

Título em Português: Desenvolvimento e Aplicação de Nanofármacos a partir do Reaproveitamento de Agentes Terapêuticos contra a Covid-19.

Título em Inglês: Development and Application of Nanopharmaceutics from Repurposing of Therapeutic Agents against Covid-19.

Autor: Igor dos Santos Pedriz

Instituição: Universidade de São Paulo

Unidade: Instituto de Física de São Carlos

Orientador: Valtencir Zucolotto

Área de Pesquisa / SubÁrea: Bioengenharia

Agência Financiadora: Outros

Desenvolvimento e Aplicação de Nanofármacos a partir do Reaproveitamento de Agentes Terapêuticos contra a Covid-19: Estudos de Modulação do Muco.

Igor dos Santos Pedriz

Leonardo Miziara Barboza Ferreira

Ana Elisa Tognoli Leite

Valtencir Zucolotto

Universidade de São Paulo campus São Carlos/USP

igorspedriz@usp.br

Objetivos

O COVID-19 causou mais de 6 milhões de mortes e, apesar da vacinação em massa, o tratamento para esta doença ainda é necessário. O remdesivir (RDV) é o primeiro medicamento antiviral aprovado para o tratamento de COVID-19 moderado a grave. No entanto, o alto preço dessa droga, sua meia-vida curta, baixa solubilidade e efeitos colaterais limitam sua aplicação clínica. Para superar esse problema, este estudo teve como objetivo desenvolver nanopartículas à base de ácido polilático-co-glicólico (PLGA) carregadas com RDV (NP@RDV) como uma nova estratégia terapêutica contra o COVID-19. As nanopartículas foram planejadas para administração pulmonar, no entanto, a barreira protética (muco) existente no epitélio das mucosas deve ser transposta a fim de aumentar a biodisponibilidade do fármaco. Para tanto, a nanoformulação foi suplementada pela adição de quatro diferentes combinações de biopolímeros (quitosana, COS, e dextransa, DS) a diferentes concentrações e proporções entre os mesmos a fim de analisar e entender como tais agentes irão modular a interação do fármaco com a barreira da mucosa.

Métodos e Procedimentos

No processo de obter as nanopartículas, duas soluções são preparadas, uma fase orgânica (acetona) contendo o PLGA e o RDV e outra aquosa que apresenta um agente surfactante, Kolliphor 188 essencial para evitar agregados nas etapas seguintes: supersaturação, nucleação, crescimento e coagulação das estruturas em nanoesferas.

As proporções de COS e DS na suplementação foram as seguintes: 0.5mg/mLDS + 0.1mg/mL COS, 0.1mg/mLDS + 0.5mg/mL COS, 0.25mg/mLDS + 0.025mg/mL COS, 0.025mg/mLDS + 0.25mg/mL COS.

A caracterização das nanopartículas foi realizada utilizando o equipamento Zetasizer onde o tamanho das partículas foi medido por espalhamento dinâmico de luz (DLS) assim como a carga das nanopartículas (potencial Zeta) e a concentração das nanopartículas em solução utilizando o equipamento NTA.

A interação da NP@RDV com a barreira da mucosa foi mimetizada considerando a principal proteína encontrada na mesma, a mucina. Duas concentrações da mesma foram empregadas, 0.300mg/mL e 0.600mg/mL, considerando processos de hidratação e desidratação do muco. Além disso, dois pH's foram adotados pH5.0, condição ideal de fusão do vírion, e pH7.4, condições saudáveis.

Resultados

As nanopartículas de PLGA modificadas com biopolímeros na proporção 1.5DS/0.3COS demonstraram maior estabilidade em pH4.5 com relação ao potencial zeta. No entanto, a interação com a mucina aumenta esta estabilidade em pH7.4 e diminui em pH5.0, tendo seus valores aproximados do controle de mucina para altas concentrações da mesma. A polidispersão das partículas aumentou em pH5.0 proporcional a concentração de mucina. Nada pode-se dizer sobre o tamanho das partículas. As evidências apontam para uma interação repulsiva com a mucina, as alterações de PDI estão relacionadas com a estruturação da mucina em pH ácido.

As NPs-PLGA modificadas com biopolímeros na razão 0.3DS/1.5COS também foram mais estáveis em pH5.0 com relação ao ZP. No entanto, a interação com a mucina aumenta a estabilidade em pH7.4 e diminui em pH5.0. A polidispersão das partículas aumentou em pH5.0 sem relação com a concentração de mucina mas em pH7.4 essa relação foi proporcional a concentração de mucina. O tamanho aumentou em pH5.0, podendo estas serem mucoadesivas, e não teve alterações em pH7.4, característica repulsiva.

As NPs-PLGA modificadas com biopolímeros na razão 0.75DS/0.075COS foram um pouco mais estáveis em pH7.4 com relação ao ZP. No entanto, a interação com a mucina aumenta a estabilidade em ambos os pH's com relação inversa à concentração de mucina. A polidispersão das partículas aumentou sem relação com a concentração de mucina. O tamanho aumentou em ambos os pH's, a interação aqui deve ser repulsiva mas o aumento do tamanho indica a formação de agregados.

As NPs-PLGA modificadas com biopolímeros na proporção 0.075DS/0.75COS também foram um pouco mais estáveis em pH7.4 com relação ao ZP. No entanto, a interação com a mucina não muda esta estabilidade em ambos os pH's. A polidispersão das partículas aumentou sem relação com a concentração de mucina. O tamanho aumentou em ambos os pH's, a interação é atrativa com formação de agregados.

| Proporção de Biopolímero | ±0,1 | | 0,3MUC | | 0,6MUC | |
|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--|
| | pH 5,0 | pH 7,4 | pH 5,0 | pH 7,4 | | |
| 0,5DS/0,1COS | 23.5 | 14,0 | 100,0 | 71,2 | | |
| 0,1DS/0,5COS | 8,7 | 13,2 | 100,0 | 84,2 | | |
| 0,25DS/0,025COS | 7,5 | 5,0 | 95,4 | 67,9 | | |
| 0,025DS/0,25COS | 0,0 | 4,2 | 100,0 | 67,7 | | |

Figura 1: Eficiência de associação (EA%).

As medidas de eficiência de associação (EA%) foram realizadas por meio do método do ácido bicinconílico (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay). A interação com a mucina sofre influência do pH e da própria concentração de mucina. Em baixas concentrações de mucina, quanto maior a proporção de dextran-sulfato maior é a associação, sendo mais aparente em pH5.0. Quanto maior a proporção de quitosana maior é a associação com a mucina, sendo mais aparente em pH7.4. Em ambos os pH's a associação com mucina é diretamente proporcional à concentração total de biopolímeros. Em alta concentração de mucina, não houve diferenças na associação em pH5.0, em pH7,4 quanto maior a proporção de quitosana maior é a associação com a mucina, sendo diretamente proporcional à concentração total de biopolímeros. É provável que em pH5.0 a mucina forme emaranhados sobrepostos.

Conclusões

A estabilidade dos nanocarreadores, em alta concentração de biopolímeros os valores em módulo do potencial zeta (ZP) aumentaram em pH7.4 e diminuíram em pH5.0 proporcionalmente a concentração de mucina, sem relação com a proporção de dextrana/quitosana. Os valores para o tamanho das nanopartículas e seus índices de polidispersão (PDI) não apresentaram grandes alterações, porém em pH5.0 tais diferenças são mais perceptíveis, deixando evidente a relação dependente da concentração de mucina. Em baixa concentração de biopolímeros houve um aumento tanto do tamanho médio como do PDI dependentes da concentração de mucina, sendo o ZP estabilizado com o ZP próprio da mucina.

Em relação a adsorção com mucina, as nanoformulações que empregaram maior proporção de dextrana interagiram mais com mucina à pH5.0. As com maior proporção de quitosana demonstraram interação

dependente com a concentração total de mucina, apesar de não haver distinção a pH5.0 e altas concentrações de mucina, pode-se considerar uma dependência com a contração total de biopolímeros empregados. Em especial, em baixa concentração total de biopolímeros, a associação com mucina demonstrou ser independente da proporção dextrana/quitosana e dependente da concentração de mucina total.

Referências Bibliográficas

1. Beigel, J. H. et al. **Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report.** N. Engl. J. Med. 383, 1813–1826 (2020).
2. Ciotti, M. et al. **The COVID-19 pandemic.** Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 57, 365–388 (2020).
3. **FDA News Release FDA approves first treatment for COVID-19.** 2020. <https://www.fda.gov/news-events/press-anouncements/fda-approves-first-treatment-covid-19> October 22. accessed on May 2, 2022.
4. LUPKIN, S. **Remdesivir Priced At More Than \$3,100 For A Course Of Treatment.** <https://www.npr.org/sections/health-shots/2020/06/29/884648842/remdesivir-priced-at-more-than-3-100-for-a-course-of-treatment> (2020).

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001 e pelos Projetos Integrados de Pesquisa em Áreas Estratégicas - Universidade de São Paulo (PIPAE).

Development and Application of Nanopharmaceuticals from the Reuse of Therapeutic Agents against Covid-19: Mucus Modulation Studies.

Igor dos Santos Pedriz

Leonardo Miziara Barboza Ferreira

Ana Elisa Tognoli Leite

Valtencir Zucolotto

Universidade de São Paulo campus São Carlos/USP

igorspedriz@usp.br

Objective

COVID-19 thought more of deaths and, thought of the 6 million mass still, treatment is necessary. Remdesivir (RDV) is the first antiviral drug approved for the treatment of moderate to severe COVID-19. However, the high price of this drug, its short half-life, low solubility, and side effects limit its clinical application. To overcome this problem, this study aimed to develop RDV-loaded poly(lactic-co-glycolic) (PLGA)-based nanoparticles (NP@RDV) as a novel therapeutic strategy against COVID-19. The existing nanoparticles were valid for pulmonary administration, however, a protein barrier (mucus) in the mucosal epithelium must be transposed to the end of the drug. For nanoformulation to be added by adding four, as different complements of biopolymers (chitosan, COS, and dextra) to different agent solutions and mechanisms between them in order to analyze such as modulate the mucosal barrier interaction.

Methods and Procedures

In the process of obtaining the nanoparticles, two solutions are prepared, an organic phase (acetone) containing PLGA and RDV and an aqueous phase that presents a surfactant agent, Kolliphor 188, essential to avoid aggregates in the following steps:

supersaturation, nucleation, growth and coagulation. of structures in nanospheres.

The proportions of COS and DS in supplementation were as follows: 0.5mg/mLDS + 0.1mg/mL COS, 0.1mg/mLDS + 0.5mg/mL COS, 0.25mg/mLDS + 0.025mg/mL COS, 0.025mg/mLDS + 0.25mg/mL COS.

The characterization of the nanoparticles was performed using the Zetasizer equipment where the particle size was measured by dynamic light scattering (DLS) as well as the nanoparticle charge (Zeta potential) and the concentration of the nanoparticles in solution using the NTA equipment.

The interaction of NP@RDV with the mucosal barrier was mimicked considering the main protein found in it, mucin. Two concentrations of the same were used, 0.300mg/mL and 0.600mg/mL, considering processes of hydration and dehydration of the mucus. In addition, two pH's were adopted pH5.0, ideal conditions for virion fusion, and pH7.4, healthy conditions.

Results

The PLGA nanoparticles modified with biopolymers in the proportion 1.5DS/0.3COS showed greater stability at pH4.5 in relation to the zeta potential. However, the interaction

with mucin increases this stability at pH7.4 and decreases at pH5.0, with their values approaching mucin control at high mucin concentrations. The polydispersity of the particles increased at pH5.0 proportional to mucin concentration. Nothing can be said about the size of the particles. Evidence points to a repulsive interaction with mucin, changes in PDI are related to mucin structuring at acidic pH.

The PLGA-NPs modified with biopolymers in the ratio 0.3DS/1.5COS were also more stable at pH5.0 in relation to ZP. However, the interaction with mucin increases stability at pH7.4 and decreases at pH5.0. The polydispersity of the particles increased at pH5.0 unrelated to mucin concentration but at pH7.4 this relationship was proportional to mucin concentration. The size increased at pH5.0, which could be mucoadhesive, and did not change at pH7.4, a repulsive characteristic.

The PLGA-NPs modified with biopolymers in the ratio 0.75DS/0.075COS were a little more stable at pH7.4 in relation to ZP. However, the interaction with mucin increases stability at both pH's with an inverse relationship to mucin concentration. The polydispersity of the particles increased unrelated to mucin concentration. The size increased at both pH's, the interaction here should be repulsive but the increase in size indicates the formation of aggregates.

The PLGA-NPs modified with biopolymers in the ratio 0.075DS/0.75COS were also a little more stable at pH7.4 in relation to ZP. However, the interaction with mucin does not change this stability at both pH's. The polydispersity of the particles increased unrelated to mucin concentration. The size increases at both pH's, the interaction is attractive with the formation of aggregates.

| $\pm 0,1$ | 0,3MUC | | 0,6MUC | |
|--------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Proporção de Biopolímero | pH 5,0 | pH 7,4 | pH 5,0 | pH 7,4 |
| 0,5DS/0,1COS | 23,5 | 14,0 | 100,0 | 71,2 |
| 0,1DS/0,5COS | 8,7 | 13,2 | 100,0 | 84,2 |
| 0,25DS/0,25COS | 7,5 | 5,0 | 95,4 | 67,9 |
| 0,025DS/0,25COS | 0,0 | 4,2 | 100,0 | 67,7 |

Figure 1: Association efficiency (EA%).

Association efficiency measurements (EA%) were performed using the bicinchoninic acid method (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay). The interaction with mucin is

influenced by the pH and the mucin concentration itself. At low mucin concentrations, the greater the proportion of dextran sulfate, the greater the association, being more apparent at pH5.0. The higher the proportion of chitosan, the greater the association with mucin, being more apparent at pH7.4. In both pH's the association with mucin is directly proportional to the total concentration of biopolymers. At high mucin concentration, there were no differences in the association at pH5.0, at pH7.4 the higher the proportion of chitosan the greater the association with mucin, being directly proportional to the total concentration of biopolymers. It is likely that at pH5.0 mucin forms overlapping tangles.

Conclusions

The stability of the nanocarriers, in high concentration of biopolymers the values in modulus of the zeta potential (ZP) increased at pH7.4 and decreased at pH5.0 proportionally to the mucin concentration, without relation to the proportion of dextran/chitosan. The values for the size of the nanoparticles and their polydispersity indices (PDI) did not show great changes, however at pH5.0 such differences are more noticeable, making evident the relationship dependent on the mucin concentration. At low concentration of biopolymers, there was an increase in both the average size and the PDI depending on the mucin concentration, with the ZP being stabilized with the mucin's own ZP.

Regarding the adsorption with mucin, the nanoformulations that used the highest proportion of dextran interacted more with mucin at pH5.0. The ones with the highest proportion of chitosan showed a dependent interaction with the total mucin concentration, although there is no distinction at pH5.0 and high mucin concentrations, it can be considered a dependence with the total contraction of biopolymers used. In particular, at low total concentration of biopolymers, the association with mucin proved to be independent of the dextran/chitosan ratio and dependent on the concentration of total mucin.

Bibliography

1. Beigel, J. H. et al. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report. N. Engl. J. Med. 383, 1813–1826 (2020).
2. Ciotti, M. et al. The COVID-19 pandemic. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 57, 365–388 (2020).
3. FDA News Release FDA approves first treatment for COVID-19. 2020. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-treatment-covid-19> October 22. accessed on May 2, 2022.
4. LUPKIN, S. Remdesivir Priced At More Than \$3,100 For A Course Of Treatment. <https://www.npr.org/sections/health-shots/2020/06/29/884648842/remdesivir-priced-at-more-than-3-100-for-a-course-of-treatment> (2020).

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001 e pelos Projetos Integrados de Pesquisa em Áreas Estratégicas - Universidade de São Paulo (PIPAE).