresenta uma composição em escala nanométrica, contendo lipossomas ou uma nanoemulsão contendo filamentos de RNA de interferência específicos (siRNA), capazes de silenciar o gene NT5E (gene ID: 4907; 5'-nucleotidase-ecto; *Homo sapiens*); ou o Nt5e (gene ID: 58813; 5' nucleotidase, ecto; *Rattus norvegicus*). Esse gene, mais especificamente ID:4907, é o responsável pela expressão da proteína de adesão e enzima geradora de adenosina ecto-5'nucleotidase/CD73 (CD73), a qual se encontra superexpressa no glioblastoma humano e em outros tipos de tumores.

**[060] Efeitos do siRNA-CD73 na progressão do glioma *in vitro***

**[061] Cultura de Células e Linhagem Celular:** As linhagens celulares de glioma (C6 e U87MG) foram obtidas da ATCC (American Type Cell Collection, USA) e foram cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), um meio de cultura estéril que contém glicose, L-glutamina e bicarbonato de sódio, 5% e 10% de soro fetal bovino (SFB), respectivamente, em incubadora de células a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>/95% umidade, de acordo com protocolo padrão de manutenção de cultivos celulares.

**[062]** Culturas primárias de astrócitos foram preparadas do zero. O córtex de ratos Wistar recém-nascidos (1-2 dias de idade) foram removidos e dissociados mecanicamente numa solução salina equilibrada livre de Ca<sup>+2</sup> e de Mg<sup>+2</sup> (pH 7,4), contendo 137 mM de NaCl, 5,36 mM de KCl, 0,27 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,1 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, e 6,1 mM de glicose. Após centrifugação a 1000 g durante 5 min, o sedimento foi ressuspensão em meio de cultura (pH 7,6) contendo 1% de DMEM, 8,39 mM do tampão HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico) (pH 7,6), 23,8 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 0,1% de fungizona® (Anfotericina B, antifúngico), 0,032% do antibiótico garamicina e 10% de SFB. As células foram semeadas a uma densidade de 1,5 x 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> em

placas de 24 poços pré-tratadas com poli-L-lisina. As culturas também foram mantidas em 5% de CO<sub>2</sub>/95% de ar a 37°C. Posteriormente, as células foram tratadas com adenosina 5'-( $\alpha,\beta$ metileno)-difosfato (AMPCP, Sigma, USA), um inibidor seletivo da CD73 e utilizado para estudar a regulação de sinalização adenosinérgica através dessa proteína. O AMPCP foi dissolvido em água a uma concentração de 100 mM (solução estoque) e posteriormente diluído em DMEM 5%/SFB para obter as concentrações de uso (1, 10 e 100  $\mu$ M). As células de glioma C6 ( $2 \times 10^4$  células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços. Após 24 h, as culturas foram tratadas com AMPCP por 48 h. Controles foram expostos apenas ao meio DMEM 5%/SFB.

**[063]** Após o tratamento com AMPCP, o meio foi removido, as células foram lavadas com solução tampão PBS (*phosphate buffered saline*, solução contendo NaCl e NaHPO<sub>4</sub>), tripsinizadas com 200  $\mu$ L de 0,25% solução de tripsina e contadas em câmara de Neubauer. Tratadas as células, foram feitos ensaios de atividade enzimática, viabilidade celular e imunocitoquímica para a CD73, de forma a determinar a confiabilidade dos testes com os complexos NE/siRNA ou dos complexos Lipofectamine<sup>®</sup>/siRNA.

**[064]** A atividade enzimática das células C6 e U87MG foi determinada em um meio de incubação (2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 120 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 10 mM de glucose, 20 mM de HEPES [pH 7.4], e 2 mM de AMP [adenosina monofosfato]) a 37°C por 10 min, onde o fosfato inorgânico liberado pela ação da CD73 foi dosado e a concentração de proteínas foi avaliada pelos métodos do verde de malaquita e Coomassie Blue, respectivamente. A atividade específica foi expressa como  $\mu$ mol Pi liberado/min/mg proteína.

**[065]** Para avaliar a sensibilidade do glioma a temozolomida, as células U87MG foram tratados com APCP (100  $\mu$ M) por 72 h ou o silenciamento da CD73 foi realizado utilizando a sequência siRNA-CD73-441. Posteriormente, as células foram expostas a uma curva de concentração de TMZ (12,5, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000  $\mu$ M) por 72 h adicionais. As células de controle foram tratadas com veículo (DMSO 0,01%). A viabilidade celular foi determinada

usando o método MTT, conforme descrito abaixo. Células tratadas com somente o veículo DMSO, APCP ou siRNA-CD73 foram considerados controles. O valor de IC<sub>50</sub> foi definido como a concentração do medicamento que inibia 50% da viabilidade celular quando comparado com o controle não tratado.

**[066]** No ensaio de viabilidade celular 5x10<sup>3</sup> células de glioma C6 ou astrócitos primários por poço foram expostos aos complexos NE/siRNA; células de glioma humano U87MG foram expostas aos complexos Lipofectamine®/siRNA-CD73-441 e após 48 horas a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT, um ensaio colorimétrico onde um composto tetrazólico de cor amarela é reduzido a formazan de cor roxa em células vivas.

**[067]** No ensaio de imunocitoquímica para a CD73, culturas de glioma (C6 ou U87MG) foram fixadas em solução de acetona/formalina e lavadas 3 vezes por 10 min cada com PBS. As células foram incubadas com a solução de bloqueio (7% SFB preparado em PBS contendo 0.2% Tween-20 [polisorbato, surfactante não iônico]) por 45 min a temperatura ambiente. Após, as células foram incubadas por 90 min com o anticorpo primário policlonal rabbit anti-rat CD73 (glioma C6) ou rabbit anti-human CD73 (glioma U87MG) (1:1000) diluído em 7% SFB preparado em PBS contendo 0.2% Tween-20. As células foram então incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com FITC (anticorpos purificados por afinidade com uma especificidade bem caracterizada, proporcionando uma maior sensibilidade através da amplificação do sinal, uma vez que múltiplos anticorpos secundários podem ligar-se a um único anticorpo primário; conjugado isotiocianato de fluoresceína; 1:1000) por 60 min a temperatura ambiente. As imagens foram capturadas usando uma câmera digital acoplada a um microscópio.

**[068]** A expressão de CD73 em células de glioma U87MG foi avaliada por citometria de fluxo usando anticorpo primário rabbit anti-human CD73 (1:100; <http://ectonucleotidases-ab.com>). Resumidamente, as células foram incubadas por 60 min com o anticorpo primário preparado em tampão PFA (PBS, 1% de

FBS, 0,1% de azida de sódio) seguido de 30 min de incubação com anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com FITC (1:100; Kirkegaard Perry Laboratories, EUA) com um mínimo de duas lavagens com PFA após cada incubação. A fluorescência da superfície celular foi determinada em um citômetro de Fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, Califórnia, EUA). Os dados foram expressos como expressão de CD73 taxa (%) = (intensidade média de fluorescência (MFI) das células tratadas /IFM de controle) × 100%.

**[069]** Para o ensaio de migração, células de glioma U87MG foram semeadas em e as células foram expostas aos complexos Lipofectamine®/siRNA-CD73-441. Após 72 h, uma ferida de monocamada celular foi realizada com uma pipeta P200 em condições reduzidas de SFB (DMEM/0,5% de SFB). Células controle foram expostas a DMEM/0,5% FBS ou GFP-siRNA. Após 0, 6, 12 e 24 h da realização da lesão na monocamada de células, as imagens foram capturadas usando um microscópio invertido (ampliação de × 4) conectado a uma câmera digital (Olympus BX-50, Tóquio, Japão). A migração celular foi determinada medindo a largura da ferida dividida por dois e subtraindo esse valor da distância inicial de meia largura da ferida. Os dados foram expressos como a porcentagem de migração em comparação com as células tratadas com DMEM / 0,5% de FBS ou GFP-siRNA.

**[070]** Para o ensaio de proliferação celular utilizando contagem de células, as células de glioma U87MG foram semeadas em DMEM/10% de FBS em placas de 12 poços. Após o tratamento com os complexos Lipofectamine®/siRNA-CD73-441 o meio foi removido; as células foram destacadas com solução de tripsina a 0,25% (Gibco BRL, Carlsbad, EUA) e contadas com exclusão de tripano azul. Os dados foram expressos como a porcentagem da taxa de inibição da proliferação em comparação com Células tratadas com DMEM/10% de FBS ou GFP-siRNA.

**[071] Desenvolvimento de sequências siRNA para proteína de adesão e enzima formadora de adenosina ecto-5'NT/CD73:**

**[072]** As sequências do DNA que codificam a CD73 (gene ID:4907, *Homo sapiens*; gene ID: 58813, *Rattus norvegicus*) foram selecionadas para realizar o design de sequências siCD73. Todas as sequências desenhadas foram avaliadas pelo BLAST (NCBI) a fim de confirmar a homologia específica com o gene alvo.

