

Título em Português:	Desenvolvimento de nanopartículas de PLGA encapsuladas com bevacizumabe na terapia do carcinoma pulmonar
Título em Inglês:	Nanoencapsulation of bevacezumab in PLGA nanoparticles for lung cancer therapy
Autor:	Maria Vitoria Silva Pereira
Instituição:	Universidade de São Paulo
Unidade:	Instituto de Física de São Carlos
Orientador:	Valtencir Zucolotto
Área de Pesquisa / SubÁrea:	Física da Matéria Condensada
Agência Financiadora:	CNPq - PIBIC

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA ENCAPSULADAS COM BEVACIZUMABE NA TERAPIA DO CARCINOMA PULMONAR

Maria Vitória Silva Pereira

Camila Rodero, Isabella Suzuki

Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

Universidade de São Paulo

Mariavitoriasp@usp.br

Objetivos

Bevacizumabe é um anticorpo monoclonal recombinante inibidor de fatores pró-angiogênicos, porém que possui limitações como curto tempo de meia-vida *in vivo*. O PLGA é um polímero biodegradável utilizado para o desenvolvimento de nanopartículas para entrega de fármacos e que oferece uma alternativa para o aumento da eficiência do BVZ. O projeto tem como objetivo o desenvolvimento e caracterização de um sistema de liberação baseado em nanopartículas de PLGA para encapsulação e entrega do bevacizumabe no tratamento do carcinoma pulmonar (NSCLC).

Métodos e Procedimentos

As nanopartículas de PLGA-BVZ foram obtidas de duas formas utilizando a metodologia de emulsificação e evaporação de solvente. O diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (PDI) e Potencial Zeta das nanopartículas foram estipulados através do Zetasizer com base na dispersão de luz dinâmica (DLS). A estabilidade das nanopartículas foi analisada pelas medidas de tamanho, PDI e potencial zeta durante 120 dias de armazenamento a 4°C. Foi realizada análise de rastreamento (NTA) para verificar o diâmetro e a concentração de

nanopartículas presentes em um determinado volume de amostra.

A análise em espectroscopia no infravermelho foi feita para investigar possíveis interações entre os componentes da nanopartícula de PLGA com o anticorpo BVZ.

A concentração de uma mesma amostra de bevacizumabe foi medida por meio do método de análise de proteína por A280, no equipamento Nanodrop One ao longo de 150 dias de forma a avaliar sua estabilidade quando não encapsulado nas nanopartículas e armazenado nas mesmas condições (4 °C).

A morfologia das nanopartículas foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A eficiência de encapsulamento do BVZ foi quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

O perfil de liberação do BVZ das nanopartículas de PLGA foi determinado coletando alíquotas da amostra em agitação em intervalos pré-determinados. A concentração do BVZ foi determinada por CLAE e a porcentagem de liberação foi calculada com base na quantidade de BVZ no sobrenadante em comparação com a quantidade encapsulada.

A avaliação da viabilidade celular *in vitro* das PLGA-BVZ foi realizada em células de linhagem A549, células malignas derivadas de carcinoma pulmonar humano, e HUVEC, células endoteliais da veia umbilical humana, de forma

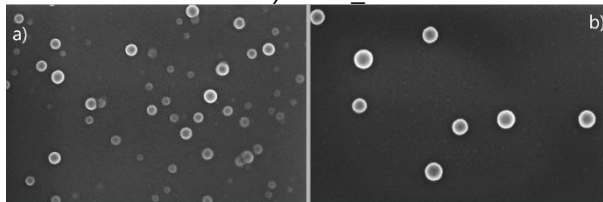
a determinar a citotoxicidade e ação anti-VEGF do BVZ encapsulado.

Resultados

As PLGA-BVZ apresentaram tamanho de 171,40 nm, índice de polidispersão (PDI) de 0,14 e potencial zeta de -23,90 mV. A partir dos resultados obtidos com a análise de estabilidade foi possível afirmar que as nanopartículas sintetizadas mantiveram sua estabilidade durante o período analisado.

A análise em espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier foi realizada para investigar possíveis interações entre os componentes da nanopartícula de PLGA com o anticorpo BVZ e indicaram interações não-covalentes específicas entre a nanopartícula de PLGA e o anticorpo BVZ. A avaliação da estabilidade do BVZ não encapsulado demonstrou um aumento de concentração que, por meio de análises de suas ligações por espectroscopia, indicaram possível formação de agregados da proteína. A caracterização por MEV demonstrou que as formulações com e sem BVZ possuem características similares, com forma esférica e superfície lisa, sem formação de grandes aglomerados de nanopartículas, como demonstrado na Figura 1. Foi obtida uma eficiência de encapsulamento de 49% e por meio da determinação do perfil de liberação foi possível evidenciar que as nanopartículas contribuíram para o controle das taxas de liberação do BVZ e demonstram o potencial do nanossistema para liberação. Por fim, a viabilidade celular demonstrou citotoxicidade das nanopartículas e indicou sucesso da ação do BVZ em inibir a proliferação celular.

Figura 1: Imagens de MEV das nanopartículas: a) PLGA e b) PLGA_BVZ



Conclusões

Neste projeto foi realizada e caracterizada a síntese de nanopartículas de PLGA encapsuladas com BVZ para o tratamento do carcinoma pulmonar. O tamanho obtido para as nanopartículas foram equivalentes aos encontrados na literatura, indicando uma metodologia de síntese eficiente. Os valores baixos de PDI revelaram homogeneidade na distribuição de tamanho das partículas e o potencial zeta negativo obtido apresenta vantagem quanto à não adsorção significativa de proteínas e melhor interação com membranas celulares. A análise da curva de liberação evidenciou que as nanopartículas contribuíram para o controle das taxas de liberação do BVZ e demonstra o potencial do nanossistema para liberação. Assim, concluiu-se que a síntese realizada foi promissora em encapsular e liberar o fármaco de forma controlada, além de proporcionar um meio para o aumento da estabilidade e efetividade do bevacizumabe, demonstrando o potencial desse sistema para futuras aplicações.

Agradecimentos

O presente projeto foi desenvolvido com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq através da concessão de bolsa de estudo de Iniciação Científica, nº de processo 126207/2022-4. Agradeço ao laboratório Gnano pela estrutura e apoio e ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo que proporcionou a base necessária no desenvolvimento do projeto.

Referências

- DANHIER, F. et al. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, v. 161, n. 2, p. 505–522, 2012.
- MUKHERJI, S.K. Bevacizumab (Avastin). *American Journal of Neuroradiology*, v. 31, p. 235–236, 2010.
- SOUZA, F. et al. A new paradigm for antiangiogenic therapy through controlled release of bevacizumab from PLGA nanoparticles. *Scientific Reports*. v. 1, n. 7, p. 3736, 2017.

NANOENCAPSULATION OF BEVACIZUMAB IN PLGA NANOPARTICLES FOR LUNG CANCER THERAPY

Maria Vitória Silva Pereira

Camila Roderio, Isabella Suzuki

Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

Universidade de São Paulo

Mariavitoriasp@usp.br

Objectives

Bevacizumab is a recombinant monoclonal antibody that inhibits pro-angiogenic factors, but has limitations such as a short in vivo half-life. PLGA is a biodegradable polymer used for the development of nanoparticles for drug delivery and offers an alternative to increase the efficiency of BVZ. This project aims to develop and characterize a delivery system based on PLGA nanoparticles for encapsulation and delivery of bevacizumab (BVZ) in the treatment of lung cancer (NSCLC).

Materials and Methods

BVZ encapsulated PLGA nanoparticles were obtained through the solvent emulsification-evaporation method.

The hydrodynamic diameter, polydispersity index (PDI) and Zeta Potential of the nanoparticles were stipulated using the Zetasizer based on dynamic light scattering (DLS). The stability of the nanoparticles was analyzed by measuring their size, PDI and zeta potential during 120 days of storage at 4°C.

Tracking analysis (NTA) was performed to verify the diameter and concentration of nanoparticles present in a given sample volume.

The analysis with Fourier-transform infrared spectroscopy was performed to investigate

possible interactions between the components of the PLGA nanoparticles with BVZ.

