



UEfiscati

Numar înregistrare

Institutul de Chimie Macromoleculară Petru Poni

6715/8.12.2021

## RAPORT ȘTIINȚIFIC

PN-III-P4-ID-PCE-2020-1523, Contract Nr. PCE 161/2021

### Vectori moleculari versatili, destinați transportului și eliberării de gene și medicamente, în lupta împotriva cancerului

Acronim: TM-Vector

Adresa web a site-ului proiectului: <https://www.intelcentru.ro/tm-vector/index.php>

#### Etapa I (ianuarie – decembrie 2021)

#### Studii preliminare, de documentare și experimentale, privind proiectarea și obținerea vectorilor nonvirali cu miez de aur, de generație I.

#### REZUMAT:

Etapa 2021 a proiectului TM-vector a fost dedicată rafinării și diversificării proiectării, sintezei și caracterizării componentelor aplicabile pentru generarea nanoplatformelor cu miez de aur:

- (i) nanoparticule cu miez de aur decorat cu PEI cu mase moleculare de 10 și respectiv 25 kDa, funcționalizate cu  $\beta$ -ciclodextrină și peptid de targetare;
- (ii) combinații complexe cu metale rare, ca potențiali fluorofori pentru obținerea unor complecși de incluziune cu  $\beta$ -ciclodextrină;
- (iii) testarea *in vitro* pe liniile celulare HeLa și MCF-7 a poliplecșilor pe bază de pCS2+MT-Luc și nanoparticule cu miez de aur funcționalizate cu bPEI25kDa și  $\beta$ -ciclodextrină, ori cu bPEI25kDa,  $\beta$ -ciclodextrină și peptid de targetare la diferite rapoarte N/P;
- (iv) cuantificarea comportamentului hemolitic pe eritrocite animale, colectate de la șoareci BALB/C.

Informațiile obținute în urma testărilor *in vivo* au arătat că poliplecșii studiați au capacitatea de a transfecta celulele canceroase HeLa și MCF-7 și că, în plus, conjugatele decorate cu peptid de targetare prezintă capacitate de transfecție mărită pentru linia celulară MCF-7. Conjugatele testate pe sânge animal au prezentat un grad de hemoliza mai mic de 3%, fapt care le recomandă pentru testarea *in vivo*, conform ISO 10993-4:2017.

Rezultatele obținute au asigurat diseminarea pe calea a două conferințe plenare, trei comunicări la manifestări naționale și internaționale și prin publicarea a două lucrări științifice în jurnale cotate ISI privind sinteza și caracterizarea intermediarilor de reacție.

Detaliile activității derulate în cadrul etapei 2021 sunt rezumate în tabelul de mai jos.

**Planul de realizare al proiectului TM-vector. Etapa 2021.**

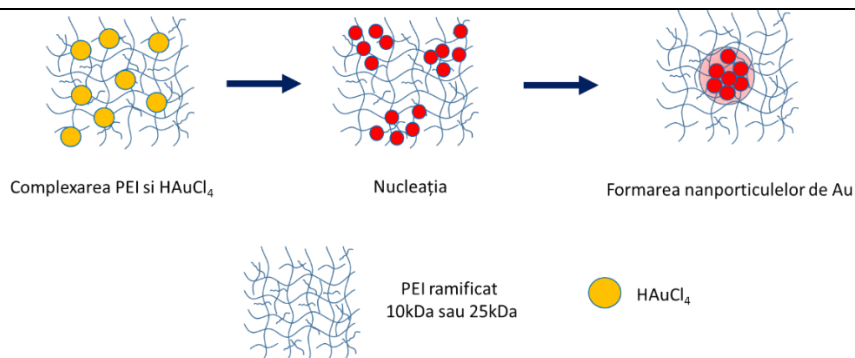
Etapa I	Activitățile incluse	Rezultate
<b>Studii preliminare, de documentare și experimentale, privind proiectarea și obținerea vectorilor nonvirali cu miez de aur de generație I.</b> <i>Livrabile:</i> <i>Raport de cercetare.</i> <i>Protocoale de sinteză și caracterizare. <u>Q lucrare științifică.</u></i> <i><u>WEB site TM-vectors.</u></i> <i><u>Participarea la min. o conferință.</u></i>	<b>A.1.1. Proiectarea și prepararea vectorilor nonvirali</b> - Sinteza nanoparticulelor din aur (AuNPs) cu dimensiuni controlate și cu stabilitate crescută în medii apoase. - Conjugarea AuNPs cu un polimer cationic (CP) funcționalizat cu ciclodextrină (CD). - Sinteza unor combinații complexe ca potențiali fluorofori pentru obținerea unor complecși de incluziune cu $\beta$ -ciclodextrină.	-2 lucrari ISI -2 conferinte, key note speaker -3 comunicari orale -pagina WEB -Raport ce include și protocoale de lucru.
	<b>A.1.2. Caracterizarea fizico-chimică a intermediarilor de reacție și a AuNPs</b>	
	<b>A.1.3. Evaluarea preliminară <i>in vitro</i> a vectorilor nonvirali</b> - Evaluarea <i>in vitro</i> a citotoxicității vectorilor nonvirali. - Evaluarea capacității de transfecție a poliplecșilor de tip Au-CP-CD-Plasmid/Peptid.	
	<b>A.1.4. Evaluarea funcționalității conjugatelor pe probe de sânge animal</b>	
	<b>A.1.5. Managementul proiectului și diseminarea rezultatelor.</b>	

**A.1.1. Proiectarea și prepararea vectorilor nonvirali de generație I**

- Sinteza nanoparticulelor de aur (AuNPs) cu dimensiuni controlate și cu stabilitate crescută în medii apoase.

- Conjugarea AuNPs cu un polimer cationic (CP) funcționalizat cu ciclodextrină (CD).

Principiul de formare al particulelor de Au funcționalizate cu polietilenimină ramificată (bPEI) este prezentat în Figura 1.



**Figura 1.** Principiul de formare al particulelor cu miez de aur, funcționalizate cu bPEI.

**Prima generație de vectori non-virali** este reprezentată de nanoparticulele de aur funcționalizate cu bPEI (Figura 1), iar nanoplatformele obținute au fost ulterior modificate cu ciclodextrine. Un astfel de înveliș favorizează formarea poliplecșilor cu ADN, prin interacțiunea PEI-ADN, iar ciclodextrina favorizează formarea complecșilor de incluziune cu derivați ai adamantanului funcționalizați specific.

S-a demonstrat că AuNP obținute *in situ* cu PEI sunt stabile chimic și fizic în condiții fiziologice și reprezintă candidați ideali pentru aplicațiile bio-medicale, în special în transfecția ADN-ului. Mai mult decât atât, AuNP încărcate pozitiv reprezintă materiale promițătoare pentru aplicații terapeutice, datorită suprafețelor lor cationice care favorizează adsorbția celulară.<sup>1</sup> Pe de altă parte, PEI prezintă stabilitate chimică bună și poate funcționa, concomitent, drept agent reducător și stabilizator al ionilor de aur.<sup>2-3</sup>

AuNP funcționalizate cu PEI (Au-PEI) pot fi preparate prin două metode generice: (i) strategia de modificare, schimb sau co-atașare a ligandului la suprafața AuNP<sup>4-6</sup> și (ii) reducerea ionilor Au (III) în prezența PEI.<sup>7-8</sup> În general, metoda de modificare a ligandului este utilizată în procesele de asamblare strat cu strat (*layer by layer, LbL*) pentru a prepara intermediari Au-PEI cu miez de aur încărcat negativ (de exemplu, AuNP-uri stabilizate cu citrat), pentru stratificarea ARN/ADN pe vectorul Au-PEI.<sup>4-6</sup>

Metoda reducerii se aplică pentru prepararea nanoparticulelor Au-PEI cu dimensiuni variabile, furnizând AuNP multifuncționale. Deși există multe referințe bibliografice ce descriu proprietățile fizico-chimice ce corelează dimensiunea și proprietățile biologice ale Au-PEI, inclusiv toxicitatea, bioabsorbția și transfecția genelor, precum și asamblarea LbL<sup>1, 7, 9-11</sup>, rezultatele prezentate în literatură sunt contradictorii, asigurând, în plus, o reproductibilitate redusă. Sun și colab.<sup>2</sup> au raportat (în 2005) prepararea Au-PEI prin dispersarea H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> în mediul de reacție ce conține PEI ramificat de 25 kDa (*b*PEI25kDa), în diferite rapoarte molare, la temperatura camerei, remarcând o creștere a dimensiunilor nanoparticulelor proporțională cu raportul concentrațiilor [PEI]/[Au]. Mai târziu, Kim și colab.<sup>9</sup> (2008) au raportat o scădere a dimensiunii Au-PEI odată cu creșterea raportului [PEI]/[Au], acest efect fiind menționat și de Song și colab.<sup>12</sup>, care au utilizat pentru reducerea aurului la temperatura camerei *b*PEI25kDa, obținând, prin modularea rapoartelor molare ale amestecurilor de reacție, nanoparticule cu dimensiunea hidrodinamică de circa 15 nm și indice de polidispersitate (DPI) 0,2. Recent, Cho și colab.<sup>1,10</sup> au publicat studii în care au evaluat critic metodologiile, proprietățile și stabilitatea AuNP.

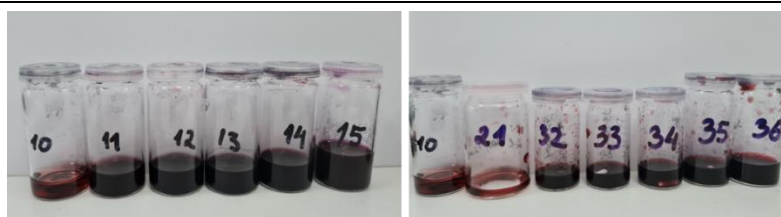
În acest context, după evaluarea procedurilor de sinteză prezentate în literatura de specialitate, am optat ca, pentru formarea conjugatelor Au-PEI, să efectuăm o serie de experimente folosind *b*PEI de 10 kDa (*b*PEI10kDa) și respectiv de 25 kDa (*b*PEI25kDa), la diferite rapoarte ale precursorilor ([PEI]/[Au]). Tabelul 1 menționează detaliile sintezelor derulate în cadrul etapei 2021 a proiectului TM-Vector.

