

Vetores não virais ou vetores sintéticos

Profa Fabiana T.M.C. Vicentini
Profa Maria Vitória L.B. Bentley

2020

Tipos de Vetores

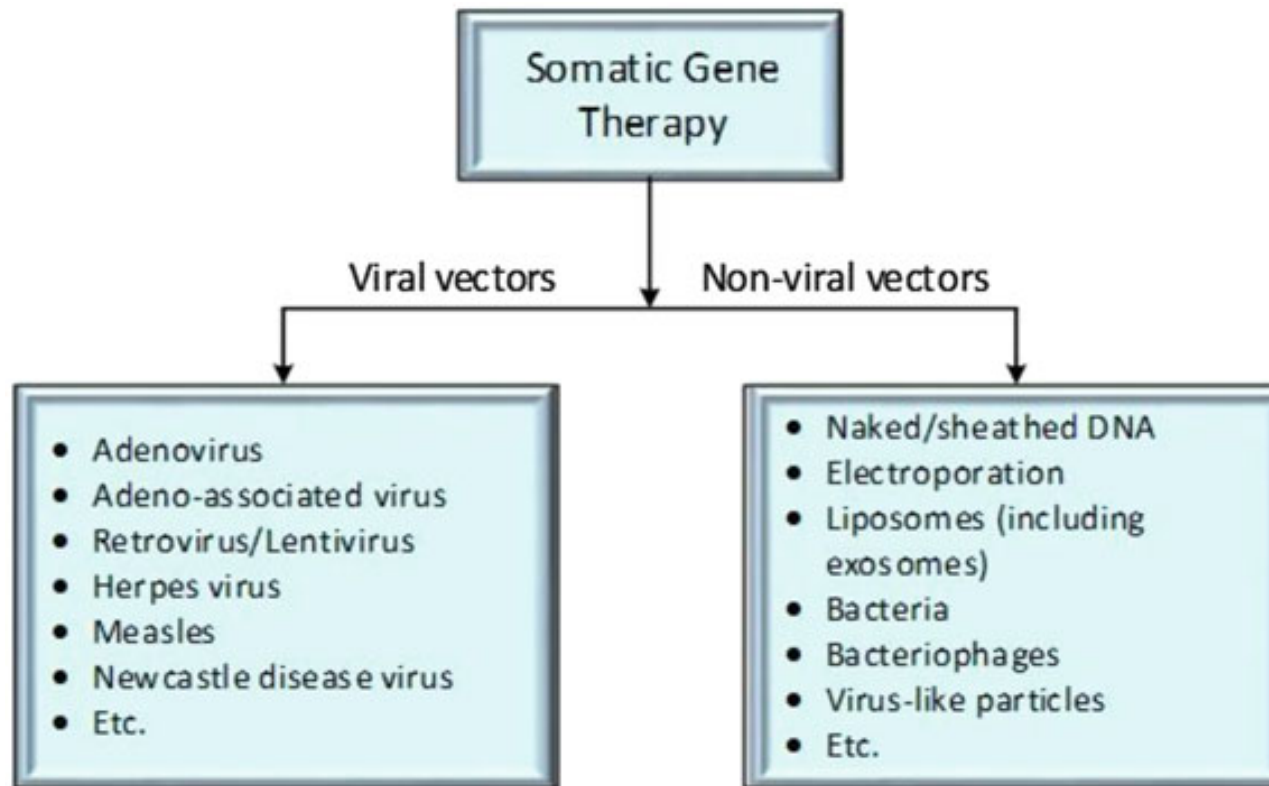


Fig. 2 Viral and non-viral vectors for somatic cell gene therapy

Fabiana T.M.C. Vicentini

Tipos de Vetores

❖ **Virais** – utilizam a capacidade dos vírus de introduzir o material genético nas células-alvo

TABLE 13.1

Comparison of Different Viral Vectors for Gene Therapy

Vector	Advantages	Disadvantages
Retrovirus	Integration into host DNA All viral genes removed Relatively safe	Insertional mutagenesis Requires cell division Relatively low titer
Adenovirus	Higher titer Efficient in nondividing cells	Toxicity Immunological response
Adeno-associated virus	All viral genes removed	Limited size of foreign DNA Labor-intensive production Status of genome not fully elucidated
Lentivirus	Provide long-term and stable gene expression Infect nondividing cells	Similar retrovirus

Tipos de Vetores

- ❖ Não-virais ou Sintéticos – dependem da transferência direta da informação genética na célula-alvo, e incluem DNA plasmidial, DNA nu ou DNA associado com algum sistema de liberação

TABLE 13.2

Methods of Nonviral Gene Transfer

Method	Size of DNA	Target Cells	Transfection Efficiency	Transfection	Cellular Toxicity	Gene Expression	Preparation	Application
Naked DNA	No limit	Especially myocytes	10–30% of cells at injection site	Extra chromosomal	Lymphocytic infiltration	Until death of cell	Easy and cheap	<i>In vivo</i>
Microinjection	No limit	Mitosis/resting	Stable <0.1–1%	Integration possible	30% survival		200–400 injections/hr	<i>In vitro</i>
Electroporation	150 Kb	Mitosis/resting	Stable <0.1–1%	1–2 copies	20–60% survival		Easy	<i>In vitro</i>
Particle bombardment	10,000 copies	Mitosis/resting	Stable <0.1–1%, transient <20%	Persistent and integration?	85–95% survival	2–12 month	Easy	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>
Lipofection	No limit	Mitosis/resting	Stable <0.1–1%, transient 80%	Integration possible	Membrane toxic		Easy	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>
Ligand mediated	>48 Kb	Mitosis/resting	Up to 50%	Extra chromosomal	High	High, Transient	Labor intensive	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>
Calcium phosphate precipitation	No limit	Mitosis/resting	Stable <0.1%	Often multiple copies	High	High, Transient	Labor intensive and time consuming	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>

Métodos de transferência

- ❖ Biológicos – vetores virais;
- ❖ Físicos – eletroporação, biobalística, etc;
- ❖ Químicos – lipossomas, nanopartículas poliméricas, etc

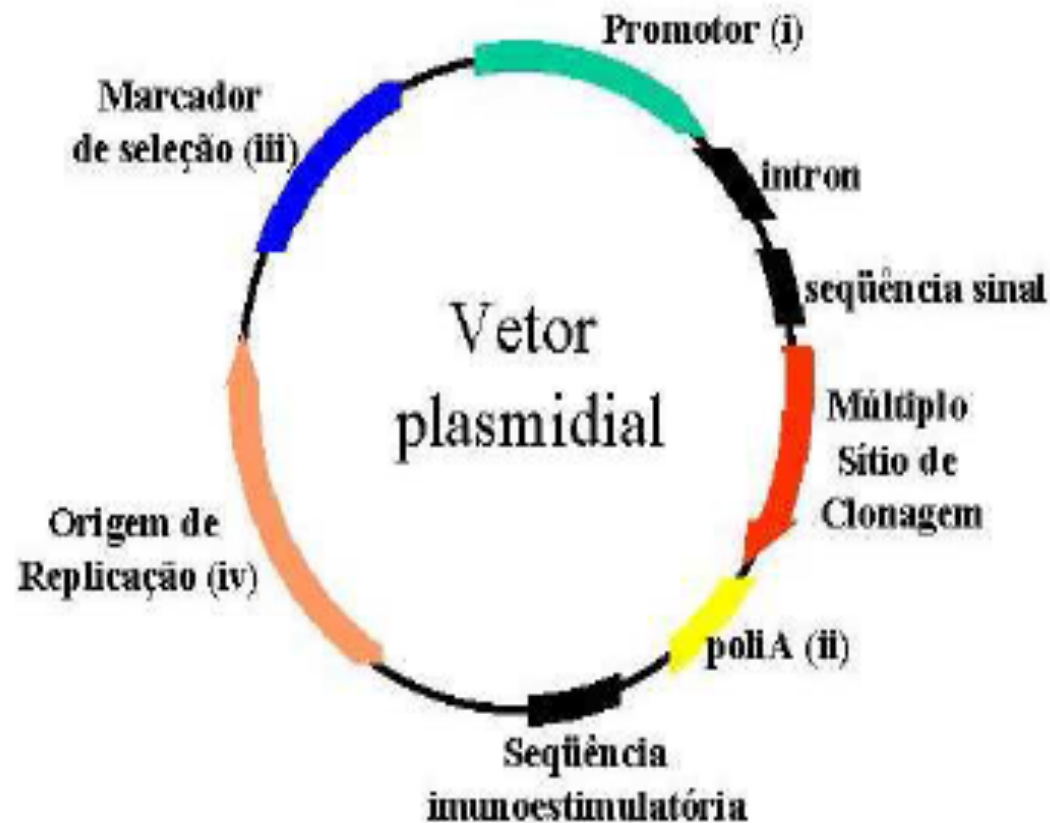
DNA plasmidial

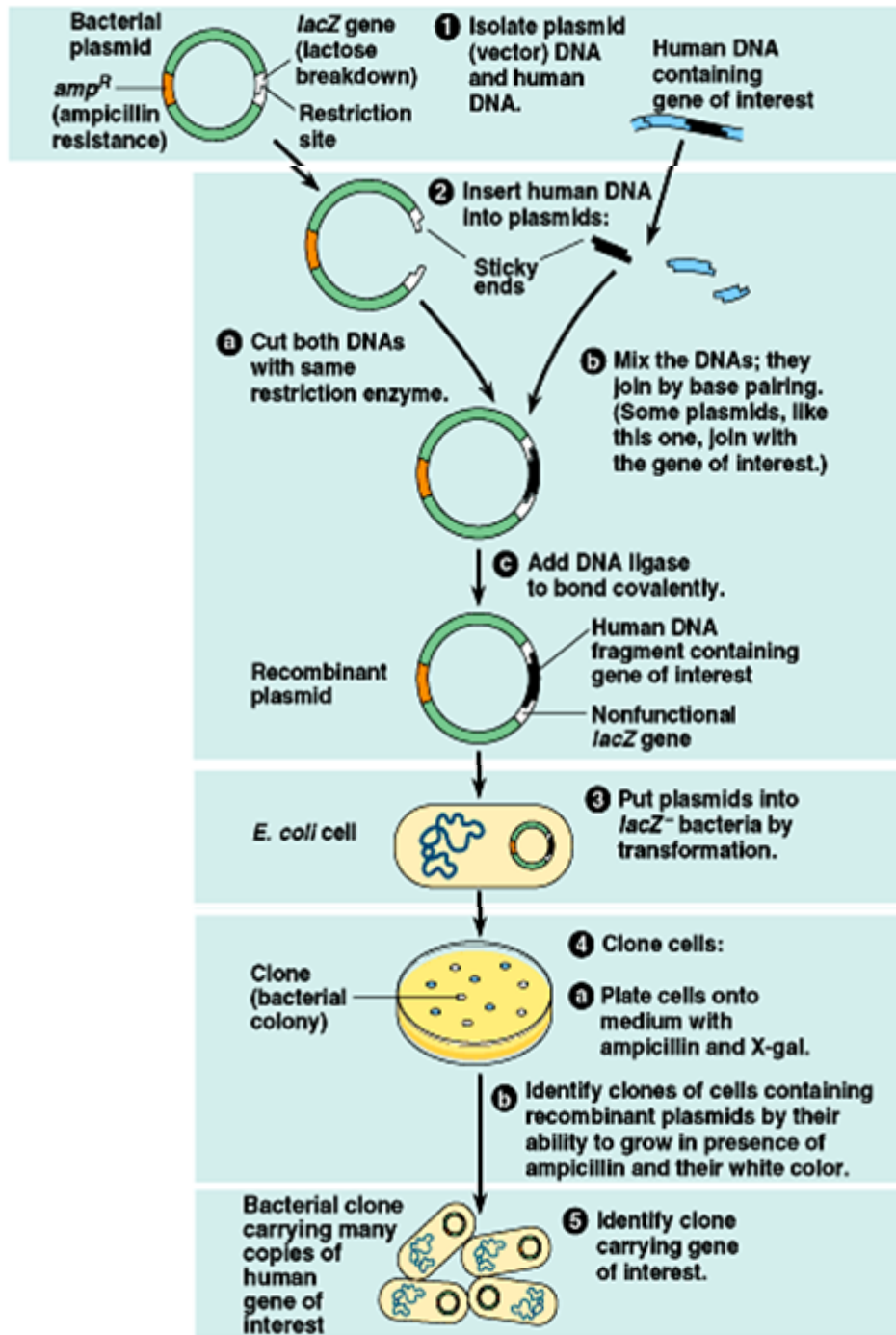
❖ **Vantagens:**

- a) Capacidade de transportar uma grande quantidade de material genético;
- b) Ausência de risco de infecção ou mutagênese;
- c) Menos imunogênicos;
- d) Produção em grande escala fácil a partir de cultivo de células bacterianas

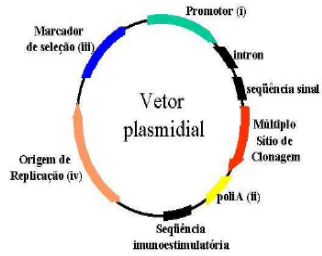
Plasmídeos

DNA circular, que se replicam independentemente do cromossomo da célula





- Clivagem de DNA em sítios específicos por endonucleases de restrição;
- Inserção dos fragmentos resultantes no cromossomo de um elemento genético auto-replicativo (Vetor genético).
- Ligação *in vitro* de diferentes moléculas de DNA, originando a molécula de DNA recombinante;
- Meio de introduzir o vetor numa célula viva, capaz de multiplicá-lo;
- Selecionar apenas as células que efetivamente incorporaram o DNA recombinante.



Fabiana T.M.C.Vicentini

Plasmídeos

- (i) Origem de replicação em bactérias;
- (ii) Gene de seleção, que geralmente oferece resistência a um antibiótico;
- (iii) Sítio de clonagem múltiplo, que pode ser clivado com enzimas de restrição;
- (iv) Promotor, geralmente um promotor viral

Injeção de DNA nu


Injeção direta de DNA plasmidial

- Facilidade de aplicação ;
- Simplicidade
- Baixa eficiência – requer até 100 vezes maior a quantidade de plasmídeo para gerar uma expressão equivalente a produzida por outros sistemas carreadores;
- Mecanismo desconhecido de integração celular;
- Sucesso para um número limitado de células;
- Aplicação restrita a tecidos (músculo e cérebro) com nível baixo de nucleases;

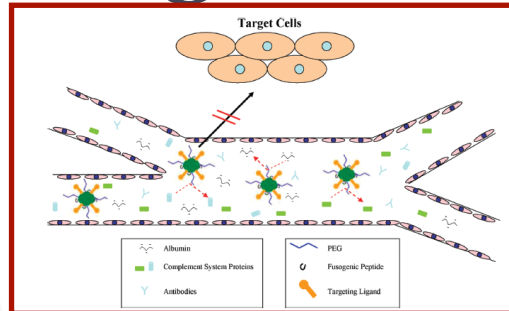
Forma de liberação de fármacos, na qual o fármaco é um ácido nucléico (DNA ou RNA) entregue a uma célula-alvo por uma formulação farmacêutica específica que tem que cumprir dois objetivos:

O princípio ativo, DNA ou RNA, tem de ser protegido de uma forma que permita sua trajetória de maneira segura para o local de ação.

Deve ser eficiente na fixação à membrana celular e deve permitir a entrada do material genético nas células, seguido de uma liberação eficiente para o sítio de ação intracelular, principalmente o núcleo da célula

- 
- ❖ Macromoléculas hidrofílicas carregadas negativamente
 - ❖ Rapidamente degradados por endonucleases
 - ❖ Alvos são invariavelmente intracelular

Barreiras biológicas



Fernandez & Rice, 2009

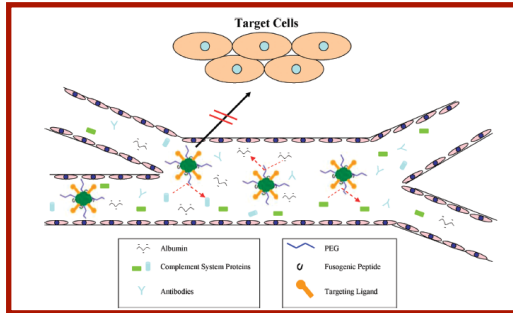
Metabolismo
prematureo fora da
célula alvo

Degradação pelas
endonucleases

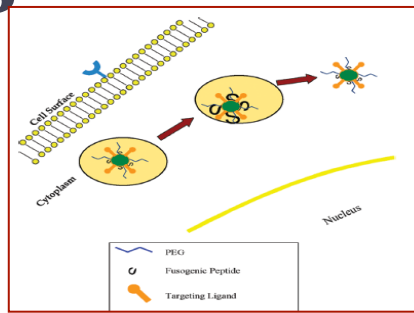
Reconhecimento
o das células
alvo

Internalização
celular

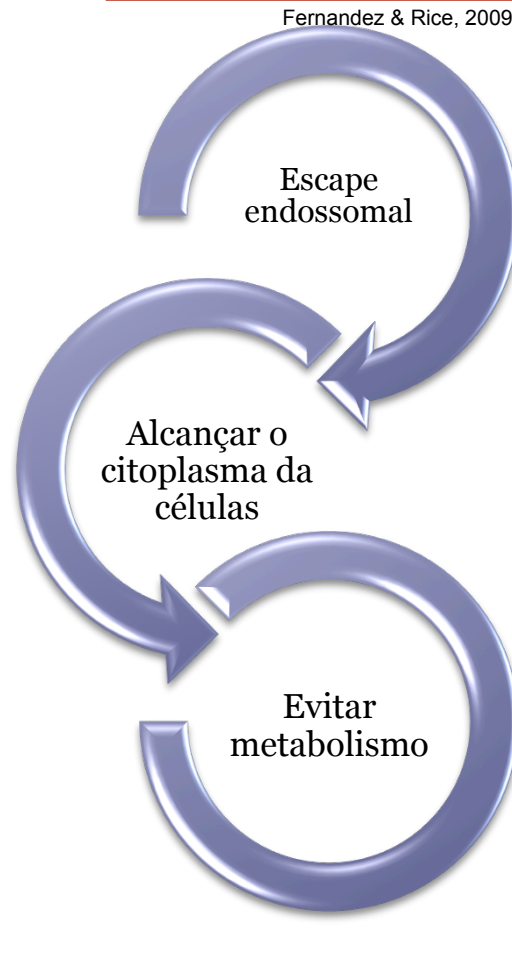
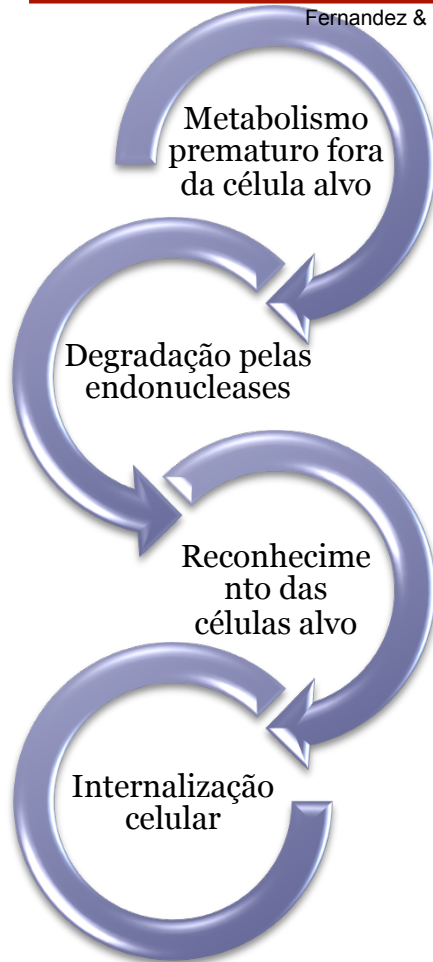
Barreiras biológicas



