



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



(21) BR 102021020831-7 A2

(22) Data do Depósito: 18/10/2021

(43) Data da Publicação Nacional:
25/04/2023

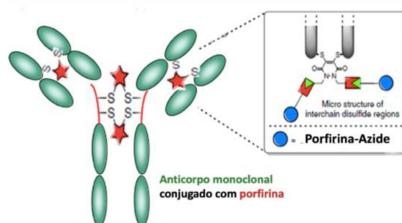
(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FOTOIMUNOCONJUGADOS, FOTOIMUNOCONJUGADOS ASSIM OBTIDOS E USO DOS FOTOIMUNOCONJUGADOS NA PREPARAÇÃO DE UMA FOTOIMUNOTERAPIA PARA O TRATAMENTO DO VÍRUS DO HIV

(51) Int. Cl.: C07K 19/00; C07K 16/10; C07K 14/795; A61N 5/06; A61K 39/21; (...).

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP.

(72) Inventor(es): FRANCISCO EDUARDO GONTIJO GUIMARÃES; MOHAMMAD SADRAEIAN.

(57) Resumo: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FOTOIMUNOCONJUGADOS, FOTOIMUNOCONJUGADOS ASSIM OBTIDOS E USO DOS FOTOIMUNOCONJUGADOS NA PREPARAÇÃO DE UMA FOTOIMUNOTERAPIA PARA O TRATAMENTO DO VÍRUS DO HIV. A presente invenção se insere no campo da fotoimunoterapia viral, e mais particularmente, ela se refere ao Processo de obtenção de fotoimunoconjungados, aos Fotoimunoconjungados assim obtidos e o Uso destes na preparação de uma fotoimunoterapia para o tratamento do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Dita invenção revelou ser capaz de prover uma preparação para matar especificamente as células infectadas pelo HIV no sangue, nos nódulos linfáticos e em tecidos profundos.



**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FOTOIMUNOCONJUGADOS,
FOTOIMUNOCONJUGADOS ASSIM OBTIDOS E USO DOS
FOTOIMUNOCONJUGADOS NA PREPARAÇÃO DE UMA FOTOIMUNOTERAPIA
PARA O TRATAMENTO DO VÍRUS DO HIV**

Campo da invenção:

[001] A presente invenção se insere no campo da fotoimunoterapia viral, e mais particularmente, ela se refere ao Processo de obtenção de fotoimunoconjungados, aos Fotoimunoconjungados assim obtidos e o Uso destes na preparação de uma fotoimunoterapia para o tratamento do vírus da imunodeficiência humana (HIV).

Fundamentos da invenção:

[002] As terapias baseadas em anticorpos vêm se tornando ferramentas clínicas importantes no tratamento de doenças crônicas. Diferentes estratégias imunoterapêuticas, com sucesso limitado, têm sido investigadas para direcionar e eliminar células infectadas por vírus usando anticorpos armados específicos para proteínas virais [1]. Isso pode ser alcançado ligando uma droga aos anticorpos monoclonais (MAbs), para formar imunotoxinas (IT) [2], anticorpos radiomarcados [3,4] ou outros conjugados de ligação celular [5,6] capazes de matar especificamente células infectadas, tais como células infectadas com HIV [1,7]. A fotoimunoterapia (PIT) é uma terapia fotodinâmica direcionada (PDT) que usa MAbs carregados com fotossensibilizador. A PIT tem certas vantagens sobre as imunotoxinas ou RIT para erradicar células infectadas [8]. Na imunoterapia com base em imunotoxinas, um MAb é conjugado a uma toxina imunogênica, como ricina [9], pulchelina [10,11] ou toxina shiga [12], que pode provocar uma imunogenicidade

exemplificada pela resposta antitoxina [3,13]. PIT é um tratamento minimamente invasivo, sendo mais seguro e mais barato do que imunotoxinas ou RIT [14]. Enquanto HIV RIT vem chamando a atenção de pesquisadores [4], não há estudos sobre a possibilidade de tratamento do HIV pelo PIT.

[003] Sendo assim, na presente invenção foi proposta a imunoterapia para HIV armando os anticorpos monoclonais direcionados ao HIV com fotossensibilizadores (PSs). Os imunoconjungados anti-HIV devem ser direcionados a proteína spike que se projeta do envelope do HIV (Env) que consiste de glicoproteínas gp160 [9,15], gp120 [16] e gp41 [11,16]. Fotossensibilizadores ativados via luz visível inicialmente formam o estado excitado singuleto, que pode decair emitindo fluorescência ou, alternativamente, ele atinge o estado de excitado triploto mais estável. [17]. Esse estado triploto pode envolver a transferência de elétron ou hidrogênio via mecanismos fotoquímicos do Tipo I para produzir radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxila (processo de transferência de elétrons), típico de corantes fenotiazínicos [18], ou mecanismos do Tipo II (processo de transferência de energia), típico de porfirinas [19,20] e Rosa de Bengala [21,22]. Espécies reativas de oxigênio (ROS) podem danificar a membrana celular por meio da oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, levando à necrose celular onde as células incham e lisam para liberar seu conteúdo intracelular causando inflamação ou,

alternativamente, as células podem sofrer apoptose [23,24]. O tratamento convencional usando apenas fotossensibilizador e luz é chamado de terapia fotodinâmica (PDT), o qual destrói células de forma não específica quando exposto à luz [23]. Em relação a isso, a fotoimunoterapia (PIT) é a forma alvo de terapia fotodinâmica (PDT) convencional, alcançada através da conjugação de fotossensibilizador (PS) com MAbs visando receptores específicos da superfície celular [14,25]. A fotoimunoterapia (PIT) também pode reduzir outros problemas, tais como toxicidade escura e agregação do fotossensibilizador (PS) em meio aquoso os quais reduzem a eficácia da terapia fotodinâmica (PDT) [14]. A conjugação de um fotossensibilizador aos anticorpos pode ser obtida por meio de modificação química do grupo ε -amino presente nos resíduos de lisina [26] ou através de reações com a fração tiol presente em resíduos de cisteína (gerada por meio da redução de ligações dissulfeto intercadeias). Contudo, nenhuma dessas estratégias de conjugação é ideal [27,28]. A modificação da lisina pode resultar em produtos heterogêneos com uma ampla distribuição de carga de drogas e métodos convencionais de modificação de cisteína utilizam a redução de dissulfeto intercadeia e resultam na perda permanente de ligações dissulfeto estruturais, que foi mostrado impactar potencialmente na função Fc [29] e afetar negativamente a estabilidade do anticorpo *in vivo* [30,31].

[004] Sendo assim, na presente invenção, foram utilizadas modificações de lisina e dissulfeto para identificar um fotoimunoconjungado (PIC) adequado para a fotoimunoterapia (PIT) sugerida. De forma resumida, um anticorpo anti-gp41 humano (7B2) [10,11] foi conjugado com dois fotossensibilizadores diferentes, porfirina catiônica com uma carga líquida de 3+ e IR700 aniônico com uma carga líquida de 4-. Para tanto, foram empregadas duas estratégias diferentes nesse processo para a conjugação ao anticorpo: 1) conjugação de lisina usando o corante ftalocianina IRDye700DX [26] e 2) conjugação de "clique" usando uma porfirina portadora de azida com um alcino ligado por meio de um ligante de ponte dissulfeto [27]. Esses fotoimunocojugados foram caracterizados bioquimicamente e imunologicamente. Posteriormente, esses fotoimunoconjungados foram conjugados com a *Upconversion Nanoparticles* (UCNP), podendo ser ativados por infravermelho (NIR) no tecido profundo, e então convertido o NIR em luz visível, a fim de ativar o fotossensibilizador e consequentemente matar tanto as células-alvo no tecido profundo quanto o próprio vírus.

Estado da técnica:

[005] O documento intitulado "*Photoimmunotherapy Using Cationic and Anionic Photosensitizer-Antibody Conjugates against HIV Env-Expressing Cells*" de 2020 revela parcialmente a presente invenção, a partir dos dados da

ligação de um fotossensibilizador ao anticorpo e tendo como alvo as células transfectadas com HIV. Por outro lado, esse documento apenas revela a conjugação do anticorpo com o PS, enquanto a presente invenção revela o produto final de MAb-PS-UCNP. Adicionalmente, o referido documento apenas revela a conjugação do anticorpo com o PS, sem revelar seu processo, enquanto a presente invenção revela o processo de conjugação entre o do UCNP e MAb-PS e sua aplicação em células transfectadas com HIV e contra o próprio vírus do HIV.

[006] O documento "*Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer*" de 2003 trata de uma revisão endereçando as possibilidades da fotoimunoterapia usando MAb-PS para seletivamente matar tumores. No entanto, o referido documento não demonstra o produto final dessa invenção que é o produto MAb-PS-UCNP, o processo de conjugação de UCNP e MAb-PS assim como sua aplicação dupla em HIV IT e HIV ART.

[007] Já o documento "*Selective cytotoxicity of a novel immunotoxin based on pulchellin A chain for cells expressing HIV envelope*" de 2017 refere-se a um estudo sobre o uso da toxina *Pulchellina* conjugada a um anticorpo como uma imunoterapia anti-HIV. Dita imunotoxina possui apenas a similaridade de utilizar um anticorpo anti-gp41. Por outro lado, a referida imunotoxina tem uma estrutura e construção diferentes daquela do anticorpo e fotossensibilizador da

presente invenção. Portanto, as imunotoxinas têm diferentes mecanismos de citotoxicidade em comparação aos fotoimunoconjugados (PICs). Adicionalmente, a conjugação entre um anticorpo e a referida toxina foi criada por um ligante comercial, chamado SPDP. Já na presente invenção, foi utilizado um ligante diferente, com reações e uma molécula diferentes. Por fim, as imunotoxinas necessitam de internalização na célula para matar as células infectadas com HIV, enquanto na presente invenção, para matar as células-alvo, não é necessária a internalização, sendo suficiente apenas as ligações de superfície da célula para matar não somente as células infectadas com HIV como também o vírus HIV.

[008] Ainda, o documento "*Photosensitizer Antibody-Drug Conjugates: Past, Present, and Future*" de 2019 refere-se a uma revisão enderçando aplicações da fotoimunoterapia. Adicionalmente, são descritas as possíveis estratégias para conjugação entre o anticorpo e fotossensibilizadores, entre elas, a reação química de "clique" entre o anticorpo e a porção porfirina-azida. Embora o referido documento trate da reação de "clique" entre o anticorpo e a porção porfirina-azida, não é revelado o processo de conjugação entre UCNP e MAb-PS; em adição, enquanto a aplicação do fotoimunoconjugado é contra o câncer,

na presente invenção, a aplicação é dupla e direcionada à imunoterapia viral em face do HIV.

[009] O documento intitulado "*In vivo Efficacy of Anti-Glycoprotein 41, But Not Anti-Glycoprotein 120, Immunotoxins in a Mouse Model of HIV Infection*" de 2015 refere-se ao estudo de aplicação de Bio-toxin (exotoxina A de *Pseudomonas*) conjugado com anticorpo anti-gp41 como uma imunoterapia anti-HIV. Mais particularmente, ele explica o uso das imunotoxinas anti-gp41 em combinação com derivados de CD4 solúveis, em comparação com as imunotoxinas anti-gp120. Em relação à estrutura dessa imunotoxina, apenas existe uma similaridade à presente invenção ao utilizar o anticorpo anti-gp41 (7B2 MAb) e estas imunotoxinas podem seletivamente matar apenas as células infectadas por HIV, não o próprio vírus. Em comparação à presente invenção, esse documento descreve uma conjugação de anticorpo-toxina anti-ENV, a qual tem diferente construção em relação ao PS e com diferente mecanismo de citotoxicidade em comparação aos PICs. Em adição, o processo de conjugação entre o anticorpo e a toxina é realizado através de um ligante comercial, chamado SPDP, o qual se diferencia daquele utilizado na presente invenção. Por fim, as imunotoxinas descritas naquele documento necessitam de internalização celular para matar as células infectadas por HIV; já a presente invenção não necessita dessa internalização, atuando somente por meio

da ligação na superfície celular, podendo matar tanto as células infectadas pelo HIV como o próprio vírus do HIV.

[010] O documento "*Immunoconjugated up-conversion nanocomplex for selective imaging and photodynamic therapy against HER2-positive breast cancer*" de 2018 descreve as aplicações de UCNP-fotoimunoconjungados para formação de imagem e terapia fotodinâmica contra câncer de seio positivo para HER2. Diferentemente desse documento em que foram utilizados 1 mol de UCNP, 1 mol de fotossensibilizador e 1 mol de anticorpo, a presente invenção utiliza uma diferente construção, já que contém 1 mol de UCNP revestido com PEG, e então é conjugado com muitos MAb-PSS sobre a superfície de UCNP. Adicionalmente, a conjugação retratada nesse documento ocorre na seguinte ordem: 1 mol de UCNP conjuga com 1 mol de fotossensibilizador, e então 1 mol de anticorpo é reagido com o PS via uma simples química de "clique", portanto, o anticorpo não reage diretamente com UCNP. Já na presente invenção, o UCNP é revestido com PEG e, em paralelo, o anticorpo é conjugado com ou IR700 ou porfirina. Finalmente, UCNP-PEG reage com fotossensibilizador-anticorpo ativado por DBCO. Em relação ainda às diferenças, a aplicação da imunoterapia aqui descrita é contra o câncer de seio, enquanto na presente invenção, ela é direcionada ao vírus do HIV, via somente ligação ao envelope do HIV.

[011] Adicionalmente, no documento intitulado “*Therapeutic compositions and related Methods for photoimmunotherapy*” de 2019, é revelado um conjugado de cetuximab-IR700 depositado por Rakuten Medical, Inc. Esse documento trata de um pedido de patente sob número US 2019/0365897 e descreve a composição do referido conjugado para fotoimunoterapia do câncer. A única similaridade entre esse documento e a presente invenção é o uso do corante ftalocianina IR700 para PIT, sendo a matéria restante totalmente diferente da presente invenção.

[012] Já o documento “*Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules*” de 2011 é similar ao documento anterior, em que descreve a estrutura e aplicação de conjugado de MAb-IR700 derivado de EGFR para fotoimunoterapia contra câncer, o qual difere totalmente da presente invenção.

[013] Por fim, o documento intitulado “*Methods for manufacturing phthalocyanine dye conjugates and stable conjugates*” de 2017 refere-se à síntese e composição do corante ftalocianina IR 700 funcionalizado o qual é ligado a um resíduo lisina da molécula alvo, sendo esse corante já disponibilizado comercialmente. A única semelhança com a presente invenção é o uso do referido corante. Já a presente invenção comprehende uma estrutura diferente com o anticorpo MAb HIV 7B2 conjugado com IR 700 ou porfirina, e então o

produto final HIV MAb-PS-UCNP. Embora o referido documento revele a marcação da proteína com o corante IR 700 funcionalizado, ele não revela tanto o processo de conjugação de UCNP e MAb-PS quanto o seu uso para matar as células transfetadas com HIV assim como o próprio vírus do HIV.

Breve descrição da invenção:

[014] A presente invenção se refere ao Processo de obtenção de fotoimunoconjungados, aos fotoimunoconjungados (PIC) assim obtidos e o uso destes na preparação de uma foto imunoterapia para o tratamento do vírus da imunodeficiência humana (HIV).

[015] Dita invenção revelou ser capaz de matar especificamente as células infectadas pelo HIV no sangue, nos nódulos linfáticos e em tecidos profundos.

