

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Felipe Cocchiarali Royg

Nanopartículas lipídicas para liberação de ácidos nucleicos: uma revisão da literatura

Florianópolis

2022

Felipe Cocchiarali Royg

Nanopartículas lipídicas para liberação de ácidos nucleicos: uma revisão da literatura

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof. Dr. Elenara Lemos Senna

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Royg, Felipe Cocchiarali
Nanopartículas lipídicas para liberação de ácidos
nucleicos : uma revisão da literatura / Felipe Cocchiarali
Royg ; orientador, Elenara Lemos Senna, 2022.
47 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Nanopartículas lipídicas. 3. Carreadores
de ácidos nucleicos. I. Senna, Elenara Lemos. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Farmácia. III. Título.

Felipe Cocchiarali Royg

Nanopartículas lipídicas para a liberação de ácidos nucleicos: uma revisão da literatura

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia.

Florianópolis, 12 de dezembro de 2022.



Coordenação do Curso

Banca examinadora



Profa. Dra. Elenara Lemos Senna

Orientadora



Profa. Dra. Mariele Paludetto Sanches

Instituição UFSC



Prof. Dr. Carlos Rogerio Tonussi

Instituição UFSC

Florianópolis, 2022

RESUMO

Os ácidos nucleicos (AN) são moléculas com um grande potencial terapêutico e o desenvolvimento de nanopartículas lipídicas (NPL) permite que sejam veiculados de forma eficiente e segura. Para o avanço dessas formulações é necessário estabelecer os componentes dessas estruturas, suas propriedades químicas e físico-químicas e como essas interferem em sua biodistribuição e efetividade. Atualmente, 41 medicamentos contendo nanopartículas lipídicas como carreadores de ácidos nucleicos estão em fase de estudo clínico, sendo que três medicamentos já estão no mercado, aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), Onpattro® (Alnylam® Pharmaceuticals), Comirnaty® (BioNTech/Pfizer) e Spikevax® (Moderna). Esse trabalho faz uma revisão sobre o desenvolvimento e o estado atual das NPLs que fazem o carregamento de ANs, determinando os lipídios catiônicos ionizáveis, fosfolipídios, colesterol e lipídios peguillados como os componentes principais dessas formulações. Os métodos de vetorização ativo e passivo são explorados, onde indicam que tanto modificações químicas, e físico-químicas, quanto a introdução de um ligante ativo no sistema, influenciam na biodistribuição e atividade dos medicamentos.

Palavras-chave: ácido nucleico; nanocarreador lipídico; nanopartícula lipídica.

ABSTRACT

Nucleic acids (NA) are molecules with a high therapeutic potential, and the development of lipid nanoparticles (LNP) allows them to be efficiently and safely delivered. For the advancement of these formulations it is necessary to establish the components of these structures, their chemical and physical-chemical properties, and how these interfere in their biodistribution and effectiveness. Currently, 41 medicines containing lipid nanoparticles as nucleic acid carriers are in clinical trial phase, being that 3 of them are already on the market, approved by the Food and Drug Administration (FDA), Onpattro® (Alnylam® Pharmaceuticals), Comirnaty® (BioNTech/Pfizer) and Spikevax® (Moderna). This paper reviews the development and current state of LNPs that carry nucleic acids, determining ionizable cationic lipids, phospholipids, cholesterol and pegylated lipids as the main components of these formulations. Active and passive targeting methods are explored, indicating that chemical and physical-chemical modifications, as well as the introduction of an active ligand into the system, influence the biodistribution and activity of medicines.

Keywords: nucleic acid; lipid nanocarrier; lipid nanoparticle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Benefícios do uso de nanocarreadores para a liberação de ácidos nucleicos.....	15
Figura 2 – Representação esquemática das NPLs como carreadoras de ANs.....	18
Figura 3 - Representação da conduta pH-dependente dos lipídios catiônicos sobre a encapsulação e liberação endossomal de ANs.....	20
Figura 4 – Interação do lipídio catiônico ionizável com a membrana do endossoma.....	21
Figura 5 - Evolução da estrutura química de lipídios catiônicos ionizáveis.....	23
Figura 6 - Mecanismo proposto para a formação das NPLs para a produção de vacinas de RNAm pela técnica de diluição de uma solução etanólica dos lipídios em uma fase aquosa contendo o AN.....	26
Figura 7 - Mecanismo de liberação de siRNA mediado por NPLs nos hepatócitos.....	27
Figura 8 - Efeito da inclusão da molécula SORT na liberação sítio específica de NPLs.....	29
Figura 9 - Estrutura química do ATX-1.....	35
Figura 10 - Estrutura química dos lipídios catiônicos ionizáveis incorporados nas formulações de NPL carreadoras de RNAm em estudo de fase clínica das vacinas SARS-CoV-2.....	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Medicamentos que se encontram em estudos de fase clínica para combater doenças infecciosas virais, que possuem ácido nucleico como fármaco, veiculados em nanopartículas lipídicas.....	33
Quadro 2 - Medicamentos em estudos de fase clínica contra doenças oncológicas, que possuem ácido nucleico como fármaco, veiculados em nanopartículas lipídicas.....	36
Quadro 3 - Medicamentos em estudos de fase clínica contra doenças genéticas, que possuem ácido nucleico como fármaco, veiculados em nanopartículas lipídicas.....	37
Quadro 4 - Componentes das NPLs aprovadas no mercado.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
AN	Ácido Nucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
siRNA	Pequeno Ácido Ribonucleico de Interferência
miRNA	Micro Ácido Ribonucleico
OAS	Oligonucleotídeo Anti-Senso
RNash	Ácido Ribonucleico <i>Short Hairpin</i>
RNAm	Ácido Ribonucleico Mensageiro
CRISPR	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas
Cas9	Proteína 9 associada ao CRISPR
CFDA	<i>China's Food and Drug Administration</i>
NPL	Nanopartícula Lipídica
NP	Nanopartícula
pH	Potencial Hidrogeniônico
PEG	Poli(etil)enoglicol
pKa	Constante de Dissociação de um Ácido
DODAP	1,2-dioleoil-3-dimetilamônio-propano
DLin-DMA	1,2-dilinoiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano
DLin-KC2-DMA	2-[2,2-bis[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil]-1,3-dioxolan-4-il]-N,N-dimetiletanamina
DLin-MC3-DMA	(6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriacont-6,9,28,31-tetraeno-19-il-4-(dimetilamino)butanoato
L319	Lipídio 319
DSPC	Diestearoilfosfatidilcolina
ApoE	Apolipoproteína E
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LDLR	Receptor da Lipoproteína de Baixa Densidade
RISC	Complexo de Silenciamento Induzido por Ácido Ribonucleico
SORT	<i>Selective organ targeting</i>
DOTAP	1,2-dioleoil-3-trimetilamônio propano
PECAM-1	Anticorpo específico à molécula de adesão celular vascular
ICV	Intracerebroventricular

FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
COVID-19	Doença do Coronavírus 19
RNAse	Pequeno Ácido Ribonucleico de Amplificação Própria
MPVh	Metapneumovírus Humano
HPV3	Vírus Papiloma Humano tipo 3
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave do Coronavírus 2
DNAp	Ácido Desoxirribonucleico Plasmidial
HPV	Vírus Papiloma Humano
IL-23	Interleucina 23
IL-36 γ	Interleucina 36 γ
OX40L	Ligante para OX40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	METODOLOGIA.....	16
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1	NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS COMO CARREADORES DE ÁCIDOS NUCLEICOS: ESTRUTURA COMPOSIÇÃO E MECANISMO DE LIBERAÇÃO.....	17
4.2	PRODUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS.....	25
4.3	ESPECIFICIDADE PELO ALVO TERAPÊUTICO.....	26
4.4	O ESTADO ATUAL DO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS PARA LIBERAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	31
4.4.1	Medicamentos em estudos de fase clínica.....	31
4.4.2	Medicamentos comercializados baseados em nanopartículas lipídicas para liberação de ácidos nucleicos.....	38
5	CONCLUSÕES.....	42
	REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

As doenças hereditárias, assim como a predisposição a certas doenças, têm sido associadas a genes específicos, sendo que mais de 3000 genes foram correlacionados a tais condições genéticas e 500 identificados como responsáveis pelo risco aumentado às mesmas. Doenças como fibrose cística, anemia falciforme e a doença de Huntington têm sido consideradas incuráveis e unicamente os sintomas podem ser gerenciados. Mesmo assim, tratamentos convencionais com a administração de pequenas moléculas de fármacos ou proteínas são limitados devido a aspectos relacionados à baixa biodisponibilidade, baixa estabilidade, e ausência de especificidade ao sítio de ação (HOLL; LEE; HUANG, 2021).

A habilidade de fazer modificações pontuais no genoma humano tem sido o objetivo da medicina desde o conhecimento do ácido desoxirribonucleico (DNA) como unidade básica da hereditariedade. Este tipo de procedimento tornou-se possível por conta dos avanços da genética e da bioengenharia, que permitiram a manipulação de vetores para a entrega do material extracromossomal em células alvo (GONÇALVES; PAIVA, 2017). Nas últimas décadas, muitas pesquisas têm sido direcionadas à busca de estratégias para a modificação e reparo de genes causadores de doenças genéticas. A terapia gênica e a utilização de ácidos nucleicos (AN) trouxeram muitas expectativas para o meio científico por gerar uma alternativa aos tratamentos convencionais, levando à esperança de que doenças que hoje são consideradas intratáveis consigam atingir resultados clínicos satisfatórios. Entende-se por terapia gênica como a capacidade do melhoramento genético por meio da correção de genes alterados (mutados) ou modificações sítio-específicas, que tenham como alvo o tratamento terapêutico. Seu princípio parte do conhecimento de que defeitos ou mutações em genes levam à produção exacerbada ou à supressão de proteínas de forma maléfica ao organismo (GONÇALVES; PAIVA, 2017; SILVA; MATTE; GIUGLIANI, 2001).

Após décadas de desenvolvimento, a terapia gênica tem mostrado grande potencial para o tratamento ou prevenção de doenças causadas por anomalias e defeitos genéticos, tais como câncer, doenças cardiovasculares, desordens neurodegenerativas, assim como doenças causadas por vírus. Até o presente momento, medicamentos empregados na terapia gênica incluem plasmídeos (pequenos fragmentos de DNA), pequenos RNAs de interferência (siRNA), micro-RNAs (miRNA), *short hairpin* RNAs (RNAsh), RNA mensageiro (RNAm), oligonucleotídeos antisense (OAS), e sistemas CRISPR/Cas9 (CHEN; HU; JU, 2020; HOLL; LEE; HUANG, 2021, PAN *et al.*, 2021). Ácidos nucleicos (ANs) como fármacos controlam as funções biológicas das células com base na informação da sequência de nucleotídeos. A

ação destes fármacos é baseada sobre a sua expressão nas células, ou mediada por meio da regulação de genes que apresentam sequência complementar. Os ANs podem ser classificados em cinco categorias, conforme a maneira na qual agem em alvos específicos, ou seja: (i) por inibição; (ii) modulação da emenda (*splice-switching*), (iii) edição, (iv) aumento e (v) substituição (YAMADA, 2021). O tratamento pode ser aplicado de diferentes maneiras, baseando-se na doença para qual a terapia é proposta. Para doenças monogênicas (com alteração em apenas um gene), como por exemplo a hemofilia e a fibrose cística, o tratamento se baseia na edição do gene e/ou inserção de cópias funcionais de RNA. No entanto, para doenças multifatoriais, além da ação conjunta de diversos genes, fatores ambientais e epigenéticos afetam a complexidade da doença e dificultam o tratamento (SILVA; BARBOSA JUNIOR, 2018).

Apesar do potencial uso de medicamentos à base de ácidos nucleicos na terapêutica, o desenvolvimento de formulações seguras e eficazes é um desafio para a indústria farmacêutica, uma vez que ANs sofrem rápida degradação por endonucleases nos fluidos biológicos. As endonucleases são enzimas importantes para o organismo, pois atuam contra a invasão viral, através da degradação de ANs extracorpóreos na circulação sistêmica. No entanto, estas enzimas também são responsáveis por degradar ANs terapêuticos, resultando em rápida depuração renal e curto tempo de circulação sanguínea. Além disso, para produzir o efeito terapêutico desejado, os ANs necessitam entrar nas células. No entanto, tais moléculas são negativamente carregadas e grandes em tamanho, de modo que são incapazes de se difundir através das membranas plasmáticas. Mesmo que pequenas quantidades entrem nas células, elas podem permanecer nos lisossomas, resultando em baixa eficácia terapêutica. Finalmente, a biodisponibilidade de ANs pode ser baixa devido à presença de barreiras endoteliais, retenção hepática, depuração renal, e acúmulo tecidual inesperado (WENG *et al.*, 2020).

