



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102022017686-8 A2

(22) Data do Depósito: 02/09/2022

(43) Data da Publicação Nacional:
19/03/2024

(54) Título: COMPOSIÇÃO POLIMÉRICA NANOESTRUTURADA CONTENDO FINGOLIMODE E USO

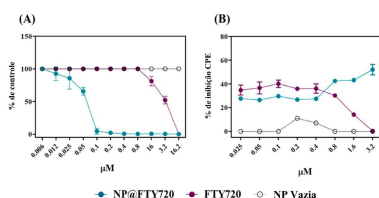
(51) Int. Cl.: A61K 31/137; A61K 9/14; A61P 31/14.

(52) CPC: A61K 31/137; A61K 9/146; A61P 31/14.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP.

(72) Inventor(es): VALTENCIR ZUCOLOTTI; RENATA RANK MIRANDA; NATÁLIA NORONHA FERREIRA NADDEO; PAULA MARIA PINCELA LINS; LEONARDO MIZIARA BARBOZA FERREIRA; VALÉRIA MARIA DE OLIVEIRA CARDOSO; EDMARCIA ELISA DE SOUZA; CARSTEN WRENGER; ARNE KRÜGER.

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO POLIMÉRICA NANOESTRUTURADA CONTENDO FINGOLIMODE E USO. A presente invenção descreve uma composição polimérica nanoestruturada à base de poli(ácido lático-coácido glicólico) (PLGA) contendo fingolimode (FTY720) e sua aplicação no tratamento da COVID-19. A composição é preparada através de um protocolo de emulsão simples, na presença do tensoativo Pluronic® 127. Por conta da sua composição inédita, compreendendo PLGA 15:85 e Pluronic® 127, a composição polimérica nanoestruturada aqui descrita apresenta um perfil de liberação do fingolimode que é minimizado em pH fisiológico e acelerado em pH acidificado, o que tende a favorecer a liberação do fármaco em tecidos inflamados (portanto, tecidos alvo). Adicionalmente, a composição nanoestruturada ora descrita ressalta significativamente um efeito anti-SARS-CoV-2 do fingolimode.



COMPOSIÇÃO POLIMÉRICA NANOESTRUTURADA CONTENDO FINGOLIMODE E USO

CAMPO DA INVENÇÃO

[1] A presente invenção pertence ao campo das ciências farmacêuticas e da nanotecnologia, posto que se refere ao desenvolvimento de uma composição nanoestruturada polimérica que contém o fármaco fingolimode (FTY720) encapsulado para entrega e aumento da atividade contra a COVID-19. Além da composição nanoestruturada polimérica contendo fingolimode, o uso de tal composição no tratamento de Covid-19 também é aqui descrito.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[2] Terapias baseadas em sistemas nanoestruturados são estratégias promissoras capazes de superar diversas limitações impostas pelos sistemas biológicos aos fármacos. Algumas propriedades físico-químicas dos fármacos, como baixa solubilidade e baixa biodisponibilidade, podem ser melhoradas através da nanoencapsulação. A modulação das propriedades físico-químicas e do perfil de liberação dessas moléculas deve melhorar sua performance no sistema biológico, bem como suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (Chauhan et al. 2020).

[3] Os nanocarreadores, por seu tamanho, podem ainda permanecer na circulação sistêmica por períodos prolongados, contornar a captação por moléculas do sistema imunológico e/ou escapar da depuração renal e hepática. As reduzidas dimensões dos sistemas contribuem para o aumento no tempo de retenção e acúmulo do fármaco no local de ação ou absorção, além de influenciar os perfis de distribuição, destino biológico, toxicidade, e na capacidade de direcionamento para alvos específicos. Todas essas características

associadas à capacidade de vetorização sítio-específica do fármaco e o controle das suas taxas de liberação e degradação melhoram a performance do fármaco e reduzem os efeitos colaterais sistêmicos (Luo et al. 2014, Kumari et al. 2015).

[4] As nanopartículas poliméricas ocupam uma posição de destaque entre os sistemas de liberação de fármacos atualmente disponíveis, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, em condições biológicas (Banerjee et al., 2017).

[5] Atualmente, existe ampla variedade de polímeros naturais e sintéticos utilizados na produção de nanocarreadores para a entrega de fármacos. Dentre os polímeros sintéticos, o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), aprovado pela FDA, tem sido amplamente utilizado para aplicações (bio)médicas (Kamaly et al. 2016).

[6] Fingolimod (FTY720), um fármaco imunossupressor comercializado sob a marca comercial Gilenya® (Novartis), é um análogo de esfingosina 1 fosfato (S1P, do inglês *sphingosine 1 phosphate*), que já possui uso bem estabelecido na terapia imunológica da esclerose múltipla. O imunomodulador atua ligando-se aos receptores S1P nos linfócitos, que promove a internalização e retenção de linfócitos nos órgãos linfoides, desencadeando uma linfopenia no compartimento de células T do sangue periférico.

[7] As implicações do FTY720 na COVID-19 têm sido bastante satisfatórias. Foerch et al. (2020) relataram que o FTY720 tem demonstrado uma melhora na integridade das células endoteliais do pulmão de pacientes portadores da doença, além de atuar no controle da liberação exacerbada de citocinas (Foerch et al., 2020). Gomez-Mayordomo et al. (2021) relataram que a retirada de FTY720 de paciente com sintomas leves de COVID-19, em tratamento contínuo, resultou em sintomas exacerbados, o que sugere o potencial do fármaco

em reduzir os efeitos desta doença (Gomez-Mayordomo et al., 2021).

[8] Recentemente, Risner et al. (2020) demonstraram através de estudos em células VeroCCL81 infectadas com o vírus causador da COVID-19, SARS-COV-2, que o tratamento com FTY720 levou à redução da replicação viral, reforçando mais uma vez o potencial deste fármaco não apenas contra os sintomas da doença, mas também contra seu agente etiológico (Risner et al., 2020). Tais resultados sugerem que o FTY720 pode contribuir significativamente para a redução da mortalidade decorrente da COVID-19.

[9] Neste contexto, a presente invenção teve como avanço a união entre a terapia convencional e a nanotecnologia, para a obtenção de um sistema nanoestruturado de entrega de fármaco. Esse sistema foi sintetizado através da técnica de emulsão simples seguida de evaporação de solvente.

[10] Técnicas de caracterização indicaram que as nanoplateformas produzidas apresentam cerca de 150 nm de diâmetro e uma alta eficiência de encapsulação de FTY720 ($\approx 90\%$). Ensaios *in vitro* mostraram que o sistema foi capaz de ser internalizado por células VeroCCL81 e Calu-3 apresentando ainda excelente atividade anti-SARS-COV-2 quando comparado à atividade exercida pelo FTY720 livre.

ESTADO DA TÉCNICA

[11] Outros grupos de pesquisa já desenvolveram diferentes tipos de sistemas nanoestruturados contendo FTY720. As nanopartículas destes sistemas são compostas por diferentes materiais, dentre eles: lipossomos, sílica, grafeno, selênio e poliméricas (De Mendoza et al., 2015; Masoudipour et al., 2018; Niemelä et al., 2020; J. Wang et al., 2015; Zou et al., 2021).

[12] Dentre as partículas poliméricas, foram encontrados sistemas nanoestruturados compostos por quitosana, policaprolactona, poli(ácido 3 hidroxibutírico) e PLGA (Alshaker et al., 2017; Puhl et al., 2020; Rezaie Shirmard et al., 2020; Sardoiwala et al., 2021; J. Wang et al., 2015). Alshaker et al. (2017) desenvolveram um sistema nanoestruturado polimérico que consiste em partículas de PLGA funcionalizadas com FTY720 e o quimioterápico docetaxel, para o tratamento de câncer de mama (Alshaker et al., 2017). Neste trabalho, os autores inicialmente funcionalizaram os fármacos covalentemente às cadeias de PLGA e, posteriormente, sintetizaram as partículas poliméricas contendo os fármacos pela técnica de emulsão simples seguida de evaporação de solvente. Análises biológicas *in vivo* mostraram que o sistema desenvolvido apresenta vantagens como maior biocompatibilidade e reduzidos efeitos adversos induzidos pelo FTY720.

[13] Wang et al. (2017) desenvolveram um sistema polimérico híbrido, composto de PLGA e lipídeo, para entrega de FTY720 e docetaxel, no tratamento de câncer de próstata (Q. Wang et al., 2017). Neste sistema, o FTY720 foi incorporado a um filme lipídico e, posteriormente, extrusado com nanopartículas de PLGA contendo docetaxel. Os dados reportados pelos autores reforçam que as nanoestruturas aumentam a segurança e eficácia do FTY720 comparado com a administração da sua forma livre.

[14] Recentemente, Zeraatpisheh et al. (2021) desenvolveram um sistema nanoestruturado polimérico para entrega de FTY720 para o tratamento de lesões da medula espinhal (Zeraatpisheh et al., 2021). Neste trabalho, nanopartículas contendo FTY720 encapsulado com PLGA 50:50 foram sintetizados pela técnica de emulsão simples seguida de evaporação de solvente, na presença do tensoativo polivinil álcool (PVA).

[15] As nanopartículas de Zeraatpisheh et al. (2021) apresentaram tamanhos médios de aproximadamente 220 nm e potencial zeta de 2 mV. Os autores reportaram uma eficiência de encapsulamento de FTY720 nas partículas de PLGA de 90% e liberação de aproximadamente 40% do fármaco após 24 horas em pH 7,4. A administração do sistema nanoestruturado em modelo animal foi realizada via injeção intratraqueal, e para isso, as nanopartículas foram incorporadas a um hidrogel. O sistema se mostrou muito promissor para o avanço no tratamento de lesões na medula espinhal.

[16] No entanto, a composição da presente invenção, genericamente referida por NP@FTY720, apresenta perfil de liberação do FTY720 e atividade biológica antiviral inéditas perante as nanopartículas contendo FTY720 já descritas. A composição nanoestruturada ora descrita, à base de PLGA 15:85 e preparada na presença do tensoativo Pluronic® F127, libera o FTY720 de maneira mais lenta em pH 7,4 (20% do fármaco após 24 horas) e mais acelerada em ambientes acidificados (100% do fármaco após 24 horas em pH 5,0).

[17] O perfil de liberação do FTY720 a partir da composição NP@FTY720, que é dependente de pH, proporciona maior disponibilidade do fármaco em compartimentos biológicos que sofrem de uma inflamação (e.g. por infecção de SARS-CoV2) - mais ácidos - favorecendo a eficácia e reduzindo a ação indesejada do fármaco em tecidos saudáveis (geralmente em pH próximo de 7,4).

[18] Adicionalmente, a composição de NP@FTY720 propicia ao FTY720 um efeito antiviral contra SARS-CoV2, demonstrado aqui de maneira inédita. Desta feita, a presente invenção fornece um perfil de liberação do FTY720 mais direcionado a tecidos alvo e favorece um efeito anti- SARS-CoV2 do fármaco; características que, tomadas em conjunto, resultam numa ação sinérgica no tratamento da COVID-19.

Tabela 1: Comparação das principais características das NP@FTY720 com as nanopartículas dos documentos do estado da técnica.

