

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica**

Ana Carolina Soares Braga

**Plataforma de nanopartículas lipídicas ionizáveis**  
**para entrega de DNA *in vivo***

Belo Horizonte

2023

Ana Carolina Soares Braga

**Plataforma de nanopartículas lipídicas ionizáveis  
para entrega de DNA *in vivo***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Tecnológica: Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito necessário para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Pires Goulart  
Guimarães

Coorientador: Dr. Sérgio Ricardo Aluotto  
Scalzo Júnior

Belo Horizonte

2023

Ficha Catalográfica

B813p  
2023  
D  
Braga, Ana Carolina Soares.  
Plataforma de nanopartículas lipídicas ionizáveis para entrega de DNA in vivo  
[manuscrito] / Ana Carolina Soares Braga. 2023.  
1 recurso online (90 f. : il., gráfs., tabs., color.) : pdf.

Orientador: Pedro Pires Goulart Guimarães.  
Coorientador: Sérgio Ricardo Aluotto Scalzo Júnior.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química (Programa de Pós-Graduação em Inovação Tecnológica).  
Inclui bibliografia e apêndices.

1. Inovações tecnológicas – Teses. 2. Biotecnologia – Teses. 3. Nanotecnologia – Teses. 4. Nanopartículas – Teses. 5. Lipídios – Teses. 6. Ácidos nucleicos – Teses. 7. Sequência de nucleotídeos – Teses. 8. DNA – Teses. I. Guimarães, Pedro Pires Goulart, Orientador. II. Scalzo Júnior, Sérgio Ricardo Aluotto, Coorientador. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Programa de pós-graduação em Inovação Tecnológica

**ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 13ª DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, DA DISCENTE ANA CAROLINA SOARES BRAGA Nº DE REGISTRO 2020726518.**

Aos 26 (vinte e seis) dias do mês de abril de 2023, às 14 horas, online, via plataforma virtual, de maneira fechada, sem presença de público, reuniu-se a Comissão Examinadora composta pelos Professores Doutores: Pedro Pires Goulart Guimarães do Programa de Pós-graduação em Inovação Tecnológica da UFMG (Orientador), Sérgio Ricardo Aluotto Scalzo Júnior da Universidade Federal de Minas Gerais (Coorientador), Frederic Jean Georges Frezard do Programa de Pós-graduação em Inovação Tecnológica da UFMG e Anderson Kenedy Santos da Yale University, para julgamento da Dissertação do Mestrado em Inovação Tecnológica - Área de Concentração: Inovação Tecnológica, Biofarmacêutica e Biotecnológica, da discente Ana Carolina Soares Braga, Dissertação intitulada: **“Plataforma de nanopartículas lipídicas ionizáveis para entrega de DNA in vivo.”** O Presidente da Banca abriu a sessão e apresentou a Comissão Examinadora, bem como esclareceu sobre os procedimentos que regem da defesa pública de dissertação. Após a exposição oral do trabalho pela discente, seguiu-se com arguição pelos membros da Banca Examinadora, com a respectiva defesa da candidata. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença da discente, tendo deliberado unanimemente pela sua **APROVAÇÃO**. Nada mais havendo para constar, lavrou-se e fez a leitura pública da presente Ata que segue assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora e pelo coordenador do PPGIT. Belo Horizonte, 26 de abril de 2023.

Professor Doutor Pedro Pires Goulart Guimarães (Orientador)

(PPG em Inovação Tecnológica da UFMG)

Professor Doutor Sérgio Ricardo Aluotto Scalzo Júnior (Coorientador)

(PPG em Inovação Tecnológica da UFMG)

Professor Doutor Frederic Jean Georges Frezard

(PPG em Inovação Tecnológica da UFMG)

Professor Doutor Anderson Kenedy Santos

(Universidade Yale)

Professor Doutor Ado Jório de Vasconcelos

## Coordenador do PPG em Inovação Tecnológica da UFMG



Documento assinado eletronicamente por **Anderson Kenedy Santos, Usuário Externo**, em 27/04/2023, às 13:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Frederic Jean Georges Frezard, Professor do Magistério Superior**, em 27/04/2023, às 13:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Pires Goulart Guimaraes, Professor do Magistério Superior**, em 27/04/2023, às 18:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sérgio Ricardo Aluotto Scalzo Júnior, Usuário Externo**, em 28/04/2023, às 09:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ado Jorio de Vasconcelos, Coordenador(a)**, em 28/04/2023, às 16:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2259416** e o código CRC **7ECB14E2**.

*“Ó Jesus misericordioso, ao Teu lado lutarei com coragem e ousadia as lutas e batalhas. Em Teu nome realizarei tudo e superarei tudo. Ó meu Deus, Bondade infinita, peço-te que a Tua misericórdia sem fim me acompanhe sempre e em todas as coisas.”*

**O Diário de Santa Faustina, 859**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus e à Virgem Maria, por serem sempre o meu sustento nos momentos difíceis, onde eu sei que sempre encontrarei forças para vencer todo e qualquer obstáculo que forem colocados em meu caminho!

Aos meus quatro anjinhos protetores que sempre pedem o auxílio de Deus e de Maria por mim lá do céu! Vovô Manuel, vovó Lúcia, bisa Márcia e padrinho Marcinho, saibam que a pequenina de vocês está vencendo e subindo mais um degrau aqui na terra, e hoje dedico essa conquista a vocês! Continuem olhando por mim aí de cima!

Aos meus pais Rafael e Edna, que nunca mediram esforços para me verem conquistando cada sonho meu, e que não me abandonaram em nenhum momento da luta enfrentada durante esses anos! Por acreditarem em mim e me incentivarem a sempre continuar, mesmo quando eu achava que não conseguiria! Por cada colo, cada palavra dita em momentos de dificuldade, cada “Vai dar tudo certo, filha”! Por me ensinarem que para vencer eu teria que batalhar até o fim e dar o máximo de mim, e principalmente que grandes batalhas se vence dobrando os joelhos e entregando todas elas a Deus! Agradeço imensamente a vocês o vos amo com todo o meu coração!

Ao vovô Marcinho e vovó Nem por cada oração e cada incentivo, por serem inspiração para mim e por me ensinarem a levar a vida de uma maneira mais calma e leve.

À toda minha família tios, tias, primos e primas (Beth, Dudu, Janinho, André Djanira, Mônica, Nildes, Alison, Carol, Janine, Anderson, Jans, Thaisinha, Jéssica, Lisa) por sempre rezarem por mim e por serem meu apoio em todas as etapas desse processo! Amo muito vocês e agradeço por todo o cuidado que sempre tiveram comigo! As minhas madrinhas mãe Nana e Didi por sempre acreditarem em mim, me ensinarem a ver a vida de forma mais alegre, por serem meu porto seguro, por não medirem esforços para me verem sorrir, por serem uma segunda mãe para mim, e principalmente por todas as orações depositadas sobre mim! Amo muito vocês!

Aos meus tios maluquinhos que sempre me colocam para cima, mesmo de longe, e que topam qualquer loucura comigo e não medindo esforços para me verem feliz, obrigada Mary, Sávio, Flávio e Cris! Amo muito vocês!

À minha irmã de alma Letícia que está comigo em todos os momentos, que me acompanha em todas as loucuras, que compartilha a vida comigo! Obrigada mais uma vez por ser a calma quando eu achava que tudo ia desmoronar e por sempre acreditar em mim! Aos meus anjinhos protetores da terra que chamo de amigos, os quais Deus permitiu que eu compartilhasse todos os momentos da minha vida. Arthur, Lalá, Nay, Felipe, Camilinha, Jeje, vocês são peças-chaves na minha vida! Obrigada por tudo e por todas as orações, amo vocês!

Aos meus irmãos e pais da Comunidade Mariana Caminho da Cruz, obrigada por todos os anjinhos enviados e por todas as orações vinda de vocês! E em especial a May e Haylinha por sempre me ouvirem e me consolarem em muitos momentos dessa jornada! Amo vocês com amor de cruz!

Ao Ken pela amizade e pelos grandes ensinamentos que me ajudaram a ser a cientista que sou hoje! Por ter sido um grande ombro amigo, por acreditar em mim quando eu me via incapaz e pelos vários puxões de orelha!

Ao meu orientador, Prof. Pedro, por todos os ensinamentos compartilhados, por toda paciência, cuidado, amizade e orientação! Por ter sido um grande apoio em um dos momentos em que mais precisei de compreensão durante o mestrado! Muito obrigada por tudo!

Ao meu coorientador, Dr. Sérgio, por todos os ensinamentos, por ter sido um grande ombro amigo e conselheiro em muitos momentos! Por confiar em mim e aceitar me coorientar! Levarei para sempre comigo todos os ensinamentos!

Ao melhor grupo de cientistas que eu pude compartilhar vários momentos especiais e de troca de conhecimento! LABNANO, vocês foram grandes presentes durante essa trajetória!

À Pró-reitoria de Pesquisa da UFMG e às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e por dedicarem um tempo para me ouvir!

**A todos, o meu muito obrigada!**

*“Fazei tudo por Amor. - Assim não há coisas pequenas: tudo é grande. - A perseverança nas pequenas coisas, por Amor, é heroísmo.”*

**São Josemaria Escrivá (Caminho, 813)**

## RESUMO

As terapias genéticas e vacinas que utilizam ácidos nucleicos surgiram como uma abordagem promissora no tratamento e prevenção de várias doenças, incluindo as virais e o câncer. No entanto, o uso dessa ferramenta requer o desenvolvimento de tecnologias que proporcionem uma entrega segura e eficaz do ácido nucleico. Nesse sentido, o uso de nanopartículas lipídicas ionizáveis (LNPs) tem se mostrado uma solução atraente para a clínica, uma vez que já vem sendo empregadas em vacinas de mRNA aprovadas para COVID-19, apresentando um grande potencial de revolucionar a prevenção tratamento de diversas doenças no futuro. Entretanto, a triagem de LNPs são comumente realizadas em um ambiente *in vitro*, o que impossibilita uma reprodução completa das barreiras biológicas encontradas em um organismo vivo. Portanto, o presente trabalho tem por objetivo desenvolver e implementar uma plataforma baseada em LNPs para entrega segura e eficaz de DNA através de uma triagem *in vivo*. Para esse fim, foi desenvolvida uma biblioteca de 29 LNPs que encapsulam código de barras de DNA (b-DNA) como ferramenta de identificação, contendo um lipídio ionizável, um lipídio auxiliar, colesterol e um lipídio acoplado ao PEG. Dentre os quatro componentes, a composição molar dos lipídios auxiliares (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) e 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP)) e do colesterol foram variadas para obter diferentes formulações. As LNPs foram formuladas através de um dispositivo microfluídico, combinadas em um *pool* e injetadas em camundongos C57BL/6 por via intramuscular ou intravenosa. Para avaliar a biodistribuição e selecionar as LNPs mais promissoras para determinado órgão, foi utilizado o sequenciamento profundo de alto rendimento do b-DNA para identificar e quantificar as entregas de DNA. As LNPs com maior eficiência de entrega de DNA em cada órgão foram selecionadas e submetidas a testes *in vitro* para avaliar a sua eficiência de transfecção em quatro tipos celulares de interesse: macrófagos (RAW 264.7), fibroblastos (L929), células hepáticas (HepG2) e células endoteliais (bEnd.3). Os resultados revelaram que a variação da composição das LNPs altera sua estrutura e propriedades físico-químicas como tamanho e potencial zeta. Em consequência, observamos um tropismo e biodistribuição diferentes para cada uma das LNPs em diferentes órgãos. A LNP B4 demonstrou uma maior expressão de GFP *in vitro*, o que valida seu potencial uso em estudos de vacinas. Além disso, testes *in*

*vivo* por via intravenosa mostraram que as LNPs B4 e B10 são adequadas para terapias genéticas que possuem como alvo órgãos como o coração, fígado, baço e pulmão.

**Palavras-chave:** nanopartículas lipídicas ionizáveis; lipídios ionizáveis; código de barra de DNA; biodistribuição; *deep sequencing*.

## ABSTRACT

Gene therapies and vaccines using nucleic acids have emerged as a promising approach in the treatment and prevention of various diseases, including viral diseases and cancer. However, the use of this tool requires the development of technologies that provide safe and effective delivery of the nucleic acid. In this sense, the use of ionizable lipid nanoparticles (LNPs) has proven to be an attractive solution for the clinic, since they are already being employed in approved mRNA vaccines for COVID-19, presenting a great potential to revolutionize the prevention and treatment of several diseases in the future. Therefore, the present work aims to develop and implement an LNPs-based platform for safe and effective DNA delivery through in vivo screening. To this end, a library of 29 LNPs encapsulating DNA barcoding (b-DNA) as an identification tool was developed, containing an ionizable lipid, an auxiliary lipid, cholesterol, and a PEG-coupled lipid. Among the four components, the molar composition of the auxiliary lipids (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) and 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP)) and cholesterol were varied to obtain different formulations. The LNPs were formulated using a microfluidic device, combined into a pool, and injected into C57BL/6 mice intramuscularly or intravenously. To assess biodistribution and select the most promising LNPs for a given organ, high-throughput deep sequencing of b-DNA was used to identify and quantify DNA deliveries. The LNPs with the highest DNA delivery efficiency in each organ were selected and subjected to in vitro testing to assess their transfection efficiency in four cell types of interest: macrophages (RAW 264.7), fibroblasts (L929), liver cells (HepG2), and endothelial cells (bEnd.3). The results revealed that varying the composition of LNPs alters their structure and physicochemical properties such as size and zeta potential. As a consequence, we observed different tropism and biodistribution for each of the LNPs in different organs. LNP B4 demonstrated higher GFP expression in vitro, which validates its potential use in vaccine studies. Furthermore, in vivo intravenous testing showed that LNPs B4 and B10 are suitable for gene therapies that target organs such as the heart, liver, spleen, and lung.

**Keywords:** Ionizable lipid nanoparticles; ionizable lipids; DNA barcoding; biodistribution; deep sequencing.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Dados de mortes provocadas pela COVID-19 mundialmente .....	18
<b>Figura 2:</b> Barreiras biológicas para entrega de ácido nucléico utilizando LNPs encapsulando b-DNA .....	21
<b>Figura 3:</b> Esquema representativo da entrega do DNA através da LNP para a célula alvo .....	22
<b>Figura 4:</b> Modos de ação de vacina administrada pela via IM .....	24
<b>Figura 5:</b> Representação do dispositivo microfluídico utilizado para a preparação das LNPs .....	27
<b>Figura 6:</b> Representação do código de barras de DNA encapsulado nas LNPs .....	29
<b>Figura 7:</b> Síntese e caracterização das LNPs para entrega de b-DNA .....	41
<b>Figura 8:</b> Esquema de LNPs encapsulando b-DNA administradas pela via IM para triagem de entrega in vivo acelerada .....	42
<b>Figura 9:</b> Biodistribuição das LNPs da Biblioteca A administradas pela via IM .....	44
<b>Figura 10:</b> Biodistribuição das LNPs da Biblioteca B administradas pela via IM .....	46
<b>Figura 11:</b> Esquema de LNPs encapsulando b-DNA administradas pela via IV para triagem de entrega in vivo acelerada .....	47
<b>Figura 12:</b> Biodistribuição das LNPs da Biblioteca A administradas pela via IV .....	49
<b>Figura 13:</b> Biodistribuição das LNPs da Biblioteca B administradas pela via IV .....	51
<b>Figura 14:</b> Relação entre variação do lipídio auxiliar DOPE nas LNPs da Biblioteca A 1-5 e a entrega de b-DNA pela via IM .....	52
<b>Figura 15:</b> Relação entre variação do lipídio auxiliar DOPE nas LNPs da Biblioteca B 1-5 e a entrega de b-DNA pela via IM .....	53
<b>Figura 16:</b> Relação entre variação do lipídio auxiliar DSPC nas LNPs da Biblioteca A 6-9 a entrega de b-DNA pela via IM .....	54

<b>Figura 17:</b> Relação entre variação do lipídio auxiliar DSPC nas LNPs da Biblioteca B 6-10 e a entrega de b-DNA pela via IM .....	55
<b>Figura 18:</b> Relação entre variação do lipídio auxiliar DOTAP nas LNPs da Biblioteca A 10-14 e a entrega de b-DNA pela via IM .....	56
<b>Figura 19:</b> Relação entre variação do lipídio auxiliar DOTAP nas LNPs da Biblioteca B 11-15 e a entrega de b-DNA pela via IM .....	57
<b>Figura 20:</b> Relação entre variação do lipídio auxiliar DOPE nas LNPs da Biblioteca A 1-5 e a entrega de b-DNA pela via IV .....	58
<b>Figura 21:</b> Relação entre variação do lipídio auxiliar DOPE nas LNPs da Biblioteca B 1-5 e a entrega de b-DNA pela via IV .....	59
<b>Figura 22:</b> Relação entre variação do lipídio auxiliar DSPC nas LNPs da Biblioteca A 6-9 e a entrega de b-DNA pela via IV .....	60
<b>Figura 23:</b> Relação entre variação do lipídio auxiliar DSPC nas LNPs da Biblioteca B 6-10 e a entrega de b-DNA pela via IV .....	61
<b>Figura 24:</b> Relação entre variação do lipídio auxiliar DOTAP nas LNPs da Biblioteca A 10-14 e a entrega de b-DNA pela via IV .....	62
<b>Figura 25:</b> Relação entre variação do lipídio auxiliar DOTAP nas LNPs da Biblioteca B 11-15 e a entrega de b-DNA pela via IV .....	63
<b>Figura 26:</b> Triagem <i>in vitro</i> , em macrófagos (RAW 264.7), das LNPs com melhor desempenho identificada por sua eficiência de transfecção .....	64
<b>Figura 27:</b> Triagem <i>in vitro</i> , em células hepáticas (HepG2), das LNPs com melhor desempenho identificada por sua eficiência de transfecção .....	65
<b>Figura 28:</b> Triagem <i>in vitro</i> , em fibroblastos (L929), das LNPs com melhor desempenho identificada por sua eficiência de transfecção .....	66
<b>Figura 29:</b> Triagem <i>in vitro</i> , em células endoteliais (bEnd.3), das LNPs com melhor desempenho identificada por sua eficiência de transfecção .....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APC:** Células apresentadoras de antígenos
- ApoE:** Apolipoproteína E
- b-DNA:** Código de barras de DNA
- C14-PEG200:** 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N [methoxy(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt)
- COVID-19:** Doença causada pelo coronavírus em inglês, *Corona Virus Disease*
- DH:** Diâmetro hidrodinâmico
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*
- DOPE:** 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
- DOTAP:** 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane
- DSPC:** 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
- FDA:** *Food and Drug Administration*
- GFP:** Proteína fluorescente verde, do inglês *Green Fluorescent Protein*
- IM:** Intramuscular
- IV:** Intravenosa
- IVT:** Transcrição in vitro, do inglês *In Vitro Transcription*
- LNP:** Nanopartícula lipídica ionizável
- MHC:** Complexo principal de histocompatibilidade
- µg:** Micrograma
- µL:** Microlitro
- mL:** Mililitro
- µm:** Micrômetro
- µM:** Micromolar
- mM:** Milimolar
- mRNA:** RNA mensageiro, do inglês *Messenger RNA*
- mV:** Milivolts
- MWCO:** Peso molecular de corte, do inglês *Molecular Weight Cut-Off*
- nm:** Nanômetro
- nM:** Nanomolar
- pb:** Pares de bases
- PBS:** Salina tamponada com fosfato, do inglês *Phosphate Buffered Saline*
- PCR:** Reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

**PDI:** Índice de polidispersão, do inglês *Polydispersion Index*

**PDMS:** Dimetil-polissiloxano

**pDNA:** DNA plasmidial

**PEG:** Polietilenoglicol

**PZ:** Potencial zeta

**rcf:** Força centrífuga relativa, do inglês *Relative Centrifugal Force*

**RNA:** Ácido ribonucleico, do inglês *Ribonucleic Acid*

**RNAi:** RNA interferente

**SARS-CoV-2:** Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2, do inglês *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

**SD:** Desvio padrão, do inglês *Standard Deviation*

**SEM:** Erro padrão da média, do inglês *Standard Error of the Mean*

**SFB:** Soro fetal bovino

**TAE:** Tris-Acetato-EDTA

**UFMG:** Universidade Federal de Minas Gerais

**UMI:** Identificadores moleculares únicos, do inglês *Unique Molecular Identifiers*

**V:** Volts

## SUMÁRIO

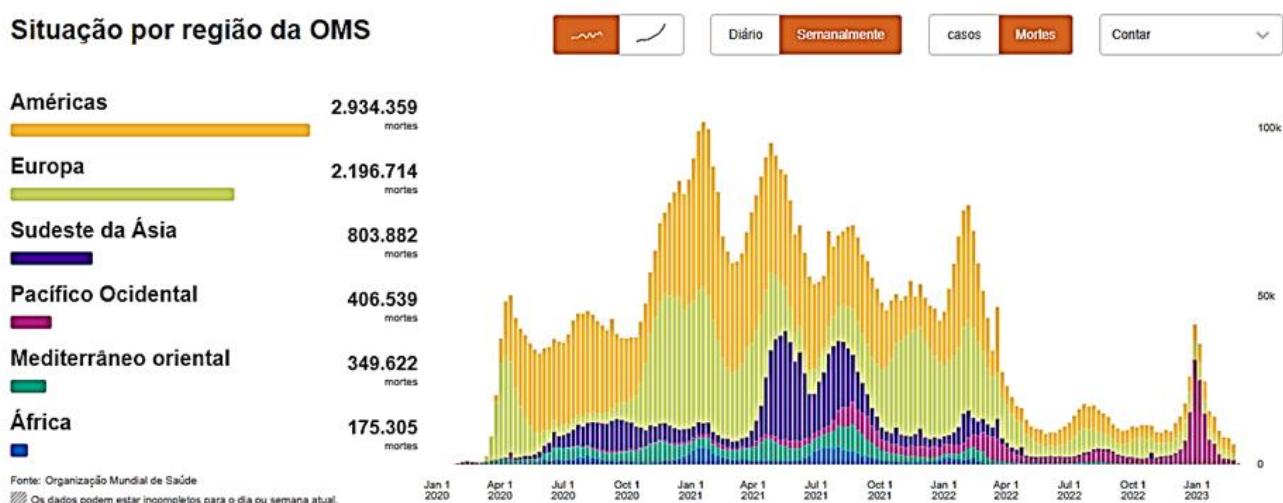
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
1.1. Imunologia aplicada a vacinas	18
1.2. Vias de administração para vacinas	23
1.3. Nanopartículas lipídicas no desenvolvimento de terapias genéticas	25
1.4. Dispositivos microfluídicos para síntese de LNPs	26
1.5. Código de barras de ácidos nucleicos como estratégia de identificação de entrega	28
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
2.1. Objetivo Geral	30
2.2. Objetivos Específicos	30
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>31</b>
3.1. Preparação da biblioteca de b-DNA	31
3.2. Preparação das LNPs	31
3.3. Caracterização das LNPs	32
3.4. Animais e grupos experimentais	32
3.5. Avaliação da biodistribuição das LNPs	32
3.6. Extração do DNA dos tecidos coletados	33
3.7. Amplificação do DNA (PCR)	34
3.8. Eletroforese em gel de agarose	35
3.9. Purificação do fragmento de DNA do gel	35
3.10. Sequenciamento de nova geração Illumina e quantificação da entrega de b-DNA	36
3.11. Entrega de LNPs <i>in vitro</i>	37
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>39</b>
4.1. Síntese e caracterização das LNPs	39
4.2. Biodistribuição das LNPs administradas por via IM e identificação de formulações promissoras para órgãos-alvo	42
4.3. Biodistribuição das LNPs administradas por via IV e identificação de formulações promissoras para órgãos-alvo	47
4.4. Relação entre variação do lipídio auxiliar DOPE e a entrega de b-DNA <i>in vivo</i> através da via IM	52
4.5. Relação entre variação do lipídio DSPC e a entrega de b-DNA <i>in vivo</i> através da via IM	54
4.6. Relação entre variação do lipídio auxiliar DOTAP e a entrega de b-DNA pela via IM55	
4.7. Relação entre variação do lipídio auxiliar DOPE e a entrega de b-DNA pela via IV	57
4.8. Relação entre variação do lipídio auxiliar DSPC e a entrega de b-DNA pela via IV	59

4.9. Relação entre a variação do lipídio auxiliar DOTAP e a entrega de b-DNA pela via IV .....	61
4.10. Transfecção <i>in vitro</i> de diferentes tipos celulares pela melhor LNP .....	63
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>77</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>82</b>
APÊNDICE A – Figuras suplementares.....	82
APÊNDICE B – Tabelas suplementares.....	83

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Imunologia aplicada a vacinas

As vacinas continuam sendo uma das medidas mais bem-sucedidas de saúde pública contra doenças infecciosas nas últimas décadas (FLINGAI et al., 2013). Com a COVID-19 foram registrados mais de 6 milhões de óbitos pelo mundo (Figura 1) (World Health Organization, 2023), e esforços ainda estão concentrados no desenvolvimento de vacinas com alta eficácia e segurança contra variantes do vírus SARS-CoV-2 e proteção a longo prazo.



**Figura 1: Dados de mortes provocadas pela COVID-19 mundialmente**, atualizados até 13 de março de 2023. Figura adaptada do site da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 2023).

Atualmente existem quatro tipos de plataformas vacinais comumente empregadas. A primeira, e mais amplamente usada, são as vacinas utilizando o próprio vírus atenuado ou inativo, cultivado em ovo de galinha embrionado (WONG; WEBBY, 2013). Essa abordagem permite que, uma vez administrado, o vírus se reproduza lentamente, dando tempo para que o sistema imunológico desenvolva uma resposta adequada. Uma segunda plataforma, consiste no uso de vetores virais que utilizam um vírus geneticamente modificado como vetor para produzir proteínas do vírus-alvo (CALLAWAY, 2020). Os vetores utilizados em vacinas de vetor viral, não apresentam riscos de causar doenças subsequentes, uma vez que são incapazes de replicação. Além disso, são projetados para não apresentar similaridade com o genoma, prevenindo assim a integração indesejada de material genético. (CALLAWAY, 2020; TRAVIESO et al., 2022.). Uma terceira plataforma utiliza proteínas virais que são

administradas diretamente no paciente encapsuladas em proteínas que imitam o revestimento externo do vírus. Essas cápsulas não são capazes de causar infecções, uma vez que não possuem material genético do vírus (BRISSE et al., 2020; CALLAWAY, 2020; POLLARD; BIJKER, 2021). A quarta plataforma vacinal, e que será o foco desta dissertação, consiste no uso de ácidos nucleicos, como o RNA e DNA, que codificam para um antígeno viral. Em geral, ácidos nucleicos são usados para codificar proteínas virais, com o objetivo de transfectar células imunes. Essas células recorrerão do seu próprio maquinário para expressar as proteínas virais, e assim, desencadear uma resposta imune (CALLAWAY, 2020; PARDI et al., 2018; POLLARD; BIJKER, 2021).

A terapia genética tem sido objeto de estudos promissores há vários anos. Desde 1966, os ácidos nucleicos começaram a ser explorados como possíveis moléculas terapêuticas, quando E.L.Tatum discorre em um de seus artigos sobre as perspectivas que essa tecnologia traria para o futuro da medicina (TATUM, 1966). Em 1990, foi demonstrado que uma injeção direta de um mRNA transcrito *in vitro* (IVT) poderia levar à expressão da proteína codificada (WOLFF et al., 1990). Desde então, houve avanços significativos no desenvolvimento de medicamentos baseados em RNA, como o Patisiran (Onpattro, Anlnylam Pharmaceuticals), aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2018 para o tratamento de amiloidose hereditária mediada por transtirretina (AKINC et al., 2019). Este foi o primeiro medicamento de RNAi aprovado para o uso clínico, abrindo novas possibilidades para o tratamento de diversas doenças.