**[073]** Oligonucleotídeos sintéticos sense e antisense constituíram o molde para a geração de uma sequências de RNA de interferência compostas por duas sequências de 19 nucleotídeos em orientação invertida, desemparelhados por um espaço de 1 par de bases, definidas de acordo com as SEQ ID No: 1, SEQ ID No:2 e SEQ ID No: 3. Como controles do siRNA foram utilizadas sequências *scramble* ausentes na base de dados do genoma de humanos, ratos ou camundongos.

siRNA	Sequências	
<b>GFP</b> (scramble)	<i>Sense</i>	5'[Phos]rCrArGrGrCrUrArCrUrUrGrGrArGrUrGrUrArUdTdT3'
	<i>Antisense</i>	[Phos]rArUrArCrArCrUrCrCrArArGrUrArGrCrCrUrGdTdT3'
<b>961</b> SEQ ID No:1	<i>Sense</i>	5'[Phos]rGrCrCrArUrCrArArArGrCrArGrArCrArUrUrArArC3'
	<i>Antisense</i>	5'[Phos]rUrArArUrGrUrCrUrGrCrUrUrUrGrArUrGrGrCrUrG3'
<b>980</b> SEQ ID No:2	<i>Sense</i>	5'[Phos]rArCrCrArGrUrGrGrArGrGrArUrArArArUrUrArG3'
	<i>Antisense</i>	5'[Phos] rArArUrUrUrUrArUrCrCrUrCrCrArCrUrGrGrUrUrA3'
<b>441</b> SEQ ID No: 3	<i>Sense</i>	5'[Phos] rGrGrGrGrCrCrArCrUrArGrCrArUCrUrCrArArU 3'
	<i>Antisense</i>	5'[Phos] rUrUrGrArGrArUrGrCrUrArGrUrGrGrCrCrCrUrU 3'

TABELA 1

**[074] Preparo e caracterização das nanoemulsões (NE):**

**[075]** NE compostas de 8% (w/w) de triglicerídeos de cadeia média, 2% (w/w) de lecitina de ovo, 0,132% (w/w) de DOTAP (N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilammonio-metilsulfato, um agente de transfecção lipossomal),

2,25% (w/w) de glicerol e água para completar 100% (w/w) foram preparadas através de emulsificação espontânea. Resumidamente, uma solução etanólica contendo os componentes da fase oleosa foi lentamente adicionada à fase aquosa contendo glicerol sob agitação moderada. O excesso da mistura de solventes (etanol/água) foi removido sob pressão reduzida a 50°C até alcançar o volume final desejado (5 mL). A concentração final de lipídeo catiônico foi de 2 mM, conforme previamente otimizado.

**[076] Preparo e caracterização dos complexos NE/siRNA:**

**[077]** A adsorção das sequências siRNA-GFP, siRNA-CD73-961, siRNACD73-980 ou siRNA-CD73-441 nas NE catiônicas foi realizada ao final do processo de produção das NEs, resultando na formação dos complexos NE/siRNA-GFP, NE/siRNACD73-961 ou NE/siRNA-CD73-980. Concentrações crescentes de NE foram adicionadas a soluções aquosas de sequências siRNA (1 µM – concentração final) e incubadas durante 15 min a temperatura ambiente.

**[078]** NE foram escolhidas como vetores não-virais para a entrega das sequências siRNA-CD73 em alvos específicos. Após a adsorção das sequências siRNA-CD73 nas NE catiônicas, as propriedades físico-químicas dos complexos foi determinada (Tabela 2).

**[079]** Os complexos foram preparados em três relações de carga +/- distintas (+0.1/-; +0.5/-, +2/- e +4/-). As relações de carga foram calculadas entre o número de cargas positivas do lipídeo catiônico presente na NE e o número de cargas negativas dos grupamentos fosfato das sequências siRNA).

**[080]** O tamanho médio de partícula, o potencial zeta e o índice de polidispersão (PDI) foram determinados por espectroscopia de correlação de fóton e por mobilidade eletroforética (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instrument, UK), a 20°C. O complexo foi adequadamente diluído em água para as determinações de tamanho e PDI ou em solução de NaCl 1 mM para as medidas de potencial zeta.

**[081]** A morfologia dos complexos NE/siRNA também foi avaliada conforme descrito acima. O tamanho médio de partícula da NE variou entre 249,9 a

526,52 nm e o PDI variou de 0,1 a 0,6. Os valores de potencial zeta dos complexos NE/siRNA foram menores que zero, resultando em variações no tamanho de partícula entre as preparações. De uma forma geral, as características apresentadas pelas formulações estão em acordo com outros sistemas de NE reportados na literatura.

**[082]** O índice de polidispersividade tende a aumentar com a adição de siRNA à nanoemulsão, sugerindo uma desestabilização do sistema em taxas de carga menores, e os valores foram próximos de 0,2 apenas para os complexos NE e +4/-, indicando uma distribuição homogênea desses sistemas.

siRNA	Relação de Carga	Diâmetro Médio (nm)	Potencial Zeta (mV)	Índice de Polidispersão
<b>NE</b>	–	188.48 ± 25.60	45.5 ± 5.13	0.1412 ± 0.059
<b>NE/siRNA-GFP</b>	+0.1/-	348 ± 12.26	-42.1 ± 4.12	0.302 ± 0.074
	+0.5/-	323.5 ± 105	-32.4 ± 10.14	0.427 ± 0.154
	+2/-	294.5 ± 15.05	-21.5 ± 9.19	0.201 ± 0.024
	+4/-	289.3 ± 13.2	+ 4.8 ± 4.3	0.25 ± 0.10
<b>NE/siRNA-961</b>	+0.1/-	526.52 ± 82.99	-43.69 ± 9.30	0.67 ± 0.07
	+0.5/-	350.46 ± 80.41	-34.98 ± 17.61	0.54 ± 0.14
	+2/-	272.1 ± 6.724	-32.5 ± 0.96	0.236 ± 0.051
	+4/-	262.7 ± 12.8	+ 3.5 ± 3.0	0.23 ± 0.11
<b>NE/siRNA-980</b>	+0.1/-	414.8 ± 106.8	-41.7 ± 3.38	0.646 ± 0.093
	+0.5/-	307.4 ± 66.62	-26.7 ± 3.98	0.419 ± 0.175
	+2/-	249.9 ± 16.33	-25.9 ± 8.44	0.164 ± 0.036
	+4/-	273.9 ± 13.6	+ 0.5 ± 2.7	0.19 ± 0.08
<b>NE/siRNA-441</b>	+0.1/-	601.9 ± 28.6	+0.55 ± 0.19	- 26.5 ± 5.9
	+0.5/-	510.0 ± 54.1	+0.42 ± 0.14	- 20.7 ± 4.1
	+2/-	392.7 ± 19.1	0.38 ± 0.09	- 2.9 ± 1.2
	+4/-	273.9 ± 13.6	0.19 ± 0.08	+ 0.5 ± 2.7

Tabela 2

**[083]** Para estudos de adsorção, os complexos NE/siRNA-CD73 foram preparados em duas relações de cargas distintas (+0.1/-; +0.5/-) e a microscopia eletrônica de transmissão foi realizada (Figura 3). A análise revelou que as gotas oleosas com aparência típica de emulsão óleo/água apresentam gotas de tamanho aproximado de 250-500 nm, de acordo com a caracterização físico-química. Interessantemente, os complexos NE/siRNA-CD73 mostraram elevada densidade eletrônica na interface (Figura 3, quadros C-H). É bem estabelecido que oligonucleotídeos interagem com acetato de uranila, resultando em regiões de sombreamento escuro. Esses dados indicam que as sequências siRNA-CD73 foram adsorvidas na interface da NE.

**[084]** A avaliação qualitativa da eficiência da complexação do siRNA foi realizada usando um ensaio de retardo em gel de agarose. Esse ensaio se baseia no princípio da eficiência de ligação quando do siRNA ao DOTAP na interface da NE, quanto maior a eficiência mais a migração do siRNA através do gel será retardada. Os complexos foram submetidos à eletroforese por 15 min em gel de agarose a 1% e posteriormente corados com SYBR®Gold (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Somente siRNAs de complexos com taxa de carga de +4/- foram completamente retidos no local da aplicação, e a taxa de complexação foi de 80 a 100% para todos os complexos nas taxas de carga +2/- e +4/- (dados não mostrados). Portanto, considerando a eficiência da complexação das sequências de oligonucleotídeos, essas taxas de carga (+ 2/- e +4/-) foram aplicadas nos experimentos subsequentes em experimentos *in vivo*.

**[085] Procedimentos de transfecção celular:**

**[086]** Transfecção é o processo de introdução intencional de ácido nucleico nas células. A transfecção do glioma C6 ou U87MG com sequências siRNA (siRNA-GFP, siRNA-CD73-961, siRNA-CD73-980 ou siRNA-CD73-441) foi realizada utilizando Lipofectamine® (Lipofectamine RNAiMax, Invitrogen), um agente de transfecção utilizado para aumentar especificamente a eficiência da lipofecção de RNA, em culturas de glioma C6 ou U87MG semeadas em placas

de 24 poços e com aproximadamente 70% de confluência de acordo com as instruções do fabricante.