Breve descrição das figuras:

[016] Para obter uma total e completa visualização do objeto desta invenção, são apresentadas as figuras as quais se faz referências, conforme se segue.

[017] Figura 1. Imagem esquemática representando duas gerações de PICs na presente invenção: **(A)** em uma abordagem de clique, o dissulfeto re-reactivado por uma construção de piridazinediona produz uma porfirina-PIC homogênea com um DAR4 constante e **(B)** modificação da lisina levando a IR700-PICs heterogêneos com “distribuição média” de DARs 2, 3 e 4 com propriedades físicas e farmacocinéticas indefinidas.

[018] Figura 2. Representação esquemática do modelo proposto na presente invenção para matar especificamente as células T infectadas com HIV em tecidos mais profundos. Esta

construção tem três compartimentos: **(1)** A *Upconversion Nanoparticle* (UCNP) que é amino-funcionalizada e PEGuilada, **(2)** Anticorpo monoclonal de HIV direcionado à glicoproteína-41 nas células de linfócitos T infectadas com HIV e **(3)** Fotossensibilizador de porfirina que se envolveu entre pontes dissulfeto de cadeias pesadas e cadeias leves de anticorpo. A porfirina é excitada pela fluorescência verde/vermelha emitida pelo UCNP e, então, produz uma reação de espécies reativas de oxigênio (ROS) na célula-alvo. O UCNP funcionalizado com NH-2 e o UCNP PEGuilado já foram sintetizados e caracterizados. Esta conjugação é solúvel em água, com dosimetria de 4 “razão droga-anticorpo” (DAR), e considerando o número de anticorpos que se ligam ao UCNP, foi previsto 50 DAR por cada nano-imuno-conjugado, conforme resultados apresentados mais adiante.

[019] Figura 3. Caracterização dos imunoconjungados (ICs), em que **(A)** representa a imagem esquemática de duas gerações de PICs na presente invenção: modificação da lisina levando a IR700-PICs heterogêneos com “distribuição média” de DARS 2, 3 e 4 com propriedades físicas e farmacocinéticas indefinidas. Em uma abordagem de clique, o dissulfeto reativado por uma construção de piridazinediona produz uma porfirina-PIC homogênea com um DAR 4 constante, **(B)** A tabela mostra os produtos de 7B2 MAb conjugados com diferentes concentrações molares de IR700, anticorpo reativado com piridazinediona e porfirina. A caracterização química por espectrofotometria UV-Vis mostra a razão anticorpo para PS (DAR). Em estudos DLS, o potencial zeta, ζ , foi estimado de

acordo com a equação de Huckel. O aumento nos pesos moleculares (MWs) das conjugações, medidos por eletroforese microcapilar, são a confirmação de determinados DARs, **(C)** placas de ELISA revestidas com antígeno gp41, em que um peptídeo representa o epítopo de 7B2. Os PICs foram irradiados com 50 J/cm², antes ou depois da incubação com gp41. Uma placa foi mantida no escuro como controle. 924 MAb foi usado como um controle de isotipo. Os dados com apresentação de média ± de desvio padrão (n = 3) com três experimentos individuais e **(D)** eletroforese microcapilar de 7B2 MAb e PICs não reduzidos, antes e depois da irradiação com 10 ou 50 J/cm². Os resultados significam que os PSS excitados podem prejudicar não apenas a capacidade de ligação dos PICs **(C)**, mas também a estrutura do anticorpo **(D)**. Os padrões de tamanho são indicados ao lado de cada "gel".

[020] Figura 4. DLS Histogramas de raio hidrodinâmico (Rh) para 7B2 Anticorpo, PICs **(A)** e UCNP-PICs **(B)** monitorando como o Rh foi preservado durante o processo de conjugação. Quando IR700 foi conjugado com uma molécula de anticorpo, a dissociação do ligante de IR700 afetou a forma e a solubilidade do anticorpo ao qual está ligado, bem como os complexos anticorpo-antígeno. O tamanho médio estimado por DLS mostra 120 nm para PEG-UCNP-Anticorpo, 130 nm para PEG-UCNP-Anticorpo-Porfirina, 125 nm para PEG-UCNP-Anticorpo-IR700, 25 nm para UCNP, 35 nm para PEG-UCNP e Espectros de

emissão de conversão ascendente de UCNP a 410 nm, 545 nm e 660 nm.

[021] Figura 5. Análise dos espectros de excitação e emissão antes da citometria de fluxo, em que **(A)** e **(C)** referem-se à citometria de fluxo BD LSR Fortessa equipado com cinco lasers, incluindo laser UV 370 nm, laser violeta 405 nm, laser azul 488 nm, laser amarelo/verde 561 nm e laser vermelho 640 nm. A análise teórica dos espectros de UV-Vis mostrou que o laser azul 488 nm é o melhor laser para irradiação do anticorpo secundário-FITC, enquanto o laser violeta 405 nm é o melhor laser para observar a emissão vermelha de IR700 e PICs de porfirina, **(B)** representa a imagem esquemática mostrando a ligação de 7B2-porfirina em gp41 na célula transfectada com Env de HIV na presença de CD4 solúvel. Após irradiação com laser violeta em 405 nm, a emissão de fluorescência vermelha pode ser observada em 725 nm e **(D)**, ao usar a espectroscopia Cary Eclipse UV-Vis-NIR, é demonstrada que a excitação da porfirina por laser azul a 488 nm não interfere no estudo de citometria de fluxo sem o uso de anticorpo secundário. A excitação por laser violeta em 405 nm causou emissão vermelha em 725 nm com intensidade de 1,163 (au), enquanto a intensidade fluorescente vermelha máxima (3,779 au) pode ser observada pela excitação da banda de Soret de porfirina em 432 nm (n = 3).

[022] Figura 6. Análise dos espectros de excitação e emissão antes dos estudos de citometria de fluxo, em que **(A)** o gráfico mostra os espectros de UV-Vis de UCNP conjugado com porfirina-anticorpo, **(B-D)** usando a espectroscopia Cary Eclipse UV-Vis-NIR, após uma excitação a laser de 980 nm, o UCNP conjugado com porfirina-7B2 **(B)** ou IR700-7B2 **(C, D)** tem emissão fluorescente vermelha em H₂O. Os resultados confirmam a ativação direta de fotossensibilizadores via irradiação com luz visível.

[023] Figura 7. Uma comparação entre UCNPs conjugados com anticorpo ou anticorpo-PS, em que **(A)** após excitação do laser de 980 nm, o UCNP-7B2 apresentou emissão de luz visível em 550 nm (fluorescente verde) e 650 nm (fluorescente vermelha) e **(B)** a presença de IR700 PS na conjugação de UCNP-PIC pode causar a diminuição da fluorescência verde e o aumento da emissão da fluorescência vermelha devido à ativação indireta de fotossensibilizadores via irradiação NIR.

[024] Figura 8. O histograma de citometria de fluxo de PICs usando células de controle 293T e transfectadas com células 293T transfectadas com Env incubadas em PBS + 1% BSA + azida de sódio (0,01%) + CD4 solúvel (5 µg/mL), em que **(A)** a ligação de PIC a células 293T transfectadas com células 92UG037,8 gp160 (293T/92UG) foi diretamente detectada através de emissão fluorescente vermelha de IR700-PICs e

porfirina-PIC, pelo filtro Qdot 705 e filtro Qdot 655, respectivamente, **(B)** usando imunofluorescência secundária FITC, PICs mostraram igual capacidade de ligação em células transfectadas com Env. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes. O controle de isotipo (RAC18 químérico) é mostrado em tons de azul no histograma e **(C)** na ausência de CD4 solúvel, porfirina-7B2 mostrou menos ligação em células transfectadas com Env ($n = 3$).

[025] Figura 9. Capacidade de ligação de UCNPs-PICs ao antígeno gp41 usando citometria de fluxo direta. As células são irradiadas por laser violeta 405 nm, e a cor vermelha fluorescente emitida pelo IR700 e porfirina são detectadas pelos filtros Qdot 655 e Qdot 705 nm, respectivamente, em que **(A)** ao usar células transfectadas com HIV Env, observa-se de forma interessante que 7B2-IR700-UCNP tem mais emissão de fluorescência vermelha do que 7B2-IR700. Este aumento significa mais acúmulo de IR700 na membrana celular. Como esperado, o 7B2-UCNP não emitiu fluorescência vermelha, pois não continha fotossensibilizador e **(B)** as células 293T de controle mostram a capacidade de ligação específica de PEG-UCNPs às células, no entanto, 7B2-IR700-UCNP mostrou ligação parcialmente não específica.

[026] Figura 10. Geração de ROS e de oxigênio singlete por PICs, em que **(A)** as amostras foram mantidas no escuro

(representado por cinza) ou foram irradiados com 50 J/cm², **(B)** como um controle positivo, as células 293T foram tratadas com 80µM H₂O₂ por 24 h no escuro. Grupo controle (sem H₂O₂) foi incubado sob as mesmas condições (n = 3), **(C)** o diagrama demonstra um amplo espectro de luz (380-780 nm) por um dispositivo LED caseiro (30 mW/cm²) para irradiação de IR700 e PICs de porfirina, ao mesmo tempo. **(Figuras 6D, 6E, 6F)** Fotodegradação de ABDA por oxigênio singlete gerado por PSSs, PICs, e UCNP-PICs no meio sem aplicação de células, em função dos tempos de irradiação contínua em uma densidade de potência de 30 mW/cm² em solução aquosa, **(D)** comparação da produção de oxigênio singlete entre uma concentração em série de 4x de porfirina-azida com (156, 625 e 2500 nM) e 625 nM 7B2-porfirina DAR 4 (contendo porfirina 2500 nM na interação com anticorpo 625 nM). O gráfico mostra a capacidade da porfirina de produzir oxigênio singlete diminuída após a conjugação. Os dados são média ± S.E.M. (n = 3), **(E)** as mudanças na absorção de ABDA em 400 nm durante 50 min de irradiação devido à geração de oxigênio singlete por porfirina-7B2 e IR700-7B2. Os dados são média ± S.E.M. (n = 3) com dois experimentos individuais, **(F)** as mudanças na absorção de ABDA em 400 nm durante 20 min de irradiação devido à geração de oxigênio singlete por UCNP-PICs após irradiação por NIR em 980 nm. O anticorpo UCNP-IR700 com DAR de 3 produziu mais oxigênio singlete do que o anticorpo

porfirina UCNP (DAR: 4) na solução aquosa. A geração de oxigênio singlete por PSs foi extinta na presença de azida de sódio 0,01%. Neste estudo, observamos que a irradiação NIR no UCNP-anticorpo-PSs pode levar à rápida extinção da absorção de ABDA em 20 min. Os dados são média ± SEM ($n = 3$) com duas experiências individuais. Os controles incluem UCNP-7B2 e água DD ($n = 3$).

[027] Figura 11. Comparaçao da foto-citotoxicidade e direcionamento de PICs por ensaio de citotoxicidade direta, em que **(A)** refere-se às células T 293 transfectadas com Env (293 T/92UG) e células 293T de controle que foram incubadas com 7B2-IR700 e 7B2-porfirina na presença de sCD4 (anti-gp120) por 4h, em seguida, foram testadas por fotoimunoterapia (PIT). Os dados com apresentação de média ± de desvio padrão ($n = 3$) com três experimentos individuais. Onde não há barras de erro visíveis, elas são obscurecidas pelo símbolo, **(B)** a incubação de células transfectadas em dois momentos diferentes (1 e 4 h) antes de PIT mostrou que a internalização-dependência de MAb-porfirina tem mais fotocitotoxicidade, enquanto a ligação à membrana de 7B2-IR700 foi suficiente para induzir a morte celular. Os dados com apresentação de média ± de desvio padrão ($n = 3$) e **(C)** observações microscópicas antes e depois de PIT demonstraram a formação de bolha (setas azuis) como sinais de morte celular necrótica. Barras de escala, 50 µm.

[028] Figura 12. **(A)** a imagem esquemática descreve três modelos de localização de PIC na membrana celular 293T transfectada com Env de HIV ou internalizada. A irradiação aplicada na presença ou ausência de azida de sódio, como agente de captura de ${}^1\text{O}_2$. Os controles incluem as células no escuro, células não coradas e as células incubadas com o anticorpo 7B2 isolado (*naked*). Estrelas verdes indicam que a célula morte foi inibida devido à captura do oxigênio singlete pela azida, indicando que a presença de PICs na membrana celular é suficiente para matar as células por geração de oxigênio singlete ($n = 3$), **(B)** na ausência de azida, danos à membrana e rápida internalização de porfirina-anticorpo foram observados em 10 minutos (b, curva laranja), resultando em sinais necróticos após 30 minutos de irradiação, **(C)** no ensaio de apoptose por Anexina V - FITC / PI, as células transfectadas com Env foram incubadas com PICs durante 4 h, depois irradiadas. PICs mostraram morte celular devido à apoptose tardia (cor roxa no subconjunto Superior Direito) após 4 h de incubação. O anticorpo controle 7B2 não apresentou morte celular nem sinal de apoptose. ($n = 3$).

[029] Figura 13. Efeito dos PICs no vírus X4 HIV-1 NL4-3, em que o estoque de vírus foi incubado com 500 nM de PICs, PSSs, anticorpos isolados anti-gp41 (7B2) e poços sem tratamento (apenas vírus). Após a irradiação, as células

Jurkat foram infectadas com vírus, em que **(A)** representa a carga de RNA de HIV-1 (cópias/mL) em cada região de LTR dos sobrenadantes colhidos no dia 3. Na placa irradiada, a carga viral foi indetectável nas amostras tratadas com PIC, mAb 7B2 isolados ou PSs. Na placa escura, as amostras tratadas com mAb 7B2 ou PICs mostraram alguma diminuição na carga viral, devido ao efeito de neutralização do mAb 7B2 no vírus. Os dados foram subtraídos do estoque de HIV (cópia/mL). Os dados com apresentação de média ± de desvio padrão (n = 3) para o sobrenadante do dia 6, **(B)** quantificação da carga de DNA proviral de HIV-1 (célula/mL) com base no protocolo de Kumar para amplificação da região LTR do vírus. O DNA total do HIV inclui provírus integrados de forma estável e formas extracromossômicas de DNA do HIV. Os resultados estavam de acordo com os resultados da carga de RNA viral, **(C)** as imagens TEM de controles escuros e irradiados revelaram que os vírions com envelope quase esférico parecem intactos com envelope distinto e **(D)** a morfologia dos vírions irradiados com anticorpo 7B2 isolado não mostrou diferença com os controles não tratados. Enquanto, a membrana dos vírions inativados com porfirina, anticorpo porfirina ou anticorpo IR700 tornou-se parcialmente destruída (chamada calva), mas suas membranas pareciam manter a integridade estrutural. Os vírions tratados com PIT com IR700 PS foram principalmente aglomerados.

[030] Figura 14. Efeito dos PICs no vírus JR-CSF do HIV-1, em que o estoque de vírus foi incubado com 500 nM de PICs e anticorpo puro como controle. Após a irradiação, as células C8166-R5 foram infectadas com vírus. O sobrenadante foi coletado diariamente para ELISA de p24. As cargas virais foram medidas como densidade óptica a 450 nm para o dia 3 e dia 4 (**A**), então calculadas com base em p24 e (**B**) trata das amostras escuras e irradiadas as quais são representadas com linha preenchida e linha pontilhada, respectivamente (**A**). Os dados com apresentação de média ± de desvio padrão (n = 3) para o sobrenadante do dia 3 e dia 4.