As vacinas de ácidos nucleicos ganharam um grande destaque atualmente, principalmente após as pesquisas envolvendo as vacinas de RNA para COVID-19 (CHUNG et al., 2020). As vacinas baseadas em nanopartículas lipídicas ionizáveis (LNPs) encapsulando mRNA da Moderna e Pfizer-BioNTech obtiveram uma eficácia acima de 94%, validando seu potencial para combater o SARS-CoV-2 e também suas variantes (HUANG et al., 2022; POLACK et al., 2020). Essas vacinas, demonstraram estimular tanto respostas imunes celulares como humorais (LI et al., 2022; WU et al., 2021). Com o aumento do surgimento de novas variantes do SARS-Cov-2 ainda existe a demanda por novas estratégias e a atualização das vacinas já aprovadas, garantindo proteção e imunidade a longo prazo (CALLAWAY, 2023; HUANG et al., 2022).

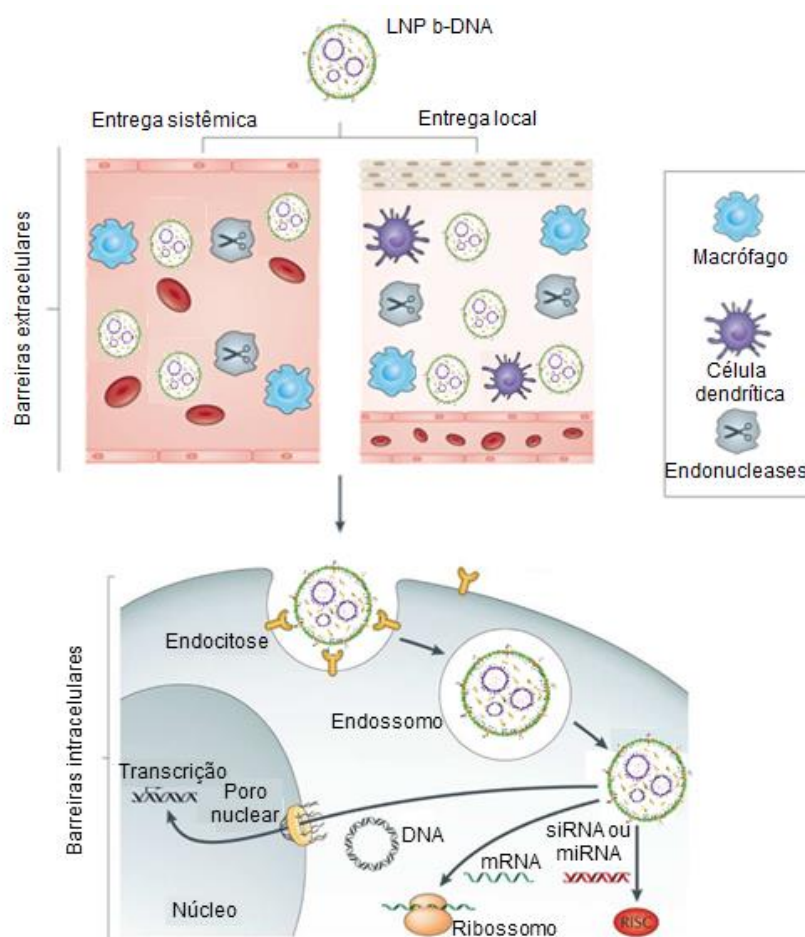
Um desafio enfrentado ao utilizar os ácidos nucleicos está relacionado à sua entrega ao alvo específico: ácidos nucleicos são macromoléculas (molécula orgânica de elevada massa molecular relativa) hidrofílicas, e com carga negativa, o que dificulta sua passagem pela membrana das células (KANASTY et al., 2013; ZHANG et al., 2021). Além disso, as moléculas de DNA e RNA livre são extremamente instáveis em condições fisiológicas, sendo facilmente degradadas por endonucleases ou eliminadas pelo sistema reticuloendotelial (KANASTY et al., 2013; ZHANG et al., 2021). Além desse desafio, outro obstáculo significativo consiste no fato do sistema imunológico ser projetado para reconhecer e destruir vetores contendo informações genéticas (CULLIS; HOPE, 2017; ZHAO; HUANG, 2014).

Dentre as diferentes estratégias que têm sido utilizadas para entrega de ácidos nucleicos nas células, destacam-se:

- I. Eletroporação: técnica que utiliza pulsos elétricos para alterar a permeabilidade da membrana das células ou mesmo formar poros que permitirão a entrada de ácidos nucleicos no interior das células (FLINGAI et al., 2013; LEE; DANISHMALIK; SIN, 2015).
- II. Nanopartículas lipídicas: técnica que utiliza do encapsulamento de ácidos nucleicos em nanopartículas lipídicas capazes de serem endocitadas pelas células imunes com consequente liberação dos ácidos nucleicos para maquinaria de transcrição e tradução e produção de proteínas virais (ZHAO; HUANG, 2014).
- III. Microneedles: técnica que utiliza microagulhas para fornecer a liberação de drogas e vacinas na pele. A fabricação dessas microagulhas podem ser de quatro tipos: (i) microagulhas sólidas para pré-tratamento da pele para aumentar a permeabilidade da pele, (ii) microagulhas revestidas com medicamento que se dissolve na pele, (iii) microagulhas de polímero que encapsulam o medicamento e se dissolvem totalmente na pele e (iv) microagulhas ocas para infusão de medicamento na pele (KIM; PARK; PRAUSNITZ, 2012; PRAUSNITZ et al., 2009).

Nesse contexto, o encapsulamento dos ácidos nucleicos em LNPs é uma das estratégias promissoras para vencer as barreiras biológicas tanto extracelulares como intracelulares presentes quando o DNA ou RNA estão livres (MASTROBATTISTA et al., 2006).

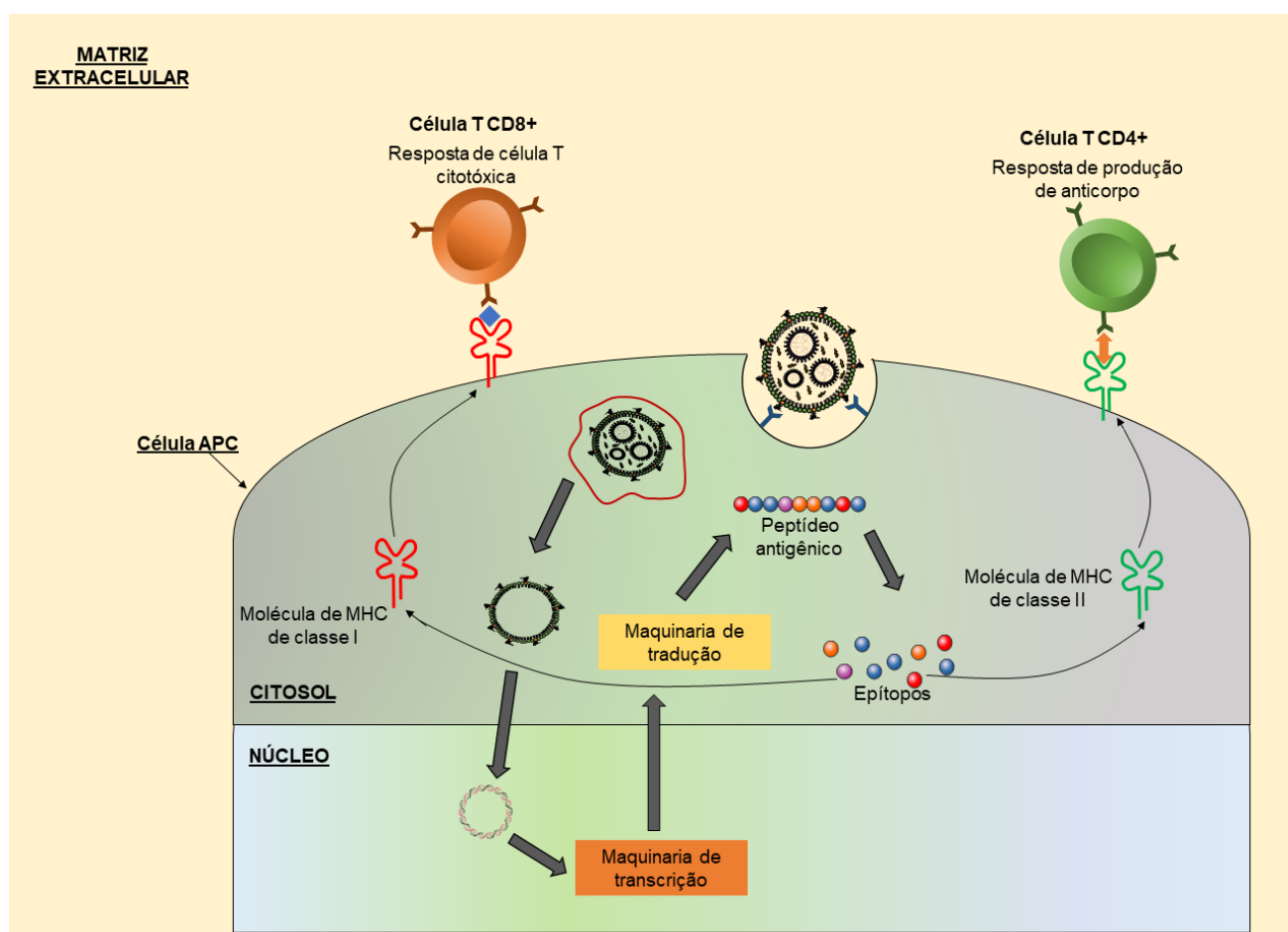
Após a internalização pelas células, as LNPs enfrentam obstáculos intracelulares que podem impedir a entrega eficiente do ácido nucléico. Essas barreiras incluem aprisionamento no endossomo, o desencapsulamento dos ácidos nucléicos das LNPs, degradação lisossômica, liberação no citoplasma (para o RNA) e a translocação através da membrana nuclear (para o DNA) (ZHAO; HUANG, 2014) (Figura 2). Nesse contexto, é importante compreender em detalhes a relação entre a composição das LNPs o papel desempenhado por cada componente e sua capacidade de internalização e entrega do ácido nucléico a fim de superar as barreiras intracelulares (RENNICK; JOHNSTON; PARTON, 2021).



**Figura 2: Barreiras biológicas para entrega de ácido nucléico utilizando LNPs encapsulando b-DNA.** Figura adaptada de HOU et al., 2021 e MUKALEL et al., 2019.

Para produção de uma vacina de DNA, um gene que codifica o antígeno precisa ser clonado em um plasmídeo não reprodutível, e então entregue ao hospedeiro pelas estratégias vacinais tradicionais (KIM et al., 2021). No caso de uma vacina utilizando LNPs, ela será endocitada, liberando, em seguida, o DNA para a maquinaria de

transcrição e tradução, resultando na produção do peptídeo antigênico no citosol (Figura 3). Os peptídeos são então processados em epítopos, que se ligam às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II expressos na superfície das células do hospedeiro. Em consequência, geram respostas de produção de anticorpos específicos do antígeno via células T CD4+ secretada por MHC de classe II (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; GRODELAND et al., 2016; KIM et al., 2021), ou citotóxica via células T CD8+. Essas respostas via T CD4+ e T CD8+ desempenham importante papel na depuração viral, e é ativada por antígenos expressos endogenamente apresentados em moléculas do MHC de classe I (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; KIM et al., 2021; LEE; IZZARD; HURT, 2018) (Figura 3).



**Figura 3: Esquema representativo da entrega do DNA através da LNP para a célula alvo.** Figura adaptada de KIM et al., 2021.

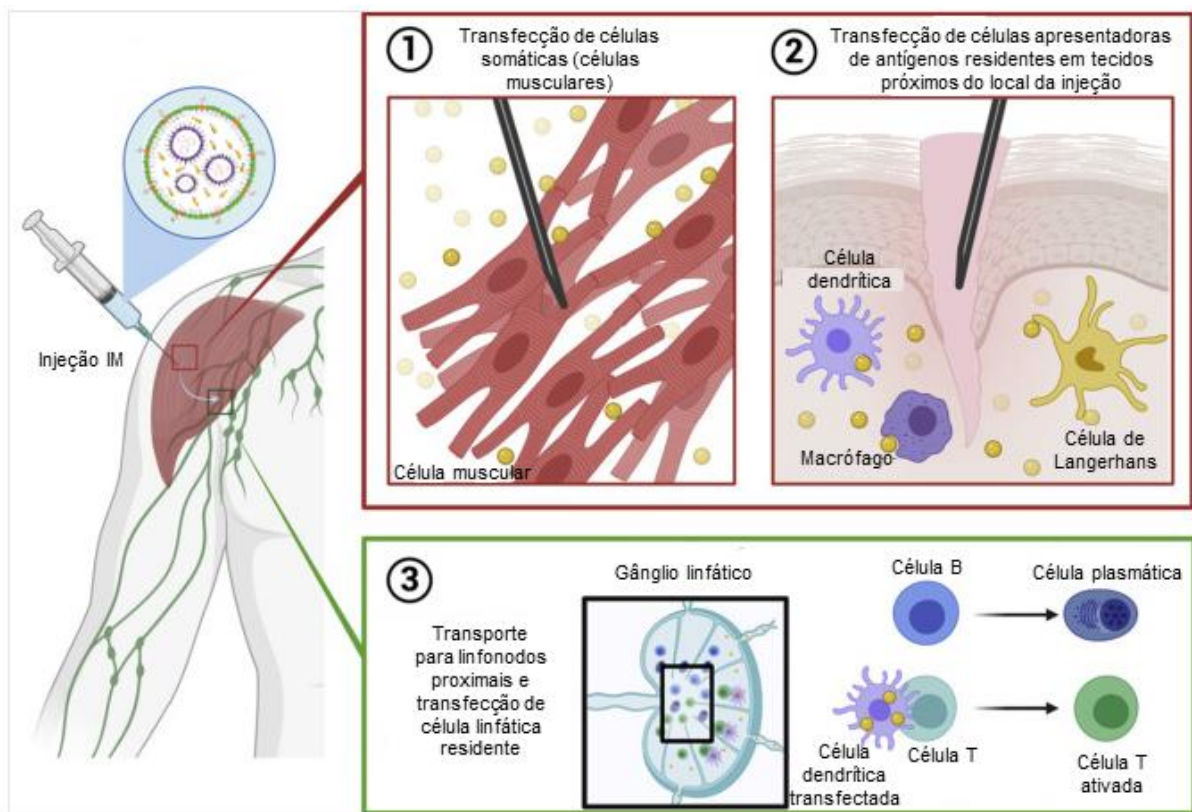
As respostas da via células T CD4+ e T CD8+ em diferentes compartimentos celulares, são resultado do processamento diferenciado do antígeno pelas APCs, que depende da sua localização (extracelular e intracelular, respectivamente) e resulta na

apresentação a diferentes classes de células T (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). Um exemplo dessa resposta é a defesa contra vírus circulantes, que depende da produção de anticorpos mediada pelas células T CD4+ auxiliares. Entretanto, quando o vírus infecta uma célula do tecido, o anticorpo não é capaz de eliminá-lo, e a eliminação requer a ação dos linfócitos T CD8+ citotóxicos. (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

## **1.2. Vias de administração para vacinas**

A via intramuscular (IM) é a mais comumente utilizada para a administração de vacinas, uma vez que demanda menos treinamento dos profissionais de saúde para ser executada e por ser apontada como mais segura em relação à via intravenosa (IV), por ter um risco menor de gerar infecção (HOU et al., 2021; KIM et al., 2021; KUTZLER; WEINER, 2008; ZHANG; BILLINGSLEY; MITCHELL, 2018). A administração local, através da via IM é considerada atrativa, pois residem na pele e nos músculos uma grande quantidade de células apresentadoras de antígenos, como as células de Langerhans e células dendríticas, o que pode resultar em uma possível internalização e processamento de antígenos (HOU et al., 2021; KIM et al., 2021; KUTZLER; WEINER, 2008).

As vacinas de DNA administradas pela via IM podem gerar a imunidade adaptativa por três modos de ação: através da transfecção de células somáticas, como as células musculares e epidérmicas; através da transfecção de células apresentadoras de antígenos presentes em tecidos próximos ao local da injeção ou as vacinas podem fluir para os linfonodos proximais e transfectar células imunes residentes, gerando uma ativação do desenvolvimento da maquinaria de célula T e B (Figura 4) (KIM et al., 2021). Portanto, as vacinas administradas por essa via geram respostas imunes satisfatórias em uma dose considerada bem tolerada em ensaios humanos (KIM et al., 2021; HOU et al., 2021).



**Figura 4: Modos de ação de vacina administrada pela via IM.** Figura adaptada de KIM et al., 2021

A administração IV das vacinas não é tão comum de ser utilizada como a administração pela via IM, por requerer um cuidado maior para a sua administração na clínica. Essa via de administração vem sendo utilizada em estudos terapêuticos utilizando mRNA, e seu uso está associado às terapias que tem como alvo específico o fígado, por apresentar resultados eficientes de transfecção de hepatócitos, células de Kupffer e células endoteliais (KIM et al., 2021; HOU et al., 2021). Além disso, é importante mencionar que as LNPs tendem a acumular no fígado após a administração IV, e isso pode ser utilizado como uma vantagem terapêutica. O fígado é um órgão com alta capacidade de produção de proteínas secretoras e esse acúmulo de LNPs pode auxiliar na produção de proteínas ausentes, em disfunções metabólicas e hematológicas hereditárias, ou ainda produzir anticorpos que efetuem a neutralização de patógenos alvo ou até mesmo de células cancerígenas (KIM et al., 2021; HOU et al., 2021).

Além disso, as vacinas administradas pela via IV podem ter uma ampla biodistribuição através do sistema circulatório levando a efeitos adversos sistêmicos e, por esse motivo, se faz necessário a otimização de carreadores nanoestruturados

que favoreçam uma entrega direcionada ao alvo específico, minimizando assim os efeitos adversos sistêmicos (KIM et al., 2021; HOU et al., 2021).

### **1.3. Nanopartículas lipídicas no desenvolvimento de terapias genéticas**

Para que as terapias genéticas tenham sucesso é preciso vencer algumas limitações relacionadas a entrega segura e eficaz dessas moléculas à célula alvo. O DNA e RNA possuem um tamanho grande, carga negativa, degradam rapidamente quando entram em contato com fluidos biológicos, não se acumulam nos tecidos alvo após a administração sistêmica, gerando dificuldade na sua transfecção à célula alvo. (CULLIS; HOPE, 2017; LEE; IZZARD; HURT, 2018; KAWABATA et al., 1995; LIU, 2003).

A fim de superar as diversas limitações do uso dos ácidos nucleicos em terapias genéticas, muitos pesquisadores têm investigado plataformas de LNPs para entrega segura e eficaz de ácidos nucleicos (GUIMARAES et al., 2019; SCALZO et al., 2022). O encapsulamento do ácido nucleico em LNPs é uma abordagem promissora de um sistema de entrega, não viral, seguro e eficaz, capaz de proteger da degradação por endonucleases, proporcionar maior circulação, evitar a depuração renal, além de prevenir interações inespecíficas via peguilação das LNPs (SUK et al., 2016). Ao comparar com o sistema de entrega viral, o sistema de entrega não viral possui vantagens significativas como: facilidade de fabricação, baixa imunogenicidade e flexibilidade de *design*, uma vez que podem ser facilmente modificados pela incorporação de ligantes que podem ajudar no direcionamento das LNPs para o alvo (CULLIS; HOPE, 2017; ZHAO; HUANG, 2014; YIN et al., 2014).

As LNPs carregadas com ácidos nucleicos são compostas por uma fase aquosa contendo DNA ou RNA solubilizados em solução tampão apropriado e uma fase etanólica composta por: colesterol, um lipídio auxiliar, um lipídio ionizável e um lipídio acoplado ao PEG, solubilizado em etanol (MAEKI et al., 2022). O lipídio ionizável desempenha um papel importante na entrega eficaz da LNP ao alvo. Ele é neutro em pH fisiológico e tem toxicidade e imunogenicidade reduzida quando comparados com os lipídios catiônicos (HAN et al., 2021; HOU et al., 2021; KOWALSKI et al., 2019; TAM; CHEN; CULLIS, 2013). Além disso, os lipídios ionizáveis promovem a internalização e escape endossomal da LNP de modo eficiente. O compartimento endossomal representa uma importante barreira de acúmulo de ácidos nucleicos no citosol, sendo considerado um fator limitante de sua eficácia (JOHANNES;

LUCCHINO, 2018). No endossomo o pH é menor que o pKa dos lipídios ionizáveis, o grupo amina do lipídio ionizável torna-se então protonado e se associa aos lipídios endossomais aniônicos, possibilitando o escape endossomal da LNP e sua livre interação com a maquinaria celular (HOU et al., 2021; RENNICK; JOHNSTON; PARTON, 2021; ZHAO; HUANG, 2014). Além do lipídio ionizável, cada componente da fase etanólica desempenha um papel fundamental e particular na LNP: (i) o colesterol é empregado para aumentar a estabilidade da bicamada da LNP e viabilizar a fusão da membrana; (ii) o lipídio auxiliar fortalece a estrutura da bicamada da LNP e também auxilia no escape endossomal, (iii) o lipídio acoplado ao PEG auxilia na estabilização da LNP por reduzir a agregação e limitar a captação inespecífica por células imunes, o que aumenta o tempo de circulação *in vivo* da LNP. (ALGARNI et al., 2022; CHENG; LEE, 2016; GRANOT; PEER, 2017; GUIMARAES et al., 2019; MUI et al., 2013).

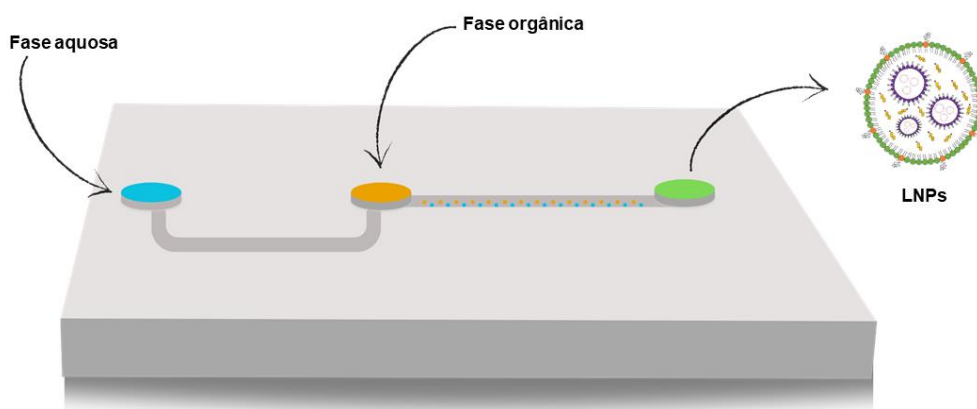
Com a pandemia do SARS-COV-2, abordagens baseadas no desenvolvimento de vacinas mRNA utilizando LNPs como sistema de entrega ganharam um grande destaque (BARBIER et al., 2022).

#### **1.4. Dispositivos microfluídicos para síntese de LNPs**

Muitos pesquisadores e empresas reportam a necessidade do desenvolvimento de métodos mais reprodutíveis, eficientes, com menor uso de solventes orgânicos e com possibilidade de escalonamento para a produção dessas LNPs. Um dos métodos para produção de LNPs carregadas com ácidos nucleicos mais comumente utilizados é o de microfluídica. Comparado aos métodos convencionais, a microfluídica apresenta vantagens. Métodos convencionais produzem LNPs com tamanhos maiores, mais heterogêneas, com baixa reprodutibilidade e com variações de lote para lote nas propriedades físico-químicas, resultando em formulações de LNPs com uma entrega/eficácia mais variável do ácido nucleico ao alvo específico (KIM et al., 2012; SHEPHERD; ISSADORE; MITCHELL, 2021). Já as LNPs produzidas através de dispositivos microfluídicos possuem tamanhos menores, são mais homogêneas, possuem alta reprodutibilidade, o que facilita a produção de em larga escala, além de direcionar a entrega de ácido nucleico de modo mais específico (KIM et al., 2012; SHEPHERD; ISSADORE; MITCHELL, 2021).

A produção das LNPs utilizadas no desenvolvimento do nosso projeto foram realizadas através de dispositivos microfluídicos que fornecem condições ideais, envolvendo manipulação de fluídos em faixa de microescala, para preparação de sistemas de entrega utilizando os ácidos nucleicos (ALI et al., 2021; MAEKI et al., 2018).

Volumes de fase orgânica e fase aquosa são misturados sob condições controladas utilizando uma bomba de seringa para a formação das LNPs. A taxa de fluxo das fases aquosa e orgânica e a concentração lipídica são fatores importantes que podem controlar o tamanho e o PDI das LNPs (KIM et al., 2012; MAEKI et al., 2022; PRAKASH et al., 2022). Na pesquisa aqui desenvolvida foi utilizado dispositivos do tipo *chip*, constituídos de dimetil-polissiloxano (PDMS), o qual consiste basicamente em duas entradas: uma para a solução aquosa contendo o ácido nucleico, e outra para a solução orgânica contendo os lipídios. Essas entradas estão conectadas por um canal onde acontecerá a mistura dessas fases e conectados a uma saída na porção final em que será obtida a LNP formulada (Figura 5).



**Figura 5: Representação do dispositivo microfluídico utilizado para a preparação das LNPs.** Elaborada pela autora.

O uso dos dispositivos microfluídicos permitem a realização de uma produção de um sistema de entrega que além de ser altamente seguro e eficaz, garante controle e reprodutibilidade de eficiência de encapsulamento, tamanho e polidispersão das LNPs, além do potencial de escalabilidade. (PRAKASH et al., 2022; SHEPHERD; ISSADORE; MITCHELL, 2021).

### 1.5. Código de barras de ácidos nucléicos como estratégia de identificação de entrega

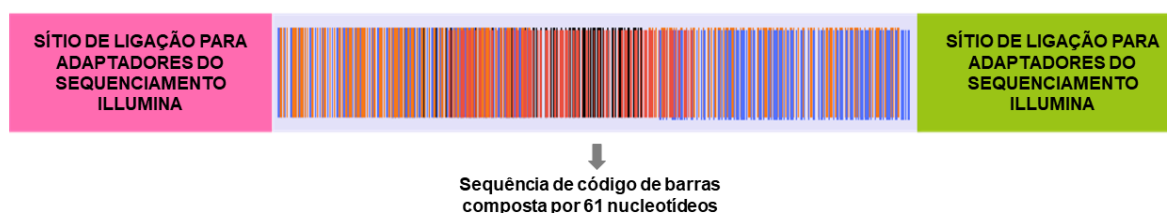
Uma grande quantidade de LNPs e poliméricas são formuladas e caracterizadas com base nas estruturas físico-químicas, transfecção e viabilidade celular, com o objetivo final de se descobrir a melhor formulação *in vitro* para entrega do ácido nucléico ao alvo específico. Por outro lado, os testes *in vitro* não conseguem reproduzir todas as barreiras biológicas que são encontradas nos testes *in vivo*, por exemplo: estruturas anatômicas, células circulantes, formação da proteína corona das LNPs e as forças fisiológicas (GUIMARAES et al., 2019; WHITEHEAD et al., 2012). Nesse sentido, a realização de uma triagem de LNP *in vivo* seria ideal para identificação de nanoformulações otimizadas para diferentes aplicações. Todavia, realizar uma triagem usando uma grande quantidade de formulações *in vivo* é um processo complexo, porque depende de um grande número de animais para sua execução e possui um alto custo.

Com o objetivo de melhorar a entrega dos ácidos nucléicos ao alvo específico, o encapsulamento de DNA contendo um código de barras único em LNPs têm sido amplamente utilizado, pois permite que haja uma triagem *in vivo* de alto rendimento utilizando várias LNPs simultaneamente em um único animal (DAHLMAN et al., 2017; GUIMARAES et al., 2019). O uso de código de barras veio com o intuito de ajudar a solucionar o problema enfrentado para a realização de triagens com grande quantidade de LNPs, uma vez que permite que formulações de LNPs com estruturas químicas distintas sejam administradas, de modo conjunto e simultânea em um único animal. Após algumas horas, a análise da biodistribuição pode ser realizada através do sequenciamento profundo de alto rendimento, revelando assim as LNPs direcionadas a tecidos e células específicas e acelerando o estudo das relações entre estrutura química e entrega simultânea de várias LNPs *in vivo* (DAHLMAN et al., 2017; GUIMARAES et al. 2019).