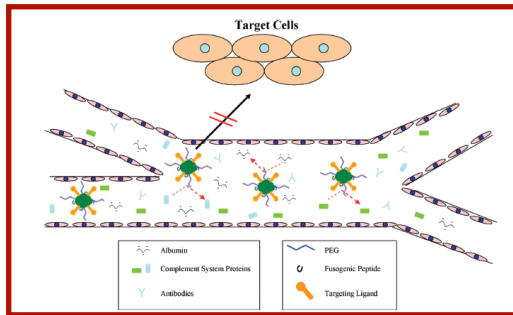
Fernandez & Rice, 2009



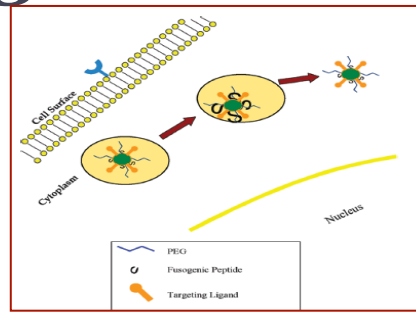
Fernandez & Rice, 2009



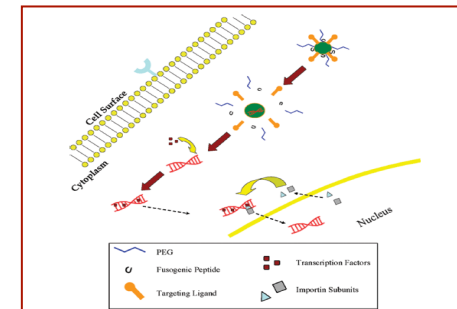
Barreiras biológicas



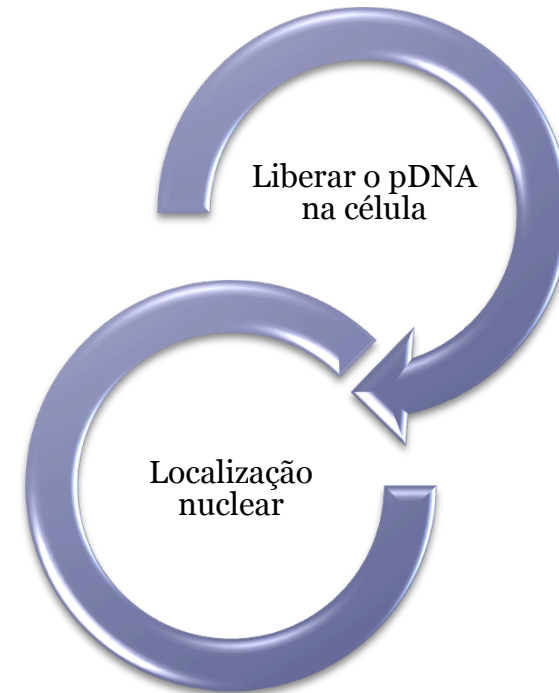
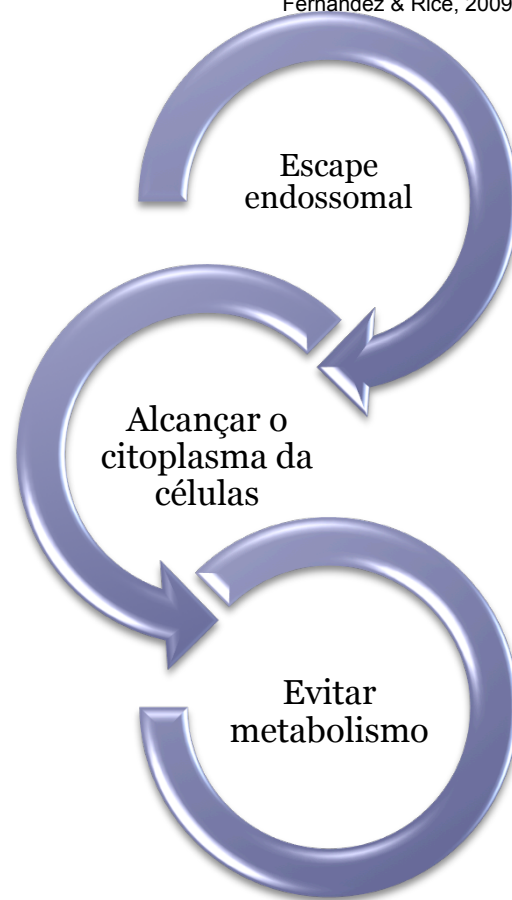
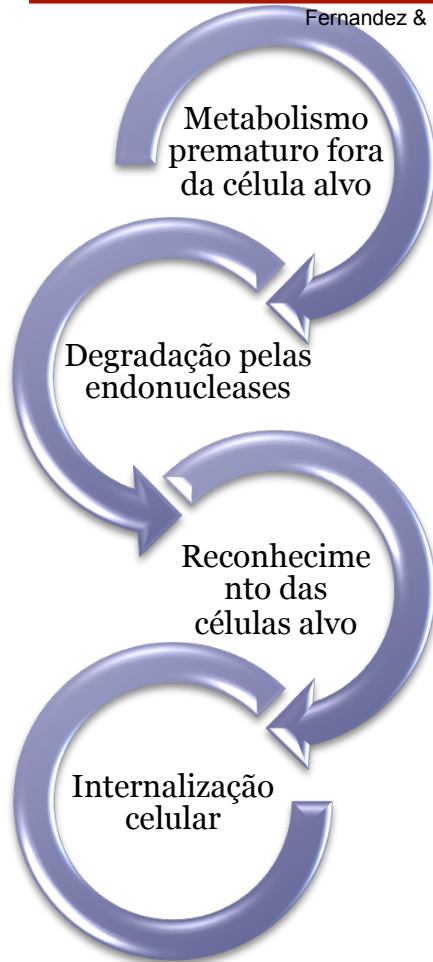
Fernandez & Rice, 2009



Fernandez & Rice, 2009



Fernandez & Rice, 2009



Vetores não virais

Estável e resistente a absorção não específica

- Escapar do sistema imune;
- Minimizar as interações com as proteínas do plasma, matriz extracelular e superfície celular das células e tecidos não-alvos;
- Não agregar

Atingir os locais específicos, promover a interiorização e expressão eficientes

- Rapidamente desestabilizado para liberar o DNA uma vez que tenham sido absorvidos pelas células-alvo;
- Expressão transiente

Vetores não virais

Apresentar baixa toxicidade;

Permitir produção em larga escala

- Uso de componentes simples e utilizando métodos robustos;
- Custo-benefício

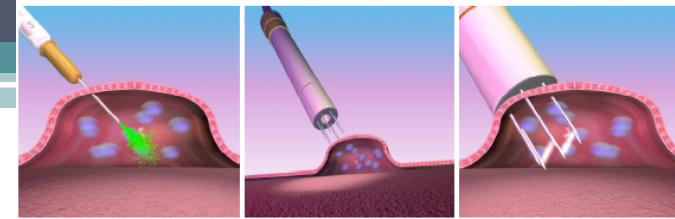
Vetores não virais



Métodos Físicos: o transgene é introduzido de maneira mecânica nas células;

Métodos químicos: o vetor é alguma substância de origem química

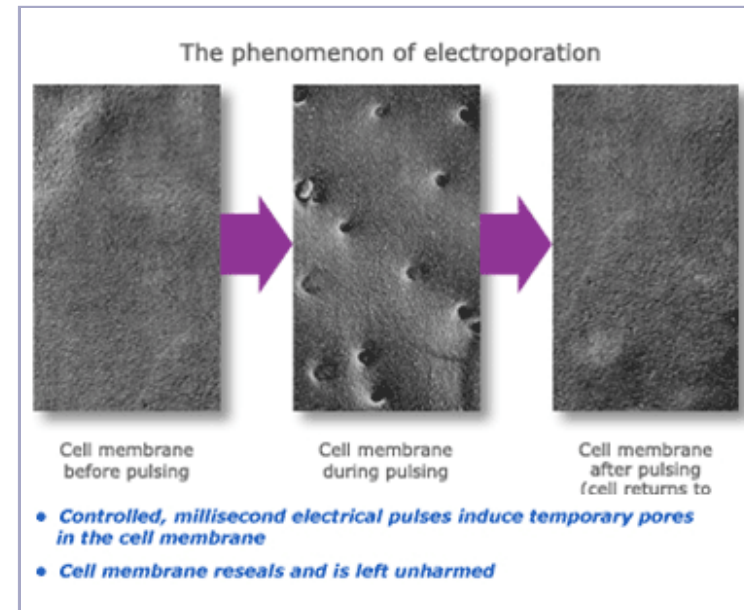
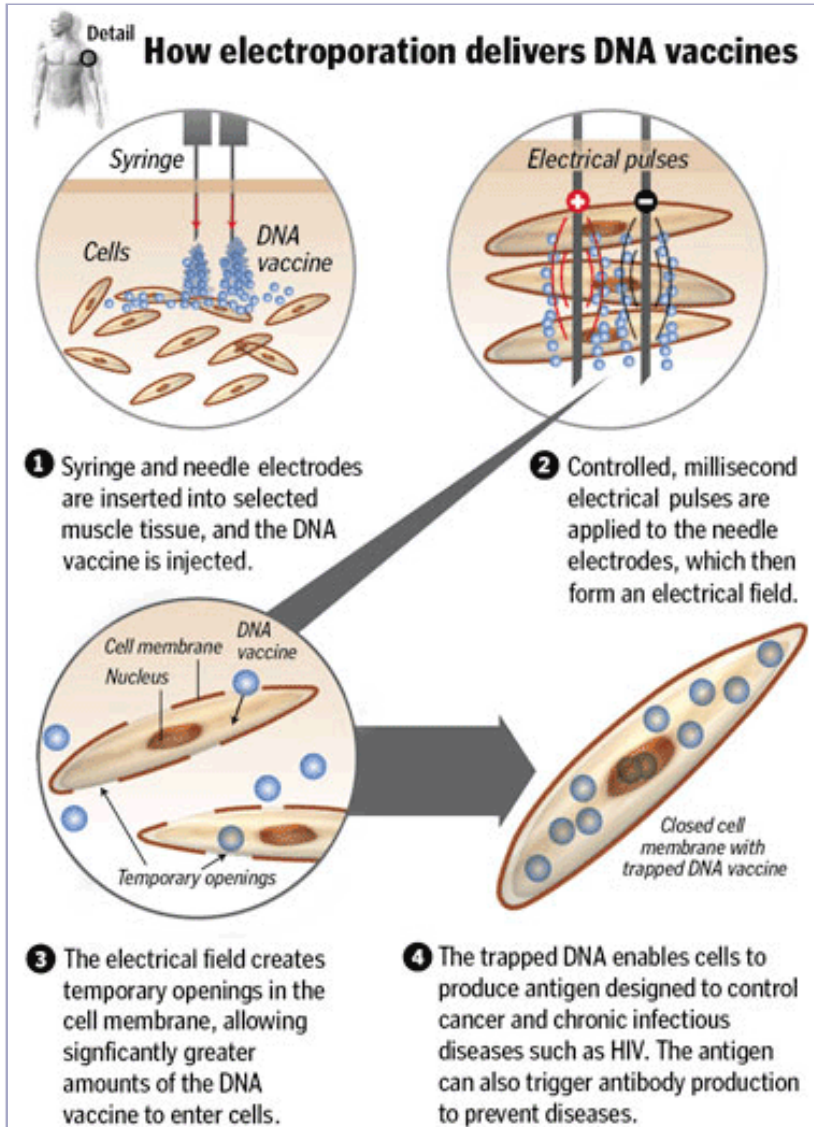
Eletroporação



Injection

Electrode Insertion

Electroporation

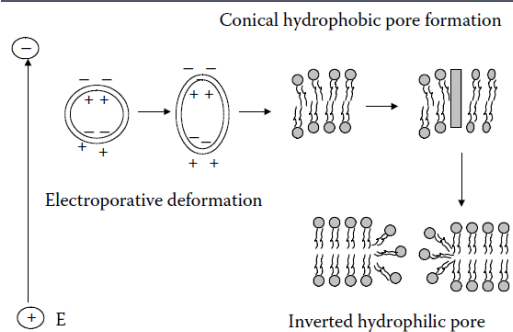




Fabiana T.M.C.Vicentini

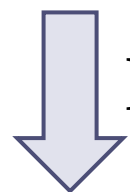
Eletroporação

- ❖ Pulsos elétricos (de alta voltagem) alternados são aplicados as células ou tecidos que estão em contato com uma solução de DNA plasmidial;
- ❖ Campo elétrico permeabiliza a membrana das células por formação de caminhos aquosos;
- ❖ Através desses caminhos a molécula de DNA penetra a membrana da célula, o que não ocorre normalmente;
- ❖ Essa alteração na membrana celular é temporária

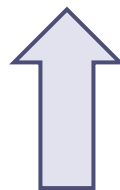


Fabiana T.M.C.Vicentini

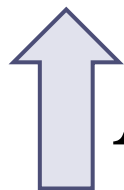
Eletroporação



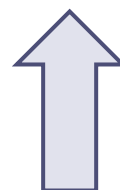
Raio célula



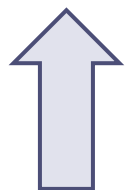
Campo elétrico necessário para atingir permeabilização



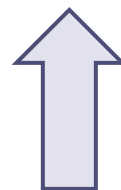
Amplitude pulso



Área de difusão

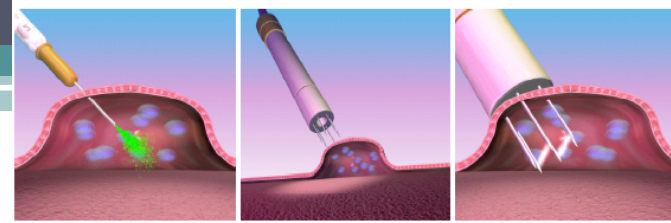


Duração pulso



Perturbação na membrana

Eletroporação



Injection

Electrode Insertion

Electroporation

VANTAGENS

Técnica simples,
rápida e não
invasiva

Equipamentos
necessários
disponíveis e
fáceis de operar

Sem limitação
tamanho
transgene

Elevada
resposta imune

DESvantagens

Muita morte
celular

Necessidade de
grande
quantidade de
DNA

Instabilidade do
DNA



Fabiana T.M.C.Vicentini

Eletroporação

Músculo esquelético

Tecidos tumorais;

Pele

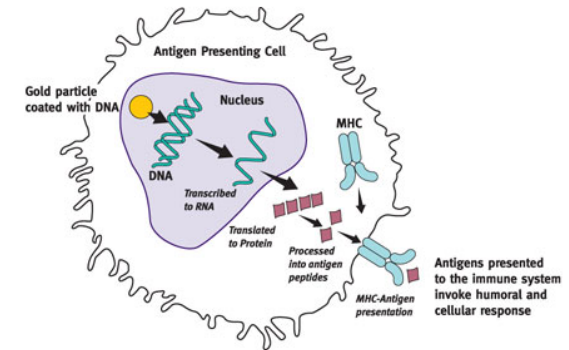


Biobalística ou *Gene Gun*

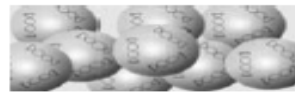
Fabiana T.M.C.Vicentini

Partículas nanométricas de ouro ou tungstênio cobertas com DNA são aceleradas por um gás carreador

Biobalística ou Gene Gun



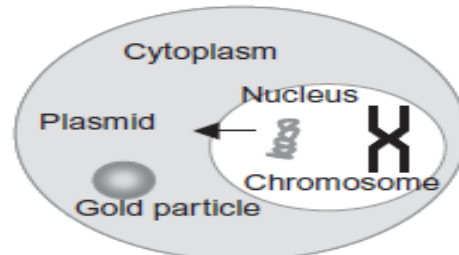
DNA is adsorbed onto gold particles



Particles are placed in a cartridge

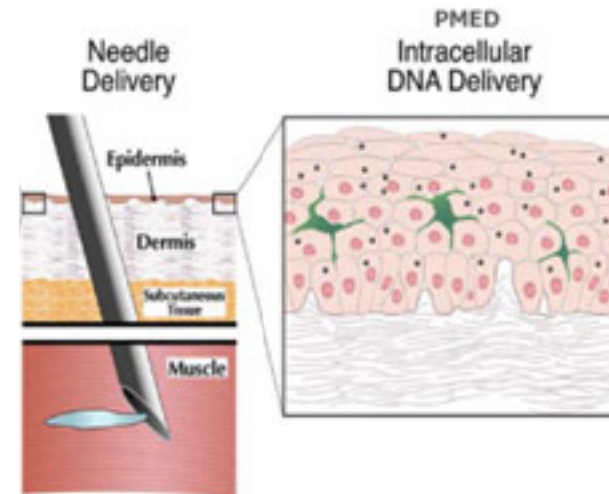
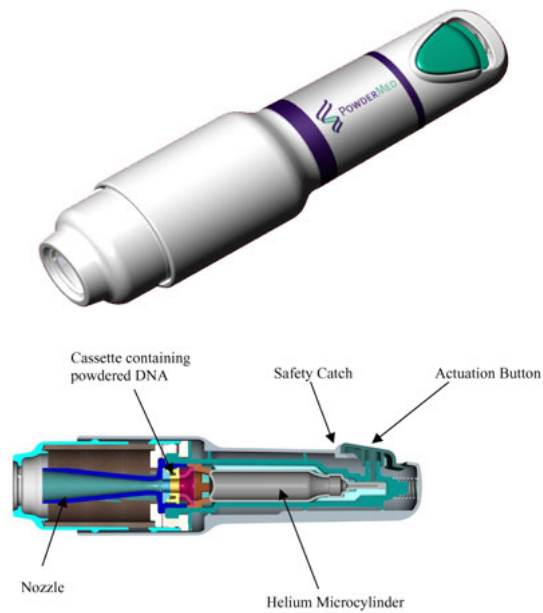
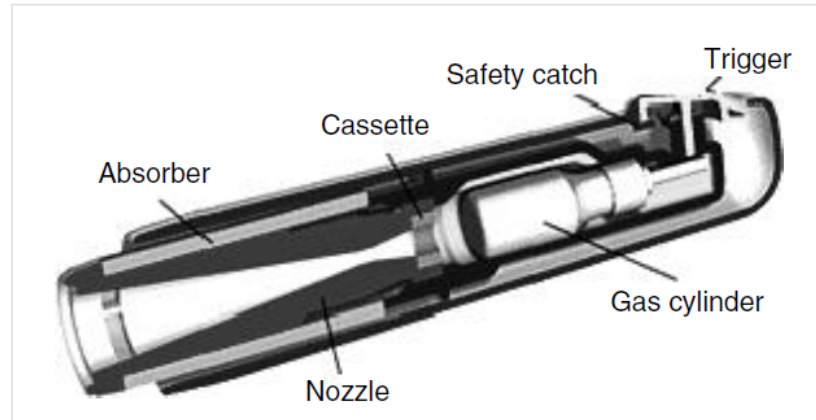