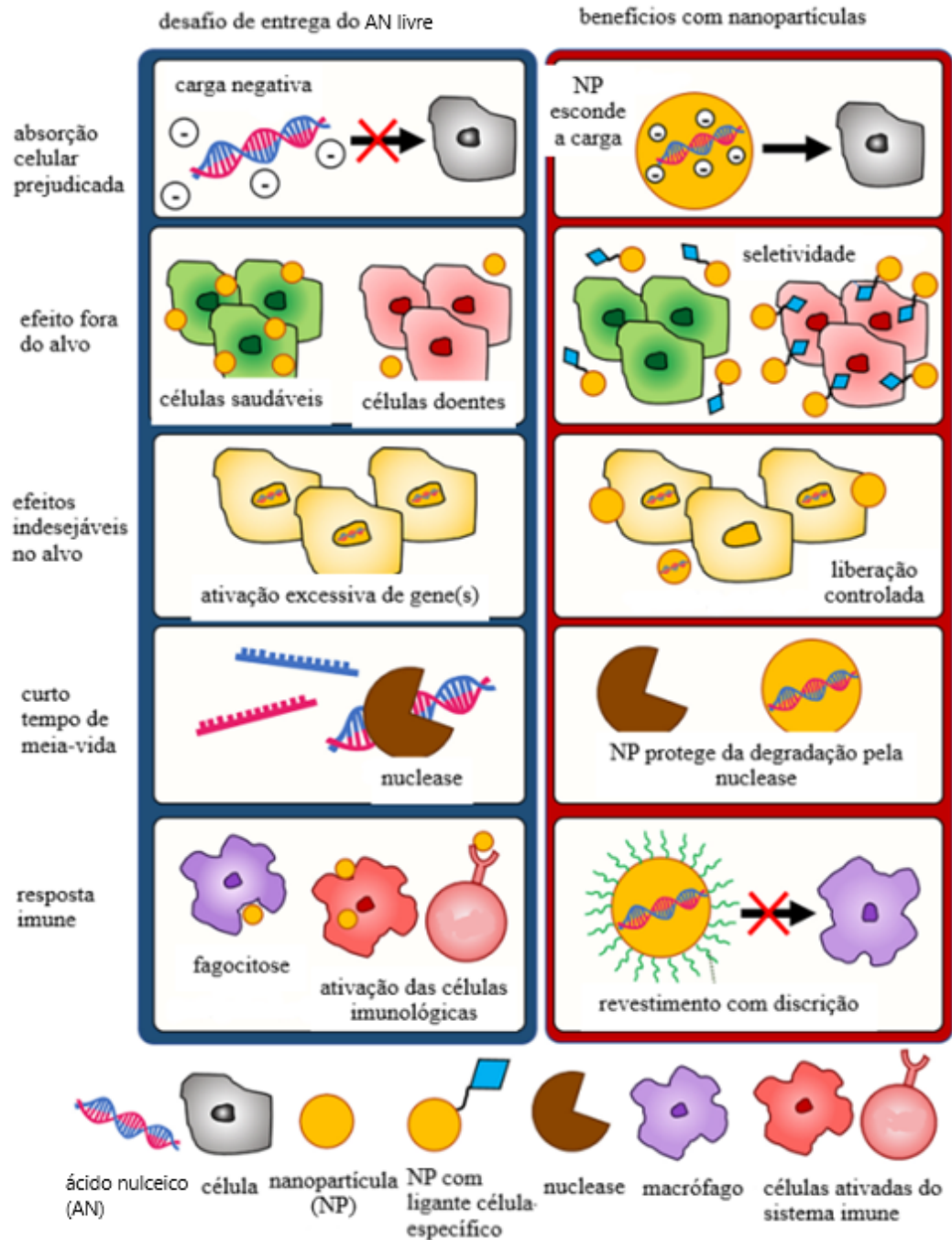
Para superar as dificuldades encontradas na administração de ANs, pesquisadores têm buscado a utilização de vetores que sejam capazes de encapsular e liberar material genético no interior das células, protegendo-os assim da degradação em meio biológico. Tais vetores precisam ser extravasados da circulação sistêmica para tecidos alvos, o que requer que apresentem características e ligantes específicos, de modo que possam ser internalizados pelas células. Os vetores empregados na liberação de ANs são classificados em dois grandes grupos: virais e não virais (JIAO *et al.*, 2020). A partir do conhecimento que os vírus possuem uma alta capacidade de invadir células, a utilização de suas estruturas como vetores de ácidos nucleicos foi amplamente explorada, sendo que em 2003, o Gendicine™, medicamento que

utiliza um vetor adenoviral não replicativo, foi aprovado pela *China's Food and Drug Administration* (CFDA), para o tratamento de tumores de cabeça e pescoço, sendo o primeiro medicamento baseado na terapia gênica aprovado no mundo (SILVA; BARBOSA JÚNIOR, 2018; WENG *et al.*, 2020).

Apesar dos vetores virais apresentarem boa eficiência na transfecção e na expressão desejada, apresentam algumas desvantagens. Esses vetores possuem alta imunogenicidade (potencial de provocar uma resposta imune), baixa especificidade pelo alvo terapêutico, limitação da carga gênica que pode ser inserida no vetor, alto custo de produção, além de poderem sofrer mutações, o que traz risco para a segurança do tratamento (JIAO *et al.*, 2020; PAUNOVSKA; LOUGHREY; DAHLMAN, 2022). De modo a contornar os inconvenientes e riscos associados à administração de vetores virais, cientistas têm desenvolvido outros tipos de vetores a partir de uma ampla variedade de materiais, incluindo polímeros e lipídios, além do emprego de vetores endógenos (PAUNOVSKA; LOUGHREY; DAHLMAN, 2022). Em decorrência das suas propriedades favoráveis, o uso de vetores não virais (frequentemente denominados como carreadores) tem mostrado melhorar a liberação *in vivo* de ANs, conferir proteção frente à ação das nucleases e aumentar a especificidade aos tecidos alvos, reduzindo efeitos adversos e melhorando os resultados terapêuticos (**Figura 1**) (LEE *et al.*, 2019).

Dentre os carreadores não virais para a liberação de ANs citados na literatura estão os lipossomas catiônicos, poliplexos catiônicos, polipeptídeos, ciclodextrinas poliméricas, niossomas, transfersomas, nanopartículas lipídicas sólidas, carreadores lipídicos nanoestruturados e as nanopartículas lipídicas (NPLs) (JIAO *et al.*, 2020; THI *et al.*, 2021). Em especial, as nanopartículas lipídicas têm sido extensivamente estudadas, devido a sua grande capacidade de encapsular ácidos nucleicos, protegendo-os da degradação em meio fisiológico. Além disso, NPLs apresentam baixa toxicidade e uma maior flexibilidade de formulação para o alcance de alvos terapêuticos desejados com maior especificidade (THI *et al.*, 2021). Os avanços nas formulações com NPLs, culminaram na aprovação do Onpattro® (Patisirana sódica, Alnylam® Pharmaceuticals) nos Estados Unidos e Europa, em 2018. Este medicamento consiste em um siRNA encapsulado em NPL para o tratamento da polineuropatia em pacientes com amiloidose mediada pela transtirretina (SAMARIDOU, HEYES, LUTWYCHE, 2020). Mais tarde, em 2020, foram aprovadas, para uso emergencial, duas vacinas de RNAm veiculadas em NPLs, o Comirnaty® (BioNTech/Pfizer) e a Spikevax® (Moderna) (KULARATNE; CRIST; STERN, 2022).

Figura 1 –Benefícios do uso de nanocarreadores para a liberação de ácidos nucleicos.



Fonte: Adaptado de LEE *et al.*, 2019.

Significativos progressos têm sido feitos nos últimos 30 anos no desenvolvimento de sistemas de liberação de ANs que permitiram o uso terapêutico dessas moléculas. Em especial, nanomedicamentos constituídos de NPLs estão em constante desenvolvimento por proporcionarem uma maior segurança e eficácia para a administração destes compostos. Assim considerando a potencial aplicação das NPLs como carreadores não virais para a liberação de ANs, este trabalho aborda uma revisão sobre o estado atual do desenvolvimento

destes sistemas de liberação, incluindo suas propriedades químicas e físico-químicas, assim como a identificação e descrição dos medicamentos em estudos clínicos e os já aprovados para comercialização, podendo servir de consulta e direcionar o desenvolvimento de novos medicamentos e tecnologias para o tratamento de doenças genéticas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma revisão da literatura sobre os avanços ocorridos no desenvolvimento de nanopartículas lipídicas para a liberação de ácidos nucleicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e descrever as nanopartículas lipídicas estudadas para a liberação de ácidos nucleicos, assim como aspectos relacionados à sua composição e características físico-químicas.
- Descrever quais fatores relacionados às propriedades desses nanocarreadores lipídicos que afetam o alcance aos tecidos alvos e a internalização celular.
- Identificar e descrever quais são os medicamentos contendo nanopartículas lipídicas para a liberação de ácidos nucleicos que já estão no mercado farmacêutico, assim como os que estão em estudo clínico.

3 METODOLOGIA

Neste trabalho foi realizada uma revisão da literatura sobre nanocarreadores não virais lipídicos para a liberação de ácidos nucleicos, usando as bases de dados informatizadas do Portal da Capes e Google Acadêmico. Para refinamento da busca no Portal da Capes e Google Acadêmico foram empregadas as seguintes palavras chaves: “*nucleic acid*” and “*lipid nanoparticles*” (intercalados com o operador booleano AND). Para filtrar as publicações os critérios de inclusão utilizados foram: publicações correspondentes aos últimos 10 anos foram incluídas, somente publicações escritas em inglês e português foram incluídas. Os critérios de

exclusão utilizados foram: citações não foram incluídas, publicações em revistas com fator de impacto baixo foram excluídas e publicações com acesso dificultado também não foram incluídas. A partir da leitura e análises dos resumos, foram selecionadas as publicações mais relevantes para o trabalho seguindo os critérios de inclusão e exclusão, sendo excluídas as publicações nas quais o assunto abordado não era correspondente ao tema do trabalho. Após essa pré-seleção, os 34 trabalhos selecionados que se encaixam no tema da revisão e nos critérios de inclusão e exclusão adotados, foram lidos na íntegra, e foi feita a extração de dados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS COMO CARREADORES DE ÁCIDOS NUCLEICOS: ESTRUTURA, COMPOSIÇÃO E MECANISMO DE LIBERAÇÃO

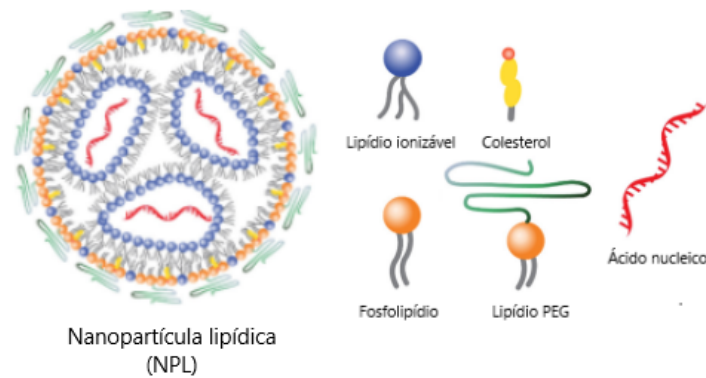
Devido à baixa biodisponibilidade dos ANs causada por fatores como a alta degradação por endonucleases, falta de especificidade pelo alvo terapêutico, baixa internalização celular e geração de resposta imune, sistemas de liberação nanotecnológicos têm sido desenvolvidos para veicular essas moléculas até a célula ou tecido desejado, permitindo assim explorar o seu real valor terapêutico (SPADEA *et al.*, 2022; LIU *et al.*, 2022). Os primeiros relatos da encapsulação de ANs datam da década de 70, com a sua encapsulação em lipossomas. No entanto, tais sistemas mostraram baixa taxa de associação, em parte devido ao uso de lipídios neutros e métodos de encapsulação passivos. Similarmente, lipoplexos formados pela interação eletrostática de lipídios catiônicos com moléculas de ANs foram extensivamente estudados, mas demonstraram baixa potência e tolerabilidade, impedindo o seu uso na clínica. Sua baixa potência advém do fato que, devido à presença de carga, quando administrados intravenosamente, ativam o sistema imune e são rapidamente eliminados da circulação sistêmica, além de apresentarem propensão à agregação. O desenvolvimento de nanocarreadores lipídicos para associação de ANs por meio da sua interação com lipídios catiônicos com carga permanente (ex.; oleilamina, estearilamina) também foi extensivamente realizado no passado. No entanto, tais sistemas exibem cinéticas desfavoráveis, liberando o ANs precocemente na circulação sistêmica, além de exibir baixa tolerabilidade. As NPLs carreadoras de ácidos nucleicos mais avançadas, evoluíram dos lipossomas e dos lipoplexos, sendo mais eficientes e efetivas. Tais sistemas

diferem dos lipossomas clássicos pelo fato de não constituírem uma bicamada lipídica ao redor de um núcleo aquoso. Além disso, não formam nanopartículas com ANs por complexação, nem necessitam de balanço de cargas dos constituintes para a efetiva liberação dentro da célula (SAMARIDOU; HEYES; LUTWYCHE, 2020; WITZIGMANN *et al.*, 2020).

O avanço no desenvolvimento de formulações lipídicas aceitáveis para a liberação de ácidos nucleicos ocorreu com o surgimento de lipídios catiônicos ionizáveis. Estes lipídios são positivamente carregados em pH ácido, mas são neutros no pH sanguíneo. Esta característica confere às NPLs a capacidade de complexar ANs e de interagir com a membrana endossomal no processo de fusão para a sua liberação no citosol, sem as desvantagens da rápida eliminação e baixa tolerabilidade dos lipídios catiônicos de carga fixa. Estes aminolipídios ionizáveis são frequentemente combinados com lipídios peguילים, os quais contribuem no processo de formulação para a obtenção de estruturas nanométricas e melhoria da estabilidade. Adicionalmente, lipídios peguילים auxiliam a mascarar as NPLs do reconhecimento pelas células do sistema imune, otimizando sua farmacocinética e perfil de biodistribuição. Por outro lado, a peguilação interfere na captura celular via endocitose e, portanto, a formulação de tais sistemas constitui a etapa crítica para o sucesso terapêutico destes medicamentos (CULLIS; HOPE, 2017; SAMARIDOU; HEYES; LUTWYCHE, 2020).