Ref.	Formulação	Diâmetro (nm)	Potencial zeta (mV)	Estudo liberação	Atividade anti-SARS-CoV-2
NP@FTY720	PLGA [15:85] Polivinil álcool (PVA) Pluronic 127 Fingolimod	149 ± 11	+14	100% de liberação após 24 h (pH 5) 20 % de liberação após 24h (pH 7.4)	IC ₅₀ = 0.05 µM
Zeraatpisheh et al., 2021	PLGA [50:50] Polivinil álcool (PVA) (1%) Fingolimod	225.5	+2	±40% de liberação após 24h (pH 7.4)	-
Q. Wang et al., 2017	PLGA Polivinil álcool (PVA) Fosfolipídios Fingolimod Docetaxel	88.4 ± 1.7	- 29.9	100% de liberação após 192 h (pH 5)	-
Alshaker et al., 2017	PLGA Polivinil álcool (PVA) Fingolimod Docetaxel	91.51 ± 1.37	- 14.0	52% de liberação após 24 h (pH 5)	-

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[19] A presente invenção fornece uma composição polimérica nanoestruturada contendo fingolimode (FTY720), encapsulado em partículas de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) preparadas por emulsão simples na presença de Pluronic® 127. Em uma modalidade preferida, a composição compreende 5 a 15 mg de PLGA 15:85, 20 a 40 mg de Pluronic® 127 e 1 mg de cloridrato de fingolimode.

[20] Em modalidades particulares da composição nanoestruturada polimérica contendo fingolimode, o tamanho médio de partículas da composição está entre 100 e 200 nm, com um índice de polidispersão (IP) entre 0,05 e 0,20.

[21] Um outro aspecto da invenção diz respeito ao uso da ora descrita composição nanoestruturada polimérica

contendo fingolimode na produção de um medicamento para tratamento da infecção causada pelo vírus SARS-CoV2, conhecida por COVID-19.

[22] Finalmente, uma outra modalidade da invenção compreende um método de tratar COVID-19 através da administração de uma quantidade eficaz da composição nanoestruturada polimérica contendo fingolimode a um indivíduo infectado com SARS-CoV2.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[23] Para auxiliar na identificação das principais características da presente invenção, são apresentadas as seguintes figuras:

[24] A Figura 1 ilustra a caracterização da nanoplateforma NP@FTY720. Caracterização morfológica de NP@FTY720 e NP vazia por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

[25] A Figura 2 ilustra a estabilidade a longo prazo dos nanossistemas desenvolvidos em termos de tamanho (nm), PDI e ZP (mV). A) NPs vazias e (B) NP@FTY720. As diferenças ao longo do tempo foram consideradas estatisticamente significativas $P < 0,05$ (**).

[26] A Figura 3 ilustra a liberação de FTY720 do sistema de nanoestrutura. Perfil de liberação de FTY720 de NP@FTY720 em um tampão de fosfato com pH = 7,4 e um meio acetato com pH = 5,0. Os dados mostram a média de três medidas independentes ($n = 3$) \pm DP.

[27] A Figura 4 ilustra o perfil de citotoxicidade de FTY720, NP@FTY720 e NPs vazias. A) células HepaRG após 24h de incubação. B) células HepaRG após 48h de incubação. C) células A549 após 24h de incubação. D) células A549 após 48h de incubação. Média \pm DP de três experimentos independentes em triplicata. Os asteriscos indicam uma diferença em relação ao controle (* $P < 0,5$ e *** $P < 0,001$).

[28] A Figura 5 ilustra os perfis de citotoxicidade de FTY720, NP@FTY720 e NPs vazias em células VeroCCL81. A) 24, B) 48 e C) 72h. Média \pm DP de três experimentos independentes em triplicata. Os asteriscos indicam uma diferença em relação ao controle ($*P < 0,5$ e $***P < 0,001$).

[29] A Figura 6 ilustra a internalização de NP@FTY720-DiO em células VeroCCL81 por citometria de fluxo e microscopia confocal. A) Cinética de internalização de 5×10^9 partículas/mL em células VeroCCL81. As células foram incubadas por diferentes tempos e processadas para citometria de fluxo pela qual a intensidade fluorescente de NP@FTY720-DiO foi obtida. Os resultados expressam a média geométrica da intensidade de fluorescência e representam a média \pm DP de três réplicas independentes. B) As células VeroCCL81 foram tratadas com diferentes inibidores farmacológicos da endocitose antes da incubação com 5×10^9 partículas/mL por 4h na presença dos inibidores. Os resultados expressam a média geométrica da intensidade de fluorescência e representam a média \pm DP de três réplicas independentes. C) Imagens adquiridas com um microscópio confocal a laser e Coeficiente de Pearson (PCC) mostrando a colocalização intracelular de NP@FTY720-DiO com lisossomos após células VeroCCL81 serem incubadas com 5×10^9 partículas/mL por 4h. Barra de escala = 50 nm.

[30] A Figura 7 ilustra a atividade antiviral de NP@FTY720. A) Produção de RNA viral de SARS-CoV-2 em células VeroCCL81. Os títulos virais foram quantificados via RT-qPCR 72h pós-infecção na presença de diluições seriadas duplas de FTY720, NP@FTY720 ou NP vazias. Dados representam médias \pm DP de quatro replicatas independentes em dois experimentos biológicos. B) Efeitos de FTY720, NP@FTY720 ou atividade de NP vazia no efeito citopático induzido por SARS-CoV-2 em células VeroCCL81. A inibição de CPE foi avaliada 72h após a infecção na presença de diluições em série de FTY720,

NP@FTY720, ou NP vazias, usando CellTiter-Glo. Os dados individuais representam a média \pm DP de três réplicas independentes em dois experimentos biológicos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[31] A menos que especificado de maneira distinta, os termos usados ao longo deste relatório descritivo têm seus significados comuns na técnica, dentro do contexto da divulgação e no contexto específico em que cada termo é usado. Certos termos que são usados para descrever a divulgação são discutidos abaixo, ou em outro lugar na especificação, para fornecer orientação adicional ao profissional em relação à descrição da divulgação. As publicações aqui citadas e o material para o qual são citados são especificamente incorporados por referência em sua totalidade.

[32] Será apreciado que a mesma coisa pode ser dita de maneiras distintas. Consequentemente, linguagem alternativa e sinônimos podem ser usados para qualquer um ou mais dos termos aqui discutidos. Nenhum significado especial deve ser colocado sobre se um termo é elaborado ou discutido aqui. Sinônimos para certos termos são fornecidos, mas a exemplificação de alguns sinônimos não exclui o potencial uso de outros porventura não listados aqui.

[33] A invenção fornece uma composição polimérica nanoestruturada compreendendo fingolimode (2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]propano-1,3-dio) (FTY720) encapsulado por uma camada composta do polímero poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) na presença do tensoativo não iônico Pluronic® 127 (2-[2-(2-hidroxietoxi)propoxi]etanol. Tal composição será genericamente referida por NP@FTY720.

[34] Conforme empregado nesta invenção, as expressões “composição polimérica nanoestruturada” ou “plataforma polimérica nanoestruturada” denotam partículas poliméricas de estrutura formada por um ou mais polímeros farmaceuticamente aceitáveis, naturais ou sintéticos, na

presença de um ou mais tensoativos farmacologicamente aceitáveis, cujo diâmetro particular médio é inferior a 1000 nanômetros (nm), conforme medido por técnicas convencionais de medição de tamanho de partícula bem conhecidas daqueles versados na técnica, como, por exemplo, difração a laser ou espalhamento dinâmico de luz.

[35] Em algumas modalidades da invenção, a NP@FTY720 tem tamanho de partícula médio, denotado pelo diâmetro hidrodinâmico médio (DMH), medido por espalhamento dinâmico de luz, igual ou inferior a cerca de 200 nm. Em formas de realização da invenção, o DHM é de cerca de 100 a cerca de 199 nm. Em uma forma preferencial da invenção, o DHM do NP@FTY720 é de cerca de 150 nm.

[36] Conforme aqui utilizado, o termo "tensoativo farmacologicamente aceitável" denota uma substância farmacologicamente aceitável, ou uma combinação das mesmas, que reduz a tensão superficial de um líquido e diminui a tensão interfacial entre dois líquidos. Tensoativos são geralmente compostos orgânicos que são anfipáticos, o que significa que eles contêm grupos hidrofóbicos (suas "caudas") e grupos hidrofílicos (suas "cabeças"). Portanto, eles são tipicamente moderadamente solúveis em solventes orgânicos e água.

[37] Um tensoativo pode ser classificado pela presença ou ausência de grupos formalmente carregados em sua cabeça. Um tensoativo não iônico não possui grupos de carga em sua cabeça. A cabeça de um tensoativo iônico carrega uma carga líquida, se a carga for negativa, o tensoativo é aniônico; se a carga for positiva, é catiônica, se contiver uma cabeça com dois grupos de cargas opostas, é zwitteriônica.

[38] Tensoativos aplicáveis no contexto da invenção incluem Pluronic® 127, monooleato de polioxietileno sorbitano (polissorbato 40 ou Tween 40), Tween 80 Pluronic®

F68 e álcool polivinílico (PVA). Um tensoativo particularmente relevante à invenção é Pluronic® 127.

[39] A composição NP@FTY720 pode ser preparada, por exemplo, através de um método de emulscionamento simples, conforme já estabelecido por Ferreira et al (2020). Neste protocolo, uma fase orgânica, contendo o polímero PLGA e o fármaco fingolimode, é adicionada a uma fase aquosa, contendo o tensoativo não iônico Pluronic® 127, e a mistura é posteriormente emulsionada.

[40] A fase orgânica pode ser preparada pela mistura de 5 a 15 mg de PLGA e de 1 mg de Fingolimod, previamente solubilizado em um solvente orgânico farmacologicamente aceitável (e.g. etanol), em diclorometano. A fase aquosa pode ser obtida pela dissolução de 20 a 40 mg de Pluronic® 127 em água purificada.

[41] A preparação da composição polimérica nanoestruturada é finalizada pela exposição da fase orgânica, dentro da fase aquosa, a pulsos de ultrassom, seguida de agitação magnética para evaporação dos solventes orgânicos.

[42] Em uma modalidade, a invenção prevê composições farmacêuticas compreendendo NP@FTY720 e um ou mais excipientes farmacologicamente aceitáveis. Tais composições podem ser preparadas e formuladas empregando métodos e excipientes convencionais, tais como divulgados, por exemplo, nas Farmacopeias Britânica, Europeia e dos Estados Unidos, Remington's Pharmaceutical Sciences (REMINGTON; GENNARO, 1990), Martindale: The Extra Pharmacopoeia (MARTINDALE; RAYNOLDS, 1996) e em Prista's Pharmaceutical technology (PRISTA et al., 1996).

[43] Em uma modalidade adicional, a invenção fornece o uso do NP@FTY720 para preparar medicamento para tratar uma infecção causada por SARS-CoV-2, também conhecida por COVID-19.

[44] Conforme aqui empregado, o termo "tratar" inclui extinguir, inibir substancialmente, retardar ou reverter a progressão de uma doença ou distúrbio, melhorar substancialmente os sintomas clínicos de uma doença ou distúrbio ou prevenir substancialmente o aparecimento de sintomas clínicos de uma doença ou distúrbio.

[45] Em outra modalidade da invenção, é fornecido um método de tratamento de um mamífero compreendendo a administração ao mamífero com necessidade de tratamento de uma quantidade terapeuticamente eficaz do NP@FTY720 ou da composição farmacêutica que o compreende, conforme descritos acima. Em modalidades preferenciais, o mamífero é um paciente humano que necessita de tratamento para uma infecção por SARS-CoV-2.

[46] Conforme empregado aqui, o termo "terapeuticamente eficaz" denota a uma quantidade eficaz de um princípio ativo (e.g. fingolimode) para alcançar um efeito clínico desejado. Uma quantidade terapeuticamente eficaz varia com a natureza da condição a ser tratada, o período de tempo em que a atividade é desejada e a idade e a condição do sujeito e, em última análise, é determinada pelo profissional de saúde.