**Tabelul 1.** Optimizarea metodei de obținere a AuNP cu înveliș de PEI (Au-PEI).

Nr. Exp	HAuCl <sub>4</sub> (14 mM)			<i>b</i> PEI10kDa 4% (4 mM)			V <sub>total</sub> (μL)	Raport molar HAuCl <sub>4</sub> /PEI	Abs AuNP (UV-Vis)
	V (μL)	m (mg)	n (μmol)	V (μL)	m (mg)	n (nmol)			
3	1000	4.7	14	28.8	1.152	115.2	1028.8	120:1	-
4	1000	4.7	14	60	2.4	240	1060	58:1	-
5	1000	4.7	14	65	2.6	260	1065	53:1	-
6	1000	4.7	14	70	2.8	280	1070	49:1	-
7	1000	4.7	14	80	3.2	320	1080	43:1	-
8	1000	4.7	14	90	3.6	360	1090	38:1	-
9	1000	4.7	14	100	4	400	1100	35:1	525
				<i>b</i> PEI10kDa 1% (1 mM)					
10	1000	4.7	14	375	3.57	357	1375	39:1	535
11	1000	4.7	14	500	5	500	1500	28:1	535
12	2500	11.8	35	625	6.25	625	3125	56:1	535
13	2500	11.8	35	750	7.5	750	3250	46:1	535
14	2500	11.8	35	1250	12.5	1250	3750	28:1	535
15	2500	11.8	35	2500	25	2500	5000	14:1	535
21	1000	4.7	14	100	4	400	1100	35:1	525
				<i>b</i> PEI25kDa 1% (0.4 mM)					
22	1000	4.7	14	100	1	40	1100	350:1	-
23	1000	4.7	14	57	0.57	22.8	1057	614:1	-
24	1000	4.7	14	20	0.2	8	1020	1750:1	-
25	1000	4.7	14	120	1.2	48	1120	292:1	-

26	1000	4.7	14	80	0.8	32	1080	438:1	-	
27	1000	4.7	14	200	2	80	1200	175:1	-	
28	1000	4.7	14	250	2.5	100	1250	140:1	-	
29	1000	4.7	14	300	3	120	1300	117:1	-	
30	1000	4.7	14	350	3.5	140	1350	100:1	-	
<b>31</b>	1000	4.7	14	400	4	160	1400	88:1	525	
<b>32</b>	1000	4.7	14	450	4.5	180	1450	78:1	525	
<b>33</b>	1000	4.7	14	500	5	200	1500	70:1	525	
				<b>bPEI25kDa 4% (1.6 mM)</b>						
<b>34</b>	1000	4.7	14	100	4	160	1100+1000 (apa)	88:1	525	
<b>35</b>	1000	4.7	14	100	4	160	1100+1500 (apa)	88:1	525	
<b>36</b>	1000	4.7	14	100	4	160	1100+2000 (apa)	88:1	525	

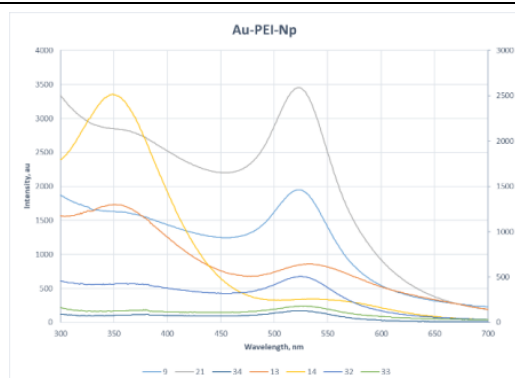
Culoarea roșie a soluțiilor (Figura 2), indică formarea nanoparticulelor Au-PEI. Aceste soluții au fost ulterior analizate prin UV-Vis, DLS, STEM și TEM pentru a confirma formarea particulelor și a determina dimensiunea și morfologia acestora.



**Figura 2.** Imagini cu soluțiile ce conțin nanoparticulele de Au-PEI.

#### A.1.2.1. Caracterizarea nanoparticulelor de aur prin tehnicile UV-VIS și DLS

Spectroscopia UV-Vis (Figura 3) permite determinarea dimensiunii nanoparticulelor, precum și a concentrației acestora în suspensie prin aplicarea legii Bouguer-Lambert Beer<sup>13</sup>. Valorile coeficientului de extincție și ale absorbanței particulelor de diferite dimensiuni sunt tabelate, permițând astfel determinarea concentrației în funcție de valoarea absorbanței.



**Figura 3.** Spectrele UV-Vis ale compozițiilor 9, 13, 14, 21, 32 și 33.

Analizând datele obținute (Figura 3), se pot identifica compoziții cu absorbantă maximă ( $Abs_{max}$ ) în intervalul 500-600 nm, caracteristic AuNP. Compoziții 10, 13, 21, 33-36 au fost analizați și prin tehnica DLS, pentru a determina diametrul hidrodinamic (dh) al particulelor de aur (Tabel 2).

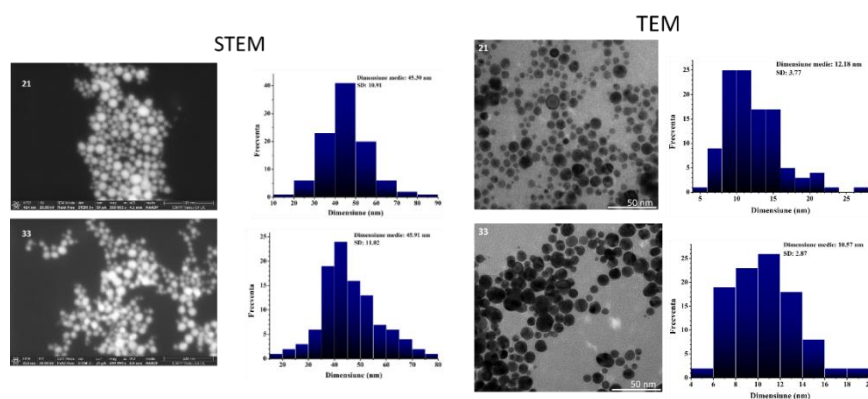
**Tabelul 2.** Datele obținute prin analiza DLS aplicată compușilor 10, 13, 21, 33-36.

Proba	10	13	21	32	33	34	35	36
dh (nm)	63.3	46.7	26.8	21.6	25.8	19.7	17.5	16.9
Indice de polidispersitate	0.353	0.280	0.318	0.134	0.266	0.176	0.10	0.14

Din datele UV-Vis și DLS, s-a observat că în cazul formării nanoparticulelor de Au-PEI cu bPEI10kDa, raportul molar optim dintre concentrațiile precursorilor [Au]/[PEI] este de 35:1, corespunzând amestecului 21 din Tabelul 1. În general, pentru formarea Au-PEI NP cu bPEI25kDa, raportul molar Au/PEI poate fi cuprins între (70-88):1 (variantele 33-36), astfel de rapoarte asigurând și o stabilitate crescută comparativ cu particulele cu bPEI10Kda în aceleași condiții experimentale. Compușii 21 (Au-bPEI10kDa) și 33 (Au-bPEI25kDa) au fost considerați referințe de sinteză.

#### A.1.2.2. Caracterizare morfologică a nanoparticulelor prin tehnicile prin STEM și TEM

Tehnica STEM oferă informații despre morfologia suprafeței și despre compoziția probei, iar tehnica TEM oferă informații valoroase despre structura interioară a acestora (structura cristalină, morfologia) și despre starea de stres (Figura 4).

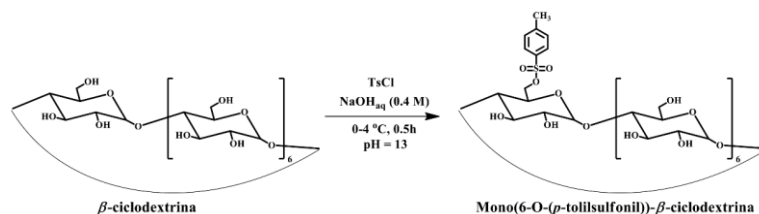


**Figura 4.** Imagini STEM și TEM ale AuNP funcționalizate cu bPEI10kDa (21) și bPEI25kDa (33), precum și distribuțiile dimensionale ale acestora

#### A.1.1. și A.1.2. Sinteza și caracterizarea AuNP decorate cu polimer cationic funcționalizat cu ciclodextrină

##### a. Sinteza mono(6-O-(p-tolilsulfonil)-β-ciclodextrinei (β-CD-m-6Ts)

Procedura experimentală pentru sinteza derivatului β-CD-m-6Ts (Schema 1) reprezintă o formă modificată a protocolului publicat către Ritter și Trelenkamp.<sup>14</sup>

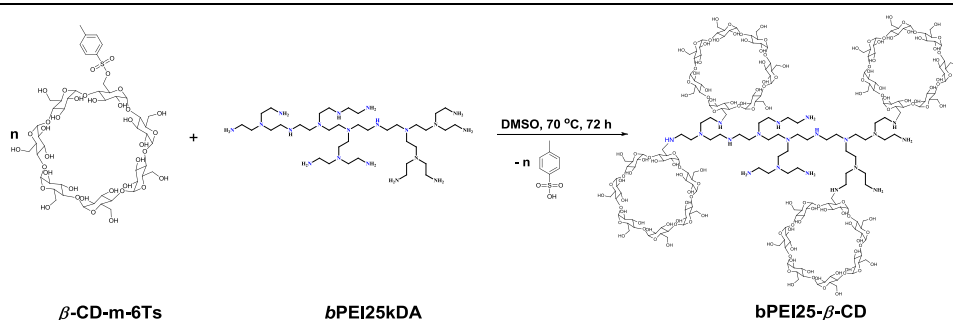


**Schema 1.** Reacția de sinteză a derivatului β-CD-m-6Ts

**Sinteza:** 5g, 4.4 mmol β-ciclodextrina (β-CD) a fost solubilizată în 50 mL soluție apoasă 0.4M NaOH, sub agitare magnetică, la temperatură camerei (23 °C). Peste soluția bazică (pH = 13) a fost adăugată clorura de tosil (5g, 26.6 mmol), lucrând pe baie de gheață (0-4 °C). Amestecul de reacție s-a supus agitării timp de 30 min. la 0-4 °C, apoi a fost filtrat sub vid pentru a înlătura clorura de tosil nereacționată. Soluția colectată a fost neutralizată cu acid clorhidric concentrat până la o valoare a pH-ului cuprinsă între 5 și 6, iar precipitatul fin, de culoare albă, a fost separat prin centrifugare la 7000 g, timp de 10 minute, apoi spălat cu apă bidistilată și uscat sub vid, în etuvă termostată la 50 °C. Izolarea compusului β-CD-m-6Ts s-a realizat prin recristalizare din apă bidistilată, acesta fiind obținut sub forma unor fulgi cristalini de culoare albă (1.4 g, 25 %), cu punct de topire de 178 °C (179 °C în literatură).<sup>15</sup> Spectrele <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN și ATR FT-IR au confirmat formarea compusului β-CD-m-6Ts.