Estruturalmente, ao contrário do núcleo aquoso observado nos lipossomas, as NPLs apresentam um núcleo eletro-denso, devido à conformação do lipídio catiônico ionizável e seu complexo formado com o ácido nucleico. A estrutura do núcleo da NPL é dependente do grau de saturação e carga do lipídio ionizável empregado. Este núcleo é rodeado por uma monocamada de lipídios estruturais (ex., fosfolipídios e colesterol) e lipídios peguילים (LIU *et al.*, 2022; SAMARIDOU; HEYES; LUTWYCHE, 2020). Uma representação esquemática das NPLs é mostrada na **Figura 2**.

Figura 2 – Representação esquemática das NPLs como carreadoras de ANs.



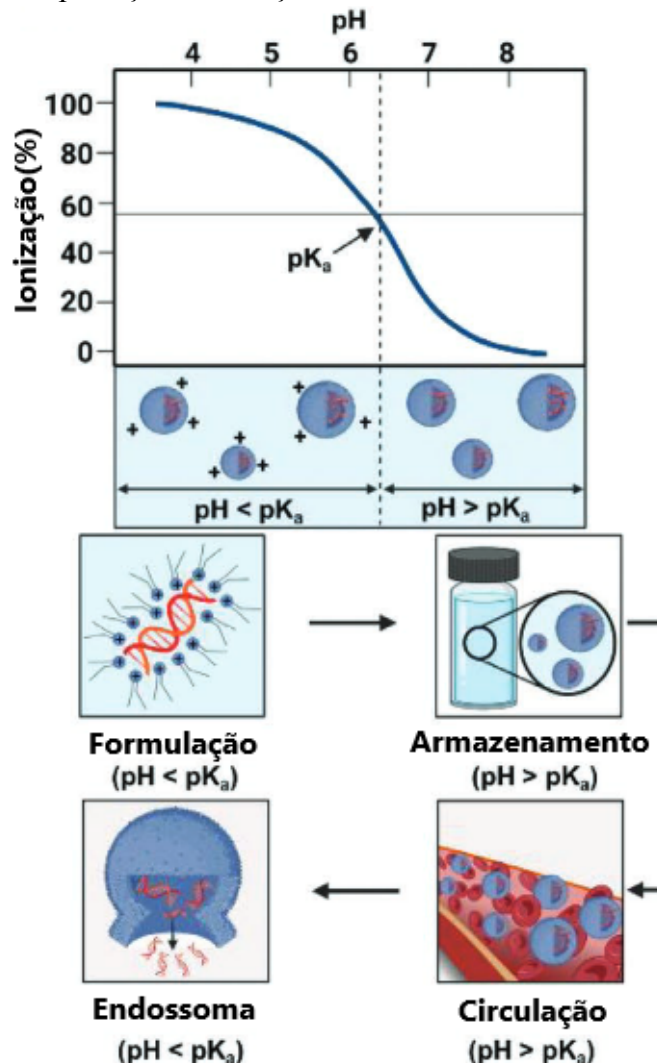
Fonte: Adaptado de ALBERTSEN *et al.*, 2022.

Os lipídios catiônicos ionizáveis possuem um grupamento cabeça com aminas terciárias que ficam protonadas em pH ácido e sem carga em pH neutro. Muitos relatos da literatura descrevem a síntese de lipídios catiônicos para uma eficiente liberação de ANs. De modo geral existem três requisitos fundamentais que devem ser observados no desenho destas moléculas: o pKa, hidrofobicidade e biodegradabilidade. Em especial, o pKa dos lipídios catiônicos tem grande impacto sobre a encapsulação de ANs, escape endossomal, e adsorção de proteínas e captura celular (KIM; KIM; MIYATA, 2022). Devido à protonação do grupamento cabeça dos lipídios catiônicos ionizáveis, as NPLs são produzidas em meio ácido, pois há uma maior interação entre a carga positiva do lipídio e a carga negativa dos ácidos nucleicos, elevando a eficiência de encapsulação (LIU *et al.*, 2022; WITZIGMANN *et al.*, 2020).

A capacidade que esses lipídios têm de se protonarem ou desprotonarem em função do pH do meio é um fator importante para o sucesso das formulações. Esta propriedade permite que em pH fisiológico (pH ~ 7) as nanopartículas não apresentem carga, evitando assim interações com as proteínas plasmáticas e diminuindo a geração de resposta imune. Quando as NPLs são internalizadas pelas células por endossomas, a redução do pH do meio para cerca de 4,5 leva à protonação das NPLs. Isto, por sua vez, leva à formação de par iônico entre o lipídio catiônico e os fosfolipídios aniônicos da membrana endossomal, permitindo que ocorra o escape do ácido nucleico para o citoplasma para realizar a sua atividade terapêutica. Assim, idealmente o pKa do lipídio catiônico deve se situar entre 6,2 e 6,5, quando a administração intravenosa é intencionada. Outro fator que contribui para o escape endossomal é o formato molecular do lipídio ionizável. Uma estrutura em formato de cone invertido é mais desejável do que um formato cilíndrico. Esta forma cônica advém da

presença de um grupamento cabeça pequeno e uma cauda volumosa no lipídio catiônico, o qual é incompatível com a bicamada lipídica do endossoma, desestabilizando-o e levando a liberação do AN encapsulado no citosol. (CARRASCO *et al.*, 2021; KULARATNE; CRIST; STERN, 2022; YONEZAWA; KOIDE; ASAI, 2020). Uma ilustração da conduta pH-dependente de lipídios catiônicos sobre a encapsulação e liberação endossomal de ANs é mostrada na **Figura 3**. Uma representação esquemática da interação do lipídio catiônico ionizável com a membrana do endossoma pode ser observada na **Figura 4**.

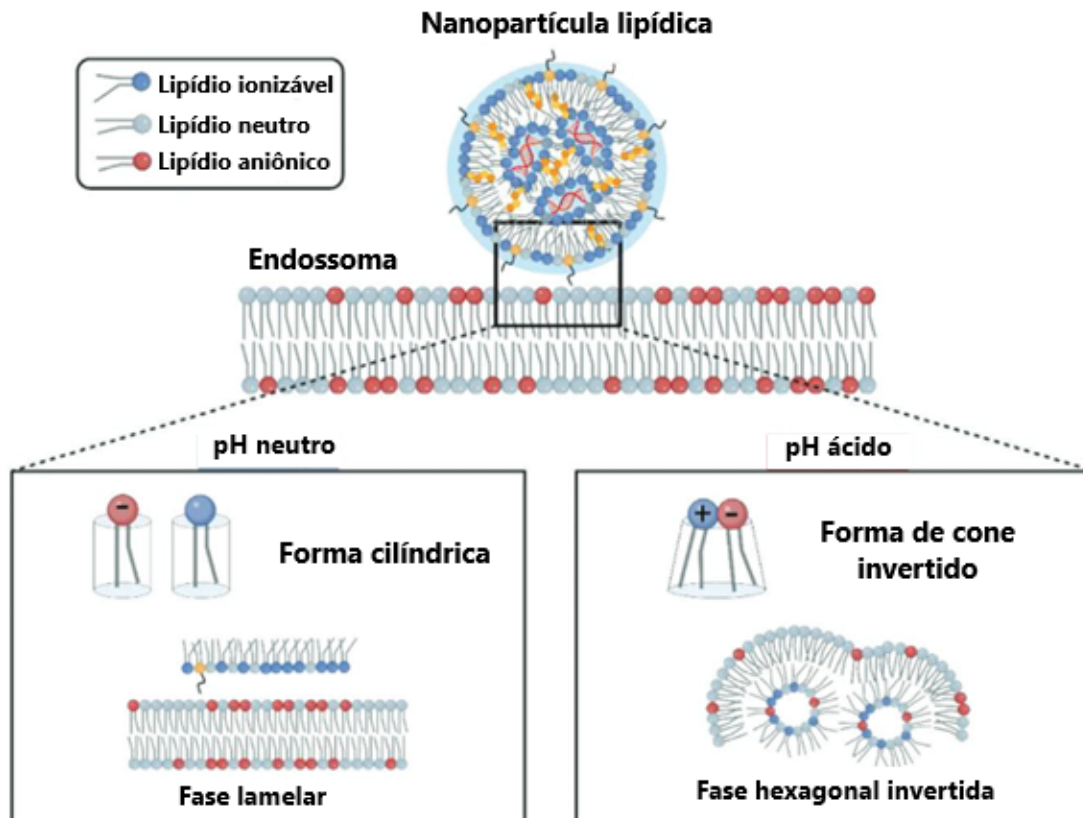
Figura 3 – Representação da conduta pH-dependente dos lipídios catiônicos sobre a encapsulação e liberação endossomal de ANs.



Legenda: Durante a formulação das NPLs, os lipídios ionizáveis apresentam carga positiva em pH baixo (abaixo do seu pKa), o que promove a sua interação com ANs carregados negativamente, facilitando a encapsulação. Durante o armazenamento e em pH fisiológico (acima de seu pKa), os lipídios tornam-se neutros. Uma vez no endossoma, o qual é caracterizado por apresentar um pH mais baixo, os lipídios tornam-se novamente protonados, permitindo o escape dos ANs.

Fonte: Adaptado de FERHAN *et al.*, 2022.

Figura 4 – Interação do lipídio catiônico ionizável com a membrana do endossoma.



Legenda: A interação das NPLs com o endossoma leva à mudança na geometria do lipídio devido à formação de pares iônicos. Os lipídios ionizáveis protonados interagem com lipídios aniônicos adotando uma geometria de cone invertido, o qual promove a formação de uma fase hexagonal invertida associada à fusão da membrana.

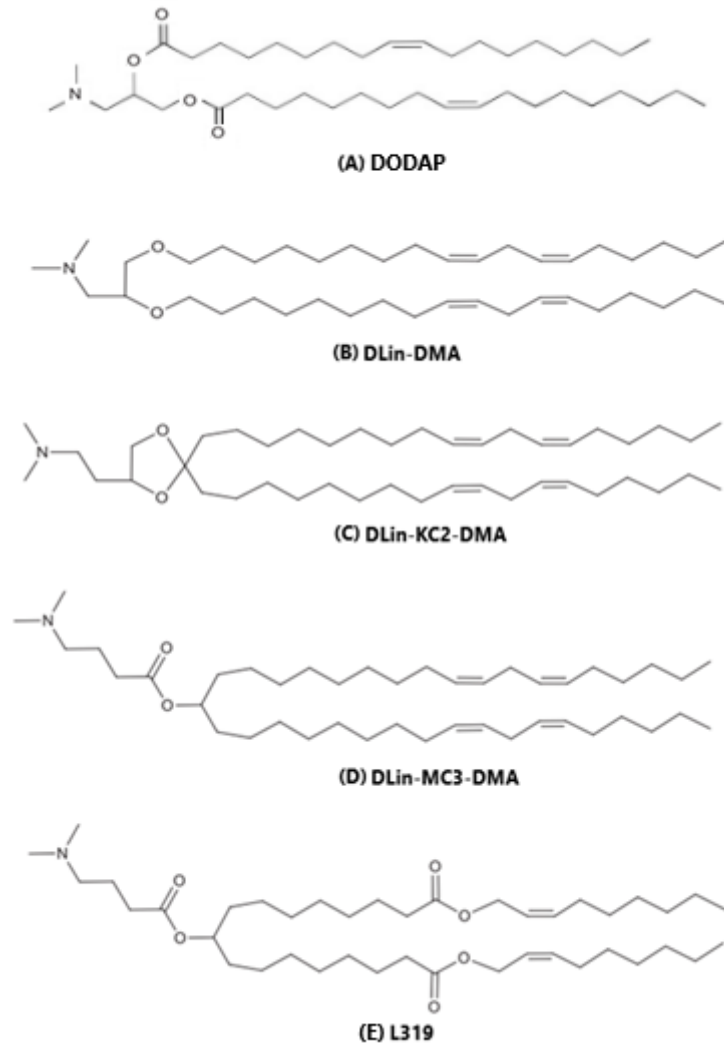
Fonte: Adaptado de FERHAN *et al.*, 2022.

As NPLs consistem basicamente de quatro componentes - o lipídio catiônico ionizável, um fosfolipídio, colesterol e um lipídio peguilado. Conforme abordado acima, o lipídio ionizável desempenha um importante papel na proteção do AN encapsulado e no seu transporte e liberação no citosol. O DODAP (**Figura 5A**) foi amplamente empregado na preparação das NPLs. Semelhante a outros lipídios catiônicos, o DODAP apresenta grupos oleil, ou seja, uma cadeia de 18 carbonos com uma única ligação dupla *cis*, cuja presença induz a dobras, facilitando a formação da estrutura hexagonal invertida fusogênica necessária ao escape endossomal do AN. Estudos posteriores mostraram que o grau de insaturação afeta grandemente a potência e eficácia das NPLs. Por esta razão, o grupo linoleil foi selecionado como base estrutural no processo de otimização do lipídio ionizável. Assim surgiu o DLin-DMA (**Figura 5B**), o qual se tornou o primeiro lipídio ionizável a ser utilizado em NPLs para liberação de um siRNA, testado em ensaios clínicos em humanos. Novos estudos mostraram que outros aspectos estruturais do lipídio catiônico afetam a potência das NPLs.

Dentre eles, o modo de ligação das cadeias linoleil ao resto do lipídio foi avaliado. Estudos mostraram que um anel cetil com um único átomo de carbono como ponto de ligação entre as cadeias levou a um aumento considerável na potência. No mesmo estudo, os autores mostraram que a constante de dissociação do ácido nas NPLs pode ser ajustada por meio de modificações no comprimento do espaçador entre o grupamento cabeça do lipídio ionizável e o restante da molécula, influenciando diretamente na eficácia do medicamento. Diante dessas descobertas foi desenvolvido o lipídio catiônico ionizável DLin-KC2-DMA (**Figura 5C**) (CULLIS; HOPE, 2017; HAN *et al.*, 2021; SAMARIDOU; HEYES; LUTWYCHE, 2020). Novos estudos mostraram que uma alteração do ligante cetil por um éster carboxílico gera uma maior potência, e foi determinado que o pKa ideal do lipídio catiônico ionizável deve se situar 6,2 e 6,5 para maior eficácia na transfecção, visando a administração intravenosa. A partir dessas informações foi desenvolvido o DLin-MC3-DMA (**Figura 5D**), sendo o lipídio utilizado na formulação do Onpattro® (AKINC *et al.*, 2019).