Com os avanços de novas tecnologias de sequenciamento, o uso de código de barras se tornaram um mecanismo de triagem de LNPs rápido e barato (GUIMARAES et al., 2019). O sequenciamento profundo de alto rendimento é um método econômico e de alto rendimento, quando comparado ao sequenciamento de Sanger que incluem grandes custos, que nos permite quantificar os códigos de barras de DNA em cada amostra de interesse, permitindo mensurar com eficácia e segurança a biodistribuição

de muitas LNPs quando encapsuladas com o b-DNA ou b-mRNA em um único animal (DAHLMAN et al., 2017; SHENDURE; HANLEE, 2008).

O código de barras é composto por uma fita simples de DNA com 61 nucleotídeos com três ligações de fosforotioato em cada extremidade, que aumentaria a estabilidade do código de barras e diminuiria a degradação por exonucleases. A região do “código de barras” é composta por 10 nucleotídeos no centro do oligonucleotídeo. Um adicional de dez bases aleatórias foi incluído diretamente na região 3’ para monitorar a amplificação excessiva na PCR. Nas extremidades 5’ e 3’ de cada código de barras continham sítios de ligação para os adaptadores do sequenciamento Illumina (Figura 6) (DAHLMAN et al., 2017; GUIMARAES et al., 2019).



**Figura 6: Representação do código de barras de DNA encapsulado nas LNPs.** Figura adaptada de GUIMARAES et al., 2019.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Desenvolver e implementar uma plataforma de LNPs para a entrega segura e eficaz de DNA, possibilitando a seleção de LNPs otimizadas para diferentes aplicações.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- I. Desenvolver uma biblioteca de LNPs formuladas através de mistura microfluídica, em que cada formulação é carregada com um código de barras de DNA (b-DNA) único.
- II. Caracterizar as LNPs quanto ao tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta (carga).
- III. Identificar as formulações de LNPs promissoras para órgãos-alvo, por meio da análise da biodistribuição *in vivo*, a partir de diferentes vias de administração.
- IV. Demonstrar *in vitro*, a capacidade de transfecção das LNPs selecionadas em diferentes linhagens celulares.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Preparação da biblioteca de b-DNA

Os parâmetros para a produção da biblioteca de b-DNA foram realizados utilizando um protocolo previamente descrito (DAHLMAN et al., 2017). Basicamente, cada b-DNA consiste em um DNA de fita simples contendo 61 nucleotídeos com três ligações consecutivas de fosforotioato em cada extremidade. A região do código de barras (denominada região de leitura) é composta por 10 nucleotídeos. Foram adicionados de forma aleatória 10 nucleotídeos na extremidade 3' do código de barras, com o intuito de monitorar a amplificação excessiva da PCR. Em cada uma das extremidades (5' e 3') do b-DNA continham locais de iniciação para adaptadores do sequenciamento Illumina, como também para ligação de primers da amplificação do oligonucleotídeo. A lista completa das sequências de b-DNA pode ser encontrada na Tabela S1. Todos os oligonucleotídeos neste estudo foram sintetizados e purificados (procedimento padrão de dessalinização) pela *Integrated DNA Technologies*.

#### 3.2. Preparação das LNPs

As LNPs foram preparadas a partir de um dispositivo microfluídico, combinando uma fase aquosa preparada em citrato 10 mM, tampão pH 3.0 (Teknova, Q2445) com um b-DNA (*Integrated DNA Technologies*) diferente para cada formulação de LNPs como descrito em GUIMARAES et al., 2019, e uma fase etanólica contendo um lipídio ionizável (C12-200), um lipídio modificado acoplado ao polietilenglicol C14-PEG200 (*Avanti Polar Lipids*), colesterol (*Avanti Polar Lipids*) e um lipídio auxiliar: DOPE (*Avanti Polar Lipids*), ou DOTAP (*Lipoid GmbH*) ou DSPC (*Lipoid GmbH*). A fase etanólica e a fase aquosa foram combinadas através de um dispositivo microfluídico e uma bomba de seringas (*Harvard apparatus*) com uma razão de fluxo de 3:1 (fase aquosa:fase etanólica). A formulação resultante foi coletada em um cassete de diálise (20.000 MWCO, *ThermoFisher*) e dialisados contra PBS (pH 7.4) por 2 h a temperatura ambiente. Após a diálise, cada formulação foi filtrada em filtro estéril de 0.22 µm (*Genesee Scientific*), dentro do fluxo laminar estéril.

Foram produzidas 29 diferentes LNPs conforme mostrado na Tabela S2. Das 29 formulações, 14 apresentam razão de lipídio ionizável:b-DNA de 1:1, denominadas Biblioteca A, e as 15 restantes possuem razão de lipídio ionizável:b-DNA de 10:1, denominadas Biblioteca B. Na Biblioteca "A" existem 5 formulações contendo o lipídio

auxiliar DOPE (denominadas 1-5), 4 formulações contendo o lipídio auxiliar DSPC (denominadas 6-9) e 5 formulações contendo o lipídio auxiliar DOTAP (denominadas 10-14). Já na Biblioteca “B” existem 5 formulações para cada um dos lipídios auxiliares: DOPE (denominadas 1-5), DSPC (denominadas 6-10) e DOTAP (denominadas 11-15).

### **3.3. Caracterização das LNPs**

As LNPs foram caracterizadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e o potencial zeta (PZ), através de espalhamento dinâmico da luz usando o Zetasizer Nano ZS (DLS, Malvern Panalytical). Cada amostra foi diluída em água MilliQ na razão de 1:100 v/v (colocada em cubeta e então realizou-se as medições em temperatura ambiente (25 °C). Os resultados obtidos revelam os valores médios de três medições independentes (média  $\pm$  DP). Para as medições de PZ, que se dá pela conversão da medida de mobilidade eletroforética das partículas, cada amostra foi diluída em água MilliQ em uma razão de 1:100 v/v, colocadas em uma cubeta específica contendo eletrodos em cada uma de suas extremidades. Os resultados obtidos revelam os valores médios de três medições independentes (média  $\pm$  DP). As concentrações de DNA em cada LNPs foram determinadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop Lite ou Qubit (ThermoFisher Scientific).

### **3.4. Animais e grupos experimentais**

Nesse estudo foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com 7 a 8 semanas de idade e peso aproximado de 25 gramas (N total = 15). Os animais foram obtidos no Biotério Central, da Universidade Federal de Minas Gerais e mantidos até a sua eutanásia no Biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFMG), em gaiolas com 5 animais. Os experimentos foram realizados de acordo com protocolos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (CEUA 177/2020).

### **3.5. Avaliação da biodistribuição das LNPs**

Para avaliar a biodistribuição das LNPs *in vivo*, os animais foram separados aleatoriamente em 3 grupos experimentais de acordo com a via de administração da mistura de LNPs (n = 5 / grupo). As 29 LNPs com diferentes estruturas químicas, foram agrupadas e administradas em um mesmo animal, pela via IV através da veia caudal

ou pela via IM através do músculo quadríceps femoral. A administração simultânea das LNPs em um único animal, é possível, pois cada uma das 29 LNPs foram formuladas com estruturas químicas distintas, de modo que cada LNP carrega um b-DNA diferente. O b-DNA é composto por uma região que codifica uma sequência única de código de barras, identificadores moleculares únicos (UMI) e uma cauda de poli (A). Após 4 horas da administração, os animais foram eutanasiados e os órgãos (coração, fígado, pulmão e baço) foram coletados. A entrega do b-DNA foi quantificada através do sequenciamento de nova geração Illumina.

### 3.6. Extração do DNA dos tecidos coletados

Para quantificar a entrega do b-DNA em cada órgão, o DNA foi extraído de cada um dos tecidos, utilizando o kit Purelink Genomic DNA mini Kit (ThermoFisher, nº. cat.: K1820-02). Resumidamente, os órgãos foram congelados a -20 °C em microtubos após a coleta. E, seguida, a maceração foi feita com o auxílio de tesouras cirúrgicas e pistilos apropriados para microtubos autoclavados.

Após a maceração, foram utilizados ~25 mg de cada tecido macerado, exceto para o baço em que foi utilizado ~10 mg, para a extração do DNA. Adicionou-se 180 µL de *PureLink® Genomic Digestion Buffer* e 20 µL de Proteinase K, certificando que todo o macerado estava imerso no líquido. As amostras, então, foram incubadas em termobloco (Eppendorf ThermoMixer) a 55 °C sob agitação máxima, *overnight*.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 15.000 rcf por 3 min, com o intuito de remover quaisquer materiais particulados do lisado. O sobrenadante foi então retirado e transferido para um novo microtubo, seguido da adição de 20 µL de RNase A. O microtubo foi misturado em *vortex* Fisher brand (Fisher Scientific) e incubado por 2 min a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200 µL de *PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer* juntamente com 200 µL de etanol 100% com agitação, no *vortex*, por 5 seg. Posteriormente, o lisado foi transferido para uma coluna cromatográfica acoplada em um microtubo de coleta (fornecida no kit), e centrifugada a 10.000 rcf por 1 min a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 500 µL de Wash Buffer 1 à coluna, que foi submetida novamente à centrifugação a 10.000 rcf por 1 min. Após, foram adicionados 500 µL de Wash Buffer 2 seguido de centrifugação a 15.000 rcf por 3 min. A coluna foi então transferida para um novo microtubo, em seguida adicionou-se no centro da coluna 30 µL de *PureLink® Genomic Elution Buffer* (pré-aquecido por ~5 min a 55 °C, antes do seu uso para

melhor eficiência), seguida por centrifugação em velocidade máxima por 1 min a temperatura ambiente.

O DNA extraído e purificado foi quantificado por espectrofotometria usando Nanodrop Lite (ThermoFisher Scientific), sua pureza foi medida através da razão A260/A280 em gel de agarose.

### **3.7. Amplificação do DNA (PCR)**

Após a extração do DNA dos órgãos coletados, as amostras foram então submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR).

Inicialmente, foi preparada uma solução estoque de uma mistura de primers que seriam utilizados, denominado primer mix, contendo 0.25  $\mu\text{M}$  de miseq universal à 5  $\mu\text{M}$ , 0.0025  $\mu\text{M}$  de barcode base à 0.5  $\mu\text{M}$  e Tris-EDTA (TE) pH 8.0 (nº. cat.: AM9858) até um volume final de 100  $\mu\text{L}$ . A reação da PCR corresponde a: água livre de nucleases (nº. cat.: 10977-015) necessária para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ , 3% de DMSO 100% (nº. cat.: #B0515A), 0.2 mM de DNTPs 10 mM (nº. cat.: #N0447AA), 2.0 mM de  $\text{MgCl}_2$  50 mM (nº. cat.: #B0510A), 1.0  $\mu\text{L}$  do primer mix, 50 ng de DNA, 0.24  $\mu\text{M}$  de sequence primer a 5  $\mu\text{M}$  (uma sequência de primer única para cada órgão, que pode ser conferida na Tabela S3), 0.5 unidades de Phusion Polymerase (nº. cat.: #M0530) e 1X de 5X Phusion Buffer (nº. cat.: #B0518S). Os valores quantitativos dos componentes do master mix são ajustados de acordo com a quantidade de amostras a serem amplificadas. É importante ressaltar que a mistura com todas as LNPs também foi amplificada e passou por todas as etapas daqui em diante, com o intuito de servir como controle positivo (100% administrado) para os dados coletados na etapa de sequenciamento de nova geração.

Em seguida, o tubo contendo a reação foi colocado no termociclador (Mini Amp Plus – ThermoFisher) para amplificação das amostras. As condições de ciclagem foram 98 °C por 48 seg, 98 °C por 12 seg, 67 °C por 22 seg, 72 °C por 28 seg e 72 °C por 5 min, repetidos por 39 ciclos. Após a etapa de amplificação, as amostras foram utilizadas imediatamente na etapa da eletroforese ou armazenadas no freezer a -20 °C.

### 3.8. Eletroforese em gel de agarose

Com o intuito de visualizar o resultado da PCR realizada anteriormente e também de separar o fragmento de DNA de interesse, foi feita eletroforese em gel de agarose.

Foi preparado um gel de agarose (nº. cat.: 16500-500) 2%, para isso, foi colocado 4.6 g de agarose dissolvida em 230 mL de TAE (tampão Tris-Acetato-EDTA) em um *erlenmeyer* de 500 mL. A solução foi então aquecida em um forno microondas até a completa dissolução da agarose. Ao finalizar a dissolução, a solução de agarose foi resfriada e foi adicionado 10 µL de SYBR Safe DNA gel stain (nº. cat.: S33102) para conseguir visualizar os fragmentos de DNA que serão adicionados. Em seguida, a solução foi transferida para a cuba de eletroforese e esperou-se a polimerização do gel.

Para a corrida de eletroforese, 5 µL de 6X TrackIt Cyan/Orange Loading Buffer (nº. cat.: 10482028) foi adicionado às amostras resultantes da PCR, homogeneizados e transferidos para os poços do gel de agarose. Foi adicionado em um dos poços do gel de agarose 6 µL de Trackit 50 pb DNA Ladder (nº. cat.: 10488043), utilizado para o dimensionamento e a quantificação aproximada de DNA. A corrida de eletroforese foi realizada a 90 V por aproximadamente 70 min (PowerPac Basic BIO-RAD) ou até visualização do loading buffer próximo ao final do gel.

Ao final da corrida, o gel foi revelado utilizando o equipamento Safe Imager Blue-Light Transilluminator (ThermoFisher). Os fragmentos de DNA com aproximadamente 144 pb foram excisados do gel com o auxílio de uma lâmina e colocados em um tubo eppendorf de 2,0 mL, para prosseguir com a recuperação e purificação desses fragmentos.

### 3.9. Purificação do fragmento de DNA do gel

Para possível realização do sequenciamento de nova geração e por conseguinte à quantificação da entrega de b-DNA pelas LNPs nos órgãos, os fragmentos de DNA de interesse extraídos do gel de agarose, foram recuperados e purificados utilizando o kit Purelink Quick Gel extraction Kit (ThermoFisher - nº. cat.: K210012).

Após a excisão do fragmento de DNA de interesse do gel, os mesmos foram pesados. Em seguida, foi adicionado ao tubo contendo o gel, o tampão de

solubilização buffer L3 (disponível no kit) em uma proporção de 3:1 (1.2 mL de Buffer L3 para cada 400 mg de gel), essa proporção é válida para um gel de agarose  $\leq 2\%$ . Após, o tubo foi colocado em banho-maria a 50 °C, por 10 min, o tubo era vertido a cada 3 min para garantir uma completa dissolução do gel. Após completa dissolução do gel o tubo foi incubado por mais 5 min. Para garantir um melhor rendimento de DNA, foi adicionado ao tubo contendo o gel dissolvido 1 volume de isopropanol equivalente ao peso do gel, seguido de homogeneização.

O gel dissolvido foi pipetado para uma coluna Quick Gel Extraction Column (disponível no kit), seguido de centrifugação a 12000 rcf por 1 min. Em seguida, foi adicionado à coluna 500  $\mu$ L de buffer de lavagem W1 contendo etanol, e então centrifugada a 12000 rcf por 1 min, essa etapa de lavagem foi repetida sob as mesmas condições. Em seguida, para remover o etanol, a coluna vazia foi centrifugada a 18000 rcf por 2 min. Por fim, foi adicionado ao centro da coluna 50  $\mu$ L do *buffer* de eluição E5, a coluna foi incubada em temperatura ambiente por 1 min, seguido de centrifugação por 1 min a 12000 rcf. O DNA eluído foi quantificado utilizando o fluorímetro qubit (ThermoFisher) e então, armazenado sob refrigeração a -20 °C até ser sequenciado.

### **3.10. Sequenciamento de nova geração Illumina e quantificação da entrega de b-DNA**

Para avaliar a biodistribuição do b-DNA presente em diferentes LNPs, em cada órgão de interesse em um único animal e também para selecionar as melhores formulações de LNPs para cada órgão de interesse, foi utilizado o sequenciamento de nova geração Illumina.

Para a realização do sequenciamento de nova geração Illumina, foi preparado inicialmente uma biblioteca utilizando 5  $\mu$ L de cada amostra do fragmento de DNA purificado do gel, previamente diluídas a uma concentração de 4 nM. Após, as bibliotecas foram encaminhadas para serem sequenciadas pela plataforma Illumina Miseq no sequenciador Illumina da UFMG.

Os resultados gerados no sequenciamento foram analisados através de um algoritmo em Python, desenvolvido para quantificar o número de leituras dos dados gerados de cada b-DNA nos órgãos analisados.

A entrega de b-DNA específico para um determinado órgão de interesse foi calculada pelo número de leituras de um b-DNA específico em um órgão dividido pelo

total de leituras de b-DNA do mesmo órgão, para uma avaliação da biodistribuição de b-DNA no mesmo órgão. Essa análise permitiu a identificação das melhores formulações de LNPs para aquele órgão específico.

### 3.11. Entrega de LNPs *in vitro*

Após análises dos dados do sequenciamento de nova geração Illumina, foram selecionadas as LNPs com melhor desempenho de entrega de b-DNA para a via IM e IV. As melhores LNPs foram então formuladas com DNA que codifica para a proteína GFP, de modo a analisar a eficiência de transfecção de cada uma das LNPs específicas, em diferentes linhagens celulares - macrófagos (RAW 264.7), fibroblastos (L929), células hepáticas (HepG2) e células endoteliais (bEnd.3), através da intensidade de fluorescência expressa pelo GFP.

As linhagens celulares RAW 264.7, L929 e bEnd.3 possuem origem animal, de camundongos (*mus musculus*) e a linhagem celular HepG2 possui origem humana (*Homo Sapiens*). As quatro linhagens celulares foram obtidas do banco de células ATCC.

As células RAW 264.7, HepG2 e bEnd.3 foram cultivadas em DMEM F12 suplementado com SFB (10% v/v) e Penicilina/Estreptomicina (1% v/v). As células L929 foram cultivadas em meio DMEM F12 suplementado com SFB (7% v/v) e Penicilina/Estreptomicina (1% v/v). Todas as células foram mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> em uma incubadora umidificada.

Para os ensaios *in vitro* de transfecção, as células L929, HepG2 e bEnd.3 foram semeadas em 5.000 células por poço e as células RAW 264.7 em 10.000 células por poço em placas de fundo plano de 96 poços e incubadas por 24 h antes do tratamento com as LNPs. Uma diluição em série de cada formulação de LNP encapsulando b-DNA em PBS foi preparada em concentrações variando de 0.00625 a 0.8 µg. A eficiência de transfecção foi medida em 24, 48 e 72 h utilizando o aparelho de microscopia Cytation 5 Cell Imaging (BioTek) com objetiva de 4x, e os dados foram analisados usando um *script* Python, que permitiu quantificar a intensidade de fluorescência em cada amostra. O teste de viabilidade celular foi realizado após 72 h da transfecção com as LNPs com ensaio alamarBlue™ (nº. cat.: DAL 1025), e a fluorescência foi medida usando ex/em 530/590 nm no Cytation 5 Cell Imaging (BioTek).

Após análise da melhor concentração realizamos uma comparação de transfecção com as duas LNPs de maior desempenho. A eficiência de transfecção foi medida em 24, 48 e 72 h utilizando o aparelho de microscopia Cytation 5 Cell Imaging (BioTek) com objetiva de 4x, e os dados foram analisados usando um *script* Python, que permitiu quantificar a intensidade de fluorescência em cada amostra.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Síntese e caracterização das LNPs

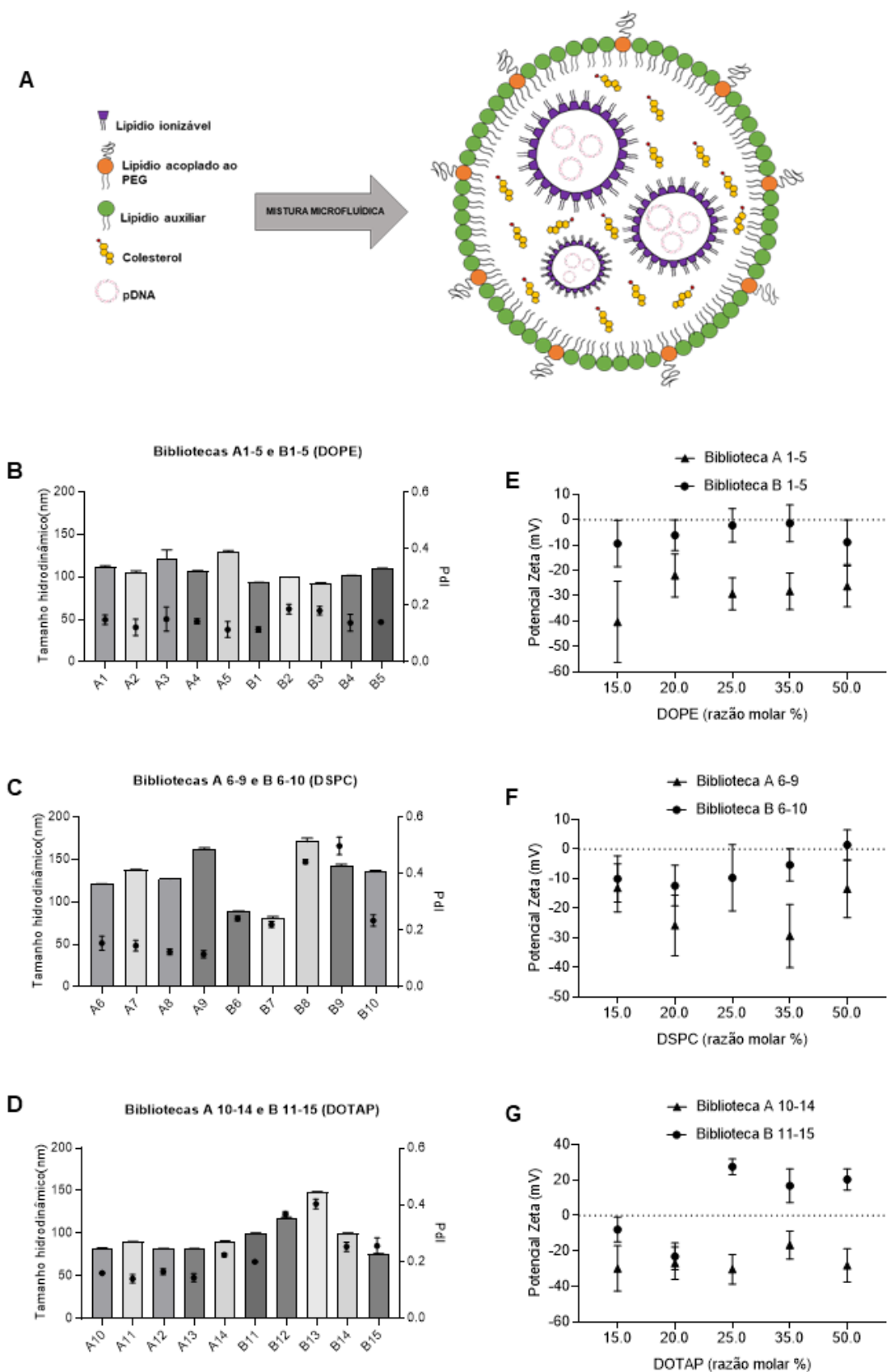
Um total de 29 formulações de LNPs foram preparadas a partir da mistura de uma fase aquosa contendo diferentes b-DNAs, e uma fase orgânica contendo lipídio ionizável, lipídio auxiliar (DOPE, ou DPSC ou DOTAP), colesterol e uma polietilenoglicol modificado (C14-PEG200) em diferentes proporções lipídicas (Tabela S2). A mistura das fases para obtenção das LNPs foi realizada através de um dispositivo microfluídico (Figura 7A).

As LNPs foram divididas em Bibliotecas “A” e “B” de acordo com suas proporções de lipídio ionizável:b-DNA (1:1 e 10:1, respectivamente). Cada biblioteca foi ainda subdividida de acordo com os lipídios auxiliares utilizados DOPE (Biblioteca A: 1-5 ou Biblioteca B: 1-5), DPSC (Biblioteca A: 6-9 ou Biblioteca B: 6-10) e DOTAP (Biblioteca A: 10-14 ou Biblioteca B: 11-15). As formulações de LNPs foram caracterizadas através do tamanho, PDI e PZ (Tabela S4).

O diâmetro hidrodinâmico da Biblioteca A variou entre  $81.64 \pm 0.66$  nm e  $161.86 \pm 2.06$  nm. De maneira interessante, esse valor variou de acordo com o tipo de lipídio auxiliar utilizado (A 1-5: entre  $105.08 \pm 2.29$  nm e  $129.92 \pm 1.31$  nm; A 6-9: entre  $121.15 \pm 0.5$  nm e  $161.86 \pm 2.06$  nm; A 10-14: entre  $81.64 \pm 0.66$  nm e  $90.3 \pm 1.13$  nm). Os valores de PDI das LNPs da Biblioteca A 1-5 variaram entre  $0.114 \pm 0.028$  e  $0.151 \pm 0.043$ , A 6-9 entre  $0.116 \pm 0.013$  e  $0.155 \pm 0.025$ , A 7-14 entre  $0.14 \pm 0.015$  e  $0.224 \pm 0.006$ . Os valores de PZ das LNPs da Biblioteca A 1-5 variaram entre  $-22 \pm 8.47$  mV e  $-40.3 \pm 16$  mV, A 6-9 entre  $-13.1 \pm 8.13$  mV e  $-29.37 \pm 10.69$  mV, A 10-14 entre  $-16.7 \pm 7.92$  mV e  $-30.3 \pm 8.33$  mV (Figura 7 e Tabela S4).

Já as LNPs da Biblioteca B apresentaram um diâmetro hidrodinâmico que variou entre  $75.70 \pm 0.59$  nm e  $170.92 \pm 4.39$  nm. Esse valor variou de acordo com o tipo de lipídio auxiliar utilizado (B 1-5: entre  $92.49 \pm 0.69$  nm e  $109.97 \pm 0.42$  nm; B 6-10: entre  $81.61 \pm 1.37$  nm e  $170.92 \pm 4.39$  nm; B 11-15: entre  $75.7 \pm 0.59$  nm e  $148.2 \pm 1.02$  nm). Os valores de PDI das LNPs da Biblioteca A 1-5 variaram entre  $0.114 \pm 0.028$  e  $0.151 \pm 0.043$ , A 6-9 entre  $0.116 \pm 0.013$  e  $0.155 \pm 0.025$ , A 7-14 entre  $0.14 \pm 0.015$  e  $0.224 \pm 0.006$ . Os valores de PZ das LNPs da Biblioteca B 1-5 variaram entre  $-1,41 \pm 7.26$  mV e  $-9,37 \pm 9.15$  mV, B 6-10 entre  $-12,35 \pm 6.85$  mV e  $1,46 \pm 5.08$  mV, B 11-15 entre  $-7,84 \pm 6.97$  mV e  $27,53 \pm 4.41$  mV (Figura 7 e Tabela S4).