[47] Os exemplos a seguir pretendem ser puramente exemplificativos da invenção. São apresentados de modo a fornecer ao técnico no assunto descrição completa de como são preparados, avaliados e empregados o SLN desta invenção. Um técnico no assunto, à luz da presente divulgação, reconhecerá que muitas alterações podem ser feitas nas modalidades específicas que são divulgadas e, ainda assim, obter um resultado semelhante ou equivalente sem se afastar do espírito e do escopo da invenção.

EXEMPLOS DE CONCRETIZAÇÕES

Exemplo 1: Preparo e caracterização de NP@FTY720 -
Desenvolvimento e otimização

*Desenvolvimento e otimização de uma composição polimérica
nanoestruturada contendo Fingolimode (FTY720)*

[48] A condição 1 de nanoprecipitação testada foi: Fase orgânica - 1 mL acetona, PLGA (85:15) 15 mg, FTY720 2 mg; Fase aquosa: tensoativo não iônico Pluronic® 127 (que possui EHL próximo ao PVA) - 25 mg, água purificada 2 mL.

[49] O gotejamento da fase orgânica na aquosa foi realizado utilizando seringa de 3 mL acoplada à agulha hipodérmica BD 1,60x40, 1000 rpm de agitação magnética, temperatura de 40°C. O resultado foi a formação parcial de nanopartículas e de precipitado de polímero no fundo do frasco.

[50] Posteriormente, na condição 2 de nanoprecipitação os mesmos parâmetros da condição 1 foram testados, com um PLGA menos hidrofóbico (PLGA 50:50). O resultado foi a formação de um grande precipitado de polímero no fundo do frasco.

[51] Para condição 3 de nanoprecipitação, retornaram-se as condições testadas inicialmente (condição 1) aumentando agora a concentração de tensoativo de 25 mg para 50 mg (aumento 2x). O resultado foi novamente a formação parcial de nanopartículas e de um pequeno precipitado de polímero no fundo do frasco.

[52] Considerando os resultados obtidos até o presente momento, tentou-se sintetizar a partícula branca (sem a presença do FTY720) em todas as condições anteriormente testadas e observou-se a manutenção da formação de precipitado o que levou à conclusão de que o PLGA utilizado ou o tensoativo selecionado poderiam ser o problema.

[53] Na condição 4 de nanoprecipitação, foi testada Fase orgânica - 1 mL acetona, PLGA (85:15) 10 mg (concentração reduzida), FTY720 1 mg (metade da concentração); Fase aquosa: Pluronic® 127 (que possui EHL próximo ao PVA) - 30 mg, água purificada 2 mL. Todas as demais condições iguais à condição inicial. Como resultado observou-se que a precipitação de polímero parecia ter diminuído.

[54] A seguir, foi avaliada a manutenção dos parâmetros acima, variando a aplicação de diferentes tensoativos: PVA (EHL 18), Tween 80 (EHL 15), Pluronic® F68 (EHL 29), Tween 40 (EHL 15.6). Todas as condições testadas resultaram na formação de polímero precipitado e com esse dado, sendo concluído que possivelmente o uso de nanoprecipitação para o preparo desses nanossistemas não seria possível. Passou-se então para a possibilidade do uso de emulsão simples.

[55] Para a condição 1 de emulsão, testou-se Fase orgânica - 900 µL de diclorometano DCM (para este caso existe a necessidade de um solvente orgânico não miscível com a água), PLGA (85:15) 10 mg previamente solubilizado em 100 µL de etanol, FTY720 1 mg; Fase aquosa: Pluronic® 127 25 mg, água purificada 2 mL. E a emulsão de fase orgânica em fase aquosa foi realizada em sonicador, amplitude de 20W, tempo de processo de 1:30 min sendo sonicação no modo pulso (1 min de sonicação com descanso de 30 segundos), sob banho de gelo. Para essa condição, não observamos a formação de precipitado.

[56] O refinamento da formulação foi feito utilizando planejamento fatorial. Foram testadas 3 diferentes variáveis em 3 níveis (Surfactantes: Tween 80, Pluronic® 127 e Pluronic® F68; Concentração de PLGA: 5, 10 e 15 mg e a razão entre fase aquosa e fase orgânica: 1,33, 2 ou 4. Os resultados foram avaliados em termos de tamanho das

nanopartículas, polidispersidade dos sistemas e potencial zeta (Tabela 1).

Tabela 1: Condições avaliadas para o desenvolvimento otimizado de NP@FTY720 utilizando a ferramenta estatística planejamento fatorial.

Variáveis codificadas				Resultados		
EHL	Surfactante	[] PLGA	Razão fase AQ/OR	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
1	1,00000	1,00000	1,00000	171,4	0,132	13,1
2	-1,00000	-1,00000	-1,00000	152	0,314	9,78
3	0,00000	-1,00000	1,00000	142,7	0,188	17,4
4	1,00000	-1,00000	0,00000	156,3	0,179	14,2
5	-1,00000	1,00000	0,00000	162,7	0,156	32
6	0,00000	0,00000	0,00000	193,7	0,201	5,07
7	0,00000	1,00000	-1,00000	217,1	0,3	23,5
8	-1,00000	0,00000	1,00000	132,7	0,194	27,2
9	1,00000	0,00000	-1,00000	177,8	0,211	14

[57] O tratamento dos dados utilizando o software STATISTICA 10, mostrou que dentre as variáveis selecionadas, nenhuma delas foi significativa para a resposta tamanho, PDI e potencial zeta (Figura 1). Desta maneira, analisando os dados obtidos na tabela 1 de maneira empírica, selecionamos a condição 4 como a melhor opção para o desenvolvimento de NP@FTY720. Portanto, a condição final de preparo do sistema está descrita abaixo de maneira detalhada.

Síntese de NP@FTY720

[58] Preparo da fase orgânica: PLGA 15:85 (5-10 mg), Fingolimod 1 mg previamente solubilizado em 100 µL de etanol, diclorometano (DCM) 1400 µL. Para solubilizar o PLGA em DCM utilizamos equipamento vórtex.

[59] Preparo da fase aquosa: tensoativo não iônico Pluronic® 127 - 30 mg, água purificada 2 mL.

[60] Para o preparo da emulsão, utilizamos a sonicação da fase orgânica dentro da fase aquosa utilizando uma seringa (5 mL) acoplada a uma agulha BD® 0,70 × 30 mm. A emulsificação foi realizada por 1,5 min de sonicação

(Branson Digital Sonifier, México) aplicando o modo de pulso de 1 min ligado e 30 s desligado, amplitude de 20% em banho de gelo. A emulsão resultante foi evaporada sob agitação magnética para remover o solvente orgânico. Em seguida, as NP@FTY720 foram lavadas com Amicon® 100-kDa cut off e armazenadas para posterior caracterização. NP vazias (sem FTY720) foram produzidas seguindo o procedimento descrito acima para fins comparativos.

[61] Para os estudos de internalização, 2 mg/mL de solução de perclorato de 3,3'-dioctadeciloxcarbocianina (DiO, Sigma-Aldrich) em etanol (10 µL) foram adicionados à fase orgânica antes do procedimento de sonicação. Depois, a formulação foi centrifugada a 10.000 g, 10 min (Eppendorf Centrifuge 5804R, Alemanha). As NP foram ainda redispersas em PBS 1 x e dialisadas 24 h usando tubos de diálise de celulose com poros de 12 kDa (Sigma Aldrich, EUA).

Determinação da eficiência de encapsulação

[62] A eficiência de encapsulação percentual (EE%) foi realizada através de um método indireto considerando a quantidade de FTY720 não encapsulado (livre no sobrenadante) de acordo com a eq 1.

$$Eq1: EE\% = \frac{[]FTY720 \text{ adicionado} - []FTY720 \text{ não encapsulado}}{[]FTY720 \text{ adicionado}} \times 100$$

[63] Para tanto, NP@FTY720 foi colocado em um Amicon 100 kDa cut off e centrifugado (5000 rpm a 25° C, 10 min), e a solução depositada no compartimento inferior foi usada para avaliação de EE%.

[64] A confirmação de EE % também foi realizada colocando uma quantidade conhecida de NP@FTY720 em acetonitrila para ruptura de nanoestrutura após filtração e injeção em um sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC). As análises cromatográficas foram

realizadas utilizando a metodologia descrita anteriormente (Ghediya et al., 2016).

[65] O sistema cromatográfico de HPLC foi um equipamento Waters Alliance com bomba quaternária, aplicando uma coluna Gemini NX-C18 (250 cm × 4,6 mm, 5 µm, 110 Å, Phenomenex) com a fase móvel acetonitrila (35:65, v/v) e trietilamina em água 0,1% (ajustado para pH 3,0 ± 0,05 com ácido ortofosfórico) a uma vazão de 0,9 mL/min e um detector de UV a 220 nm. A curva analítica padrão foi determinada pela adição de FTY720 (10–100 µg/mL) à fase móvel e usando a equação $y = 26701x - 8300,5$ ($r^2 = 0,999$). Os resultados são apresentados como a média de três determinações independentes e seus desvios padrão (DP).

Caracterização físico-química de NP@FTY720

[66] O tamanho de partícula e o índice de polidispersidade (PDI) foram medidos por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e espectroscopia de correlação de fótons a um comprimento de onda de 633 nm a 25°C e um ângulo de detecção de 90°. O potencial zeta (ZP) foi registrado pela mobilidade eletroforética a 25°C. As análises foram realizadas em equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido).

[67] As amostras (10 µL) foram diluídas em 1 mL de água purificada. Para fins de estabilidade, NP@FTY720 foi armazenada em geladeira (8°C) e periodicamente (pelo menos uma vez por semana) analisada quanto ao tamanho, PDI e ZP. Os resultados são apresentados como a média de três medidas independentes ($n = 3$) e seus DP. Uma nanoemulsão de controle, sem o fármaco também foi caracterizada para fins comparativo.

[68] Os nanossistemas foram adicionalmente caracterizados quanto à sua concentração e distribuição de tamanho por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) em um NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Worcestershire,

Reino Unido) equipado com uma câmara de amostra, um laser de 532 nm, nível de câmara 11/12, e 77 ± 25 partículas por quadro.

[69] As amostras foram diluídas 50× e 400× usando água purificada e injetadas na câmara de amostra com uma seringa estéril de 1 mL. O software NTA 2.3 foi utilizado para capturar as imagens e analisar os dados. Os vídeos foram gravados com uma câmara EMCCD 215S. Para estudos de internalização, um filtro de fluorescência foi aplicado para aquisição de dados. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, aplicando amostras independentes em duplicata, à temperatura ambiente.

[70] Análises de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG-SEM) foram conduzidas para NPs vazias e NP@FTY720 para analisar tamanho e morfologia. As amostras foram diluídas (2:100 v/v) em água ultrapura, colocadas em suporte metálico e deixadas secar à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram revestidas com carbono e fotomicrografias foram feitas em diferentes ampliações usando um JEOL-JSM-7500F acoplado ao Joel Pc-100 ver.2.1.0.3.

[71] Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) revelou que NP@FTY720 é composta por partículas esféricas com um tamanho de ~400 e ~190 nm para NPs vazias e NP@FTY720, respectivamente (Figura 1). Além disso, as fotomicrografias expõem uma concentração menor de partículas para NPs vazias em vez de NP@FTY720.