Os lipídios ionizáveis correspondem, na maioria das vezes, ao componente mais abundante das NPLs, e é importante que sejam desenvolvidas formulações onde esses lipídios são biodegradáveis (o que não é o caso do DLin-MC3-DMA), principalmente quando aplicados a medicamentos que necessitam de uma administração mais frequente, a fim de diminuir os resíduos e a toxicidade, tornando esses medicamentos mais toleráveis. Geralmente são adicionados ligantes éster na cadeia hidrofóbica da molécula, pois podem ser hidrolisados facilmente por esterases ou lipases presentes no organismo, gerando ácido carboxílico e álcool que podem ser rapidamente eliminados ou metabolizados (MIAO; ZHANG; HUANG, 2021). As vacinas de RNAm aprovadas, Tozinameran (BionTech/Pfizer) e Elasomernan (moderna), já apresentam em suas formulações lipídios catiônicos ionizáveis biodegradáveis. Um exemplar desses lipídios é o L319, que pode ser observado na **Figura 5E**, que demonstra ainda uma maior potência do que o DLin-MC3-DMA, podendo aumentar em até 5 vezes a expressão proteica gerada pelo medicamento (SAMARIDOU; HEYES; LUTWYCHE, 2020).

Figura 5 – Evolução da estrutura química de lipídios catiônicos ionizáveis.



Legenda: O DODAP, originalmente empregado para a liberação de oligonucleotídeos antisense foi substituído pelo DLin-DMA para liberação de um siRNA encapsulado em NPLs. Na sequência, o DLin-KC2-DMA demonstrou aumentar a potência na transfecção, levando à síntese do DLin-MC3-DMA, atualmente empregado no Onpattro®. Lipídios biodegradáveis como o L319 tem sido introduzido na preparação de NPLs. DODAP: (1,2-dioleoil-3-dimetilamônio-propano); DLin-DMA: 1,2-dilinoileiloxi-N,Ndimetil-3aminopropano; DLin-KC2-DMA: 2-[2,2-bis[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil]-1,3-dioxolan-4-il]-N,N-dimetiletanamina; DLin-MC3-DMA: (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconte-6,9,28,31-tetraeno-19-il-4-(dimetilamino)butanoato; L319: Di((Z)-non-2-en-1-il) 9-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)heptadecanedioato.
Fonte: Adaptado de CULLIS; HOPE, 2017; PATEL; IBRAHIM; CHENG, 2021.

O colesterol e os fosfolipídios são lipídios estruturais (*helper lipids*), que contribuem para a melhoria da estabilidade das NPLs e do escape endossomal. Os fosfolipídios, como o DSPC, são caracterizados por apresentar capacidade de formação de bicamadas e alta temperatura de transição de fases, podendo contribuir para o aumento da rigidez e redução da permeabilidade das nanopartículas. Estudos têm sugerido que a presença do colesterol na formulação impede que a estrutura da nanopartícula seja desestabilizada pelo sequestro de

colesterol da corrente sanguínea. Os lipídios estruturais também atuam como espaçadores para os lipídios catiônicos ionizáveis, possibilitando uma maior interação com os ácidos nucleicos na fase de formação das NPLs (LIU *et al.*, 2022; WITZIGMANN *et al.*, 2020).

Os lipídios peguilados são constituídos por uma cadeia de polietilenoglicol (PEG) hidrofílica conjugada com uma molécula hidrofóbica de um fosfolipídio. Uma vez que as NPLs não contêm um núcleo aquoso, os lipídios peguilados estão localizados na interface entre as partículas e o meio, com a sua porção lipídica inserida dentro da estrutura da partícula e a cadeia de PEG exposta na superfície. O lipídio peguilado possui importância no processo de formação das NPLs, evitando que as partículas se fundam umas às outras. São responsáveis pelo tamanho da partícula, variando de acordo com sua concentração, e garantem uma população homogênea de partículas, com uma baixa polidispersão. Especificamente, um aumento na concentração do lipídio peguilado de 0,25 mol% para 5 mol% mostrou reduzir o tamanho da partícula de 120 para 25 nm. Além disso, a presença do lipídio peguilado contribui para a melhoria da estabilidade da formulação durante o armazenamento, uma vez que a presença das cadeias de PEG criam uma barreira estérica que reduz a agregação das partículas (CHEN *et al.*, 2014; SAMARIDOU; HEYES; LUTWYCHE, 2020).

Historicamente, lipídios peguilados têm sido usados para aumentar o tempo de circulação sanguínea de nanocarreadores (ex. lipossomas), uma vez que a barreira estérica impede a adsorção de proteínas plasmáticas (opsoninas), evitando a rápida eliminação das partículas pelo sistema reticular endotelial, e permitindo o seu alcance em órgãos onde devem liberar o fármaco encapsulado. Nas NPLs, no entanto, os lipídios peguilados devem ser empregados em concentrações que permitam a sua manutenção na circulação sistêmica, mas que não impeça a captura celular. Apesar de auxiliar na prevenção da opsonização, as cadeias de PEG impossibilitam que lipoproteínas com importante papel na apresentação das NPLs para células alvo (como é o caso da apolipoproteína E [ApoE] na apresentação do Onpattro® ao hepatócito), liguem-se a ela. A camada de PEG também afeta o escape endossomal, impedindo a aproximação e a fusão da NPL à membrana do endossoma. Estudos têm mostrado que quanto maior a concentração de lipídio peguilado, menor é a taxa de transfecção, sendo necessário a otimização de sua concentração na formulação a fim de garantir um tamanho ideal de partícula e estabilidade da formulação, sem comprometer a sua eficácia terapêutica (SAMARIDOU; HEYES; LUTWYCHE, 2020).

Lipídios peguilados difusíveis, compostos por cadeias de acila com 14 carbonos vem sendo utilizados nas formulações, pois conseguem garantir estabilidade durante o

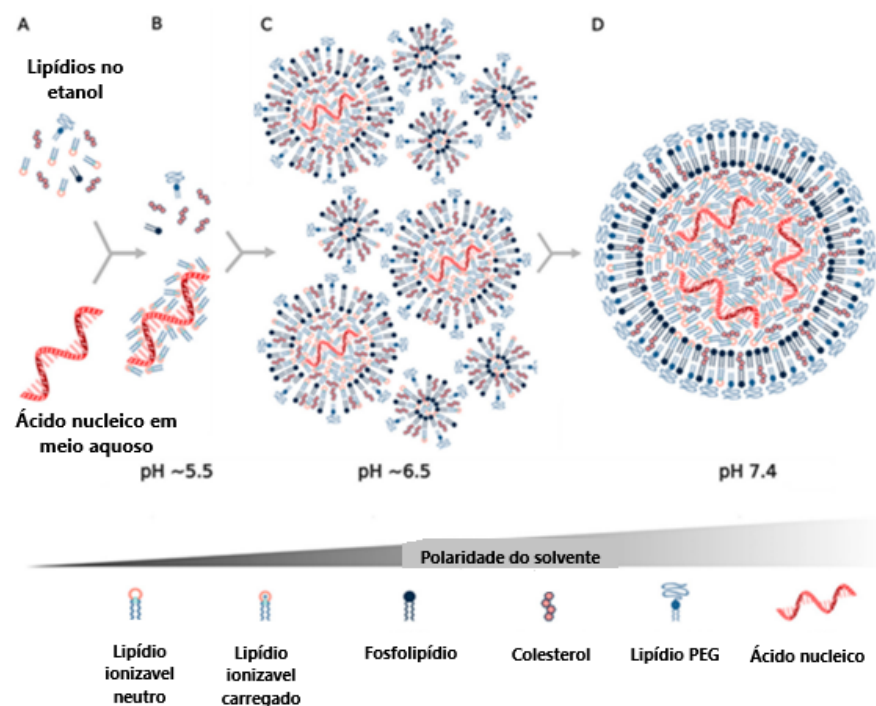
armazenamento, ao passo que podem se dissociar rapidamente da NPL na circulação sistêmica. Estudos mostraram que unicamente 20% destes lipídios peguilados permanecem associados à partícula, após 2 horas da sua administração. O uso de lipídios peguilados difusíveis é interessante na formulação de medicamentos em que o alvo terapêutico é o fígado, onde não há necessidade de aumentar o tempo de circulação sistêmica, visto que as NPLs se direcionam passivamente a este órgão. Além disso, lipídios peguilados que possuem uma taxa pequena de difusão da NPL podem causar imunogenicidade, gerando a produção de anticorpos anti-PEG. Isso pode dificultar a administração frequente desses medicamentos devido à hipersensibilidade gerada, resultando em aceleração da depuração plasmática (SAMARIDOU; HEYES; LUTWYCHE, 2020; WITZIGMANN *et al.*, 2020).

4.2 PRODUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

A técnica mais empregada para produção das NPLs baseia-se na formação espontânea das partículas por meio da diluição do etanol, um solvente miscível em água em que os lipídios são solúveis. Esse método é simples, robusto, reprodutível e escalonável que permite realizar, em uma única etapa, a complexação dos ácidos nucleicos e a formação de nanopartículas monodispersas. Brevemente, esta técnica envolve a dissolução dos lipídios em etanol em concentrações apropriadas, enquanto o ácido nucleico é dissolvido em um tampão aquoso, como o citrato ou acetato, em pH ácido. Quanto maior for o tamanho do ácido nucleico, maior deve ser a concentração do tampão utilizado, podendo variar de 10-100 mM. A fase orgânica é então adicionada à solução de AN sob condições pré-determinadas (ex., fluxo, temperatura) na proporção de 1:3. Para realizar a mistura das fases é utilizado um microfluidizador ou um misturador em T. Durante a mistura das soluções em meio ácido, o lipídio ionizável torna-se positivamente carregado e se complexa com o ácido nucleico, que possui carga negativa, ao mesmo tempo que ocorre a redução da solubilidade do lipídio pela diluição do etanol em água. A baixa solubilidade dos lipídios em meio aquoso leva à formação de vesículas que incorporam os ácidos nucleicos, porém instáveis e suscetíveis ao aumento de tamanho até que uma posterior etapa de diluição, diálise ou filtração/centrifugação, para manutenção da formulação em tampão pH neutro, seja realizada. Por meio desta técnica é possível empregar uma ampla variedade de tipos de ANs e condições de preparação, resultando em eficiências de encapsulação maiores que 90%. Parâmetros como o tamanho de partícula, carga e eficiência de encapsulação devem ser avaliados na etapa de

formulação. Propriedades como esterilidade, osmolaridade, presença de toxinas bacterianas, entre outros devem ser verificadas para garantir a segurança e qualidade da formulação (HOU *et al.*, 2021; WITZIGMANN *et al.*, 2020). O mecanismo proposto para a formação de NPLs pela técnica de diluição do etanol para a obtenção de vacinas de RNAm é mostrado na **Figura 6**.

Figura 6 – Mecanismo proposto para a formação das NPLs para a produção de vacinas de RNAm pela técnica de diluição de uma solução etanólica dos lipídios em uma fase aquosa contendo o AN.



Legenda: (A) Inicialmente é realizada a mistura da solução etanólica dos lipídios com a do AN, previamente solubilizado em tampão pH ~ 4,0. (B) Quando o lipídio ionizável é adicionado à fase aquosa, ele torna-se protonado. O pH do meio aumenta para próximo a 5,5, e o lipídio ionizável se complexa eletrostaticamente com o RNAm que possui carga negativa. (C) Devido à baixa solubilidade aquosa do lipídio em meio aquoso, ocorre a formação de vesículas e a encapsulação do AN. (D) Após o processo de filtração, diluição ou diálise, o pH do meio é aumentado para perto do fisiológico, ocorrendo a neutralização do lipídio ionizável. Isto o torna mais hidrofóbico, o que aumenta a fusão das vesículas causando posterior sequestro do lipídio ionizável e do RNA para o interior das partículas. O lipídio peguilado encerra o processo de fusão ao fornecer uma superfície mais hidrofílica, determinando o tamanho termodinamicamente estável da NPL.