## b. Funcționalizarea bPEI25kDa cu unități de $\beta$ -ciclodextrină. Obținerea bPEI25- $\beta$ -CD.

Procedura experimentală de obținere a bPEI25- $\beta$ -CD (Schema 2) reprezintă o formă modificată a protocoalelor descrise în literatura de specialitate.<sup>16-17</sup>

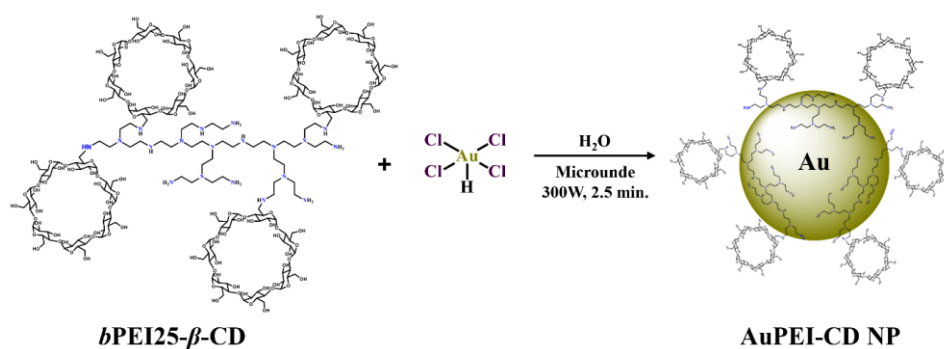


**Schema 2.** Obținerea bPEI25- $\beta$ -CD prin funcționalizarea bPEI25kDa cu unități de  $\beta$ -CD

**Sinteza:** bPEI25kDa (0.13 g, 0.0052 mmol) a fost solubilizată în 20 mL DMSO anhidru și adăugată, în picături, sub agitare energetică, peste o soluție de  $\beta$ -CD-m-6Ts (1 g, 0.8 mmol) în 55 mL DMSO anhidru. Amestecul de reacție a fost agitat magnetic sub atmosferă inertă (azot) timp de 72 de ore, la temperatura de 70 °C. Finalizarea reacției a fost observată prin virajul culorii soluției, de la galben pal la portocaliu intens. După încheierea reacției, soluția a fost lăsată să ajungă la temperatura camerei (23 °C), apoi i s-au adăugat 1.2 L de acetonă. După 10 minute de agitare magnetică, a fost observată apariția unui precipitat pufos, de culoare galben pal, care a fost separat prin centrifugare la 7000 g, timp de 10 minute, spălat de trei ori cu acetonă și uscat peste noapte sub vid, în etuvă termostată la 37 °C. Precipitatul obținut a fost purificat prin solubilizare într-un volum minim de apă ultrapură și filtrat prin centrifugare la 5000 g, timp de 30 de minute, folosind un filtru Amicon Ultra 15 cu MWCO 10000 Da. Soluția concentrată de culoare galbenă, recuperată din filtru, a fost liofilizată. Produsul final, bPEI25- $\beta$ -CD, a rezultat sub forma unui solid pufos, de culoare galben pal (0.25 g). Raportul între  $\beta$ -CD și bPEI25kDa a fost dedus prin integrarea protonilor din spectrul <sup>1</sup>H-RMN și a fost calculat ca fiind de aproximativ 26 unități de  $\beta$ -CD pentru o moleculă de bPEI25kDa.

## c. Sinteza nanoparticulelor de aur funcționalizate cu bPEI25kDa și bPEI25- $\beta$ -CD (AuPEI-CD NP)

Procedura experimentală de obținere a AuPEI-CD NP (Schema 3) pornește de la protocolul publicat de M. Ortega-Muñoz<sup>18</sup>, căruia i-au fost aduse modificări.



**Schema 3.** Sinteza nanoparticulelor de aur funcționalizate cu bPEI25- $\beta$ -CD. (Nanoparticulele de aur se aur decorate cu bPEI25kDa au fost obținute în mod asemănător.)

**Sinteza:** Pentru a obține proba 1 (AuPEI-CD NP P1), clorura aurică trihidratată ( $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) (0.005 g) a fost solubilizată în 5 mL apă ultrapură, iar soluția obținută a fost adăugată peste o soluție de bPEI25- $\beta$ -CD (0.02 g) în 10 mL apă ultrapură, sub agitare magnetică la temperatură ambientală (23 °C). Pentru produsul AuPEI-CD NP P1 raportul între bPEI25- $\beta$ -CD și  $\text{HAuCl}_4$  a fost de 4/1 (w/w). După adăugarea soluției de  $\text{HAuCl}_4$  peste soluția de bPEI25- $\beta$ -CD a fost observat un viraj de culoare de la galben pal la portocaliu. Amestecul de reacție obținut a fost supus iradierii cu microunde (300 W) timp de 2.5 minute, fără a depăși temperatura de fierbere. Formarea nanoparticulelor de aur a fost pusă



în evidență prin virajul culorii suspensiei de la portocaliu la roșu intens. După iradierea cu microunde, soluția a fost lăsată în repaos, la întuneric, pentru a ajunge la temperatură ambientală, iar apoi a fost purificată prin centrifugare la 5000 g, timp de 15 minute, folosind un filtru Amicon Ultra15 cu MWCO 50000 Da. Reziduu rămas în filtrul Amicon, sub forma unei soluții vâscoase de culoare închisă, a fost spălat de trei ori cu apă ultrapură. În final, **AuPEI-CD NP** au fost obținute sub forma unui lichid vâscos, de culoare roșu închis (0.012 g în 0.655 mL).

Proba 2 (**AuPEI-CD NP P2**) a fost obținută în mod similar, prin schimbarea raportului între *bPEI25-β-CD* și  $\text{HAuCl}_4$  la 8/1 (w/w), iar proba martor fără ciclodextrină (**AuPEI NP**) prin utilizarea *bPEI25kDa* și  $\text{HAuCl}_4$  în raportul masic de 4/1. Cantitățile luate în lucru sunt prezentate în Tabelul 3.

**Tabelul 3.** Cantitățile de precursori utilizate pentru obținerea AuNP funcționalizate.

Produsul	AuPEI-CD NP P1	AuPEI-CD NP P2	AuPEI NP
<i>bPEI25kDa</i> (g)	-	-	0.010
<i>bPEI25-β-CD</i> (g)	0.020	0.010	-
$\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ (g)	0.005	0.00125	0.0025
Raportul <i>bPEI/HAuCl<sub>4</sub></i> (w/w)	4/1	8/1	4/1

#### A.1.2. Studiul stabilității termice a precursorilor, prin analiză termogravimetrică (TGA)

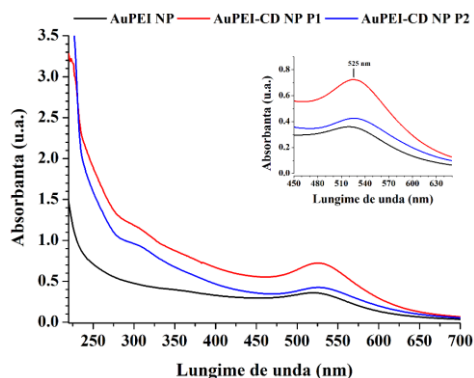
Stabilitatea termică a precursorilor utilizați pentru obținerea nanoparticulelor de aur funcționalizate cu *bPEI25-CD* a fost evaluată prin TGA și derivata termogravimetrică (DTG), în condiții dinamice de temperatură. Datele extrase din curbele TGA sunt prezentate în Tabelul 4. Gruparea tosil introdusă în structura chimică a  $\beta$ -CD duce la o diminuare a stabilității termice a acestora prin scăderea temperaturii de degradare de la 322 °C la 182 °C, observație ce este corelată cu datele din literatură.<sup>16</sup> Aceeași situație poate fi observată și în cazul *bPEI25kDa*, pentru care, urmare grefării unităților de  $\beta$ -CD, se înregistrează o destabilizare termică tradusă prin scăderea temperaturii de degradare de la 323 °C la 219 °C.

**Tabelul 4.** Rezultatele studiului de degradare termogravimetrică.

Proba	Regiunea (T °C)	Pierdere de masă (%)	T <sub>5%</sub> (°C)	Maximul DTGA (°C)	Atribuirea
$\beta$ -CD	30 - 125	12.4	319	322	Solvent (apă)
	125 - 700	71.6			$\beta$ -CD
$\beta$ -CD- <i>m-6Ts</i>	30 - 139	6.5	182	182	Solvent (apă)
	139 - 200	26.5			tosil
	200 - 700	36			$\beta$ -CD
<i>bPEI25kDa</i>	290 - 430	96	323	379	<i>bPEI25kDa</i>
<i>bPEI25-β-CD</i>	30 - 116	5	219	415	Solvent (apă)
	116 - 220	5			tosil incluziune
	220 - 338	32			<i>bPEI25kDa</i>
	338 - 700	31			$\beta$ -CD

#### A.1.2. Caracterizarea prin UV-Vis a AuNP sintetizate în soluții apoase

Analiza UV-Vis este una dintre metodele de caracterizare capabile să ateste formarea AuNP sub influența derivaților policationici pe bază de *bPEI25kDa*.<sup>21-24</sup> În acest sens, AuNP obținute conform protocolului descris anterior, au fost diluate până la o concentrație de aproximativ 5 mg/mL și au fost investigate prin spectroscopie UV-Vis, folosind spectrofotometrul Lambda 35 de la Perkin Elmer. Spectrele de absorbție a celor trei probe analizate (Figura 5) atestă formarea AuNP decorate cu *bPEI25kDa* și *bPEI-CD* (P1 și P2), prin apariția unui maxim de absorbție la 525 nm. Spectrele UV-Vis ale nanoparticulele de Au ce au în compoziție și ciclodextrină prezintă un umăr cu maximul de absorbție la 300 nm, acest umăr nefiind prezent în spectrul de absorbție al AuNP decorate doar cu *bPEI25kDa*, ceea ce duce la concluzia că nanoparticulele de aur AuPEI-CD NP P1 și P2 sunt decorate cu unități de  $\beta$ -CD.

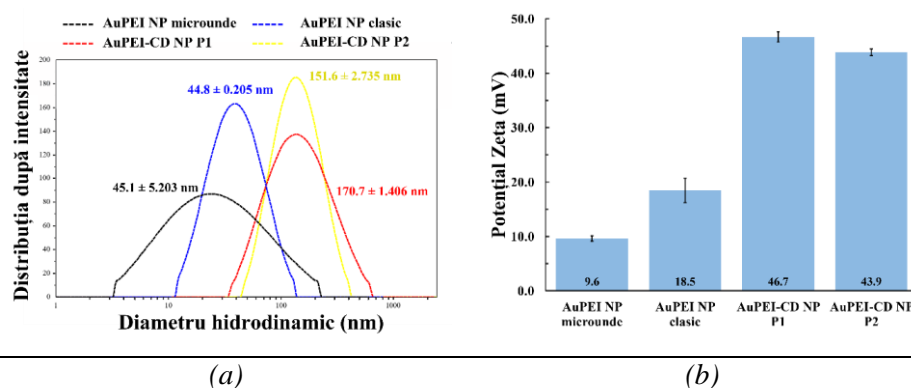


**Figura 5.** Spectrele UV-Vis ale nanoparticulelor de Au sintetizate.

### A.1.2. Evaluarea stabilității coloidale și a dimensiunilor AuPEI NP, prin tehnica DLS

Studiile de dimensiune și stabilitate coloidală în soluții apoase au fost efectuate folosind tehnica DLS. Nanoparticulele de aur obținute au fost dispersate în apă ultrapură, la o concentrație la care aparatul (DelsaNano, de la Beckman Coulter) a prezentat intensitatea optimă pentru a realiza măsurătorile.