The cartridge is coupled to the "gene gun", and the particles are accelerated against the animal's skin



On hitting the cell, the DNA is released from the particle and gets to the nucleus, where it controls the protein synthesis

Biobalística ou *Gene Gun*





Biobalística ou *Gene Gun*

❖ Estabilidade

- Vacinas na forma de pó;
- Elimina necessidade da “cadeia fria”

❖ Eficiência

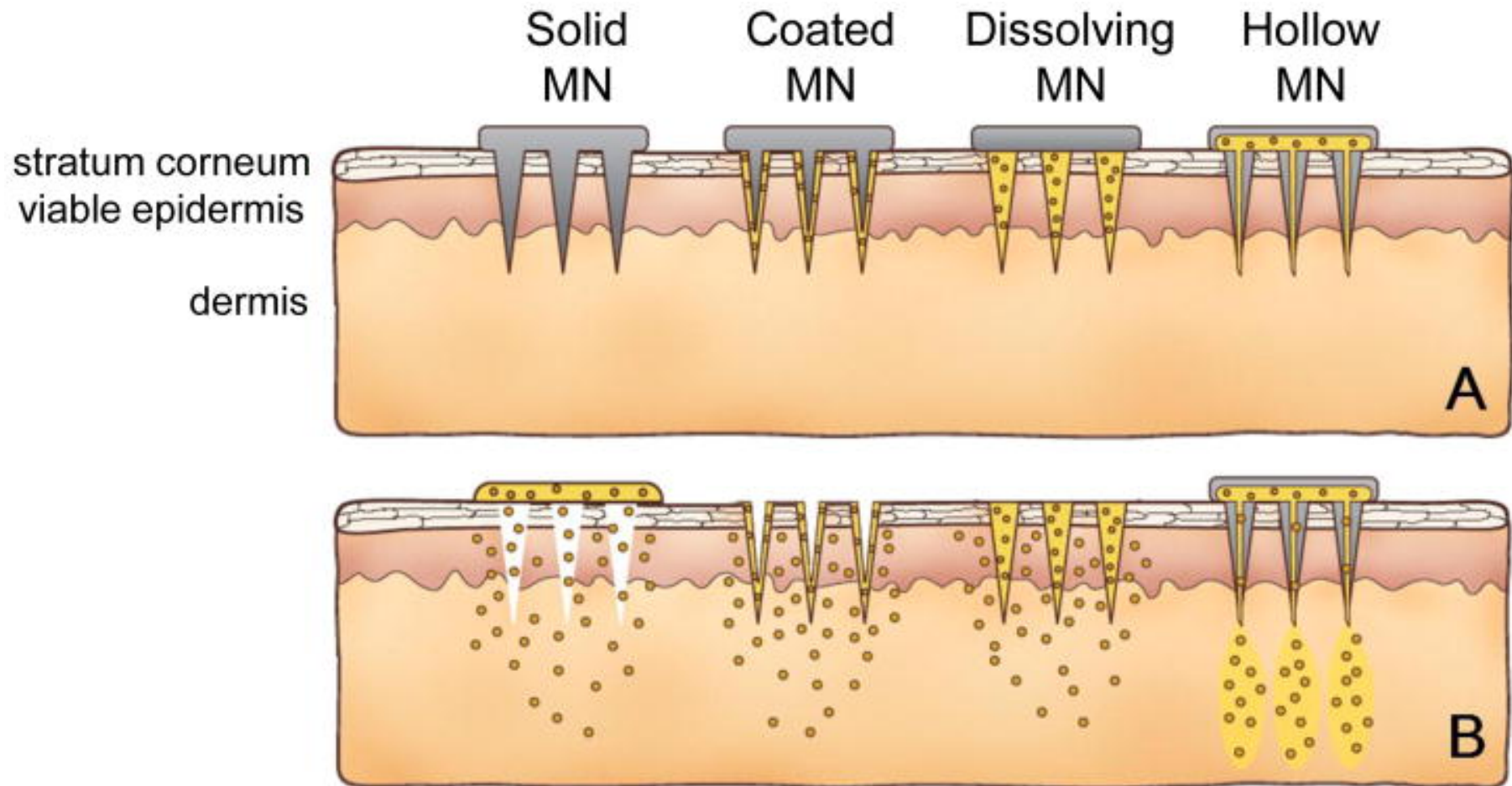
- Menores quantidades de DNA X IM;
 - Expressão do DNA codificando a proteína de 10-100 vezes > IM;
 - Permite a liberação DNAp dentro das células, evitando sua degradação;
- ## ❖ Adaptado para utilização *in vivo* nas vacinas de DNA;



Biobalística ou *Gene Gun*

- ❖ Morte celular elevada;
- ❖ Adaptado para utilização *in vivo* nas vacinas de DNA;
- ❖ Não é adequado para aplicação sistêmica;
- ❖ Necessidade de DNA altamente estável;
- ❖ Altos custos de desenvolvimento;
- ❖ Requer um dispositivo especializado;

Microagulhas



Vetores não virais

Métodos Físicos: o transgene é introduzido de maneira mecânica nas células;



Métodos químicos: o vetor é alguma substância de origem química

Vetores não-virais

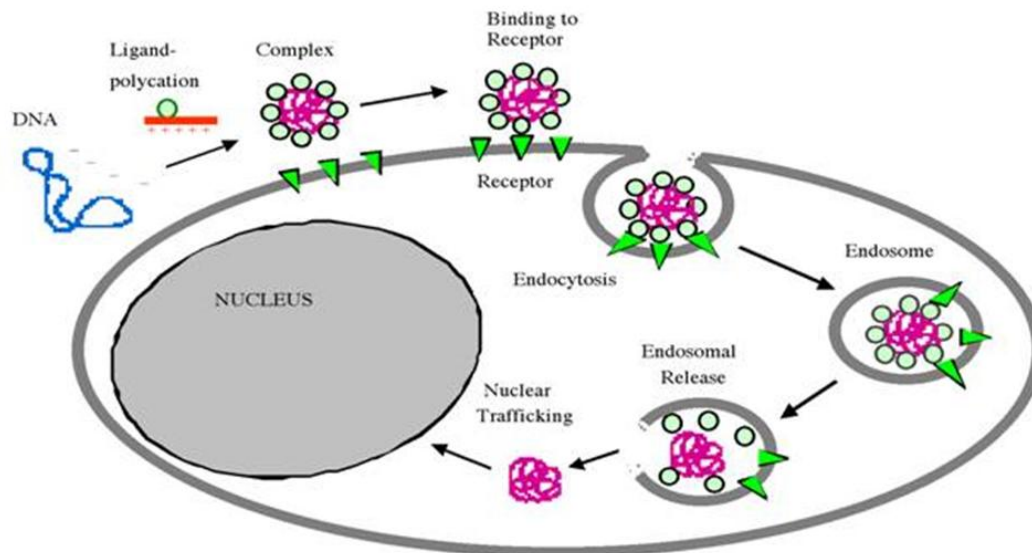
Molécula (+)

DNA (-)

Complexos (+)

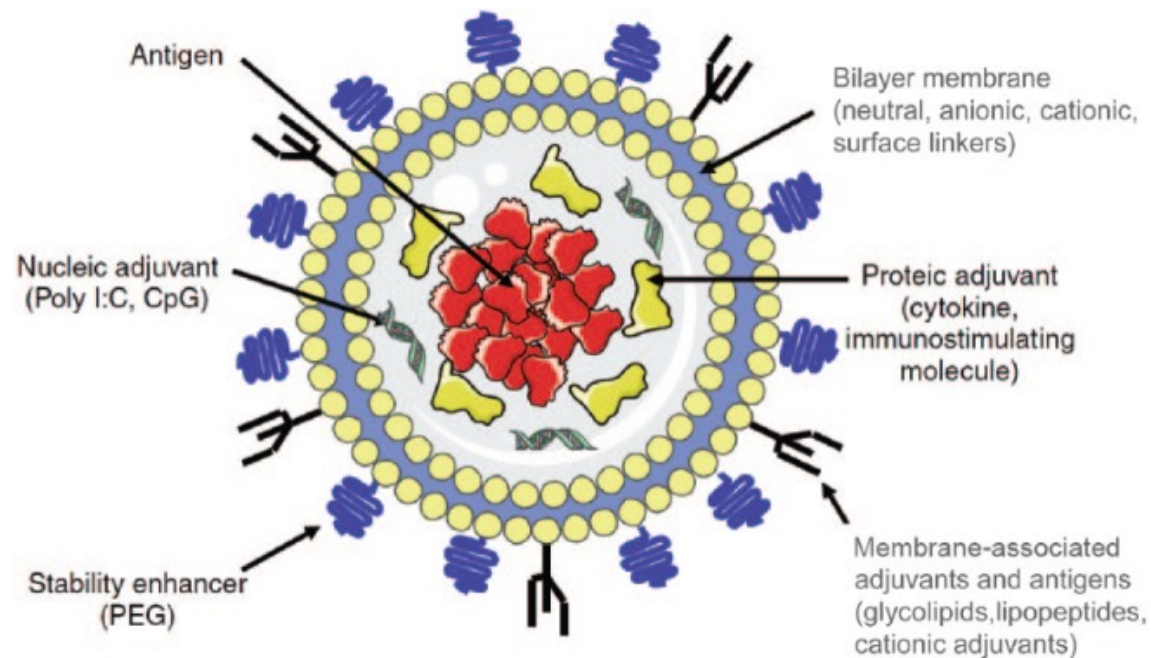
Polímeros
Peptídeos
Lipídeos

Lipoplexos
Poliplexos



Eliminam repulsão de cargas entre o DNA e os domínios extracelulares das proteínas de membrana

- ✓ SEGURANÇA
- ✓ BAIXA EFICIÊNCIA
- ✓ VERSATILIDADE



Schwendener, R.A., 2014

Vetores não-virais

Vantagens

- ❖ Liberação mais prolongada que DNA nu;
- ❖ Redução da toxicidade em relação vetores virais;
- ❖ Facilita o escape da ação de enzimas degradativas lisossomais;
- ❖ Simplicidade de tecnologia - Métodos de produção já foram otimizados e aspectos de segurança têm sido investigados em detalhes. Simple transferência de conhecimento pode reduzir substancialmente os custos de desenvolvimento;

Vetores não-virais

Vantagens

- ❖ Baixa imunogenicidade - Permitindo várias aplicações;
- ❖ Capacidade de direcionamento para células específicas
- ❖ Permitir carregamento de maiores taxas de DNA do que os sistemas virais, que atingem os seus limites em torno de 30 kb (Herpes vírus)

Vetores não-virais

Desvantagens

- Eficiência de transfecção baixa e variável;
- Expressão transiente, já que não se integra no genoma do hospedeiro, em consequência, a transferência do gene terapêutico deve ser repetida regularmente, possivelmente durante um longo período de tempo;
- Especificidade para células ou tecidos insuficiente;
- Baixas taxas de transferência de DNA a partir do citosol para o núcleo;
- Instabilidade

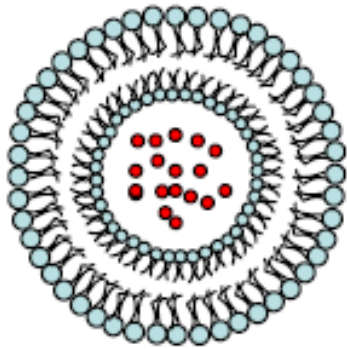


SISTEMAS BASEADOS EM LIPÍDEOS

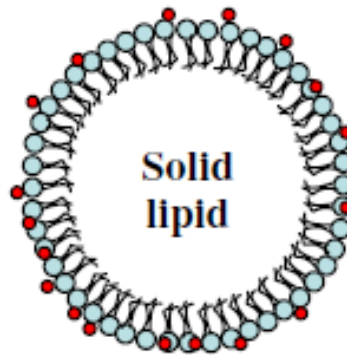
SISTEMAS BASEADOS EM POLÍMEROS

Sistemas baseados em lipídeos

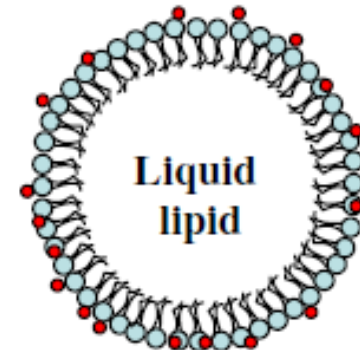
Fabiana T.M.C. Vicentini



Lipossomas



Nanoesferas



Nanocápsulas

Lipoplexos

Lípideos ou
fosfolípideos catiônicos

Interações eletrostáticas
espontâneas

DNA (-)

**Lipoplexos ou
Lipossomas
catiônicos**

- Encapsulamento ácido nucléico
- Degradação enzimática

Lipoplexos

- Fase ordenada de DNA rodeada por uma bicamada lipídica

Complexo de DNA parcialmente condensado com uma estrutura ordenada e de morfologia irregular

Lipoplexos

- Primeiros carreadores não virais a serem desenvolvidos e testados por sua eficácia clínica;
- Vantagens: expressão transiente do gene liberado e não ocorre integração cromossomal;

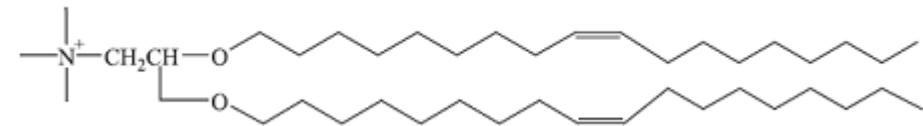
Lipoplexos

- Agentes de transfecção mais utilizados em cultura de células;
- *In vivo*:
 - Immunogenicidade e toxicidade;
 - Agregação com componentes sanguíneos
 - Baixa eficácia de transfecção

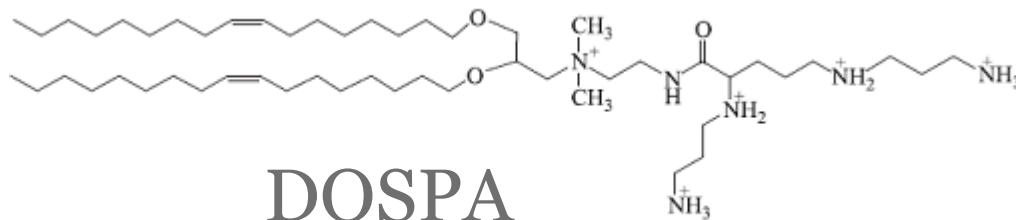


Dificultam sua eficácia

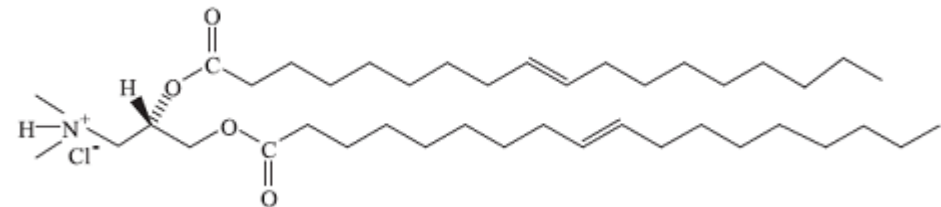
Lipídeos



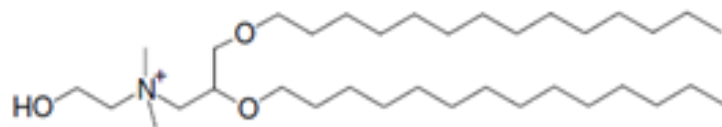
DOTMA



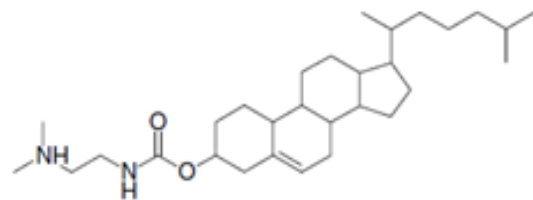
DOSPA



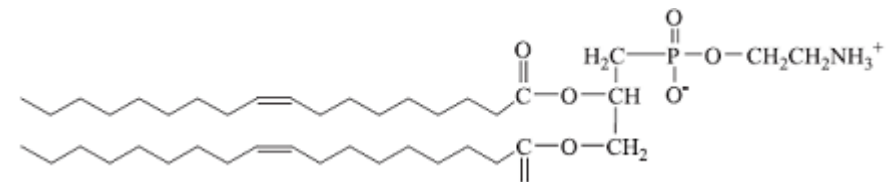
DOTAP



DMRIE



DC-Chol



DOPE

Agentes de transfecção

LipofectamineTM

DOSPA: DOPE

3:1 w/w

Lipofectin[®]