**[087]** Para a transfecção das células C6 com os complexos NE/siRNA, os complexos foram preparados conforme descrito acima e as células de glioma C6 foram transfectadas utilizando o protocolo direto e reverso. Para o protocolo direto,  $2 \times 10^4$  de células C6 foram semeadas em placas de 24 poços e a mistura de transfecção foi preparada e adicionada as células no dia seguinte ao do semeio. Para o protocolo reverso, os complexos foram preparados dentro do poço da placa de cultivo de 24 poços e, após,  $2 \times 10^4$  células de glioma C6 em meio de cultivo foram adicionadas. As células C6 foram expostas aos complexos por 24, 48 ou 72 h.

**[088] Efeitos do siRNA-CD73 na progressão do glioma *in vivo***

**[089] Modelo pré-clínico de glioma e silenciamento do gene CD73 *in vivo*:** As células de glioma C6 foram mantidas em cultura até atingirem aproximadamente 90% de confluência. Posteriormente as células foram preparadas e um total de  $10^6$  células em 3  $\mu$ L de DMEM/10% de SFB foi injetado no estriado direito, a uma profundidade de 6,0 mm (coordenadas em relação ao bregma, 3,0 mm lateral e 0,5 posterior), de ratos Wistar machos (250-300 gramas, 8 semanas de idade) anestesiados por administração intraperitoneal de cetamina e xilazina. Cinco dias após a implantação do glioma, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: (1) Controle (tratado com PBS); (2) *Scramble*-GFP-siRNA (complexos de GFP siRNA/nanoemulsão na razão de carga +4/-1), este grupo representa um controle negativo mais refinado do experimento, pois são utilizadas sequências embaralhadas de siRNA; e (3) NE/siRNA-CD73-980 (complexos de CD73 siRNA em nanoemulsão na razão de carga de +4/-). As formulações foram administradas por via nasal a cada 12h, em doses de 10  $\mu$ g/kg durante 15 dias.

**[090]** No final do protocolo (20 dias após a implantação do glioma), os animais foram eutanasiados e os cérebros foram removidos, seccionados e congelados. O tecido congelado foi posteriormente corado com hematoxilina e

eosina, e pelo menos 3 cortes de cada animal foram analisados por um patologista cego para o experimento. Para quantificação do tamanho do tumor, as imagens dos 3 cortes de cada cérebro foram capturadas usando uma câmera digital conectada ao microscópio (Olympus BX-51, Tóquio, Japão) e a área do tumor ( $\text{mm}^2$ ) em cada fatia foi determinada usando o software ImageJ. Para o cálculo do volume tumoral ( $\text{mm}^3$ ) presente em cada fatia, a área calculada ( $\text{mm}^2$ ) foi multiplicada pela espessura (mm) de cada corte. O volume tumoral total foi obtido a partir da soma do volume tumoral presente em cada uma das 3 fatias. Os dados foram expressos como  $\text{mm}^3$ .

**[091]** Para análise de imuno-histoquímica, os cortes do tecido foram realizados em criostato na espessura de 5  $\mu\text{m}$ . Para fixação do tecido foi utilizado uma solução contendo 95% de acetona e 5% de formalina, e para o bloqueio de marcações de inespecíficas foi utilizado uma solução contendo 1% de albumina. Para as análises, os cortes foram incubados durante a noite a temperatura de 4°C com os seguintes anticorpos específicos: mAb CD31/PECAM-1 de camundongo anti-rato (1:30, 550300, BD Pharmingen, BD Biosciences, Mountain View, EUA) e CD73 de coelho anti-rato (1:2000; <http://ectonucleotidases-ab.com>). Posteriormente, os cortes foram incubados com os anticorpos secundários fluorescentes Alexafluor 594 anti-camundongo (1:1000, A-21236, Molecular Probes), Alexafluor 488 anti-coelho (1:500, A-11008, Molecular Probes Oregon, EUA) e corados com DAPI (dicloridrato de 4', 6-diamina-2-fenilindole) (1:10.000) por 15 min. Todas as avaliações imuno-histológicas foram realizadas em campos do tumor escolhidos aleatoriamente em um aumento de 200 vezes (Olympus BX-51, Tóquio, Japão).

**[092]** Todos os procedimentos utilizados no presente estudo seguiram os Princípios de Cuidado Animal de Laboratório do NIH e foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (protocolo número 293/14).

**[093]** Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e as análises estatísticas foram realizadas através de Análise da variância (ANOVA)

seguido de post-hoc de Tukey (Prism GraphPad Software, USA), considerando  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo.

#### **[094] EXEMPLOS**

**[095] Exemplo 1 – O Inibidor seletivo da ecto-5'-NT/CD73, AMPCP, diminui a proliferação celular de glioma C6:**

**[096]** Foi analisada a atividade da ecto-5'-nucleotidase/CD73 em células de glioma C6 comparativamente com astrócitos, o qual foi utilizado como modelo de célula não-transformada.

**[097]** Ao contrário dos astrócitos, glioma C6 apresentou uma elevada atividade AMPásica ( $0,013 \pm 0,001$  versus  $0,12 \pm 0,01$   $\mu\text{mol Pi/min/mg}$  de proteína, para astrócitos e células C6, respectivamente; Figura 1, quadro A), a qual foi acompanhada por uma elevada expressão da ecto-5'-nucleotidase/CD73 na superfície das células tumorais (Figura 1, quadro B).

**[098]** Assim, foi avaliado o quanto o inibidor seletivo da ecto-5'-nucleotidase/CD73, AMPCP, poderia afetar a proliferação das células de glioma C6. As células foram expostas a concentrações crescentes de AMPCP (1, 10 e 100  $\mu\text{M}$ ) e após 48 h a proliferação celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Em paralelo, a atividade da enzima ecto-5'-nucleotidase/CD73 foi analisada através da medida da hidrólise do AMP até adenosina (ADO) pelo método do verde de malaquita.

**[099]** O tratamento do glioma C6 com AMPCP (100  $\mu\text{M}$ ) resultou em um decréscimo de 30% da proliferação celular quando comparadas ao controle (Figura 1, quadro C). Além disso, o tratamento com 10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  de AMPCP reduziu a hidrólise de AMP em 40 e 50%, respectivamente (Figura 1, quadro D).

**[100]** Esses dados indicam que a CD73 é superexpressa em gliomas e que a sua inibição farmacológica é importante para reduzir a proliferação das células tumorais.

**[101] Exemplo 2 – Novas sequências siRNA-CD73 são eficientes em reduzir a expressão ecto-5'-nucleotidase/CD73 em células de glioma:**

**[102]** Como o aumento da expressão da ecto-5'-nucleotidase/CD73 é um fator positivo para o desenvolvimento tumoral, incluindo o glioblastoma (Figura 1), uma segunda concretização foi a constatação de que o silenciamento dessa enzima utilizando a tecnologia do RNA de interferência poderia ser uma estratégia interessante para controlar a progressão dos gliomas.

**[103]** Para essa finalidade, sequências específicas siRNA-CD73 foram desenvolvidas (siRNA-CD73-961 e siRNA-CD73-980; Tabela 1) e sua funcionalidade/especificidade foi avaliada por meio de transfecção das células C6 utilizando Lipofectamine® de acordo com as instruções do fabricante. Após 48 h da transfecção, a expressão e a atividade enzimática da CD73 foram avaliadas por imunocitoquímica e por hidrólise do AMP, respectivamente.

**[104]** Células transfectadas com sequências siRNA-GFP foram utilizadas como controle. Conforme mostrado na Figura 2, as sequências siRNA-CD73 foram eficientes em reduzir a expressão (Figura 2, quadro A) e a hidrólise (Figura 2, quadro B) do AMP quando comparadas ao controle e as células transfectadas com as sequências siRNA-GFP. Além disso, o processo de transfecção *per se* não induziu citotoxicidade nas células.

**[105]** Esses resultados indicam que as sequências siRNA-CD73 desenhadas foram eficientes e específicas em reduzir a expressão e a atividade da CD73 em glioma C6 e foram subsequentemente utilizadas para o desenvolvimento das nanoemulsões (NE).

**[106]** Exemplo 3 – Complexos NE/siRNA não são citotóxicos para cultura de astrócitos primários:

**[107]** Considerando que as NE catiônicas têm sido associadas à toxicidade em sistemas biológicos, o protocolo de transfecção em glioma C6 foi otimizado com o objetivo de equalizar elevada taxa de transfecção e baixa toxicidade.

**[108]** Para essa finalidade, complexos NE/siRNA-GFP foram preparados em três relações de carga distintas (+0.1/-; +0.5/-; +2/-) e as células C6 foram transfectadas utilizando os protocolos direto e reverso, conforme descrito em

materiais e métodos. Após 24, 48 e 72 h de exposição, a viabilidade celular foi determinada por MTT (Figura 4, quadros A-F).

**[109]** A transfecção direta resultou em 50% de toxicidade em glioma C6 após 48 e 72 h de exposição com os complexos quando comparado as células não-tratadas (Figura 4, quadros A-C). Para a transfecção reversa, a exposição das células C6 aos complexos NE/siRNA-GFP nas relações de carga +0.1/- e +0.5/- por 48 h não alterou a viabilidade celular (Figura 4, quadro E), enquanto a exposição por 72 h resultou em 50% de toxicidade para as relações de carga +0.5/- and +2/- (Figura 4, quadro F). Em conjunto, esses dados indicam que o protocolo de transfecção reversa resultou em menor toxicidade quando comparado ao protocolo direto. Então, os complexos NE/siRNA-GFP em duas relações de carga (+0.1/-; +0.5/-) e o protocolo reverso por 48 h de exposição foi utilizado nos experimentos subseqüentes.