[72] As caracterizações de tamanho, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ZP) e concentração de NP@FTY720, NPs vazias e NP@FTY720-DiO são mostradas na Tabela 1. As medições de tamanho de partícula da análise DLS mostraram valores de aproximadamente 460 nm para NPs vazias e 150 nm para NP@FTY720.

[73] Os dados de PDI revelaram maior dispersão para NPs vazias em comparação com NP@FTY720 ($P \geq 0,05$). Além disso, os valores de ZP revelaram cargas potenciais com alteração significativa na presença (NP@FTY720) e ausência do fármaco (NP vazio) ($P \geq 0,05$). Os dados de NTA reforçaram uma diferença significativa nas NPs considerando a presença e ausência do fármaco em termos de tamanho e concentração (Tabela 1). NP@FTY720-DiO tem um índice de tamanho e concentração semelhante ao encontrado para NP@FTY720.

Tabela 2. Caracterização das Nanoestruturas Desenvolvidas

Amostra	Espalhamento dinâmico de luz (DLS)			Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)	
	Tam. Médio (nm)	PDI	Pot. Zeta (mV)	Tam. Médio (nm)	Concentração (partículas/mL)
NP vazia	460±30	0,45±0,02	-17±4	294±10	6.10 ¹⁰ ±4.10 ⁹
NP@FTY720	149±11	0,13±0,02	14±2	181±44	7.10 ¹¹ ±6.10 ¹⁰
NP@FTY720-DiO	n/d	n/d	n/d	170±30	5.10 ¹¹ ±3.10 ⁹

Estabilidade de Armazenamento de NP@FTY720 in vitro

[74] A estabilidade de armazenamento de NPs pode limitar a aplicação de sistemas nanoestruturados e sua atividade biológica na prática clínica. A previsão da estabilidade coloidal de NPs ao longo do tempo pode antecipar mudanças físico-químicas dos nanossistemas e estar associada ao desempenho biológico *in vitro*. Assim, NPs vazias e NP@FTY720 foram monitoradas por um período de 3 meses em que tamanho, PDI, e Potencial Zeta foram medidos semanalmente.

[75] Os resultados não mostraram mudanças significativas no tamanho, PDI e Potencial Zeta de NPs vazias durante o período analisado (Figura 2A). Além disso, alterações insignificantes foram registradas para NP@FTY720 no período de 90 dias em termos de tamanho (Figura 2B). No entanto, após 90 dias de análise, pequenas alterações no PDI também foram acompanhadas por uma ligeira diminuição nos valores de Potencial Zeta. Portanto, não foram detectadas

alterações significativas para ambas as NPs (NP@FTY720 e NPs vazias) nas análises realizadas *in vitro* por 2 meses.

Estudo de Liberação In Vitro

[76] Estudos de liberação de FTY720 livre e NP@FTY720 foram realizados de acordo com uma metodologia previamente proposta com modificações (Ferreira et al. 2019; Sardoiwala et al. 2020). Uma quantidade conhecida de FTY720, solução e NP@FTY720 foi adicionada a um tubo de 2 mL contendo tampão fosfato em pH 7,4 com 0,2 % de lauril sulfato de sódio (LSS) e meio de acetato a pH 5,0 a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ com agitação de 300 rpm. A solubilidade do fármaco FTY720 em ambos os meios receptores selecionados foi previamente avaliada para assegurar condições estabelecidas pelo ensaio de liberação.

[77] Em seguida, em tempos pré-determinados (0,5, 2, 4, 8 e 24 h), o conteúdo foi filtrado (Amicon Ultra 30K) para isolar o fármaco liberado e a quantificação foi realizada utilizando o sistema HPLC com curva analítica padrão FTY720 (10- 100 $\mu\text{g/mL}$) tampão fosfato pH 7,4 com 0,2% LSS ($y = 4196,6x + 81\ 754$) e meio acetato pH 5,0 ($y = 2158,7x + 163\ 173$). Modelagem matemática com diferentes modelos cinéticos (Korsmeyer-Peppas, Higuchi, primeira ordem, Hixson-Crowell, Baker-Lonsdale e Weibull) foi realizada para entender melhor a cinética de liberação do FTY720 de NPs usando o software SigmaPlot 10.0.

[78] A liberação de FTY720 do sistema nanoestruturado depende do pH. A liberação do fármaco foi estimada pela aplicação de um meio selecionado (tampão fosfato pH 7,4, com 0,2% de LSS e tampão acetato pH 5,0) para imitar o ambiente *in vivo* e prever o comportamento esperado do fármaco e o perfil de liberação.

[79] Esses dados importantes devem ser correlacionados com o desempenho biológico. A Figura 3 representa os perfis FTY720 de NP@FTY720 e o fármaco livre

em pH 7,4 e 5,0. Os resultados mostraram que o fármaco livre atingiu 100% de dissolução do fármaco em 0,5 h, independentemente do valor de pH. Por outro lado, NP@FTY720 exibiu uma liberação inicial de aproximadamente 10% nas primeiras 2 h do ensaio para ambos os valores de pH.

[80] A liberação inicial está normalmente associada à difusão e deposição da camada superficial das moléculas do fármaco. Assim, esses dados reforçaram o índice de encapsulamento de aproximadamente 90% dos dados registrados anteriormente. Portanto, após 8 h, a liberação do fármaco foi próxima de 80% em pH 5,0 e ainda aproximadamente 10% em pH 7,4. Após 24 h, a liberação do fármaco atingiu 100% em pH 5,0, enquanto apenas 20% foram registrados em pH 7,4, o que é quase cinco vezes menor que os dados registrados em pH 5,0.

[81] Este perfil de liberação mostrou a dependência do pH da liberação do fármaco. Tal comportamento enfatiza que na circulação sistêmica a liberação do fármaco pode ser preservada e a internalização celular contribui para a efetiva liberação e desempenho terapêutico. As baixas taxas de liberação de FTY720 de sistemas nanoestruturados em pH 7,4 foram demonstradas anteriormente. Além disso, a dependência do pH da liberação de FTY720 comparando os valores de pH investigados de 5,0 e 7,4 de sistemas baseados em PLGA também já foi relatada. Para uma compreensão mais profunda dos mecanismos de liberação de fármacos a partir de matrizes de nanoestruturas poliméricas, perfis de liberação foram ajustados a vários modelos matemáticos empíricos e semiempíricos comumente usados que descrevem o processo de liberação de dissolução (Figura 3). Os coeficientes de determinação (r^2) registrados dos diferentes modelos estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3: Modelos matemáticos aplicados aos perfis de liberação: coeficientes obtidos pelos modelos de Baker e

Lonsdale, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Primeira Ordem, Hixson-Crowell e Weibull.

Modelos matematicos		NP@FTY720	
		pH 5.0	pH 7.4
Baker and Lonsdale	k	0.012	0.0005
	r ²	0.91	0.64
Higuchi	k	20.76	5.31
	r ²	0.91	0.63
Korsmeyer-Peppas	r ²	0.89	0.79
	n	0.48	0.17
	k	21.65	13.11
Primeira ordem	r ²	0.95	0.42
	k	0.15	0.013
Hixson-Crowell	r ²	0.96	0.42
	k	0.04	0.004
Weibull	r ²	0.98	0.80
	b	16.2	11.0

[82] Os resultados exibidos na Tabela 3 mostram que a liberação de FTY720 de NP@FTY720 em pH 5,0 e pH 7,4 se correlaciona melhor com o modelo Weibull (r² 0,98 e 0,88, respectivamente). O modelo matemático, proposto pela primeira vez por Weibull em 1951, descreve a quantidade cumulativa de fármaco no meio em um determinado momento, que pode ser ajustada a diferentes perfis de dissolução de acordo com a eq 3 abaixo.

$$m = 1 - \exp\left(\frac{-(t - T_i)^b}{a}\right) \quad \text{eq. 3}$$

em que m representa o fármaco acumulado, a é o parâmetro de escala que define a escala de tempo do processo (dependência do tempo), T_i representa o tempo de atraso antes do início do processo de dissolução/liberação e b descreve a forma da progressão da curva de dissolução. Portanto, o expoente b indica o principal mecanismo que impulsiona o transporte de fármacos de uma matriz polimérica, como PLGA. Para valores

de b maiores que 1 ($b > 1$), o transporte do fármaco é governado por um mecanismo complexo.

[83] Como o PLGA é considerado uma matriz intumescível, processos físicos e químicos devem estar relacionados a liberações complexas de fármacos. Nos estágios iniciais, esse fenômeno pode estar relacionado à entrada de líquido na rede polimérica, hidratação do polímero e intumescimento. Tal evento é seguido pela difusão do fármaco por toda a matriz intumescida ou mesmo pela erosão da matriz. Sabe-se que vários perfis de liberação de NP baseados em PLGA do fármaco são adequados para o modelo Weibull.

Exemplo 2: Atividade biológica de NP@FTY720 *in vitro*

[84] As linhagens celulares utilizadas neste estudo foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil. Hepatócitos humanos imortalizados (HepaRG), adenocarcinoma alveolar humano (A549) e células epiteliais do rim de um macaco verde africano (VeroCCL81) foram usados para investigar o potencial citotóxico de FTY720 e NP@FTY720.

[85] As células VeroCCL81 foram ainda usadas para acessar os mecanismos de internalização e o potencial antiviral de FTY720 e NP@FTY720. As células foram cultivadas em monocamada usando meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino em uma incubadora umidificada a 37°C com 5% de atmosfera de CO₂. Para os experimentos, as células foram semeadas em placas de 96 (ensaio de citotoxicidade e inibição de CPE) ou 12 poços (ensaio de internalização de NP), em DMEM fresco com 10% de FBS e deixadas aderir por 24 h a 37°C com 5% de CO₂. Três experimentos independentes (com três replicatas cada, para citotoxicidade e o ensaio CPE) foram realizados.

Perfil de Citotoxicidade

[86] Para investigar o perfil citotóxico de FTY720, NP@FTY720 e NPs vazias, as células foram primeiro incubadas com diferentes concentrações do fármaco e NPs por 24 e 48 h em DMEM fresco com 2,5% de FBS. As células VeroCCL81 também foram incubadas com os compostos de teste por 72 h, considerando os experimentos com o vírus SARS-CoV-2, que foram realizados por 72 h. Os seguintes grupos de controle foram mantidos em paralelo: células incubadas apenas com meio completo e células incubadas com quantidades equivalentes de etanol ou água presentes nos grupos de teste FTY720 e NP@FTY720, respectivamente. No final de cada período de exposição, o meio de cultura foi substituído por um meio completo fresco contendo brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Sigma-Aldrich) a 0,5 mg/ mL. As células foram incubadas por 1 h e lavadas com PBS, e o formazan foi solubilizado com dimetilsulfóxido (200 µL). A absorbância foi medida a 570 nm usando um espectrofotômetro de microplaca, SpectraMax M2E (Molecular Device, Inc.).

[87] A viabilidade das linhagens celulares humanas, HepaRG e A549, após tratamento com FTY720, NP@FTY720 e NPs vazias foram analisadas pelo ensaio de MTT. Para ambas as linhagens celulares, FTY720 livre e encapsulado induziu uma diminuição significativa na viabilidade celular de uma maneira concentração-dependente (Figura 4). Além disso, NPs vazias não causaram citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas ou pontos de tempo de incubação.

[88] Para células HepaRG, NP@FTY720 foi menos tóxico que FTY720 em 24 e 48 h (Figura 4A, 4B). A concentração inibitória que produz metade do efeito máximo (IC₅₀) após 24 h de exposição foi de 8,8 µM para FTY720 e 15,6 µM para NP@FTY720; após 48 h, os valores de IC₅₀ foram 6,8 e 15 µM, respectivamente.