DOTMA:DOPE

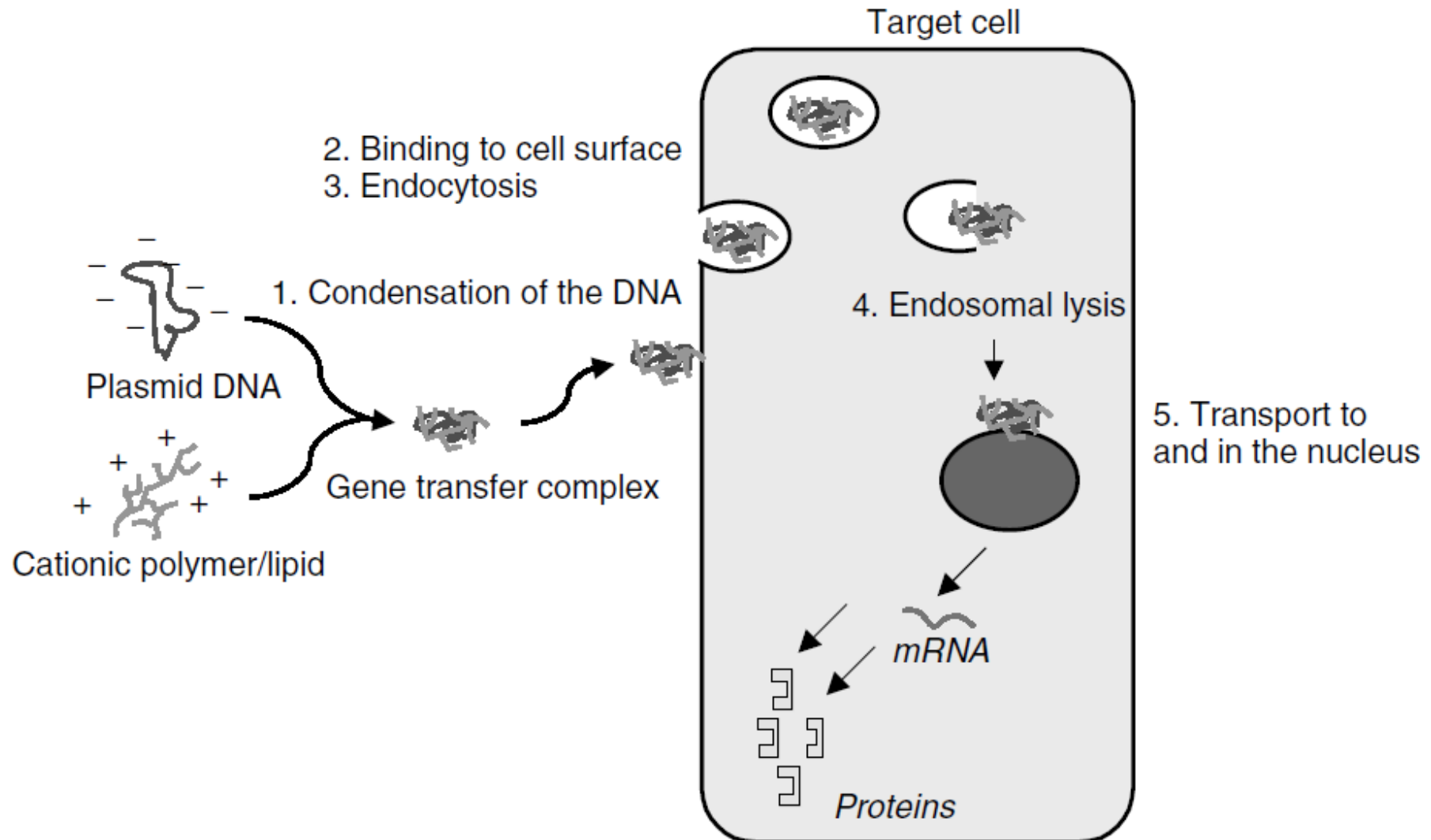
1:1 w/w



Formação do complexo

- Processo exotérmico rápido atribuído a ligação eletrostática do DNA com a superfície do lipossoma;
- Reação endotérmica lenta subsequente causada pela fusão dos dois componentes e sua reorganização em uma nova estrutura

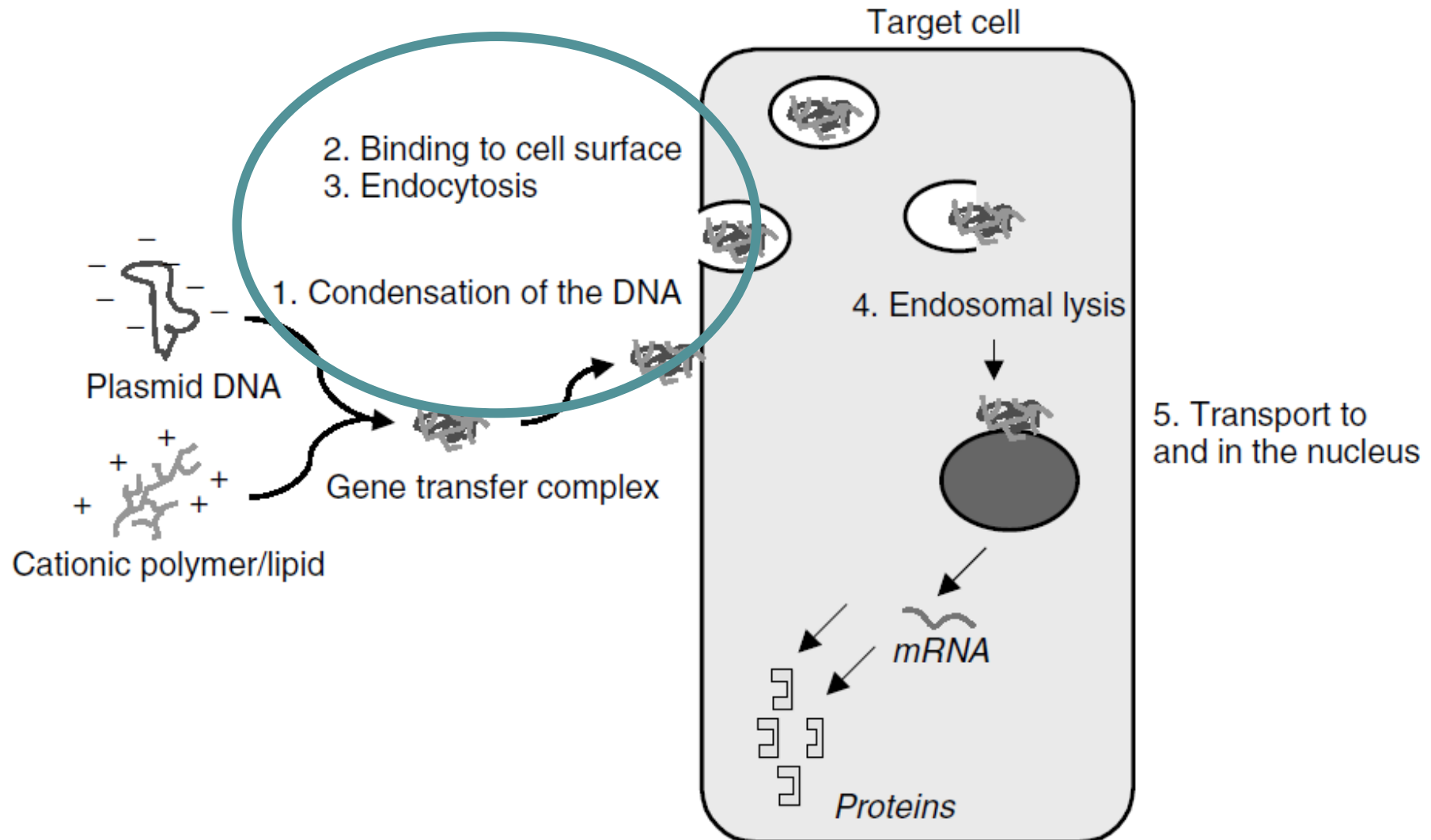
Características



Relação estrutura/atividade



Características

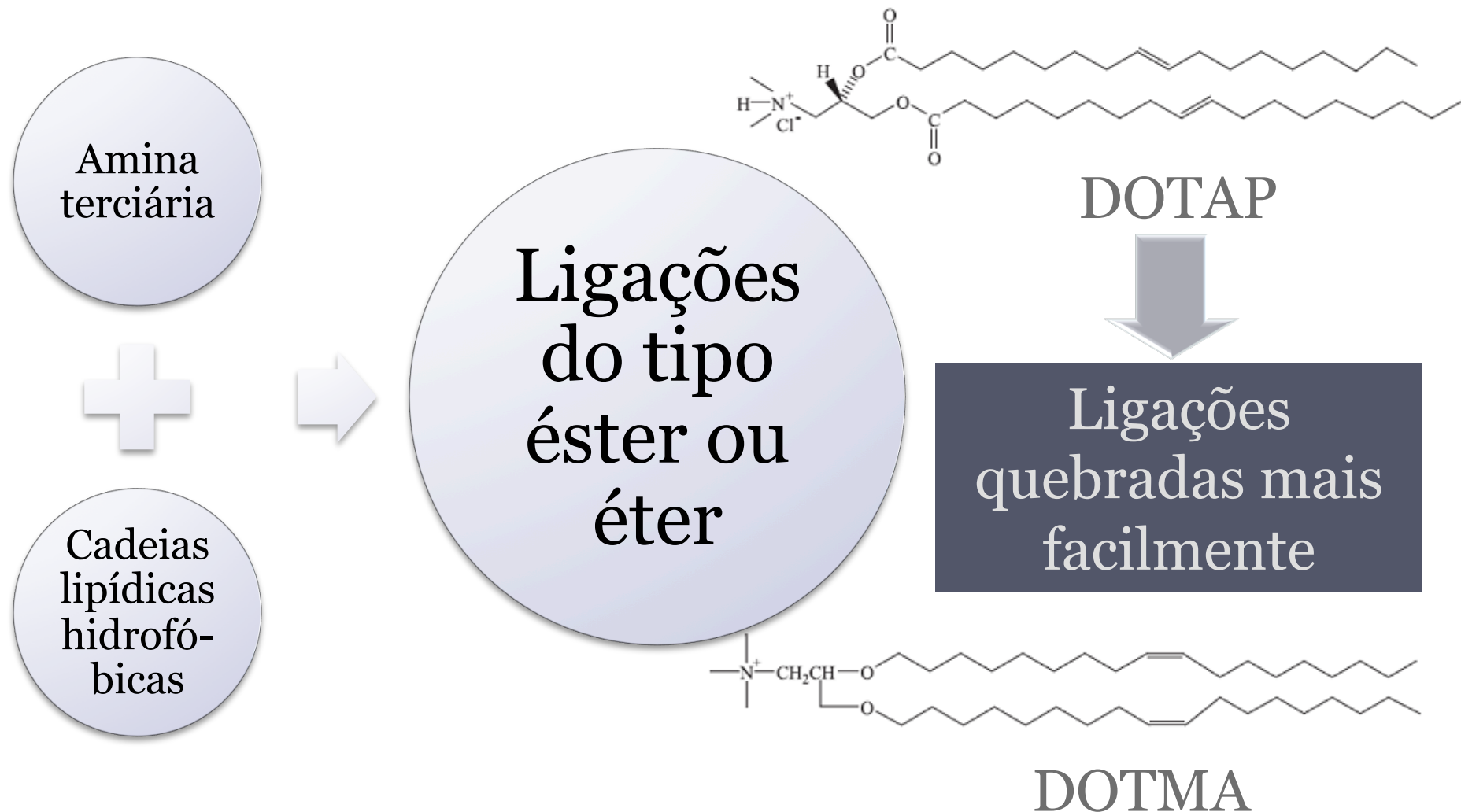


Relação estrutura/atividade

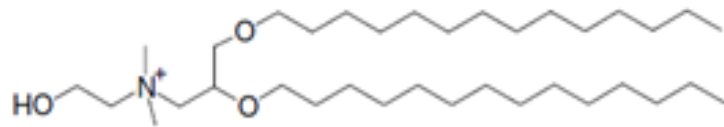
- Presença da amina terciária;
- Uma ou duas cadeias alifáticas hidrofóbicas

- Ligar ao DNA (-)
- Razão de cargas (+/-)
- Lipoplexos estáveis

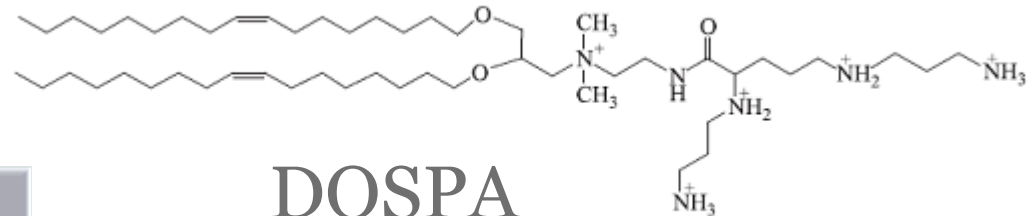
Relação estrutura/atividade



Relação estrutura/atividade



DMRIE



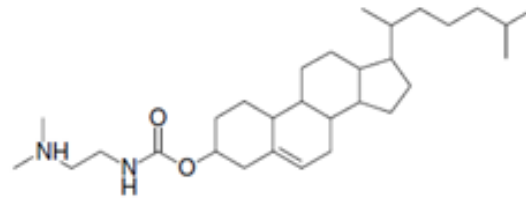
DOSPA

In vivo

Cadeia dialquílica (12 – 18 C)

Melhor transfecção

Relação estrutura/atividade



DC-Chol

- Substituição da cadeia alquílica com colesterol,
- Tratamento de fibrose cística;
- Afinidade pelas células bronco epiteliais;
- Interage menos com as proteínas do plasma

PEGlação



Farmacocinética

- Bloqueia absorção de proteínas;
- Tempo de meia-vida
- Estabilizando a partícula *in vivo*;
- Reduzindo a toxicidade



Biodistribuição

- Minimiza interação entre as partículas e a superfície celular

Eficiência de transfecção

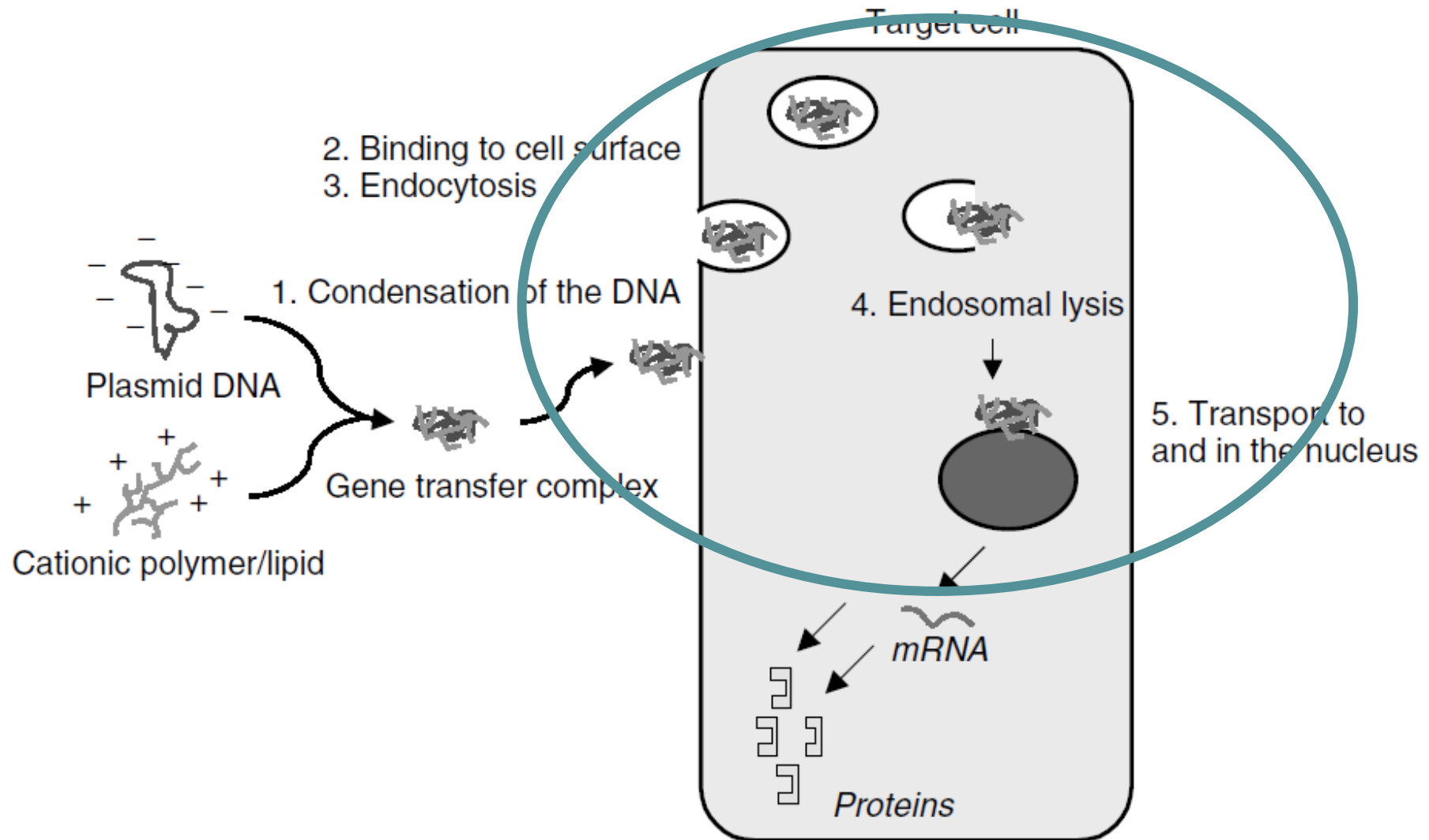


- Diminuir potencial zeta;
- Liberação do PEG das NPs qdo da sua interiorização na célula-alvo;

Relação estrutura/atividade

- Estruturas nanométricas
- Partículas grandes são completamente removidas da circulação pelas células do sistema monocítico fagocitário do fígado e pulmões,
- Não alcançando as células-alvo;

Características



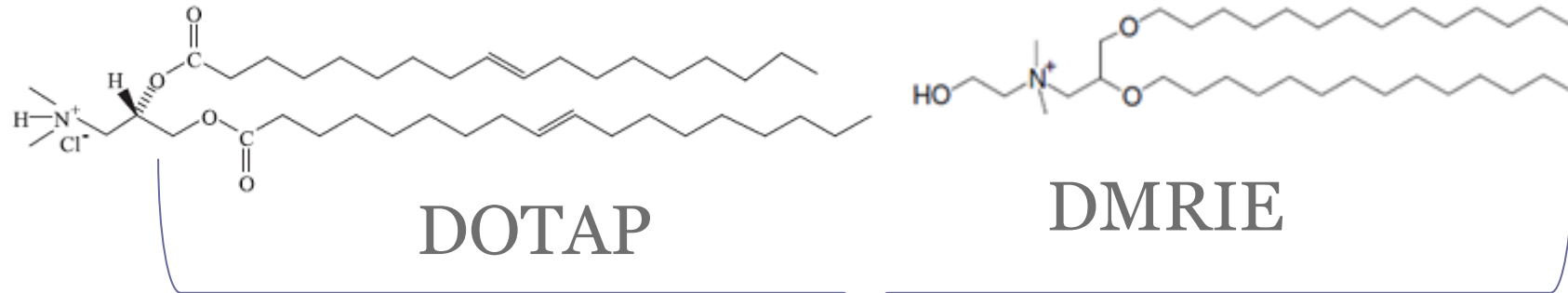
Relação estrutura/atividade

- Desestabilização das membranas biológicas
 - Interação entre lipossomas catiônicos e lipídeos aniônicos das membranas, permitindo uma fusão entre as bicamadas lipídicas;

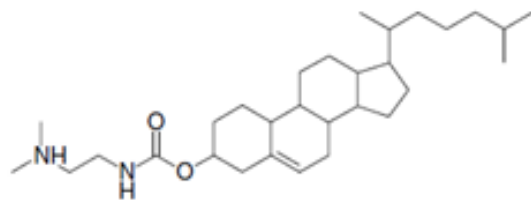
Relação estrutura/atividade

- Estabilidade intracelular do complexo lipídeo/DNA
- Capacidade de dissociação da molécula de DNA do vetor
- pKa do lipídeo;
- pH do produto

Relação estrutura/atividade



100%



DC-Chol

50%

pH 7,4

Desvantagens

- a) Baixa eficiência de transfecção quando comparados com vetores virais;
- b) Tempo de meia vida curto;
- c) Inativação por proteínas séricas;
- d) Toxicidade dos lipídeos catiônicos quando em altas concentrações;
- e) Instabilidade coloidal dos lipoplexos, o que leva à formação de grandes agregados.