Ao comparar as duas bibliotecas nota-se que as LNPs da Biblioteca A, formuladas com a proporção 1:1 de lipídio ionizável:b-DNA, tiveram seu PZ mais negativo (A 1-5: entre  $-22 \pm 8.47$  mV e  $-40.3 \pm 16$  mV, A 6-9: entre  $-13.1 \pm 8.13$  mV e  $-29.37 \pm 10.69$  mV, A 10-14: entre  $-16.7 \pm 7.92$  mV e  $-30.3 \pm 8.33$  mV) que as formuladas com a proporção de 10:1 (Biblioteca B), as quais apresentaram valores mais próximos da neutralidade (B 1-5: entre  $-1,41 \pm 7.26$  mV e  $-9,37 \pm 9.15$  mV, B 6-10: entre  $-12,35 \pm 6.85$  mV e  $1,46 \pm 5.08$  mV, B 11-15: entre  $-7,84 \pm 6.97$  mV e  $27,53 \pm 4.41$  mV) (Figura 7 E-F). De maneira interessante, as LNPs formuladas com DOTAP na proporção 10:1 (Biblioteca B11-15) mostraram-se negativas apenas nas formulações B11 ( $-7,84 \pm 6.97$  mV) e B12 ( $-23,03 \pm 7.61$  mV) (Figura 7G).

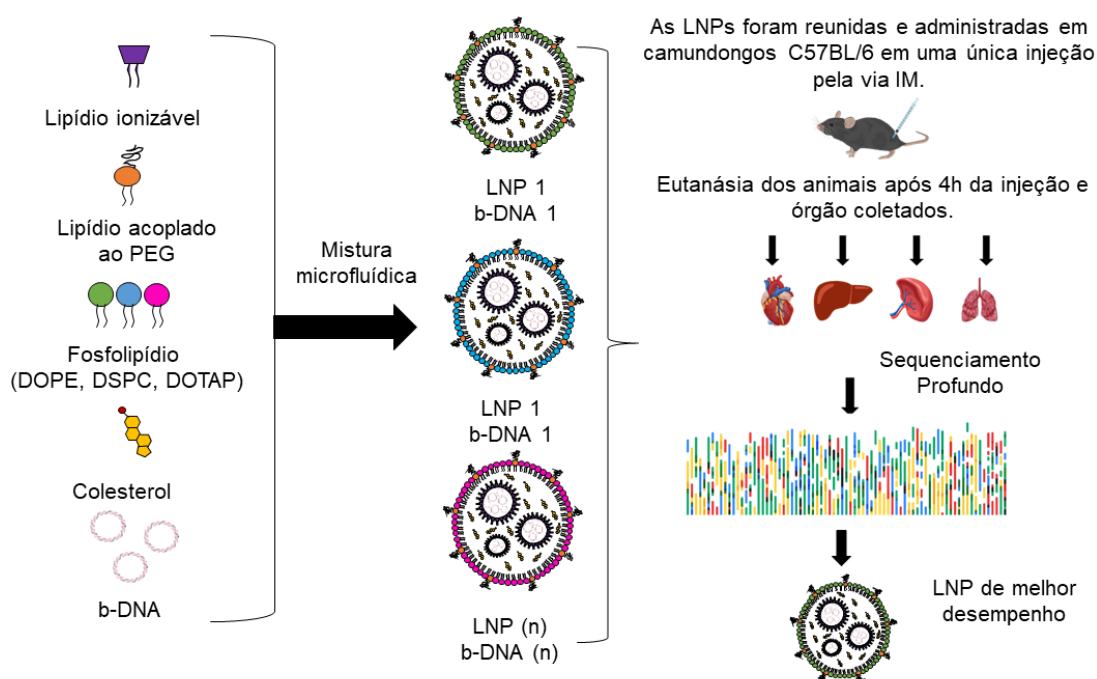


**Figura 7: Síntese e caracterização das LNPs para entrega de b-DNA. (A)** Esquerda: as LNPs foram formuladas utilizando um dispositivo microfluídico, na qual há uma mistura de uma fase aquosa contendo o b-DNA e uma fase orgânica contendo os lipídios. Direita: Formação esquemática da LNP encapsulando o b-DNA. **(B-D)** Medidas do diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão das

LNPs, separadas pelos grupos de acordo com os lipídios auxiliares de cada um. Gráfico de barras: tamanho; Ponto da barra: índice de polidispersão (PDI) **(E-G)** Valores de potencial zeta (mV) das LNPs, separadas pelos grupos de acordo com os lipídios auxiliares de cada um. Os dados são plotados como média  $\pm$  SD.

#### 4.2. Biodistribuição das LNPs administradas por via IM e identificação de formulações promissoras para órgãos-alvo

Para avaliação da biodistribuição das LNPs por via IM, a mistura de LNPs foi administrada no músculo quadríceps femoral do animal, e 4h após a administração os animais foram eutanasiados e seus órgãos foram coletados para análise (Figura 8). Através do sequenciamento profundo de alto rendimento, foram detectados os b-DNAs referentes a cada LNP para os diferentes órgãos de interesse, sendo assim possível identificar formulações específicas para esses órgãos-alvo (Figuras 9 e 10).

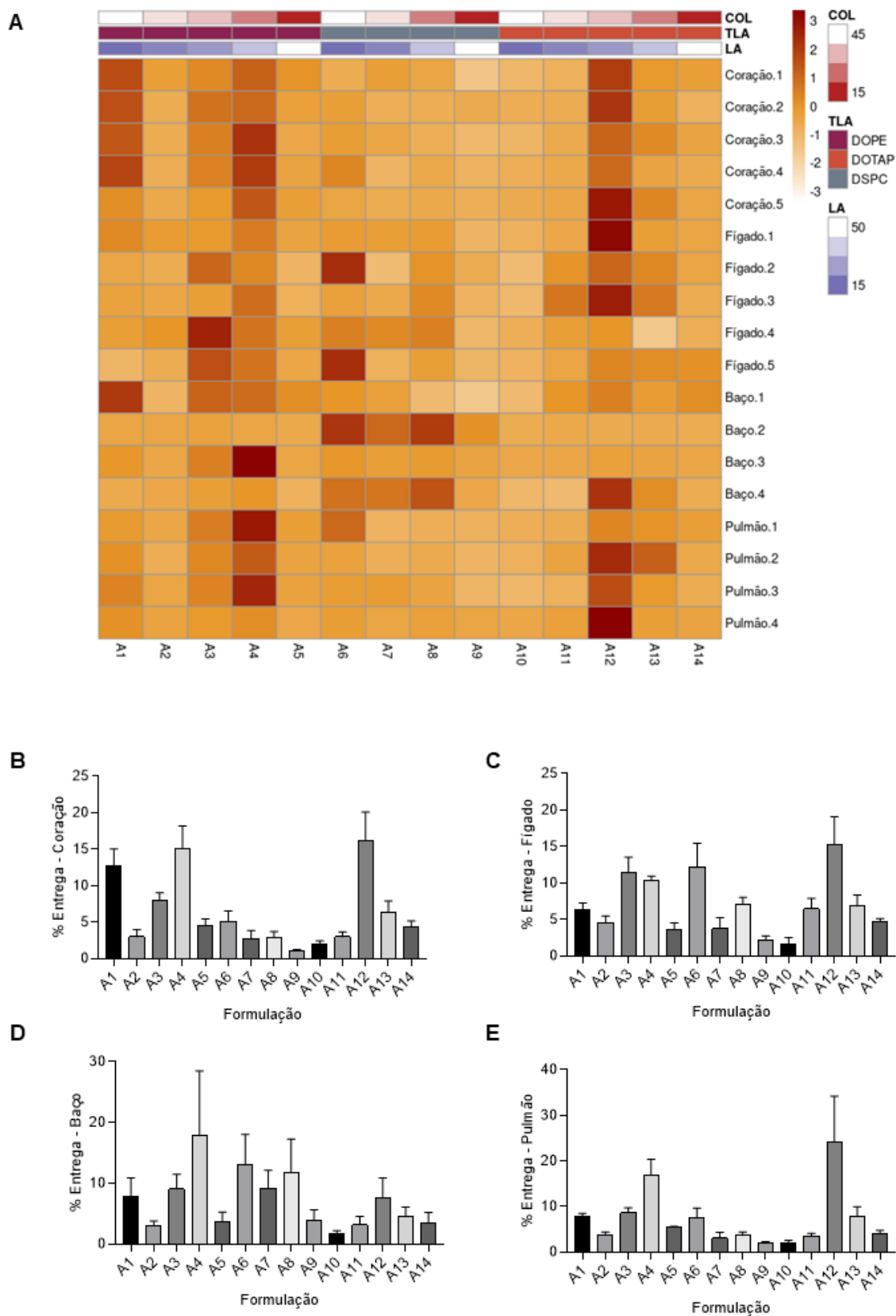


**Figura 8: Esquema de LNPs encapsulando b-DNA administradas pela via IM para triagem de entrega in vivo acelerada.** Esquerda: LNPs foram formuladas por meio de mistura microfluídica de uma fase aquosa de contendo b-DNA e uma fase etanólica contendo os lipídios. Meio: Formação esquemática de LNPs encapsulando b-DNA. As LNPs foram formuladas através de um dispositivo microfluídico e cada formulação de LNP foi encapsulada com um b-DNA exclusivo. Direita: 29 formulações de LNP (A1-A14 e B1-B15) foram formuladas variando o conteúdo e a razão molar de lipídio auxiliar (DOPE, DOTAP ou DSPC) e colesterol. Uma dose de 0.5  $\mu$ g de pDNA de cada b-DNA LNP foi reunida e administrada a camundongos C57BL/6 pela via IM como uma única injeção. 4 h após a injeção, a entrega de b-DNA ao coração, fígado, baço e pulmão foram quantificados.

Com o objetivo de avaliar a LNP mais adequada para uma possível vacina de ácido nucléico, foi realizada a administração da mistura de LNPs pela via IM. Essa via

é comumente utilizada para administração de vacinas, pois possui células apresentadoras de antígenos (APC) residentes ou atraídas presentes na pele, músculo, ou em tecidos de órgãos linfóides secundários, que possuem a capacidade de internalizar e processar antígenos que sejam codificados pelos ácidos nucléicos.

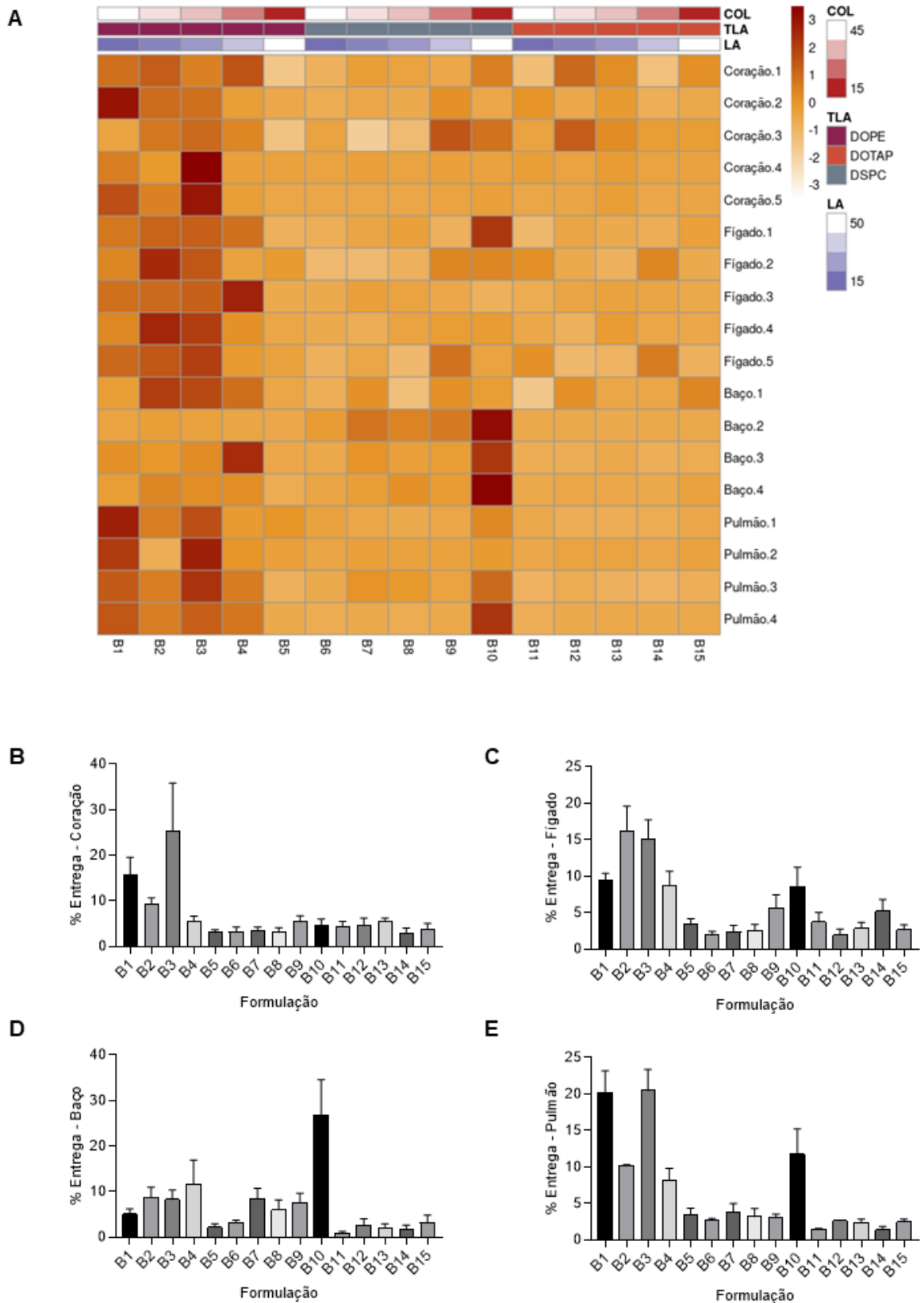
Dentro da biblioteca A, as LNPs com maior percentual de entrega de b-DNA foram: (i) A1 (12.67%), A4 (15.17%) e A12 (16.25%) para o coração; A3 (11.41%), A4 (10.42%), A6 (12.16%) e A12 (15,33%) para o fígado; A4 (17.82%), A6 (13.05%), e A8 (11.87%) para baço; A4 (16.94%) e A12 (24.28%) para pulmão (Figura 9). Dentre as LNPs com maior percentual de entrega de b-DNA nos tecidos, as formulações A1, A3 e A4 contém o lipídio auxiliar DOPE em diferentes proporções na composição, as formulações A6 e A9 contém o lipídio auxiliar DSPC em diferentes proporções na composição e a formulação A12 contém o lipídio auxiliar DOTAP na composição (Tabela S2).



**Figura 9: Biodistribuição das LNPs da Biblioteca A administradas pela via IM. (A-E) 14 formulações com razão lipídio ionizável:b-DNA de 1:1 (A 1-14) formuladas variando a razão molar do lipídio auxiliar (DOPE, DSPC ou DOTAP) e do colesterol. Uma dose de 0,5 µg de cada LNP**

encapsulando um b-DNA diferente foi reunida e administrada em camundongos C57BL/6 pela via IM em uma única injeção. 4h após a injeção, a entrega do b-DNA no coração, fígado, baço e pulmão foram quantificadas por sequenciamento profundo de alto rendimento. **(A)** O mapa de calor foi criado usando software R e representa a entrega de b-DNA em diferentes amostras de tecidos. As regiões mais escuras indicam as amostras que tiveram maior percentual de entrega de b-DNA. **(B-E)** O gráfico de barras apresenta a quantificação em porcentagem da entrega de b-DNA pelas LNPs (A1-A14) nos diferentes tecidos alvos: **(B)** coração, **(C)** fígado, **(D)** baço e **(E)** pulmão 4 h após a injeção administrada por via IM. Dados plotados como média  $\pm$  SEM.

Dentro da biblioteca B, as LNPs com maior percentual de entrega de b-DNA foram: (i) B1 (15.67%), B2 (9.37%), B3 (25.29%) para o coração; (ii) B1 (9.51%), B2 (16.22%), B3 (15.14%) e B4 (8.70%) para o fígado; (iii) B2 (8.72%), B3 (8.28%), B4 (11.74%) e B10 (26.24%) para baço; (iv) B1 (20.25%), B2 (10.27%), B3 (20.48%), B4 (8.20%) e B10 (11.78%) para pulmão (Figura 10). Dentre as LNPs com maior percentual de entrega de b-DNA nos tecidos, as formulações B1, B2, B3, B4 contém o lipídio auxiliar DOPE em diferentes proporções na composição, enquanto a formulação B10 possui DSPC na composição (Tabela S2). As formulações contendo DOTAP como lipídio auxiliar não apresentaram percentual significativo de entrega de b-DNA comparada às outras formulações.

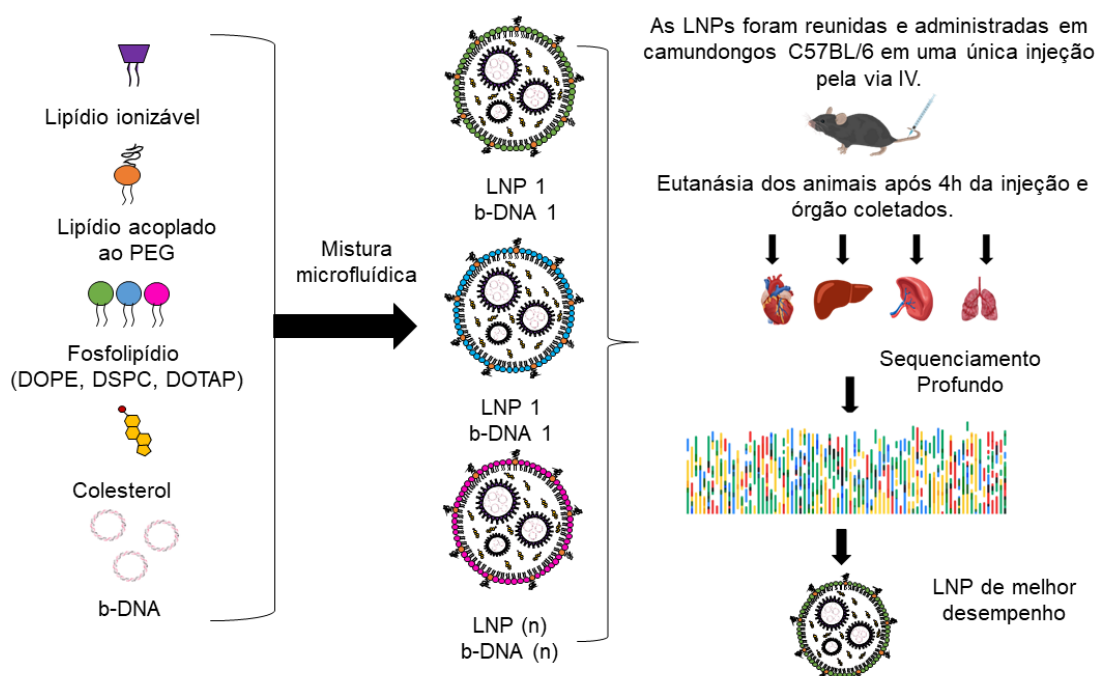


**Figura 10: Biodistribuição das LNPs da Biblioteca B administradas pela via IM. (A-E) 15 formulações com razão de lipídio ionizável:b-DNA de 10:1 (B 1-15) formuladas variando a razão molar do lipídio auxiliar (DOPE, DSPC ou DOTAP) e do colesterol. Uma dose de 0.5 µg de cada LNP encapsulando um b-DNA diferente foi reunida e administrada em camundongos C57BL/6 pela**

via IM em uma única injeção. 4h após a injeção, a entrega do b-DNA no coração, fígado, baço e pulmão foram quantificadas por sequenciamento profundo de alto rendimento. **(A)** O mapa de calor foi criado usando software R e representa a entrega de b-DNA em diferentes amostras de tecidos. As regiões mais escuras indicam as amostras que tiveram maior percentual de entrega de b-DNA. **(B-E)** O gráfico de barras apresenta a quantificação em porcentagem da entrega de b-DNA pelas LNPs (B 1-15) nos diferentes tecidos alvo: **(B)** coração, **(C)** fígado, **(D)** baço e **(E)** pulmão 4 h após a injeção administrada por via IM. Dados plotados como média  $\pm$  SEM.

### 4.3. Biodistribuição das LNPs administradas por via IV e identificação de formulações promissoras para órgãos-alvo

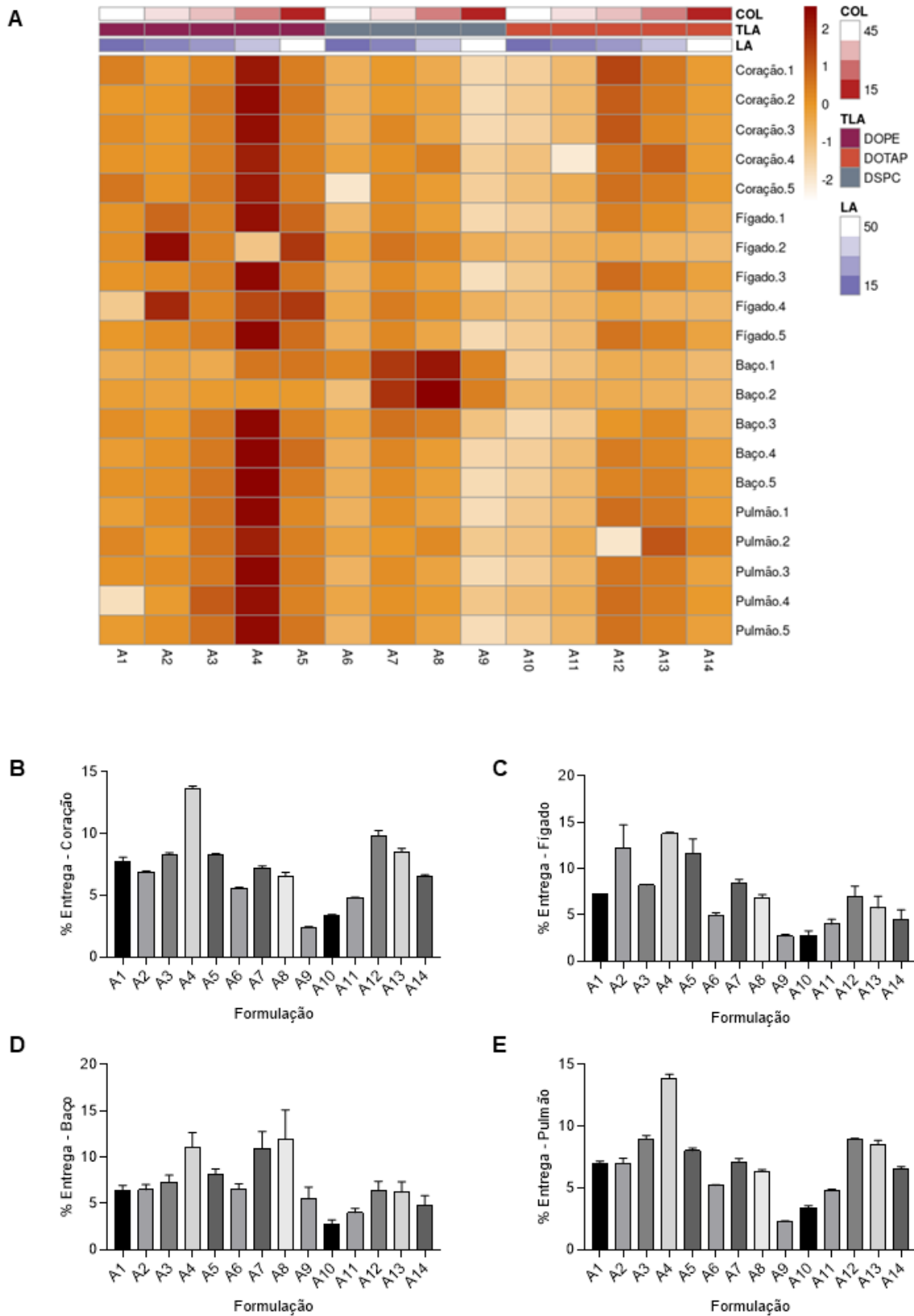
Para avaliação da biodistribuição das LNPs por via IV, a mistura de LNPs foi administrada na veia da cauda do animal, e após 4h da administração os animais foram eutanasiados e seus órgãos foram coletados para análise (Figura 11). Através do sequenciamento profundo de alto rendimento, foram detectados os b-DNAs referentes a cada LNP para os diferentes órgãos de interesse (coração, fígado, baço e pulmão), sendo assim possível identificar formulações específicas para esses órgãos-alvo em possíveis estudos para terapias genéticas pela via IV (Figuras 12 e 13).



**Figura 11: Esquema de LNPs encapsulando b-DNA administradas pela via IV para triagem de entrega in vivo acelerada.** Esquerda: LNPs foram formuladas por meio de mistura microfluídica de uma fase aquosa de contendo b-DNA e uma fase etanólica contendo os lipídios. Meio: Formação esquemática de LNPs encapsulando b-DNA. As LNPs foram formuladas através de um dispositivo microfluídico e cada formulação de LNP foi encapsulada com um b-DNA exclusivo. Direita: 29 formulações de LNP (A1-A14 e B1-B15) foram formuladas variando o conteúdo e a razão molar de lipídio auxiliar (DOPE, DOTAP ou DSPC) e colesterol. Uma dose de 0.5  $\mu$ g de pDNA de cada b-DNA

LNP foi reunida e administrada a camundongos C57BL/6 pela via IV como uma única injeção. 4 h após a injeção, a entrega de b-DNA ao coração, fígado, baço e pulmão foram quantificados.

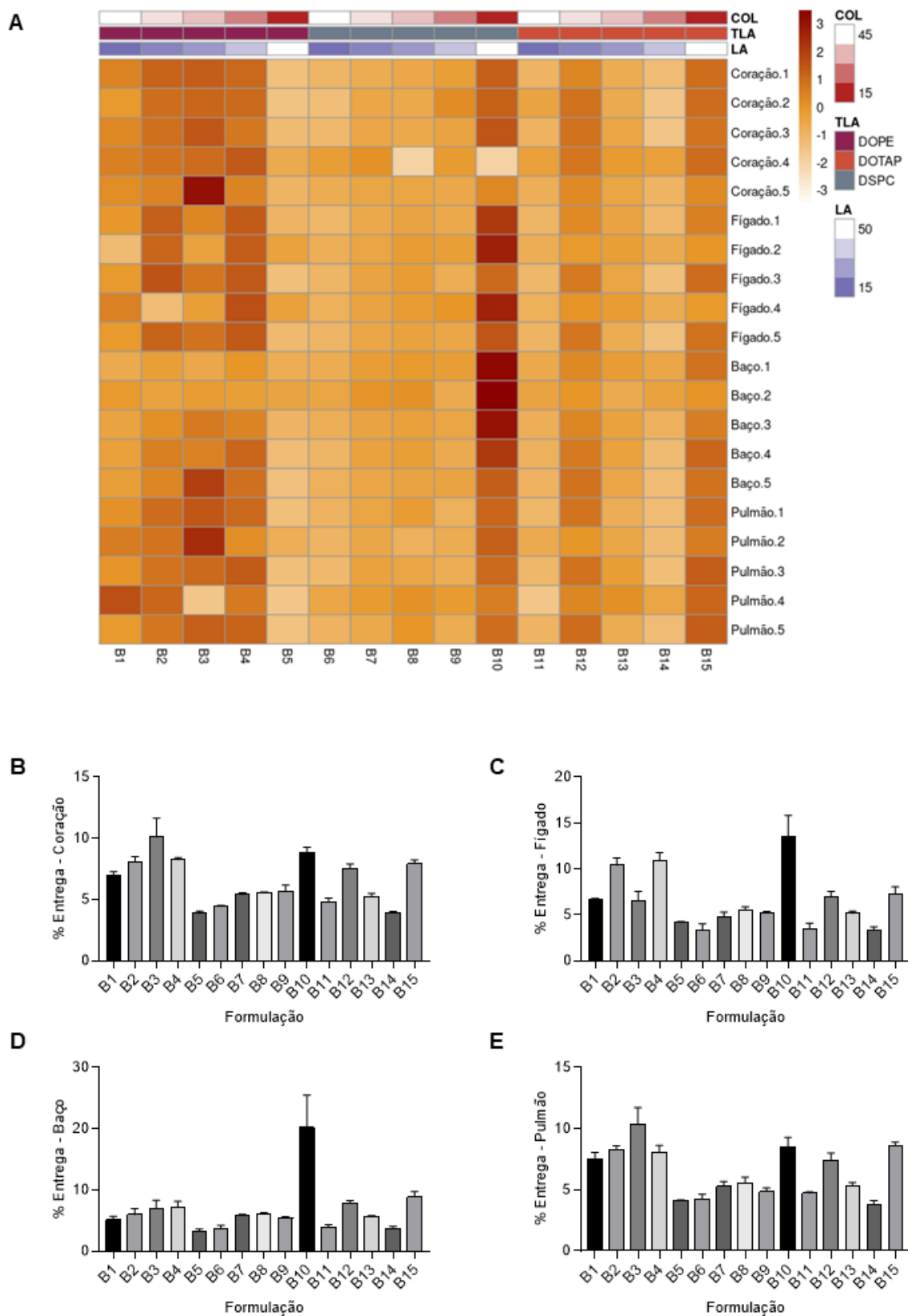
Dentro da biblioteca A, as LNPs com maior percentual de entrega de b-DNA foram: (i) A4 (13.70%) e A12 (9.80%) para o coração; A2 (12.24%), A4 (13.82%), e A5 (11.70%) para o fígado; A4 (11.12%), A7 (10.89%), e A8 (11.93%) para baço; A3 (8.97%), A4 (11.88%), A12 (8.96%), e A13 (8.54%) para pulmão (Figura 12). Dentre as LNPs com maior percentual de entrega de b-DNA nos tecidos, as formulações A2, A3, A4 e A5 contém o lipídio auxiliar DOPE em diferentes proporções na composição, as formulações A7 e A8 contém o lipídio auxiliar DSPC em diferentes proporções na composição e as formulações A12 e A13 contém o lipídio auxiliar DOTAP em diferentes proporções na composição (Tabela S2).