**[110]** Finalmente, a toxicidade dos complexos NE/siRNA também foi avaliada em astrócitos, um modelo de célula glial não-tumoral. Astrócitos foram expostos aos complexos NE/siRNA-GFP (+0.1/-; +0.5/-) por 48 h e a viabilidade celular foi determinada por MTT. Notavelmente, os complexos não promoveram toxicidade para os astrócitos quando comparados ao controle, indicando a segurança das formulações (Figura 5).

**[111] Exemplo 4 – Os complexos NE/siRNA-CD73 são eficientes em silenciar a expressão e a atividade da ecto-5'-nucleotidase/CD73 em glioma C6:**

**[112]** Após a caracterização físico-química e a otimização do protocolo de transfecção, foi analisada a eficácia dos complexos NE/siRNA-CD73-961 e NE/siRNA-CD73-980 em silenciar a CD73 em glioma C6 através de experimentos de imunocitoquímica e de hidrólise de AMP.

**[113]** A expressão da CD73 foi significativamente menor nas células expostas aos complexos NE/siRNA-CD73-961 e NE/siRNA-CD73-980 quando comparadas as células transfectadas com as sequências *scramble* (NE/SiRNA-GFP) (Figuras 6, quadros A e B). Similarmente, a atividade AMPásica foi reduzida nas células silenciadas (redução de 70% e 63% para siRNA-CD73-

961 e siRNA-CD73-980, respectivamente; Figura 6, quadro C). Dessa forma, os complexos NE/siRNA-CD73-961 e 980 foram eficientes e seletivos em silenciar a CD73 em glioma C6.

**[114]** Além disso, a transfecção das células C6 com os complexos NE/siRNA-CD73-961 e 980 na relação de cargas +0.1/- resultou em redução de 20 e 35% da viabilidade celular, respectivamente (Figura 7). De uma forma geral, esses dados sugerem que as NE catiônicas foram eficientes em fazer a entrega das sequências siRNA-CD73 nas células de glioma C6 e que a CD73 é um alvo interessante para o tratamento dos gliomas.

**[115] Exemplo 5 – O tratamento com NE/siRNA-CD73 reduz o crescimento de glioblastoma em modelo experimental *in vivo*:**

**[116]** Conforme descrito anteriormente, as células de glioma foram transplantadas no cérebro dos animais do estudo, e após 5 dias iniciou-se o tratamento com NE/siRNA-CD73-980 por 15 dias adicionais (10 µg/kg; 12/12h). O tratamento com NE/siRNA-CD73-980 reduziu o volume do tumor em 60% ( $58,8 \pm 32,7 \text{ mm}^3$ ) quando comparado aos grupos controle ( $139,8 \pm 33,5 \text{ mm}^3$  e  $139,7 \pm 35,4 \text{ mm}^3$  para o grupo PBS e *Scramble*-GFP-siRNA, respectivamente) (Figura 8 e 9).

**[117] Exemplo 6 – O tratamento com NE/siRNA-CD73 reduz a expressão da CD73 *in vivo* em modelo experimental de glioblastoma.**

**[118]** Para determinar se o efeito antiglioma do NE-siRNA-CD73-980 estava relacionado ao silenciamento *in vivo* da CD73, a expressão da CD73 foi determinada por experimento de imunohistoquímica no tecido tumoral dos animais do grupo controle ou tratados com a NE-siRNA-CD73-980 (Figura 10). Primeiro, é interessante notar a maior expressão de CD73 no volume do tumor quando comparado ao tecido cerebral adjacente. O tratamento com NEsiRNA-CD73-980 levou a uma diminuição da expressão de CD73 em ratos com glioma quando comparados ao controle, confirmando a capacidade da formulação para entregar sequências de CD73 siRNA, resultando no silenciamento de CD73 *in vivo*. Além disso, a análise qualitativa indica uma diminuição de células

positivas para CD31/PECAM-1, o que é sugestivo de diminuição da angiogênese, em animais tratados com NE-siRNA-CD73-980 quando comparados ao controle.

**[119] Exemplo 7** – As sequências siRNA-CD73-441 são eficientes em silenciar a CD73 em linhagem de glioblastoma humano U87MG o que resulta em inibição da proliferação, migração celular e sensibilização a temozolomida.

**[120]** A sequência siRNA-CD73-441 para silenciar a CD73 de humanos foi avaliada quanto a sua eficiência. Os dados apresentados na Figura 11 demonstram que a sequência é eficiente em diminuir a atividade enzimática da CD73 (~90%) e também a expressão proteica.

**[121]** Para avaliar o impacto do silenciamento da CD73 na proliferação celular de glioma U87MG em cultura, as células foram silenciadas utilizando a sequência siRNA-CD73-441 e contadas utilizando câmara de Neubauer. O silenciamento da CD73 resultou em inibição de ~40% da proliferação de células U87MG e o tratamento com ADO restaurou a proliferação nessas células ao nível próximo do controle (Figura 12).

**[122]** A participação de CD73 na quimiorresistência também foi investigada (Fig. 13). As células de glioma U87MG foram tratadas com temozolomida (100 µM) isoladamente ou em combinação com o siRNA-CD73-441. A temozolomida reduziu a viabilidade celular em 20%, em média, no glioma previamente silenciado para CD73. Em conjunto, esses dados indicam que a inibição de CD73 potencializa a citotoxicidade da TMZ em células de glioblastoma humanas.

**[123]** O ensaio de migração indica que a adenosina induziu uma migração sustentada de células de glioma U87MG durante as 24 horas de análise. O silenciamento da CD73 utilizando a sequência siRNA-CD73-441 (Fig. 14) prejudicou a migração de células de glioma, enquanto que o tratamento com adenosina promoveu a recuperação do potencial migratório das células de glioblastoma.

[124] O depositante, ao depositar este pedido de patente perante o órgão competente/garante, busca e pretende: (i) nomear os inventores em respeito a seus respectivos direitos morais; (ii) indicar inequivocamente que é possuidor do segredo industrial e titular de qualquer forma de propriedade intelectual que dele derivar e o depositante desejar; (iii) descrever em detalhes o conteúdo objeto do segredo, comprovando sua existência nos planos físico e jurídico; (iv) estabelecer a relação entre os exemplos/concretizações e o conceito inventivo segundo a cognição do depositante e seu contexto, para demonstrar com clareza o alcance de seu bem intangível tutelado e/ou tutelável; (v) requerer e obter os direitos adicionais previstos para as patentes, se o depositante optar por prosseguir com o procedimento administrativo até o final.

[0090] Desde logo adverte-se que eventual uso comercial requer autorização do possuidor/titular e que o uso não autorizado enseja sanções previstas em Lei. Neste contexto, dado o amplo detalhamento segundo o qual o conceito e os exemplos foram revelados pelo depositante, os versados na arte poderão, sem muito esforço, considerar outras formas de concretizar a presente invenção de formas não idênticas às meramente exemplificadas acima. Entretanto, tais formas são ou poderão ser consideradas como dentro do escopo de uma ou mais das reivindicações anexas.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica nanométrica na forma de lipossomas ou nanoemulsão que contém filamentos de RNA de interferência **caracterizada** pelo fato de conter as sequências específicas de siRNA:

- SEQ ID NO:1;
- SEQ ID NO:2; ou
- SEQ ID NO:3;

2. Composição farmacêutica nanométrica na forma de lipossomas ou nanoemulsão que contém filamentos de RNA de interferência de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de ser utilizada no tratamento de glioblastoma.

3. Composição farmacêutica nanométrica na forma de lipossomas ou nanoemulsão que contém filamentos de RNA de interferência de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato dos filamentos de RNA de interferência formados pela SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:3 apresentarem uma fita sense e antisense composta por 19 nucleotídeos em orientação invertida, separadas por um espaço de 1 par de base.

4. Composição farmacêutica nanométrica na forma de lipossomas ou nanoemulsão que contém filamentos de RNA de interferência de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3 **caracterizada** por compreender adicionalmente um excipiente farmacologicamente aceitável com capacidade de carrear siRNA SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:3.

5. Composição farmacêutica nanométrica na forma de lipossomas ou nanoemulsão que contém filamentos de RNA de interferência de acordo com as reivindicações 1 e 4, **caracterizada** pelo excipiente farmacologicamente aceitável apresentar-se na forma de um complexo de lipossomas ou nanoemulsão.

6. Composição farmacêutica nanométrica na forma de lipossomas ou nanoemulsão que contém filamentos de RNA de interferência de acordo com as

reivindicações 1, 4 e 5, **caracterizada** pelo fato da nanoemulsão ser composta de 8% (w/w) de triglicerídeos de cadeia média, 2% (w/w) de lecitina de ovo, 0,132% (w/w) de DOTAP (N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilammonio metilsulfato, 2,25% (w/w) de glicerol e água para completar 100% (w/w).

7. Composição farmacêutica nanométrica na forma de lipossomas ou nanoemulsão que contém filamentos de RNA de interferência de acordo com as reivindicações 1, 4, 5 e 6, **caracterizada** pela nanoemulsão passar por um processo de transfecção do RNA de interferência da SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:3.