Causas de baixas taxas de transfecção

- ❖ Liberação lisossomal insuficiente do DNA terapêutico do carreador;
- ❖ Rápida degradação enzimática no lisossoma ou no citosol;
- ❖ Transporte para o núcleo:

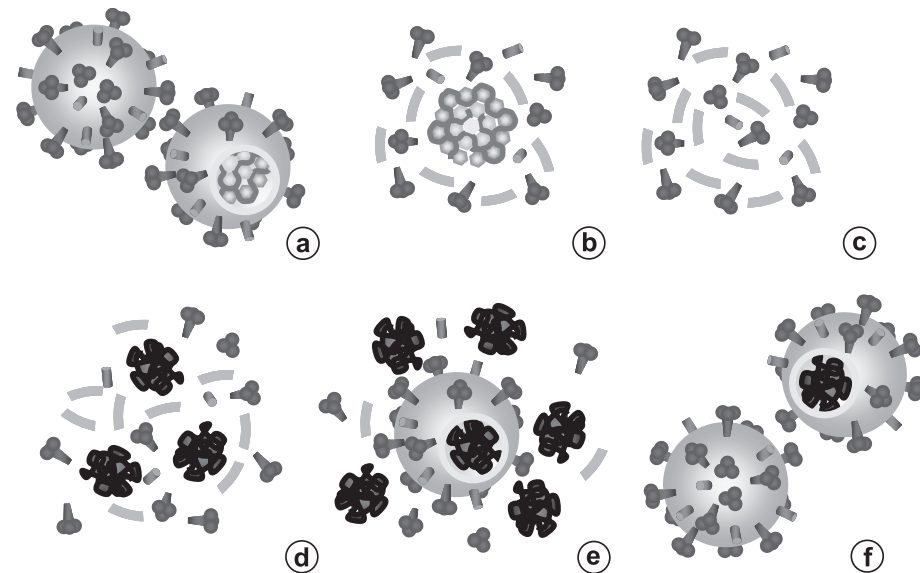
Virossomas ou Immunolipossomas

- Immunolipossomas – são caracterizados pela presença de anticorpos monoclonais ligados a superfície
- Virossomas – lipossomas q contém proteínas virais ou peptídeos fusiogênicos para aumentar a liberação do DNA no endossoma e aumentar as taxas de transfecção;

VIROSSOMAS

- ❑ Sistemas lipídicos contêm proteínas virais para aumentar a liberação do DNA no endossoma e aumentar as taxas de transfecção

- ❑ Almeida et al. (1975)



- ❑ Virossomas catiônicos de influenza

Jamali et al. (2012) Cationic influenza virosomes as an adjuvanted delivery system for CTL induction by DNA vaccination. *Immunol Lett* 148: 77–82

Produto em fase clínica

Produto: SGR-53
Lipossoma/gene p53
Indicação: Tumor sólido
FDA: Fase I
SynerGene Therapeutics



- Gene supressor de tumores vital em seres humanos;
- Numerosos tumores humanos possuem uma perda ou mutação do tipo selvagem do p53 (wtp53).

Produto em fase clínica

Produto: SGR-53

Lipossoma/gene p53

Indicação: Tumor sólido

FDA: Fase I

SynerGene Therapeutics



É um complexo composto do gene p53 encapsulados em um lipossoma que é alvo para as células tumorais por meio de um fragmento de anticorpo de cadeia simples que se liga ao receptor de transferrina (TfRscFv) fixado na parte externa do lipossoma



SISTEMAS BASEADOS EM LIPÍDEOS

SISTEMAS BASEADOS EM POLÍMEROS

Sistemas baseados em polímeros

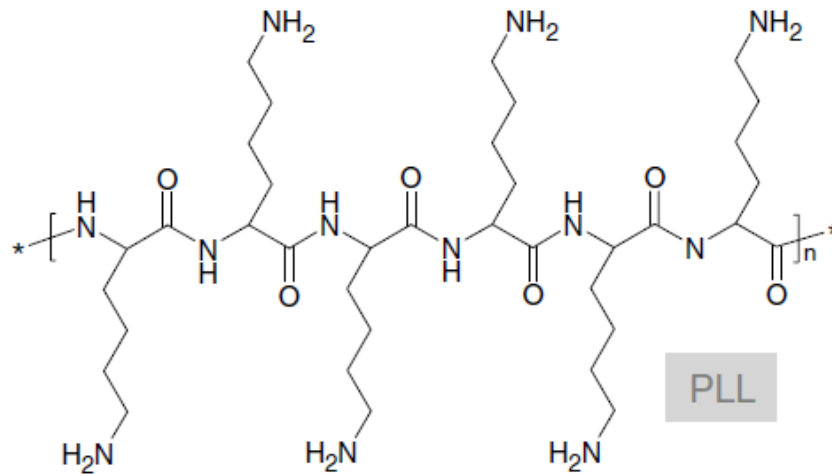
Poliplexos

- Ligação eletrostática entre um polímero catiônico e um ácido nucléico aniônico;
- Resulta na compactação do ácido nucléico em nanopartículas;

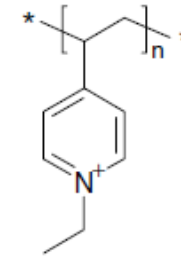
Vantagens

- a) DNA pode ser liberado para os tecidos-alvo de forma sustentada, controlada e previsível;
- b) DNA é efetivamente protegido antes de ser liberado;
- c) Possível uma liberação sítio-específica com uma simples implantação ou injeção direta;

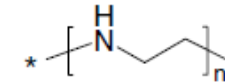
Poliplexos



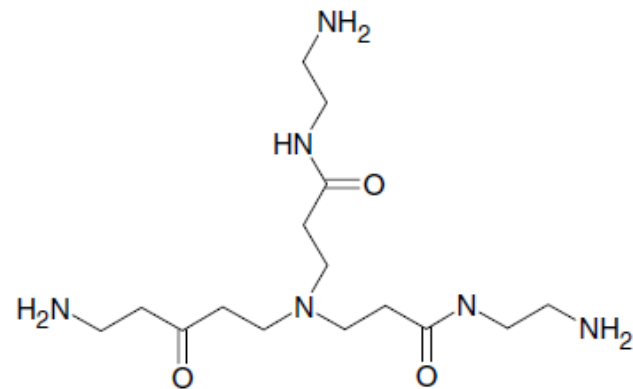
PLL



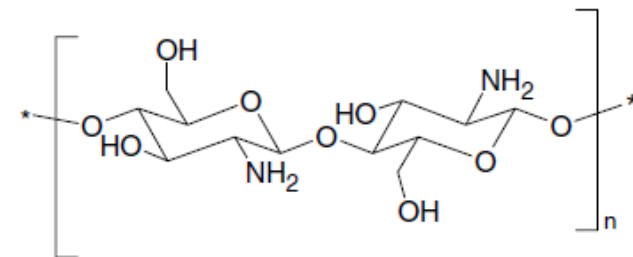
PVP



PEI



pAMEAMA dendrimer (1. Generation)



Chitosan

Mecanismos

- 1) Polímeros catiônicos executam seu efeito tanto por condensar os genes grandes em estruturas menores, bem como por mascarar o residual de carga negativo do DNA;

Mecanismos

Fabiana T.M.C.Vicentini

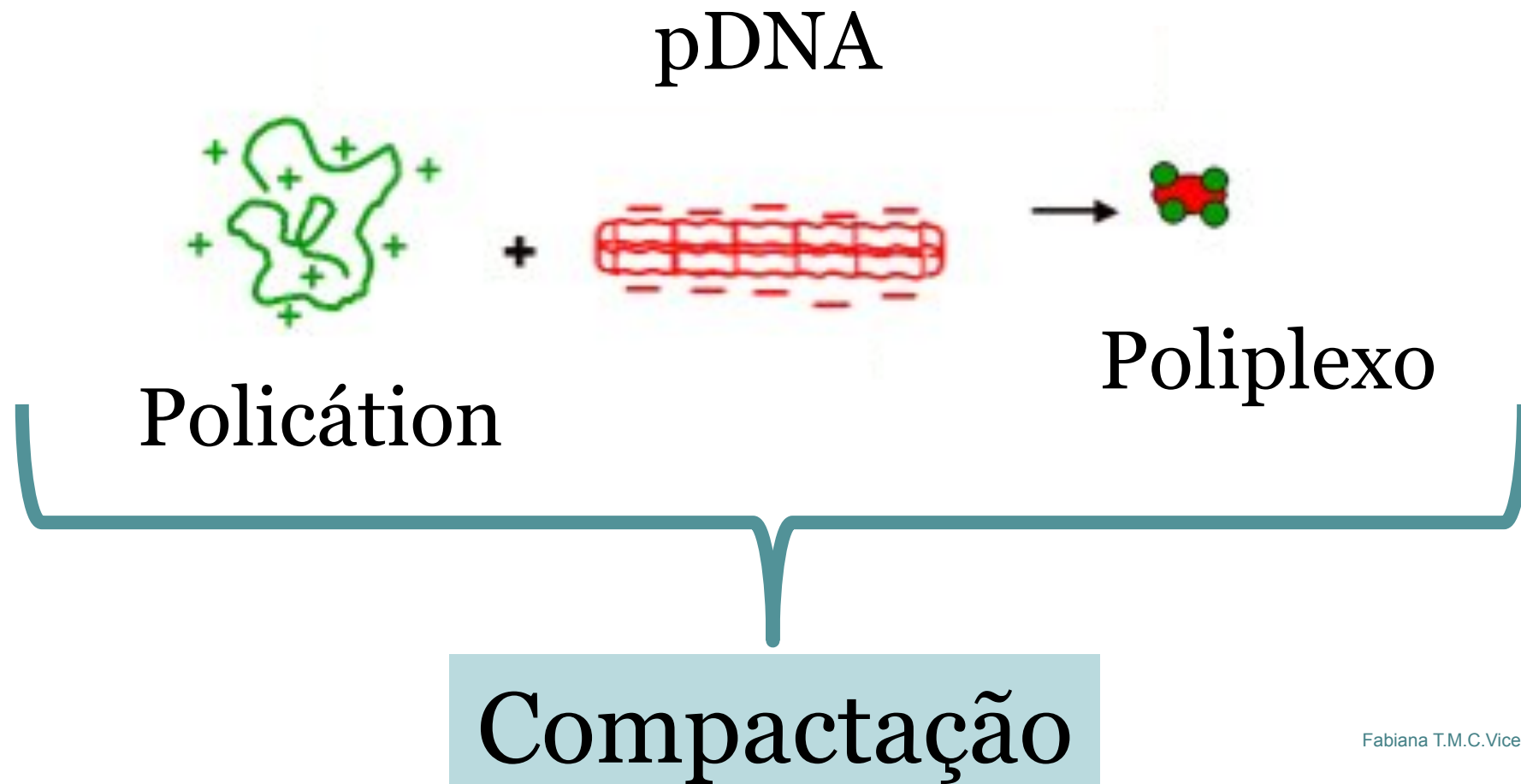
- 2) Polímeros com carga neutra, que não podem se condensar com DNA, são utilizados para proteger o DNA da degradação por nucleases extracelular, mantendo sua integridade e função biológica no local da ação;

Mecanismos

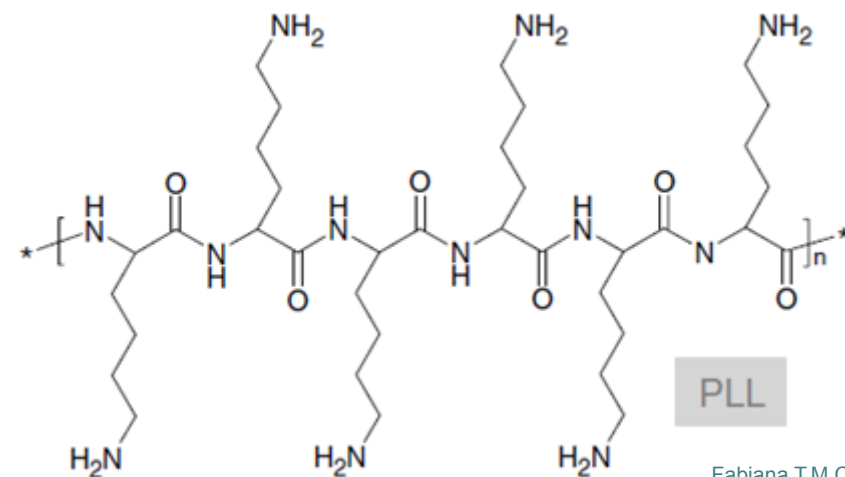
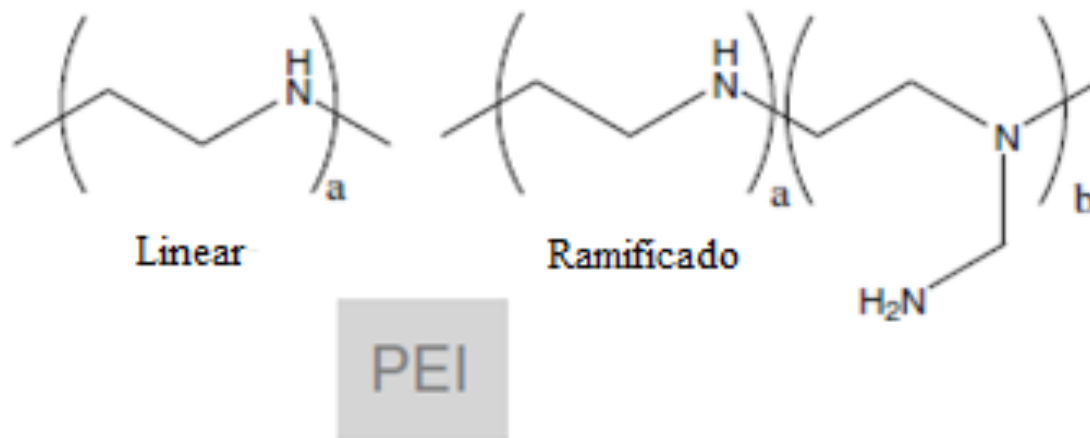
Fabiana T.M.C.Vicentini

3) Nanopartículas poliméricas ou micropartículas a base de PLGA, gelatina, alginato, quitosana, etc, que absorvem ou encapsulam genes, são considerados como importantes matrizes para liberação sustentada de genes

1) Sistemas de liberação de genes baseados em polímeros catiônicos



1) Sistemas de liberação de genes baseados em polímeros catiônicos



PEI

Fabiana T.M.C.Vicentini

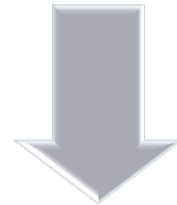
- Polietilenoimina:
 - Polímero sintético;
 - Alta densidade de carga catiônica;
 - Grupo de aminoácidos protonáveis em cada terceira posição;
 - Disponível com uma gama de PMs em formas lineares e ramificadas;
 - Forma ramificada e de baixo peso (25 kDa) - mais indicado para uma liberação bem sucedida ;

PEI

Fabiana T.M.C.Vicentini

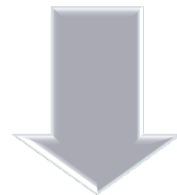
■ Polietilenoimina:

- Poliplexos com PEI ramificado e de maior PM (70-800 kDa)



In vitro

- Administração intravenosa de PEIs menores e lineares



Mais eficiente

PEI

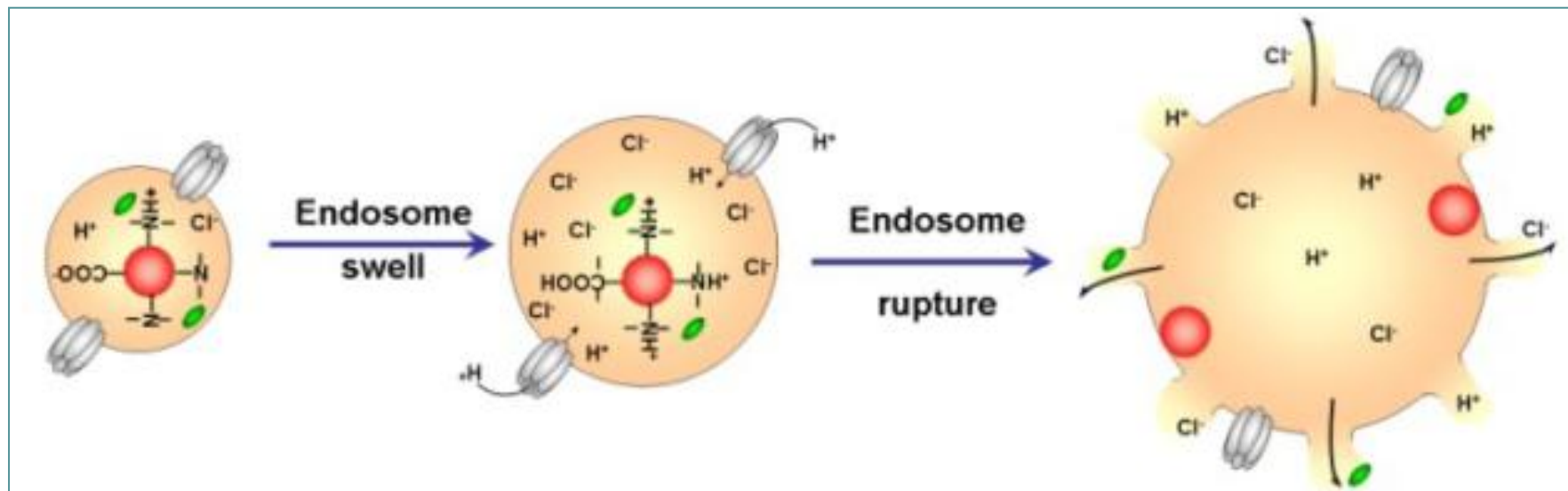
Fabiana T.M.C.Vicentini

- Relação de carga = (+) / (-) = N/P
- Alta densidade de grupos amina:
 - Formação de complexos mais apertados e menores;
 - Atuar como esponja de prótons para facilitar a liberação de DNA a partir dos endossomos;
 - Ajudar na liberação do plasmídeo para entrar no núcleo