Diametrele hidrodinamice medii ale nanoparticulelor de aur studiate au fost determinate folosind modulul „Size Cell” și cuvă de unică folosință cu volumul de 3.5 mL. Măsurătorile au fost realizate în triplicat, iar distribuția după intensitate reprezentată grafic în Figura 6.a, ca medie a trei măsurători. Valorile potențialului Zeta au fost obținute folosind modulul „Flow Cell” iar mediile celor trei măsurători sunt reprezentate grafic în Figura 6.b.



**Figura 6.** Distribuția diametrelor hidrodinamice după intensitate (a) și valorile potențialelor Zeta (b), obținute în urma analizei DLS a nanoparticulelor de aur dispersate în apă ultrapură.

Rezultatele obținute în urma înregistrării potențialelor Zeta (Figura 6.b) atestă faptul că stabilitatea coloidală a nanoparticulelor de aur sintetizate este influențată de prezența grupărilor funcționale de pe suprafața lor și de modul de sinteză (clasic sau în câmp de microunde) al acestora. Nanoparticulele care au valori mari ale potențialului Zeta ( $> \pm 30$  mV) posedă o stabilitate coloidală mare și dispersitate crescută, iar nanoparticulele cu valori mici au tendința să formeze agregate într-un timp foarte scurt. Nanoparticulele care au valori ale potențialului Zeta cuprinse între + 10 mV și - 10 mV sunt considerate neutre din punct de vedere electrostatic. AuPEI NP sintetizate prin metoda clasică posedă o stabilitate coloidală îmbunătățită (+ 18.5 mV), dar au încă tendință de agregare.

În cazul celor două probe de AuNP funcționalizate cu bPEI-CD (P1 și P2) se poate observa o stabilitate coloidală net superioară, cu valori ale potențialului Zeta de + 46.7 mV și respectiv + 43.9 mV. Aceasta indică faptul că prezența unităților de  $\beta$ -CD din compoziția nanoparticulelor de aur ajută la stabilizarea coloidală și implicit la o bună dispersie a acestora în soluții apoase.

### A.1.2. Determinarea cantității de bPEI25kDa din probele de AuNP prin spectroscopie UV-Vis

Întrucât nanoparticulele de aur obținute vor fi folosite pentru transportul și eliberarea de gene și/sau medicamente (vectori non-virali), cantitatea de polimer prezentă în alcătuirea acestora reprezintă o informație importantă pentru calculele necesare realizării diluțiilor până la concentrații exacte, impuse de aplicațiile biomedicale. În acest scop, a fost realizat un studiu de determinare a



cantității de *b*PEI25kDa din probele obținute anterior, folosind metoda complexării cu  $\text{CuCl}_2$  și cuantificarea complexului format prin spectroscopie UV-Vis (Tabelul 5), conform protoalelor din literatură<sup>25</sup>.

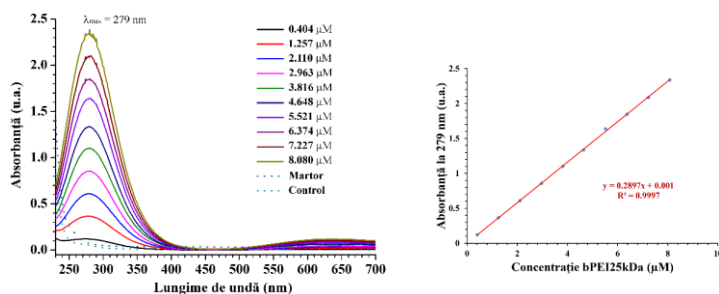
Prima etapă a acestui studiu a constat în obținerea unei soluții standard de *b*PEI25kDa, cu o concentrație exactă. În acest scop, *b*PEI25kDa (0.1117 g) a fost solubilizată în apă ultrapură, iar volumul final a fost ajustat la 100 mL folosind un flacon cotate, obținându-se o soluție stoc de concentrație teoretică 1.117 mg/mL. Concentrația experimentală exactă a soluției stoc a fost determinată prin metoda gravimetrică. Astfel, 10 eșantioane a câte 5 mL din soluția stoc au fost evaporate sub vid, în etuvă termostată la 55 °C. Cele 10 recipiente au fost cântărite înainte și după evaporarea completă a soluției, iar prin diferență s-au calculat masele de *b*PEI25kDa din cei 5 mL de soluție. Concentrația medie a celor 10 eșantioane a fost de  $1.954 \pm 0.0498$  mg/mL ( $0.07816 \pm 0.001994$  mM).

În următoarea etapă, s-a stabilit curba de calibrare a soluției de *b*PEI25kDa, utilizând 10 concentrații cuprinse între 0.404 și 8.08  $\mu\text{M}$  (Tabelul 5). Soluțiile de *b*PEI25kDa obținute (2 mL) au fost tratate cu 20  $\mu\text{L}$  dintr-o soluție de  $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (0.5 M), iar spectrele UV-Vis au fost înregistrate după 10 minute de la tratare, timp în care probele au fost lăsate în repaos pentru stabilizarea complexului de cupru format.

**Tabelul 5.** Prepararea și caracterizarea soluțiilor cu *b*PEI25kDa necesare stabilirii curbei de calibrare.

Nr. crt.	C <i>PEI25kDa</i> din 2 mL sol (mM)	C <i>PEI25kDa</i> din sol finală (mM)	V sol stoc $\text{CuCl}_2$ -0.5M (mL)	V sol. <i>PEI25kDa</i> (mL)	V <sub>f</sub> soluție (mL)	V sol stoc de <i>PEI25kDa</i> ( $\mu\text{L}$ )	V apă ultrapură ( $\mu\text{L}$ )
1	0.0004000	0.0004040	0.02	2	2.02	10.34	1989.66
2	0.0012444	0.0012569	0.02	2	2.02	32.16	1967.84
3	0.0020889	0.0021098	0.02	2	2.02	53.99	1946.01
4	0.0029333	0.0029627	0.02	2	2.02	75.81	1924.19
5	0.0037778	0.0038156	0.02	2	2.02	97.63	1902.37
6	0.0046222	0.0046684	0.02	2	2.02	119.46	1880.54
7	0.0054667	0.0055213	0.02	2	2.02	141.28	1858.72
8	0.0063111	0.0063742	0.02	2	2.02	163.11	1836.89
9	0.0071556	0.0072271	0.02	2	2.02	184.93	1815.07
10	0.0080000	0.0080800	0.02	2	2.02	206.76	1793.24

Spectrele UV-Vis ale soluțiilor de *b*PEI25kDa, la diferite concentrații, ce au fost tratate cu soluție 0.5 M  $\text{CuCl}_2$ , precum și curba de calibrare rezultată sunt prezentate în Figura 7.



**Figura 7.** Spectrele UV-Vis ale soluțiilor de *b*PEI25kDa la diferite concentrații, tratate cu soluție 0.5M  $\text{CuCl}_2$  și curba de calibrare a soluțiilor de *b*PEI25kDa tratate cu soluție 0.5M  $\text{CuCl}_2$  obținute prin fitarea absorbanțelor măsurate la 279 nm ca funcție de concentrația soluțiilor analizate. **Notă.** Martorul utilizat este soluția 5 mM  $\text{CuCl}_2$ , iar controlul este soluția 0.01 mM.

Spectrele UV-Vis ale soluțiilor apoase ce conțin *b*PEI25kDa în diferite concentrații înregistrate la 10 minute după tratarea cu soluției apoase de  $\text{CuCl}_2$  (0.5 M), prezentate în Figura 7, confirmă formarea complexului de Cu cu aminele primare din polietilenimină, prin apariția unei benzi cu maximul de absorbție la lungimea de undă de 279 nm. Conform datelor din literatura de specialitate,

maximul de absorbție la aproximativ 279 nm este caracteristic complexului de Cu format și este dependent de concentrația policationului utilizat, respectiv de procentul de grupări amino primare din compoziția acestuia.<sup>25</sup>

Folosind ecuația algebrică a curbei de calibrare au fost calculate concentrațiile experimentale ale soluțiilor de bPEI25kDa analizate prin UV-Vis, aceste date fiind prezentate în Tabelul 6.

**Tabelul 6.** Concentrațiile soluțiilor de bPEI25kDa stabilite utilizând ecuația curbei de calibrare.

Nr. crt.	Absorbanța măsurată la 279 nm (u.a.)	$y=ax+b$			Conc. calculată ( $\mu\text{M}$ )	Eroare ( $\mu\text{M}$ )	Eroare (%)
		$a$	$b$	$x$ ( $\mu\text{M}$ ) (conc. determinată)			
1	0.1197	0.2897	0.0010	0.4166	0.404	0.0126	3.13
2	0.3661			1.2672	1.257	0.0102	0.81
3	0.6091			2.1060	2.110	0.0040	0.19
4	0.8546			2.9534	2.963	0.0096	0.32
5	1.1013			3.8050	3.816	0.0110	0.29
6	1.3346			4.6103	4.648	0.0377	0.81
7	1.6376			5.6562	5.521	0.1352	2.45
8	1.8457			6.3745	6.374	0.0005	0.01
9	2.0862			7.2047	7.227	0.0223	0.31
10	2.3361			8.0673	8.080	0.0127	0.16
<b>Media</b>					<b>0.0256</b>	<b>0.85</b>	

Valorile concentrațiilor determinate folosind ecuația drepte, prezentate în Tabelul 6, atestă faptul că această tehnică de determinare a concentrației de bPEI25kDa din probe este suficient de sensibilă, iar eroarea medie determinată prin compararea concentrațiilor obținute cu valorile calculate este de ordinul nanomolilor.

Pentru a determina concentrația de bPEI25kDa din probele obținute în cadrul prezentului studiu (bPEI25-CD și AuPEI-CD NP P1) a fost pregătită câte o proba dispersată în apă ultrapură, la o concentrație cunoscută (obținută prin metoda gravimetrică - un volum exact de probă a fost liofilizat și reziduu rămas reprezintă cantitatea de compus din volumul respectiv) (Tabelul 7). Soluțiile obținute au fost tratate cu 20  $\mu\text{L}$  soluție 0.5 M  $\text{CuCl}_2$ , lăsate în repaos 10 minute, apoi au fost înregistrate spectrele lor UV-Vis.