[89] Em ambos os tempos de exposição, os valores de IC₅₀ de NP@FTY720 foram aproximadamente duas vezes maiores

que os valores registrados para o fármaco livre. Portanto, o efeito protetor atribuído ao encapsulamento de FTY720 dentro de NPs PLGA foi confirmado.

[90] Os perfis citotóxicos de FTY720 e NP@FTY720 em células A549 foram semelhantes em ambos os pontos de tempo de incubação. Os valores de IC_{50} após 24 h de exposição à FTY720 e NP@FTY720 foram 11 e 14,7 μM , respectivamente (Figura 4C). Após 48 h, esses valores foram de 11 μM para FTY720 e 12,2 μM para NP@FTY720 (Figura 4D).

[91] Os dados indicam que o FTY720 diminui a viabilidade celular de forma dependente da concentração, o que é consistente com os resultados obtidos neste estudo. Investigações de citotoxicidade também foram realizadas para diferentes tipos de NPs FTY720, incluindo NPs à base de óxido de grafeno, lipossomal e fosfato de cálcio. No estado da técnica, também é relatado que a viabilidade celular diminuiu de maneira dependente da concentração após a incubação com NPs FTY720.

[92] Testes de viabilidade celular também foram realizados em células VeroCCL81, pois essas células foram usadas para estudar a atividade antiviral de FTY720 e NP@FTY720 contra SARS-CoV-2. Além de 24 e 48 h, as células foram incubadas por 72 h seguindo o protocolo de infecção viral (Figura 5). Conforme observado para células humanas, FTY720 e NP@FTY720 induziram uma redução dependente da concentração na viabilidade celular em células VeroCCL81.

[93] Recentemente, Risner e colaboradores descreveram um resultado semelhante para VeroCCL81 incubado com FTY720 por 24 h (Risner et al., 2020). No presente caso, a toxicidade de FTY720 livre foi aproximadamente duas vezes maior do que a de NP@FTY720 para células VeroCCL81 após 24 e 48 h de incubação (Figura 5A e 5B). No entanto, essa diferença foi equalizada após 72 h de incubação; assim, os valores de IC_{50} após 72 h foram 3,2 μM para FTY720 livre e

5,2 μM para NP@FTY720 (Figura 5C). A partir desses resultados, concluímos que concentrações abaixo de 1,4 μM de FTY720 livre e NP@FTY720 não são citotóxicas para células VeroCCL81 e são adequadas para estudar sua atividade antiviral contra SARS-CoV-2.

Estudo de internalização de NP@FTY720 in vitro

[94] Para avaliar a cinética de internalização de NP@FTY720, as células VeroCCL81 foram incubadas com NP@FTY720-DiO a 5×10^9 partículas/mL por 0,5, 1, 2 e 4 h. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com tampão PBS a 4°C, colhidas (0,25% de tripsina, 0,02% de EDTA em PBS, pH 7,2) e peletizadas em um meio de cultura completo (1000 g, 5 min). Subsequentemente, os pellets foram ressuspensos e lavados duas vezes por centrifugação (500g por 10 min, 4°C) com uma solução de BSA-Isoton a 0,5%.

[95] A intensidade de fluorescência de NP@FTY720-DiO foi quantificada em cada amostra por citometria de fluxo usando FACS Calibur (BD Biosciences). Células em meio completo e células com adição de NP@FTY720 não fluorescente foram usadas como controles. Três replicatas biológicas independentes foram realizadas, os dados foram processados usando o software FlowJo e a análise estatística foi realizada usando o software GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software Inc.).

[96] A internalização de NP@FTY720-DiO em células VeroCCL81 foi ainda confirmada por microscopia confocal. As células foram cultivadas em lamínulas em placas de 12 poços e incubadas com 5×10^9 partículas/mL por 4 h. 30 minutos antes de terminar o tratamento, 1 μM da sonda fluorescente LysoTracker (Thermo Fisher) foi adicionado aos poços para corar os lisossomos. No final do período de incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS, fixadas com paraformaldeído a 3,7% por 10 min e lavadas três vezes com

PBS. Após bloqueio com BSA 3% por 1 h, as células foram lavadas novamente com PBS, os núcleos foram corados com 4',6'-diamino-2-fenil-indol (1 µg/mL) e as lamínulas foram montadas com meio Fluoroshield. As células foram fotografadas em seções z de 1,47 µm de espessura usando um microscópio confocal de varredura a laser Zeiss LSM900 (Alemanha). Para estudos de colocalização, as seções z de 10 células foram analisadas individualmente usando o plugin JACoP no software Fiji, e o coeficiente de Pearson foi avaliado.

[97] Para investigar as vias de endocitose envolvidas na captação de NP@FTY720, células VeroCCL81 foram cultivadas em placas de 12 poços e incubadas com diferentes inibidores farmacológicos de endocitose por 30 min a 37°C e 5% de CO₂ (amilorida 100 µg/mL, nistatina 40 µg/mL, nocodazol 5 µg/mL, dinasore 100 µg/mL e dansil-cadaverina 100 µg/mL). Esses inibidores foram escolhidos devido à sua capacidade de inibir seletivamente diferentes vias de endocitose, a saber: amiloride bloqueia a macropinocitose, a nistatina inibe a endocitose mediada por cavéolas, o nocodazol interfere na captação dependente de microtúbulos, hidroxildinasore inibe a endocitose mediada por dinamina e a cadaverina bloqueia a internalização celular dependente de clatrina/dinamina.

[98] Após o pré-tratamento, as células foram incubadas com os inibidores e NP@FTY720-DiO a 5×10^9 partículas/mL por 4 h. Em seguida, as células foram cuidadosamente lavadas com PBS (três vezes), colhidas (0,25% de tripsina, 0,02% de EDTA em PBS, pH 7,2) e peletizadas em meio de cultura completo (1000 g por 5 min). Subsequentemente, as amostras foram processadas para análise de citometria de fluxo conforme descrito anteriormente.

[99] Foi observado que a captação de NP ocorreu significativamente 4 h após a incubação, em comparação com os controles (células não expostas a NPs e células expostas

a NPs não fluorescentes) (Figura 6A). Com base nesses resultados, novos experimentos foram projetados para investigar os mecanismos de internalização de partículas.

[100] Os mecanismos pelos quais NP@FTY720-DiO são internalizados pelas células foram abordados por meio de tratamento com inibidores farmacológicos de diferentes vias endocíticas antes da incubação por 4 h. Conforme mostrado na Figura 6B, NP@FTY720-DiO foi internalizado por uma combinação de diferentes vias de captação (caveolina, macropinocitose, dinamina e endocitose mediada por microtúbulos). Os resultados foram indicados pela redução da intensidade de fluorescência em células VeroCCL81 após pré-tratamento com inibidores farmacológicos (nistatina, amilorida, hidroxí-dinasore e nocodazol, respectivamente).

[101] A absorção de NP@FTY720-DiO em células pré-incubadas com dinasore foi quase 80% menor do que no grupo controle (Figura 6B), indicando que a dinamina é uma proteína essencial para a internalização de NP@FTY720. Esta GTPase é um dos principais reguladores da endocitose da célula porque é necessária para a fagocitose, endocitose mediada por clatrina e caveolina (CVME), bem como algumas vias de captação independentes de clatrina e caveolinina. Assim, seria esperada forte inibição da concentração intracelular de NP@FTY720-DiO após pré-tratamento com dinasore.

[102] A endocitose mediada por clatrina é um processo dependente de dinamina e uma das vias de captação mais representativas para NPs de 100-200 nm. No entanto, a pré-incubação de células VeroCCL81 com cadaverina não reduziu significativamente a captação de NP@FTY720-DiO (Figura 6B), o que sugere que os mecanismos de captação de NP ocorreram principalmente de maneira independente da clatrina.

[103] A CVME é uma das vias de endocitose independentes de clatrina e dependentes de dinamina mais bem caracterizadas. Aqui, o pré-tratamento com nistatina, um inibidor de CVME,

levou a uma redução significativa na captação de NP@FTY720-DiO (quase 40%) (Figura 6B). Embora a CVME seja caracterizada como uma invaginação de membrana em forma de frasco, com aproximadamente 50-80 nm de tamanho, já foi relatado no estado da técnica que NPs esféricas de PLGA de 100-200 nm podem ser internalizadas por essa via endocítica. Nesses estudos, as NPs poliméricas também foram internalizadas via endocitose mediada por clatrina e/ou macropinocitose.

[104] A macropinocitose também pode ocorrer no processo de captação de NP@FTY720-DiO, pois a concentração intracelular de NP diminuiu significativamente (~30%) em células pré-tratadas com amilorida (Figura 6B). Este mecanismo de internalização é independente de clatrina, caveolina e dinamina e ocorre através da formação de saliências de membrana acionadas por actina de maneira não seletiva. Devido à sua não especificidade e capacidade de englobar partículas de tamanho micro, a macropinocitose de NPs poliméricas comumente ocorrem em conjunto com outros tipos de vias de captação, como endocitose mediada por clatrina e caveolina.

[105] Uma vez que o estudo de liberação do fármaco indicou uma dependência do pH para a liberação de FTY720 da NP, e os ensaios de MTT revelaram que ocorre um efeito citotóxico após a exposição do NP@FTY720, é mais provável que o NP@FTY720-DiO seja transportado para organelas ácidas após a internalização celular, onde pode ocorrer a liberação do fármaco.

[106] Por microscopia confocal, foi confirmado que após 4 h de incubação, NP@FTY720-DiO colocaliza com os lisossomos marcados com LysoTracker de células VeroCCL81, com coeficiente de correlação de Pearson (PCC) acima de 0,5 (Figura 6C); a colocalização de NP@FTY720-DiO e lisossomos pode ser vista como um sinal de fluorescência amarelo na imagem mesclada. Este resultado reforça que após a

internalização celular, NP@FTY720-DiO segue a via endocítica clássica em que as vesículas endocitadas são transportadas para endossomos precoces e tardios e terminam nos lisossomos.

[107] Em conjunto, os resultados obtidos nos ensaios de captação indicaram que NP@FTY720-DiO foi ativamente internalizada pelas células VeroCCL81 principalmente através de um mecanismo dependente de dinamina, sendo CVME e macropinocitose as vias de captação mais representativas. Além disso, NP@FTY720 foi transportada para lisossomos, onde FTY720 foi rapidamente liberado do nanossistema em organelas de baixo pH, fato previamente evidenciado em estudos de liberação *in vitro* (Figura 3).

Avaliação da atividade anti-SARS-CoV-2 in vitro

[108] As células VeroCCL81 semeadas em placas de 96 poços foram pré-tratadas com diluições em série de FTY720, NP@FTY720 ou nanopartículas vazias em DMEM fresco com 2,5% de FBS. Após 4 h de incubação, a cepa SARS-CoV-231 foi diluída em DMEM com 2,5% de FBS e as células foram inoculadas com o vírus em uma multiplicidade de infecção de 0,1 para permitir a absorção por 1 h. O inóculo viral foi removido e DMEM fresco com 2,5% de FBS contendo diluições em série duplas de FTY720, NP@FTY720 ou nanopartículas vazias foram adicionados de volta aos poços. As células foram incubadas por mais 72 h após a infecção para avaliar o efeito citopático (CPE) mediado pela infecção viral através do ensaio CellTiter-Glo (CTG) ou para análise de RNA viral.