**Figura 12: Biodistribuição das LNPs da Biblioteca A administradas pela via IV. (A-E) 14 formulações com razão lipídio ionizável:b-DNA de 1:1 (A 1-14) formuladas variando a razão molar**

do lipídio auxiliar (DOPE, DSPC ou DOTAP) e do colesterol. Uma dose de 0.5 µg de cada LNP encapsulando um b-DNA diferente foi reunida e administrada em camundongos C57BL/6 pela via IV em uma única injeção. 4h após a injeção, a entrega do b-DNA no coração, fígado, baço e pulmão foram quantificadas por sequenciamento profundo de alto rendimento. **(A)** O mapa de calor foi criado usando software R e representa a entrega de b-DNA em diferentes amostras de tecidos. As regiões mais escuras indicam as amostras que tiveram maior percentual de entrega de b-DNA. **(B-E)** O gráfico de barras apresenta a quantificação em porcentagem da entrega de b-DNA pelas LNPs (A1-A14) nos diferentes tecidos alvos: **(B)** coração, **(C)** fígado, **(D)** baço e **(E)** pulmão 4 h após a injeção administrada por via IV. Dados plotados como média ± SEM.

Dentro da biblioteca B, as LNPs com maior percentual de entrega de b-DNA foram: (i) B2 (8.07%), B3 (10.1%), B4 (8.26%) e B10 (8.86%) para o coração; (ii) B2 (10.41%), B4 (10.98%) e B10 (13.60%) para o fígado; (iii) B10 (20.22%), B12 (7.81%) e B15 (8.90%) para baço; (iv) B2 (8.33%), B3 (10.40%), B4 (8.06%), B10 (8.52%) e B15 (8.60%) para pulmão (Figura 13). Dentre as LNPs com maior percentual de entrega de b-DNA nos tecidos, as formulações B2, B3 e B4 contém o lipídio auxiliar DOPE em diferentes proporções na composição, a formulação B10 possui DSPC na composição e as formulações B12 e B15 contém o lipídio auxiliar DOTAP em diferentes proporções na composição (Tabela S2).

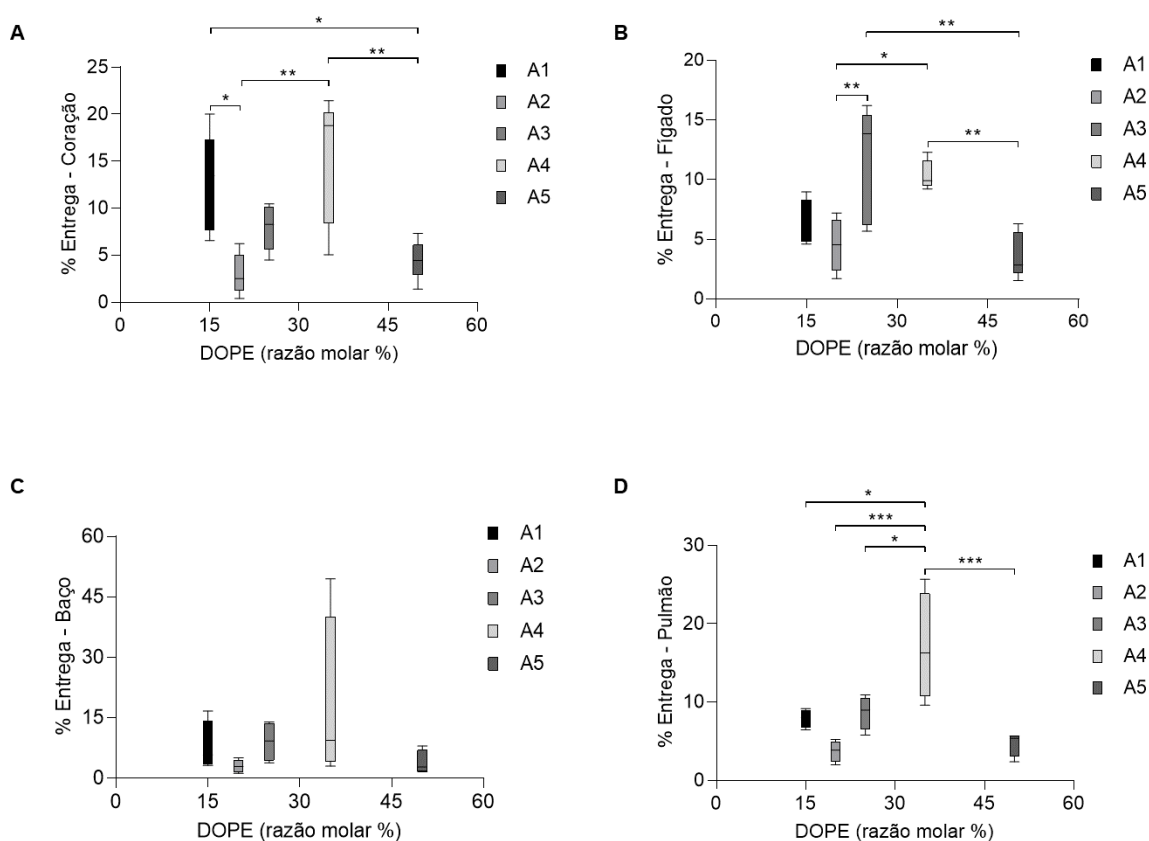


**Figura 13: Biodistribuição das LNPs da Biblioteca B administradas pela via IV. (A-E)** 15 formulações com razão lipídio ionizável:b-DNA de 10:1 (B 1-15) formuladas variando a razão molar do lipídio auxiliar (DOPE, DSPC ou DOTAP) e do colesterol. Uma dose de 0.5  $\mu$ g de cada LNP encapsulando um b-DNA diferente foi reunida e administrada em camundongos C57BL/6 pela via

IV em uma única injeção. 4h após a injeção, a entrega do b-DNA no coração, fígado, baço e pulmão foram quantificadas por sequenciamento profundo de alto rendimento. **(A)** O mapa de calor foi criado usando software R e representa a entrega de b-DNA em diferentes amostras de tecidos. As regiões mais escuras indicam as amostras que tiveram maior percentual de entrega de b-DNA. **(B-E)** O gráfico de barras apresenta a quantificação em porcentagem da entrega de b-DNA pelas LNPs (B 1-15) nos diferentes tecidos alvos: **(B)** coração, **(C)** fígado, **(D)** baço e **(E)** pulmão 4 h após a injeção administrada por via IV. Dados plotados como média  $\pm$  SEM.

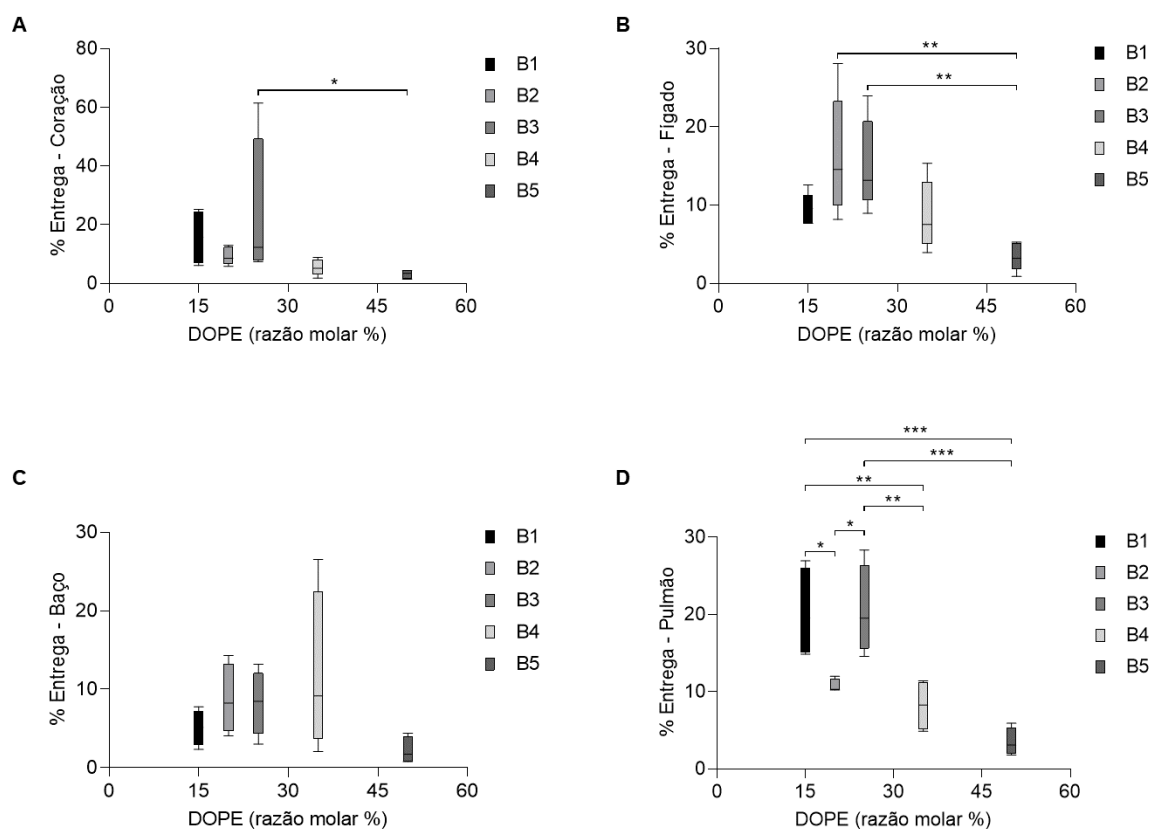
#### 4.4. Relação entre variação do lipídio auxiliar DOPE e a entrega de b-DNA *in vivo* através da via IM

Ao correlacionar a variação do lipídio auxiliar DOPE com a entrega de b-DNA através da via IM, pode-se observar que o maior percentual de entrega de b-DNA dentro da Biblioteca A se deu através da LNP A4 para o coração, baço e pulmão e LNP A3 para o fígado (Figura 14 A-D). Essa formulação contém 35% de DOPE e 27.5% de colesterol. Por outro lado, os menores percentuais de entrega de b-DNA se deram a partir das LNPs A2 (20% de DOPE e 42.5% de colesterol) para o coração, baço e pulmão (Figura 14 A, C e D), e A5 (50% de DOPE e 12.5% de colesterol) para o fígado (Figura 14 B). Nesse contexto, foi possível observar um máximo de entrega de b-DNA na razão molar de 35% de DOPE, sendo que essa entrega é reduzida em razões molares maiores.



**Figura 14: Relação entre variação do lipídio auxiliar DOPE nas LNPs da Biblioteca A 1-5 e a entrega de b-DNA pela via IM.** \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  por teste *one-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Comparação Múltipla de Tukey.

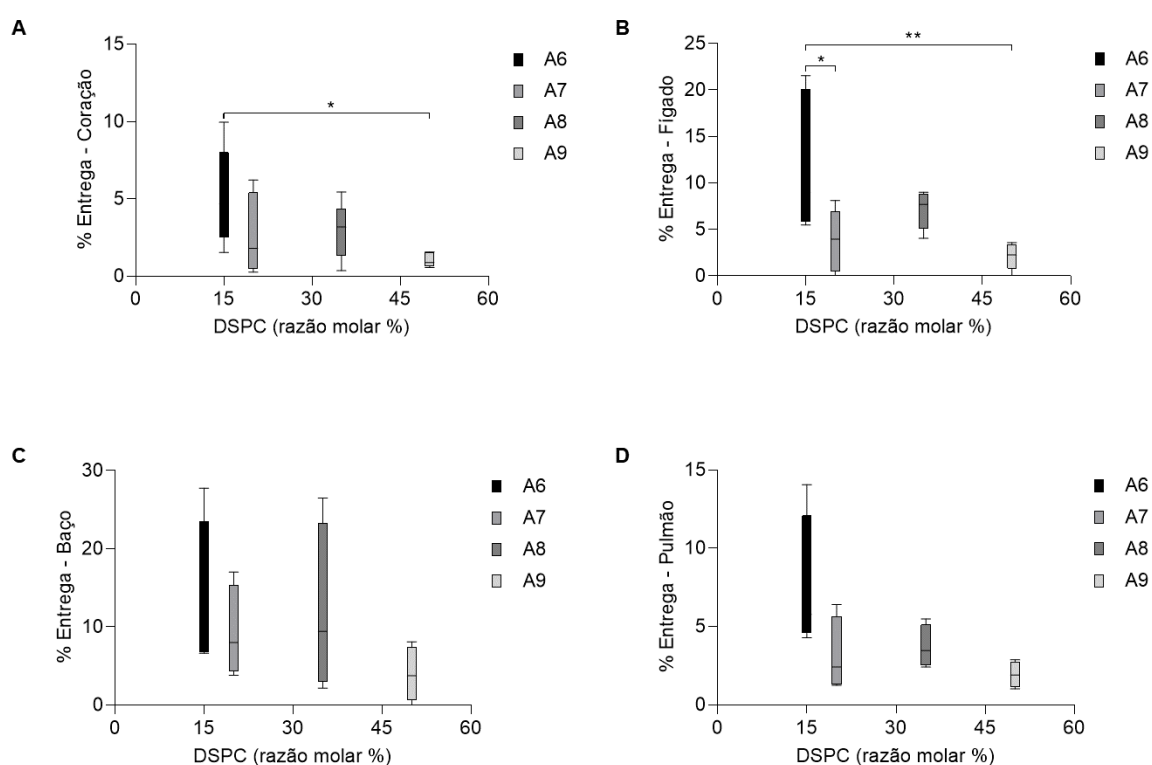
Na mesma correlação para a Biblioteca B, observa-se que a LNP B3 (25% de DOPE e 37.5% de colesterol) apresentou maior percentual de entrega de b-DNA para os órgãos como: coração e pulmão (Figura 15 A e D), a LNP B2 (20% de DOPE e 42.5% de colesterol) foi a de maior entrega de b-DNA no fígado (Figura 15 B) e a LNP B4 (35% de DOPE e 27.5% de colesterol) foi a formulação com maior percentual de entrega de b-DNA no baço (Figura 15 C). Nos dados da Biblioteca B1-5, verifica-se uma relação entre o aumento de DOPE e com aumento do percentual de entrega de b-DNA, até máximo de entrega de acordo com cada órgão de modo que razões molares de DOPE superiores a 35%, reduzem a entrega de b-DNA nos órgãos analisados (Figura 15).



**Figura 15: Relação entre variação do lipídio auxiliar DOPE nas LNPs da Biblioteca B 1-5 e a entrega de b-DNA pela via IM.** \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  por teste *one-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Comparação Múltipla de Tukey.

#### 4.5. Relação entre variação do lipídio DSPC e a entrega de b-DNA in vivo através da via IM

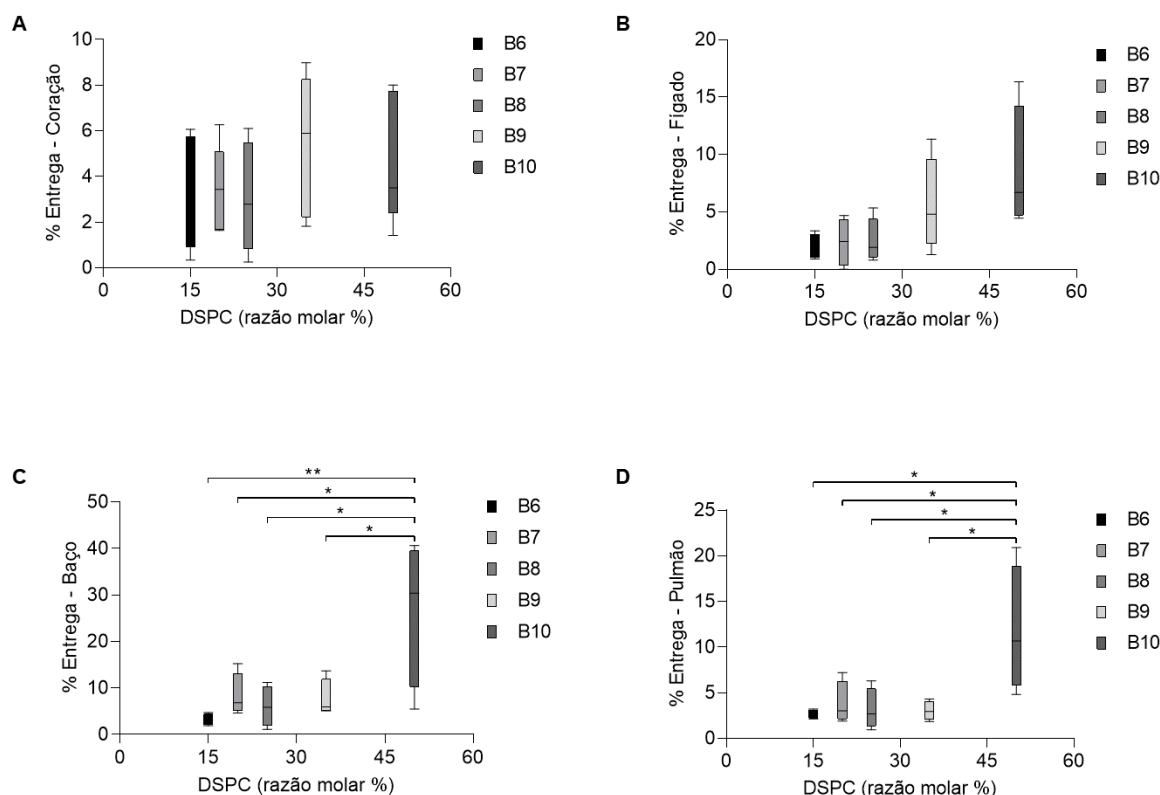
Ao correlacionar a variação do lipídio auxiliar DSPC com a entrega de b-DNA através da via IM, nota-se que o maior percentual de entrega de b-DNA se dá através da LNP A6 (15% de DSPC e 47.5% de colesterol) para todos os órgãos analisados (Figura 16). Aqui observa-se que ao aumentar o teor de DSPC na LNP o seu percentual de entrega de b-DNA diminui, exibindo a maior entrega de b-DNA com a LNP com o menor teor de DSPC e a menor com a LNP que apresenta maior teor de DSPC.



**Figura 16: Relação entre variação do lipídio auxiliar DSPC nas LNPs da Biblioteca A 6-9 a entrega de b-DNA pela via IM.** \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  por teste *one-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Comparação Múltipla de Tukey.

Para a Biblioteca B 6-10, a LNP B10 (50% de DSPC e 12.5% de colesterol) exibiu melhor entrega de b-DNA no fígado, baço e pulmão (Figura 17 B-D), no coração a maior entrega de b-DNA foi apresentada pela LNP B9 (35% de DSPC e 27.5% de colesterol) (Figura 17 A). A menor entrega de b-DNA foi apresentada pela LNP B6 (15% de DSPC e 47.5% de colesterol) para todos os quatro órgãos de interesse

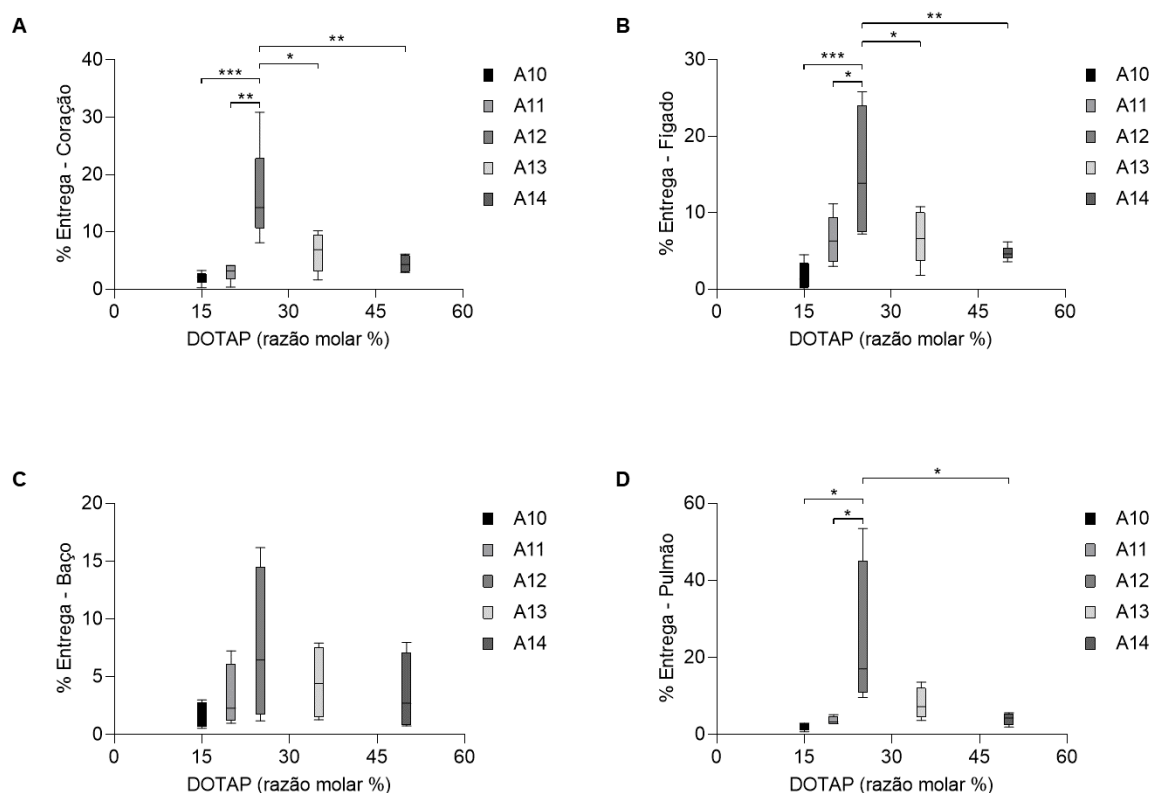
(Figura 17A-D). Nesse contexto, foi possível observar um máximo de entrega de b-DNA na razão molar de 50% de DSPC, sendo que essa entrega é reduzida em razões molares menores. (Figura 17).



**Figura 17: Relação entre variação do lipídio auxiliar DSPC nas LNPs da Biblioteca B 6-10 e a entrega de b-DNA pela via IM.** \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  por teste *one-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Comparação Múltipla de Tukey.

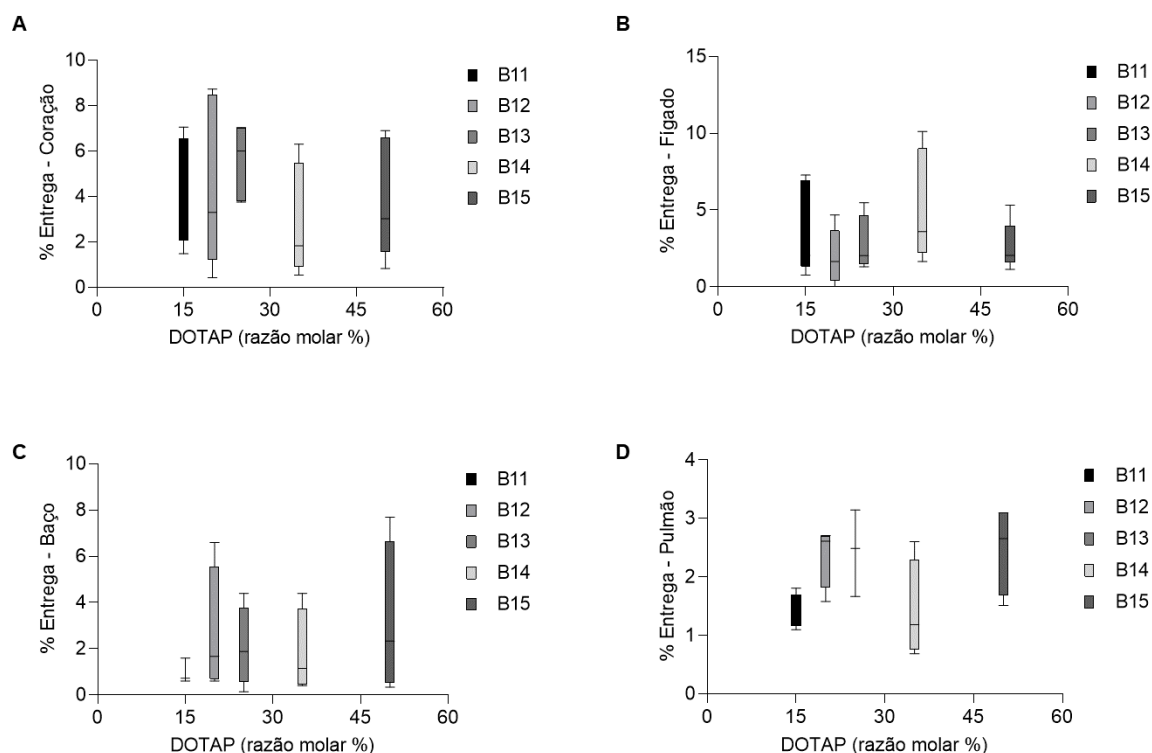
#### 4.6. Relação entre variação do lipídio auxiliar DOTAP e a entrega de b-DNA pela via IM

Ao considerar a Biblioteca A 10-14, a LNP A12 (25% de DOTAP e 37.5% de colesterol) apresentou a maior entrega de b-DNA para todos os quatro órgãos analisados (Figura 18 A-D). Com o aumento do teor de DSPC se observa que existe um aumento na entrega de b-DNA até o ponto em que atinge o máximo de entrega de b-DNA (25% de DOTAP), com redução na entrega de b-DNA ao aumentar o percentual de DOTAP (Figura 18 A-D). O percentual mínimo de entrega de b-DNA foi exibido pela LNP A10 (15% de DOTAP e 47.5% de colesterol) (Figura 18 A-D).



**Figura 18: Relação entre variação do lipídio auxiliar DOTAP nas LNPs da Biblioteca A 10-14 e a entrega de b-DNA pela via IM.** \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  por teste *one-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Comparação Múltipla de Tukey.