Concentrațiile de bPEI25kDa din probele analizate (Tabelul 7) au fost obținute folosind absorbnanțele citite la 279 nm din spectrele UV-Vis înregistrate pentru probele de interes și ecuația drepte.

**Tabelul 7.** Concentrațiile de bPEI25kDa din probele sintetizate cu nanoparticule de aur.

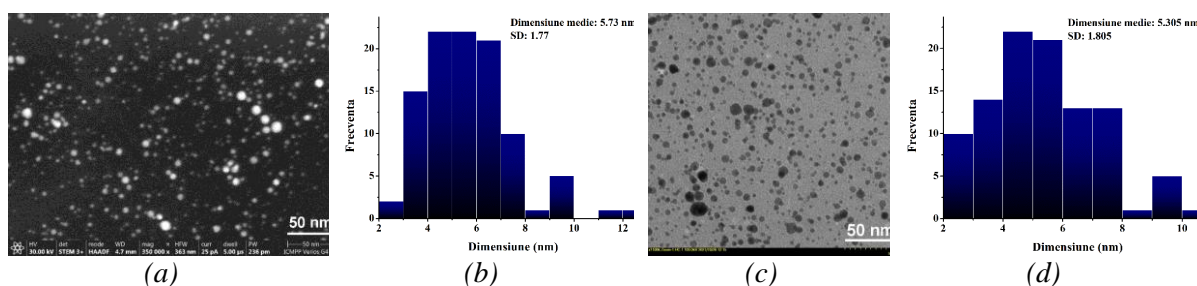
Proba	Absorbanță la 279 nm (u.a.)	Conc. probă (mg/mL)	Conc. bPEI25kD a ( $\mu\text{M}$ )	Masa de probă (mg)	Masa de PEI din probă (mg)	Procentul de PEI din probă (%)
bPEI25-CD	0.2433	0.05525	<b>0.84</b>	0.1105	<b>0.0422</b>	<b>38.22</b>
AuPEI-CD NP	0.2524	0.138	<b>0.87</b>	0.2760	<b>0.0438</b>	<b>15.86</b>

Datele obținute în urma acestui studiu, privind cantitatea de bPEI25kDa din probe, vor fi utilizate pentru calcularea raportului N/P dintre vectori și plasmidul ADN, în etapa de generare a poliplexșilor ce vor fi utilizați pentru studiile biologice *in vitro* (raportul N/P reprezentând numărul de atomi de azot din compoziția conjugatului raportat la numărul de atomi de fosfor din compoziția plasmidului) (A.1.3) și respectiv pentru comportamentului hemolitic pe eritrocite animale (A.1.4).

### A.1.2. Investigarea morfologiei nanoparticulelor AuPEI utilizând tehnicile STEM și TEM

Morfologia nanoparticulelor de aur funcționalizate cu bPEI25kDa și  $\beta$ -CD a fost studiată prin microscopie electronică de baleiaj și de transmisie. Rezultatele obținute sunt prezentate în Figura 8. Ambele tehnici de microscopie electronică (Figurile 8.a și 8.c) atestă faptul că nanoparticulele de aur funcționalizate cu bPEI25kDa și  $\beta$ -CD au morfologie sferică, dimensiuni de ordin nanometric și

tendință mică de agregare. De asemenea, în aceste imagini este evident faptul că nanoparticulele sunt dispersate uniform pe grilele din cupru.



**Figura 8.** Imaginile obținute prin analiza STEM (a) și TEM (c), precum și distribuțiile dimensiunilor nanoparticulelor investigate, (b) și respectiv (d).

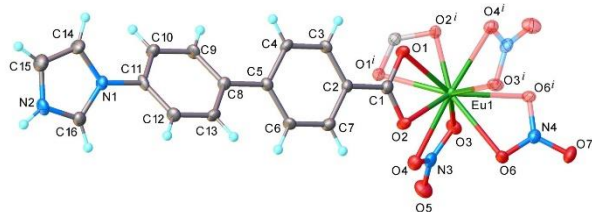
Distribuțiile dimensiunilor stabilite utilizând aplicația software ImageJ (Figurile 8.b și 8.d), prin măsurarea unui număr de 100 de particule din fiecare imagine, indică diametre cuprinse între 2 și 13 nm pentru imaginea STEM, cu o valoare medie de 5.73 nm, în timp ce particulele măsurate în imaginea TEM au valori asemănătoare ale diametrelor, cuprinse între 2 și 11 nm și o valoare medie de 5.305 nm. Rezultatele obținute prin microscopia electronică pentru nanoparticulele de AuPEI-CD prezintă toate particularitățile specifice nanoparticulelor de aur raportate în literatura de specialitate<sup>21, 26</sup> și confirmă rezultatele măsurătorilor realizate prin tehnica DLS.

#### **A.1.1 și A.1.2. Sinteza și caracterizarea unor combinații complexe cu metale rare, ca potențiali fluorofori pentru obținerea unor complecși de incluziune în $\beta$ -ciclodextrină**

Deseori, în studiul sistemelor biologice, se recurge la markeri fluorescenți pentru a urmări mecanismele de interacțiune, complexare, eliberare etc. Însă, fluorescența este frecvent stinsă în mediul biologic, sau interferă cu fluorescența de fundal a acestuia. Moleculele luminescente au proprietăți superioare celor fluorescente, deoarece posedă sisteme electronice rigide, plane și conjugări extinse ale electronilor  $\pi$ . Astfel de structuri duc în general la o colorare puternică și o fotoluminescență eficientă. În acest context, complecșii liganzilor  $\pi$ -conjugăți cu ioni metalici sunt adesea utilizați pentru a înlocui compuși fluorescenți clasici.

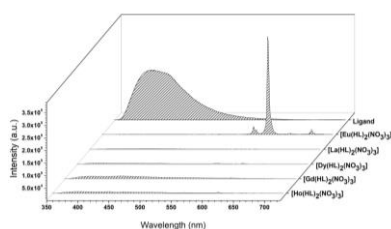
Combinatiile complexe ale metalelor din blocul d (metale rare) cu diverși liganzi sunt utilizate pe scară largă în procesele catalitice<sup>27</sup>, pentru stocarea și separarea gazelor<sup>28</sup>, în magnetism<sup>29</sup>, senzori<sup>30</sup>, imagistica medicală etc.<sup>31</sup> În studiul nostru ne-am propus să obținem o serie de complecși având drept ion metalic un lantanid  $[\text{Ln}(\text{HL})_2(\text{NO}_3)_3]$   $[\text{Ln} = \text{La} (1), \text{Ce} (2), \text{Nd} (3), \text{Eu} (4), \text{Gd} (5), \text{Dy} (6), \text{Ho} (7)]$  și drept ligand rigid bidentat acidul  $(4'-(1H\text{-imidazol-1-il})\text{difenil-4-carboxilic})$  (HL). Compușii obținuți au fost caracterizați prin analiză elementală, spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR), analiză termogravimetrică (TGA), difracție de raze X pe cristal și pe pulbere (PXRD). Luminiscența complecșilor a fost investigată, de asemenea. Complecșii cu  $\text{Eu}^{3+}$  prezintă o luminiscență intensă, care ar putea fi exploatată în imagistica biomedicală, prin înglobarea acestora în cavitatea  $\beta$ -ciclodextrinei și formarea unor complecși de incluziune.

În vederea obținerii de combinații complexe cu ligandul HL au fost explorate mai multe strategii de complexare, două dintre ele fiind prezentate în cele ce urmează. Strategia A, care recurge la reacții solvotermale în  $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ , a oferit cristale bine definite, care au putut fi analizate prin difracția de raze X. Respectivul cristale conțin însă și complecși neidentificați și ligand nereacționat. Prin strategia B (reacții solvotermale în  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ , variație de temperatură) s-au obținut produșii cu randament bun și puritate ridicată. Toți complecșii  $[\text{Ln}(\text{HL})_2(\text{NO}_3)_3]$   $[\text{Ln} = \text{La} (1), \text{Ce} (2), \text{Nd} (3), \text{Eu} (4), \text{Gd} (5), \text{Dy} (6), \text{Ho} (7)]$  astfel obținuți sunt izostructurali și cristalizează în grupul spațial P2/n al sistemului monoclinic. Partea asimetrică a celulei unitare cuprinde un cation  $\text{Eu}^{3+}$ , un zwitterion imidazol-bifenil-carboxilat (HL) și un anion și jumătate (1,5 ioni) de  $\text{NO}_3^-$ . Echilibrul de sarcină este realizat cu formarea speciilor  $[\text{Eu}(\text{HL})_2(\text{NO}_3)_3]$ , reprezentate în Figura 9.

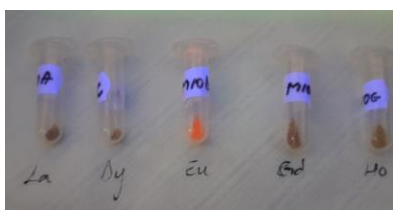


**Figura 9.** Partea asimetrică a celulei unitare din cristalul  $[Eu(HL)_2(NO_3)_3]$  (4), la nivel de 50% din unitate. Reprezentarea modului de coordonare a atomului Eu.

O proprietate importantă a combinațiilor complexe cu lantanide este emisia spectrală îngustă, obținută din tranzițiile intra-atomice  $Ln^{3+} 4f \rightarrow 4f$  și durată lungă de viață radioactivă.<sup>32</sup> Spectrele de luminescență ale ligandului sintetizat și ale complexelor cu  $Ln^{3+}$  au fost înregistrate la temperatura camerei, în fază solidă și, după cum se poate observa în Figura 10.a, la excitarea la o lungime de undă de 315 nm, ligandul HL afișează o bandă largă de emisie de fluorescență, între 356 nm și 556 nm, cu un maxim la 413 nm și o coadă mai lungă după valoarea mai mare a lungimii de undă. Complexul de  $Eu^{3+}$  prezintă emisii ascuțite caracteristice la  $\lambda = 593$  nm (slab,  $5D^0 \rightarrow 7F^0$ ),  $\lambda = 597$  nm (slab,  $5D^0 \rightarrow 7F^1$ ),  $\lambda = 615$  nm (foarte puternic,  $5D^0 \rightarrow 7F^2$ ),  $\lambda = 651$  nm (foarte slab,  $5D^0 \rightarrow 7F^3$ ) și  $\lambda = 686$  nm (foarte slab,  $5D^0 \rightarrow 7F^4$ ). O hipersensibilitate ridicată a tranziției  $5D^0 \rightarrow 7F^2$  la 615 nm (lumină roșie), urmată de tranziția  $5D^0 \rightarrow 7F^0$  la 593 nm, este remarcată prin excitarea la 315 nm. În acest studiu am dovedit că atât ligandul cât și complexul prezintă emisii intense și înguste la temperatura camerei, ceea ce-i face candidați buni în calitate de materiale cu luminescență. În Figura 10.b, se observă emisia complexului  $[Eu(HL)_2(NO_3)_3]$ , sub excitare UV ( $\lambda = 254$  nm).