8. Composição farmacêutica nanométrica na forma de lipossomas ou nanoemulsão que contém filamentos de RNA de interferência conforme a reivindicação 1 e 2, **caracterizada** por ser um medicamento para silenciar genes responsáveis pela expressão de proteínas superexpostas em glioblastoma multiforme.

9. Composição farmacêutica nanométrica na forma de lipossomas ou nanoemulsão que contém filamentos de RNA de interferência de acordo com a reivindicação 1, 2 e 8, **caracterizada** pelo fato do gene silenciado pelas SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2 ser o 58813/NT5E e pela SEQ ID NO:3 ser o gene 4907/NT5E.

10. Composição farmacêutica nanométrica na forma de lipossomas ou nanoemulsão que contém filamentos de RNA de interferência de acordo com as reivindicações 1, 2, 8 e 9, **caracterizada** pelo fato da proteína a ser regulada ser a ecto- 5'-nucleotidase/CD73.

11. Composição farmacêutica nanométrica na forma de lipossomas ou nanoemulsão que contém filamentos de RNA de interferência de acordo com as reivindicações 1 a 10 **caracterizada** por ser administrada na forma de uma injeção intratumoral, parenteral, aerossol, oral, dermal, intradermal, inalação, intramuscular, intranasal, intraocular, intrapulmonar, intravenosa, intraperitoneal, nasal, ocular, ótica, emplastro, subcutânea, sublingual, tópica, ou transdermal.

12. Composição farmacêutica nanométrica na forma de lipossomas ou nanoemulsão que contém filamentos de RNA de interferência de acordo com as reivindicações 1 a 10 **caracterizada** pelo fato de ser utilizada em kits de silenciamento gênico.

13. Uso da sequência de siRNA para CD73 específica **caracterizada** pelo fato de ser composta pela SEQ ID NO:3 e ser usada na preparação de um medicamento para o tratamento de tumores, glioblastoma, esclerose múltipla e sepse.

14. Uso da sequência de siRNA para CD73 específica de acordo com a reivindicação 13 **caracterizada** pelo fato da SEQ ID NO:3 ser administrada ao indivíduo através de um veículo farmacêuticamente aceitável.

15. Uso da sequência de siRNA para CD73 específica de acordo com a reivindicação 13 e 14 **caracterizada** pelo fato do siRNA SEQ ID NO:3 e o veículo farmacêuticamente aceito, serem administrados na forma de uma injeção intratumoral, parenteral, aerossol, oral, dermal, intradermal, inalação, intramuscular, intranasal, intraocular, intrapulmonar, intravenosa, intraperitoneal, nasal, ocular, ótica, emplastro, subcutânea, sublingual, tópica, ou transdermal.