PEI

Fabiana T.M.C.Vicentini

- Complexos de PEI/DNA:
 - “Efeito esponja de prótons”



PEI

Fabiana T.M.C.Vicentini

- Complexos de PEI/DNA:
 - Alta eficiência de transfecção;
 - Toxicidade: interação com eritrócitos levando a sua agregação e perigo de embolia;

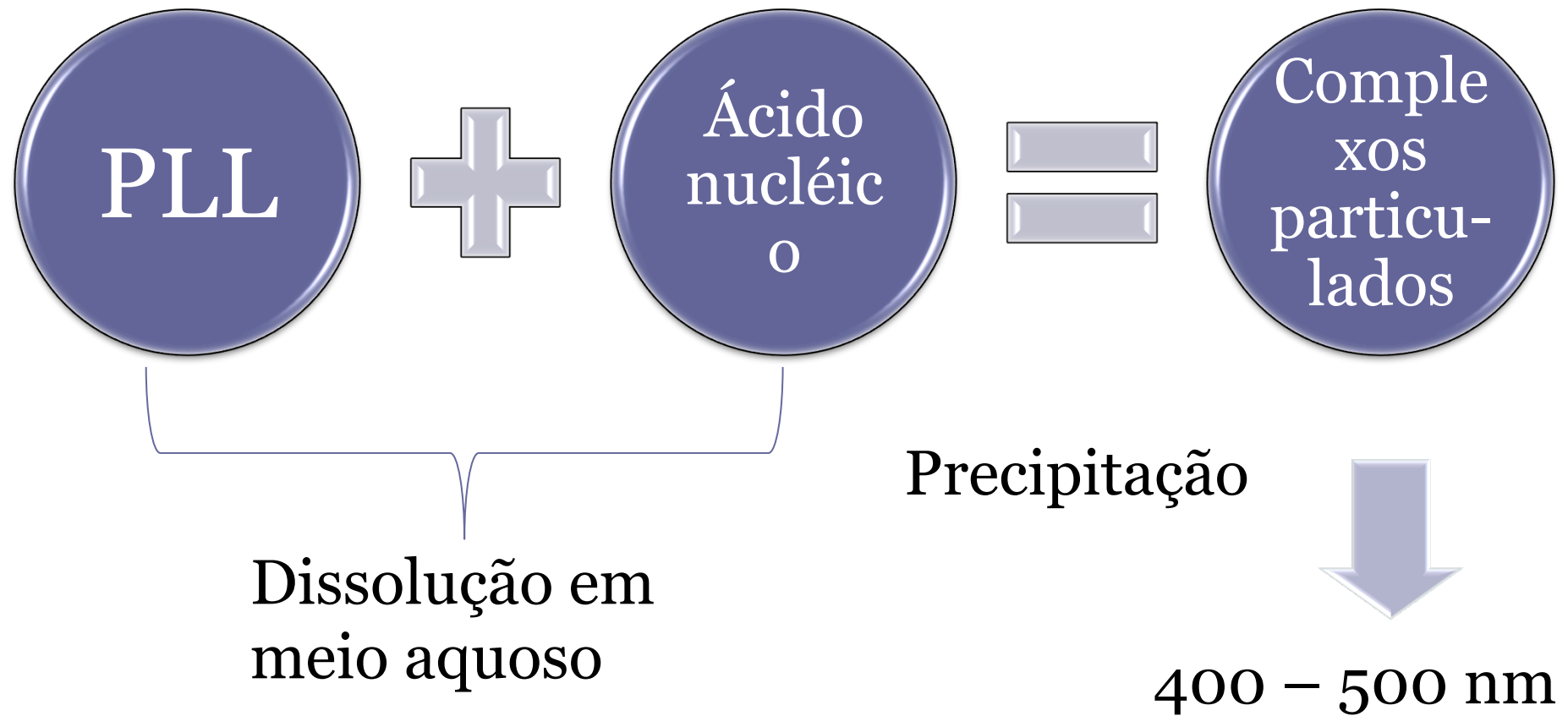


- PEGlação:
 - Reduzir absorção das partículas;
 - Eficácia de transfecção

PLL e PLA

- Polímeros sintéticos;
- Consistem em repetições de resíduos de lisina e arginina, respectivamente;
- São biodegradáveis, fator importante para o uso *in vivo*;
- Podem ser sintetizados de vários tamanhos (de 15 – mais de 1000 resíduos);
- Ligação = carga (+) dos grupos amino e a carga (-) dos grupos fosfato do DNA;
- Contribui para completa neutralização da carga da molécula de DNA.

Obtenção complexos PLL/Ácido nucléico



PLL-Vantagens

- (a) Facilmente disponível;
- (b) Baixo custo;
- (c) Presença de substituintes laterais para a incorporação de ligantes;

PLL-Desvantagens

- (a) Baixa incorporação do DNA plasmidial;
- (b) Baixa eficiência de transfecção;
- (c) Alta toxicidade;
- (d) Formação de subprodutos ácidos durante a degradação do polímero e liberação do DNA;

PLL

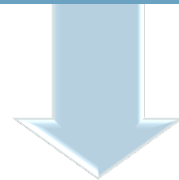
Fabiana T.M.C.Vicentini

Encapsulamento de complexos de PLL/DNA em dispositivos de liberação controlada



Melhorar a prestação de gene

Conjugação de ligantes como transferrina, ácido fólico, ou anticorpos monoclonais



Aumento da captação celular

PLL

Fabiana T.M.C.Vicentini

PEGlação

Redução da toxicidade e
metabolização hepática

Uso de polímero hidrofílico

Redução da opsonização por
proteínas plasmáticas

Poli (2-dimetilamino) etilmetacrilato -pDMAEMA

- Usados em produtos farmacêuticos na tecnologia de microencapsulação;
- Baixa toxicidade geral
- Interessantes como carreadores de transferência de genes;

Após a captação endossomal, novamente as aminas primárias do exterior são protonadas, levando a lise osmótica do endossomo e liberação das partículas pDMAEMA / DNA para o citosol

Poli (2-dimetilamino) etilmetacrilato -pDMAEMA

Eficiência de transfecção

Tamanho e carga das partículas



Tampão HEPES (pH 7,4)

Partículas de pDMAEMA

Potencial zeta = ~25 mV

Tamanho médio = 100 – 200 nm;

Poli (2-dimetilamino) etilmetacrilato -pDMAEMA

- ❖ Eficiência de transfecção de poliplexos de pDMAEMA é afetada pela topologia do DNA:
 - DNA linear (ex:oligonucleotídeos antisense) é adsorvido mais fortemente do que DNA plasmidial circular;
 - Influência negativa sobre a eficiência da transferência de genes;
 - DNA circular é o preferido;

Ácido poli-{- (4-aminobutil)-L-glicólico} - PLAGA

- Capaz de se condensar de forma eficiente com DNA;
- Biodegradável;
- Menos citotóxico que PLL;
- Aumenta a transfecção em cultura de células;

2) Sistemas de liberação de genes baseados em polímeros neutros

- Desvantagens intrínsecas dos carreadores catiônicos
- Desenvolvimento de sistemas de liberação de genes de carga neutra

2) Sistemas de liberação de genes baseados em polímeros neutros

- PVP (polivinilpirrolidona);
- PVA (álcool polivinílico)

- Função básica é um efeito protetor contra degradação por nucleases;
- Eficiência de transfecção é sempre relativamente baixa;
- Em combinação com outros polímeros catiônicos

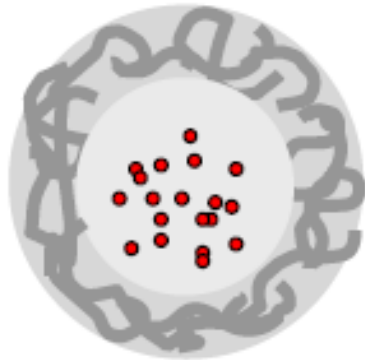
2) Sistemas de liberação de genes baseados em polímeros neutros

- Estabilizar a emulsão formado durante a preparação de partículas;
- Podem influenciar as propriedades das partículas formadas, sendo que o tipo e [] afetam tamanho de partículas;
- Modificando as propriedades de partículas, tais como potencial zeta e mucoadesão;
- Outros polímeros são: derivados celulósicos como metilcelulose (MC), hidroxietilcelulose (HEC), hidroxipropilcelulose (HPC) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), assim como gelatina tipo A e B, carbomer e poloxamer

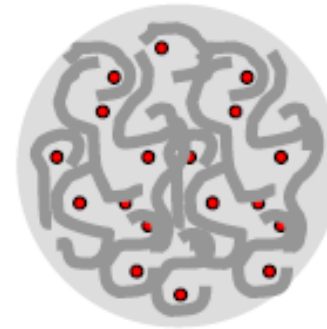
3) Sistemas de liberação de genes baseados em nano ou micropartículas poliméricas

- Encapsulamento do ácido nucléico pode protegê-lo contra a degradação até sua liberação;
- Controle da liberação do ácido nucléico - sistema de liberação pode ser adaptado para uma aplicação em particular;
- A escolha do polímero e sua forma física determinam as características da liberação do DNA

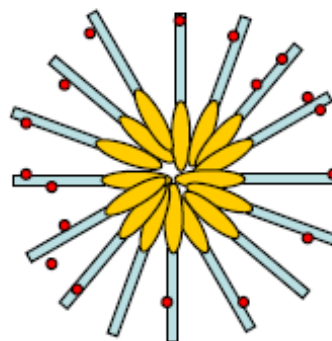
Sistemas nanoestructurados poliméricos



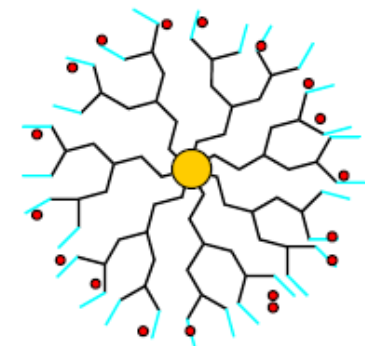
Nanocápsulas poliméricas



Nanoesferas poliméricas



Micelas poliméricas

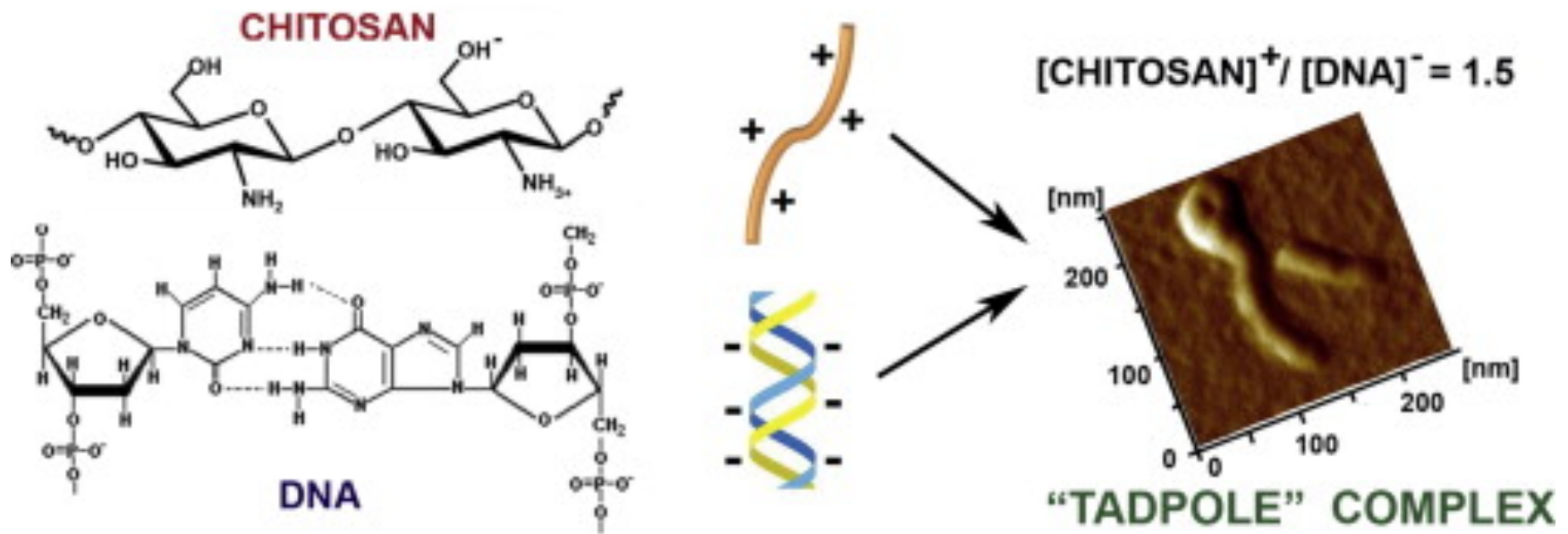


Dendrimeros poliméricos

Nanopartículas

- ❖ Sistemas coloidais;
- ❖ Sistemas poliméricos biodegradáveis e biocompatíveis;
- ❖ Diâmetro de 10-1000 nm;
- ❖ Agente terapêutico aprisionado ou adsorvido ou ligado quimicamente a matriz polimérica;
- ❖ Podem ser endocitadas pelas células, o que efetivamente aumenta a captação celular;
- ❖ DNA incorporado nas nanopartículas são liberados lentamente com a hidrólise da matriz polimérica;
- ❖ Expressão sustentada do gene terapêutico no tecido-alvo

Quitosana



Polímero origem natural

Desacetilação da quitina

Versátil – solubilidade, estabilidade e direcionamento

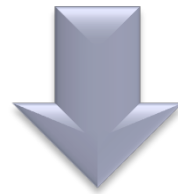
Propriedades bioadesivas em condições fisiológicas

Quitosana

- Polissacarídeo biodegradável com perfil de toxicidade bem estabelecido;
- Produzida pela hidrólise da quitina, principalmente de crustáceos;
- Devido às suas funções amina livres também pode ser protonada ($pK_a = 5,6$)
- Complexos de quitosana/DNA apresentaram potência de transferência de genes similar a complexos com PEI em estudos *in vitro*;

Quitosana

- Quase insolúvel em água em pH neutro e solúvel em pH ácido;
- Derivados quaternários trimetilados

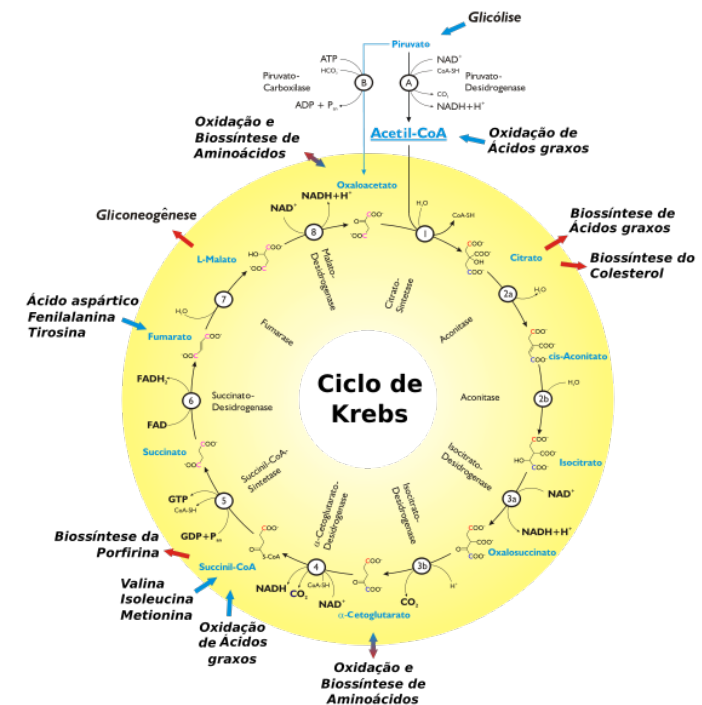
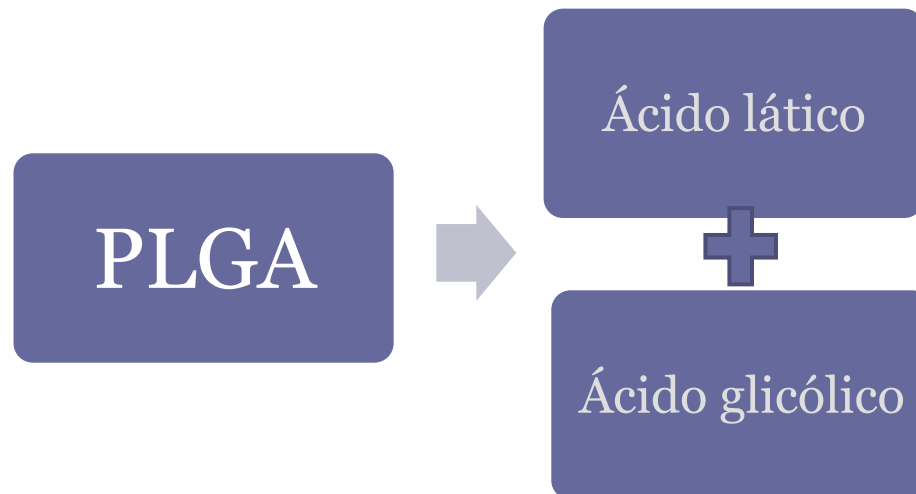


- Solúveis em condições fisiológicas e facilmente complexados com moléculas de DNA