(a)

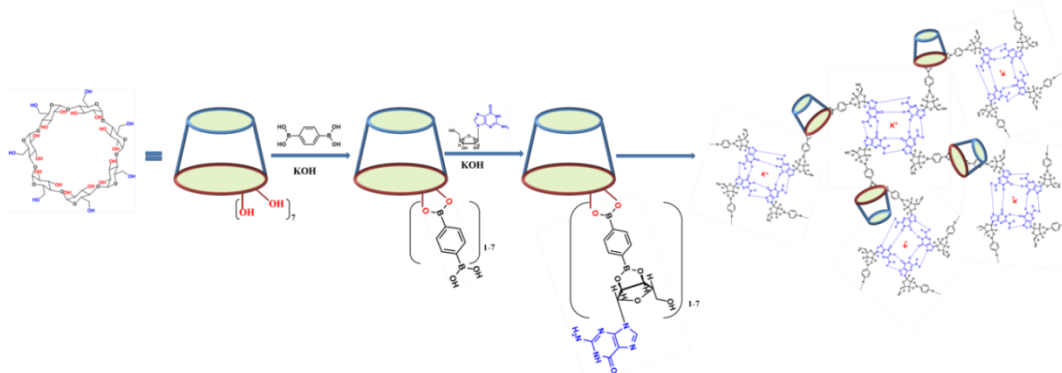


(b)

**Figura 10.** Spectrele de emisie a ligandului și a cinci complecși excitați la 315 nm (a) și imaginea obținută prin excitarea cu lampa UV ( $\lambda = 254$  nm) a cinci complecși sintetizați (b).

### A.1.1. și A.1.2. Studii preliminare referitoare la acoperirea particulelor de aur cu înveliș de rețele supramoleculare de ciclodextrine

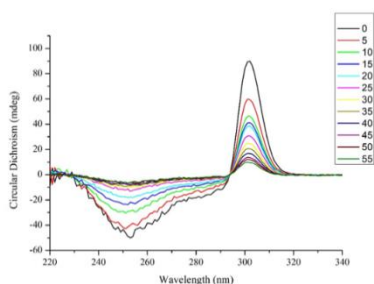
Particulele de Au au deseori tendința de a se aglomera în timp și sub acțiunea substraturilor biologice. Funcționalizarea lor cu rețele de ciclodextrine reprezintă o potențială metodă de stabilizare. Astfel, au fost studiate sisteme supramoleculare pe bază de guanozină, pentru a crea o clasă nouă de rețele modificate cu ciclodextrină, cu caracteristici controlabile și ajustabile.<sup>33</sup> Au fost generate șapte sisteme supramoleculare, prin legarea  $\beta$ -ciclodextrinei de fragmente de guanozină, în diferite proporții, prin intermediul acidului 1,4-benzen diboronic (cu rol de liant), în prezență de hidroxid de potasiu (Schema 4).



**Schema 4.** Procesele de formare a rețelei supramoleculare G4-CD.



Pentru a obține detalii asupra mecanismelor de formare a structurii interne a sistemelor G4-CD\_1-7, pentru fiecare probă au fost înregistrate spectrele de dicroism circular. Toate probele au prezentat caracteristici comune, deși fiecare dintre modelele studiate a demonstrat un comportament unic, în funcție de numărul de unități de guanozină atașate la molecula de  $\beta$ -CD (Figura 11).



**Figura 11.** Spectrele de dicroism circular a sistemului G4-CD\_1, în intervalul 220–340 nm, înregistrate la fiecare cinci minute (0-55 min), de la 60 la 25 °C.

Sistemele obținute reprezintă rețele ce conțin cavități de ciclodextrină disponibile pentru încărcarea componentelor active. Astfel de sisteme sunt candidați excepționali pentru aplicații biomedicale și farmaceutice și pot servi drept înveliș pentru particulele de Au.

### A.1.3. Evaluarea preliminară *in vitro* a vectorilor nonvirali

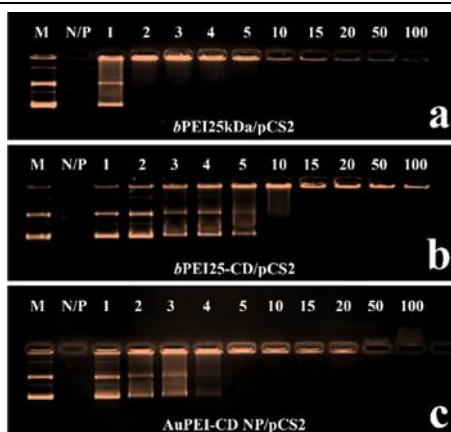
#### Testarea capacității de legare la ADN

Capacitatea vectorilor de a se lega la acizii nucleici a fost testată prin două metode: electroforeza pe gel de agaroză și testul de excludere a colorantului GelRed.

#### a. Testarea capacității de legare la ADN prin electroforeza în gel de agaroză

A fost studiată capacitatea conjugatelor bPEI25kDa, bPEI25-CD și AuPEI-CD NP de a împacheta plasmidul ADN (pCS2+MT-Luc). conjugatele obținute au fost tratate cu pCS2+MT-Luc (500 ng/ $\mu$ L) în diferite rapoarte N/P (1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 50 și 100). Soluțiile apoase ce conțin poliplecșii în diferite rapoarte N/P au fost tratate cu soluție tampon TAE10x (6.67%) pentru a regla pH-ul la valoarea fiziologică de 7.4 și cu soluție 25% sucroză pentru a favoriza depunerea poliplecșilor în godeurile din gel.

Probele ce conțin poliplecșii, împreună cu martorul reprezentat de plasmid necomplexat au fost pipetate câte 15  $\mu$ L/godeu, iar gelul de agaroză, imersat în soluție TAE1x cu pH=7.4 a fost supus unui câmp electric la 90V, pentru 90 de minute. La sfârșitul procesului de migrare electroforetică, gelul a fost imersat într-o baie de apă bidistilată suplimentată cu bromură de etidiu (compus fluorescent care complexează plasmidul și permite vizualizarea acestuia sub radiația UV). După incubare, gelul a fost vizualizat folosind sistemul GelCapture, care permite achiziționarea imaginilor cu gelul sub radiație UV. Rezultatele obținute sunt prezentate în Figura 12.



**Figura 12.** Mobilitatea electroforetică a poliplecșilor obținuți prin complexarea pCS2+MT-Luc de către (a) bPEI25kDa, (b) bPEI25-CD și (c) AuPEI-CD NP, la diferite rapoarte N/P.

Studiul de împachetare a pCS2+MT-Luc demonstrează abilitatea de complexare a plasmidului de către toate cele trei nanoconjugate, la valori diferite ale raportului N/P. Astfel, policationul

*b*PEI25kDa nefuncționalizat formează poliplecși prin împachetarea completă a plasmidului începând cu raportul N/P de 2 (Figura 12.a), valoare de la care nu se mai poate observa migrarea plasmidului liber. În cazul conjugatului *b*PEI25-CD, formarea poliplecșilor prin împachetarea completă a plasmidului are loc începând cu valori ale raportului N/P de 15 (Figura 12.b), ceea ce indică o diminuare a numărului de grupări aminice primare responsabile de complexarea electrostatică a grupărilor fosfat ale plasmidei.

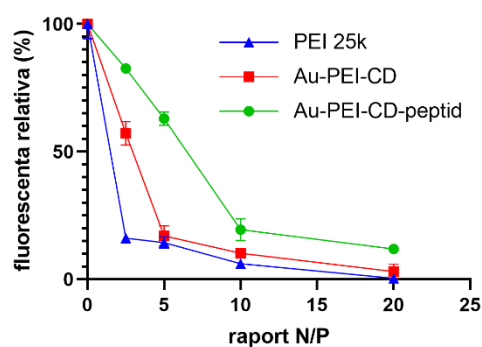
Interesant este faptul că nanoparticulele de AuPEI-CD prezintă o eficiență îmbunătățită de împachetare a ADN-ului plasmidic comparativ cu conjugatul *b*PEI25-CD, complexarea fiind completă începând cu raportul N/P de 5 (Figura 12.c). Deși procentul de *b*PEI25kDa din compoziția nanoparticulelor de AuPEI-CD este mai mic (15.86 %) decât în cazul conjugatului *b*PEI-CD (38.22 %), AuNP prezintă o eficiență superioară de împachetare a plasmidului, ceea ce duce la concluzia că atomul de aur din compoziția acestora contribuie la împachetarea mai eficientă a ADN-ului plasmidic.

### b. Testul de excludere al colorantului

O a doua metodă aplicată pentru evaluarea interacțiunii dintre vectori și ADN a fost testul de excludere a colorantului GelRed. Moleculele GelRed au proprietatea de a se atașa de ADN-ul dublu catenar și de a prezenta fluorescență puternică atunci când sunt legate de acesta. Moleculele GelRed libere au o fluorescență mult mai slabă.

Metoda menționată se bazează pe faptul că vectorii care se leagă de ADN împiedică accesul moleculelor GelRed la ADN, acest efect fiind cu atât mai puternic cu cât interacțiunea dintre vectori și acizii nucleici este mai intensă. Practic, pentru un amestec de ADN, vectori și GelRed, este de așteptat să se observe o scădere a fluorescenței pe măsură ce concentrația de vectori crește.

Testul cu GelRed s-a aplicat poliplecșilor formați între plasmidului *pcs2*+Luc și vectorii AuPEI-CD, AuPEI-CD-peptid și *b*PEI25kDa, la diverse rapoarte azot/fosfor (N/P). Amestecurile au fost realizate în microplăci opace negre, cu 96 de godeuri, incubate la temperatura camerei timp de 30 minute. La final, fluorescența a fost măsurată folosind cititorul de plăci FLUOstar® Omega, (BMG-Labtech), cu excitare la 300 nm și măsurarea emisiei la 620 nm. Rezultatele (Figura 13) confirmă faptul că toți cei trei vectori testați se leagă de ADN. Mai mult decât atât, se observă diferențe între capacitățile de legare, ordinea crescătoare fiind *b*PEI25kDa, AuPEI-CD, respectiv AuPEI-CD-peptid. Experimentele au fost efectuate în duplicat și analiza datelor s-a efectuat utilizând aplicația software GraphPad Prism, versiunea 8.00 pentru Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).