## Figuras

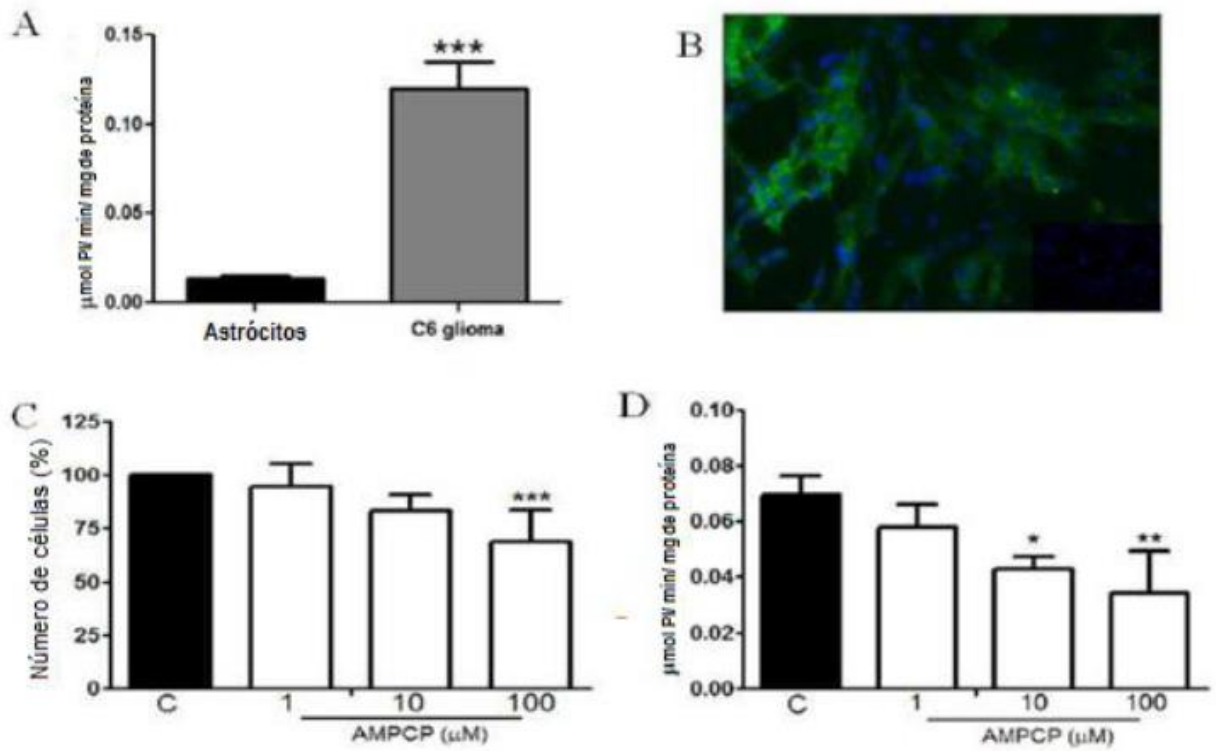


Figura 1

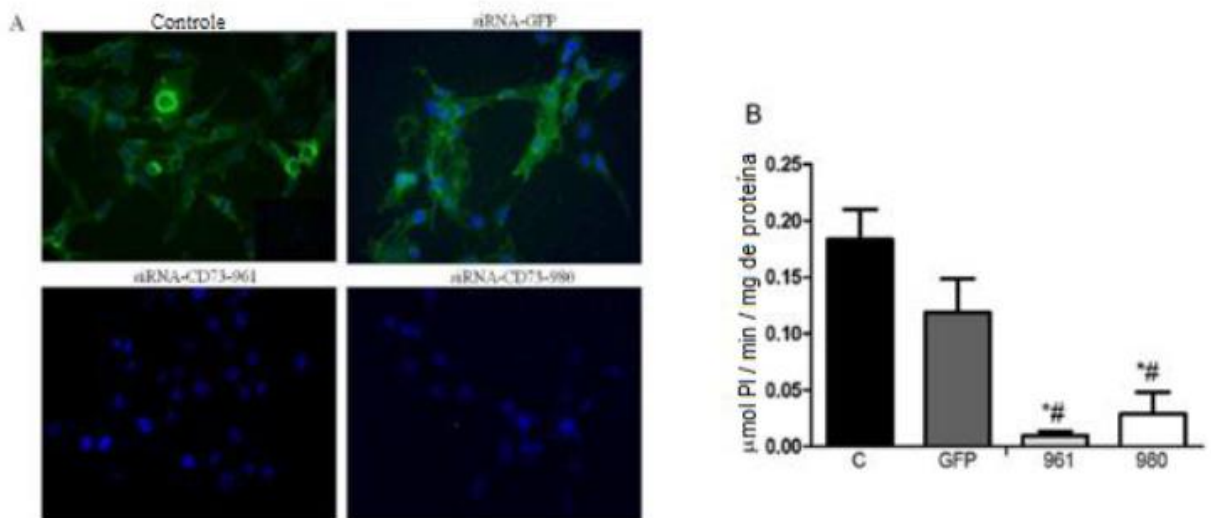


Figura 2

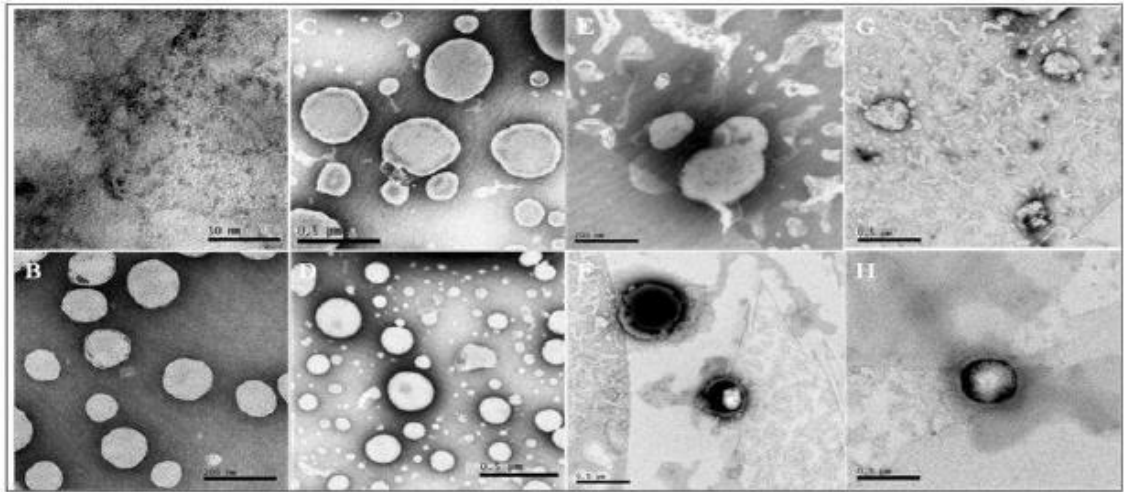


Figura 3

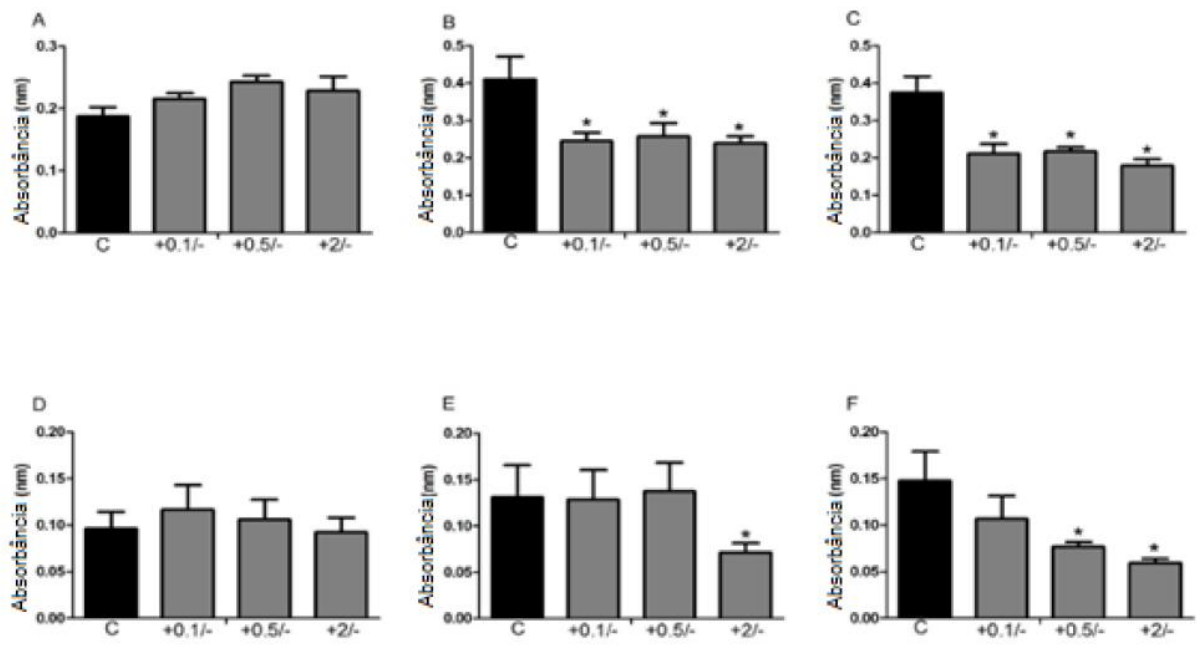


Figura 4

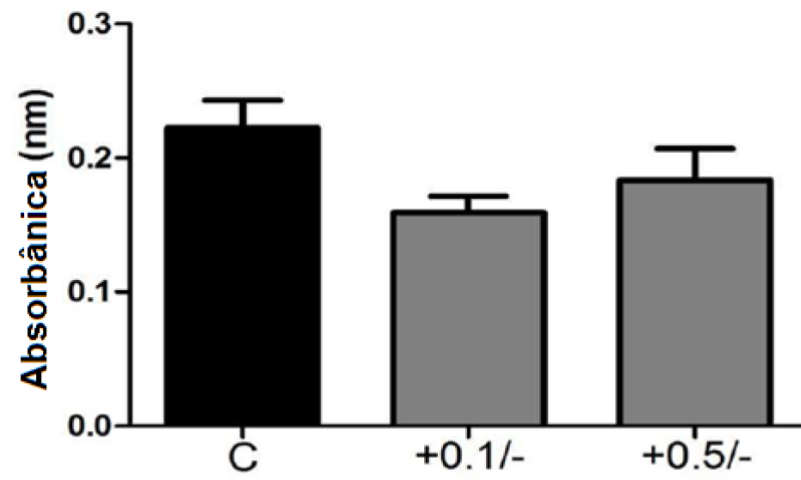


Figura 5

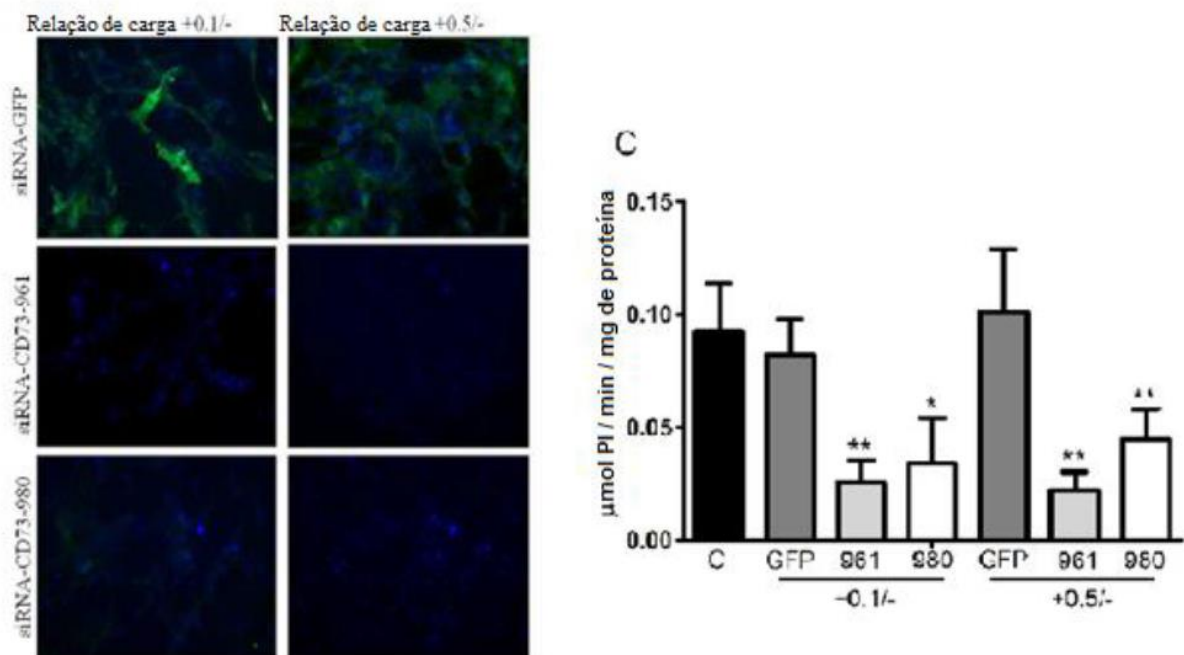


Figura 6

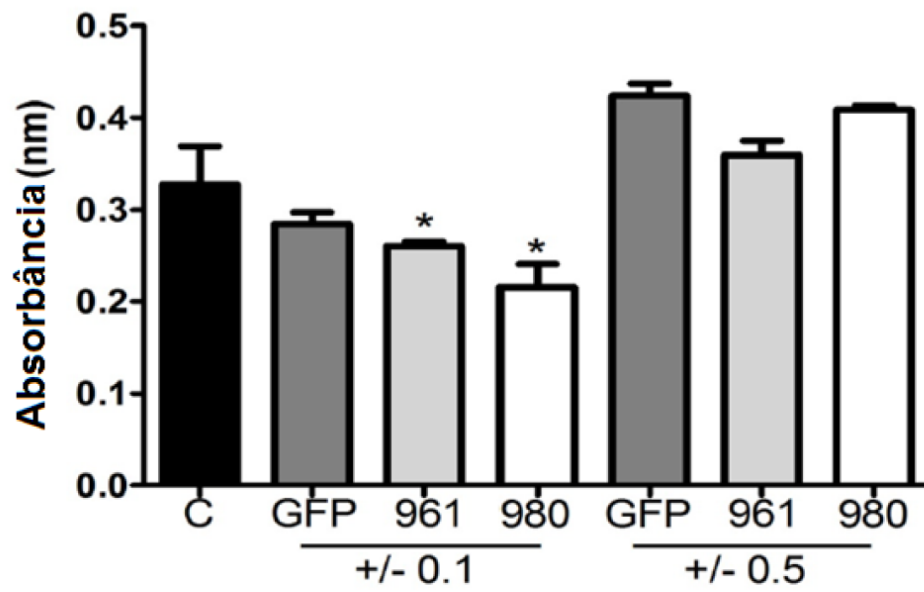


Figura 7

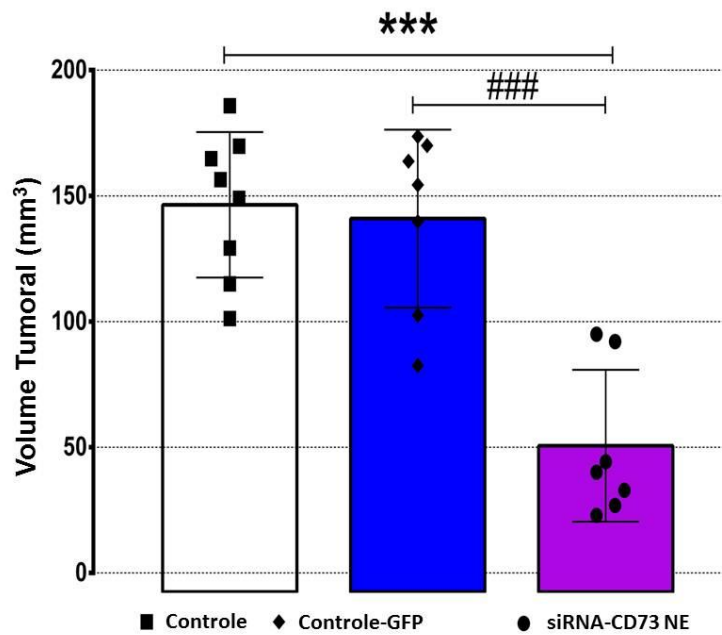


Figura 8

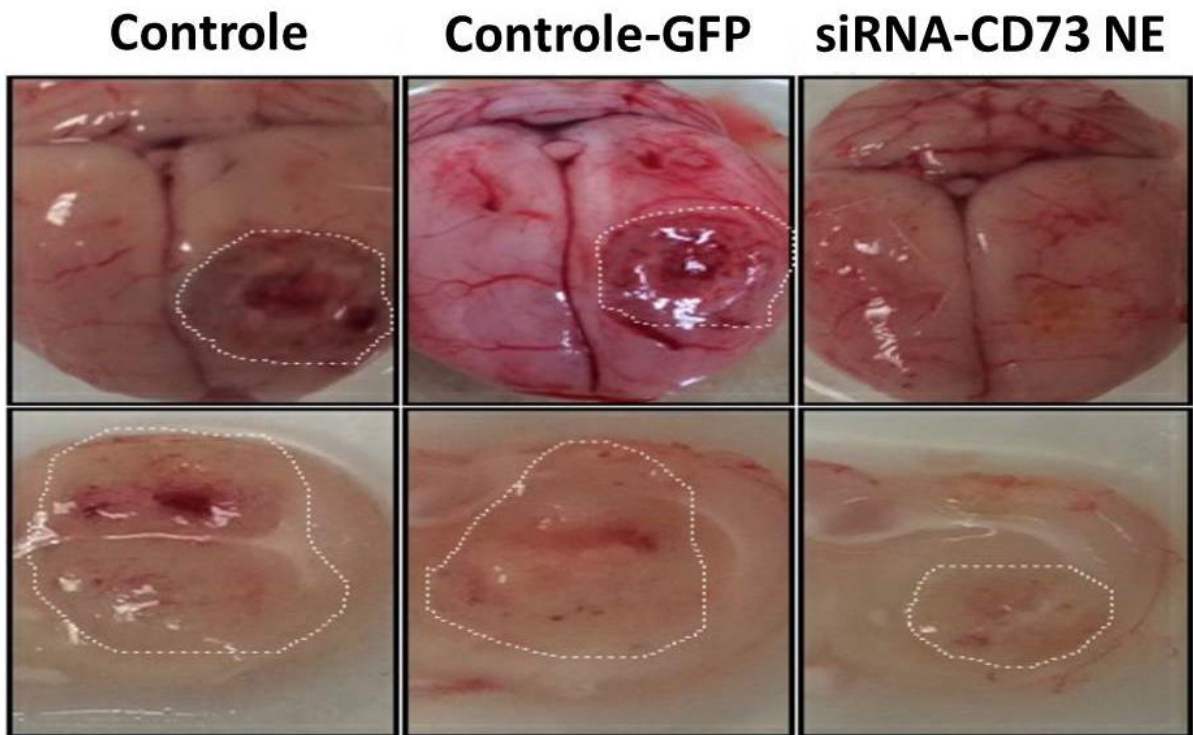


Figura 9

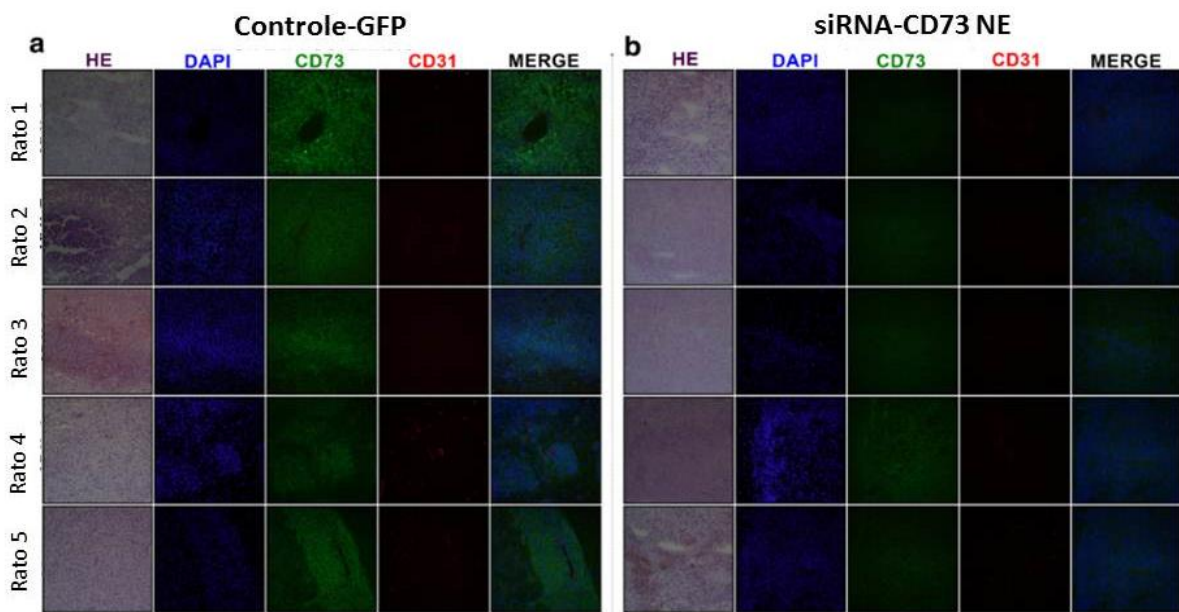


Figura 10

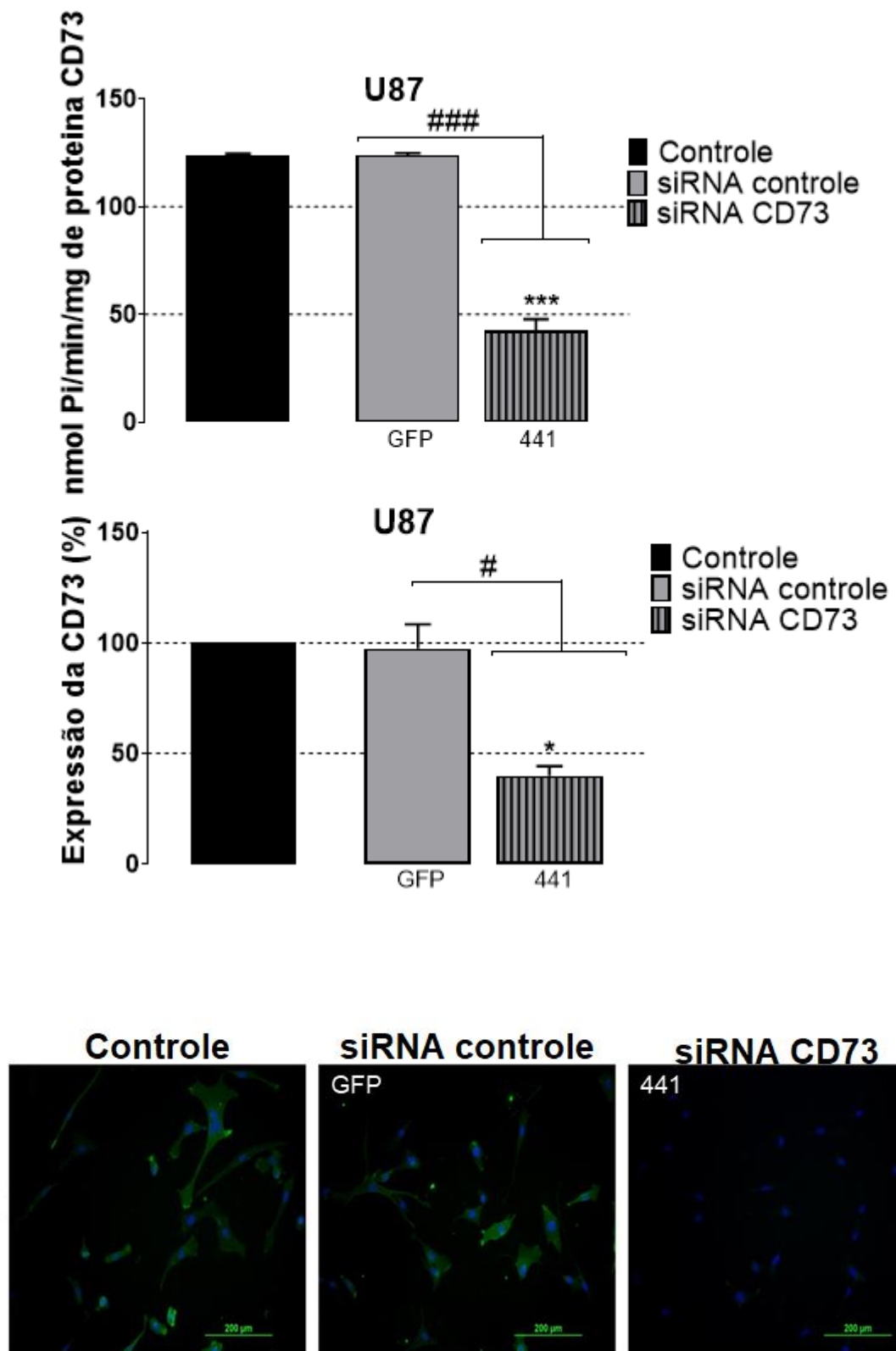


Figura 11

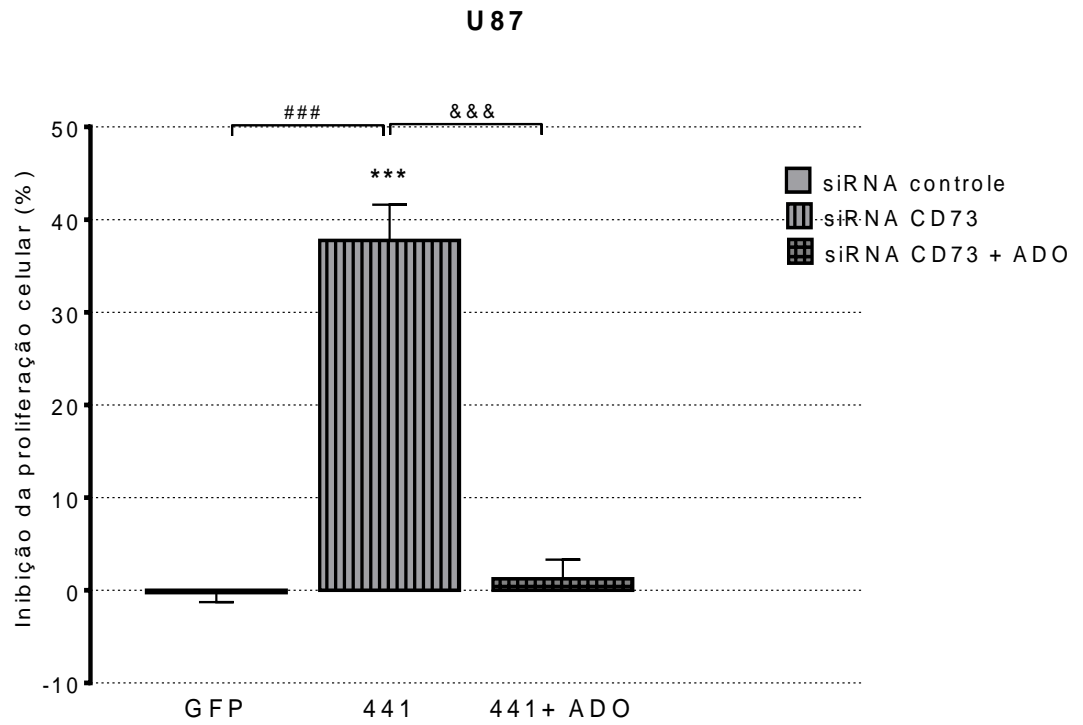


Figura 12

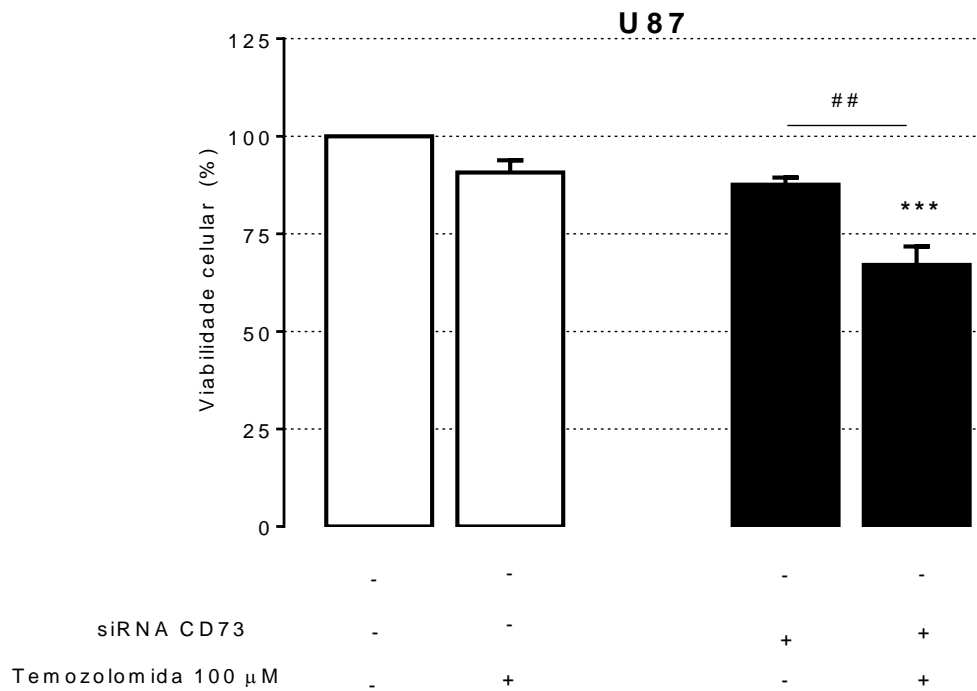


Figura 13