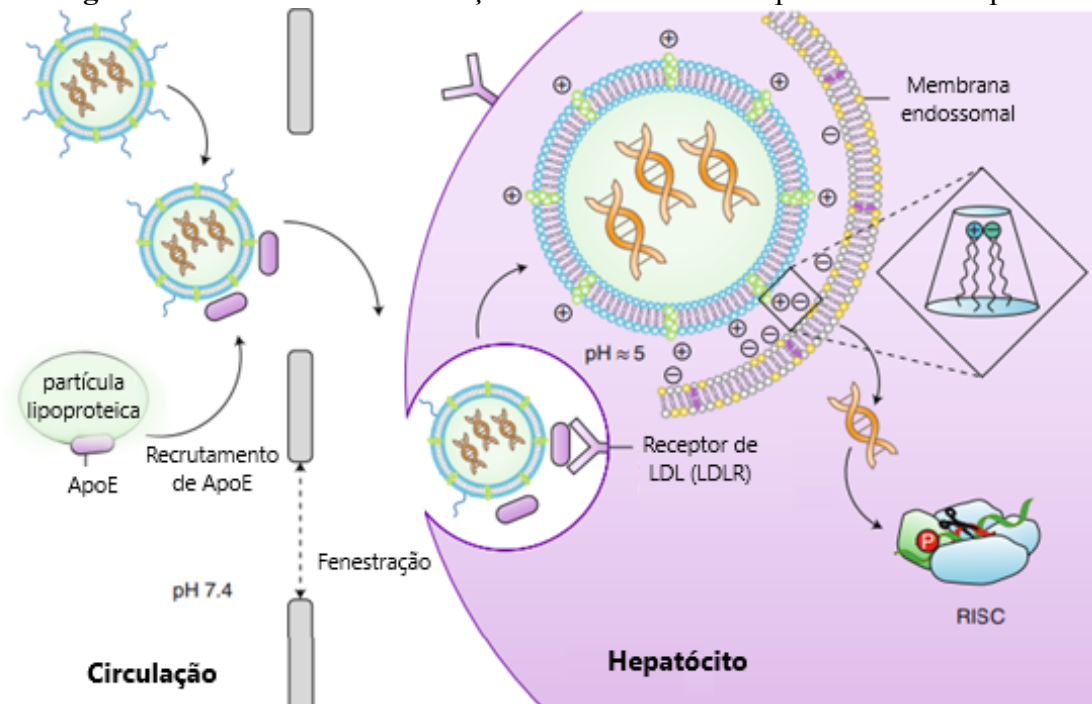
Fonte: Adaptado de BUSCHMANN, 2021.

4.3 ESPECIFICIDADE PELO ALVO TERAPÊUTICO

Um fator muito importante para a biodisponibilidade do fármaco é a especificidade pelo alvo terapêutico. Há dois tipos de estratégias tomadas nesse sentido, a vetorização ativa e passiva (*targeting*). A vetorização ativa baseia-se na adição de um ligante específico ao alvo terapêutico durante a formulação, adicionando-o no etanol para haver uma conjugação química com a superfície da NPL. Anticorpos, peptídeos, proteínas e carboidratos, que se ligam ao seu receptor correspondente na célula alvo, são exemplos de ligantes utilizados. A vetorização passiva, por sua vez, baseia-se no alcance espontâneo das nanopartículas em órgãos específicos em função das suas características de tamanho e carga superficial. As NPLs possuem uma tendência natural em se acumular no fígado após administração intravenosa, por meio de um mecanismo mediado pela adsorção de proteínas plasmáticas, predominantemente apolipoproteínas, à superfície das partículas. A formação desta “proteína coroa” tem mostrado ser determinante para as funções biológicas das NPLs, cuja adsorção por sua vez, é dependente da carga superficial das partículas e do tipo e tamanho da cadeia de PEG do lipídio peguilado, entre outros. A presença da apolipoproteína facilita sua endocitose via receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR) nos hepatócitos, como acontece na formulação do Onpattro® (**Figura 7**) (AKINC *et al.*, 2019; SAMARIDOU; HEYES; LUTWYCHE, 2020).

As modulações das características físico-químicas das partículas podem ser realizadas por meio de alterações nas concentrações dos lipídios, resultando em alterações no seu perfil de biodistribuição (BÖTTGER *et al.*, 2020; KULARATNE; CRIST; STERN, 2022; RAMISHETTI *et al.*, 2020). A vetorização passiva pode ser induzida, por exemplo, pela modificação na estrutura das moléculas lipídicas que compõe as NPLs, como por exemplo, a modificação do grupo cabeça dos lipídios ionizáveis pela introdução de um grupo piperazina. Lipídios ionizáveis contendo piperazina liberam RNAm preferencialmente em células imunes, sem que haja a introdução de ligantes na superfície das partículas, direcionando as partículas para órgãos como fígado e baço (NI *et al.*, 2022).

Figura 7 – Mecanismo de liberação de siRNA mediado por NPLs nos hepatócitos.

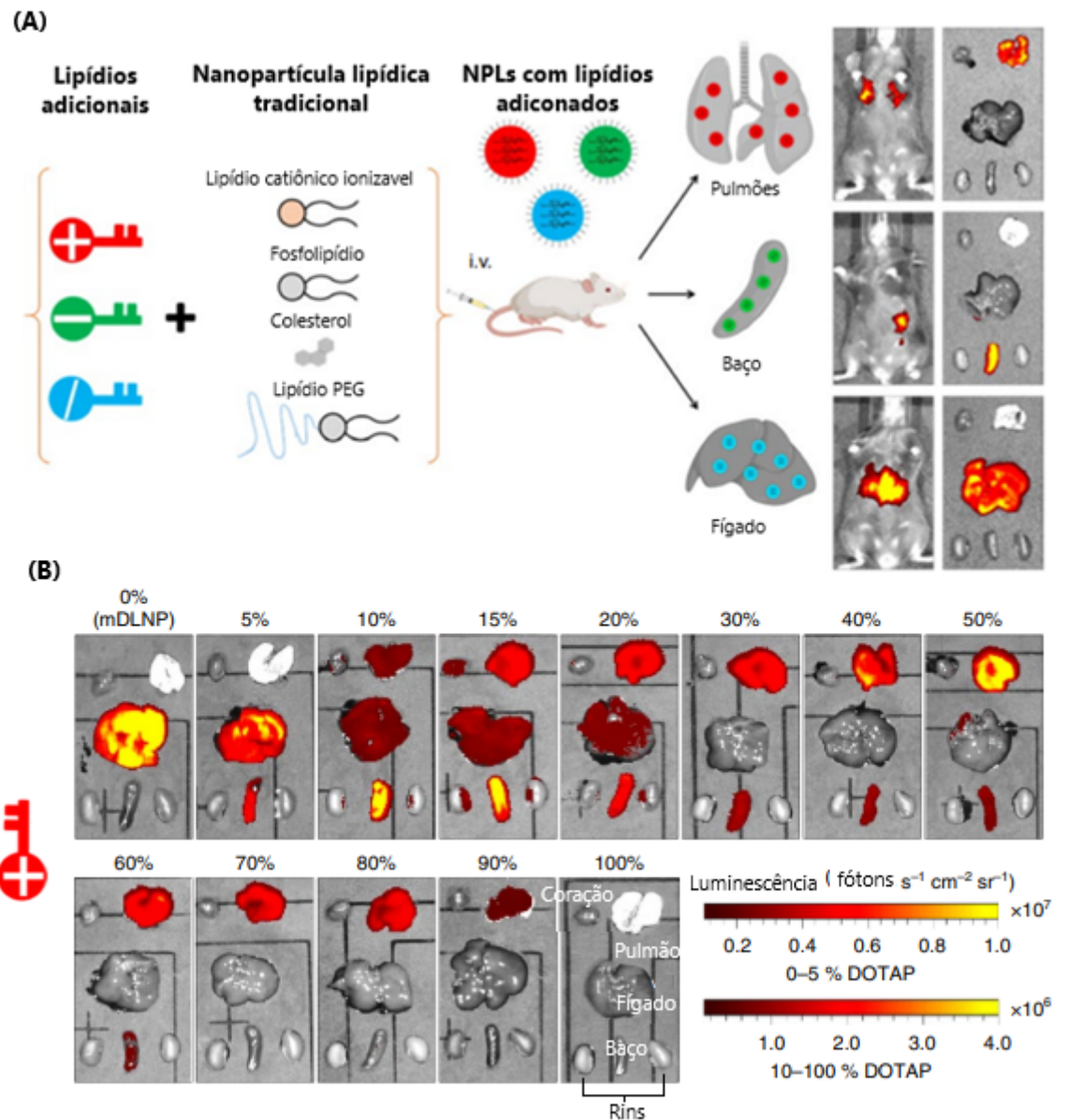


Legenda: O mecanismo de liberação de ANs envolve a dissociação do lipídio peguado, recrutamento da ApoE para a superfície das partículas, tráfico das NPLs através do epitélio fenestrado, ligação aos receptores LDL e outros receptores de ApoE nos hepatócitos, e internalização das NPLs via endocitose. Dentro do endossoma, o pH mais ácido deixa a NPL protonada devido à presença do lipídio catiônico ionizável. Esse liga-se à membrana endossomal com carga negativa, formando estruturas hexagonais que desestabilizam a membrana endossomal, liberando o siRNA dentro do citoplasma.

Fonte: Adaptado de AKINC *et al.*, 2019.

Cheng *et al.* (2020) relatam a utilização da estratégia SORT (do inglês, *selective organ targeting*) em que várias classes de nanopartículas lipídicas são sistematicamente desenhadas para a liberação sítio específica moléculas como RNAm e complexos Cas9/RNAm e Cas9/ribonucleoproteínas para a edição de genes. Por esta estratégia, NPLs são projetadas para editar seletivamente tipos celulares terapeuticamente relevantes nos pulmões, baço e fígado (**Figura 8A**), incluindo células epiteliais, endoteliais, células B e T e hepatócitos. Em um estudo, os autores avaliaram os efeitos da modificação das NPLs pela molécula SORT na liberação da RNAm luciferase por via intravenosa na dose de $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$. Neste estudo, um aumento da massa molar do lipídio catiônico DOTAP resultou em um aumento progressivo da expressão da proteína do fígado, para o baço e então para os pulmões, mostrando uma clara e precisa liberação sítio específica após atingir um limiar da concentração da molécula SORT nas nanopartículas que permitiu a liberação exclusiva nos pulmões (**Figura 8B**).

Figura 8 – Efeito da inclusão da molécula SORT na liberação sítio específica de NPLs.



Legenda: A estratégia SORT permite que NPLs sejam sistematicamente desenhadas para liberar RNAm em órgãos específicos. Um componente adicional (chamado molécula SORT) é adicionado à formulação das NPLs para alterar o perfil de liberação *in vivo* e mediar a liberação sítio-específica em função da percentagem e propriedades biofísicas da molécula adicionada.

Fonte: Adaptado de CHENG *et al.*, 2020.

Alterações no tamanho das nanopartículas podem ser alcançadas por modificações nas concentrações do lipídio peguilado. Conforme a sua concentração aumenta, menor é a nanopartícula formada. Portanto, essa estratégia pode ser aplicada quando as NPLs precisam ter um tamanho reduzido para atravessar barreiras fisiológicas para atingir alvos, como é o caso de NPLs que necessitam atingir células dendríticas nos linfonodos. Nakamura *et al.* (2020) mostraram que nanopartículas de 30 nm foram eficientemente translocadas para os

linfonodos e capturadas por células dendríticas CD8⁺, enquanto a eficiência foi drasticamente reduzida quando NPLs de 100 e 200 nm foram testadas. Além disso, os autores mostraram que NPLs de 30 nm carregadas negativamente movem-se aos linfonodos mais eficientemente que as com carga positiva ou neutras, além de serem capazes de alcançar o córtex profundo – a zona de células T.

As células tronco hematopoéticas constituem uma importante célula alvo para terapias com siRNA ou edição de genes. Assim, para ter um bom alcance em células endoteliais microvasculares da medula óssea, estratégias de vetorização passiva foram testadas por SAGO *et al.* (2018), as quais se basearam na modificação estrutural do lipídio peguilado e na otimização da concentração do colesterol nas NPLs. Os autores mostraram que a composição ideal das NPLs para este fim era de 80 mol% de um lipídio ionizável sintético chamado de 7C1, 15 a 20 mol% do lipídio peguilado (C18-PEG2000), e 1 a 10 mol% de colesterol. Os autores concluíram que que simples mudanças na composição lipídica podem gerar modificações no tropismo das NPLs (SAGO *et al.*, 2018).

A liberação pulmonar de ANs apresenta potencial para o tratamento de várias doenças respiratórias, tais como doenças genéticas como a fibrose cística e infecciosas como a influenza (KULARATNE; CRIST; STERN, 2022). Parhiz *et al.* (2018) obtiveram NPLs contendo um RNAm conjugadas com um anticorpo específico à molécula de adesão celular vascular (PECAM-1). Os autores mostraram que a administração sistêmica das NPLs conjugadas ao PECAM-1 resultou na expressiva inibição da captura hepática com concomitante aumento de 200 e 25 vezes da liberação do RNAm e expressão proteica nos pulmões, respectivamente, quando comparado aos sistemas de liberação não vetorizados. Adicionalmente à administração sistêmica de NPLs vetorizadas aos pulmões, a administração direta por inalação tem sido investigada. Lokugamage *et al.* (2021) encontraram que altas concentrações molares de lipídio peguilado e catiônico melhoraram a transfecção nos pulmões, após nebulização. Neste estudo, a administração de NPLs de 40 nm constituída de 55 e 5 mol% de C14-PEG2000 e DOTAP, respectivamente, liberaram o RNAm de modo eficiente, conferindo proteção aos camundongos contra uma dose letal do influenza H1N1.

A liberação ocular de ANs também tem sido estudada para o tratamento de doenças causadoras de cegueira, como o glaucoma avançado, degeneração macular atópica, retinopatia diabética, entre outras. Estudos mostraram que a injeção subretinal de NPLs com baixo teor de lipídio peguilado (0,5 mol%) contendo RNAm que codifica luciferase foram mais efetivas para a expressão proteica. Injeções subretinais de NPLs também permitiram a liberação de cre RNAm em camundongos Ai9, levando à expressão proteica específica no epitélio pigmentar

da retina. De modo a investigar a penetração ocular, as NPLs foram administradas por injeção intravítrea. As NPLs contendo 0,5% do lipídio peguado mediarão a mais alta atividade da luciferase e a expressão foi observada nas células de Muller, cabeça do nervo óptico e malha trabecular, mas não alcançaram o epitélio pigmentar da retina. De modo geral, os autores concluíram que NPLs de 150 nm com menor concentração do lipídio peguado são mais eficientes para a expressão proteica no olho (RYALS *et al.*, 2020).