[031] Figura 15. Comparação da foto-citotoxicidade específica UCNP-PICs por ensaio de citotoxicidade após irradiação de luz visível (**A,B**) ou irradiação NIR (**C,D**), em que resumidamente, as células 293T transfectadas com Env (293T/92UG) e células 293T de controle foram incubadas com UCNP-PICs e controles na presença de sCD4 (anti-gp120) por 4 h, em seguida, foram irradiadas a 400-750 nm (**A,B**) ou 975-980 nm (**C,D**). Neste estudo, assumimos que o NIR-PIT pode causar a geração de ${}^1\text{O}_2$ por PSSs que ativou indiretamente via reação LRET no UCNP, enquanto o PIT baseado em luz visível pode causar a geração de ${}^1\text{O}_2$ via ativação direta de PSSs. Portanto, PIT (**B**) baseado em luz visível mostrou cerca de duas vezes mais citotoxicidade na concentração de [100] $\mu\text{g/mL}$ do que NIR-PIT (**D**). Os resultados do NIR-PIT mostram o

direcionamento específico e a morte das células transfectadas, enquanto as células de controle são preservadas. O anticorpo UCNP-IR700 mostrou uma ligeira ligação não específica a células de controle 293T na concentração elevada, que está de acordo com os resultados de FACS. Ao contrário da irradiação de luz visível, a irradiação NIR não tem efeito significativo sobre a proliferação do crescimento celular (observe as estrelas verdes). Na Figura 15D, o UCNP-7B2 não apresentou citotoxicidade, uma vez que não contém PS, indicando que não há citotoxicidade do anticorpo UCNP após a internalização celular. UCNP-PICs mostrou toxicidade escura em alta concentração de [500] µg/mL. Os dados são ± significa S.E.M. (n = 3) com três experiências individuais. Onde não há barras de erro visíveis, elas são obscurecidas pelo símbolo.

Descrição Detalhada da Invenção:

[032] Em uma primeira modalidade, a presente invenção se refere ao Processo de obtenção de fotoimunoconjungados (PIC). O referido processo compreende as seguintes etapas (Figura 1):

Produção de PIC, compreendendo:

(1) na primeira etapa, os fotossensibilizadores twp foram conjugados com o anticorpo anti-envelope HIV por meio de duas estratégias diferentes:

(a) conjugação de porfirina-anticorpo por química de cliques e

(b) conjugação e otimização do anticorpo IR700 por

modificação de lisina.

(2) na segunda etapa, a conjugação entre UCNPs e anticorpo-fotossensibilizador (UCNP-PICs) (Figura 2).

[033] Mais particularmente, na etapa (1)(a) a alcino dibromopiridazinadiona é conjugada ao anticorpo MAb 7B2 e então o conjugado anticorpo-alcino reage com a porfirina azida.

[034] Na etapa (1)(b) o conjugado anticorpo-alcino é covalentemente ligado ao corante ftalocianina IR700Dye, via modificação de lisina, sendo a porção N-hidroxisuccinimida (NHS) éster do corante reagida com o grupo amina primária do anticorpo, principalmente o aminoácido Lys. Concomitantemente, o anticorpo MAb 7B2 é funcionalmente reativado com ligações dissulfeto intercadeias com um alcino estirado por dibromopiridazinadiona (*PD Linker*) e uma azida porfirina.

[035] Ditos fotoimunoconjungados (PICs) foram caracterizados bioquimicamente e imunologicamente.

[036] As etapas 1(a) e (b) são esquematicamente demonstradas nas Figuras 1(a) e (b).

[037] Já na etapa (2), ocorre a conjugação dos MAb-PS (PIC) obtidos na etapa (1) com *Upconversion Nanoparticles* (UCNP) formando os UCNP-PICs. Primeiramente, os PICs foram funcionalizados por dibenzociclooctina (DBCO). Posteriormente, as UCNP-N3 reagiram com os PICs ativados por DBCO.

[038] Por outro lado, os UCNP-PICs são ativados por luz infravermelha (NIR) na faixa que varia de 975 a 980 nm que é penetrável no tecido profundo, e consequentemente convertida em luz visível por UCNP, e finalmente ativado o

fotossensibilizador por luz visível com duas emissões máximas em 545 nm e 660 nm ou por Transferência de Energia por Ressonância de Luminescência (LRET).

[039] Ditas *Upconversion Nanoparticles* caracterizam-se por serem amino-funcionalizadas e PEGuiladas.

[040] Adicionalmente, dito anticorpo Mab7B2 conjugado ao corante ftalocianina IR700Dye apresenta uma razão de droga-anticorpo com uma dosimetria de 4 (DAR).

[041] Mais particularmente, os detalhes de cada um dos compartimentos acima mencionados são descritos a seguir:

a) Anticorpo Monoclonal Anti-gp 41 (7B2): O MAb 7B2 (números de acesso ao Genbank JX188438 e JX188439) é uma IgG1 humana que se liga à gp41 do HIV em AA 598-604 (CSGKLIC) na região da hélice;

b) Alcino estirado por dibromopiridazinadiona (*PD Linker*): O método para sintetizar a dibromopiridazinadiona de alcino de tensão metil (*MepStra PD Linker*) foi adaptado de Chudasama Vijay (Chudasama V et al., 2015);

c) Azida porfirina: O método para sintetizar a azida porfirina solúvel em água foi descrito e adaptado de Boyle, Rosse (Boyle R, et al., 2015), sendo a própria porfirina preparada e adquirida pelo mesmo;

d) O corante IRDye 700DX foi adquirido da empresa LI-COR Biosciences. O corante IR700 foi covalentemente ligado ao MAb 7B2 purificado através de um grupo reativo N-hidroxissuccinimida, de acordo com as instruções do fabricante.

[042] Em uma segunda modalidade, a presente invenção se refere aos fotoimunoconjungados (produto final) produzidos pelo referido processo compreendendo MAb-PS-UCNP ou UCNP-

PIC, isto é, a conjugação de o anticorpo monoclonal Anti-gp41 (7B2) isolado, os fotossensibilizadores porfirina portadora de azida e o corante ftalocianina IRDye 700DX e as *Upconversion Nanoparticles* (UCNP).

[043] Em uma terceira modalidade, a presente invenção se refere ao Uso dos referidos fotoimunoconjugados (PIC) na preparação de uma fotoimunoterapia (PIT) para o tratamento da doença da imunodeficiência adquirida (HIV).

[044] Dita doença do HIV é caracterizada por compreender duas linhagens do vírus HIV-1, X4 HIV-1 NL4-3 e vírus JR-CSF, sendo que os referidos fotoimunoconjugados foram capazes de matar tanto as células que expressam o HIV quanto eliminam o próprio vírus do HIV, respectivamente.

[045] Ressalta-se que a presente invenção não se restringe exclusivamente ao tratamento apenas do HIV, porém, compreende o tratamento de outras doenças virais e câncer, uma vez que a presente invenção atua se ligando ao envelope do vírus fisicamente.

[046] Por meio da presente invenção, foi possível resolver problemas da terapia fotodinâmica convencional (PDT) como será demonstrado por meio dos testes a seguir apresentados, sendo que:

(A) Na etapa (1), foi possível demonstrar que a forma, solubilidade, capacidade de ligação do corante IR700-PICs foram afetadas aumentando a razão droga-anticorpo (DAR), enquanto foi preservada a solubilidade da porfirina ao se conjugar ao anticorpo monoclonal MAb 7B2 com a constante DAR de 4, devido à retenção das ligações estruturais rígidas sobre o anticorpo (Figura 1).

(B) Na etapa (2), foi possível resolver a limitação da

entrega de luz combinando fotoimunoterapia com *Upconversion Nanoparticles* (UCNP), em que UCNPs PEGuiladas amino-funcionalizadas podem converter uma radiação de comprimento de onda mais longo (por exemplo, luz infravermelha próxima na faixa que varia de 975 a 980 nm) em uma fluorescência de comprimento de onda mais curto (por exemplo, luz visível com duas emissões máximas em 545 nm e 660 nm). As UCNPs PEGuiladas mostraram melhor emissão de luz visível, o que tem por efeito alcançar o tecido mais profundo e matar o vírus.

(C) Ainda, a energia emitida pelas UCNP pode ser absorvida pela porfirina por meio da Transferência de Energia por Ressonância de Luminescência (LRET) e, consequentemente, gera oxigênio singlete e reação ROS e, consequentemente, mais citotoxicidade. O anticorpo tem a função de ligação específica às células de linfócitos T infectadas com HIV.

[047] A tabela 1 demonstra a estratégia utilizada na presente invenção para resolver os problemas existentes na terapia fotodinâmica.

Tabela 1. Problemas da terapia fotodinâmica convencional e as soluções propostas pela presente invenção

Problemas dos fotossensibilizadores	Solução da presente invenção
Baixa solubilidade das células alvo	Anticorpo monoclonal seletivamente libera o fotossensibilizador às células alvo
Solubilidade em água e auto-agregação em meio aquoso	Porfirina mostra solubilidade em água após conjugação com o anticorpo

Dosimetria do fotossensibilizador consumido	É fácil calcular o número exato da razão droga-anticorpo (DAR) em conjugação (4 DAR)
Penetração da luz vermelha no tecido profundo	Ao combinar o imunoconjugado com as <i>Upconversion nanoparticles</i> , foi possível aumentar a penetração da luz em tecidos mais profundos tais como sangue e linfonodos.

[048] Já a Tabela 2 apresenta a estratégia da presente invenção para resolver os problemas associados a imunoterapia com HIV (IT) e Terapia Antiviral (ART).

Tabela 2. Problemas da Imunoterapia do HIV (IT) e Terapia Antiviral

Problemas com a Imunoterapia do HIV e Terapia viral	Solução da presente invenção
Novas cepas de vírus HIV resistentes às drogas	Fotossensibilizador-anticorpo (PIC) como uma alternativa
Conjugados anticorpo-droga podem matar as células-alvo, mas não o vírus	Os conjugados (PIC) não necessitam de internalização, e podem destruir o envelope do vírus, fisicamente
Reservatórios de latência do HIV são em sua maioria escondidos em tecidos	Combinando PICs com UCNPs, foi possível aumentar a penetração da luz em

profundos, tais como linfonodos	tecidos mais profundos.
------------------------------------	-------------------------

[049] Ainda, os produtos obtidos pela presente invenção são apresentados a seguir na Tabela 3.

Tabela 3. Lista dos produtos de fotoimunoconjungados (PIC-UCNP).

Componentes preliminares			Produto: PICs	Produto: PIC-UCNP
Fotosensibilizadores	Anticorpos	Upconversion Nanoparticles comercializadas (UCNP)	Novos PICs produzidos na presente invenção	Produtos finais de PIC-UCNP
Porfirina Ftalocianina IR700Dye	7B2 (anti-gp41) Isotipo controle	UCNP-PEG-NH2 UCNP-PEG-N3	7B2-IR700 7B2-Porfirina	PEG_UCNP-7B2 PEG-UCNP-7B2-Porfirina PEG-UCNP-7B2-IR700

Exemplos e Testes realizados:

[050] A seguir são apresentados exemplos de desenvolvimento e aplicação da presente invenção assim como testes realizados, não se limitando, entretanto, a estes.

Conjugação porfirina-anticorpo por química de clique:

[051] A conjugação entre a azida porfirina e o mAb 7B2 foi realizada em duas etapas: funcionalização do anticorpo e, em seguida, conjugação química de clique. Mais particularmente, alcino dibromopiridazinediona (MepStra PD) (15 µL, 20 mM em DMSO, 30 eq.) foi adicionada a uma solução

de anticorpo 7B2 (500 µL, 19 µM, 3,0 mg/mL) em solução tampão de borato (BBS) (Borato de sódio a 25 mM, NaCl a 25 mM, EDTA 0,5 mM, pH 8,0) e a solução foi incubada a 4°C durante 1 hora. TCEP·HCl (6,0 µL, 20 mM em água d.d, 12 eq.) foi adicionado e a solução foi incubada a 4°C por mais 16 horas. O excesso de reagentes foi removido por ultrafiltração (6 × 3000 MWCO, VivaSpin® GE Healthcare) em BBS (pH = 8,0). A caracterização foi realizada em 50 µL do conjugado resultante.

[052] Na segunda etapa, a porfirina azida (31 µL, 10 mM em DMSO, 40 eq.) foi adicionada a uma solução de conjugado 7B2 rebridado (450 µL, 20 µM, 3,0 mg/mL) em BBS (borato de sódio 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 0,5 mM, pH 8,0) e a solução incubada a 21°C durante 4 horas. O excesso de reagentes foi removido por coluna de dessalinização Zeba (Pierce) equilibrada com 1 × PBS (pH = 7,4).

Conjugação e otimização de corante fталocianina IR700-anticorpo via modificação de lisina:

[053] Corante IRDye 700DX (LI-COR Biosciences; IR700) foi covalentemente ligado ao MAb 7B2 purificado através de um grupo reativo de N-hidroxisuccinimida, de acordo com as instruções do fabricante. Para encontrar a conjugação 7B2-IR700 ideal em relação ao grau de marcação e fotoimunoeficácia, o anticorpo 7B2 (800 µL, 7 µM, 1,1 mg/mL) em 1 × PBS (pH = 8,5) foi misturado com equivalentes variáveis de IRDye 700DX (50, 100 e 200 µg de corante), iguais a razões molares de 3,5, 7 e 14, respectivamente. Finalmente, o corante livre foi separado dos anticorpos marcados pela coluna de dessalinização Zeba (Pierce) equilibrada com PBS (pH = 7,4), e a concentração dos produtos

finais (7B2-IR700Dye) foi medida por ensaio proteico com ácido bicinchonínico (BCA) (Pierce, Rockford, IL).

Fotospectroscopia UV-Vis:

[054] A espectroscopia UV-Vis foi usada para determinar as concentrações de proteína e de fotossensibilizador para as razões de anticorpos, em primeiro lugar, usando o espectrofotômetro Nanodrop 1000 UV-Visible (ThermoFisher Scientific) e, em seguida, um espectrofotômetro Varian Cary 100 Bio UV-Visible operando a 21°C. O tampão de amostra foi usado como branco para a correção da linha de base com coeficientes de extinção; $\epsilon_{280} = 250.440 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para anticorpos, $\epsilon_{335} = 9.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para as estruturas de piridazinediona, $\epsilon_{422} = 165,175 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para porfirina e $\epsilon_{689} = 165.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para IRDye 700DX. Um fator de correção em 280 nm de 0,25 (em A335) foi empregado para piridazinedionas.

[055] Um espectrofluorímetro Agilent Technologies Cary Series UV-VIS-NIR (Cary 5000) foi usado para observar os espectros de emissão de IR700-7B2 e porfirina-7B2, excitado em 689 nm e 432 nm, respectivamente.

Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial zeta:

[056] Os raios hidrodinâmicos, mobilidade eletroforética, potencial zeta e polidispersidade de PICs e UCNPs-PICs foram medidos a 1 mg/ml em placas de 96 poços transparentes ao UV com 70 μl de volume de amostra usando um DLS Wyatt Möbius (Wyatt technologies, Dernbach, Alemanha) com luz incidente em 532 nm, 461 medido em um ângulo de 163,5°. As amostras foram equilibradas a $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ por 600 segundos antes das medições, e essa temperatura foi mantida constante ao longo dos experimentos. Todas amostras foram medidas em triplicata com 10 aquisições e um tempo de

aquisição de 5 segundos. A mudança no raio hidrodinâmico cumulante ajustado em nanômetros foi monitorada durante o período de armazenamento. Os resultados foram calculados usando o software dynamics 7.1.7 (Wyatt technologies). Ao usar o espectrofluorímetro UV-NIS-NIR Agilent technologies série Cary (cary 5000), mostramos o feixe de laser incidente em 532 nm não está dentro da banda de excitação da amostra fluorescente (IR700-7B2 e porfirina-7B2); pois a análise não seria interrompida ou contaminada.