### Migração U87

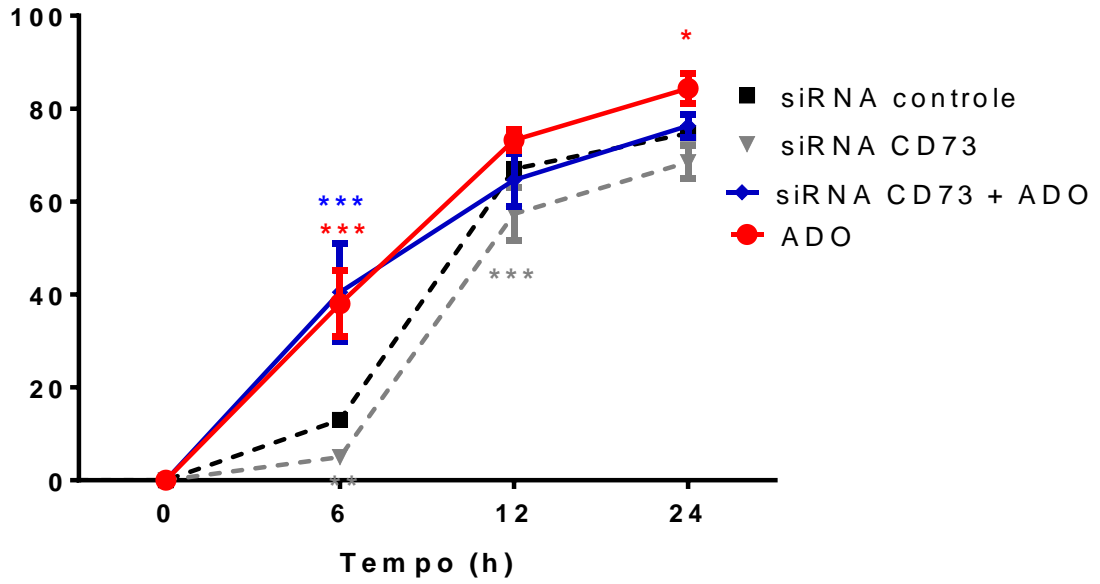


Figura 14

**RESUMO****COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA NANOMÉTRICA NA FORMA DE LIPOSSOMAS OU NANOEMULSÃO QUE CONTÉM SEQUÊNCIAS ESPECÍFICAS DE RNA DE INTERFERÊNCIA**

A presente invenção está inserida nos campos da nanotecnologia, farmácia e genética e refere-se a sequências específicas de RNA de interferência (siRNA), capazes de silenciar o gene responsável pela expressão de uma proteína de adesão, produtora de adenosina extracelular superexpressa em tumores, a enzima ecto-5'-nucleotidase/CD73 (CD73). As sequências específicas de siRNA para a CD73 são propostas em uma composição em escala nanométrica na forma de lipossomas ou nanoemulsões de forma a promover um complexo de liberação sítio-direcionado capaz de ser incorporado a diversos tipos de formulação, como injeção intratumoral, intravenosa ou administração nasal. As sequências siRNA para silenciar a CD73 também poderão ser aplicadas na manufatura de kits e/ou em ensaios de silenciamento da CD73 para a pesquisa científica utilizando lipossomas, nanoemulsões ou outros reagentes de transfecção.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

### Código de Controle

Campo 1



Campo 2



### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: sequência.txt
- Data de Geração do Código: 22/06/2020
- Hora de Geração do Código: 16:54:24
- Código de Controle:
  - Campo 1: 4A2FC426CFDE5E5D
  - Campo 2: D8E8AFDC91214372