Estratégias para possibilitar a transfecção em neurônios no sistema nervoso central se baseiam no mesmo mecanismo de vetorização aos hepatócitos, o qual é mediado pela adsorção da apolipoproteína E à superfície das nanopartículas e sua apresentação ao hepatócito, pela afinidade ao receptor de LDL (LDLR), uma vez que as astróglia, células do sistema nervoso, produzem apolipoproteína E e os neurônios expressam o LDLR. Rungta *et al.* (2013) investigaram um método para administração de um siRNA em NPLs para silenciar a expressão de genes neuronais em cultura de células e *in vivo* após injeção intracraniana. Os autores mostraram que as NPLs se acumulam nos neurônios de modo dependente à apolipoproteína E, resultando em uma elevada captura celular com ausência de toxicidade. Estudos *in vivo* mostraram que a injeção intracortical ou intracerebroventricular (ICV) das NPLs-siRNA resultaram no *knockdown* de genes alvos em regiões próxima ao sítio de injeção ou em áreas mais amplas após injeção ICV, sem aparente toxicidade ou resposta imune às NPLs. Neste estudo, os autores concluíram que a administração de NPL-siRNA permite a manipulação da expressão de proteínas envolvidas em processos neuronais, possibilitando o desenvolvimento de terapias gênicas para o tratamento de distúrbios neurológicos.

4.4 O ESTADO ATUAL DO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS PARA LIBERAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.4.1 Medicamentos em estudos de fase clínica

Diversos medicamentos baseados na liberação de ácidos nucleicos por NPLs se encontram em estudos de fase clínica, os quais são realizados em seres humanos com o objetivo de avaliar a eficácia e segurança da administração dos mesmos. Além do antigo interesse em veicular ANs com eficiência para células, devido a seu grande potencial terapêutico, dois fatores impulsionaram o desenvolvimento destas formulações. Um deles foi a aprovação do Onpattro® em 2018, trazendo uma formulação segura e eficaz, com a inclusão

do lipídio catiônico ionizável DLin-MC3-DMA, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), nas formulações. O outro foi o alto investimento no desenvolvimento de vacinas de RNAm formuladas com NPLs, para atender um estado de emergência ocasionada pela pandemia da COVID-19. Estas vacinas foram as primeiras a entrarem em estudo clínico devido as suas vantagens em comparação as vacinas tradicionais, como uma síntese mais fácil, menor custo de produção, segurança e possibilidade de serem produzidas em larga escala. A partir de então os candidatos a esses estudos aumentaram, trazendo um grande espectro de alvos terapêuticos, explorando diferentes vias de administração e tipos de ácidos nucleicos (CARRASCO *et al.*, 2021; THI *et al.*, 2021). Entre os 41 medicamentos com NPLs carreadores de ácidos nucleicos encontrados em estudos de fase clínica, 17 estão sendo testadas para combater infecções virais (correspondendo a 41,5%)(**Quadro 1**), 17 para o tratamento de doenças oncológicas (correspondendo a 41,5%)(**Quadro 2**), e 7 para o tratamento de doenças genéticas metabólicas (correspondendo a 17%) (**Quadro 3**).

Quadro 1 – Medicamentos que se encontram em estudos de fase clínica para combater doenças infecciosas virais, que possuem ácido nucleico como fármaco, veiculados em nanopartículas lipídicas.

Nome/Empresa	Ácido nucleico	Doença	Via de Administração	Fase Clínica	Número de ID
LNP-nCoVsaRNA/ Imperial	RNAsa	COVID-19	Intramuscular	1	ISRCTN17072692
ARCT-154/ Arcturus	RNA _m	COVID-19	Intramuscular	3	NCT05012943
mRNA-1273.617/ Moderna	RNA _m	Variante delta da COVID-19	Intramuscular	2	NCT04927065
mRNA-1273/ Moderna	RNA _m	COVID-19	Intramuscular	3	NCT04860297
CVnCoV/ CureVac AG	RNA _m	COVID-19	Intramuscular	3	NCT04652102
mRNA-1647/ Moderna	RNA _m	Infeção de citomegalovírus	Intramuscular	3	NCT05085366
mRNA-1345/ Moderna	RNA _m	Vírus respiratório sincicial	Intramuscular	2 e 3	NCT05127434
VAL-506440(mRNA-1440)/ Moderna	RNA _m	Influenza H10N8	Intramuscular	1	NCT03076385
VAL-339851 (mRNA-1851)/ Moderna	RNA _m	Influenza H7N9	Intramuscular	1	NCT03345043
BNT161/ BioNTech–Pfizer	RNA _m	Influenza Sazonal	Intramuscular	1 e 2	N/A
mRNA-1325/ Moderna	RNA _m	Zika vírus	Intramuscular	1	NCT03014089
mRNA-1893/ Moderna	RNA _m	Zika vírus	Intramuscular	1	NCT04064905
mRNA1653/ Moderna	RNA _m	MPVh e HPV3	Intramuscular	1	NCT03392389
VAL-181388(mRNA-1388)/ Moderna	RNA _m	Chikungunya	Intramuscular	1	NCT03325075
mRNA-1944/ Moderna	RNA _m	Chikungunya	Intravenoso	1	NCT03829384
CV7202/CureVac	RNA _m	Vírus da raiva	Intramuscular	1	NCT03713086
ARB-001467/ Arbutus Biopharma	siRNA	Hepatite B	Intravenoso	2	NCT02631096

Legenda: RNA_m - ácido ribonucleico mensageiro; COVID-19- coronavírus; RNAs - pequeno ácido ribonucleico de interferência; RNAsa - pequeno ácido ribonucleico de amplificação própria; MPVh - metapneumovírus humano; HPV 3 - vírus papiloma humano tipo 3.

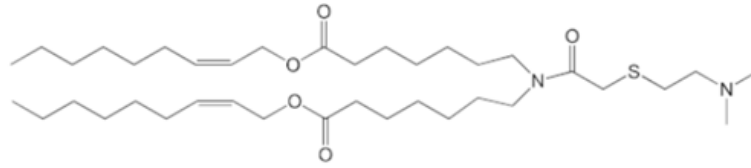
Fonte: Adaptado de BERG *et al.*, 2021; DAS *et al.*, 2021; HOU *et al.*, 2021; THI *et al.*, 2021; WITZIGMANN *et al.*, 2020.

As doenças infecciosas são controladas de forma mais eficiente por vacinas, e as formulações contendo NPLs carreadoras de RNA_m vem sendo muito estudadas. A via de administração intramuscular é a mais utilizada para a administração desses medicamentos, sendo a via de escolha de 15 dos 17 medicamentos listados no **Quadro 1**. Essa via é

amplamente utilizada na vacinação, pois células apresentadoras de antígeno (APCs) estão presentes no tecido muscular, podendo internalizar e expressar o ácido nucleico presente na NPL. Além disso, o músculo é uma região rica em vasos sanguíneos e linfáticos, permitindo estimular a imunidade por células T, pela apresentação facilitada do antígeno aos linfonodos. Dessa maneira a administração muscular de RNAm veiculado por NPL gera uma resposta imune robusta (KIM *et al.*, 2021).

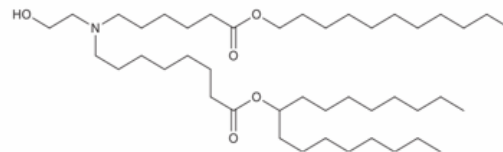
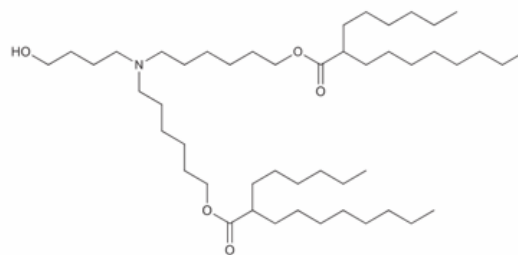
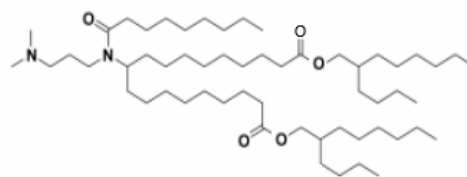
Os avanços nessa área levaram à aprovação da Comirnaty® e Spikevax® contra SARS-CoV-2 pela Moderna e pela BioNTech/Pfizer, respectivamente. Estes estudos evidenciaram o potencial clínico de NPLs como veículo para RNAm, fornecendo uma poderosa ferramenta para combater o COVID. Por esta tecnologia é possível que sejam codificados diferentes tipos de antígenos. Por exemplo, na vacina para o citomegalovírus foram incorporados seis RNAs mensageiros diferentes, codificando antígenos pentaméricos e um antígeno de glicoproteína. Além do seu alto valor terapêutico, as vacinas de RNAm são atraentes, pois possuem uma alta flexibilidade no que diz respeito ao antígeno que o RNAm codifica, e uma rápida produção, possibilitando uma resposta quase imediata à patógenos emergentes. Outros medicamentos contra a COVID-19 que estão em fase de estudo clínico, possuem RNAm que codificam a proteína *spike*, e três outras proteínas virais. Vacinas de RNAm baseadas em formulações de NPLs também estão sendo desenvolvidas para o combate ao Influenza. Essas vacinas utilizam o RNAm para codificar a hemaglutinina (um antígeno de superfície glicoproteico), sendo o mRNA-1440 e o mRNA-1851 seus representantes. Para combater a Zika, as NPLs contêm RNAm que codificam as proteínas da pré-membrana e do envelope do vírus. Para a codificação do anticorpo anti-chikungunya, NPLs carreadoras de RNA-1944 estão sendo testadas. Estudos clínicos também estão sendo realizados para testar outras vacinas de RNAm carreados por NPLs para combater o metapneumovírus e o vírus da raiva (HOU *et al.*, 2021).

Uma plataforma desenvolvida pela Arcturus Therapeutics, Inc. (São Diego, EUA) para liberação de RNA é denominada LUNAR® (do inglês, *lipid-enabled and unlocked nucleomonomer agent modified RNA*). Esse sistema é composto por 58 mol% de um amino lipídio ionizável ATX-1 (**Figura 9**), 7 mol% do fosfolipídio 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 33,5 mol% de colesterol, e 1,5 mol% do DMG-PEG2000. Diferente dos lipídios catiônicos convencionais, o lipídio ATX-1 possui ligações éster na sua porção lipídica, sendo biodegradável. Esse lipídio demonstrou um potencial 5 vezes maior na transfecção, quando comparado a NPL com o DLin-MC3-DMA (THI *et al.*, 2021).

Figura 9 – Estrutura química do ATX-1.

Fonte: Adaptado de THI *et al.*, 2021.

Entre os medicamentos em fase de estudo clínico para combater a COVID-19, as NPLs da CureVac utilizam o lipídio catiônico ionizável Acuitas ALC-0315 (mesmo lipídio utilizado na vacina SARS-CoV-2 aprovada Tozinameran), que possui pKa teórico de 6,09. A Moderna utiliza o lipídio H (SM-102), que possui pKa teórico de 6,68, e a Imperial utiliza o Acuitas A9, com pKa teórico de 6,27 (BUSCHMANN *et al.*, 2021). As estruturas químicas desses lipídios podem ser observadas na **Figura 10**.

Figura 10 – Estrutura química dos lipídios catiônicos ionizáveis incorporados nas formulações de NPL carreadoras de RNAm em estudo de fase clínica das vacinas contra o SARS-CoV-2.**(A)** Lipídio H (SM-102)**(B)** Acuitas ALC-0315**(C)** Acuitas 09

Fonte: Adaptado de BUSCHMANN *et al.*, 2021, PATEL; IBRAHIM; CHENG, 2021.

Quadro 2 – Medicamentos em estudos de fase clínica contra doenças oncológicas, que possuem ácido nucleico como fármaco, veiculados em nanopartículas lipídicas.

Nome/Empresa	Ácido nucleico	Doença	Via de Administração	Fase Clínica	Número de ID
mRNA-4157/Moderna–Merck	RNA _m	Tumor sólido/melanoma	Intramuscular	2	NCT03897881
mRNA-5671/Moderna–Merck	RNA _m	Neoplasias	Intramuscular	1	NCT03948763
mRNA-2752/Moderna, AstraZeneca	RNA _m	Tumores malignos sólidos	Intratumoral	1	NCT03739931
BNT151/ BioNTech	RNA _m	Tumores sólidos	Intravenoso	1 e 2	NCT04455620
RO7198457/BioNTech	RNA _m	Melanoma	Intravenoso	2	NCT03815058
IVAC_W_bre1_uID and IVAC_M_uID/ BioNTech	RNA _m	Câncer de mama	Intravenoso	1	NCT02316457
INT-1B3/ InteRNA	miRNA	Tumores sólidos	Intravenoso	1	NCT04675996
ALN-VSP02/ Alnylam/Ascleptis	siRNA	Tumores hepáticos sólidos	Intravenoso	1	NCT01158079
TKM-080301, TKM-PLK1/Arbutus Biopharma	siRNA	Tumores sólidos	Intravenoso	1 e 2	NCT01262235
Atu027/ Silence Therapeutics	siRNA	Câncer pancreático avançado	Intravenoso	1 e 2	NCT01808638
EPHARNA/ M.D. Anderson Cancer Center	siRNA	Tumores sólidos	Intravenoso	1	NCT01591356
SGT-53/ SynerGene Therapeutics	DNA _p	Câncer pancreático metastático	Intravenoso	2	NCT02340117
MTL-CEBPA/ Mina Alpha	RNA _{sa}	Câncer hepático avançado	Intravenoso	1	NCT02716012
HARE-40/ BioNTech	RNA _m	Câncer HPV +	Intradermal	1 e 2	NCT03418480
W_ova1/ BioNTech	RNA _m	Câncer de ovário	Intravenoso	1	NCT04163094
MEDI1191 /MedImmune LLC	RNA _m	Tumores sólidos	Intratumoral	1	NCT03946800
SAR441000 /Sanofi/BioNTech	RNA _m	Tumores sólidos	Intratumoral	1	NCT03871348

Legenda: RNA_m - ácido ribonucleico mensageiro; miRNA- micro ácido ribonucleico; siRNA- pequeno ácido ribonucleico de interferência; DNA_p - ácido desoxirribonucleico plasmidial; RNA_{sa}-pequeno ácido ribonucleico de amplificação própria; HPV - vírus do papiloma humano.