Eletroforose:

[057] O tamanho molecular, a pureza e a precisão da conjugação por clique dos produtos (MAbs purificados e MAb-PS) foram determinados usando glicina redutora/não redutora-SDS-PAGE e, em seguida, confirmada por eletroforese microcapilar (Agilent Bioanalyzer, GE Healthcare), seguindo os procedimentos padrão do laboratório.

ELISA:

[058] Ensaios com ELISAs foram realizados para análise de especificidade de ligação de Ag e titulação de MAbs purificados e foto-imunoconjungados (PICs) em poços revestidos com antígeno gp41 (1 µg/mL) [16]. O antígeno gp41 era uma sequência de clado B de consenso de peptídeo linear HIV-1 representando o epítopo de 7B2 [3,4]. A ligação do anticorpo ao antígeno foi detectada com anticorpo secundário conjugado a AP (anticorpo de cabra IgG anti-humano) (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA). Os dados são relatados como densidade óptica em 405 nm e representam as médias de valores triplicados com três experimentos independentes.

Imunofluorescência direta e indireta por citometria de

fluxo:

[059] A imunofluorescência direta/indireta e citometria de fluxo foi realizada para analisar a ligação da foto-imunoconjungados (PICs e UCNP-PICs) às células 293T transfectadas com Env. 8×10^4 células foram incubadas com PBS/BSA/azida de sódio 0,01% (PBA) por 30 minutos em TA, em seguida, PICs e UCNP-PICs adicionados para atingir as concentrações finais de 10 µg/mL na presença de CD4 solúvel a 5 µg/mL. As células foram incubadas com PICs ou UCNP-PICs por 1 hora em temperatura ambiente.

[060] Para o ensaio indireto, metade das amostras foram lavadas, e, em seguida, coradas com anticorpo secundário IgG de cabra anti-humano conjugado com FITC (2 µg/mL) por 1 hora. Todas as amostras, para os ensaios diretos e indiretos, foram lavadas duas vezes e fixadas em 100 µL de 2% de paraformaldeído. Após um mínimo de 4 horas, 150 µL de PBS foram adicionados. Células (10.000) foram estudadas em Optics LSR Fortessa (Becton-Dickson), analisadas pelo software Flow-Jo (Treestar Inc).

[061] A fluorescência média da população de células bloqueadas marcadas com imunoconjungado foi calculada em relação à fluorescência média das células marcadas com MAb 7B2.

[062] A imunofluorescência direta sem adição de anticorpo secundário conjugado com FITC foi aplicada para analisar a ligação de PICs e UCNP-PICs às células 293T transfectadas com Env. Para IR700-PIC e IR700-UCNP-PIC, as células foram excitadas por qualquer laser violeta em 405 nm ou laser vermelho em 640 nm e a emissão de fluorescência vermelha foi detectada pelo filtro passa-banda 710 ± 50 (Qdot

705). Para porfirina-PIC e porfirina-UCNP-PIC, as células foram excitadas por laser violeta em 405 nm e a emissão de fluorescência vermelha foi detectada por 660 ± 20 filtro passa-banda (Qdot 655).

Ensaio de apoptose/morte celular:

[063] A coloração de células 504 Anexina V-FITC/PI foi realizada após 6 horas de fotoimunoterapia padrão. Resumidamente, as células foram incubadas com tampão de ligação de Annexin V (10 mM HEPES, pH 7,4; NaCl 140 mM; 2,5 mM CaCl₂) e coradas com Annexin V-FITC (ThermoFisher Scientific) por 15 min. Após três lavagens, as células foram incubadas com 2 µg/mL de iodeto de propídio (PI) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) por 15 min. A intensidade média de fluorescência foi medida para 10.000 eventos. Os dados foram coletados usando amplificação linear para FSC e SSC e amplificação logarítmica para filtros relacionados e analisados por software associado como mencionado acima.

Detecção de ROS (Espécies de Oxigênio Reativas):

[064] A geração de ROS nas linhagens celulares foi detectada com a sonda fluorescente H2DCF-DA (diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína). 2×10^5 células foram incubadas com 1 µM de anticorpo nativo, porfirina-PIC ou IR700-PIC em placas de 96 poços em DMEM sem fenol por 45 minutos.

[065] As células foram lavadas e incubadas com solução H2DCF-DA a 1 µM preparada em PBS, e lavadas novamente e incubadas com DMEM livre de fenol antes da irradiação com 50 J/cm² (uma placa escura espelhada, submetida ao mesmo procedimento, exceto pela exposição à luz, continha os grupos controle escuro). As células incubadas com 40 mM de H₂O₂, sem

irradiação, foram utilizadas como controle positivo. A intensidade da fluorescência ($Ex/Em = 485/535$ nm) foi medida com a citometria de fluxo, como o procedimento mencionado acima.

Avaliação da geração de oxigênio singlete foto-induzida:

[066] A geração de oxigênio singlete foi avaliada por fotodegradação com a sonda química ácido 9,10-antracenodiil-bis (metíleno) dimalônico (ABDA) (adquirido na Sigma-Aldrich). O oxigênio singlete produzido por uma gama de concentrações de PICs e UCNP-PICs em 0,15 mM do sal de sódio de ABDA em água foi assim determinado. Após irradiação controlada por tempo (380-750 nm) por LED (30 mW/cm²) para PICs ou com NIR (975-980 nm) por LED (500 mW/cm²) para UCNP-PICs, a diminuição na absorção a 400 nm (λ_{max} de ABDA) foi medida em um frasco de quartzo 530 com um espectrofotômetro UV-VIS-NIR série Cary da Agilent Technologies (Cary 5000). Os experimentos também foram realizados sem fotoestimulação. Um controle que consiste na solução ABDA sem PICs irradiados nas mesmas condições foi analisado em paralelo.

Ensaio de proliferação celular após fotoimunoterapia:

[067] Anticorpo 7B2 nu, IR700-7B2, porfirina-7B2, uma mistura de ambos os PICs com molaridades iguais foram diluídas no meio DMEM sem fenol, mas sem FCS, para fornecer um intervalo de cinco concentrações finais de 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62,5 nM e 31,2 nM em 5 poços de placa de 96 poços. Por NIR-FIT, UCNP-PICs foram diluídas no meio DMEM sem fenol, mas sem FCS, para fornecer um intervalo de cinco concentrações finais de 500 µg/mL, 400 µg/mL, 300 µg/mL, 200 µg/mL e 100 µg/mL em 5 poços de placa de 96 poços. Células transfectadas com HIV Env e células 293T foram ajustadas a

uma concentração de 1×10^6 células/mL. CD4 solúvel foi adicionado a cada poço em uma concentração final de 500 ng/mL. A placa foi incubada por 4h a 37°C e 5% de CO₂. Placas idênticas foram mantidas protegidas da luz para o mesmo período para obter os grupos controle escuro adequados. Após a incubação, as células foram lavadas com um excesso de 4X de DMEM livre de fenol sem soro para eliminar qualquer conjugado não ligado. Para PICs, cada placa foi irradiada com 20 J/ cm² de luz (380-780 nm) por uma matriz de LED caseira (54 mW/cm²) em duas doses iguais separadas por 10 min. Para UCNP-PICs, cada placa foi irradiada com NIR (975-980 nm) por LED (500 mW/cm²).

[068] Após a irradiação, 10 µL de FCS foram adicionados a cada poço e as placas foram devolvidas à incubadora por 3 dias. O crescimento das células em cada grupo também foi fotografado ao microscópio (IX81, Olympus America) em cada ponto de tempo, antes e depois da irradiação. Substrato MTS/PMS (Promega, Madison, WI) foi adicionado a cada poço e as placas lidas de hora em hora a 490 nm. Resultados representam a média e SEM de amostras triplicadas (representativas de três experimentos), e são representados graficamente como A₄₉₀ sem o fundo de célula subtraído. Os resultados são expressos como % de viabilidade celular versus concentração de PICs ou UCNP-PICs.

Foto-inatividade do HIV:

[069] Duas cepas de HIV-1, X4 HIV-1 NL4-3 e vírus JR-CSF foram usadas para estudar o foto-ensaio de inatividade em células Jurkat e células C8166.R5, respectivamente. Estoques de vírus de X4 HIV-1 NL4-3 ou vírus JR-CSF foram diluídos em 100 µL livre de fenol RPMI sem FCS em poços triplicados,

então, foram tratados a 37°C por 45 minutos com 500 nM de PICs, PSSs, anti-gp41 (7B2) Mab isolado (*naked*) e três poços sem tratamento. Uma placa espalhada foi incubada e mantida no escuro, sem controle de irradiação. A placa foi irradiada com 20 J/cm² de luz (380-780 nm) por uma matriz de LED feita sob medida (30 mW/cm²) em duas doses iguais separadas por 10 min. Posteriormente, 120 µL de meio RPMI com 20% de FCS foram adicionados a cada poço e as placas foram devolvidas à incubadora. Aos 30 minutos após a irradiação, uma concentração em série de células Jurkat ou células C8166.R5 com a ordem de 10⁷, 10⁶ e 10⁵ células/mL foram adicionados aos poços em triplicado contendo 500 µL de volume final de X4 HIV-1 NL4-3 irradiado ou vírus JR-CSF, respectivamente.

[070] Esta ordem de concentrações finais representa a multiplicidade específica de infecção (MOI) de 0,1, 1 e 10. As células foram incubadas por 6 dias, enquanto 50 µL de amostra foram colhidos por dia e centrifugados. Os pellets de células Jurkat foram colhidos para DNA qPCR proviral, e os sobrenadantes foram colhidos para RNA viral. Enquanto, os sobrenadantes de células C8166.R5 foram colhidos para ensaio de antígeno p24.

Quantificação de RNA viral de HIV-1:

[071] O RNA de HIV-1 total do sobrenadante das amostras no dia 6 com MOI de 1 foi extraído e purificado usando o Kit de RNeasy Lipid Tissue Mini, de acordo com o protocolo do fabricante (QIAGEN). A medição da carga viral do HIV-1 foi realizada usando a transcriptase reversa de uma etapa (RT) e PCR em tempo real em um único sistema tampão usando o Abbott RealTime HIV-1 no m2000 automatizado, ao longo da faixa dinâmica de detecção de 40 a 10.000.000 cópias/mL

(Abbott, IL, EUA). O protocolo foi seguido conforme descrito pelo fornecedor (Applied Biosystems) para o TaqMan One-Step RT e Kit PCR Master Mix Reagents (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA).

Quantificação de DNA Proviral de HIV-1 pelo ensaio de TaqMan PCR Real-Time:

[072] O número de células Jurkat contendo DNA proviral de HIV-1 foi medido usando qPCR. As amostras colhidas do dia 3 foram centrifugadas e o sedimento foi separado. A quantificação foi feita com base em dois protocolos distintos previamente publicados [32,33] para amplificação de DNA proviral de HIV-1 (região LTR), bem como a amplificação de CCR5 para medir as células totais.

Medição da infecção por HIV 610 por ELISA Sanduíche:

[073] O conteúdo do antígeno p24 do HIV-1 do sobrenadante foi medido, usando o p24 do HIV-1 core profile ELISA (DuPontNEN, Boston, Massachusetts, Estados Unidos). O sobrenadante do menor número de células adicionadas por 6 dias infectadas com HIV-1 foi determinado. Foi usado um ELISA sanduíche por captura de Ab para a medição de Ag no núcleo de HIV, p24. A sensibilidade desse ensaio é de 5 pg/mL. Poços foram revestidos com o anti-p24 mAb de captura, 183-H12-5C. Uma diluição apropriada de meio de cultura de tecido tratado com 1% Triton X-100 (Sigma) foi então adicionado e incubado durante a noite à 4°C. Seguido de lavagem, as placas foram incubadas com imunoglobulina de HIV conjugada com biotina (ARRRP) como a detecção de Ab e, em seguida, com Amdex-estreptavidina conjugada com peroxidase de rábano (streptavidin-HRP) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). O sinal foi detectado com o substrato HRP colorimétrico

tetrametilbenzidina (Sigma) e medido em A450. Todas as amostras foram executadas triplicadas.

Microscopia eletrônica:

[074] A análise de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foi conduzida para avaliar a morfologia do vírus HIV-1 NL4-3 não tratado e tratado com PIT, conforme descrito na seção "Foto-inatividade por HIV". Em seguida, os vírions residuais foram fixados usando paraformaldeído 0,1% por 15 min em 4°C. As amostras foram submetidas a coloração negativa. As grades de acetato de uranila foram colocadas em 30 µL de amostras por 10 min. A coloração foi realizada com fosfotungstato de potássio a 2% (pH 7,2). As grades foram observadas sob um JEOL TEM (modelo JEM1011) (JEOL/Massachusetts/EUA) operando a 80 kV. As imagens foram gravadas com uma câmera de dispositivo carregada (modelo 785 ES1000W, Gatan, EUA) e o Programa Gatan versão 1.6.

Análises estatísticas:

[075] As análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism, v5.0. Os dados são mostrados como média e SEM do número indicado de valores replicados. Se nenhuma barra de erro aparecer, as barras de erro são menores e obscurecidas pelo símbolo. O método para comparação estatística é pelo teste t de Student bicaudal desemparelhado, a menos que especificamente indicado de outra forma.

Resultados:

Produção e caracterização dos fotoimunoconjugados (PICs):

[076] Duas gerações de PICs foram produzidas; 7B2 MAb conjugado com diferentes molares concentrações de IR700 por

meio de modificação de lisina, e Anticorpo 7B2 rebridado com dissulfeto funcionalmente inter-fita com um alcino estirado por piridazinediona (PD) e uma azida-porfirina (Figura 3A). A caracterização química por espectrofotometria UV-Vis mostrou uma carga de PD de 4,3 para o anticorpo rebridado e um DAR de 4,1 para a espécie final de porfirina-PIC. IR700-PICs mostrou DARS de 2,1, 3,0 e 4,4 que eram iguais às razões molares de 3,5, 7 e 14, antes da conjugação, respectivamente (Figura 3B).

[077] Os resultados de DLS mostraram que a ligação de drogas de moléculas pequenas ao MAb 7B2 ligeiramente aumenta o tamanho médio da molécula (raio hidrodinâmico, R_h) e polidispersidade (% Pd), indicando a presença de algumas espécies de alto peso molecular nesta região (Figura 3B). 7B2-porfirina apresentou maior % de Pd e R_h no pico principal. O potencial zeta do anticorpo 7B2 mudou muito ligeiramente de +0,5 mV para +0,01 e -0,04 para porfirina catiônica e para IR-700 DAR4 aniônico, respectivamente (Figura 3B). A ligação dos PICs com base em 7B2 foi examinada usando o antígeno de peptídeo gp41 antes da irradiação (escuro) e após irradiação com 50 J/cm². Os resultados de ELISA sem irradiação (escuro) mostraram que um aumento da razão de IR700-anticorpo diminui a capacidade de ligação, uma vez que 7B2-IR700 DAR 4 mostrou a menor ligação ao gp41. Em contraste, a conjugação de porfirina com 7B2 MAb não afetou significativamente a especificidade imunológica do anticorpo. Após a irradiação de PICs com luz, os PICs com base em 7B2 perderam sua capacidade de ligação ao gp41, enquanto o 7B2 MAb irradiado mostrou capacidade de ligação preservada (Figura 3C).