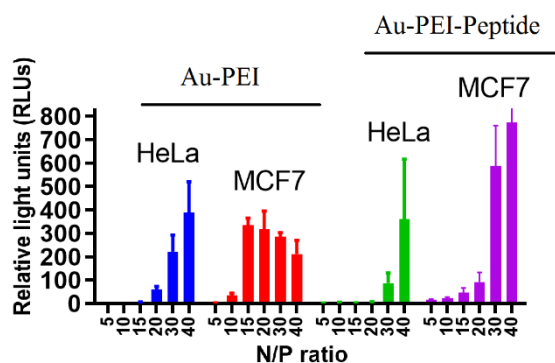
**Figura 13.** Testul de excludere a colorantului GelRed.

### c. Testarea eficienței în transfecție Bright-Glo

Eficiența și selectivitatea în transfecție vectorilor au fost testate asupra a două linii celulare (Figura 14): MCF-7, care este o linie tumorală de cancer mamar și respectiv HeLa, care este o linie tumorală de cancer de col uterin. Înaintea testului de transfecție, celulele au fost însămânțate pe plăci albe opace cu 96 de godeuri, la o concentrație de  $10 \times 10^3$  celule/ godeu, pentru linia HeLa și de  $7 \times 10^3$  celule/ godeu pentru linia MCF-7, după care au fost incubate timp de 24 de ore în atmosferă umidificată, cu 5%  $\text{CO}_2$ , la 37 °C. Mediul utilizat pentru cultivarea celulelor a fost alfa-MEM suplimentat cu 10% ser fetal bovin și cu 1% amestec de penicilină-streptomycină-amfotericină B (10 K/10 K/25  $\mu\text{g}$  în 100 ml). A doua zi, mediul a fost înlocuit cu soluțiile de poliplecși. Poliplecșii au fost obținuți prin amestecarea a 500 ng plasmid *pCS2*+Luc/godeu cu vectori, la diverse rapoarte N/P, urmată de incubare



la temperatura camerei, timp de 30 minute. Plăcile cu celule au fost incubate în prezența poliplecșilor timp de 48 de ore în incubator cu 5% CO<sub>2</sub>, la 37 °C, pentru a aștepta exprimarea genei pentru luciferază. La sfârșitul celor 48 de ore, în godeurile plăcilor s-au adăugat 100 μL / godeu reactiv Bright-Glo (Promega), iar după 4 minute plăcile au fost introduse în cititorul de plăci (FLUOstar® Omega, BMG-Labtech), măsurându-se intensitatea luminii emise. Aceasta este proporțională cu cantitatea de luciferază exprimată, fiind o măsură a eficienței transfecției.



**Figura 14.** Transfecția celulelor HeLa și MCF-7 cu gena pentru luciferază. Evaluare după 48 ore. Datele prezentate ca medie ± eroarea standard a mediei (S.E.M).

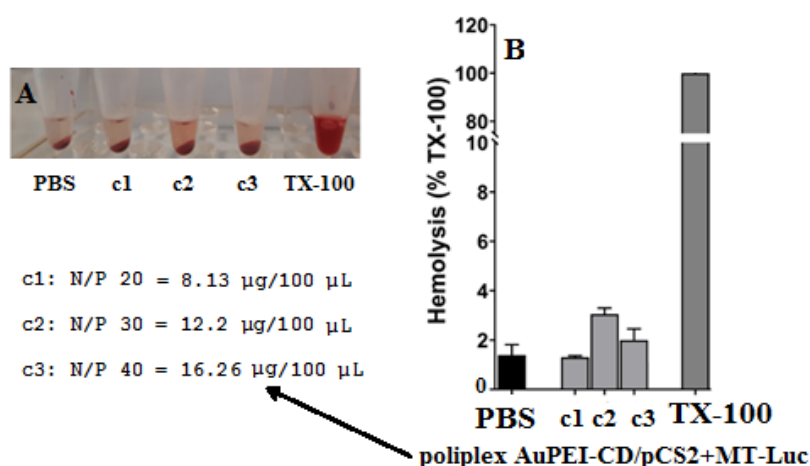
Cea mai intensă transfecție s-a înregistrat pentru vectorul AuPEI-CD-peptid asupra liniei MCF-7, la raportul N/P 40. Valoarea astfel determinată depășește intensitatea transfecției aceluiași vector asupra liniei HeLa. Nu același fapt s-a înregistrat pentru transfecția celor două linii celulare cu vectorul fără peptid, caz în care, cel puțin la raportul N/P 40, linia MCF-7 este transfectată mai slab decât linia HeLa. Aceste rezultate indică faptul că prezența peptidului de recunoaștere celulară conferă selectivitate vectorului AuPEI-CD-peptid pentru linia MCF-7. Experimentele au fost efectuate cu patru replicare, iar analiza datelor s-a realizat utilizând aplicația software GraphPad Prism v8.00 pentru Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

#### A.1.4. Evaluarea hemocompatibilității conjugatelor AuPEI-CD NP în raport cu eritrocitele animale

În această etapă, poliplecșii AuPEI-CD/pCS2+MT-Luc au fost testați asupra eritrocitelor colectate de la șoareci BALB/C. Comportamentul hemolitic s-a cuantificat prin determinarea hemoglobinei eliberate din eritrocite sub acțiunea poliplecșilor (Figura 15.A), măsurând absorbanta cu un cititor de plăci, la 540 nm (Figura 15.B). S-a determinat un grad de hemoliza mai mic de 3% pentru diverse concentrații ale poliplecșii AuPEI-CD/ pCS2+MT-Luc, în soluții de eritrocite cu aceeași densitate de masă eritrocitară, ceea ce recomandă utilizarea respectivilor poliplecși în testările *in vivo* efectuate conform ISO 10993-4:2017, standard care recomandă ca, pentru aplicații biomedicale, biomaterialele să nu inducă hemoliză la valori mai mari decât 5 %.

**Modelul animal.** Șoarecii BALB/C, în vârstă de 10 săptămâni, femele cu o greutate medie de  $20 \pm 0,45$  g, au fost achiziționați de la Institutul Cantacuzino, București. Aclimatizarea șoarecilor s-a efectuat în condiții identice de temperatură ( $22 \pm 0,7$  °C) și umiditate ( $50 \pm 10\%$ ), la alternanță lumină/întuneric de 12 ore. Animalele au avut acces nelimitat la hrană și apă timp de 7 zile, în laborator pentru cazare și au fost monitorizate zilnic pentru a înregistra eventuale stări patologice ori comportamente anormale. Animalele care nu îndeplineau criteriile de sănătate cerute au fost scoase din experiment. Experimentele au fost aprobate de Comisia de Etică a Universității de Științele Vieții „Ion Ionescu de la Brad”, Iași și au fost realizate conform directivelor 2010/63/EU privind protecția animalelor folosite în scop științific.

**Testul de hemocompatibilitate *ex-vivo*.** Sîngele recoltat de la șoareci a fost centrifugat timp de 15 min., la 1000 rot/min. și 4 °C, pentru a separa plasma de eritrocite. Masa de eritrocite a fost diluată 1:10 cu PBS și s-au preparat soluții cu diverse concentrații de poliplex (Figura 15.A). După incubarea probelor timp de o oră la 37 °C, acestea au fost centrifugate pentru separarea eritrocitelor intacte. Supernatantul a fost analizat utilizând cititorul de plăci FLUOstar® Omega (BMG-Labtech), iar hemoglobina eliberată de din eritrocitele afectate de interacțiunea cu AuPEI-CD a fost cuantificată la 540 nm. Pentru controlul negativ s-au utilizat eritrocite incubate cu PBS, iar pentru controlul pozitiv s-au utilizat eritrocite incubate cu 0.5% Triton X-100 (TX-100).<sup>34</sup>



**Figura 15.** Evaluarea hemocompatibilității polielectroliților AuPEI-CD/pCS2+MT-Luc pe eritrocite animale. (A) Imagini ale eritrocitelor intacte, sedimentate după incubarea cu diferite concentrații de polielectroliți. (B) Absorbanta hemoglobinei din supernatant la 540 nm la diferite concentrații de polielectroliți. Rezultatele sunt exprimate ca medie  $\pm$  deviație standard (S.D.) pentru fiecare experiment realizat în duplicat. Concentrațiile polielectroliților sunt cele utilizate în testările pe celulele tumorale, la rapoarte N/P de 20, 30 și 40.

### DISEMINAREA REZULTATELOR ȘTIINȚIFICE OBTINUTE

În etapa 2021 a proiectului TM-Vector au fost publicate două lucrări ISI, care au tratat sinteza și caracterizarea intermediarilor de reacție cu proprietăți fluorescente și a celor pe bază de ciclodextrine. O lucrare aflată în curs de redactare include sinteza și caracterizarea AuNP de generație I. De asemenea, au fost prezentate două conferințe și trei comunicări orale, la manifestări științifice naționale și internaționale.

#### Lucrari ISI

1. M.C. Sardaru, I. Rosca, S. Morariu, E.L. Ursu, R. Ghiarasim, A. Rotaru. Injectable Thixotropic  $\beta$ -Cyclodextrin-Functionalized Hydrogels Based on Guanosine Quartet Assembly. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22(17), 9179; <https://doi.org/10.3390/ijms22179179>
2. M.C. Sardaru, N.L. Marangoci, S. Shova, D. Bejan. Novel Lanthanide (III) Complexes Derived from an Imidazole-Biphenyl-Carboxylate Ligand: Synthesis, Structure and Luminescence Properties. *Molecules*, **2021**, 26(22), 6942; <https://doi.org/10.3390/molecules26226942>

#### Participări la simpozioane / conferințe

1. M. Pinteala. *Biomedical applications of polymer-coated metallic nanoparticles*. Polymer Science and Composite Materials, perioada 5-7 Iulie, **2021**, Barcelona, Spania; **key note presentation**;
2. Dragos Peptanariu. *Vectori non-virali de tip stea pentru transfectie*. Conferinta Cercetarii Stiintifice din Academia Romana (CCSAR-2021), Bucuresti, 22-23 noiembrie **2021**; conferință plenară.
3. A. Fifere, I.-A. Turin-Moleavin, A.-L. Lungoci, I. Rosca, A. Iacobescu, A.R. Petrovici, A. Coroaba, M. Pinteala. *Hybrid nanostructured systems based on metal oxides with magnetic and antioxidant properties for biomedical applications*. Polymer Science and Composite Materials, perioada 5-7 Iulie, **2021**. Barcelona, Spania; prezentare orală.
4. O. E. Carp, M. Pinteala, A. Arvinte. *Evaluation of antioxidant properties using electrochemistry combined with in vitro peroxidation and reducing assays*. 6th International Congress on Biomaterials and Biosensors (BIOMATSEN), Oludeniz, Turkey, 17-23 October **2021**; prezentare orală.
5. L. Clima, B. Craciun, D. Peptanariu, M. Pinteala. *Supramolecular squalene based self-assembled entities as promising non-viral vectors for gene delivery*. International Conference of Polymer Science and Composite Materials "Polymer Connect", Barcelona, Spania, 05-07 iulie. **2021**; comunicare orală.