Fonte: Adaptado de DAS *et al.*, 2021; HOU *et al.*, 2021; THI *et al.*, 2021; WITZIGMANN *et al.*, 2020.

Diversos medicamentos que possuem ácidos nucleicos carregados por NPLs para o tratamento de câncer, estão em fase de estudo clínico. Uma das estratégias que vem sendo

testadas baseia-se na utilização de RNAm, como o mRNA-4157 e o mRNA-5671, para estimular a produção de neoantígenos (antígenos altamente imunogênicos gerados por mutações em células cancerígenas) para tratar tumores sólidos e câncer pancreático. Em outro estudo, NPLs contendo RNAm (mRNA-2752) que codifica citocinas pró-inflamatórias como a IL-23 (interleucina 23) e IL-36 γ (interleucina 36 γ), e também o OX40L (ligante para OX40), estão sendo testadas com o objetivo de gerar um microambiente pró-inflamatório no tumor, e aumentar a resposta por células T (MIAO; ZHANG; HUANG, 2021).

Quadro 3 – Medicamentos em estudos de fase clínica contra doenças genéticas, que possuem ácido nucleico como fármaco, veiculados em nanopartículas lipídicas.

Nome/Empresa	Ácido nucleico	Doença	Via de Administração	Fase Clínica	Número de ID
ARCT-810/ Arcturus	RNAm	Deficiência de ornitina transcarbamilase	Intravenoso	1	NCT04442347
mRNA-3705/ Moderna	RNAm	Acidemia metilmalônica	Intravenoso	1 e 2	NCT04899310
MRT5005/Translat e Bio, Inc.	RNAm	Fibrose cística	Nebulização	1 e 2	NCT03375047
ALN-PCS02/ Alnylam Pharmaceuticals	siRNA	Hipercolesterolemia	Intravenoso	1	NCT01437059
ND-L02-s0201, BMS-986263/ Nitto Denko Corporation/ Bristol-Myers Squibb	siRNA	Fibrose pulmonar idiopática	Intravenoso	2	NCT03538301
NTLA-2001/ Intellia Therapeutics / Regeneron	CRISPR / Cas9	Amiloidose hereditária por transtirretina	Intravenoso	1	NCT04601051
mRNA-3927/ Moderna	RNAm	Acidemia propiônica	Intravenoso	1 e 2	NCT04159103

Legenda: RNAm - ácido ribonucleico mensageiro; siRNA-pequeno ácido ribonucleico de interferência; CRISPR-Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas; Cas9 - proteína 9 associada ao CRISPR.

Fonte: Adaptado de BERG *et al*, 2021; DAS *et al*, 2021; HOU *et al*, 2021; WITZIGMANN *et al*, 2020.

As doenças genéticas são causadas por mutações em genes, que resultam na expressão anormal de certas proteínas, ou até a não expressão dessas. Há três estratégias principais, com a utilização de NPLs carreadoras de ANs, para o tratamento dessas doenças. A primeira é a veiculação de RNAm para as células, fazendo com que elas traduzam as proteínas desejadas, como é o caso do mRNA-3705 e mRNA-3927, que tratam respectivamente a acidemia metilmalônica e a acidemia propiônica, por estimular a produção de enzimas que

irão degradar produtos metabólicos que se acumulam e resultam em graves sintomas clínicos. A Translate Bio desenvolveu uma formulação de NPL carreadora de RNAm, MRT5005, administrada por nebulização para o tratamento de pacientes com fibrose cística. Outra estratégia é a veiculação de siRNA, para que haja o silenciamento da expressão de proteínas que estão sendo produzidas em excesso. Já a terceira estratégia utiliza o sistema CRISPR/Cas9 com a finalidade de corrigir, a nível de genoma, a mutação que está causando a doença. Essa estratégia se diferencia das outras por buscar um tratamento duradouro, que possibilite uma cura. O medicamento em fase de estudo clínico NTLA2001 é um exemplo da veiculação do sistema CRISPR/Cas9 por NPL, para o tratamento da amiloidose transtirretina hereditária (HOU *et al.*, 2021).

4.4.2 Medicamentos comercializados baseados em nanopartículas lipídicas para liberação de ácidos nucleicos

Existem 3 medicamentos que utilizam nanopartículas lipídicas como carreadores de ácidos nucleicos atualmente no mercado, aprovados pela FDA. O Onpattro®, Comirnaty® e Spikevax®. O primeiro se refere à liberação da Patisirana sódica, produzida pela Alnylam® Pharmaceuticals, utilizado para o tratamento de amiloidose hereditária, sendo o primeiro medicamento comercializado que utiliza siRNA como fármaco encapsulado em NPLs. Os dois outros medicamentos são destinados à liberação da Tozinameran e Elasmomeran em vacinas contra o SARS-CoV-2, sendo produzidas, respectivamente, pela BioNTech/Pfizer e Moderna. Ambas foram aprovadas para uso emergencial pela FDA em dezembro de 2020 para combater a COVID-19. Devido ao grande impacto clínico gerado pela aprovação das vacinas de RNAm veiculadas por NPLs, existe a tendência de que se facilite o surgimento de outros medicamentos com tecnologias similares em suas formulações, o que já se reflete no mercado, com um recorde de investimento em *startups* de nanomedicina (KULARATNE; CRIST; STERN, 2022).

O Onpattro® trata a polineuropatia em pacientes com amiloidose mediada pela transtirretina, uma proteína que se aglomera de uma maneira desorganizada e se deposita em diferentes tecidos e órgãos do corpo, podendo causar uma disfunção orgânica e a morte do paciente. A terapia é baseada no silenciamento do gene responsável pela produção da forma anormal da proteína e tem mostrado melhorar consideravelmente a qualidade de vida e sobrevivência de pacientes afetados (SAMARIDOU, HEYES, LUTWYCHE, 2020). O

silenciamento ocorre através da ação do siRNA presente no medicamento, que é composto por um RNA de fita dupla com 21 pares de bases. Assim que as NPLs são incorporadas pelos hepatócitos no fígado, através da apresentação pela apolipoproteína E, e realizam o escape endossomal, o siRNA degrada o RNAm que codifica a transtirretina, reduzindo assim sua síntese proteica. Essa formulação é administrada pela via intravenosa, sendo observado seu acúmulo no fígado, local de interesse clínico, pois é onde acontece a maior produção de transtirretina. Um estudo com ratos demonstrou que após 4 horas da administração intravenosa de uma dose da Patisirana, aproximadamente 90% da radioatividade do medicamento foi detectada no fígado (SUZUKI; ISHIHARA, 2021; YONEZAWA; KOIDE; ASAI, 2020).


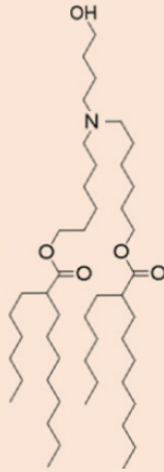
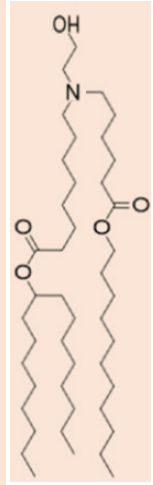
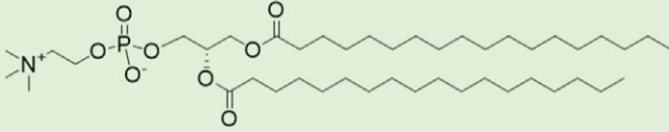
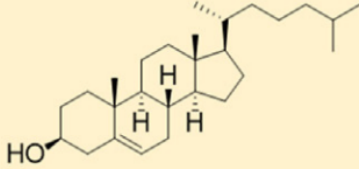
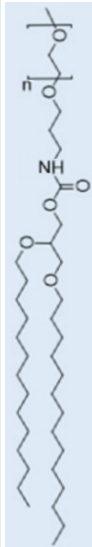
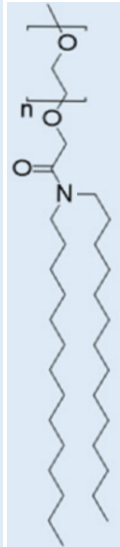
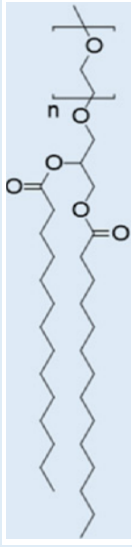
As vacinas Tozinameran e Elasmoran possuem em sua formulação moléculas de RNAm de fita única com mais de 4000 bases que codificam a proteína *spike* do SARS-CoV-2, que possui um grande potencial em estimular o sistema imune, gerando a produção de anticorpos. As vacinas são administradas pela via intramuscular, onde ocorre uma pequena inflamação local, levando ao recrutamento de neutrófilos e células apresentadoras de antígenos, além da drenagem através de capilares linfáticos para linfonodos próximos, onde acontece a ativação das células T, gerando a resposta imune adaptativa. Um estudo com ratos avaliou que após uma dose intramuscular de Tozinameran, a concentração da radioatividade do medicamento se encontrava mais alta entre 15 minutos e 48 horas no local da administração. Devido ao perfil mais localizado da distribuição do medicamento por essa via de administração, é possível ter uma redução na exposição sistêmica indesejada (SUZUKI; ISHIHARA, 2021).

Os três medicamentos aprovados possuem diversas similaridades em suas formulações, sendo todos compostos pelos quatro lipídios que compõe as NPLs modernas: lipídio peguilado, fosfolipídio, colesterol e o lipídio catiônico ionizável. Os três lipídios catiônicos ionizáveis utilizados nas respectivas formulações possuem grupo de amina terciária, sendo que o DLin-MC3-DMA (presente no Onpattro®) possui um pKa 6,44; o ALC-0315 (presente no Comirnaty®) possui um pKa 6,09; e o SM-102 (presente no Spikevax®) possui um pKa 6,68. Com esses valores de pKa, esses lipídios não apresentam carga em pH sanguíneo, e quando em meio ácido, dentro dos endossomas, tornam-se catiônicos, permitindo o escape endossomal (BUSCHMANN *et al.*, 2021). Os lipídios catiônicos ionizáveis das vacinas aprovadas possuem uma estrutura molecular em formato de cone invertido acentuada, pelo aumento da ramificação de suas caudas lipídicas, o que também contribui para aumentar a eficiência do escape endossomal (CARRASCO *et al.*,

2021). O DLin-MC3-DMA possui um tempo de meia vida, *in vivo*, de cerca de 70 horas devido às suas características estruturais não biodegradáveis (SAMARIDOU, HEYES, LUTWYCHE, 2020). Já o ALC-0315 e o SM-102 do Comirnaty® e Spikevax®, respectivamente, possuem ligações éster em suas porções lipídicas que sofrem hidrólise *in vivo*, o que torna esses lipídios biodegradáveis, possuindo uma maior tolerabilidade por serem eliminados mais facilmente do organismo após sua administração (SUZUKI; ISHIHARA, 2021)

Os lipídios peguilados utilizados nas três formulações possuem cadeias com 14 carbonos, chamados de lipídios peguilados difusíveis, sendo que essa característica estrutural permite uma dissociação mais rápida das cadeias de polietilenoglicol da superfície das NPLs *in vivo*. Os lipídios peguilados utilizados nas vacinas são conjugados do PEG-2000, sendo que formulações que contêm PEG2000-DMG possuem uma maior eficácia *in vivo* em comparação ao ALC-0159, pois podem se separar mais rapidamente das NPLs, facilitando a entrada da partícula na célula e a realização do escape endossomal (LIU; TIAN; ZHENG; CUI, 2022). A composição lipídica das três formulações de NPLs encontradas no mercado pode ser observada no **Quadro 4**.

Quadro 4 – Componentes das NPLs aprovadas no mercado.

	Onpattro® (Alnylam Pharmaceuticals)	Comirnaty® (Pfizer–BioNTech)	SpikeVax® (Moderna)
Fármaco	Patisirana sódica	Tozinameran	Elasomeran
Lipídio ionizável	 DLin-MC3-DMA	 ALC-0315	 SM-102
Fosfolipídio	 DSPC		
Colesterol	 Colesterol		
Lipídio peguilado	 PEG2000-C-DMG	 ALC-0159	 PEG2000-DMG

Fonte: Adaptado de SUZUKI; ISHIHARA, 2021.

Quanto à proporção da concentração de cada lipídio nas formulações das NPLs, existem variações entre os medicamentos. No caso do Spikevax® (Moderna), a porcentagem da concentração molar do lipídio catiônico ionizável, do fosfolipídio, do colesterol e do lipídio peguilado é de, respectivamente, 50:10:38,5:1,5. Na formulação do Comirnaty® (Pfizer–BioNTech), a proporção dos lipídios é de 46.3:9.4:42.7:1.6 (LIU *et al*, 2022), enquanto o Onpattro® (Alnylam Pharmaceuticals) emprega uma proporção de 50:10:38.5:1,5 de lipídio catiônico ionizável, do fosfolipídio, do colesterol e do lipídio peguilado (KAZEMIAN *et al*, 2022). Todas as formulações são produzidas pelo método de formação espontânea das NPLs após diluição de uma solução etanólica dos lipídios em uma solução aquosa pH ~ 4,0 contendo o RNA terapêutico, conforme descrito em 4.2 (SUZUKI; ISHIHARA, 2021).