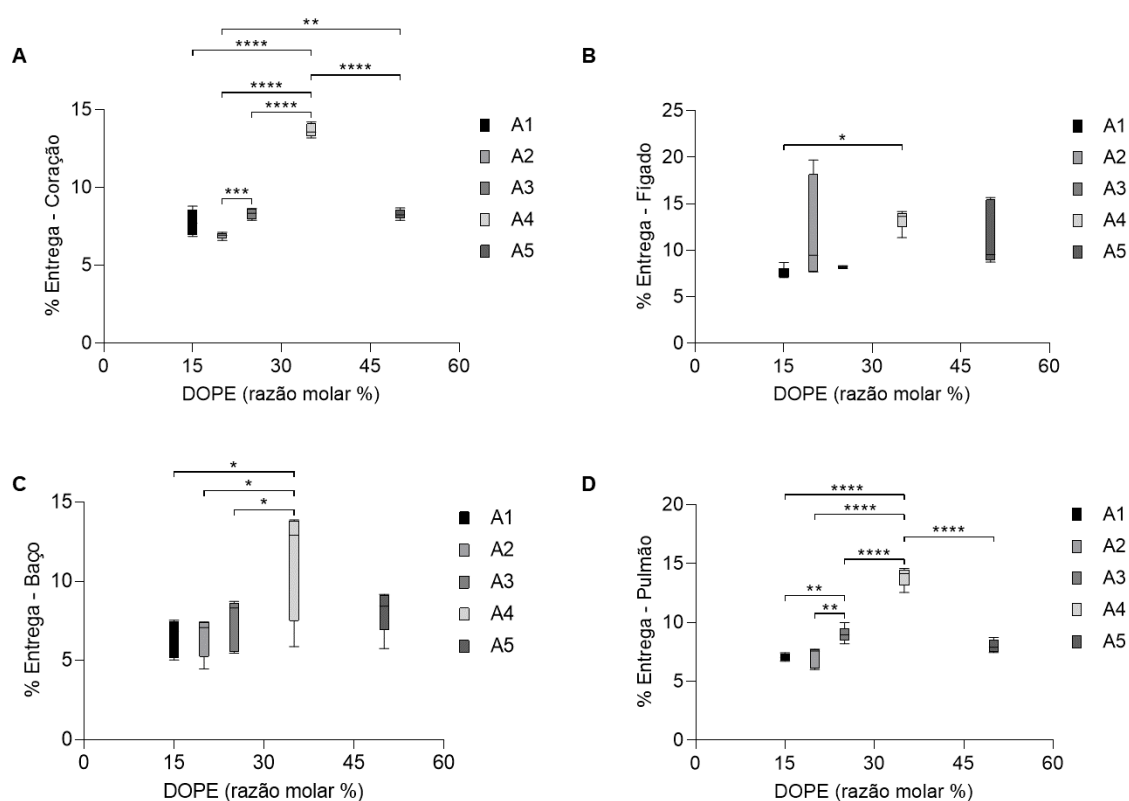
Já ao analisar a Biblioteca B 11-15, a maior entrega de b-DNA foi apresentada pela LNP B13 (25% de DOTAP e 37.5% de colesterol) para o coração (Figura 19 A), pela LNP B14 (35% de DOTAP e 27.5% de colesterol) para o fígado (Figura 19 B) e pela LNP B15 (50% de DOTAP e 12.5% de colesterol) para o baço (Figura 19 C) e pela LNP B12 (20% de DOTAP e 42.5% de colesterol) para o pulmão (Figura 19 D). A menor entrega de b-DNA foi apresentada pela LNP B14 (35% de DOTAP e 27.5% de colesterol) para o coração e pulmão (Figura 19 A e D), pela LNP B12 (20% de DOTAP e 42.5% de colesterol) para o fígado (Figura 19 B) e pela LNP B11 (15% de DOTAP e 47.5% de colesterol) para o baço (Figura 19 C). Nesse contexto, observa-se que com o aumento do percentual molar DOTAP nas LNPs tivemos entregas distintas, com pequenas variações, o que não permitiu estabelecer uma relação evidente do aumento do percentual molar desse lipídio auxiliar com a entrega de b-DNA (Figura 19).



**Figura 19: Relação entre variação do lipídio auxiliar DOTAP nas LNPs da Biblioteca B 11-15 e a entrega de b-DNA pela via IM.** Os testes estatísticos foram realizados por teste *one-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Comparação Múltipla de Tukey.

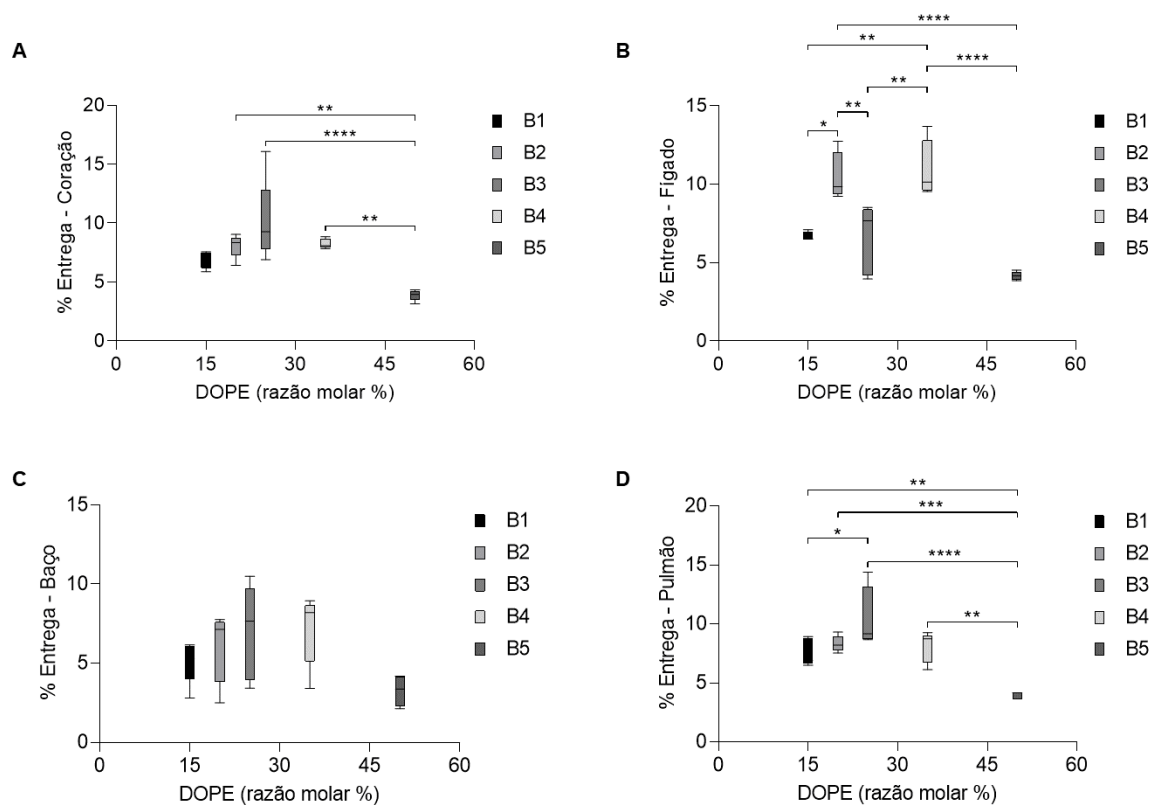
#### 4.7. Relação entre variação do lipídio auxiliar DOPE e a entrega de b-DNA pela via IV

Ao observar a Biblioteca A 1-5, nota-se que a maior entrega de b-DNA para todos os órgãos de interesse em estudo se dá pela LNP A4 (35% de DOPE e 27.5% de colesterol) (Figura 20). A menor entrega de b-DNA para o coração, baço e pulmão se deu com a LNP A2 (20% de DOPE e 42.5% de colesterol) (Figura 20 A, C e D) e para o fígado se deu com a LNP A1 (15% de DOPE e 47.5% de colesterol) (Figura 20 B e C). Nesse contexto, foi possível observar um máximo de entrega de b-DNA na razão molar de 35% de DOPE, sendo que essa entrega é reduzida em razões molares inferiores e superiores à 35% desse lipídio auxiliar.



**Figura 20: Relação entre variação do lipídio auxiliar DOPE nas LNPs da Biblioteca A 1-5 e a entrega de b-DNA pela via IV.** \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  por teste *one-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Comparação Múltipla de Tukey.

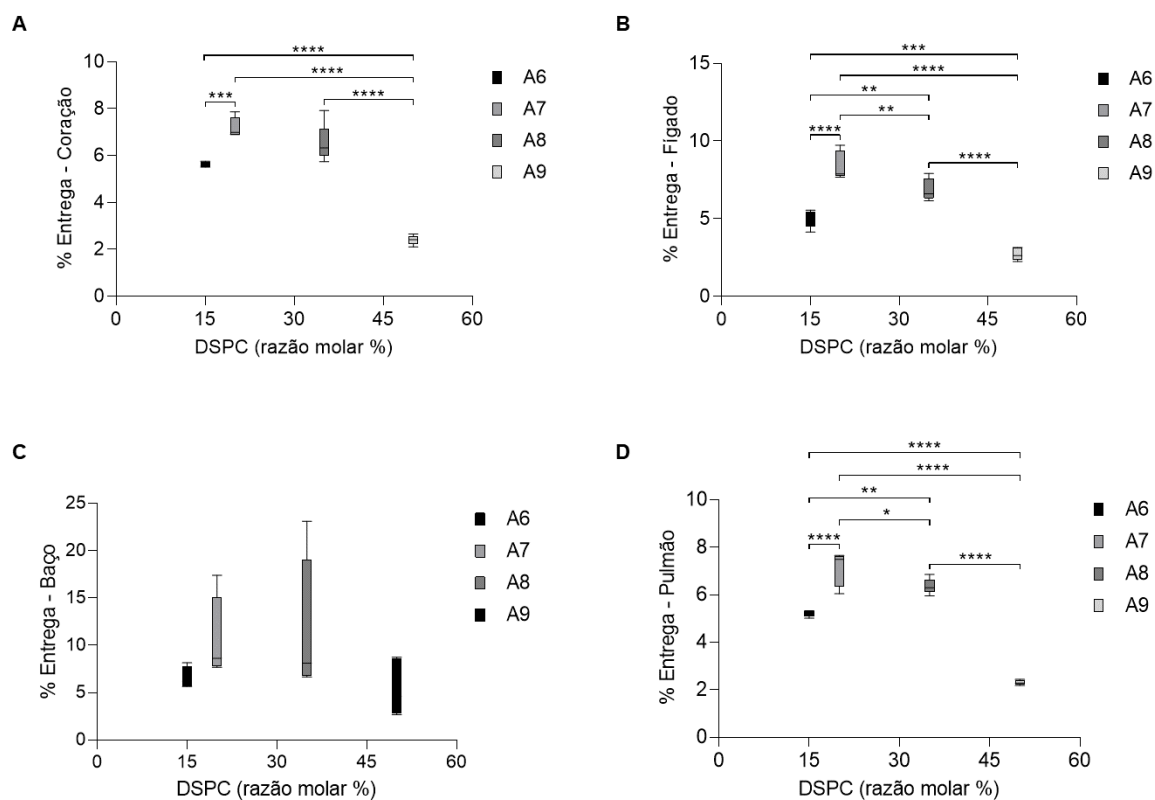
Já ao correlacionar as LNPs da Biblioteca B 1-5, a maior entrega de b-DNA para o coração e pulmão foi exibida pela LNP B3 (25% de DOPE e 37.5% de colesterol) (Figura 21 A e D) e para o fígado e o baço foi exibida pela LNP B4 (35% de DOPE e 27.5% de colesterol) (Figura 21 B e C). A menor entrega de b-DNA foi apresentada pela LNP B5 (50% de DOPE e 12.5% de colesterol) para todos os quatro órgãos analisados (Figura 21 A-D). Os órgãos como coração, baço e pulmão exibiram o mesmo perfil quando se analisa o aumento do teor de DOPE, aumenta de acordo com o aumento do teor de DOPE até à LNP de máxima entrega de b-DNA em cada órgão, após o percentual de entrega começa então a diminuir (Figura 21 A, C e D).



**Figura 21: Relação entre variação do lipídio auxiliar DOPE nas LNPs da Biblioteca B 1-5 e a entrega de b-DNA pela via IV.** \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  por teste *one-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Comparação Múltipla de Tukey.

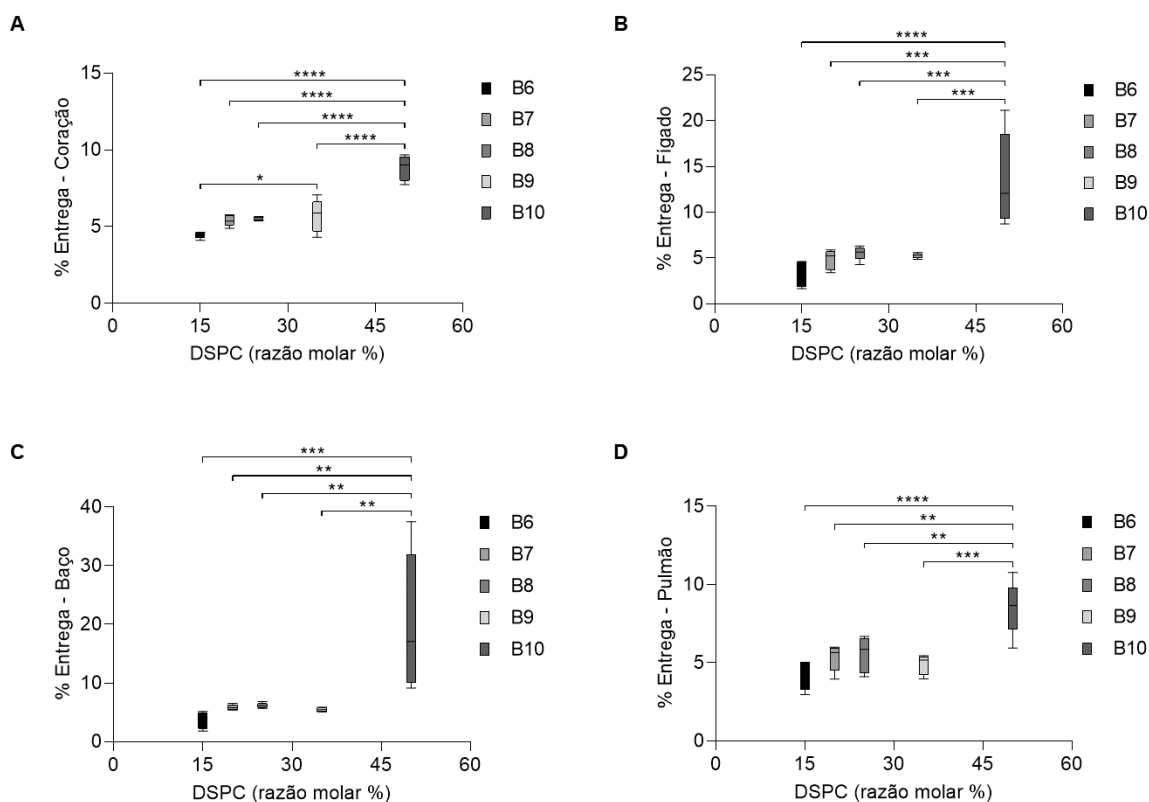
#### 4.8. Relação entre variação do lipídio auxiliar DSPC e a entrega de b-DNA pela via IV

Ao correlacionar as LNPs da Biblioteca A 6-9, o aumento do teor de DSPC na LNP também aumentou o percentual de entrega de b-DNA. A maior entrega de b-DNA para o coração, fígado e pulmão foi dada pela LNP A7 (20% de DSPC e 42.5% de colesterol) (Figura 22 A, B e D) e pela LNP A8 (35% de DSPC e 27.5% de colesterol) para o baço (Figura 22 C). Após o pico máximo apresentado pela LNP de maior entrega de b-DNA de cada órgão, o percentual da entrega de b-DNA diminuiu. A menor entrega de b-DNA foi exibida pela LNP A9 (50% de DSPC e 12.5% de colesterol) para todos os quatro órgãos analisados (Figura 22).



**Figura 22: Relação entre variação do lipídio auxiliar DSPC nas LNPs da Biblioteca A 6-9 e a entrega de b-DNA pela via IV.** \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  por teste *one-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Comparação Múltipla de Tukey.

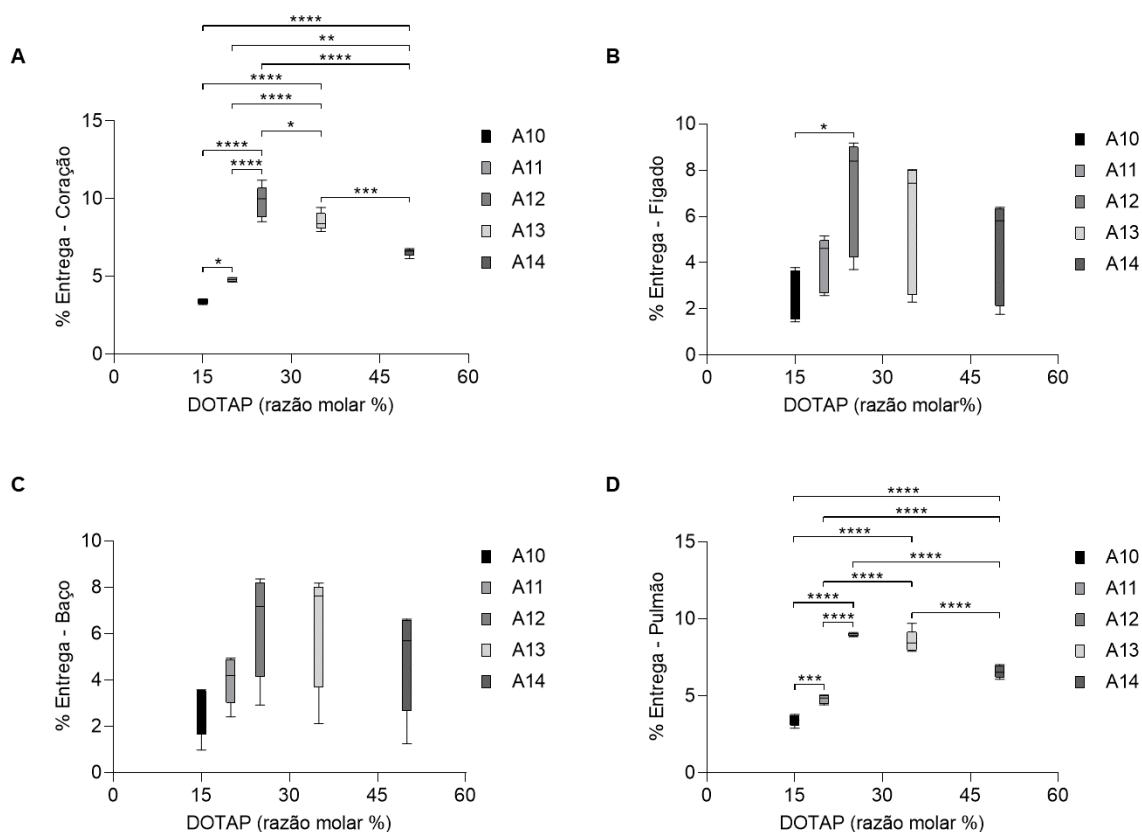
Já as LNPs da Biblioteca B 6-10 exibem um perfil diferente do apresentado pelas LNPs da Biblioteca A 6-9. Com o aumento do teor de DSPC nas LNPs da Biblioteca B 6-10, observa-se um aumento considerado quase linear em relação a entrega de b-DNA, ou seja, aumentando o teor de DSPC aumenta a entrega de b-DNA, sendo a LNP com o maior teor B10 (50% de DSPC e 12.5% de colesterol) a que exibe a maior entrega de b-DNA, e a com menor teor B6 (15% de DSPC e 47.5% de colesterol) a que exibe menor entrega de b-DNA para todos os órgãos analisados (Figura 23 A-D).



**Figura 23: Relação entre variação do lipídio auxiliar DSPC nas LNPs da Biblioteca B 6-10 e a entrega de b-DNA pela via IV. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  por teste *one-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Comparação Múltipla de Tukey.**

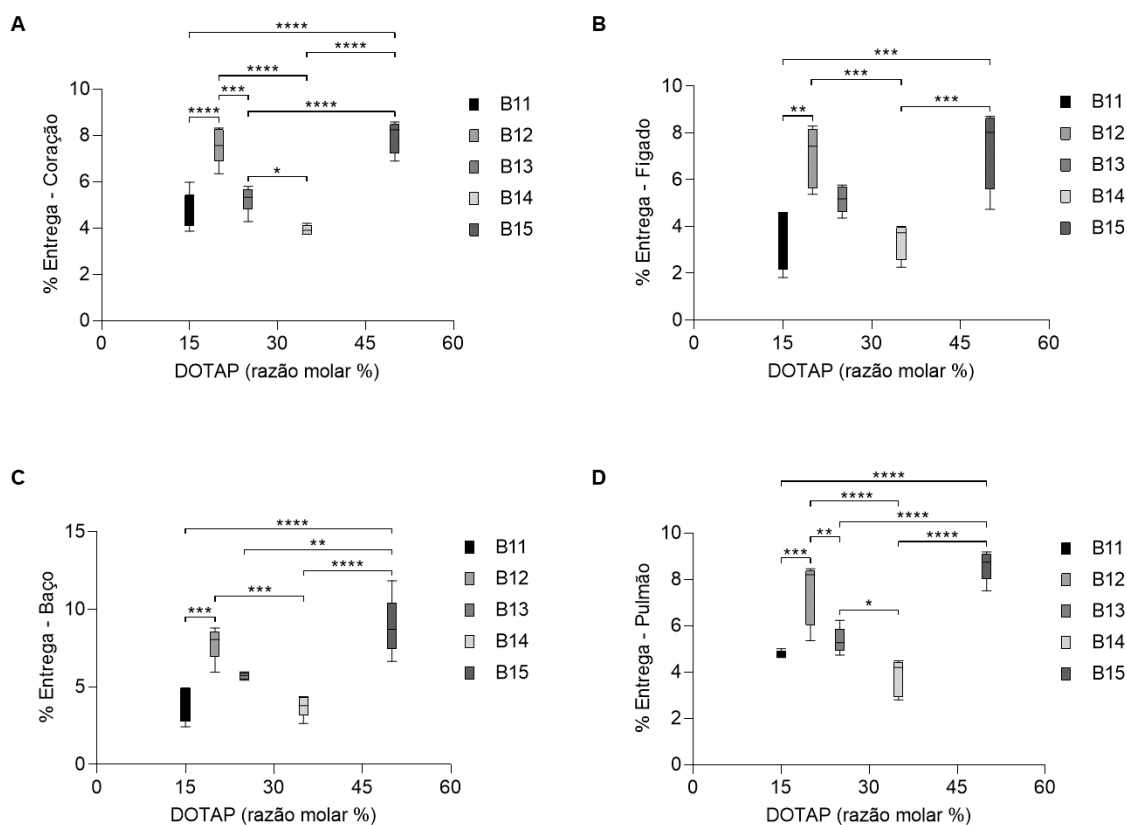
#### 4.9. Relação entre a variação do lipídio auxiliar DOTAP e a entrega de b-DNA pela via IV

Ao avaliar a Biblioteca A 10-14, percebe-se que a LNP A12 (25% de DOTAP e 37.5% de colesterol) apresentou a maior entrega de b-DNA em todos os quatro órgãos analisados (Figura 24 A-D). A menor entrega de b-DNA foi exposta pela LNP A10 (15% de DOTAP e 47.5% de colesterol) para todos os quatro órgãos analisados (Figura 24 A-D). Nesse contexto, foi possível observar um máximo de entrega de b-DNA na razão molar de 25% de DOTAP, sendo que essa entrega é reduzida em razões molares inferiores e superiores à 25% desse lipídio auxiliar. (Figura 24 A-D).



**Figura 24: Relação entre variação do lipídio auxiliar DOTAP nas LNPs da Biblioteca A 10-14 e a entrega de b-DNA pela via IV.** \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  por teste *one-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Comparação Múltipla de Tukey.

Ao correlacionar as LNPs da Biblioteca B 11-15, a maior entrega de b-DNA para todos os órgãos analisados, foi apresentada por dois picos com valores bem próximos sendo o primeiro pela LNP B15 (50% de DOTAP e 12.5% de colesterol) e o segundo pela LNP B12 (20% de DOTAP e 42.5% de colesterol) (Figura 25 A-D). A menor entrega de b-DNA foi exibida pela LNP B14 (35% de DOTAP e 27,5% de colesterol) para todos os quatro órgãos analisados (Figura 25). Nesse contexto, observa-se que com o aumento do percentual molar DOTAP nas LNPs tivemos entregas distintas, com pequenas variações, o que não permitiu estabelecer uma relação evidente do aumento do percentual molar desse lipídio auxiliar com a entrega de b-DNA (Figura 25).



#### 4.10. Transfecção *in vitro* de diferentes tipos celulares pela melhor LNP

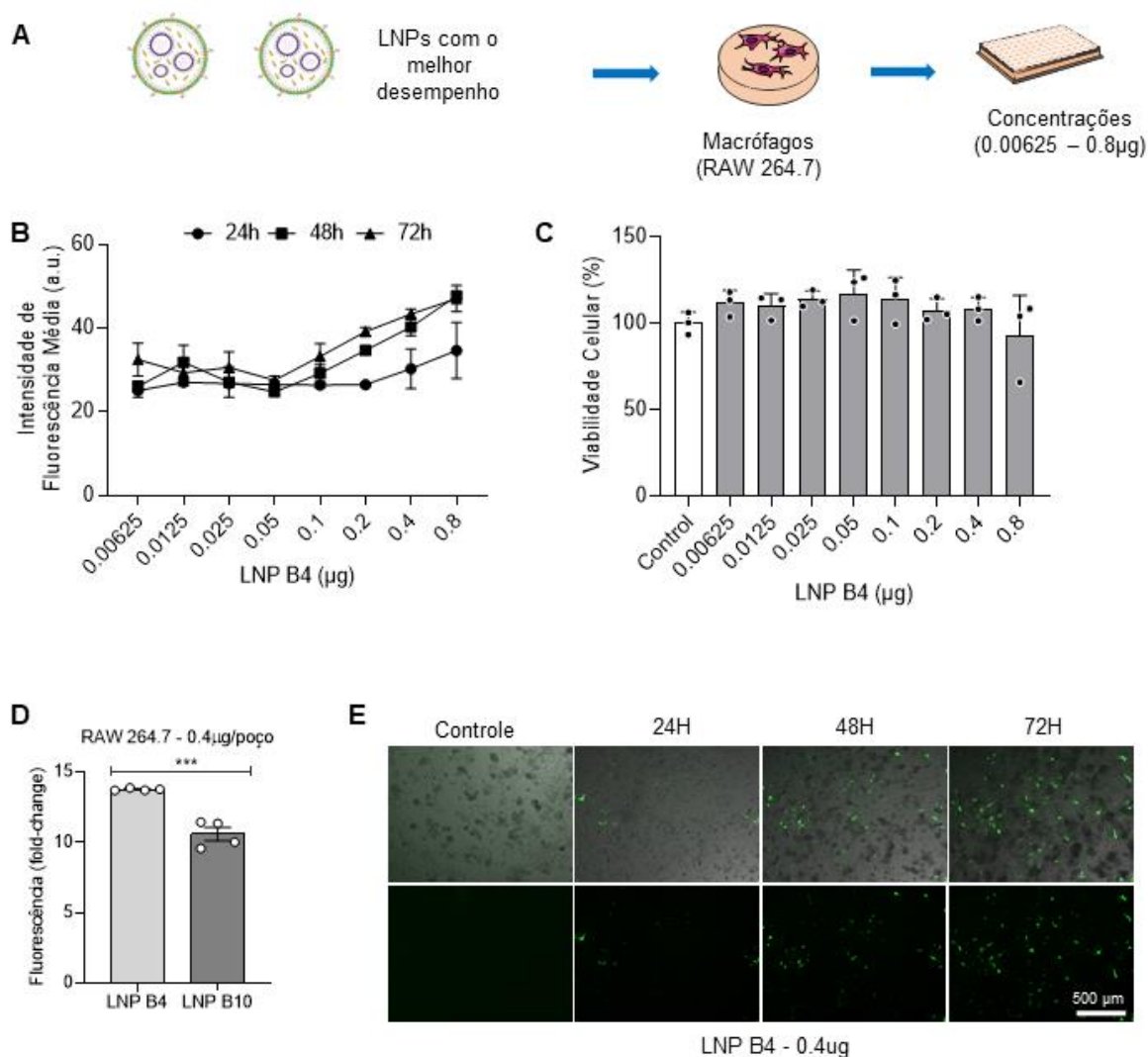
Com o objetivo inicial de selecionar formulações para desenvolvimento de vacinas e terapias, prosseguimos com as LNPs da Biblioteca “B” com razão de lipídio ionizável:b-DNA de 10:1 para os experimentos *in vitro*. Selecionamos duas LNPs com entrega aumentada de b-DNA tanto pela via IM como pela via IV, para prosseguir com os ensaios de transfecção *in vitro* em diferentes tipos celulares (Figuras 10 e 13). De acordo com os resultados da entrega (Figuras 10 e 13), as LNPs B4 e B10 apresentaram uma eficiente entrega de b-DNA para os órgãos alvo de interesse.