Director proiect,

**Dr. Mariana Pinteală**

## Bibliografie

1. Cho, T. J.; Gorham, J. M.; Pettibone, J. M.; Liu, J.; Tan, J.; Hackley, V. A., Parallel multi-parameter study of PEI-functionalized gold nanoparticle synthesis for bio-medical applications: part 1—a critical assessment of methodology, properties, and stability. *Journal of Nanoparticle Research* **2019**, *21* (8), 188.
2. Sun, X.; Dong, S.; Wang, E., One-step synthesis and characterization of polyelectrolyte-protected gold nanoparticles through a thermal process. *Polymer* **2004**, *45* (7), 2181-2184.
3. Note, C.; Kosmella, S.; Koetz, J., Poly(ethyleneimine) as reducing and stabilizing agent for the formation of gold nanoparticles in w/o microemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2006**, *290* (1), 150-156.
4. Boyer, C.; Bousquet, A.; Rondolo, J.; Whittaker, M. R.; Stenzel, M. H.; Davis, T. P., Glycopolymer Decoration of Gold Nanoparticles Using a LbL Approach. *Macromolecules* **2010**, *43* (8), 3775-3784.
5. Elbakry, A.; Zaky, A.; Liebl, R.; Rachel, R.; Goepferich, A.; Breunig, M., Layer-by-layer assembled gold nanoparticles for siRNA delivery. *Nano letters* **2009**, *9* (5), 2059-64.
6. Elbakry, A.; Wurster, E. C.; Zaky, A.; Liebl, R.; Schindler, E.; Bauer-Kreisel, P.; Blunk, T.; Rachel, R.; Goepferich, A.; Breunig, M., Layer-by-layer coated gold nanoparticles: size-dependent delivery of DNA into cells. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2012**, *8* (24), 3847-56.
7. Cebrián, V.; Martín-Saavedra, F.; Yagüe, C.; Arruebo, M.; Santamaría, J.; Vilaboa, N., Size-dependent transfection efficiency of PEI-coated gold nanoparticles. *Acta Biomaterialia* **2011**, *7* (10), 3645-3655.
8. Kretschmer, F.; Mansfeld, U.; Hoepfner, S.; Hager, M. D.; Schubert, U. S., Tunable synthesis of poly(ethylene imine)–gold nanoparticle clusters. *Chemical Communications* **2014**, *50* (1), 88-90.
9. Kim, K.; Lee, H. B.; Lee, J. W.; Park, H. K.; Shin, K. S., Self-Assembly of Poly(ethylenimine)-Capped Au Nanoparticles at a Toluene–Water Interface for Efficient Surface-Enhanced Raman Scattering. *Langmuir* **2008**, *24* (14), 7178-7183.
10. Cho, T. J.; Gorham, J. M.; Pettibone, J. M.; Liu, J.; Tan, J.; Hackley, V. A., Parallel Multiparameter Study of PEI-Functionalized Gold Nanoparticle Synthesis for Biomedical Applications: Part 2. Elucidating the Role of Surface Chemistry and Polymer Structure in Performance. *Langmuir* **2020**, *36* (46), 14058-14069.
11. Tao, Y.; Li, Z.; Ju, E.; Ren, J.; Qu, X., Polycations-functionalized water-soluble gold nanoclusters: a potential platform for simultaneous enhanced gene delivery and cell imaging. *Nanoscale* **2013**, *5* (13), 6154-6160.
12. Song, W.-J.; Du, J.-Z.; Sun, T.-M.; Zhang, P.-Z.; Wang, J., Gold Nanoparticles Capped with Polyethyleneimine for Enhanced siRNA Delivery. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2010**, *6* (2), 239-246.
13. Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Aveyard, J.; Fernig, D. G., Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (11), 4215-4221.
14. Trelenkamp, T.; Ritter, H., Poly(N-vinylpyrrolidone) Bearing Covalently Attached Cyclodextrin via Click-Chemistry: Synthesis, Characterization, and Complexation Behavior with Phenolphthalein. *Macromolecules* **2010**, *43* (13), 5538-5543.
15. Petter, R. C.; Salek, J. S.; Sikorski, C. T.; Kumaravel, G.; Lin, F. T., Cooperative binding by aggregated mono-6-(alkylamino)-.beta.-cyclodextrins. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112* (10), 3860-3868.
16. Pun, S. H.; Bellocq, N. C.; Liu, A.; Jensen, G.; Machemer, T.; Quijano, E.; Schlupe, T.; Wen, S.; Engler, H.; Heidel, J.; Davis, M. E., Cyclodextrin-Modified Polyethylenimine Polymers for Gene Delivery. *Bioconjugate Chemistry* **2004**, *15* (4), 831-840.
17. Forrest, M. L.; Gabrielson, N.; Pack, D. W., Cyclodextrin–polyethylenimine conjugates for targeted in vitro gene delivery. *Biotechnology and Bioengineering* **2005**, *89* (4), 416-423.
18. Ortega-Muñoz, M.; Giron-Gonzalez, M. D.; Salto-Gonzalez, R.; Jodar-Reyes, A. B.; De Jesus, S. E.; Lopez-Jaramillo, F. J.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F., Polyethyleneimine-Coated Gold Nanoparticles: Straightforward Preparation of Efficient DNA Delivery Nanocarriers. *Chemistry – An Asian Journal* **2016**, *11* (23), 3365-3375.

19. Román, F.; Colomer, P.; Calventus, Y.; Hutchinson, J. M., Study of Hyperbranched Poly(ethyleneimine) Polymers of Different Molecular Weight and Their Interaction with Epoxy Resin. *Materials* **2018**, *11* (3), 410.
20. Trotta, F.; Zanetti, M.; Camino, G., Thermal degradation of cyclodextrins. *Polymer Degradation and Stability* **2000**, *69* (3), 373-379.
21. Lee, S. H.; Bae, K. H.; Kim, S. H.; Lee, K. R.; Park, T. G., Amine-functionalized gold nanoparticles as non-cytotoxic and efficient intracellular siRNA delivery carriers. *International journal of pharmaceutics* **2008**, *364* (1), 94-101.
22. Elbakry, A.; Zaky, A.; Liebl, R.; Rachel, R.; Goepferich, A.; Breunig, M., Layer-by-Layer Assembled Gold Nanoparticles for siRNA Delivery. *Nano letters* **2009**, *9* (5), 2059-2064.
23. Lee, J.-S.; Green, J. J.; Love, K. T.; Sunshine, J.; Langer, R.; Anderson, D. G., Gold, Poly( $\beta$ -amino ester) Nanoparticles for Small Interfering RNA Delivery. *Nano letters* **2009**, *9* (6), 2402-2406.
24. Sun, X.; Dong, S.; Wang, E., One-step preparation of highly concentrated well-stable gold colloids by direct mix of polyelectrolyte and HAuCl<sub>4</sub> aqueous solutions at room temperature. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, *288* (1), 301-303.
25. Patkowski, J.; Myśliwiec, D.; Chibowski, S., Validation of a new method for spectrophotometric determination of polyethylenimine. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization* **2016**, *21* (6), 486-494.
26. Cavuslar, O.; Celaloglu, C.; Duman, F. D.; Konca, Y. U.; Yagci, M. B.; Yagci Acar, H., pH and molecular weight dependence of auric acid reduction by polyethylenimine and the gene transfection efficiency of cationic gold nanoparticles thereof. *New Journal of Chemistry* **2018**, *42* (12), 10078-10083.
27. Chai, Z.; Chu, J.; Qi, Y.; Tang, M.; Hou, J.; Yang, G., Half-sandwich chiral rare-earth metal complexes with linked tridentate amido-indenyl ligand: synthesis, characterization, and catalytic properties for intramolecular hydroamination. *RSC Advances* **2017**, *7* (3), 1759-1765.
28. Yang, T.-H.; Silva, A. R.; Shi, F.-N., Two dimensional porous 3d-4f heterometallic coordination polymers constructed by pyridine-2,3-dicarboxylic acid. *CrystEngComm* **2015**, *17* (20), 3852-3858.
29. Bazhenova, T. A.; Yakushev, I. A.; Lyssenko, K. A.; Maximova, O. V.; Mironov, V. S.; Manakin, Y. V.; Kornev, A. B.; Vasiliev, A. N.; Yagubskii, E. B., Ten-Coordinate Lanthanide [Ln(HL)(L)] Complexes (Ln = Dy, Ho, Er, Tb) with Pentadentate N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>-Type Schiff-Base Ligands: Synthesis, Structure and Magnetism. *Magnetochemistry* **2020**, *6* (4), 60.
30. Zhao, S. N.; Song, X. Z.; Zhu, M.; Meng, X.; Wu, L. L.; Feng, J.; Song, S. Y.; Zhang, H. J., Encapsulation of Ln(III) Ions/Dyes within a Microporous Anionic MOF by Post-synthetic Ionic Exchange Serving as a Ln(III) Ion Probe and Two-Color Luminescent Sensors. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2015**, *21* (27), 9748-52.
31. Zhao, S.-N.; Wu, L.-L.; Feng, J.; Song, S.-Y.; Zhang, H.-J., An ideal detector composed of a 3D Gd-based coordination polymer for DNA and Hg<sup>2+</sup> ion. *Inorganic Chemistry Frontiers* **2016**, *3* (3), 376-380.
32. George, M. R.; Critchley, P. E.; Whitehead, G. F. S.; Bailey, A. J.; Cuda, F.; Murdin, B. N.; Gossel, M. C.; Curry, R. J., Modified pyridine-2,6-dicarboxylate acid ligands for sensitization of near-infrared luminescence from lanthanide ions (Ln<sup>3+</sup> = Pr<sup>3+</sup>, Nd<sup>3+</sup>, Gd<sup>3+</sup>, Dy<sup>3+</sup>, Er<sup>3+</sup>). *Journal of Luminescence* **2021**, *230*, 117715.
33. Sardaru, M.-C.; Rosca, I.; Morariu, S.; Ursu, E.-L.; Ghiarasim, R.; Rotaru, A., Injectable Thixotropic  $\beta$ -Cyclodextrin-Functionalized Hydrogels Based on Guanosine Quartet Assembly. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22* (17), 9179.
34. E. V. Fuior, M. Deleanu, C. A. Constantinescu, D. Rebleanu, G. Voicu, M. Simionescu, M. Călin. Functional Role of VCAM-1 Targeted Flavonoid-Loaded Lipid Nanoemulsions in Reducing Endothelium Inflammation. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 391; doi:10.3390/pharmaceutics11080391.