[109] Quando o CPE ocorre devido à infecção viral, a depleção de ATP pode ser medida e correlacionada com a carga viral. A inibição do CPE após 72 h pós-infecção na presença de FTY720, NP@FTY720 ou NPs vazias foi determinada via o ensaio de viabilidade celular luminescente CTG (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Um sinal luminescente foi registrado usando um leitor de microplacas multimodo

CLARIOstar (BMG LABTECH, Alemanha). A porcentagem de inibição de CPE foi definida como:

$$\left[\frac{(\text{sinal do composto de teste} - \text{sinal do controle de vírus})}{(\text{sinal do controle de célula} - \text{sinal do controle de vírus})} \right] \times 100.$$

[110] Para avaliar a produção de RNA viral, foi utilizado o kit de isolamento de ácido nucleico viral/patógeno MagMAX (Thermo Fisher Scientific). As amostras foram processadas em uma plataforma semiautomática NucliSens easyMAG (bioMérieux, Lyon, França), seguindo as instruções do fabricante. A detecção do RNA viral foi realizada em um sistema QuantStudio 3 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific) usando o kit AgPath-ID One-step RT-PCR (Thermo Fisher Scientific) e uma sequência de primers e sonda para o gene E.

[111] Os títulos virais foram calculados usando uma curva padrão gerada com diluições seriadas de um modelo de concentração conhecida e expressos em uma dose infecciosa de cultura de tecidos (TCID₅₀)/mL. Os valores de IC₅₀ foram calculados por análise de regressão não linear usando GraphPad Prism versão 8.00 (GraphPad Software Inc). Os dados foram obtidos a partir de quatro repetições (n = 4) em dois experimentos biológicos. Amostras consideradas falhas técnicas ou outliers foram removidos.

[112] Para estudar o efeito de FTY720, NP@FTY720 e NPs vazias na proliferação de SARS-CoV-2, foram realizados ensaios de RT-qPCR e CTG. Diluições em série de FTY720, NP@FTY720 ou NPs vazias foram aplicadas às células VeroCCL81 infectadas para analisar o efeito de NP@FTY720 na síntese de RNA viral (vRNA). Embora o valor IC₅₀ de FTY720 contra a linhagem celular hospedeira tenha sido de 5,3 µM (Figura 5C), o respectivo valor IC₅₀ de NP@FTY720 na proliferação do vírus foi determinado como sendo cerca de 100 vezes mais potente

(valor $IC_{50} = 0,05 \mu M$) (Figura 7A) que demonstra claramente o caráter não citotóxico do fármaco nanoencapsulado. Ademais, a nanoencapsulação de FTY720 melhorou significativamente (cerca de 70 vezes) a atividade antiviral contra SARS-CoV-2, como mostrado claramente pelo valor IC_{50} de $3,3 \mu M$ de FTY720 na proliferação do vírus (Figura 7A).

[113] No ensaio de inibição de CTG, a incubação de células com NP@FTY720 mostrou inibição da produção de partículas virais infecciosas > 50% em níveis não citotóxicos (valor $IC_{50} = 0,7 \mu M$), enquanto FTY720 não foi capaz de inibir CPE abaixo dos níveis de concentração citotóxica (Figura 7B).

[114] Esses resultados demonstram que a produção de vRNA do SARS-CoV-2 foi substancialmente mais sensível ao NP@FTY720, indicando sua atividade antiviral contra o SARS-CoV-2 com maior potência do que o FTY720 livre. Ademais, a NP vazia não influenciou a síntese de RNA viral ou CPE, o que demonstrou que a atividade anti-SARS-CoV-2 observada para NP@FTY720 foi induzida pela combinação do fármaco e do nanossistema desenvolvido.

[115] Uma das vantagens dos sistemas de liberação de fármacos de NP é a possibilidade de melhorar a farmacocinética e propriedades farmacodinâmicas do fármaco, modulando sua solubilidade, perfil de liberação do fármaco, difusividade e biodisponibilidade. No caso do FTY720, foi demonstrado que sua encapsulação em sistemas nanoparticulados resulta em melhor eficácia terapêutica e propriedades farmacocinéticas melhoradas em comparação com fármacos livres.

[116] Foi observado que a nanoencapsulação foi essencial para aumentar a potência da atividade antiviral de FTY720 contra SARSCoV-2 abaixo da concentração citotóxica, pois o valor de IC_{50} de NP@FTY720 para inibir a produção de partículas virais foi 70 vezes menor do que o observado para FTY720 livre. Este resultado corrobora um estudo recente que

mostrou que 5 μ M de FTY720 pode inibir a produção de SARS-CoV-2 em células infectadas com VeroCCL81. Há um aumento em sua biodisponibilidade e degradação reduzida, uma vez que o FTY720 é pouco solúvel e instável em tampões aquosos. Consequentemente, mesmo em baixas concentrações, o NP@FTY720 do presente pedido alcançou o efeito desejado.

[117] Em conjunto, os resultados demonstram o potencial do NP@FTY720 para melhorar a segurança e a atividade anti-SARS-CoV-2 do FTY720. Além de melhorar a eficácia terapêutica dos medicamentos, as NPs também podem reduzir os efeitos colaterais adversos. Isso é particularmente importante para o FTY720, pois sua administração está frequentemente associada a vários efeitos colaterais, como dor de cabeça, fadiga, redução da frequência cardíaca na primeira dose, edema macular, enzimas hepáticas alteradas e risco de desenvolvimento de câncer de pele. O aprisionamento de fármacos em nanossistemas poliméricos pode oferecer uma opção de tratamento mais segura.

Referências Bibliográficas

[118] Alshaker, H., Wang, Q., Srivats, S., Chao, Y., Cooper, C., & Pchejetski, D. (2017). New FTY720-docetaxel nanoparticle therapy overcomes FTY720-induced lymphopenia and inhibits metastatic breast tumour growth. *Breast Cancer Research and Treatment*, 165(3), 531-543. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4380-8>.

[119] Araujo, D. B., Machado, R. R. G., Amgarten, D. E., Malta, F. de M., de Araujo, G. G., Monteiro, C. O., Candido, E. D., Soares, C. P., de Menezes, F. G., Pires, A. C. C., Santana, R. A. F., Viana, A. de O., Dorlass, E., Thomazelli, L., Ferreira, L. C. de S., Botosso, V. F., Carvalho, C. R. G., Oliveira, D. B. L., Pinho, J. R. R., & Durigon, E. L. (2020). SARS-CoV-2 isolation from the first reported patients in brazil and establishment of a coordinated task

network. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 115(12), 1-8.
<https://doi.org/10.1590/0074-02760200342>.

[120] De Mendoza, A. E. H., Castello-Cros, R., Imbuluzqueta, E., Cirauqui, C., Pippa, R., Odero, M. D., & Blanco-Prieto, M. J. (2015). Lipid nanosystems enhance the bioavailability and the therapeutic efficacy of FTY720 in acute myeloid leukemia. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 11(4), 691-701. <https://doi.org/10.1166/jbn.2015.1944>.

[121] Ferreira, N. N., Granja, S., Boni, F. I., Prezotti, F. G., Ferreira, L. M. B., Cury, B. S. F., Reis, R. M., Baltazar, F., & Gremião, M. P. D. (2020). Modulating chitosan-PLGA nanoparticle properties to design a co-delivery platform for glioblastoma therapy intended for nose-to-brain route. *Drug Delivery and Translational Research*. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00824-2>.

[122] Foerch, C., Friedauer, L., Bauer, B., Wolf, T., & Adam, E. H. (2020). Severe COVID-19 infection in a patient with multiple sclerosis treated with fingolimod. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 42(May), 102180. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2020.102180>.

[123] Ghediya, R. V.; Patel, M.; Pandya, D.; Shah, A. K.; Khunt, R. C. Stability Indicating Chromatographic Method Transfer of Immunomodulating Drug Fingolimod from High Performance Liquid Chromatography to New Generation Ultra Performance Liquid Chromatography with Comparative Validation Study. *J. Chem. Pharm. Res.* 2016, 8, 476-485.

[124] Gomez-Mayordomo, V., Montero-Escribano, P., Matías-Guiu, J. A., González-García, N., Porta-Etessam, J., & Matías-Guiu, J. (2021). Clinical exacerbation of SARS-CoV2 infection after fingolimod withdrawal. *Journal of Medical Virology*, 93(1), 546-549. <https://doi.org/10.1002/jmv.26279>.

[125] Masoudipour, E., Kashanian, S., Maleki, N., Karamyan, A., & Omidfar, K. (2018). A novel intracellular pH-responsive formulation for FTY720 based on PEGylated

graphene oxide nano-sheets. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44(1), 99–108.

<https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1386194>.

[126] Niemelä, E., Desai, D., Niemi, R., Doroszkowski, M., Özliseli, E., Kemppainen, K., Rahman, N. A., Sahlgren, C., Törnquist, K., Eriksson, J. E., & Rosenholm, J. M. (2020). Nanoparticles carrying fingolimod and methotrexate enables targeted induction of apoptosis and immobilization of invasive thyroid cancer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 148(November 2019), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.12.015>.

[127] Puhl, D. L., Funnell, J. L., D'Amato, A. R., Bao, J., Zagorevski, D. V., Pressman, Y., Morone, D., Haggerty, A. E., Oudega, M., & Gilbert, R. J. (2020). Aligned Fingolimod-Releasing Electrospun Fibers Increase Dorsal Root Ganglia Neurite Extension and Decrease Schwann Cell Expression of Promyelinating Factors. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(August), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00937>.

[128] Rezaie Shirmard, L., Ghofrani, M., Bahari Javan, N., Bayrami, S., Tavassoli, A., Rezaie, A., Amini, M., Kebriaee-zadeh, A., Rouini, M. R., Dinarvand, R., Rafiee-Tehrani, M., & Dorkoosh, F. A. (2020). Improving the in-vivo biological activity of fingolimod loaded PHBV nanoparticles by using hydrophobically modified alginate. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 46(2), 318–328. <https://doi.org/10.1080/03639045.2020.1721524>.

[129] Risner, K. H., Tieu, K. V., Wang, Y., Bakovic, A., Alem, F., Bhalla, N., Nathan, S., Conway, D. E., Macklin, P., & Narayanan, A. (2020). Maraviroc inhibits SARS-CoV-2 multiplication and s-protein mediated cell fusion in cell culture. *BioRxiv*, 2020.08.12.246389. <https://doi.org/10.1101/2020.08.12.246389>.

- [130] Sardoiwala, M. N., Karmakar, S., & Choudhury, S. R. (2021). Chitosan nanocarrier for FTY720 enhanced delivery retards Parkinson's disease via PP2A-EzH2 signaling in vitro and ex vivo. *Carbohydrate Polymers*, 254(June 2020), 117435. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117435>.
- [131] Wang, J., Wang, J., Lu, P., Cai, Y., Wang, Y., Hong, L., Ren, H., Heng, B. C., Liu, H., Zhou, J., & Ouyang, H. (2015). Local delivery of FTY720 in PCL membrane improves SCI functional recovery by reducing reactive astrogliosis. *Biomaterials*, 62, 76-87. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.04.060>.
- [132] Wang, Q., Alshaker, H., Böhler, T., Srivats, S., Chao, Y., Cooper, C., & Pchejetski, D. (2017). Core shell lipid-polymer hybrid nanoparticles with combined docetaxel and molecular targeted therapy for the treatment of metastatic prostate cancer. *Scientific Reports*, 7(1), 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06142-x>.
- [133] Zeraatpisheh, Z., Mirzaei, E., Nami, M., Alipour, H., Mahdavi pour, M., Sarkoohi, P., Torabi, S., Azari, H., & Aligholi, H. (2021). Local delivery of fingolimod through PLGA nanoparticles and PuraMatrix-embedded neural precursor cells promote motor function recovery and tissue repair in spinal cord injury. *European Journal of Neuroscience*, 54(4), 5620-5637. <https://doi.org/10.1111/ejn.15391>.
- [134] Zou, X., Jiang, Z., Li, L., & Huang, Z. (2021). Selenium nanoparticles coated with pH responsive silk fibroin complex for fingolimod release and enhanced targeting in thyroid cancer. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 49(1), 83-95. <https://doi.org/10.1080/21691401.2021.1871620>.
- [135] British pharmacopoeia. Vol. 1. London: Medicines and Healthcare products Regulatory Agency; 2018.
- [136] European pharmacopoeia. 9th ed, Strassbourg: Council of Europe: 2018.