PLGA

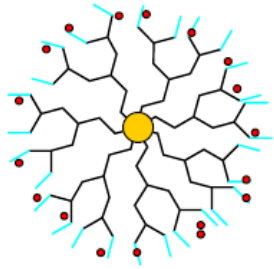
Fabiana T.M.C.Vicentini

- Polímero biocompatível e biodegradável empregado com frequência na formulação de nanopartículas / microesferas utilizadas como sistemas carreadores de genes;



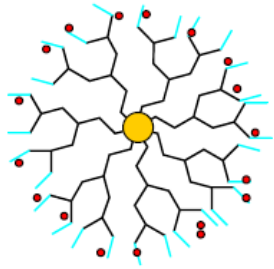
NPs PLGA

- Fornecem uma liberação sustentada;
- Capazes de atravessar a barreira endossomal e liberar os agentes terapêuticos encapsulados no citoplasma;



Dendrímeros

- São polímeros sintéticos altamente ramificados;
- Macromoléculas globulares com muitos braços que emanam de um núcleo central;
- Sistemas moleculares ordenados com dimensões nanométricas e alta densidade de repetição e / ou unidades funcionais;
- Tamanhos de partículas variando de 5 a 100 nm;
- Apesar de seu alto PM são solúveis em água;



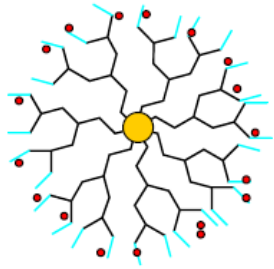
Dendrímeros

Fabiana T.M.C.Vicentini

N° e tipo de
funções amina
na superfície
da partícula



**Características
físicas e
químicas**



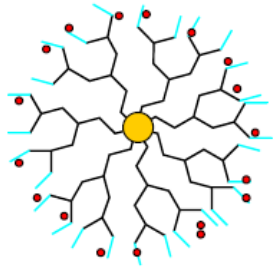
Dendrímeros

Fabiana T.M.C.Vicentini

Excelentes veículos para transferência de gene



- Altas taxas de adsorção do DNA;
- Protonação das funções amina após captação endossomal



Dendrímeros

Fabiana T.M.C.Vicentini

- Toxicidade:
 - Forte interação com eritrócitos, causando hemólise;
 - Funções amina primária livres na superfície da partícula são as principais responsáveis

- Citotoxicidade

Sistemas nanoestruturados

- Natureza e o número de componentes;
- Relação de carga entre o cátion e o grupo fosfato do ácido nucléico (+/-);
- Concentração dos componentes;
- Ordem e a taxa de mistura dos componentes;
- Concentração de tensoativos ou a porcentagem de solvente orgânico utilizados no processo obtenção do sistema;
- Força iônica e temperatura de preparo

Sistemas nanoestruturados

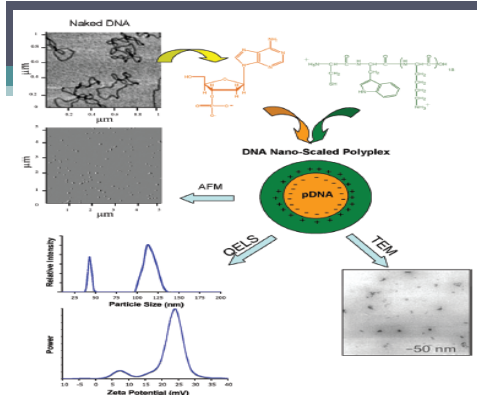
- ❖ Quantidade de policação utilizada

Tamanho e carga destes complexos

- ❖ Força iônica e pH do tampão

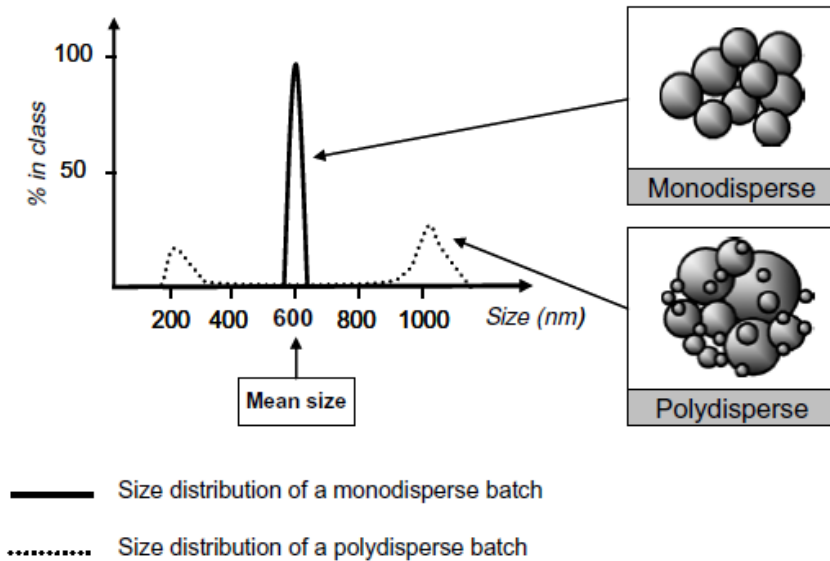
Formato e polidispersividade

Caracterização

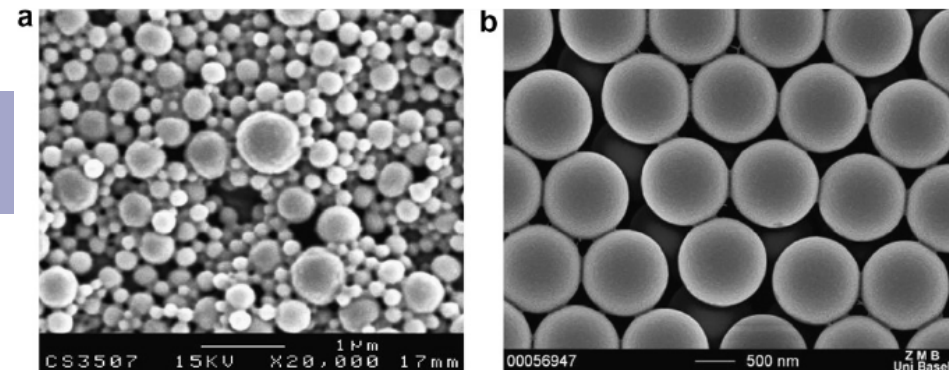


Fernandez & Rice, 2009

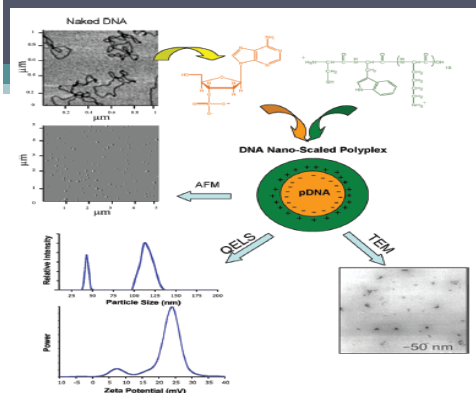
Técnica de espalhamento dinâmico (*Light Scattering*)



Diferentes tipos de microscopia

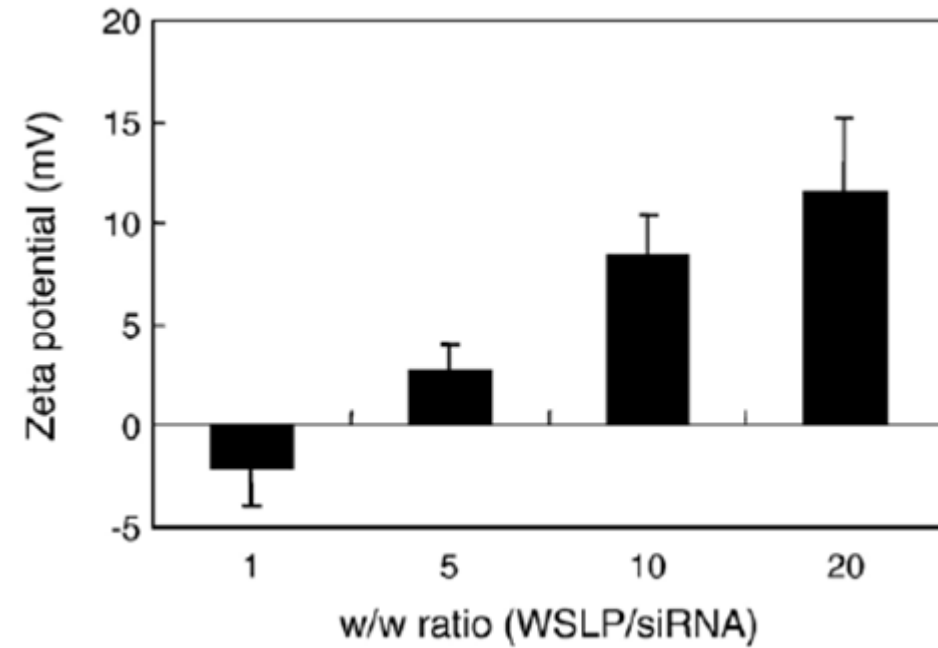


Caracterização



Fernandez & Rice, 2009

Potencial Zeta



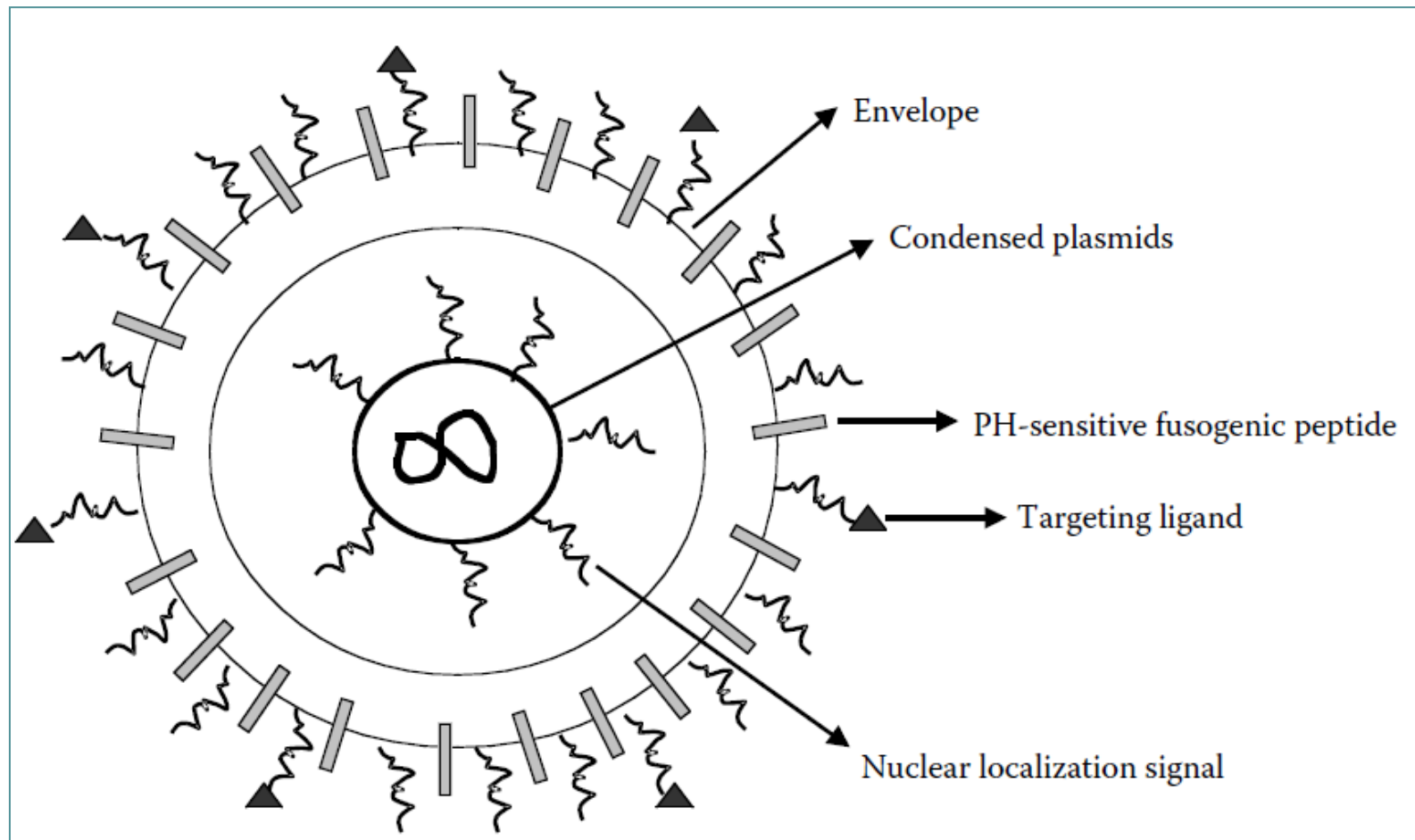
Eletroforese em gel de agarose

w/w 0 1 2 5 7 10 20



Kim et al., 2007

Funcionalização dos Sistema de liberação de genes

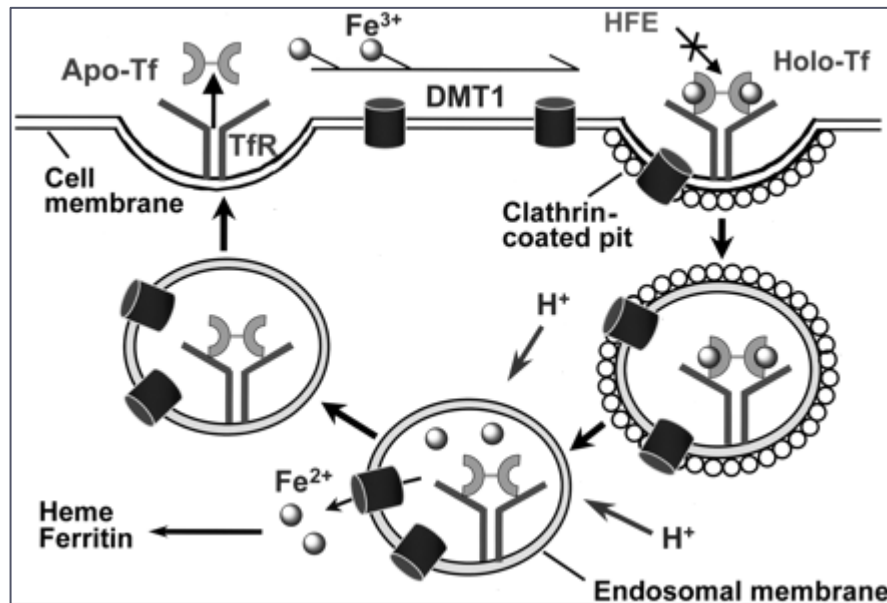


Liberação de genes mediada por receptores

- Direcionamento para tipos celulares específicos;
- Melhorar liberação intracelular;

Oportunidade para conseguir a liberação sítio-específica de complexos de DNA

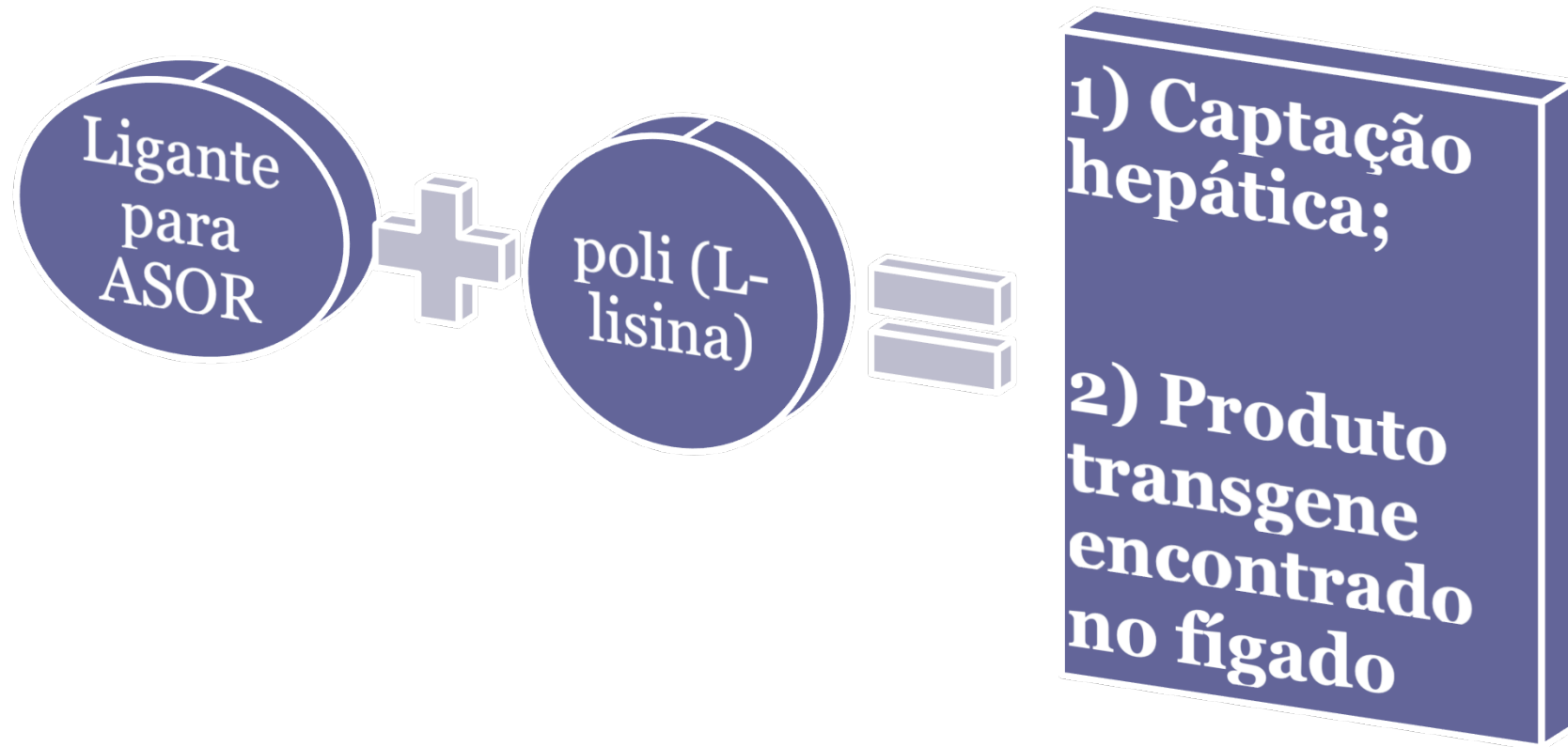
Liberação de genes mediada por receptores



