

Abstract

The HIV/AIDS pandemic continues to stand as a worldwide health, social and economic burden. Innovative preventive strategies such as the development of vaginal and rectal microbicides are required in order to circumvent viral sexual transmission. Drug formulation is assuming increasing importance in the design of modern microbicides and nanotechnology-based solutions in particular may provide added value to these last. Thus, the objective of this Thesis was to investigate the potential of polymeric nanoparticles (NPs) as carriers for the antiretroviral drug dapivirine and their possible use in the development of vaginal anti-HIV microbicides.

Different drug-loaded NPs based on poly(ϵ -caprolactone) (PCL) were developed using surface-modifiers such as poly(ethylene oxide) (PEO-PCL NPs), sodium lauryl sulfate (SLS-PCL NPs) and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB-PCL NPs). All NP formulations presented similar size (180-200 nm), high drug association efficiency (>97%) and nearly 13% drug loading. Differences were mainly restricted to their zeta potential: PEO-PCL NPs and SLS-PCL NPs were negatively charged (around -30 mV and -55 mV, respectively), while CTAB-PCL NPs presented positive surface charge (roughly +45 mV). NPs showed no relevant interactions or incompatibilities among individual components; also, colloidal and drug stability was preserved up to one year, except for CTAB-PCL NPs.

NPs were further characterized for their interactions with a simulated vaginal fluid (SVF) containing mucin. In particular, multiple particle tracking was shown useful in assessing mucoadhesive and transport behavior of NPs in SVF. The diffusion of nanosystems was dependent on the combined effect of their surface chemistry/charge and the pH of SVF (4.2 or 7.0). PEO-PCL NPs and SLS-PCL NPs presented higher diffusivity as compared to CTAB-PCL NPs, which may be related with increased interactions of these last with mucin. NPs could adhere transiently to mucin but were still able to diffuse through SVF. This may favor vaginal retention while allowing NPs to diffuse across mucus.

All NP formulations were able to be readily taken up by different cell types relevant to vaginal and rectal microbicide development. However, intracellular/cell associated levels of dapivirine resulting from incubation with NPs were not enhanced in cells of epithelial origin as compared to the free drug, contrasting with higher drug concentrations in the case of immune cells. These results may be associated with the phagocytic nature of these last and appear to be highly advantageous considering the role of immune cells in HIV transmission. Also, similar/increased anti-HIV activity and reduced cytotoxicity was achievable for PEO-PCL NPs, while toxicity results were mixed for SLS-PCL NPs. CTAB-

PCL NPs showed high cytotoxicity despite potent antiviral activity. Furthermore, all NPs and free dapivirine were shown unable to induce pro-inflammatory response *in vitro*.

Studies using cell monolayers of cervicovaginal and colorectal origin as well as in pig vaginal and rectal mucosae showed that drug-loaded PEO-PCL NPs were able to reduce the permeability of dapivirine across these membrane models while CTAB-PCL NPs enhanced drug transfer. The use of SLS-PCL NPs did not influence permeability. All NPs were able to penetrate and distribute throughout the epithelium of pig explants as assessed by fluorescence microscopy. This was also associated with significantly increased drug residence in mucosae as compared to unformulated dapivirine. Drug-loaded PEO-PCL NPs in particular seem to conjugate the potential to provide enhanced local delivery of dapivirine without promoting its permeation and, consequently, decrease systemic exposure. Toxicity studies using pig mucosal tissues reinforced that PEO-PCL NPs were at least as safe as free dapivirine and confirmed the detrimental effects of SLS-PCL NPs and, in particular, of CTAB-PCL NPs.

Dapivirine-loaded PEO-PCL NPs were further tested in a female mouse model. Although NPs were rapidly eliminated upon vaginal administration (around 70% after 30 min), they were still retained mainly at the vagina but also distributed to the lower uterus. NPs were able to penetrate vaginal and uterine mucosae and be detected until at least 24h post-administration. NPs also modified the pharmacokinetics (PK) of dapivirine upon vaginal administration: significantly higher levels of drug were recovered from the vagina and lower uterus as compared to free dapivirine administered in suspension. Values of area-under-the-curve between 15 min and 24h increased around 4.2-, 5.1- and 2.8-fold for vaginal lavages, and vaginal and lower uterine tissues when NPs were used. Also, mildly lower systemic drug exposure was observed for NPs. Enhanced drug levels in the genital tract seem particularly promising and may potentially lead to enhanced protection from vaginal HIV transmission. Moreover, dapivirine-loaded PEO-PCL NPs were found safe upon 14 days of daily vaginal administration.

Overall, PEO-PCL NPs seem to represent an interesting carrier system for dapivirine that could be useful for the development of novel and improved vaginal microbicides. Favorable PK and safety profiles provided by these polymeric NPs may confer them enhanced ability to protect against vaginal HIV transmission.

Keywords: Microbicides; Dapivirine; Poly(ϵ -caprolactone); Vaginal drug delivery; Nanomedicine

Resumo

A pandemia VIH/SIDA subsiste como um grave problema global de saúde e sócio-económico. Estratégias de prevenção inovadoras tais como o desenvolvimento de microbicidas vaginais e retais são necessárias no combate à transmissão sexual do vírus. A formulação de fármacos tem assumido uma crescente importância na obtenção de novos microbicidas e, em particular, soluções nanotecnológicas poderão conferir valor acrescentado a estes últimos. Assim, o objectivo desta Tese é averiguar o potencial de nanopartículas (NPs) poliméricas como transportadores do fármaco antiretrovívico dapivirina e o seu uso potencial no desenvolvimento de microbicidas vaginais anti-VIH.