- [137] United States Pharmacopeia and National Formulary. Buffer solutions. In: USP 43 NF 38; 2020.
- [138] REMINGTON, J. P., AND GENNARO, A. R. Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Co., 18th ed. 1990.
- [139] MARTINDALE, W. AND REYNOLDS, J. E. F. Martindale: The Extra Pharmacopoeia. London, The Pharmaceutical Press 31st ed, 1996).
- [140] PRISTA, L. V. N., ALVES, A. C., MORGADO, R. M. R. Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica. 4ª edição. Fundação Calouste Gulbenkian. Serviço de Educação e Bolsas, 1996.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição polimérica nanoestruturada contendo fingolimode **caracterizada** pelo fato de que compreende:

a) 5 a 15 mg de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) 15:85;

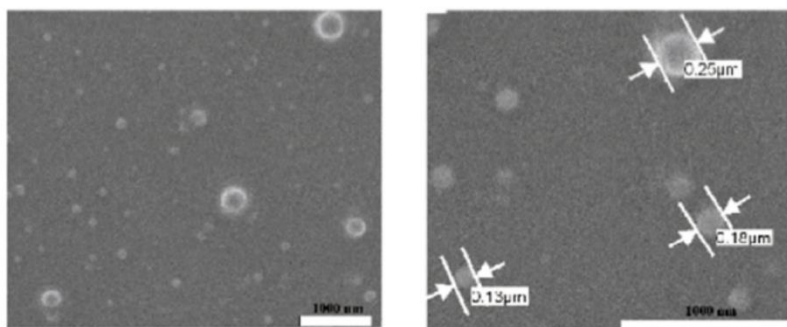
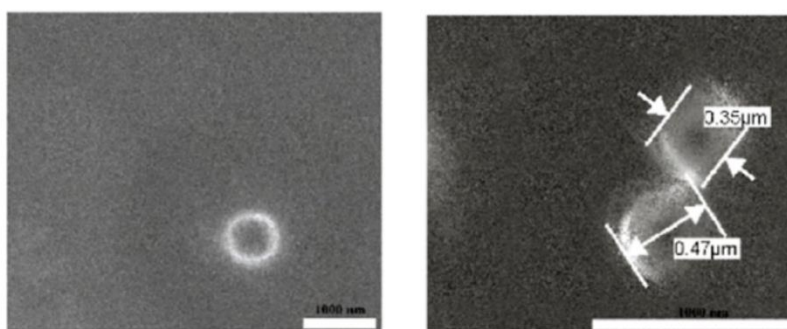
b) 20 a 40 mg de tensoativo não iônico (2-[2-(2-hidroxietoxi)propoxi]etanol (Pluronic® 127); e

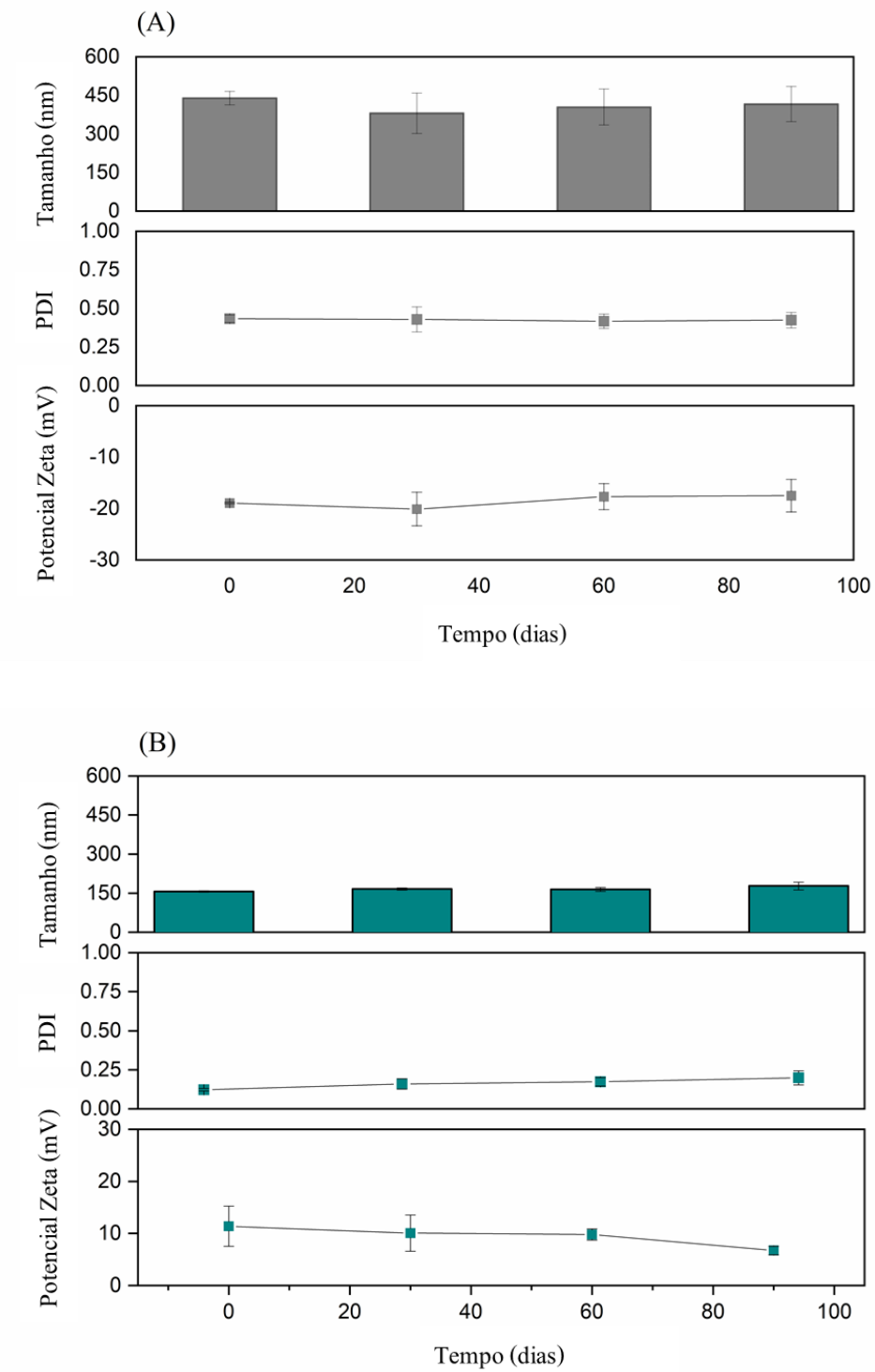
c) 1 mg de cloridrato de fingolimode (2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]propano-1,3-diol).

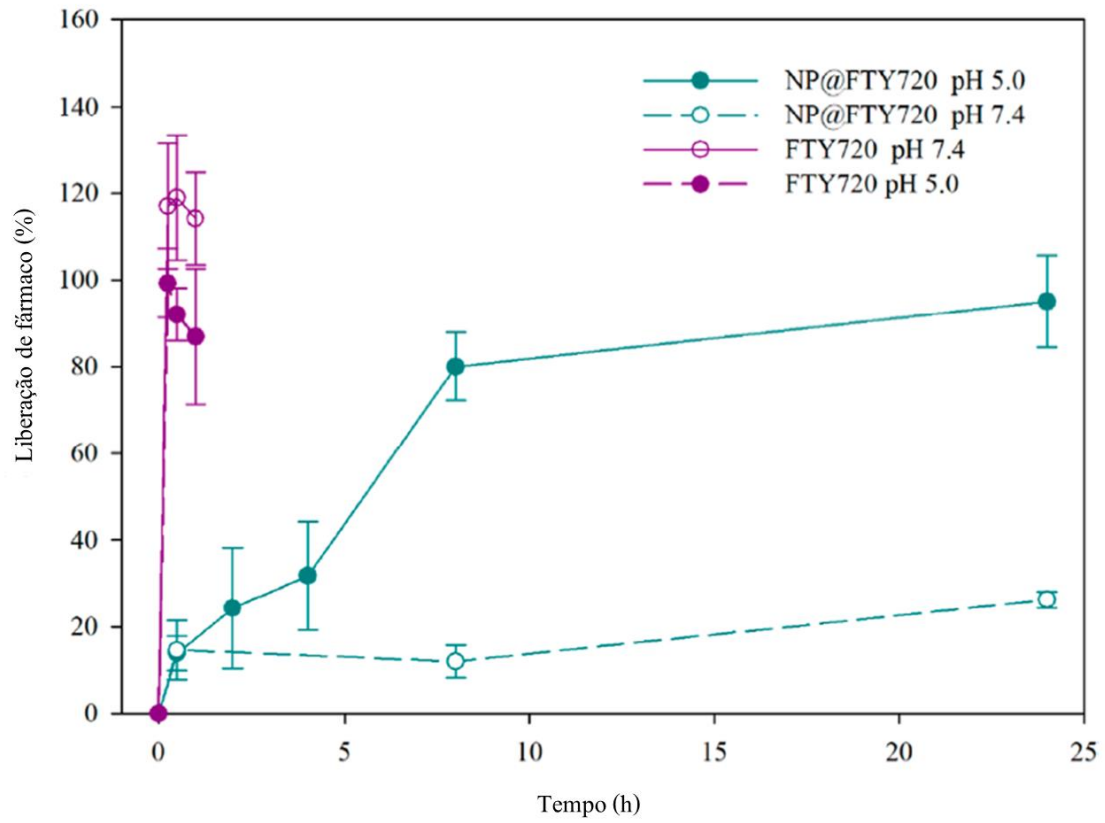
2. Composição polimérica nanoestruturada contendo fingolimode, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que compreende 10 mg poli(ácido lático-co-ácido glicólico) 15:85, 15 mg de tensoativo não iônico (2-[2-(2-hidroxietoxi)propoxi]etanol (Pluronic® 127) e 1 mg de cloridrato de fingolimode (2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]propano-1,3-diol).

3. Composição polimérica nanoestruturada contendo fingolimode, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que o tamanho médio das partículas da composição, medido por espalhamento dinâmico de luz, está entre 100 e 200 nm, com um índice de polidispersão entre 0,05 e 0,20.

4. Uso da composição nanoestruturada polimérica contendo fingolimode, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de ser para preparar um medicamento para tratar Covid-19.