5 CONCLUSÕES

A terapia com ácidos nucleicos tem se mostrado uma forte ferramenta para tratar diversas doenças tidas antes como difíceis de tratar. Atualmente, estes fármacos podem ser veiculados em carreadores que permitiram contornar os problemas que limitavam a sua utilização. A introdução desses fármacos em nanopartículas lipídicas (LNP) impulsionou o desenvolvimento de medicamentos com ácidos nucleicos, pois permitiram não apenas uma boa eficácia na internalização da nanopartícula pela célula, mas também sucesso no escape endossomal, devido ao desenvolvimento e evolução dos lipídios catiônicos ionizáveis, permitindo que o ácido nucleico terapêutico esteja realmente presente no interior das células. A partir de diversos estudos foi determinado que a composição para essas partículas se baseia em quatro componentes: lipídios catiônicos ionizáveis, fosfolipídios, colesterol e lipídio peguilado. O tamanho ideal da NPL varia de ~20 nm a ~150 nm, dependendo do seu alvo terapêutico, podendo ser modulado pela concentração de lipídio peguilado na formulação. A neutralização da carga das partículas na circulação sistêmica pela introdução de lipídios ionizáveis torna estas irreconhecíveis pelo sistema imune e facilita a sua internalização celular.

Uma grande vantagem dessas estruturas é a capacidade de carrear diversos tipos de ácidos nucleicos, podendo ser desenhadas para exercer uma dada função terapêutica. Pequenas mudanças nas estruturas químicas ou na concentração dos lipídios podem gerar alterações nas propriedades físico-químicas das NPLs, podendo estas serem manipuladas a

fim de mudar seu tropismo celular, seu tempo de meia vida, sua biodegradabilidade, entre outras características. Durante a formulação podem ser adicionados ligantes às NPLs, como anticorpos ou proteínas, a fim de direcioná-las especificamente às células de interesse terapêutico.

A flexibilidade apresentada por essas nanopartículas torna-as muito promissoras para tratar diversas doenças. No momento existem 41 medicamentos em estudos de fase clínica que utilizam NPLs como carreadoras de ácidos nucleicos, sendo elas testadas para o tratamento de doenças oncológicas, doenças genéticas metabólicas, e para o combate de doenças virais. A aprovação do Onpattro® pela FDA em 2018, trouxe a aprovação do potente lipídio ionizável DLin-MC3-DMA, e fomentou ainda mais o interesse no desenvolvimento dessas formulações, sendo que em 2020 foram aprovadas duas vacinas, Comirnaty® e Spikevax®, juntando-se ao Onpattro® como os representantes de medicamentos com NPL carreadoras de ácidos nucleicos disponíveis no mercado. Tendo em vista esses avanços, o campo da terapia com ANs veiculados em NPLs tende a crescer, e trazer tratamentos inovadores.

REFERÊNCIAS

- AKINC, A. *et al.* The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. **Nature Nanotechnology**, [S.l.], v. 14, n. 12, p. 1084-1087, Dez. 2019. <http://dx.doi.org/10.1038/s41565-019-0591-y>.
- ALBERTSEN, C. *et al.* The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 188, Set. 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2022.114416>.
- BERG, A. *et al.* Polymeric delivery systems for nucleic acid therapeutics: approaching the clinic. **Journal Of Controlled Release**, [S.l.], v. 331, p. 121-141, Mar. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.01.014>
- BÖTTGER, R. *et al.* Lipid-based nanoparticle technologies for liver targeting. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 154-155, p. 79-101, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.017>.
- BUSCHMANN, M. *et al.* Nanomaterial Delivery Systems for mRNA Vaccines. **Vaccines**, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 65, Jan. 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/vaccines9010065>.
- CARRASCO, M. *et al.* Ionization and structural properties of mRNA lipid nanoparticles influence expression in intramuscular and intravascular administration. **Communications Biology**, [S.l.], v. 4, n. 1, Ago. 2021. <http://dx.doi.org/10.1038/s42003-021-02441-2>.
- CHEN, S. *et al.* Development of lipid nanoparticle formulations of siRNA for hepatocyte gene silencing following subcutaneous administration. **Journal Of Controlled Release**, [S.l.], v. 196, p. 106-112, Dez. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.09.025>.
- CHEN, W.; HU, Y.; JU, D. Gene therapy for neurodegenerative disorders: advances, insights and prospects. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, [S.l.], v. 10, n. 8, p. 1347-1359, Ago. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2020.01.015>.
- CHENG, Q. *et al.* Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR–Cas gene editing. **Nature Nanotechnology**, [S.l.], v. 15, n. 4, p. 313-320, Abr. 2020. <http://dx.doi.org/10.1038/s41565-020-0669-6>.
- CULLIS, P.; HOPE, M. J. Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies, [S.l.], *Molecular Therapy*, v. 25, n. 7, Jul 2017. <https://doi: 10.1016/j.ymthe.2017.03.013>.
- DAS, R. *et al.* What's Next after Lipid Nanoparticles? A Perspective on Enablers of Nucleic Acid Therapeutics. **Bioconjugate Chemistry**, [S.l.], Abr. 2022. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.2c00058>.
- FERHAN, A. *et al.* Lipid Nanoparticle Technologies for Nucleic Acid Delivery: a nanoarchitectonics perspective. **Advanced Functional Materials**, [S.l.], v. 32, n. 37, Jun. 2022. <http://dx.doi.org/10.1002/adfm.202203669>.

- GONÇALVES, G. A. R.; PAIVA, R. M. A. Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. Einstein, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 369-375, Jul. 2017. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082017RB4024>.
- HAN, X. *et al.* An ionizable lipid toolbox for RNA delivery. **Nature Communications**, [S.l.], v. 12, n. 1, Dez. 2021. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-27493-0>.
- HOLL, N. J.; LEE, H.-J.; HUANG, Y.-W. Evolutionary Timeline of Genetic Delivery and Gene Therapy. *Current Gene Therapy*, [S.l.], v. 21, p. 89-111, 2021. <http://dx.doi.org/10.2174/1566523220666201208092517>.
- HOU, X. *et al.* Lipid nanoparticles for mRNA delivery. **Nature Reviews Materials**, [S.l.], v. 6, n. 12, p. 1078-1094, Ago. 2021. <http://dx.doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0>.
- JIAO, Y. *et al.* Research Progress of nucleic acid delivery vectors for gene therapy. *Biomedical Microdevices*, [S.l.], v. 22, n. 1, Jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s10544-020-0469-7>.
- KAZEMIAN, P. *et al.* Lipid-Nanoparticle-Based Delivery of CRISPR/Cas9 Genome-Editing Components. **Molecular Pharmaceutics**, [S.l.], v. 19, n. 6, p. 1669-1686, Maio 2022. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00916>.
- KIM, H. J.; KIM, A.; MIYATA, K. Synthetic molecule libraries for nucleic acid delivery: design parameters in cationic/ionizable lipids and polymers. **Drug Metabolism And Pharmacokinetics**, [S.l.], v. 42, Fev. 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dmpk.2021.100428>.
- KIM, J. *et al.* Self-assembled mRNA vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 170, p. 83-112, Mar. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2020.12.014>.
- KULARATNE, R. N.; CRIST, R. M.; STERN, S. T. The Future of Tissue-Targeted Lipid Nanoparticle-Mediated Nucleic Acid Delivery. **Pharmaceutics**, [S.l.], v. 15, n. 7, p. 897, Jul. 2022. <http://dx.doi.org/10.3390/ph15070897>.
- LEE, S. W. L. *et al.* MicroRNA delivery through nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, [S.l.], v. 313, p. 80-95, Nov. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.10.007>
- LIU, T. *et al.* Design Strategies for and Stability of mRNA–Lipid Nanoparticle COVID-19 Vaccines. **Polymers**, [S.l.], v. 14, n. 19, p. 4195, Out. 2022. <http://dx.doi.org/10.3390/polym14194195>.
- LOKUGAMAGE, M. *et al.* Optimization of lipid nanoparticles for the delivery of nebulized therapeutic mRNA to the lungs. **Nature Biomedical Engineering**, [S.l.], v. 5, n. 9, p. 1059-1068, out. 2021. <http://dx.doi.org/10.1038/s41551-021-00786-x>.
- MIAO, L.; ZHANG, Y.; HUANG, L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy. **Molecular Cancer**, [S.l.], v. 20, n. 1, Fev. 2021. <http://dx.doi.org/10.1186/s12943-021-01335-5>.
- NAKAMURA, T. *et al.* The Effect of Size and Charge of Lipid Nanoparticles Prepared by Microfluidic Mixing on Their Lymph Node Transitivity and Distribution. **Molecular**

Pharmaceutics, [S.l.], v. 17, n. 3, p. 944-953, Jan. 2020.
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b01182>.

NI, H. *et al.* Piperazine-derived lipid nanoparticles deliver mRNA to immune cells in vivo. **Nature Communications**, [S.l.], v. 13, n. 1, Ago. 2022.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-022-32281-5>.

PAN, X. *et al.* Applications and developments of gene therapy drug delivery systems for genetic diseases. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 16, n. 6, p. 687–703, Nov. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2021.05.003>.

PARHIZ, H. *et al.* PECAM-1 directed re-targeting of exogenous mRNA providing two orders of magnitude enhancement of vascular delivery and expression in lungs independent of apolipoprotein E-mediated uptake. **Journal Of Controlled Release**, [S.l.], v. 291, p. 106-115, dez. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.10.015>.

PATEL, P.; IBRAHIM, N. M.; CHENG, K. The Importance of Apparent pKa in the Development of Nanoparticles Encapsulating siRNA and mRNA. **Trends In Pharmacological Sciences**, [S.l.], v. 42, n. 6, p. 448-460, Jun. 2021.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2021.03.002>.

PAUNOVSKA, K.; LOUGHREY, D.; DAHLMAN, J. E. Drug delivery systems for RNA therapeutics. **Nature Reviews Genetics**, [S.l.], Jan. 2022. <http://dx.doi.org/10.1038/s41576-021-00439-4>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41576-021-00439-4>. Acesso em: 26 mar. 2022.

RAMISHETTI, S. *et al.* A Combinatorial Library of Lipid Nanoparticles for RNA Delivery to Leukocytes. **Advanced Materials**, [S.l.], v. 32, n. 12, Mar. 2020.
<http://dx.doi.org/10.1002/adma.201906128>.

RUNGTA, R. *et al.* Lipid Nanoparticle Delivery of siRNA to Silence Neuronal Gene Expression in the Brain. **Molecular Therapy—Nucleic Acids**, [S.l.], v. 2, n. 11, p. 136, Dez. 2013. <http://dx.doi.org/10.1038/mtna.2013.65>

RYALS, R. *et al.* The effects of PEGylation on LNP based mRNA delivery to the eye. **Plos One**, [S.l.], v. 15, n. 10, 29 Out. 2020. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0241006>.

SAGO, C. *et al.* Nanoparticles That Deliver RNA to Bone Marrow Identified by in Vivo Directed Evolution. **Journal Of The American Chemical Society**, [S.l.], v. 140, n. 49, p. 17095-17105, Nov. 2018. <http://dx.doi.org/10.1021/jacs.8b08976>.

SAMARIDOU, E.; HEYES, J.; LUTWYCHE, P. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 154–155, p. 37–63, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.002>.

SILVA, A. C. R.; BARBOSA JÚNIOR, J. Realidades e perspectivas do uso de terapia gênica no tratamento de doenças. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, [S.l.], v. 20, n. 3, p. 122-127, Dez. 2018. <http://dx.doi.org/10.23925/1984-4840.2018v20i3a2>.

SILVA, C. D.; MATTE, U. S.; GIUGLIANI, R. Terapia gênica: uma nova estratégia para o tratamento de doenças, *Revista HCPA*, [S.L.], v. 3, p. 379-386, 2001.

SPADEA, A. *et al.* Nucleic Acid-Loaded Lipid Nanoparticle Interactions with Model Endosomal Membranes. ***Acs Applied Materials & Interfaces***, [S.L.], v. 14, n. 26, p. 30371-30384, Jun. 2022. <http://dx.doi.org/10.1021/acsami.2c06065>.

SUZUKI, Y.; ISHIHARA, H. Difference in the lipid nanoparticle technology employed in three approved siRNA (Patisiran) and mRNA (COVID-19 vaccine) drugs. ***Drug Metabolism And Pharmacokinetics***, [S.L.], v. 41, Dez. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dmpk.2021.100424>.

THI, T. *et al.* Lipid-Based Nanoparticles in the Clinic and Clinical Trials: from cancer nanomedicine to covid-19 vaccines. ***Vaccines***, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 359, Abr. 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/vaccines9040359>.

WENG, Y. *et al.* Improved Nucleic Acid Therapy with Advanced Nanoscale Biotechnology. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, [S.L.], v. 19, p. 581-601, Mar. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.omtn.2019.12.004>.

WITZIGMANN, D. *et al.* Lipid nanoparticle technology for therapeutic gene regulation in the liver. ***Advanced Drug Delivery Reviews***, [S.L.], v. 159, p. 344-363, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.026>.

YAMADA, Y. Nucleic Acid Drugs—Current Status, Issues, and Expectations for Exosomes. *Cancers*, [S.L.], v. 13, n. 19, Out. 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers13195002>.

YONEZAWA, S.; KOIDE, H.; ASAI, T. Recent advances in siRNA delivery mediated by lipid-based nanoparticles. ***Advanced Drug Delivery Reviews***, [S.L.], v. 154-155, p. 64-78, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.022>.