The concentration of the same bevacizumab sample was measured using the A280 protein analysis method, in the Nanodrop One equipment, over 150 days in order to assess its stability when not encapsulated in nanoparticles and stored under the same conditions (4 °C).

The morphology of the nanoparticles was characterized by scanning electron microscopy (SEM).

Quantification of the efficiency of BVZ encapsulation in nanoparticles was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

The BVZ release profile of PLGA nanoparticles was determined by collecting aliquots of the sample in agitation at predetermined intervals.

The released amount of bevacizumab in the supernatant was quantified by HPLC and the percentage of released BVZ was calculated in comparison with the encapsulated amount.

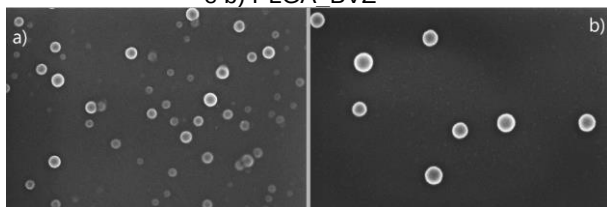
The evaluation of the in vitro cell viability of PLGA-BVZ was carried out in A549, malignant cells derived from human lung carcinoma, and HUVEC cells, human umbilical vein endothelial cells, in order to determine the cytotoxicity and anti-VEGF action of the encapsulated BVZ.

Results

The PLGA-BVZ presented a size of 171.40 nm, polydispersion index (PDI) of 0.14 and zeta potential of -23.90 mV. From the results obtained from the stability analysis, it was possible to assert that the synthesized nanoparticles maintained their stability during the analyzed period.

The analysis with Fourier-transform infrared spectroscopy was performed to investigate possible interactions between the components of the PLGA nanoparticles with BVZ and indicated specific non-covalent interactions between the PLGA nanoparticle and the BVZ antibody. The stability analysis of the non-encapsulated BVZ showed an increase in concentration which, through analysis with Fourier-transform infrared spectroscopy, indicated the possible formation of protein aggregates. Characterization by SEM demonstrated that the formulations with and without BVZ have similar characteristics, with a spherical shape and smooth surface, without the formation of large nanoparticle aggregation, as shown in Figure 1. An encapsulation efficiency of 49% was obtained and by the determination of the release profile it was possible to show that the nanoparticles contributed to the control of BVZ release rates and demonstrate the potential of the nanosystem for release. Finally, cell viability demonstrated the cytotoxicity of the nanoparticles and indicated that BVZ was successful in inhibiting cell proliferation.

Figure 1: SEM images of the nanoparticles: a) PLGA e b) PLGA BVZ



Conclusions

In this project, the synthesis of PLGA nanoparticles encapsulated with BVZ for the treatment of lung carcinoma was carried out

and characterized. The size obtained for the nanoparticles were equivalent to those found in the literature, indicating an efficient synthesis methodology. The low PDI values revealed homogeneity in the particle size distribution and the negative zeta potential obtained presents an advantage regarding the non-significant adsorption of proteins and better interaction with cell membranes. The analysis of the release curve showed that the nanoparticles contributed to the control of BVZ release rates and demonstrates the potential of the nanosystem for release. Thus, it was concluded that the synthesis performed was promising in encapsulating and releasing the drug in a controlled manner, in addition to providing a means to increase the stability and effectiveness of bevacizumab, demonstrating the potential of this system for future applications.

Acknowledgements

This project was developed with the support of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq through the granting of a Scientific Initiation grant, process number 126207/2022-4. I would like to thank the Gnano laboratory for the structure and support and the Institute of Physics of São Carlos of the University of São Paulo that provided the necessary basis for the development of the project.

References

- DANHIER, F. et al. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, v. 161, n. 2, p. 505–522, 2012.
- MUKHERJI, S.K. Bevacizumab (Avastin). *American Journal of Neuroradiology*, v. 31, p. 235–236, 2010.
- SOUZA, F. et al. A new paradigm for antiangiogenic therapy through controlled release of bevacizumab from PLGA nanoparticles. *Scientific Reports*. v. 1, n. 7, p. 3736, 2017.