NP@FTY720**NP vazia****FIGURA 1**

**FIGURA 2**

**FIGURA 3**

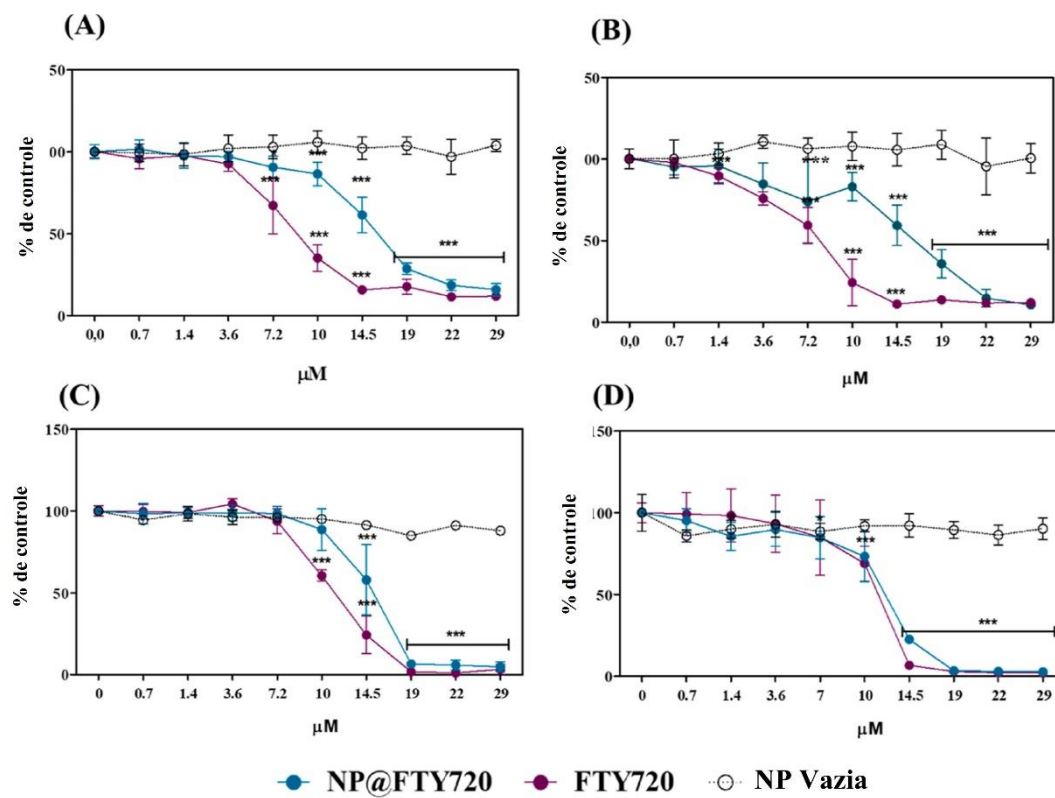


FIGURA 4

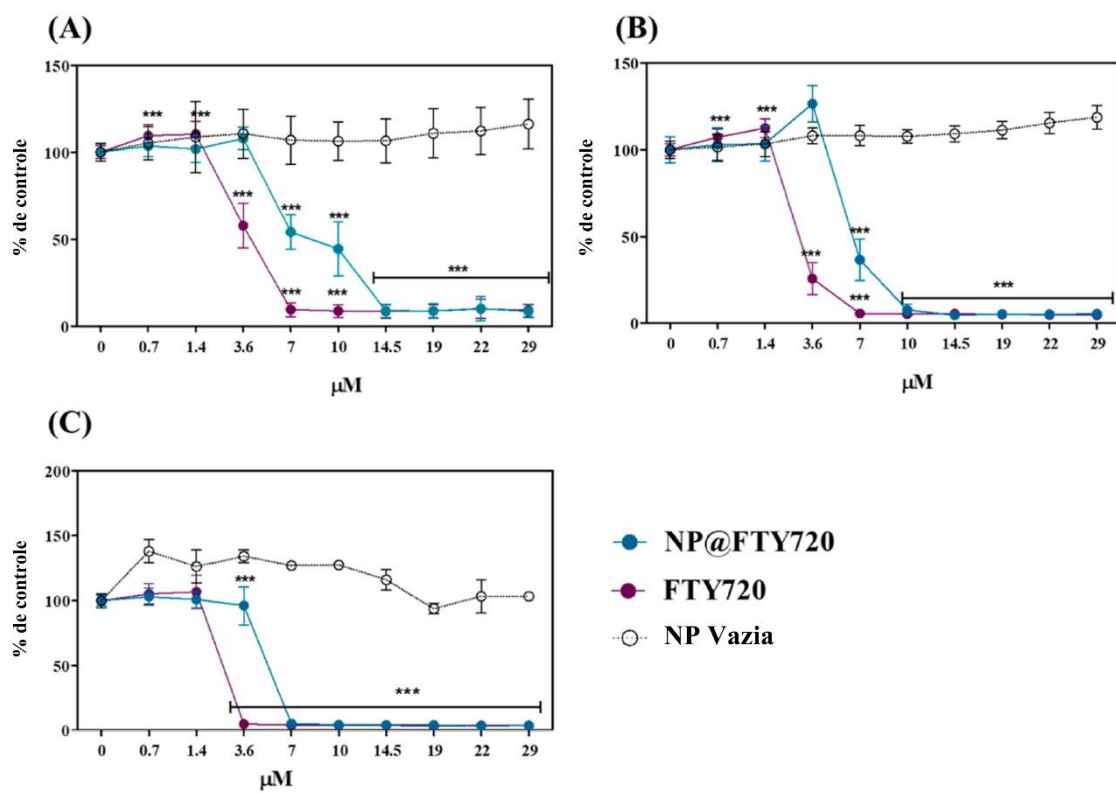


FIGURA 5

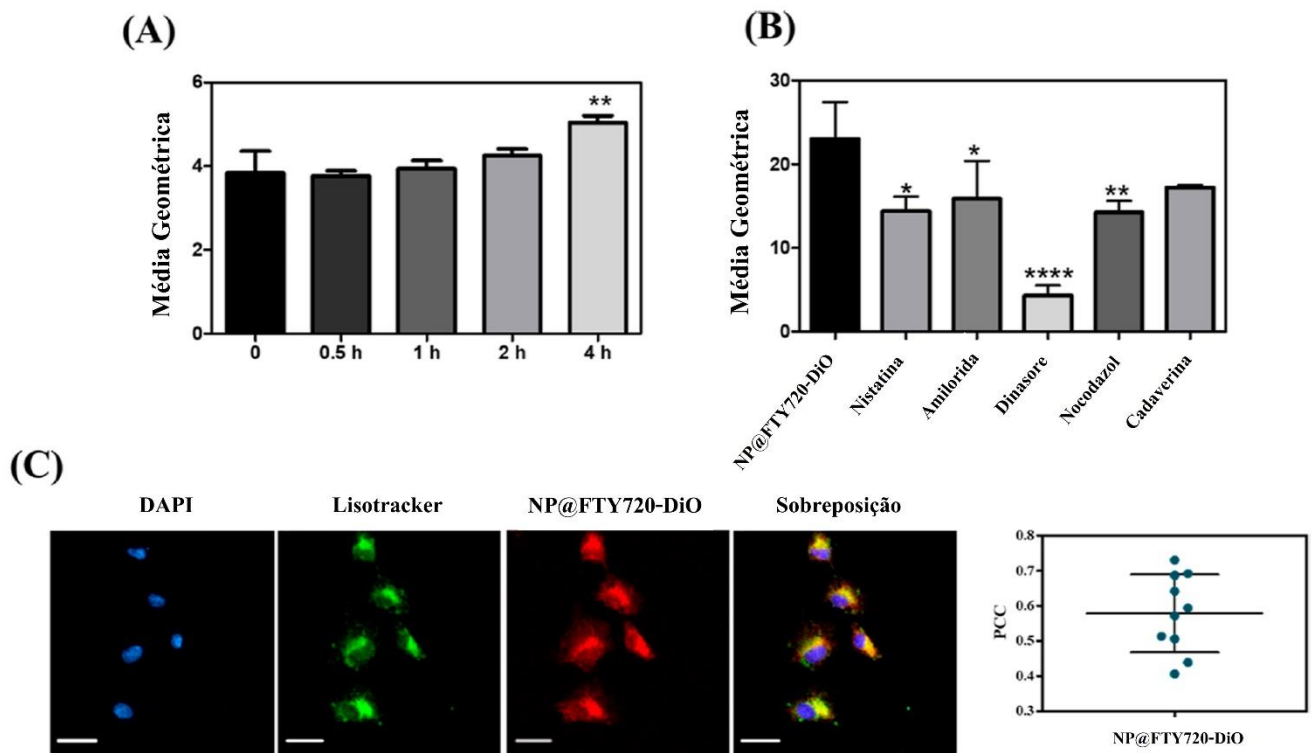


FIGURA 6

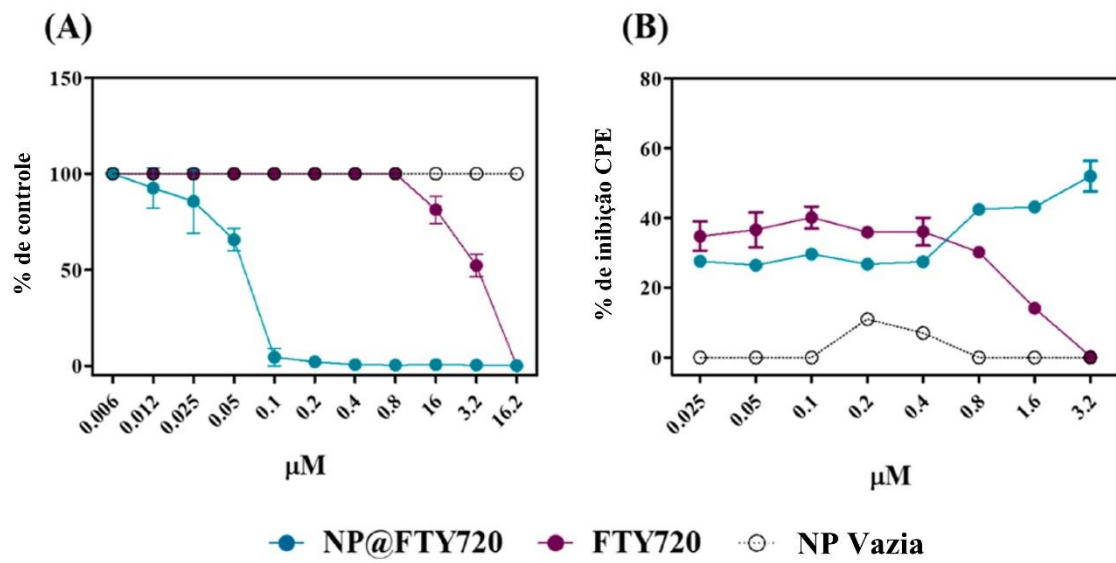


FIGURA 7

RESUMO**COMPOSIÇÃO POLIMÉRICA NANOESTRUTURADA CONTENDO FINGOLIMODE****E USO**

A presente invenção descreve uma composição polimérica nanoestruturada à base de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) contendo fingolimode (FTY720) e sua aplicação no tratamento da COVID-19. A composição é preparada através de um protocolo de emulsão simples, na presença do tensoativo Pluronic® 127. Por conta da sua composição inédita, compreendendo PLGA 15:85 e Pluronic® 127, a composição polimérica nanoestruturada aqui descrita apresenta um perfil de liberação do fingolimode que é minimizado em pH fisiológico e acelerado em pH acidificado, o que tende a favorecer a liberação do fármaco em tecidos inflamados (portanto, tecidos alvo). Adicionalmente, a composição nanoestruturada ora descrita ressalta significativamente um efeito anti-SARS-CoV-2 do fingolimode.