- Relação estrutura-atividade bem estabelecida;
- Domínio de ligação determinado;
- Obtenção de receptores com alta afinidade;
- Mecanismos e vias de internalização *in vivo* caracterizados

Receptor de asialoglicoproteína

- Receptor hepático;



Outros exemplos

- Receptor de transferrina;
- Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF);
- Receptor de imunoglobulina polimérica;
- Receptor da célula CD3-T;
- Lectinas;
- Receptor folato;
- Receptor da proteína circunsporozoíta da malária;
- Integrinas;
- Receptor de insulina;
- Receptor de trombomodulina

Obstáculos

- Dificuldade de obtenção em quantidade suficiente e alta pureza dos ligantes a receptores (tanto proteínas como complexos de carboidratos);
- Estes ligantes geralmente são ligados covalentemente a poli (L-lisina), criando assim um novo epítipo antigênico;

Obstáculos

- Polidispersão poli (L-lisina) disponível comercialmente



- Falta de reprodutibilidade na formulação;
- Obtenção de sistemas estáveis;

- Poli (L-lisina) apresenta uma conformação:

- Espiral (pH neutro);
- Hélice (pH alcalino);
- Mistura de conformações (pH 7,4);

- Tóxicas para as células vivas, em concentrações nM,



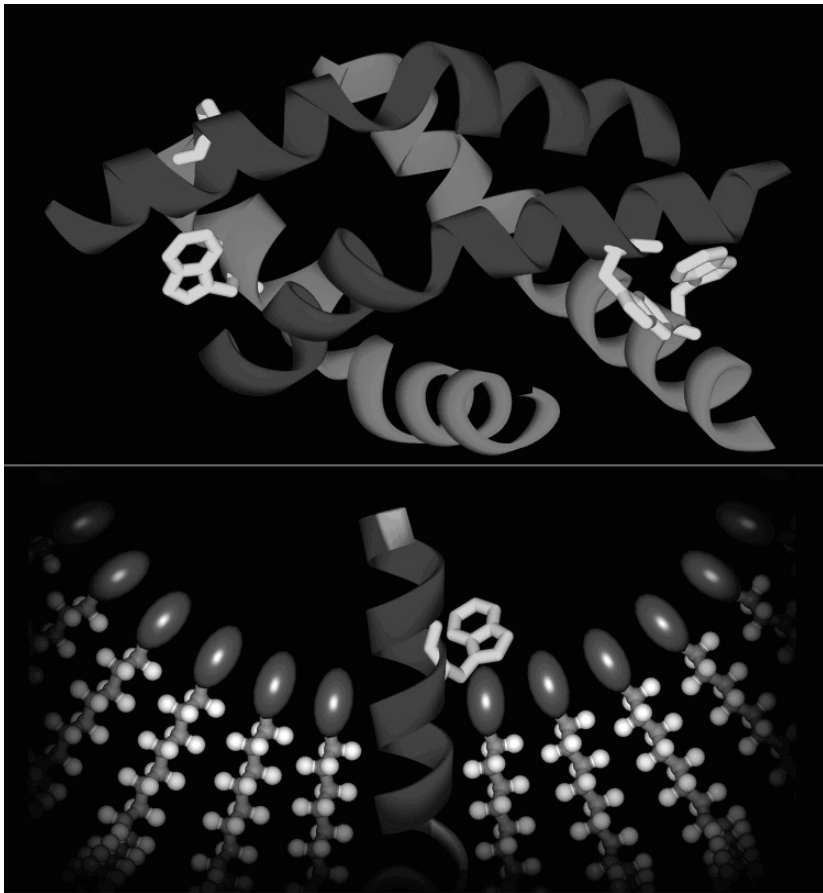
Limita sua aplicação geral

Peptídeos fusogênicos

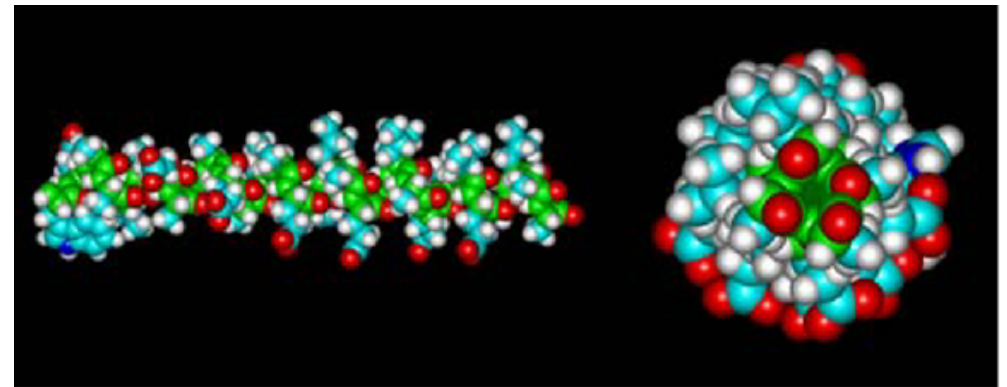
- ❑ Peptídeos de 20-30 aminoácidos;
- ❑ Estrutura anfifílicas α helicoidal;
- ❑ Permite a inserção da face hidrofóbica na membrana celular resultando na formação de poros e lise

- ❑ [] e pH dependente
- ❑ Peptídeos fusogênicos aniônicos:
 - pH neutro
 - pH 4-5

Peptídeos fusogênicos

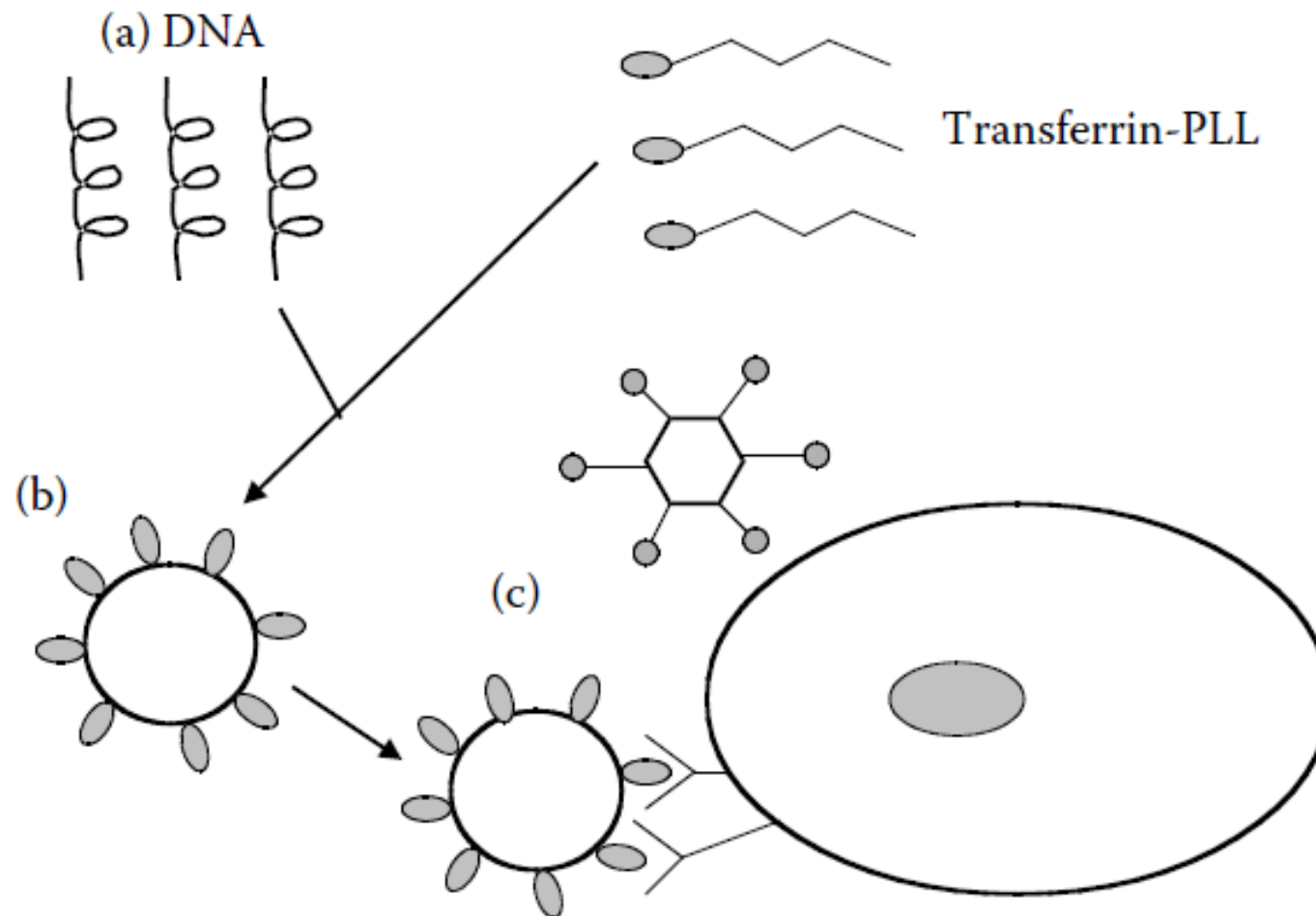


Melitina

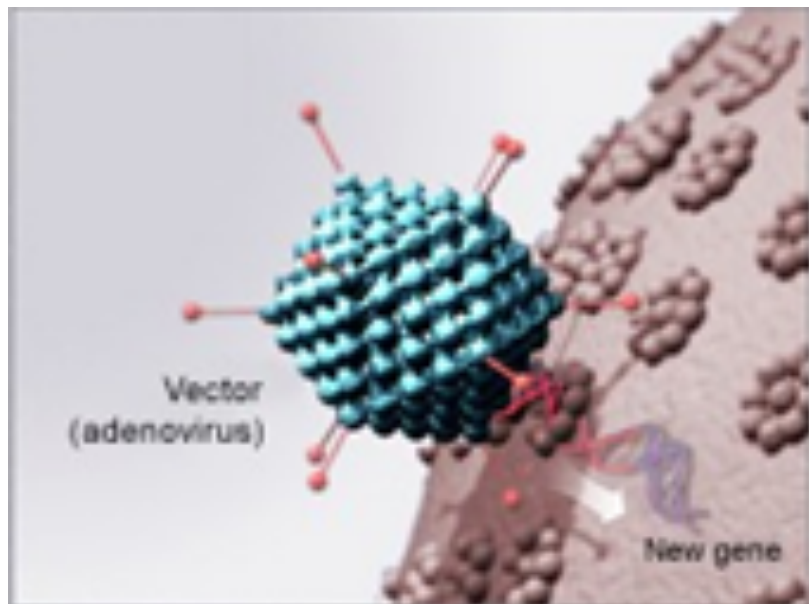


GALA

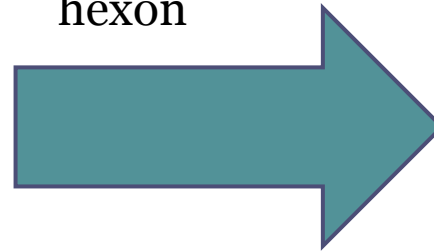
Vetores híbridos (componentes virais e não virais)



Vetores híbridos (componentes virais e não virais)



Proteína hexon

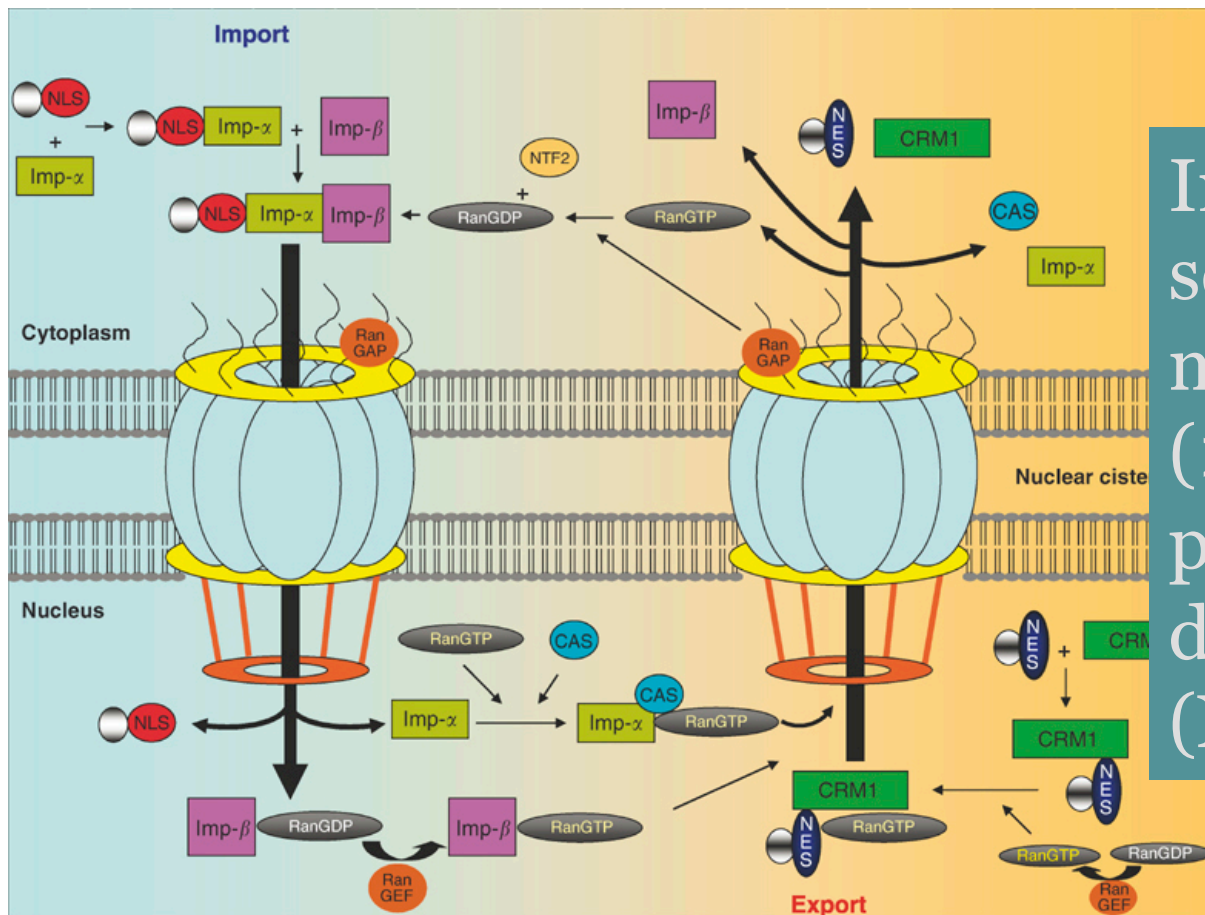


PEI/DNA



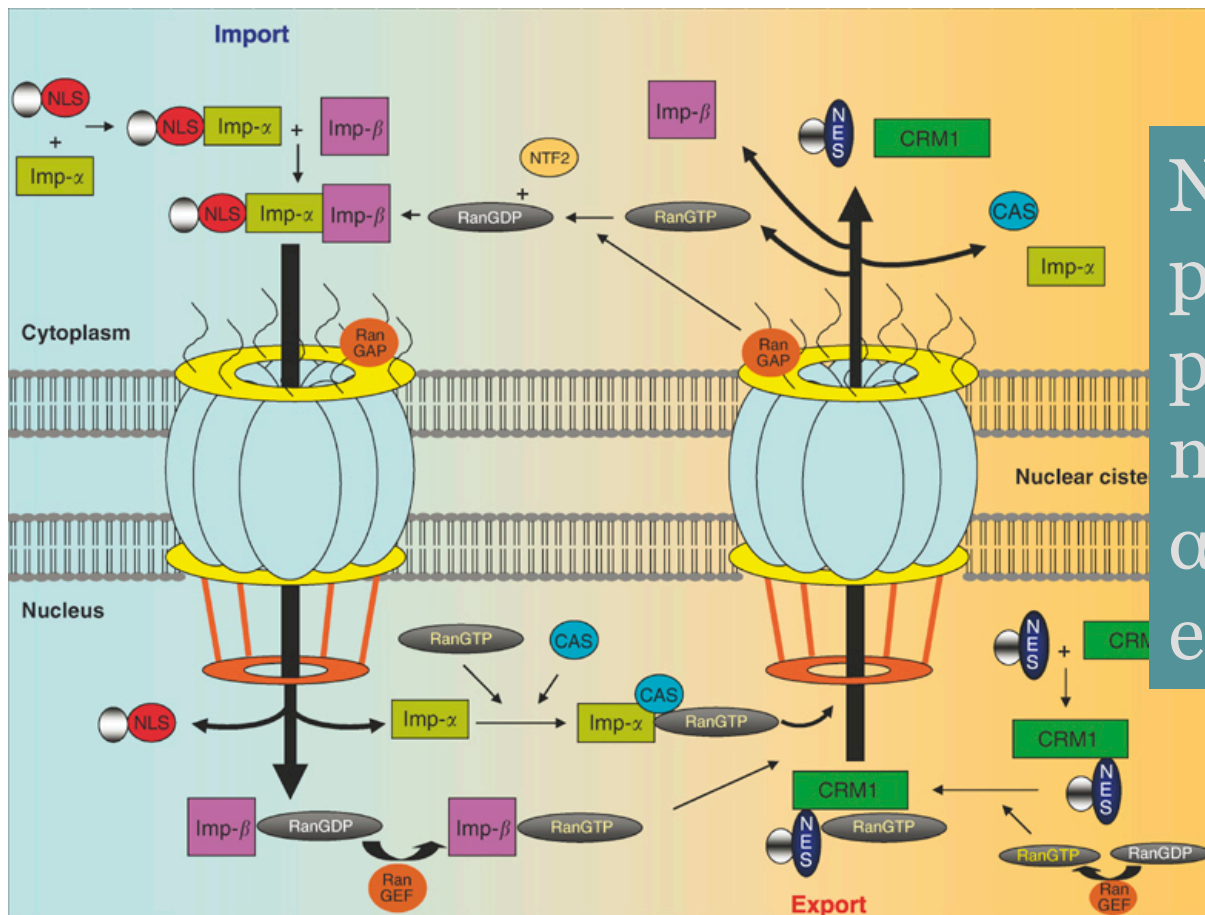
Entrega nuclear;
Expressão do transgene

Peptídeos sinalizadores de localização nuclear



Importação nuclear seletiva de macromoléculas (> 40 kDa) é mediada por sinal de localização nuclear (NLS)

Peptídeos sinalizadores de localização nuclear



NLS são reconhecidos por um complexo de proteínas de heterodiméricas: importina- α (Kap- α) e importina- β (Kap- β)