[078] Resultados da eletroforese microcapilar de anticorpos não reduzidos (cadeias H e L) e PICs demonstraram os pesos moleculares (MWs) com 151,4, 166,1 e 166,9 kDa para o anticorpo isolado (*naked*), anticorpo rebridado e anticorpo-porfirina clicado. O aumento nos MWs de IR700-PICs estava de acordo com os DARs determinados, com 154,1, 154,7 e 156,8 kDa para os DARs 2, 3 e 4, respectivamente (Figura 3B). Eletroforese microcapilar de PICs, antes e depois da irradiação, revelou que as bandas de proteína de 7B2-PICs desapareceram de uma maneira dependente da dose com densidade de potência de 10 e 50 J/cm², e algumas bandas sobre o anticorpo aumentaram com o esfregaço. Enquanto isso, as bandas de anticorpos 7B2 isolados (*naked*) não se alteraram durante a irradiação (Figura 3D). Em adição, o aumento no peso médio (MWs) dos IR700-PICs estão de acordo com os DARs, com 154,1, 154,7 e 156,8kDa para DARs 2, 3 e 4, respectivamente (Figuras 3A e 3C).

[079] DLS Histogramas de raio hidrodinâmico (Rh) para 7B2 Anticorpo, PICs (Figura 4A) e UCNP-PICs (Figuras 4B) mostrando como o Rh foi preservado durante o processo de conjugação. Quando IR700 foi conjugado com uma molécula de anticorpo, a dissociação do ligante de IR700 afetou a forma e a solubilidade do anticorpo ao qual está ligado, bem como os complexos anticorpo-antígeno. O tamanho médio estimado por DLS mostra 120 nm para PEG-UCNP-Anticorpo, 130 nm para PEG-UCNP-Anticorpo-Porfirina, 125 nm para PEG-UCNP-Anticorpo-IR700, 25 nm para UCNP, 35 nm para PEG-UCNP e Espectros de emissão de conversão ascendente de UCNP a 410 nm, 545 nm e 660 nm.

[080] Usando a espectroscopia Cary Eclipse UV-Vis-NIR,

foram analisadas a excitação e os espectros de emissão antes do estudo de citometria de fluxo, sem usar um anticorpo secundário (Figuras 5 e 6). Demonstrou-se que a excitação da porfirina por laser azul a 488 nm não interfere na intensidade da emissão. A excitação por laser violeta em 405 nm causou emissão vermelha em 725 nm com 1,163 (a.u.) de intensidade, enquanto a intensidade fluorescente vermelha máxima (3.779 a.u.) pode ser observada pela excitação da banda de Soret de porfirina a 432 nm, sendo que os resultados estão de acordo com a análise teórica do espectro UV-Vis (Figura 5). Os resultados de espectroscopia Cary Eclipse UV-Vis-NIR confirmam a ativação direta de fotossensibilizadores via irradiação com luz visível (Figura 6).

[081] Uma comparação entre UCNPs conjugados com anticorpo ou anticorpo-PS mostrando que após excitação do laser de 980 nm, o UCNP-7B2 apresentou emissão de luz visível em 550 nm (fluorescente verde) e 650 nm (fluorescente vermelha) (Figura 7A). A presença de IR700 PS na conjugação de UCNP-PIC pode causar a diminuição da fluorescência verde e o aumento da emissão da fluorescência vermelha devido à ativação indireta de fotossensibilizadores via irradiação NIR (Figura 7B).

[082] Sem usar um anticorpo secundário, a emissão fluorescente vermelha de IR700-PIC e porfirina-PIC foram detectadas diretamente nas células transfectadas com Env, pelo filtro Qdot 705 e filtro Qdot 655, respectivamente (Figura 8A). Ao usar o anticorpo secundário FITC, os PICs mostraram capacidade de ligação em células transfectadas com Env, enquanto Mab7B2-IR700 DAR4 mostrou ligação inespecífica às células 293T de controle (Figura 5B). A presença de CD4

solúvel (sCD4) mostrou um efeito sinérgico na capacidade de ligação da porfirina-7B2, em comparação com a ausência de sCD4 (Figura 8C).

[083] A capacidade de ligação de UCNP-PICs ao antígeno gp41 foi estudoada usando citometria de fluxo direta. Ao usar células transfectadas com HIV Env, observa-se de forma interessante que 7B2-IR700-UCNP tem mais emissão de fluorescência vermelha do que 7B2-IR700. Este aumento significa mais acúmulo de IR700 na membrana celular. Como esperado, o 7B2-UCNP não emitiu fluorescência vermelha, pois não continha fotossensibilizador e (Figura 9A). As células 293T de controle mostram a capacidade de ligação específica de PEG-UCNPs às células, no entanto, 7B2-IR700-UCNP mostrou ligação parcialmente não específica (Figura 9B).

[084] Para detectar a geração de ROS, as células incubadas pelos PICs foram irradiadas com 50 J/cm², em seguida, incubadas com a sonda fluorescente H₂DCF-DA. A irradiação foi aplicada usando um dispositivo de LED feito sob medida com um amplo espectro de luz (380-780 nm), já que o espectro azul pode excitar a banda Soret da porfirina em 432 nm, enquanto o espectro vermelho excita IR700-7B2 em 689 nm (Figura 10C). Sonda fluorescente H₂DCF-DA foi aplicada para detectar a produção de ROS em células vivas irradiadas com 50 J/cm² por meio de citometria de fluxo. As células transfectadas com Env incubadas com PICs exibiram um aumento significativo nos níveis de ROS, enquanto as células 293T de controle não apresentaram produção de ROS (Figura 10A). Paralelamente, no grupo de controle positivo, foi observada a produção de ROS em células 293T que foram tratadas com 80 µM H₂O₂ por 24 horas no escuro (Figura 10B). As células

irradiadas, sem incubação ou incubadas com anticorpo 7B2, mostraram um aumento na intensidade da fluorescência em comparação com as células não coradas no escuro.

[085] Para medir a produção de oxigênio singlete por PICs, as mudanças na absorção de ABDA em 400 nm foram medidas durante 50 minutos de irradiação contínua de 380-780 nm. Na Figura 10D, assumiu-se que 625 nM de anticorpo-porfirina (DAR de 4) contém 2500 nM de porfirina. Foi observada que a capacidade de 625 nM de anticorpo-porfirina para produzir oxigênio singlete era menor que 625 nM de porfirina. Na Figura 10E, IR700-7B2 (DAR de 4), mostrou mais geração de oxigênio singlete do que a molaridade igual da porfirina-7B2 (DAR de 4). Não houve diminuição óbvia na absorbância para as soluções ABDA irradiadas sem PIC ou com anticorpo 7B2 isolado (*naked*) (controles) (Figuras 10D e 10E). A Figura 10F demonstra as mudanças na absorção de ABDA em 400 nm durante 20 min de irradiação devido à geração de oxigênio singlete por UCNP-PICs após irradiação por NIR em 980 nm. O anticorpo UCNP-IR700 com DAR de 3 produziu mais oxigênio singlete do que o anticorpo porfirina UCNP (DAR: 4) na solução aquosa. A geração de oxigênio singlete por PSs foi extinta na presença de azida de sódio 0,01%. UCNP-7B2 não produziu oxigênio singlete. A geração de oxigênio singlete por UCNP-PICs prova a ativação indireta de PSs via LRET ou emissão de fôtons por UCNPs.

[086] Células 293T transfectadas com Env (293T/92UG) e células 293T de controle foram incubadas com uma diluição de PICs começando em 500 nM na presença de sCD4 (anti-gp120) por 4 horas, então foram testadas por fotoimunoterapia (PIT) com 20 J/cm². IR700-PIC com um DAR de 3 pareceu mais

citotóxico do que a porfirina-PIC. PICs não mostraram citotoxicidade escura nas células transfectadas nem morte inespecífica em células de controle 293T. Foi observada a inibição do crescimento celular devido à irradiação nas células sem tratamento PIC (estrelas verdes na Figuras 11A). Além disso, a fotocitotoxicidade da porfirina-7B2 aumentou duas vezes, aumentando o tempo de incubação de 1 hora para 4 horas, momento em que o conjugado MAb foi necessário para internalização. Paralelamente, a fotocitotoxicidade de IR700-7B2 não mudou significativamente, aumentando o tempo de incubação em 37°C (Figura 11B). Observações microscópicas antes e depois de PIT demonstraram a formação de bolha (setas azuis) devido à morte celular necrótica (Figura 11C).

[087] A fototoxicidade de PICs foi estudada em três modelos de localização de PIC; os PICs internalizados, assim como os modelos de ligação à membrana na presença e ausência de azida de sódio, como um agente de captura de O_2^- . Os diagramas de citometria de fluxo mostram as células 293T transfectadas com Env incubadas com PICs na presença ou ausência de azida de sódio por 1 hora, irradiadas na presença e ausência de azida de sódio, depois coradas com corante PI como indicador de morte celular. As células, incubadas com/sem azida, foram lavadas dos PICs e azida e, em seguida, irradiadas na presença ou ausência de azida. No modelo internalizado, ambos os PICs apresentaram citotoxicidade, porém IR700-7B2 com um DAR de 3 mostrou mais citotoxicidade do que porfirina-7B2. Além disso, foi comparada a citotoxicidade de PICs localizados na membrana, que foram irradiados na presença ou ausência de azida. A porfirina-7B2 localizada na membrana apresentou 40% de morte celular,

enquanto esta citotoxicidade foi inibida pela azida de sódio, devido à extinção do oxigênio singlete (estrelas verdes na Figura 12A e 12B). Os resultados para IR700-7B2 foram iguais. Foi realizada microscopia de fluorescência *ao vivo* para visualizar os locais de ligação celular dos conjugados durante a irradiação. Foi observada que a presença de porfirina-7B2 na membrana celular sem internalização foi suficiente para danificar a membrana, causando a internalização da porfirina-7B2, bem como do anticorpo secundário FITC, e indução de sinais necróticos, como inchaço celular e formação de bolha (Figura 12B). De acordo com os resultados da citometria de fluxo (Figura 8A), foi observada que a morte celular necrótica foi inibida por azida de sódio (Figura 12B). Os controles de espelho no escuro e anticorpo 7B2 não mostraram uma porcentagem significativa de morte celular.

[088] Para os ensaios de apoptose, as células transfectadas com Env foram incubadas por PICs durante 4 horas, irradiadas e depois o corante FITC/PI - Anexina V adicionado antes da análise de citometria de fluxo. Nenhum recurso relacionado a estágios de apoptose, como a exposição extracelular de fosfatidilserina, foi observado em resposta aos PICs. Os PICs mostraram morte celular, devido à apoptose tardia após 4 horas de incubação. O anticorpo controle 7B2 não mostrou morte celular nem sinais de apoptose (Figura 12C).

[089] O efeito de inatividade do vírus por PIT foi estudado em duas cepas virais do vírus HIV-1, X4 NL4-3 (Figura 13) e vírus JR-CSF (Figura 14) usando a linhagem celular Jurkat e a linhagem celular C8166.R5,

respectivamente.

[090] No primeiro estudo, após o tratamento do vírus X4 NL4-3 com PIT a 500 nM de PSs ou PICs foram demonstrados os níveis indetectáveis de carga de RNA viral (\log_{10} cópias/mL) (Figura 13A) e carga de DNA proviral (cópias de DNA do HIV/100 células) em cada região do LTR do HIV-1 (Figura 13B). Os resultados do PIT-tratado com o anticorpo 7B2 isolado (*naked*) mostrou uma diminuição significativa na replicação viral, mas ainda detectável. Na placa escura, amostras tratadas com mAb 7B2 ou PICs mostraram alguma diminuição na carga viral, devido ao efeito de neutralização do anticorpo no vírus, enquanto os PSs não mostraram inatividade do vírus na ausência de luz.

[091] A morfologia do vírus X4 NL4-3 não tratado e tratado com PIT foi examinada com microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Não houve diferenças na morfologia viral entre vírions não tratados ou controles claros e escuros (Figura 13C). Em contraste com os controles, os vírions irradiados com PICs ou PSs mostraram diferentes mudanças morfológicas dependendo do tipo de tratamento. Os vírions irradiados com 500 nM de corante IR700 mostraram aglomerados de partículas de valência múltipla, enquanto as outras amostras tratadas com PIT mostraram a manutenção de integridade estrutural da membrana ou membranas parcialmente destruídas sem aglomeração (Figura 13D).

[092] No segundo estudo usando o vírus JR-CSF, os resultados do p24 ELISA estavam de acordo com os resultados de carga viral de RNA do HIV do primeiro estudo. Na placa irradiada, os resultados para as amostras tratadas com PICs mostraram uma diminuição significativa na produção de p24,

em comparação com as amostras refletidas na escuridão. Na placa escura, as amostras tratadas com mAb 7B2 ou PICs mostraram alguma diminuição na produção de p24, devido ao efeito de neutralização do mAb 7B2 sobre o vírus. No dia 3, a irradiação com 20 J/cm² de luz (380–780 nm) nos vírus não tratados tem um efeito na inibição sobre a transfecção, no entanto, esta não é uma inibição de longo prazo à medida que a carga viral aumenta para os vírus irradiados no dia 4, em comparação com os vírus não tratados no escuro. Os resultados revelaram que a fotoinatividade máxima foi alcançada apenas quando os vírus da cepa JR-CSF do HIV-1 foram tratados com PIC e também foram expostos à luz (Figura 14).

[093] Os resultados de NIR-PIT usando UCNP-PICs mostram o direcionamento específico e a morte de células transfectadas enquanto as células de controle são preservadas. Além disso, os resultados do ensaio de citotoxicidade comprovam que o NIR-PIT pode causar a geração de oxigênio singlete por PSs que são ativados indiretamente por meio da reação LRET no UCNP. O UCNP-7B2 não apresentou citotoxicidade, pois não contém PS, indicando ausência de citotoxicidade do anticorpo UCNP após internalização celular (Figura 15).

[094] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

Referências:

- [095] 1. Davenport, M. P. et al. Functional cure of HIV: the scale of the challenge. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 45–54 (2019).

[096] 2. Ndung'u, T., McCune, J. M. & Deeks, S. G. Why and where an HIV cure is needed and how it might be achieved. *Nature* **576**, 397–405 (2019).

[097] 3. World Health Organization (WHO). *HIV Drug Resistance Report*. (2019).

[098] 4. Caskey, M., Klein, F. & Nussenzweig, M. C. Broadly neutralizing anti-HIV-1 monoclonal antibodies in the clinic. *Nat. Med.* **25**, 547–553 (2019).

[099] 5. Polito, L., Bortolotti, M., Battelli, M. G., Calafato, G. & Bolognesi, A. Ricin: An ancient story for a timeless plant toxin. *Toxins (Basel)*. **11**, 1–16 (2019).

[100] 6. Larson, S. M., Carrasquillo, J. A., Cheung, N. K. V. & Press, O. W. Radioimmunotherapy of human tumours. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 347–360 (2015).

[101] 7. Helal, M. & Dadachova, E. Radioimmunotherapy as a Novel Approach in HIV, Bacterial, and Fungal Infectious Diseases. *Cancer Biother. Radiopharm.* **33**, 330–335 (2018).