Para validar a plataforma de triagem de LNP encapsulando b-DNA, analisamos a eficiência de transfecção das formulações B4 e B10 em diferentes linhagens celulares: RAW 264.7 (macrófagos), L929 (fibroblastos), HepG2 (células hepáticas) e bEND.3 (células endoteliais) (Figura 26-29).

Para determinar a melhor concentração com a maior eficiência de transfecção e menor toxicidade em diferentes tipos celulares, complexamos a LNP B4 com DNA

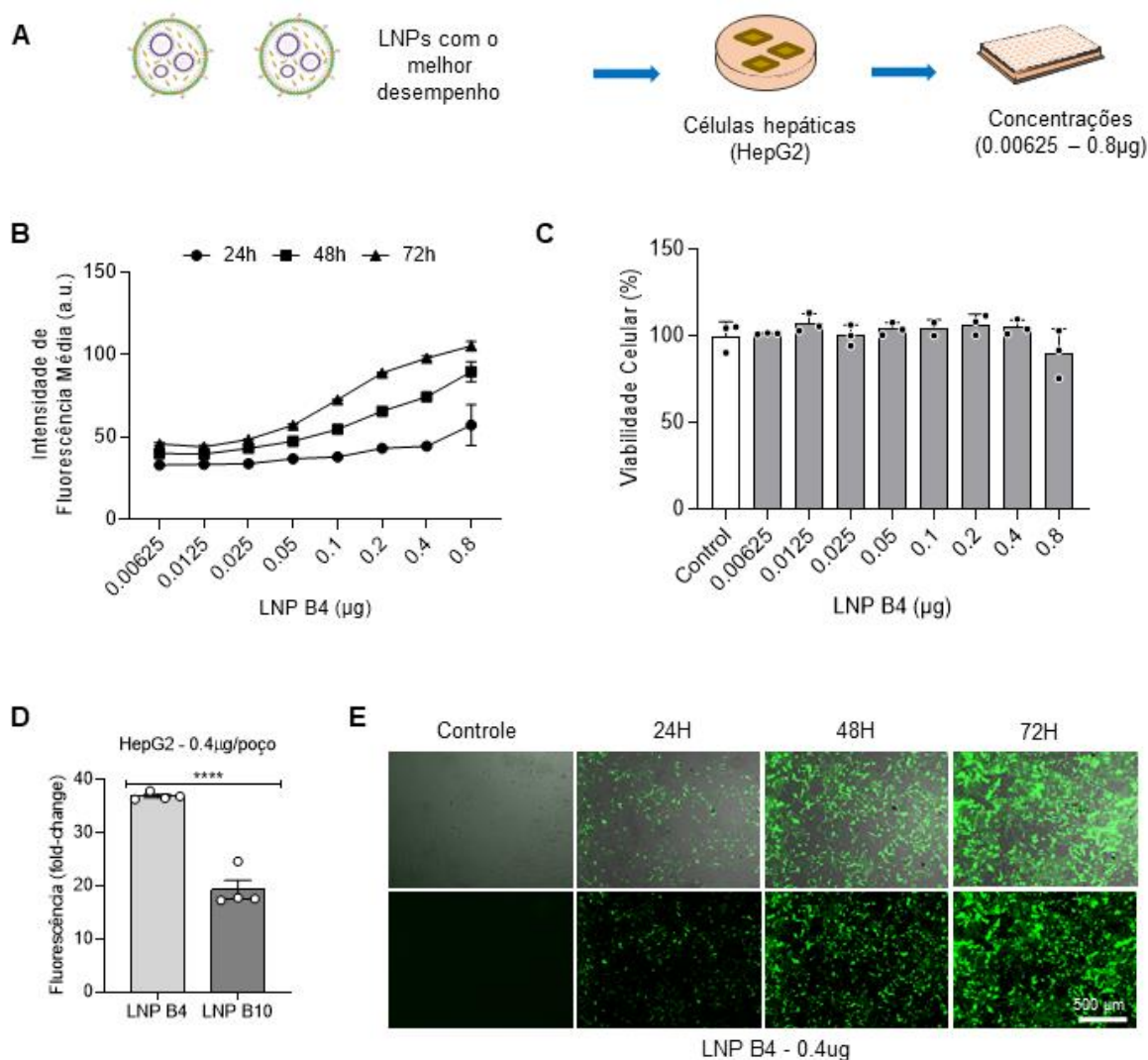
que codifica para GFP. Em seguida, os quatro tipos celulares de interesse (RAW 264.7, L929, HepG2 e bEnd.3) foram tratados com LNP B4 em concentrações variando de 0.00625 - 0.8  $\mu\text{g}$ . A expressão de GFP foi avaliada após 24, 48 e 72h por aquisição de imagens usando Cytation 5 Cell Imaging, e após 72h realizou-se também a leitura da viabilidade celular usando também o Cytation 5 Cell Imaging.

O máximo de transfecção nas linhagens celulares RAW 264.7 (Figura 26) e HepG2 (Figura 27) foi alcançado com a concentração de 0.4  $\mu\text{g}$  que resultou em uma indução de fluorescência 5.3 e 5.7, respectivamente, vezes maior em comparação ao controle, além de reduzida citotoxicidade.



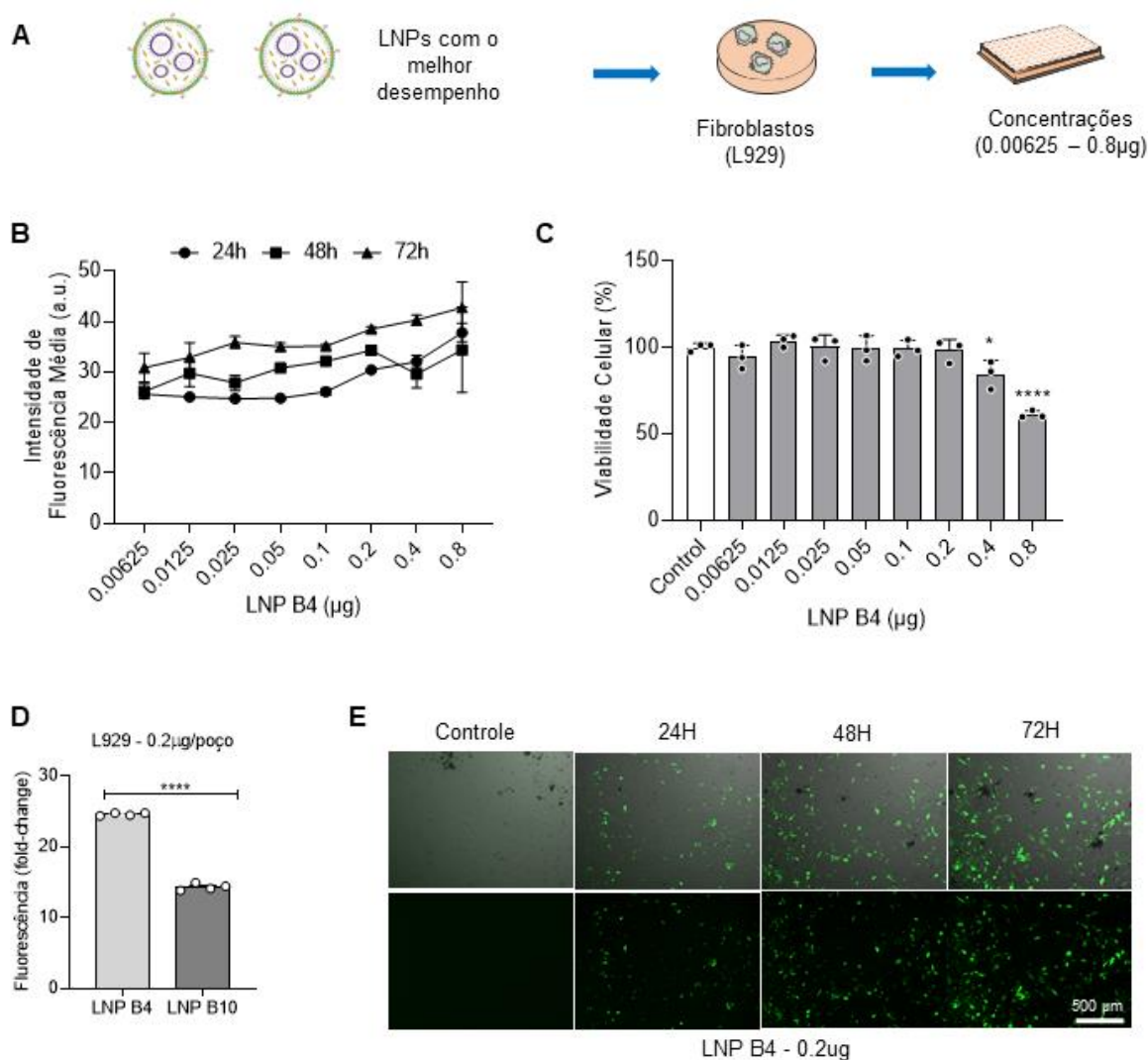
**Figura 26: Triagem *in vitro*, em macrófagos (RAW 264.7), das LNPs com melhor desempenho identificada por sua eficiência de transfecção. (A)** Esquema das duas LNPs com melhor desempenho (B4 e B10), complexada com DNA codificador para GFP para triagem *in vitro* da eficiência de transfecção em macrófagos (RAW 264.7). **(B)** Quantificação da expressão de GFP induzida por diferentes concentrações de pDNA encapsulados na formulação B4. **(C)** Viabilidade celular de macrófagos (RAW 264.7) avaliada 72h após tratamento com a LNP B4 em diferentes concentrações. **(D)** Comparação da eficiência de transfecção entre as formulações B4 e B10 em macrófagos (RAW

264.7). **(E)** Fotomicrografias representativas de fluorescência GFP (inferior) e sobrepostas em campo claro (superior) após o tratamento de LNP B4 em macrófagos (RAW 264.7). Os dados foram plotados como média  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0.001$  por teste *one-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Comparação Múltipla de Dunnett para GFP de diferentes concentrações de pDNA em comparação com o controle.



**Figura 27: Triagem *in vitro*, em células hepáticas (HepG2), das LNPs com melhor desempenho identificada por sua eficiência de transfecção. (A)** Esquema das duas LNPs com melhor desempenho (B4 e B10), complexada com DNA codificador para GFP para triagem *in vitro* da eficiência de transfecção em células hepáticas (HepG2). **(B)** Quantificação da expressão de GFP induzida por diferentes concentrações de pDNA encapsulados na formulação B4. **(C)** Viabilidade celular de células hepáticas (HepG2) avaliada 72h após tratamento com a LNP B4 em diferentes concentrações. **(D)** Comparação da eficiência de transfecção entre as formulações B4 e B10 em células hepáticas (HepG2). **(E)** Fotomicrografias representativas de fluorescência GFP (inferior) e sobrepostas em campo claro (superior) após o tratamento de LNP B4 em células hepáticas (HepG2). Os dados foram plotados como média  $\pm$  SEM. \*\*\*\* $p < 0.0001$  por teste *one-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Comparação Múltipla de Dunnett para GFP de diferentes concentrações de pDNA em comparação com o controle.

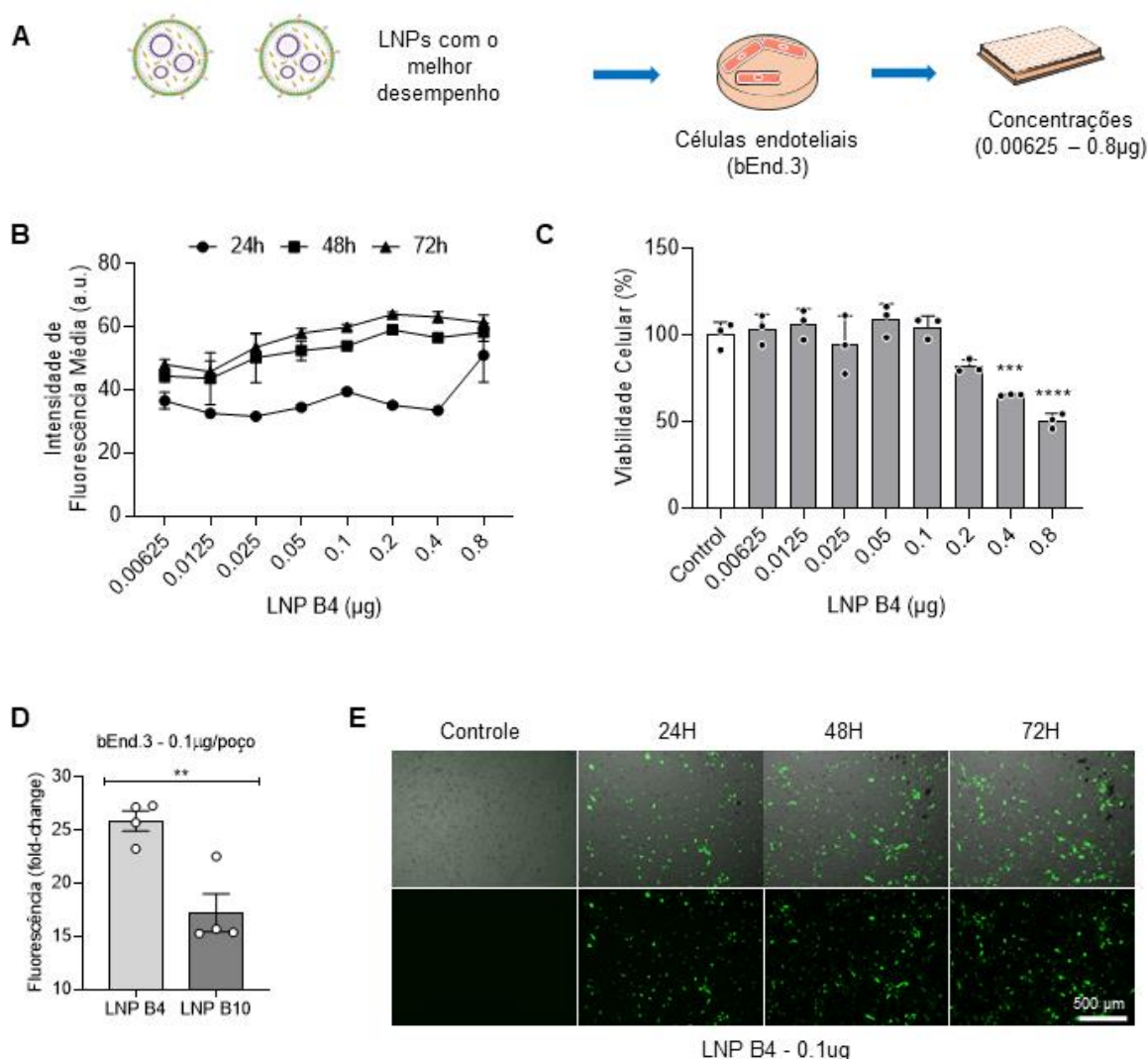
Já para a linhagem celular L929 o máximo de eficiência de transfecção foi alcançado na concentração de 0.2 µg com uma indução de fluorescência de 7.8 vezes maior e reduzida citotoxicidade em relação ao controle (Figura 28).



**Figura 28: Triagem *in vitro*, em fibroblastos (L929), das LNPs com melhor desempenho identificada por sua eficiência de transfecção. (A)** Esquema das duas LNPs com melhor desempenho (B4 e B10), complexada com DNA codificador para GFP para triagem *in vitro* da eficiência de transfecção em fibroblastos (L929). **(B)** Quantificação da expressão de GFP induzida por diferentes concentrações de pDNA encapsulados na formulação B4. **(C)** Viabilidade celular de fibroblastos (L929) avaliada 72h após tratamento com a LNP B4 em diferentes concentrações. **(D)** Comparação da eficiência de transfecção entre as formulações B4 e B10 em fibroblastos (L929). **(E)** Fotomicrografias representativas de fluorescência GFP (inferior) e sobrepostas em campo claro (superior) após o tratamento de LNP B4 em fibroblastos (L929). Os dados foram plotados como média ± SEM. \*p<0.05, \*\*\*\*p<0.0001 por teste *one-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Comparação Múltipla de Dunnett para GFP de diferentes concentrações de pDNA em comparação com o controle.

Em células endoteliais (bEnd.3) o máximo de eficiência de transfecção foi alcançado na concentração de 0.1 µg com indução de fluorescência 6.9 vezes maior e reduzida citotoxicidade em comparação ao controle (Figura 29). Juntos, os resultados mostram que para cada linhagem celular foi encontrada uma concentração diferente para alcançar o máximo de transfecção com baixa citotoxicidade. Após definirmos as concentrações ideais para cada linhagem celular, realizamos uma

comparação entre as formulações de LNPs com o melhor desempenho na entrega de b-DNA (LNP B4 e B10). Apesar das LNPs B4 e B10 apresentarem significativa transfecção nas quatro linhagens celulares de interesse (RAW 264.7, HepG2, L929 e bEnd.3), a LNP B4 induziu uma fluorescência significativamente maior que a apresentada pela LNP B10 (Figuras 26 D, 27 D, 28 D e 29 D), indicando a formulação B4 como uma LNP promissora para possíveis estudos posteriores envolvendo como desenvolvimento de vacinas e terapias.



**Figura 29: Triagem *in vitro*, em células endoteliais (bEnd.3), das LNPs com melhor desempenho identificada por sua eficiência de transfecção. (A)** Esquema das duas LNPs com melhor desempenho (B4 e B10), complexada com DNA codificador para GFP para triagem *in vitro* da eficiência de transfecção em células endoteliais (bEnd.3). **(B)** Quantificação da expressão de GFP induzida por diferentes concentrações de pDNA encapsulados na formulação B4. **(C)** Viabilidade celular de células endoteliais (bEnd.3) avaliada 72h após tratamento com a LNP B4 em diferentes concentrações. **(D)** Comparação da eficiência de transfecção entre as formulações B4 e B10 em células endoteliais (bEnd.3). **(E)** Fotomicrografias representativas de fluorescência GFP (inferior) e sobrepostas em campo claro (superior) após o tratamento de LNP B4 em células endoteliais (bEnd.3). Os dados foram plotados como média  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  por teste *one-way* ANOVA seguida pelo teste

*post hoc* de Comparação Múltipla de Dunnett para GFP de diferentes concentrações de pDNA em comparação com o controle.

## 5. DISCUSSÃO

A terapia genética está se tornando cada vez mais importante por oferecer um grande potencial para o tratamento de uma ampla gama de doenças. Isso pode ser alcançado através de diversas técnicas, incluindo o silenciamento de genes, a indução da expressão de proteínas com fins terapêuticos e o uso de ferramentas de edição genética. (CULLIS; HOPE, 2017). Entretanto, a entrega eficaz dos ácidos nucleicos ao órgão alvo ainda é um fator limitante que impede a sua aplicação em larga escala. Existem várias técnicas para entregar material genético às células-alvo, utilizando tanto vetores virais como vetores não virais. O encapsulamento de ácidos nucleicos em LNPs é uma estratégia usando vetores não virais muito promissora para otimização da entrega. Isso se deve ao fato de que as LNPs conseguem superar várias barreiras biológicas extra e intracelulares. Nesse sentido, as LNPs impedem ou reduzem interações inespecíficas e degradação por endonucleases, proporcionando assim uma maior circulação e evitando a depuração renal (SUK et al., 2016). Além disso, as LNPs facilitam a entrada dos ácidos nucleicos nas células via endocitose, permitindo a liberação eficiente do mesmo para a maquinaria celular (KIM et al., 2021). Dessa forma, o uso de LNPs tem se mostrado como uma forma eficiente e segura para entrega de material genético em comparação com outras técnicas disponíveis atualmente (GUIMARAES et al., 2019; SCALZO et al., 2022). Diversas formulações de LNPs e poliméricas são formuladas e caracterizadas segundo sua estrutura físico-química, sua transfecção celular, e seus ensaios de viabilidade celular são realizados com o fim último de se encontrar a melhor formulação *in vitro* para uma entrega de ácido nucleico. Em contrapartida, os ensaios *in vitro* são limitados em sua capacidade de replicar de maneira precisa todas as barreiras biológicas encontradas em um ambiente *in vivo*. Dentre essas barreiras, estão incluídas estruturas anatômicas complexas, células circulantes, formação da proteína corona das LNPs e as forças fisiológicas (GUIMARAES et al., 2019). Todavia, a realização de uma triagem *in vivo* envolvendo uma grande quantidade de formulações é um processo desafiador, já que exige o uso de um grande número de animais e um custo elevado.

Assim, com o objetivo de simplificar a triagem de várias LNPs *in vivo* em grande escala surgiram novas abordagens, como o uso de código de barras de ácidos nucleicos (YAARI et al., 2016). Essa técnica auxilia na investigação da relação entre a estrutura e biodistribuição de LNPs, especialmente em relação aos órgãos-alvo.

Para aplicar essa estratégia, utilizamos código de barras de DNA associado à variação dos lipídios auxiliares, que são fatores cruciais que influenciam na entrega do DNA ao órgão alvo. Neste trabalho, desenvolvemos uma biblioteca com 29 formulações de LNPs distintas que foram administradas em uma única dose pelas vias IV ou IM. Para cada via foram utilizados 5 animais por grupo. Neste estudo foi possível investigar as relações existentes entre a estrutura e a biodistribuição das LNPs visando a identificação de formulações para uma entrega segura e eficaz de ácidos nucleicos em órgãos-alvo como fígado, baço, pulmão e coração, que podem contribuir também para a redução de possíveis efeitos de *off-target*. Além disso, estes resultados poderão ser aplicados em pesquisas futuras para desenvolvimento de vacinas e terapias genéticas utilizando as LNPs otimizadas.

Em relação às características físico-químicas das LNPs, o PZ das LNPs da Biblioteca “A” com razão de lipídio ionizável:b-DNA de 1:1 foi mais negativo do que as LNPs da biblioteca “B”. Isso se deve ao fato de que o DNA possui uma carga negativa e a redução da razão de lipídio ionizável:b-DNA levou ao aumento da carga residual negativa das LNPs da Biblioteca “A” contendo os lipídios auxiliares DOPE e DSPC (Tabela S4). O mesmo não foi observado para as LNPs com lipídio auxiliar DOTAP uma vez que esse lipídio é catiônico. Esses resultados são consistentes com estudos anteriores que demonstraram que uma diminuição na razão de lipídio ionizável:ácido nucleico leva a LNPs maiores e com um PZ mais negativo (CARRASCO et al., 2021; EYGERIS et al., 2021).

As LNPs da Biblioteca A (10-14) e da Biblioteca B (11-15) contendo o lipídio auxiliar DOTAP apresentaram, em sua maioria, um menor tamanho, quando comparada com as LNPs contendo DOPE e DPSC em sua composição, e PDI variando entre  $0.14 \pm 0.015$  e  $0.224 \pm 0.006$  para Biblioteca A 10-14, e entre  $0.2 \pm 0.002$  e  $0,404 \pm 0.017$  para Biblioteca B 11-15. O PZ das LNPs da Biblioteca A 10-14 foram mais negativos que os da Biblioteca B 11-15, corroborando com estudos existentes que demonstram PZ mais negativo de LNPs ao diminuir a razão lipídio ionizável:ácido nucleico (CARRASCO et al., 2021).

Estudos revelam que a associação de diversas formulações de LNPs específicas contendo sequências de código de barras de DNA únicos garantem uma mensuração eficaz da biodistribuição de muitas LNPs em um único animal (DAHLMAN et al., 2017, GUIMARAES et al., 2019).

Para a triagem *in vivo* desenvolvida nesta pesquisa utilizamos uma dose de 0.5 µg de b-DNA de cada uma das 29 LNPs, quantidade essa considerada na literatura, conveniente para gerar uma resposta adequada pelo sequenciamento profundo de alto rendimento. Estudos apontam as doses mínimas que são necessárias para à obtenção de uma leitura eficaz da biodistribuição do código de barras no órgão alvo detectadas através do sequenciamento profundo de alto rendimento (DAHLMAN et al., 2017, GUIMARAES et al., 2019). O volume total de LNPs administrado no animal foi de 51.6 µL, considerado adaptável para a administração pelas vias IV e IM. A quantificação da entrega de b-DNA aos órgãos de interesse, foi realizada após 4 horas da administração do agrupamento das 29 LNPs através do sequenciamento profundo de alto rendimento; A definição do tempo foi baseada em estudos prévios (DAHLMAN et al., 2017, GUIMARAES et al., 2019).

A forma molecular do lipídio auxiliar utilizado, segundo estudos, pode influenciar de forma significativa na entrega da LNP ao órgão alvo de interesse. Uma forma molecular em cone é mais desejável do que uma cilíndrica, por possuírem um grupo de cabeça pequena e uma seção transversal molecular mais ampla na região da cauda faz com que se tornem incompatíveis com a bicamada lipídica, gerando assim uma desestabilização na membrana endossomal o que permite que o ácido nucléico seja liberado para o citosol (CARRASCO et al., 2021; HOU et al., 2021). Nossos resultados corroboram esses estudos, uma vez que as LNPs produzidas com DOPE em sua composição, lipídio auxiliar que possui forma molecular de cone, apresentaram, em sua maioria, uma entrega maior do b-DNA quando comparada com as outras LNPs do estudo (exceto a LNP B10), tanto para as vias de administração IM quanto para a via IV (Figuras 9, 10, 12 e 13).

Quando comparamos as Bibliotecas "A" e "B" das LNPs contendo DOTAP em sua composição com as demais LNPs (contendo DOPE e DSPC) observa-se que elas possuem uma entrega menor para os órgãos alvo de interesse. Tal fato pode estar relacionado ao DOTAP ser um lipídio catiônico, o que reduz sua tolerabilidade ou tempo de circulação *in vivo*. Assim, o resultado esperado seria uma baixa eficiência na entrega do ácido nucléico ao alvo, devido a sua capacidade restrita de liberar o ácido nucléico no citosol ou no núcleo da célula (ALGARNI et al., 2022).

Ao analisar a biodistribuição das LNPs "A" e "B" que possuem em sua composição os lipídios auxiliares DOPE, DSPC e DOTAP, tanto as que foram administradas pela via IM quanto as da via IV, nota-se que as LNPs da Biblioteca "A"

exibiram uma maior entrega de b-DNA para todos os órgãos em estudo (coração, fígado, baço e pulmão) (Figuras 9, 10, 12 e 13) do que as LNPs da Biblioteca “B”. Isso pode estar relacionado com o PZ das LNPs da Biblioteca “A”, pois eles exibiram um valor mais negativo quando comparados com o das LNPs da Biblioteca “B”, e esse PZ mais negativo poderia causar um escape endossomal mais eficaz, resultando em uma melhor entrega aos órgãos alvo. Corroborando com nossos resultados descrito anteriormente, um estudo recente avaliou as taxas de transfecção em células HEK293 de uma LNP formulada com um lipídio ionizável (KC2) encapsulando mRNA, nele os pesquisadores relatam que ao reduzir a razão lipídio ionizável:ácido nucléico as LNPs que continham a menor razão apresentavam maior taxa de transfecção, devido a uma possível relação onde essas LNPs possuíam um PZ mais negativo (CARRASCO et al., 2021). Por esse motivo, os autores suspeitam que aconteça uma maior protonação das LNPs no endossomo, o que resultaria em um escape endossomal mais eficaz e desse modo teriam uma maior transfecção (CARRASCO et al., 2021).