Foram desenvolvidas NPs de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) com fármaco utilizando os modificadores de superfície polioxietileno (NPs PEO-PCL), laurilsulfato de sódio (NPs SLS-PCL) e brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB). Todas as NPs apresentaram tamanho semelhante (180-200 nm), elevada taxa de associação do fármaco (>97%) e cerca de 13% de teor em dapivirina. A principal diferença entre NPs traduziu-se no seu potencial zeta: as NPs PEO-PCL e as NPs SLS-PCL com carga negativa (cerca de -30 mV e -55 mV, respetivamente) e as NPs CTAB-PCL com carga positiva (+45 mV). Não foram detetadas interações/incompatibilidades relevantes entre constituintes e a estabilidade coloidal das NPs e química do fármaco foram mantidas após um ano, exceto para as NPs CTAB-PCL.

As NPs foram caracterizadas quanto à sua interação com um fluido vaginal simulado (SVF) com mucina. A técnica de múltiplo rastreio de partículas mostrou-se útil na avaliação da mucoadesividade e transporte das NPs em SVF. A sua difusão mostrou-se dependente da carga/química de superfície e do pH do SVF (4,2 ou 7,0). As NPs com carga negativa apresentaram maior difusividade, o que poderá estar relacionado com a maior interação das NPs CTAB-PCL com a mucina. As NPs mostraram aderir transitoriamente à mucina mas mantiveram a capacidade de deslocação em SVF. Este facto poderá ser favorável à retenção vaginal das NPs e permitir em simultâneo a sua difusão em muco.

Todas as NPs mostraram ser captadas por diferentes tipos celulares relevantes ao desenvolvimento de microbicidas vaginais e retais. No entanto, este facto não se traduziu num aumento das concentrações intracelulares/associação celular do fármaco em células de origem epitelial, ao contrário do observado em células imunes. Estes resultados podem estar relacionadas com a atividade fagocitária das células imunes, o que poderá ser vantajoso tendo em conta o papel destas últimas na transmissão do VIH. Observou-se também que a associação do fármaco a NPs PEO-PCL permitiu obter atividade anti-VIH semelhante ou melhorada e menor citotoxicidade, enquanto a toxicidade para NPs SLS-

PCL foi variável. As NPs CTAB-PCL com fármaco demonstraram elevada actividade antiviral mas também toxicidade. Nenhum tipo de NPs induziu resposta pró-inflamatória.

Os estudos em monocamadas celulares de origem cervicovaginal e coloretal, bem como em mucosa vaginal e retal de porca mostraram que as NPs PEO-PCL reduziram a permeabilidade da dapivirina através destes modelos, enquanto as NPs CTAB-PCL aumentaram. As NPs SLS-PCL não influenciaram a permeabilidade. Todos os tipos de NPs conseguiram penetrar a distribuir-se no epitélio de mucosa de porca. Em simultâneo, as NPs aumentaram o teor de fármaco associado à mucosa em relação à dapivirina livre. Em particular, as NPs PEO-PCL parecem conjugar o aumento da concentração de dapivirina no tecido sem promover a sua permeação e, potencialmente, diminuir a distribuição sistémica. Os estudos de toxicidade em mucosa de porca confirmaram a menor toxicidade das NPs PEO-PCL e os efeitos tóxicos das NPs SLS-PCL e das NPs CTAB-PCL.

As NPs PEO-PCL carregadas com dapivirina foram testadas num modelo animal de ratinhas. Apesar de sofrerem rápida eliminação após administração vaginal (cerca de 70% após 30 minutos), as NPs ficaram retidas sobretudo na vagina mas também atingiram a parte inferior do útero. As NPs conseguiram penetrar a mucosa vaginal e uterina e foram detetadas até pelo menos 24h após administração. As NPs também modificaram o perfil de farmacocinética (PK) da dapivirina após administração vaginal: níveis mais elevados de fármaco foram recuperados da vagina e da zona inferior do útero, quando comparados com os obtidos para a dapivirina administrada em suspensão. Os valores da área-sobre-a-curva entre os 15 min e as 24h foram cerca de 4,2, 5,1 e 2,8 vezes superiores para a lavagem vaginal e tecidos vaginais e da zona inferior do útero no caso de utilização das NPs. A distribuição sistémica do fármaco foi também ligeiramente inferior quando comparada com os resultados da dapivirina em suspensão. Os níveis mais elevados de fármaco no tecido genital parecem ser promissores no que diz respeito ao potencial de proteção contra a transmissão vaginal do VIH. A administração vaginal diária durante 14 dias das NPs PEO-PCL carregadas com dapivirina mostrou-se segura.

De uma forma geral, as NPs PEO-PCL parecem constituir transportadores interessantes para a dapivirina e que poderão ser úteis no desenvolvimento de microbicidas vaginais. Os perfis de PK e segurança proporcionados por estas NPs poliméricas poderão conferir uma capacidade reforçada de proteção contra a transmissão vaginal do VIH.

Palavras-chave: Microbicidas; Dapivirina; Poli(ϵ -caprolactona); administração vaginal de medicamentos; Nanomedicina