[102] 8. Ferrari, G. et al. Envelope-specific antibodies and antibody-derived molecules for treating and curing HIV infection. *Nat. Rev. Drug Discov.* (2016) doi:10.1038/nrd.2016.173.

[103] 9. Tsukrov, D. & Dadachova, E. The potential of radioimmunotherapy as a new hope for HIV patients. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **10**, 553–555 (2014).

[104] 10. Pincus, S. H. et al. Identification of Human Anti-HIV gp160 Monoclonal Antibodies That Make Effective Immunotoxins. *J. Virol.* **91**, JVI.01955-16 (2017).

[105] 11. Sadraeian, Mohammad Francisco E. G. Guimarães, Ana P. U. Araújo, David K. Worthylake, Louis LeCour Jr, S. H. P. Selective cytotoxicity of a novel

immunotoxin based on pulchellin A chain for cells expressing expressing HIV envelope. *Sci. Rep.* (2017) doi:10.1007/s11548-012-0737-y.

[106] 12. Sadraeian, M. et al. Prevention and Inhibition of TC-1 Cell Growth in Tumor Bearing Mice by HPV16 E7 Protein in Fusion with Shiga Toxin B-Subunit from shigella dysenteriae. *Cell J.* **15**, 176-81 (2013).

[107] 13. Med, A. N. & Hanaoka, Y. H. H. Applying near-infrared photoimmunotherapy to B-cell lymphoma: comparative evaluation with radioimmunotherapy in tumor xenografts. *Ann. Nucl. Med.* (2017) doi:10.1007/s12149-017-1197-9.

[108] 14. Sandland, J. & Boyle, R. W. Photosensitizer Antibody-Drug Conjugates: Past, Present, and Future. *Bioconjug. Chem.* **30**, 975-993 (2019).

[109] 15. Pincus, S. H. et al. Design and In Vivo Characterization of Immunoconjugates Targeting HIV gp160. *J. Virol.* **91**, 1-15 (2017).

[110] 16. Craig, R. B., Summa, C. M., Corti, M. & Pincus, S. H. Anti-HIV Double Variable Domain Immunoglobulins Binding Both gp41 and gp120 for Targeted Delivery of Immunoconjugates. *PLoS One* **7**, 1-13 (2012).

[111] 17. Buzzá, H. H. et al. Photodynamic therapy: Progress toward a scientific and clinical network in Latin America. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **13**, 261-266 (2016).

[112] 18. Wainwright, M., O'Kane, C. & Rawthore, S. Phenothiazinium photosensitisers XI. Improved toluidine blue photoantimicrobials. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **160**, 68-71 (2016).

[113] 19. Auwärter, W., Écija, D., Klappenberger, F. & Barth, J. V. Porphyrins at interfaces. *Nat. Chem.* **7**, 105-120

(2015).

[114] 20. Fujita, A. K. L. et al. Fluorescence evaluations for porphyrin formation during topical PDT using ALA and methyl-ALA mixtures in pig skin models. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **15**, 236–244 (2016).

[115] 21. Kim, S. et al. Luciferase-Rose Bengal conjugates for singlet oxygen generation by bioluminescence resonance energy transfer. *Chem. Commun.* **53**, 4569–4572 (2017).

[116] 22. Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B. W., Jori, G. & Kessel, D. Photodynamic Therapy. *J Natl Cancer Inst* **17**, 889–905 (1998).

[117] 23. Bacellar, I. O. L., Tsubone, T. M., Pavani, C. & Baptista, M. S. Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 20523–20559 (2015).

[118] 24. Caudle, A. S., Yang, W. T., Mittendorf, E. a & Kuerer, H. M. Cancer Cell-Selective In Vivo Near Infrared Photoimmunotherapy Targeting Specific Membrane Molecules. *Nat. Med.* **150**, 137–143 (2016).

[119] 25. Bryden, F. et al. Regioselective and stoichiometrically controlled conjugation of photodynamic sensitizers to a HER2 targeting antibody fragment. *Bioconjug. Chem.* **25**, 611–617 (2014).

[120] 26. Maruani, A. et al. A plug-and-play approach to antibody-based therapeutics via a chemoselective dual click strategy. *Nat. Commun.* **6**, 6645 (2015).

[121] 27. Bahou, C. et al. Disulfide Modified IgG1: An Investigation of Biophysical Profile and Clinically Relevant Fc Interactions. *Bioconjug. Chem.* **30**, 1048–1054 (2019).

[122] 28. Maruani, A.; Smith, M.E.B.; Miranda, E.; Chester, K.A.; Chudasama, V.; Caddick, S. A plug-and-play approach to antibody-based therapeutics via a chemoselective dual click strategy. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 1–9. [CrossRef] [PubMed].

[123] 29. Bahou, C.; Love, E.A.; Leonard, S.; Spears, R.J.; Maruani, A.; Armour, K.; Baker, J.R.; Chudasama, V. Disulfide Modified IgG1: An Investigation of Biophysical Profile and Clinically Relevant Fc Interactions. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30*, 1048–1054. [CrossRef] [PubMed].

[124] 30. Chester, K.A.; Baker, R.; Caddick, S. Next generation maleimides enable the controlled assembly. *R. Soc. Chem. 2014*, *10*, 1–52.

[125] 31. Jackson, D.Y. Processes for Constructing Homogeneous Antibody Drug Conjugates. *Org. Process. Res. Dev.* **2016**, *20*, 852–866. [CrossRef].

[126] 32. Komninaakis, S. V. et al. HIV-1 proviral DNA loads (as determined by quantitative PCR) in patients subjected to structured treatment interruption after antiretroviral therapy failure. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 2132–2133 (2012).

[127] 33. Kumar, A. M. et al. Human immunodeficiency virus type 1 in the central nervous system leads to decreased dopamine in different regions of postmortem human brains. *J. Neurovirol.* **15**, 257–274 (2009).

[128] 34. AIDS Research and Reference Reagent Program [RRRP], National Institutes of Health [NIH].

[129] 35. Sadraeian Mohammad et al., Photoimmunotherapy Using Cationic and Anionic Photosensitizer-Antibody Conjugates against HIV Env-Expressing Cells. *Int. J. Mol.*

Sci. 2020, 21, 9151; doi:10.3390/ijms21239151.

[130] 36. Sadraeian Mohammad et al., Photoinduced Photosensitizer-Antibody Conjugates Kill HIV Env-Expressing Cells, Also Inactivating HIV. *ACS Omega* 2021, June 8, 2021, <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c01721>.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção de fotoimunoconjugados (PIC), caracterizado por compreender as seguintes etapas:

(1) conjugação dos fotossensibilizadores com o anticorpo anti-envelope HIV por meio de:

(a) conjugação de porfirina-anticorpo por química de cliques e

(b) conjugação e otimização do anticorpo IR700 por modificação de lisina;

(2) conjugação entre UCNPs e anticorpo-fotossensibilizador (UCNP-PIC).

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por na etapa (1) (a), a alcino dibromopiridazinadiona ser conjugada ao anticorpo MAb 7B2, sendo, em seguida, o conjugado anticorpo-alcino reagido com a porfirina azida.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por na etapa (1) (b), o conjugado anticorpo-alcino ser covalentemente ligado ao corante ftalocianina IR700, via modificação de lisina, sendo a porção N-hidroxisuccinimida (NHS) éster do corante reagida com o grupo amina primária do anticorpo, preferivelmente, o aminoácido Lys.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por, concomitantemente, o anticorpo MAb 7B2 ser funcionalmente reativado com ligações dissulfeto intercadeias com um alcino estirado por dibromopiridazinadiona e uma azida porfirina.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por na etapa (2), o MAb-PS (PIC) obtido na

etapa (1) ser conjugado com as *Upconversion Nanoparticles* (UCNP) formando as UCNP-PICs por meio de dibenzociclooctina (DBCO).

6. Processo, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelas *Upconversion Nanoparticles* serem amino-functionalizadas e PEGuiladas.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelas UCNP-PICs serem ativadas por luz infravermelha (NIR) na faixa de 975 - 980 nm e convertidas em luz visível pelas UCNPs, sendo ativado o fotossensibilizador pela luz visível com duas emissões máximas em 545 nm e 660 nm ou por Transferência de Energia por Ressonância da Luminescência (LRET).

8. Fotoimunoconjungados obtidos pelo processo conforme definido nas reivindicações 1 a 7, **caracterizados** por compreenderem a conjugação do anticorpo monoclonal Anti-gp41 (7B2 MAb) isolado, os fotossensibilizadores porfirina portadora de azida, o corante ftalocianina IRDye 700DX e as *Upconversion Nanoparticles* (UCNP).

9. Uso dos fotoimunoconjungados conforme definidos na reivindicação 8, **caracterizado** por ser na preparação de uma fotoimunoterapia (PIT) para o tratamento da doença da imunodeficiência humana (HIV).

10. Uso, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo vírus HIV compreender duas linhagens do vírus HIV-1, X4 HIV-1 NL4-3 e vírus JR-CSF.

11. Uso, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de a fotoimunoterapia (PIT) para doença do HIV compreender eliminar tanto as células que expressam o HIV quanto o próprio vírus do HIV.

12. Uso, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** por compreender opcionalmente o tratamento de outras doenças virais e câncer.

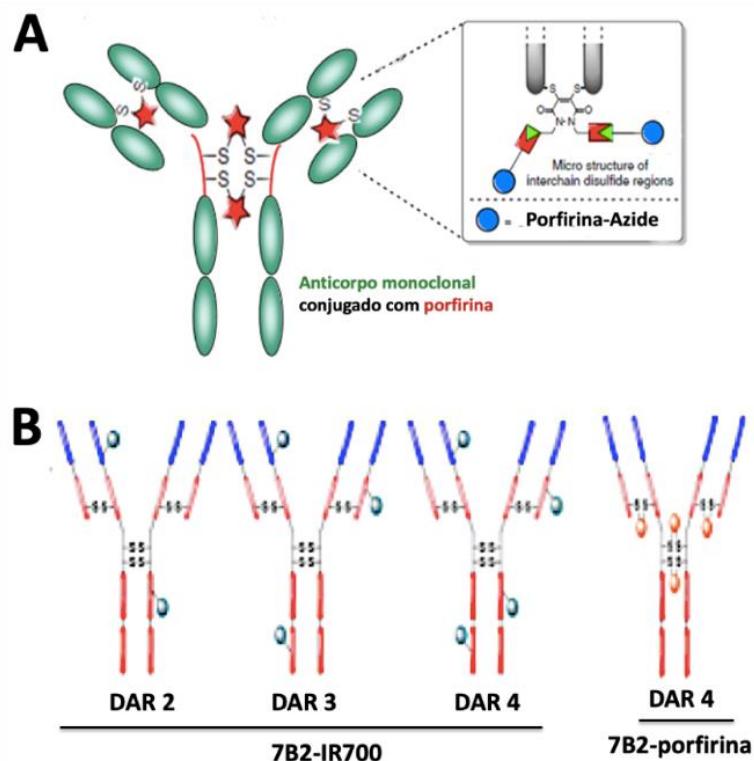


Figura 1

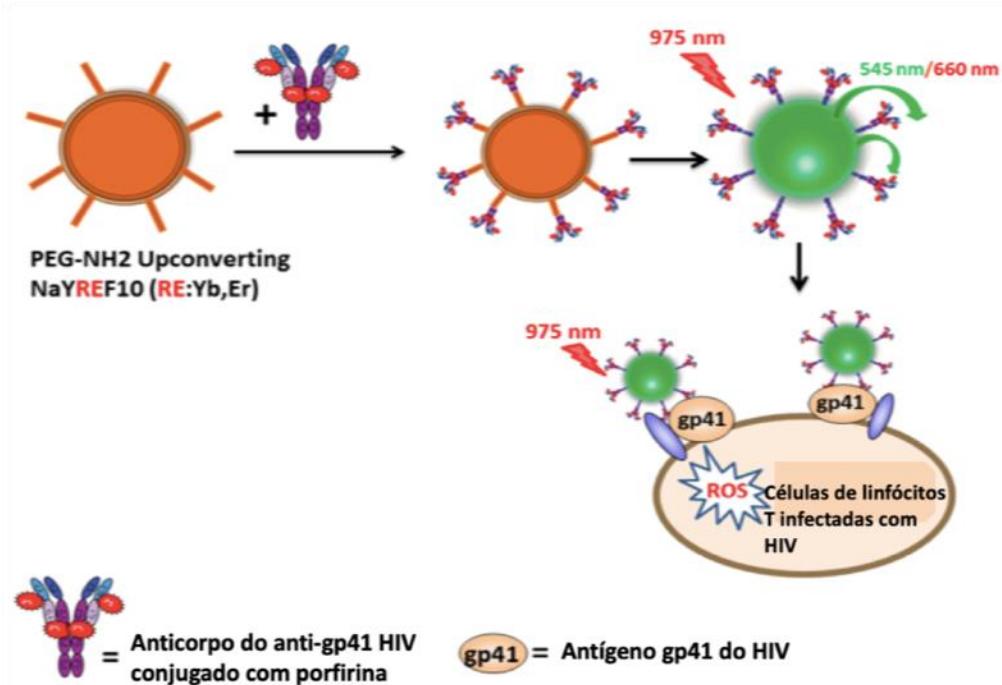


Figura 2

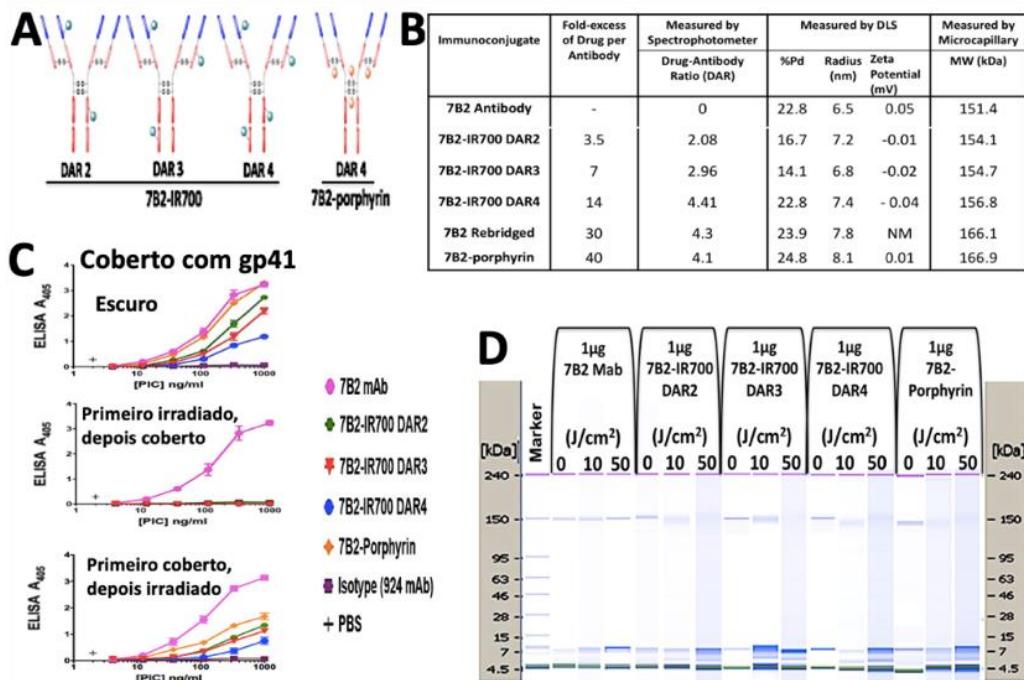


Figura 3

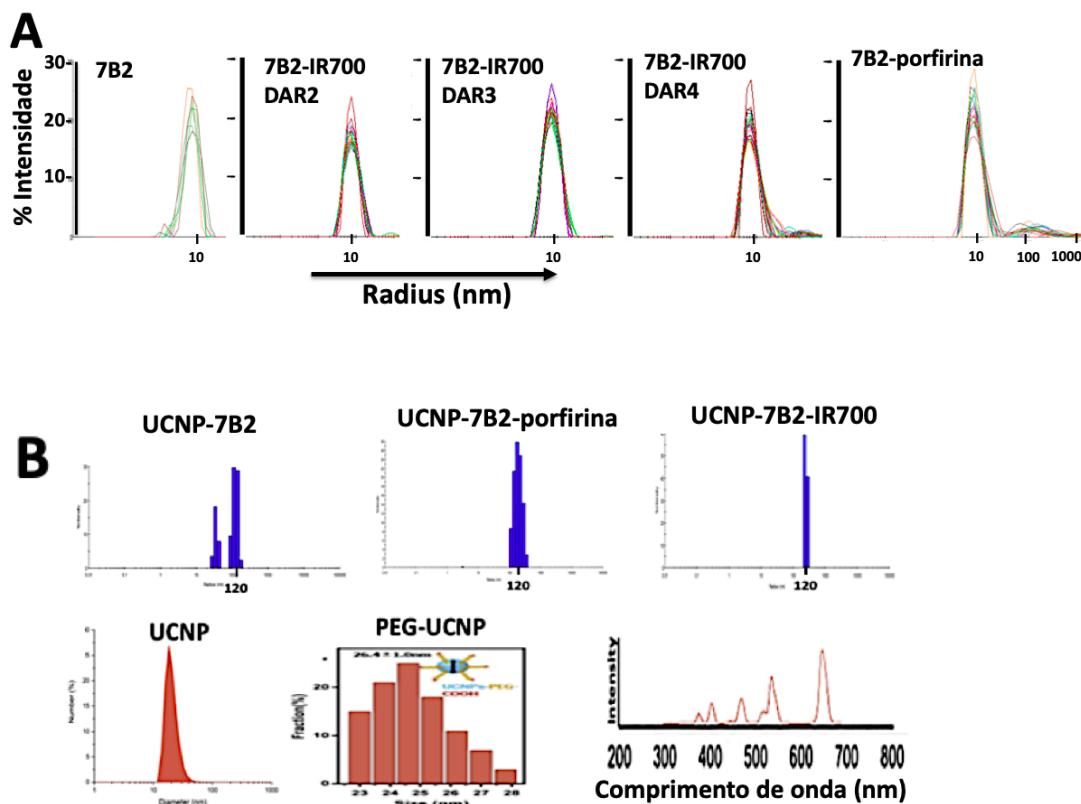


Figura 4

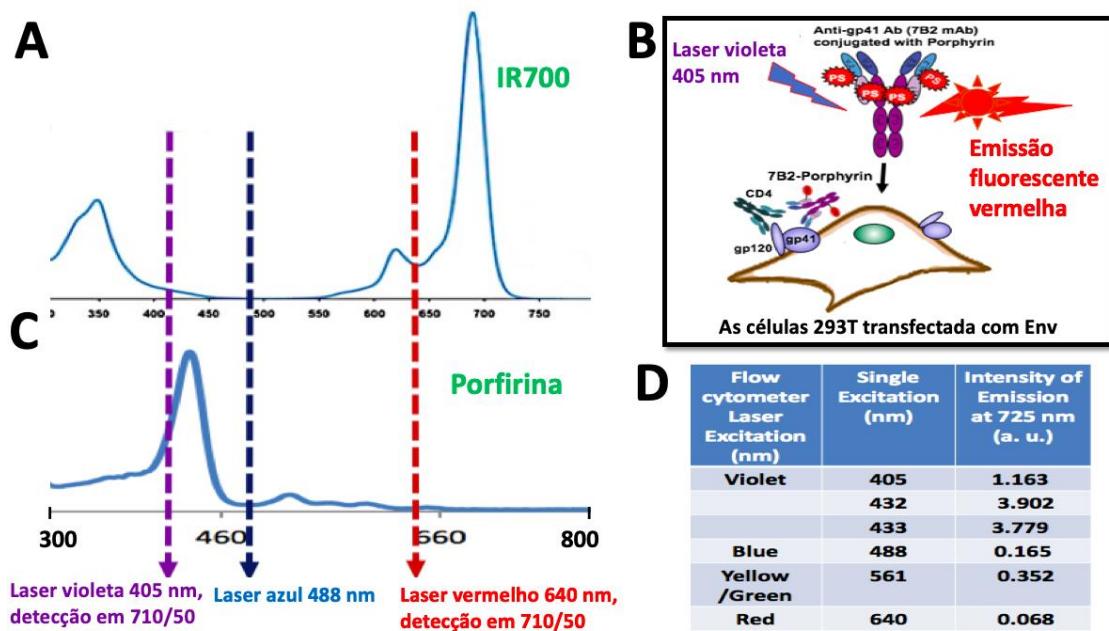


Figura 5

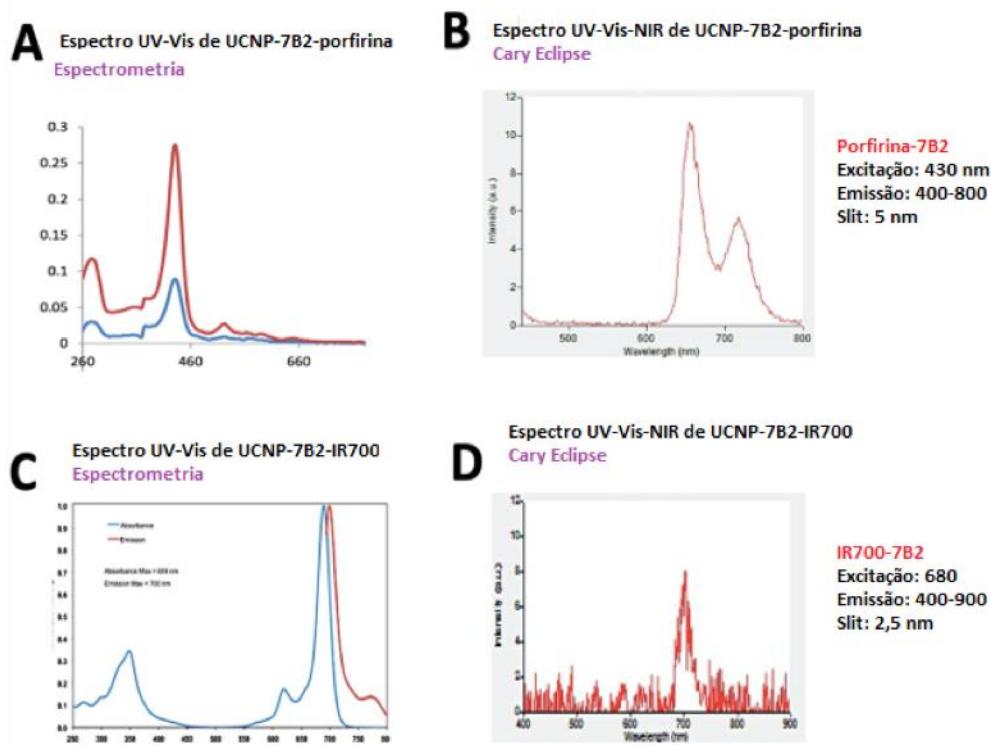


Figura 6

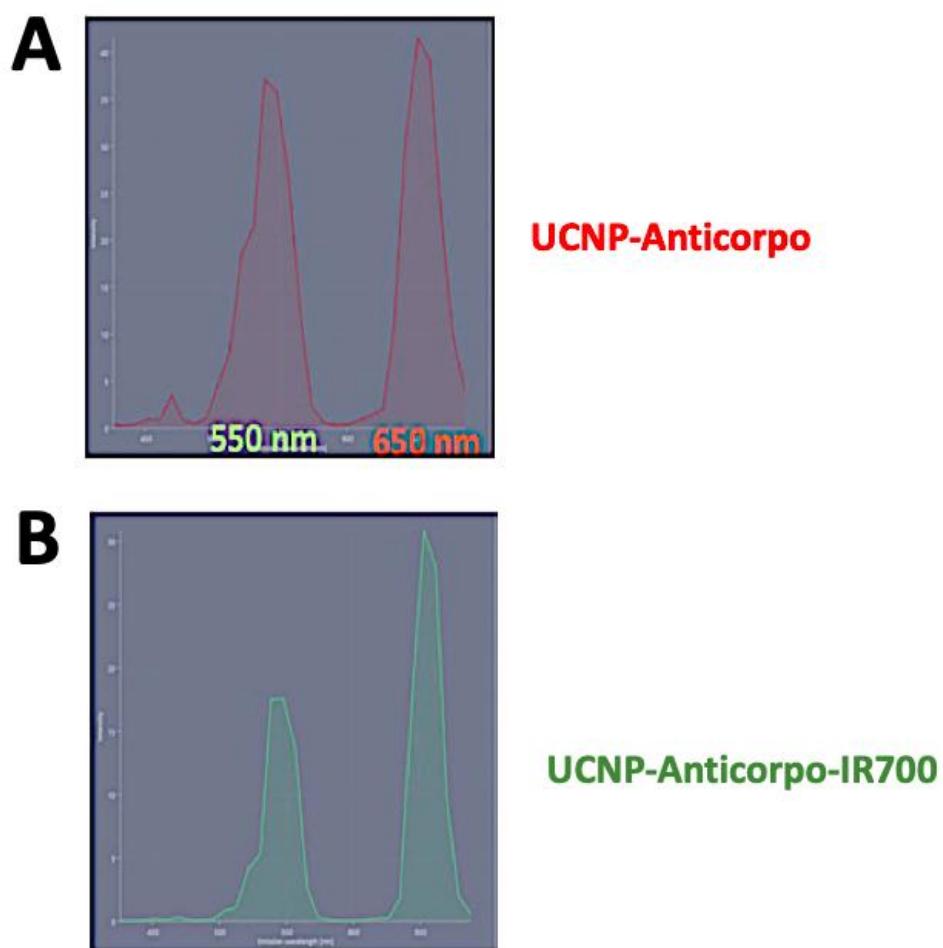


Figura 7

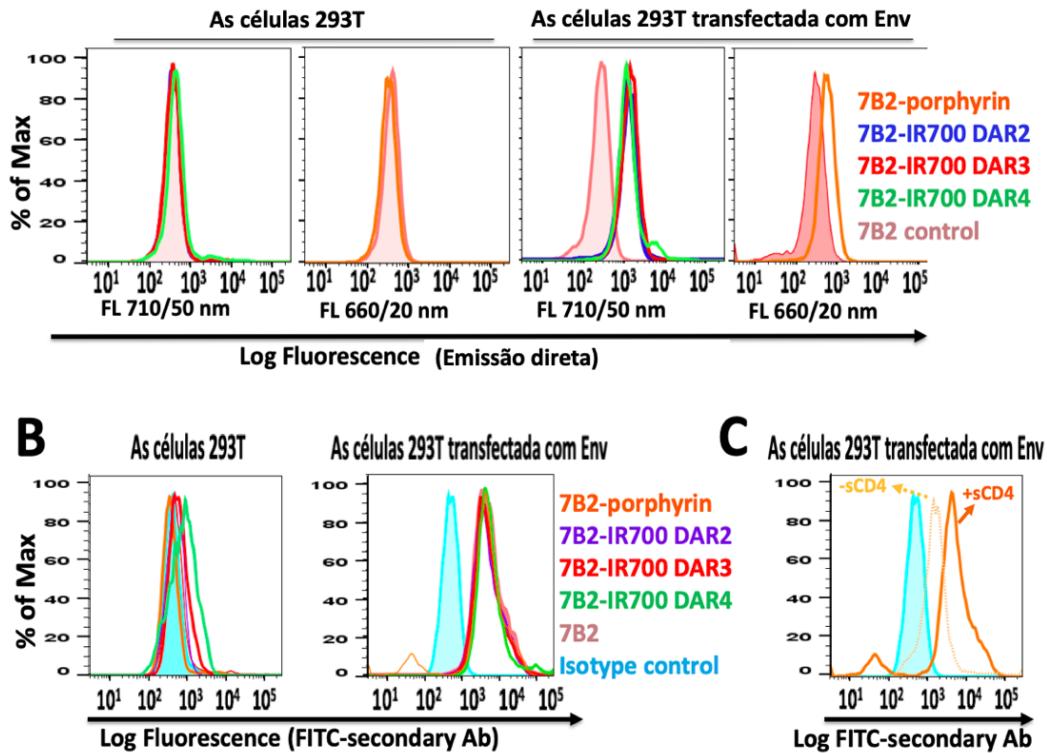


Figura 8

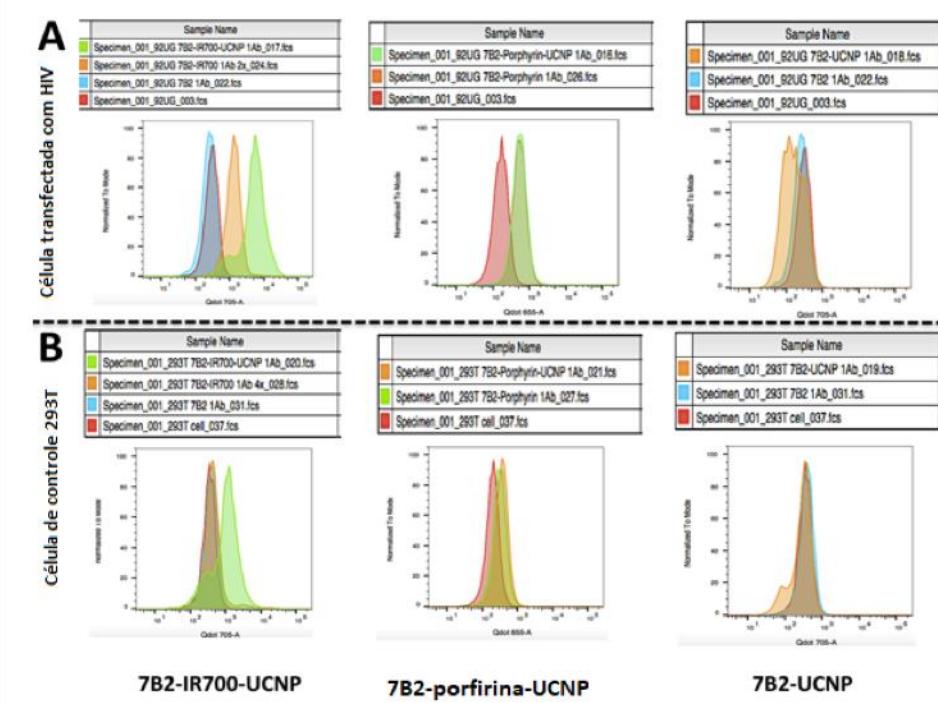


Figura 9

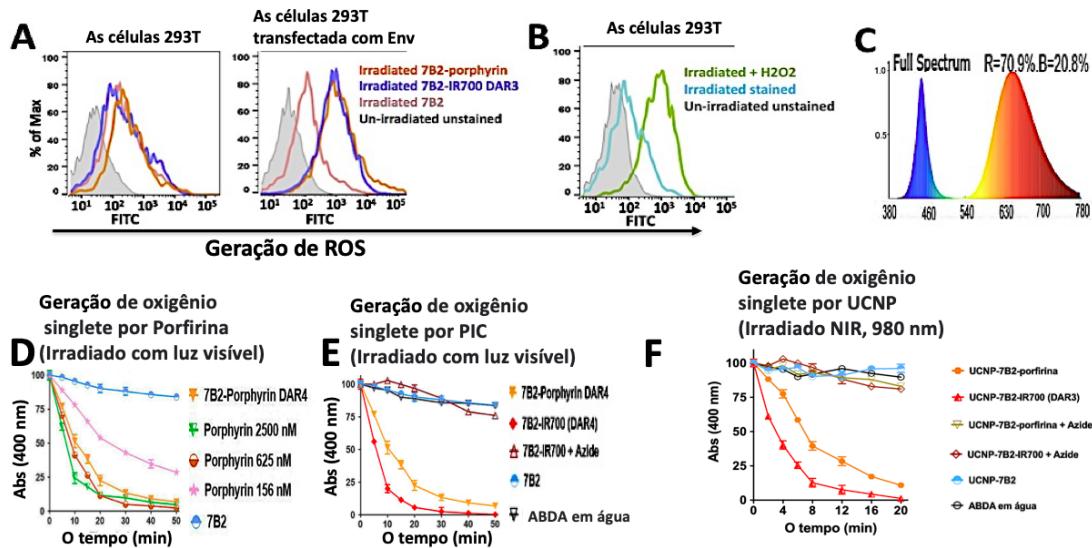


Figura 10

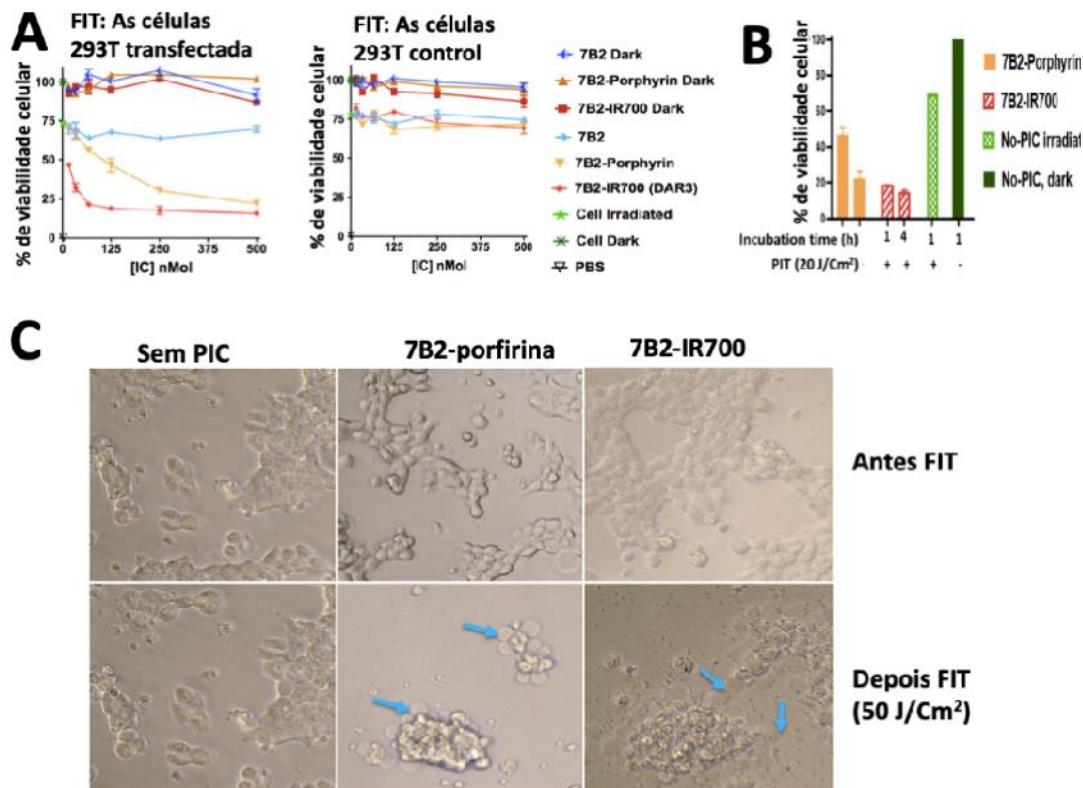


Figura 11

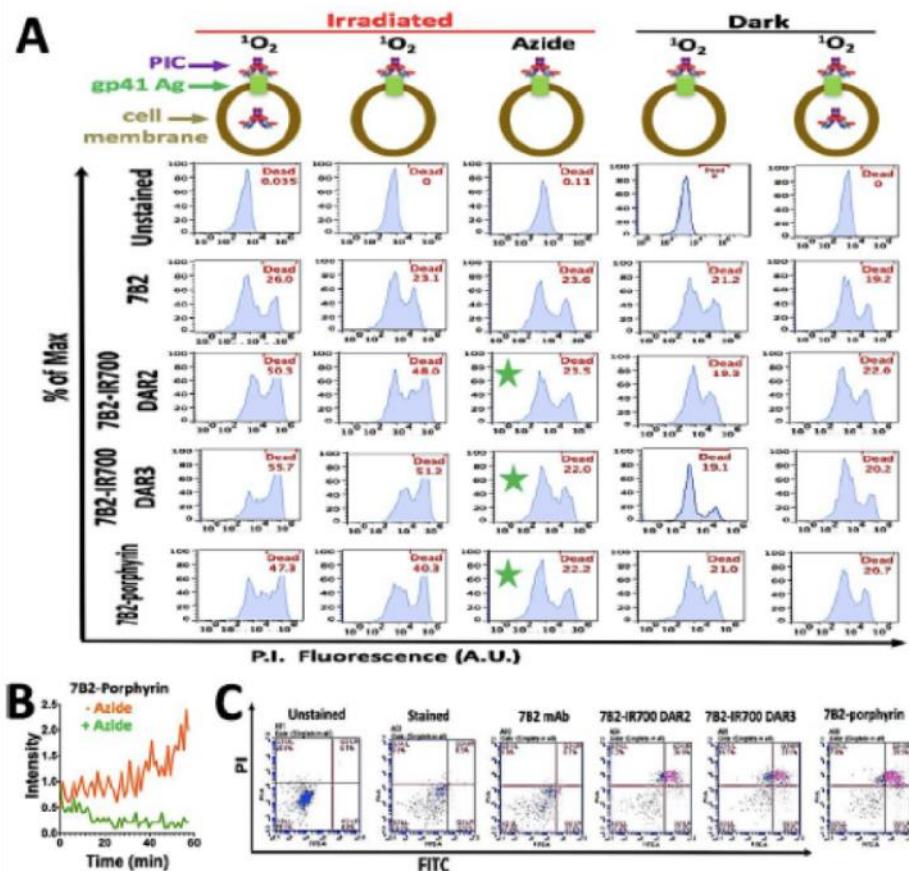


Figura 12

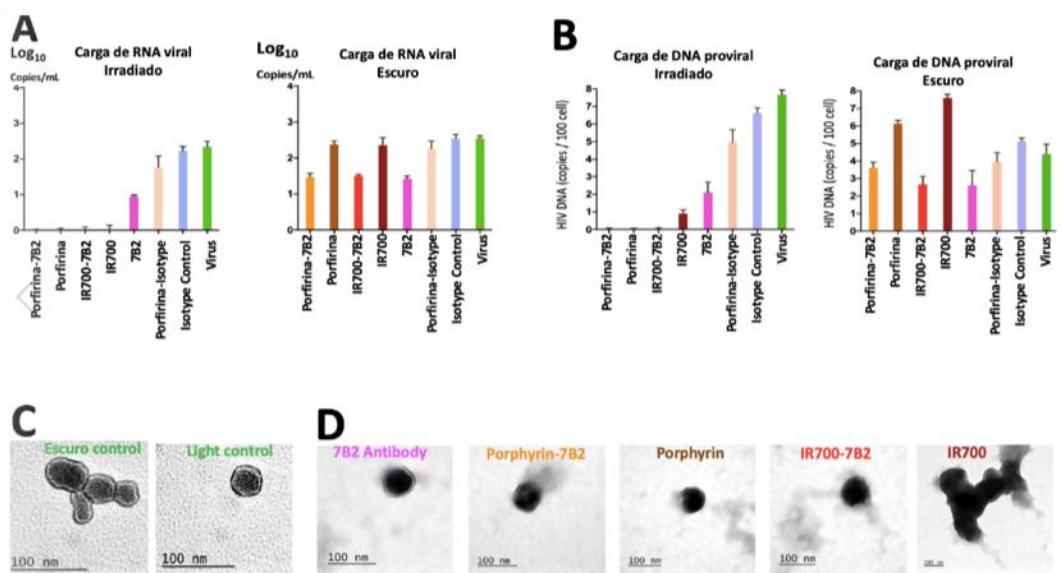


Figura 13

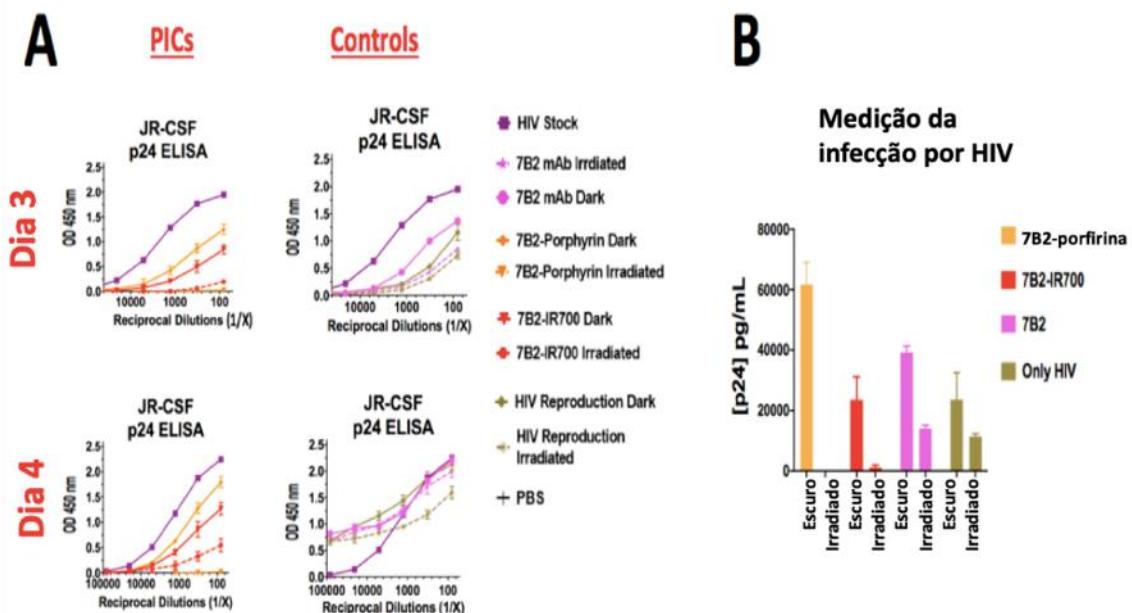


Figura 14

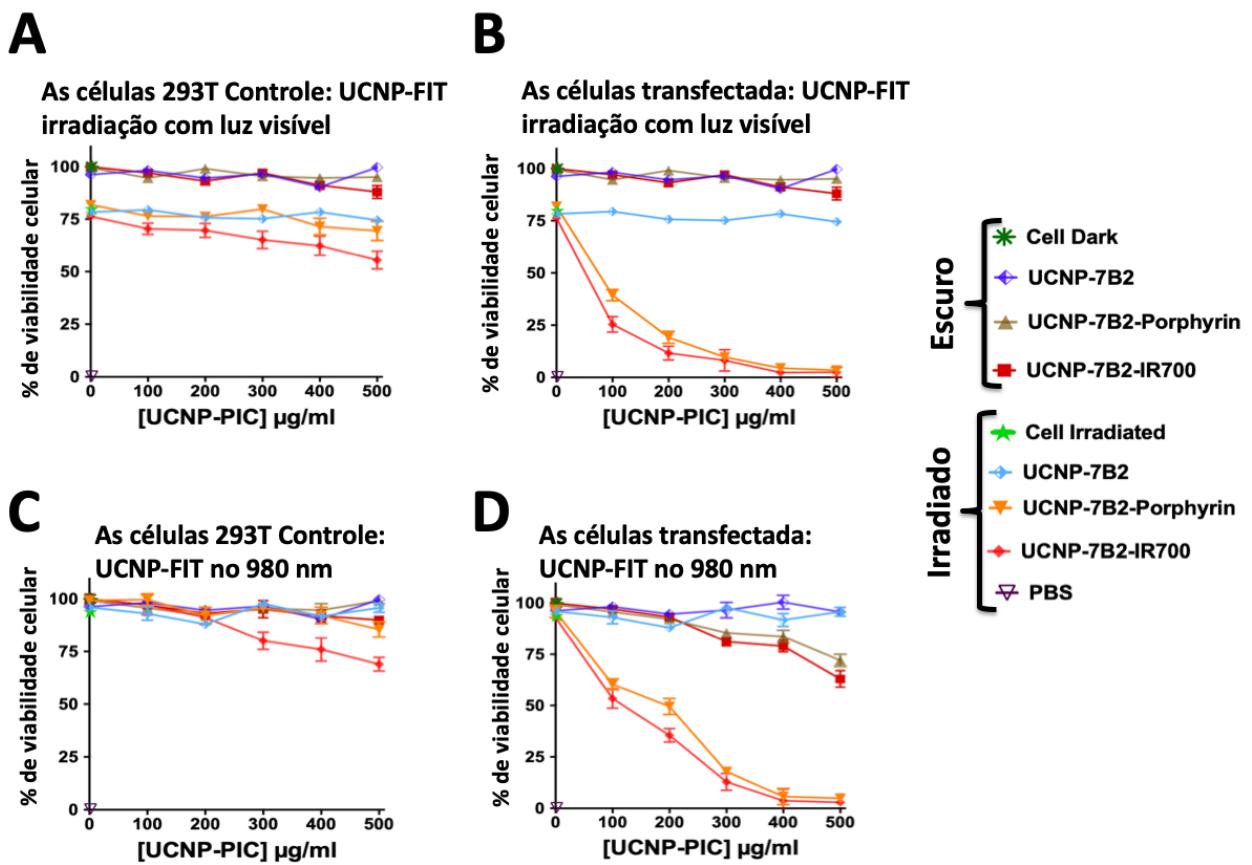


Figura 15

Resumo

**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FOTOIMUNOCONJUGADOS,
FOTOIMUNOCONJUGADOS ASSIM OBTIDOS E USO DOS
FOTOIMUNOCONJUGADOS NA PREPARAÇÃO DE UMA FOTOIMUNOTERAPIA
PARA O TRATAMENTO DO VÍRUS DO HIV**

A presente invenção se insere no campo da fotoimunoterapia viral, e mais particularmente, ela se refere ao Processo de obtenção de fotoimunoconjungados, aos Fotoimunoconjungados assim obtidos e o Uso destes na preparação de uma fotoimunoterapia para o tratamento do vírus da imunodeficiência humana (HIV).

Dita invenção revelou ser capaz de prover uma preparação para matar especificamente as células infectadas pelo HIV no sangue, nos nódulos linfáticos e em tecidos profundos.