Analisando o mapa de calor das LNPs da Biblioteca “B” e compostas pelo lipídio auxiliar DSPC nota-se tanto para via IM quanto para via IV que a LNP B10 apresentou maior percentual de entrega de b-DNA principalmente para o baço (Figura 10 e 13). Esse fato pode estar relacionado com o fato dessa LNP apresentar um valor de PZ mais próximo da neutralidade, o que implicaria em uma interação mais fraca com as proteínas plasmáticas, como a apolipoproteína E (ApoE), resultando em uma biodistribuição maior para o baço (ZHANG et al., 2021).

Com o propósito de se estudar a via IM para descoberta de possíveis formulações de LNPs para desenvolvimento de vacinas, identificamos as formulações B2, B4 e B10 assim como algumas formulações da Biblioteca A com entrega de b-DNA aumentada para o baço e pulmão (Figuras 11 e 13). Entretanto, como foram relatados casos raros de miocardite e pericardite após a imunização com vacinas de mRNA baseadas nas LNPs utilizadas pela Moderna e Pfizer-BioNTech, a formulação B2 assim como as LNPs da Biblioteca “A” foram desconsideradas, por apresentarem entrega aumentada de b-DNA para coração e fígado (Figuras 11 e 13) (HUSBY; KOBER, 2022; VERMA; LAVINE; LIN, 2021). Conseqüentemente, selecionamos as LNPs com melhor desempenho de entrega de b-DNA para baço e pulmão, com entregas de b-DNA minimizadas para o coração e fígado, garantindo assim descartar possíveis preocupações de especificidade e segurança associadas às vacinas de

LNPs baseadas em mRNA. Devido aos fatos supracitados, as formulações selecionadas foram B4 e B10 da Biblioteca “B”.

Ao analisarmos as formulações administradas pela via IV observa-se uma entrega significativa das LNPs nas duas Bibliotecas “A” e “B” para todos os quatro órgãos em estudos, o que viabiliza o uso de possíveis formulações das LNPs promissoras para o uso em terapias genéticas. Através da análise do sequenciamento profundo de alto rendimento, identificamos as formulações B4 e B10 como sendo promissoras para possível uso em terapias (Figura 12 e 13). Estudos mostram que após a administração pela via IV, as LNPs tendem a se acumular no fígado (HOU et al., 2021), e observamos isso também em nossos resultados tanto *in vitro* (Figura 12 e 13) quanto *in vivo* (Figura 27). Observamos também que as LNPs contendo DOPE em sua composição tiveram uma entrega de b-DNA (Figura 12 e 13) e uma transfecção maior para o fígado (Figura 27), isso pode estar relacionado com o fato de que as LNPs contendo DOPE interagem mais fortemente com a ApoE, proteína essa que tem sido amplamente implicada na depuração e no direcionamento endógeno de LNPs para o fígado (SUZUKI; ISHIHARA, 2016; ZHANG et al., 2021).

Em seguida, testes *in vitro* foram realizados com o intuito de validar a eficácia de transfecção das formulações selecionadas B4 e B10, para possíveis estudos de desenvolvimento de vacinas e terapias. Inicialmente, foi realizado um experimento com a LNP B4 para avaliar a transfecção em quatro tipos celulares diferentes (RAW 264.7, L929, HepG2 e bEnd.3) em diferentes concentrações (0.00625 - 0.8 µg), em que foi possível definir a menor concentração para indução da maior transfecção sem toxicidade para cada tipo celular (Figuras 26 - 29). A menor concentração para alcançar expressão máxima de GFP sem citotoxicidade foi de 0.4 µg em macrófagos e células hepáticas (RAW 264.7 e HepG2, respectivamente), 0.2 µg em fibroblastos (L929) e 0.1 µg em células endoteliais (bEnd.3). Em seguida, comparamos a performance das duas melhores formulações, B4 e B10, nas quatro linhagens celulares na melhor concentração definida acima. Vale ressaltar que a escolha dos tipos celulares foi baseada tanto na via IM como via IV, no sentido de avaliar a eficácia de transfecção e servir como base para o desenvolvimento racional de vacinas e terapias, sendo:

- RAW 264.7: macrófagos usados como células apresentadoras de antígenos relevantes tanto pela via IM como IV.

- L929: fibroblastos, células abundantes na musculatura e relevantes para a via IM.
- HepG2: células epiteliais do fígado, órgão de acúmulo elevado de LNPs após administração IV.
- bEnd.3: células endoteliais, representando os vasos sanguíneos relevantes tanto para a via IM como IV.

Os resultados dos experimentos *in vitro* mostraram uma transfecção significativa em todos os tipos celulares testados, validando assim a eficácia das nossas LNPs. A LNP B4 induziu uma maior expressão de GFP em todas as linhagens celulares testadas quando comparada à LNP B10, indicando que a LNP B4 preparada com o lipídio auxiliar DOPE foi a que apresentou os melhores resultados em comparação com B10 formulada com o lipídio auxiliar DSPC (Figuras 26 - 29D).

Em suma, os achados deste trabalho, permitiram identificar LNPs para entrega segura e eficaz de DNA através das vias IM e IV em órgãos alvo. Os resultados mostraram ainda que a escolha do lipídio auxiliar, a carga e o tamanho da LNP influenciam no seu tropismo para cada órgão alvo.

## 6. CONCLUSÃO

Com os dados expostos neste trabalho, pode-se concluir que:

- O uso de LNPs encapsulando o b-DNA, permitiu que obtivéssemos sucesso na triagem das LNPs, garantindo a avaliação da entrega de DNA ao órgão alvo, utilizando poucos animais e reproduzindo as barreiras biológicas *in vivo*.
- A criação de uma plataforma de LNPs encapsulando o b-DNA permitiu que uma ampla gama de LNPs fossem testadas, e servirá de base para estudos de desenvolvimento de vacinas e terapias.
- Foi possível identificar LNPs promissoras para os órgãos alvo de interesse para as duas vias de administração avaliadas no estudo (via IM e via IV), além de compreender a relação entre a estrutura das LNPs com sua biodistribuição *in vivo*.
- Quando diminuímos a razão do lipídio ionizável:ácido nucléico foram obtidas LNPs com PZ mais negativa, sendo que as LNPs que apresentam PZ com carga mais negativa apresentaram uma melhor entrega aos órgãos alvo de interesse, possivelmente por terem um escape endossomal mais eficaz.
- As LNPs contendo DOPE em sua composição apresentaram melhor entrega aos órgãos alvo, independente da sua razão de lipídio ionizável:b-DNA, possivelmente por apresentarem uma forma molecular de cone, gerando assim uma desestabilização na membrana endossomal permitindo que o ácido nucléico seja liberado para o citosol.
- A LNP B10 contendo DSPC em sua composição, apresentou entrega aumentada de b-DNA principalmente para o baço, podendo estar relacionado com o fato dessa LNP apresentar uma interação mais fraca com as proteínas plasmáticas, como a ApoE, devido ao seu PZ positivo, resultando em uma biodistribuição maior para o baço.
- As LNPs contendo DOTAP em sua composição apresentaram uma menor entrega de b-DNA *in vivo*, quando comparadas às de DOPE e DSPC, podendo esse fato estar relacionado com sua carga permanente positiva que diminui o tempo de circulação *in vivo*.
- Os experimentos *in vitro* revelam uma transfecção aumentada em todos os tipos celulares testados, validando assim a eficácia das nossas LNPs. Além

disso, as LNPs contendo DOPE obtiveram melhor transfecção corroborando com os resultados *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. Moléculas do complexo principal de histocompatibilidade e apresentação do antígeno aos linfócitos T. **Imunologia celular e molecular**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 109-38, nov. 2011.

AKINC, Akin et al. The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. **Nature nanotechnology**, v. 14, n. 12, p. 1084-1087, 4 dez. 2019.

ALGARNI, Azizah et al. In vivo delivery of plasmid DNA by lipid nanoparticles: the influence of ionizable cationic lipids on organ-selective gene expression. **Biomaterials Science**, 20 abr. 2022.

ALI, Moustafa S. et al. Microfluidics for development of lipid nanoparticles: paving the way for nucleic acids to the clinic. **ACS Applied Bio Materials**, 8 set. 2021.

BARBIER, Ann J. et al. The clinical progress of mRNA vaccines and immunotherapies. **Nature biotechnology**, v. 40, n. 6, p. 840-854, 2022.

BRISSE, Morgan et al. Emerging concepts and technologies in vaccine development. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 583077, 2020.

CALLAWAY, Ewen. THE NEXT GENERATION OF CORONAVIRUS VACCINES. **Nature**, v. 614, 2023.

CALLAWAY, Ewen. The race for coronavirus vaccines: a graphical guide. **Nature**, p. 576-577, 30 abr. 2020.

CARRASCO, Manuel J. et al. Ionization and structural properties of mRNA lipid nanoparticles influence expression in intramuscular and intravascular administration. **Communications biology**, v. 4, n. 1, p. 956, 2021.

CHENG, Xinwei; LEE, Robert J. The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 99, p. 129-137, 1 abr. 2016.

CHUNG, Young Hun et al. COVID-19 vaccine frontrunners and their nanotechnology design. **ACS nano**, v. 14, n. 10, p. 12522-12537, 2020.

CULLIS, Pieter R.; HOPE, Michael J. Lipid nanoparticle systems for enabling gene therapies. **Molecular Therapy**, v. 25, n. 7, p. 1467-1475, 13 abr. 2017.

DAHLMAN, James E. et al. Barcoded nanoparticles for high throughput in vivo discovery of targeted therapeutics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 8, p. 2060-2065, 3 jan. 2017.

EYGERIS, Yulia et al. Chemistry of lipid nanoparticles for RNA delivery. **Accounts of Chemical Research**, v. 55, n. 1, p. 2-12, 1 dez. 2021.

FLINGAI, Seleeke et al. Synthetic DNA vaccines: improved vaccine potency by electroporation and co-delivered genetic adjuvants. **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 354, 2013.

GRANOT, Yasmin; PEER, Dan. Delivering the right message: Challenges and opportunities in lipid nanoparticles-mediated modified mRNA therapeutics—An innate immune system standpoint. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, p. 68-77, dez. 2017.

GRODELAND, Gunnveig et al. Antigen targeting to human HLA class II molecules increases efficacy of DNA vaccination. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 9, p. 3575-3585, 1 nov. 2016.

GUIMARAES, P. P. G. et al. Ionizable lipid nanoparticles encapsulating barcoded mRNA for accelerated in vivo delivery screening. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 316, p. 404–417, 28 dez. 2019.

HAN, Xuexiang et al. An ionizable lipid toolbox for RNA delivery. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 13 dez. 2021.

HOU, Xucheng et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. **Nature Reviews Materials**, v. 6, n. 12, p. 1078-1094, 10 ago. 2021.

HUANG, Xiangang et al. Nanotechnology-based strategies against SARS-CoV-2 variants. **Nature Nanotechnology**, v. 17, n. 10, p. 1027-1037, 2022.

HUSBY, Anders; KØBER, Lars. COVID-19 mRNA vaccination and myocarditis or pericarditis. **The Lancet**, v. 399, n. 10342, p. 2168-2169, 2022.

JOHANNES, Ludger; LUCCHINO, Marco. Current challenges in delivery and cytosolic translocation of therapeutic RNAs. **Nucleic acid therapeutics**, v. 28, n. 3, p. 178-193, 1 jun. 2018.

KANASTY, Rosemary et al. Delivery materials for siRNA therapeutics. **Nature materials**, v. 12, n. 11, p. 967-977, 2013.

KAWABATA, K.; TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M. The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 6, p. 825–830, jun. 1995.

KIM, Jeonghwan et al. Self-assembled mRNA vaccines. **Advanced drug delivery reviews**, v. 170, p. 83-112, 2021.

KIM, Y. et al. Mass Production and Size Control of Lipid–Polymer Hybrid Nanoparticles through Controlled Microvortices. **Nano Letters**, v. 12, n. 7, p. 3587–3591, 11 jul. 2012.

KIM, Yeu-Chun; PARK, Jung-Hwan; PRAUSNITZ, Mark R. Microneedles for drug and vaccine delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, n. 14, p. 1547-1568, 2012.

KOWALSKI, P. S. et al. Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. **Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 27, n. 4, p. 710–728, 10 abr. 2019.

KUTZLER, Michele A.; WEINER, David B. DNA vaccines: ready for prime time?. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 10, p. 776-788, 2008.

LEE, Leo Yi Yang; IZZARD, Leonard; HURT, Aeron C. A review of DNA vaccines against influenza. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1568, 9 jul. 2018.

LEE, Si-Hyeong; DANISHMALIK, Sayyed Nilofar; SIN, Jeong-Im. DNA vaccines, electroporation and their applications in cancer treatment. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 11, n. 8, p. 1889-1900, 11 ago. 2015.

LI, Chunfeng et al. Mechanisms of innate and adaptive immunity to the Pfizer-BioNTech BNT162b2 vaccine. **Nature Immunology**, v. 23, n. 4, p. 543-555, 2022.

LIU, M. A. DNA vaccines: a review. **Journal of internal medicine**, v. 253, n. 4, p. 402-410, 21 mar. 2003.

MAEKI, M. et al. Advances in microfluidics for lipid nanoparticles and extracellular vesicles and applications in drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 128, p. 84–100, 15 mar. 2018.

MAEKI, Masatoshi et al. Microfluidic technologies and devices for lipid nanoparticle-based RNA delivery. **Journal of Controlled Release**, abr. 2022.

MASTROBATTISTA, Enrico et al. Artificial viruses: a nanotechnological approach to gene delivery. **Nature reviews Drug discovery**, v. 5, n. 2, p. 115-121, 1 fev.2006.

MUI, Barbara L. et al. Influence of polyethylene glycol lipid desorption rates on pharmacokinetics and pharmacodynamics of siRNA lipid nanoparticles. **Molecular Therapy-Nucleic Acids**, v. 2, p. e139, 17 dez. 2013.

MUKALEL, Alvin J. et al. Nanoparticles for nucleic acid delivery: Applications in cancer immunotherapy. **Cancer letters**, v. 458, p. 102-112, 2019.

PARDI, Norbert et al. mRNA vaccines—a new era in vaccinology. **Nature reviews Drug discovery**, v. 17, n. 4, p. 261-279, 2018.

POLACK, Fernando P. et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. **New England journal of medicine**, v. 383, n. 27, p. 2603-2615, 2020.

POLLARD, Andrew J.; BIJKER, Else M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 2, p. 83-100, 2021.

PRAKASH, Gyan et al. Microfluidic Fabrication of Lipid Nanoparticles for the Delivery of Nucleic Acids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, p. 114197, maio 2022.

PRAUSNITZ, Mark R. et al. Microneedle-based vaccines. **Vaccines for Pandemic Influenza**, p. 369-393, 2009.

RENNICK, Joshua J.; JOHNSTON, Angus PR; PARTON, Robert G. Key principles and methods for studying the endocytosis of biological and nanoparticle therapeutics. **Nature nanotechnology**, v. 16, n. 3, p. 266-276, 12 mar. 2021.

SCALZO, Sérgio et al. Ionizable lipid nanoparticle-mediated delivery of plasmid DNA in cardiomyocytes. **International Journal of Nanomedicine**, p. 2865-2881, 2022.

SHENDURE, Jay; JI, Hanlee. Next-generation DNA sequencing. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1135-1145, 2008.

SHEPHERD, Sarah J.; ISSADORE, David; MITCHELL, Michael J. Microfluidic formulation of nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 274, p. 120826, jul. 2021.

SUK, Jung Soo et al. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 99, p. 28-51, 1 abr. 2016.

SUZUKI, Yuta; ISHIHARA, Hiroshi. Structure, activity and uptake mechanism of siRNA-lipid nanoparticles with an asymmetric ionizable lipid. **International journal of pharmaceuticals**, v. 510, n. 1, p. 350-358, 2016.

TAM, Yuen Yi C.; CHEN, Sam; CULLIS, Pieter R. Advances in lipid nanoparticles for siRNA delivery. **Pharmaceutics**, v. 5, n. 3, p. 498-507, 18 set. 2013.

TATUM, Edward L. Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. **Perspectives in biology and medicine**, v. 10, n. 1, p. 19-32, maio 1966.

TRAVIESO, Tatianna et al. The use of viral vectors in vaccine development. **npj Vaccines**, v. 7, n. 1, p. 75, 2022.

VERMA, Amanda K.; LAVINE, Kory J.; LIN, Chieh-Yu. Myocarditis after Covid-19 mRNA vaccination. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 14, p. 1332-1334, 2021.

WHITEHEAD, Kathryn A. et al. In vitro–in vivo translation of lipid nanoparticles for hepatocellular siRNA delivery. **ACS nano**, v. 6, n. 8, p. 6922-6929, 2012.

WOLFF, Jon A. et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science**, v. 247, n. 4949, p. 1465-1468, 23 mar. 1990.

WONG, Sook-San; WEBBY, Richard J. Traditional and new influenza vaccines. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 3, p. 476-492, 1 jul. 2013.

World Health Organization. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 25 jan. 2023.

WU, Kai et al. Serum neutralizing activity elicited by mRNA-1273 vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 15, p. 1468-1470, 2021.

YAARI, Zvi et al. Theranostic barcoded nanoparticles for personalized cancer medicine. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 13325, 2016.

YIN, H. et al. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews. Genetics*, v. 15, n. 8, p. 541–555, ago. 2014.

ZHANG, Rui et al. Helper lipid structure influences protein adsorption and delivery of lipid nanoparticles to spleen and liver. *Biomaterials science*, v. 9, n. 4, p. 1449-1463, dez. 2021.

ZHANG, Rui; BILLINGSLEY, Margaret M.; MITCHELL, Michael J. Biomaterials for vaccine-based cancer immunotherapy. *Journal of Controlled Release*, v. 292, p. 256-276, 2018.

ZHAO, Yi; HUANG, Leaf. Lipid nanoparticles for gene delivery. *Advances in genetics*, v. 88, p. 13-36, 2014.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A – Figuras suplementares



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

#### **CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo de biodistribuição e avaliação de imunização de uma candidata a vacina de DNA a vacina de DNA baseada em nanopartículas lipídicas ionizáveis para COVID-19", protocolo do CEUA: 177/2020 sob a responsabilidade de Pedro Pires Goulart Guimaraes que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 29/09/2020.

**Figura S1:** Certificado de aprovação do projeto mestrado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

## APÊNDICE B – Tabelas suplementares

Tabela S1: Sequências oligonucleotídicas do b-DNA utilizado nas LNPs

Formulação	b-DNA adicionado	Sequências dos oligonucleotídeos
A1	CCCAAAGACA	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT CCCAAAGACA NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
A2	GCTAAGGTCT	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT GCTAAGGTCT NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
A3	CATTATCGCG	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT CATTATCGCG NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
A4	CAGAGACTGA	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT CAGAGACTGA NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
A5	CAGGTAGGAA	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT CAGGTAGGAA NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
A6	CTCTCTGAAC	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT CTCTCTGAAC NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
A7	TGACATGCAC	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT TGACATGCAC NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
A8	TTCAGCGAAG	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT TTCAGCGAAG NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
A9	CACTAGCCAA	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT CACTAGCCAA NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
A10	CACGCTATCT	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT CACGCTATCT NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
A11	ACAGGCATAC	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT ACAGGCATAC NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
A12	ATCTAGACCG	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT ATCTAGACCG NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
A13	AATCCCCCTT	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT AATCCCCCTT NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
A14	AAGTCCGCTT	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT AAGTCCGCTT NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
B1	TAACGCACCT	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT TAACGCACCT NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
B2	GAGGGTACTT	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT GAGGGTACTT NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
B3	TGTCTCCCAT	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT TGTCTCCCAT NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
B4	GGAGAAACAG	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT GGAGAAACAG NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
B5	ATGATCGTCG	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT ATGATCGTCG NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
B6	TTGCAGCCTT	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT TTGCAGCCTT NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
B7	CGTACAAACG	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT CGTACAAACG NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
B8	ATCCATGAGG	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT ATCCATGAGG NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
B9	TTCCACGATG	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT TTCCACGATG NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
B10	GAATGCTGAC	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT GAATGCTGAC NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T

B11	TCTCGCCTTT	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT TCTCGCCTTT NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
B12	GCTGGGAATT	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT GCTGGGAATT NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
B13	GACACGTTCT	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT GACACGTTCT NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
B14	TTCGCATCTG	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT TTCGCATCTG NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T
B15	CAGATCAGAG	A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT CAGATCAGAG NNNNNNNNNN AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T

**Abreviações:** LNP: nanopartícula lipídica ionizável; b-DNA: código de barras de DNA.

Tabela S2: Composição das LNPs e identificação das bibliotecas

Formulação	Razão lipídio ionizável:b-DNA	Razão Molar %				
		Lipídio ionizável	Lipídio auxiliar	Colesterol	PEG-lipídio	
A1	1:1	35	15	47,5	2,5	BIBLIOTECA A 1-5
A2	1:1	35	20	42,5	2,5	
A3	1:1	35	25	37,5	2,5	
A4	1:1	35	35	27,5	2,5	
A5	1:1	35	50	12,5	2,5	
A6	1:1	35	15	47,5	2,5	BIBLIOTECA A 6-9
A7	1:1	35	20	42,5	2,5	
A8	1:1	35	35	27,5	2,5	
A9	1:1	35	50	12,5	2,5	
A10	1:1	35	15	47,5	2,5	BIBLIOTECA A 10-14
A11	1:1	35	20	42,5	2,5	
A12	1:1	35	25	37,5	2,5	
A13	1:1	35	35	27,5	2,5	
A14	1:1	35	50	12,5	2,5	
B1	10:1	35	15	47,5	2,5	BIBLIOTECA B 1-5
B2	10:1	35	20	42,5	2,5	
B3	10:1	35	25	37,5	2,5	
B4	10:1	35	35	27,5	2,5	
B5	10:1	35	50	12,5	2,5	
B6	10:1	35	15	47,5	2,5	BIBLIOTECA B 6-10
B7	10:1	35	20	42,5	2,5	
B8	10:1	35	25	37,5	2,5	
B9	10:1	35	35	27,5	2,5	
B10	10:1	35	50	12,5	2,5	
B11	10:1	35	15	47,5	2,5	

B12	10:1	35	20	42,5	2,5
B13	10:1	35	25	37,5	2,5
B14	10:1	35	35	27,5	2,5
B15	10:1	35	50	12,5	2,5

**Abreviações:** b-DNA: código de barras de DNA

**Tabela S3:** Sequência do primer adicionado para a amplificação e quantificação do DNA extraído

Tecido	Sequência da leitura	Sequência completa do primer	Quantificação Qubit (ng/μL)
<b>VIA INTRAMUSCULAR</b>			
Co1	GGCACGGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	2,68
Co2	GTTGCCCC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	2,76
Co3	CTCAAACG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	2,66
Co4	TGAAGGGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	2,41
Co5	GCATTAGG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	4,97
F1	GTCCGTCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	1,52
F2	TAGACCAT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	4,20
F3	GTGAGTTA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	2,01
F4	TATTCCGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	2,70
F5	GTGTATGG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	4,54
B1	AGTCTCGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	4,61
B2	TTACTGTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	3,63
B3	CGCTTCTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	1,48
B4	CTGACTGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	2,00
B5	GGCGGCAA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	1,88
Pu1	TTTTTGCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	3,22
Pu2	AGAGAAAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	5,10
Pu3	CTCTCCAT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	1,08
Pu4	CTAAAAGC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	1,64
Pu5	TCTGCGTA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	4,62
<b>VIA INTRAVENOSA</b>			
Co6	AGATATCC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	2,16
Co7	AGATGGTA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	2,41

Co8	CGTTATAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	2,06
Co9	GGTCCTTC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	1,86
Co10	CGGACGTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	1,16
F6	CGGTCTGG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	3,33
F7	TCTGGACC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	14,50
F8	TACGGACG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	3,93
F9	CTACTGAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	10,30
F10	GCTTACAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	3,37
B6	CGGGGATC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	3,24
B7	TACCGCTA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	13,90
B8	TTACAGGG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	3,76
B9	TACGATCC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	4,06
B10	CAACGCGG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	4,11
Pu6	CAAGGGTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	4,50
Pu7	GAACTACG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	3,23
Pu8	CCAAATAA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	4,88
Pu9	GAGGGCTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	4,17
Pu10	GCATAAAT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATATAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	4,52

Tabela S4: Caracterização das LNPs

Formulação	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Potencial Zeta (mV)	PDI		
A1	111,54 ± 1,84	-40,3 ± 16	0,149±0,017	DOPE	BIBLIOTECA A 1-5
A2	105,08 ± 2,29	-22 ± 8,47	0,122±0,029		
A3	120,88 ± 11,06	-29,2 ± 6,3	0,151±0,043		
A4	106,62 ± 1,11	-28,17 ± 7,23	0,143±0,009		
A5	129,92 ± 1,31	-26,25 ± 8,05	0,114±0,028		
A6	121,15 ± 0,5	-13,1 ± 8,13	0,155±0,025	DSPC	BIBLIOTECA A 6-9
A7	137,65 ± 0,97	-25,8 ± 10,28	0,146±0,019		
A8	127,05 ± 0,39	-29,37 ± 10,69	0,124±0,010		
A9	161,86 ± 2,06	-13,43 ± 9,73	0,116±0,013		
A10	81,71 ± 1,69	-29,85 ± 12,8	0,16±0,001	DOTAP	BIBLIOTECA A 11-14
A11	90,23 ± 0,36	-26,87 ± 9,19	0,14±0,015		
A12	81,79 ± 0,65	-30,3 ± 8,33	0,165±0,010		
A13	81,64 ± 0,66	-16,7 ± 7,92	0,144±0,014		
A14	90,3 ± 1,13	-28,2 ± 9,39	0,224±0,006		
B1	93,71 ± 0,07	-9,37 ± 9,15	0,114±0,009	DOPE	BIBLIOTECA B 1-5
B2	99,48 ± 0,41	-6,14 ± 6,02	0,187±0,017		
B3	92,49 ± 0,69	-2,2 ± 6,64	0,181±0,015		
B4	101,5 ± 0,49	-1,41 ± 7,26	0,138±0,030		
B5	109,97 ± 0,42	-8,9 ± 8,75	0,141±0,002		
B6	88,34 ± 1,29	-10,05 ± 7,85	0,242±0,008		
B7	81,61 ± 1,37	-12,35 ± 6,85	0,221±0,011	DSPC	BIBLIOTECA B 6-10
B8	170,92 ± 4,39	-9,67 ± 11,2	0,443±0,008		
B9	142,56 ± 2,04	-5,31 ± 5,41	0,499±0,031		
B10	135,44 ± 1,77	1,46 ± 5,08	0,235±0,020		

<b>B11</b>	99,4 ± 0,94	-7,84 ± 6,97	0,2±0,002	<b>DOTAP</b>	<b>BIBLIOTECA B 11-15</b>
<b>B12</b>	118,21 ± 0,88	-23,03 ± 7,61	0,368±0,009		
<b>B13</b>	148,2 ± 1,02	27,53 ± 4,41	0,404±0,017		
<b>B14</b>	100,04 ± 0,55	16,8 ± 9,55	0,253±0,016		
<b>B15</b>	75,7 ± 0,59	20,37 ± 6,01	0,256±0,028		

**Abreviações:** LNP: nanopartícula lipídica ionizável; nm: nanômetro; mV: milivolts; PDI: índice de polidispersão; DOPE: 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine; DSPC: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DOTAP: 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane.