



UEFiscdi

Institutul de Chimie Macromoleculară Petru Poni

RAPORT ȘTIINȚIFIC FINAL

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

Pagina web: <https://intelcentru.ro/tm-vector/>

Proiectul TM-Vector și-a propus proiectarea, dezvoltarea și evaluarea funcțională a unui nou tip de instrument (macro)molecular nanoparticulat, de tip miez-manta, cu miez din aur, numit în continuare vector nonviral sau conjugat, care combină abilitățile de transport, eliberare și acțiune farmacodinamică pentru a oferi un sistem versatil de transport pentru acizi nucleici, medicamente ori radionuclizi, dotat cu eficacitate, selectivitate și capacitate îmbunătățită de eliberare sau marcarea la țintă.

În cadrul acestui proiect au fost desfășurate, în principal, **activități pentru proiectarea, sinteza și caracterizarea fizico-chimică și biologică a două biblioteci de vectori nonvirali (I, II)**, inclusiv testarea acestora pentru aplicații în terapia genică, eliberarea de medicamente la țintă și imagistica medicală. Au fost avute în vedere și **activități support (III)**, pentru elaborarea unor planuri experimentale adecvate.

I. Vectori nonvirali cu miez de aur funcționalizați cu polietilen glicol (PEG) de diferite mase moleculare și apoi post-funcționalizați cu polietilenimină (PEI), aceasta din urmă funcționalizată cu grupări glicozaminice (GA). Vectorii au fost **(a)** post funcționalizați cu medicamente pentru transportul și livrarea acestora la țintă; **(b)** complexați cu un plasmid pentru a demonstra capacitatea lor de a funcționa drept vectori destinați terapiei genice; **(c)** radiomarcați pentru a demonstra aplicabilitatea lor în imagistica medicală.

II. Vectori nonvirali cu miez de aur funcționalizați cu PEI pre-funcționalizată cu ciclodextrină în vederea atașării la peptide de targetare specifice liniei celulare MCF7, considerată model pentru cancerul de sân. După formarea poliplexului cu un plasmid specific, sistemul a fost testat *in vitro* și *in vivo* pentru a demonstra eficacitatea acestuia în aplicații de terapie genică.

III. Activități suport, în vederea proiectării adecvate a experimentelor cu vectori genici nonvirali.

Rezultatele obținute au asigurat îndeplinirea indicatorilor de rezultat, prezentați în tabelul de mai jos.

Indicatori propuși	Indicatori realizați
2021: O lucrare științifică. Participarea la minimum o conferință. WEB site TM-vectors. Raport de cercetare. Protocoale de sinteză și caracterizare.	2021: Două lucrări ISI. Două conferințe key note speaker, și trei comunicări orale. Pagina WEB. Raport de cercetare ce include și protocoale de lucru.
2022: Două lucrări științifice. Participări la conferințe și simpozioane. Actualizarea paginii WEB. Raport de cercetare. Protocoale de sinteză și caracterizare.	2022: Trei lucrări ISI. Două conferințe key note speaker, șase comunicări orale și postere. Pagina WEB. Raport de cercetare ce include și protocoale de lucru.
2023: Trei lucrări științifice. Participări la conferințe și simpozioane. Actualizarea paginii WEB. Raport de cercetare. Protocoale de sinteză și caracterizare.	2023: Două lucrări ISI publicate. 4 lucrări ISI în etapa de evaluare (1/RSC, 1/CellPress, 1/Taylor & Francis, 1/Elsevier). O cerere de brevet. Cinci comunicări și postere. Pagina WEB. Raport de cercetare care include protocoale de lucru.

Raportul științific, prezentat în continuare, cuprinde pe scurt activitățile desfășurate conform Planului propus de realizare al proiectului:

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

Etapa I	Activitățile incluse
Studii preliminare, de documentare și experimentale, privind proiectarea și obținerea vectorilor nonvirali cu miez de aur de generație I.	A.1.1. Proiectarea și prepararea vectorilor nonvirali
	A.1.1.1. Sinteza nanoparticulelor din aur (AuNPs) cu dimensiuni controlate și cu stabilitate crescută în medii apoase.
	A.1.1.2. Conjugarea AuNPs cu un polimer cationic (CP) funcționalizat cu ciclodextrină (CD).
	A.1.1.3. Sinteza unor combinații complexe ca potențiali fluorofori pentru obținerea unor complecși de incluziune cu β -ciclodextrină.
	A.1.2. Caracterizarea fizico-chimică a intermediarilor de reacție și a AuNPs
	A.1.3. Evaluarea preliminară <i>in vitro</i> a vectorilor nonvirali
A.1.3.1. Evaluarea <i>in vitro</i> a citotoxicității vectorilor nonvirali.	
A.1.3.2. Evaluarea capacității de transfecție a polipeptidelor de tip Au-CP-CD-Plasmid/Peptid.	
A.1.4. Evaluarea funcționalității vectorilor pe probe de sânge animal	
A.1.5. Managementul proiectului și diseminarea rezultatelor.	

Planul de realizare al proiectului TM-vector. Etapa 2022.

Etapa II	Activitățile incluse
Obținerea și caracterizarea fizico-chimică a unei biblioteci de vectori nonvirali de generație II, pentru testarea <i>in vitro/in vivo</i>.	A.2.1. Proiectarea și prepararea vectorilor nonvirali de generație II
	A.2.1.1. Conjugarea NPs de aur cu PEG adecvat funcționalizat de diferite mase moleculare (Au-S-PEGi-X, ex. X: -COOH);
	A.2.1.2. Conjugarea Au-S-PEGi-X cu polimer cationic (CP) funcționalizat cu glucoxamină (GA)(Au-S-PEGi-CP-GP);
	A.2.1.3. Încărcarea conjugatelor Au-S-PEGi-CP-GP cu un plasmid sau alte molecule active biologice (polipeptidii Au-PEGi-CP-GP-Plasmid/GP).
	A.2.2. Caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor de aur de generație II
	A.2.2.1. Caracterizarea fizico-chimică a precursorilor, și intermediarilor de reacție prin metode avansate: NMR, ATR-FTIR, Raman, ESI-MS, MALDI-Tof/MS.
	A.2.2.2. Caracterizarea vectorilor nonvirali în stare uscată, prin ATR-FTIR, NIR, Raman, XPS, XRD, SEM/EDX, micro-ATR-FTIR, TG/DSC, SEM, TEM, AFM, spectroscopie de fluorescență.
	A.2.2.3. Caracterizarea vectorilor nonvirali în stare umedă: UV-Vis, DLS, fluorimetrie, micro-ATR-FTIR, Cryo-TEM, Raman-AFM.
	A.2.2.4. Investigarea la scară nanometrică a vectorilor nonvirali, <i>in vitro</i> , în fluide biologice simulate.
	A.2.2.5. Investigarea capacității compușilor unimerici pe bază de telur (Te-AC) de a genera radicali liberi, <i>in vitro</i> .

	A.2.3. Evaluarea preliminară <i>in vitro</i> a vectorilor nonvirali A.2.3.1. Evaluarea capacității de transfecție a poliplecșilor de tip Au-PEGi-CP-Plasmid / moleculă de targetare. A.2.3.2. Proiectarea unei terapii pentru tratarea cancerului cu pro-medicament încărcat în vectorul nonviral sintetizat.
	A.2.4. Confirmarea funcționalității vectorilor nonvirali sintetizați prin teste <i>in vivo</i> A.2.4.1. Testarea <i>in vivo</i> a funcționalității sistemelor complexe care au demonstrat proprietăți promițătoare după testarea lor <i>in vitro</i> .
	A.2.5. Managementul administrativ al proiectului și diseminarea rezultatelor

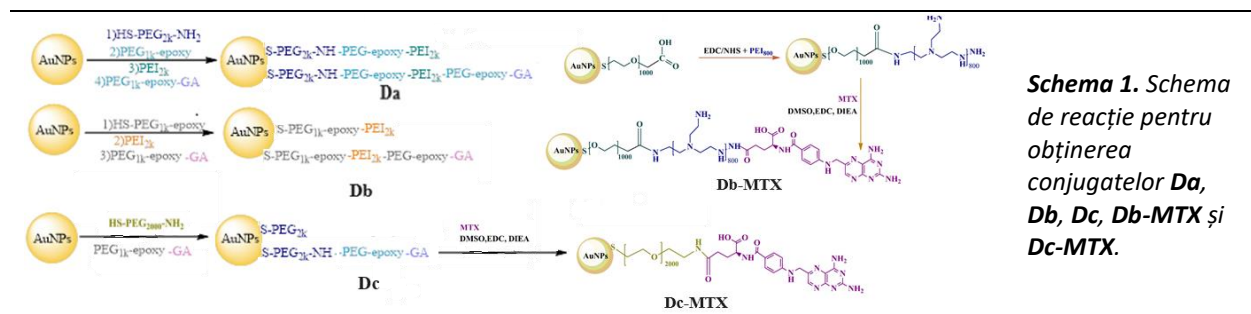
Planul de realizare al proiectului TM-vector. Etapa 2023.

Etapa III	Activitățile incluse
Obținerea și caracterizarea fizico-chimică a unei biblioteci de vectori nonvirali. Testarea funcționalității vectorilor nonvirali de generație I prin teste <i>in vivo</i>.	A.3.1. Proiectarea și prepararea vectorilor nonvirali A.3.1.1. Încărcarea conjugatelor AuPEI-CD cu un plasmid sau cu molecule biologic-active și peptide funcționale. Poliplecși AuPEI-CD-peptid/Plasmid pentru terapia genică. A.3.1.2. Încărcarea conjugatelor Au-PEG-PEI-GA cu un plasmid pentru transfecția celulelor tumorale de sân. A.3.1.3. Încărcarea conjugatelor Au-PEG-PEI-GA cu metotrexat cu proprietăți antitumorale. A.3.1.4. Radiomarcarea conjugatelor Au-PEG-PEI-GA pentru diagnostic. A.3.1.5. Studii de formare a complecșilor de incluziune ciclodextrină/medicament. A.3.1.6. Studii electrochimice a nanoparticulelor de Au electrodepuse pe diferite materiale 2D
	A.3.2. Caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor de aur, a conjugatelor Au-S-PEGi-CP-CD și a poliplecșilor Au-PEGi-CP-CD-Plasmid/Peptide A.3.2.1. Investigarea la scară nanometrică a vectorilor nonvirali <i>in vitro</i> , în fluide biologice simulate.
	A.3.3. Evaluarea preliminară <i>in vitro</i> a vectorilor nonvirali A.3.3.1. Proiectarea unei terapii pentru tratarea cancerului cu pro-medicament încărcat în vectorul nonviral sintetizat.
	A.3.4. Confirmarea funcționalității vectorilor nonvirali sintetizați, prin teste <i>in vivo</i> A.3.4.1. Testarea <i>in vivo</i> a funcționalității sistemelor complexe care au demonstrat proprietăți promițătoare după testările <i>in vitro</i> .
	A.5. Managementul administrativ al proiectului și diseminarea rezultatelor

Prezentarea rezultatelor proiectului

I. Vectori nonvirali cu miez de aur funcționalizați cu polietilen glicol (PEG) de diferite mase moleculare și apoi post-funcționalizați cu polietilenimină (PEI, polimer cationic) pre-funcționalizată cu grupări glucozaminice (GA) (vectorii Da și Db, conform Schemei 1). Stabilirea protocolului de lucru s-a realizat pe parcursul Etapei II/2022, prin sinteza unor biblioteci de compuși pentru a elabora metoda de sinteză care asigură reproductibilitatea produșilor de reacție. Structura chimică a fost demonstrată prin spectroscopia FTIR, care a evidențiat picurile caracteristice fiecărui vector studiat. Spectrele UV-Vis au păstrat rezonanța plasmonului de suprafață între 520 și 528 nm (domeniu specific nanoparticulelor din aur) în toate etapele de reacție. Adăugarea succesivă a straturilor polimerice induce o deplasare batocromă. Culoarea roșu-rubiniu s-a păstrat în toate etapele de reacție. Histogramele DLS au evidențiat ansambluri uniforme, cu o tendință clară de creștere a diametrului hidrodinamic odată cu creșterea lungimii lanțului lateral atașat nanoparticulelor de aur. În cazul vectorului **Da**, diametrul hidrodinamic măsurat prin tehnica DLS a fost de 324 nm, cu un potențial zeta de 19,2 mV. Pentru vectorul **Db** (cu lanț PEG mai scurt în comparație cu lanțul PEG din **Da**) diametrul hidrodinamic este de circa 242 nm, iar

potențialul zeta de 21,5 mV. Valorile potențialului zeta atestă faptul că sistemele prezintă stabilitate coloidală.



Evaluarea *in vitro* a biocompatibilității și citotoxicității celor două sisteme (Da și Db) asupra fibroblastelor gingivale umane (HGF) a arătat faptul că nanosistemele sunt biocompatibile, neafectând viabilitatea celulelor la concentrațiile testate.

Testele *in vivo* pe șoareci BALB/c au permis determinarea dozelor toxicității acute (DL_{50}), care au fost de 1,9 mg/șoarece pentru **Da**, respectiv de 6 mg/șoarece pentru **Db**. Pe parcursul perioadei de monitorizare, animalele supraviețuitoare din ambele loturi nu au prezentat modificări comportamentale sau semne de toxicitate. După determinarea toxicității la doze repetate ale celor doi vectori, nu s-au observat modificări de comportament, diferențe de greutate corporală sau alte semne de toxicitate clinică târzie. Șoarecii și-au păstrat interesul pentru hrană și apă pe parcursul celor 7 zile de monitorizare, iar examenul histopatologic pe ficat și rinichi a relevat faptul că administrarea acestora a indus modificări patologice de stadiu incipient.

(Detalii asupra condițiilor de reacție pentru prepararea vectorilor, precum și detalii legate de caracteristicile lor fizico-chimice și biologice au fost prezentate în Etapa 2022).

Sistemele Da, Db și Dc (Schema 1) au fost post-funcționalizate adecvat în funcție de aplicația dorită:

I.1. În terapia genică (Etapa II/2022 și Etapa III/2023): sistemele AuNP-PEG-PEI-GA au fost complexate cu plasmidul pCS2+MT-Luc (5991 bp), formând poliplexii corespunzători.

Capacitatea vectorilor de a complexa acizii nucleici a fost testată prin electroforeză pe gel de agaroză, în soluții de fluid biologic simulat cu diferite concentrații. Din studiile electroforetice, cei doi vectori formează poliplexi prin complexarea plasmidului la valori diferite ale concentrației vectorilor. Vectorul **Da** complexează total plasmidul la o concentrație de $8 \cdot 10^{-9}$ M, în timp ce vectorul **Db** asigură o împachetare totală a plasmidului la concentrația de $8 \cdot 10^{-11}$ M (concentrația plasmidului: $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$).

Testele de Citotoxicitate (testul CellTiter-Glo) și transfecție (testul Bright Glo Luciferase) aplicate vectorilor **Da** și **Db** la 48 ore pe linia celulară HeLa, au arătat că aceștia nu prezintă citotoxicitate pentru concentrații mai mici de $1200 \mu\text{M}$ aur și că asigură o transfecție eficientă la concentrații mai mici de $800 \mu\text{M}$ aur pentru **Da** și respectiv de circa $2000 \mu\text{M}$ aur pentru **Db**. În etapa 2023 s-a demonstrat (prin teste de protecție la degradarea enzimatică în prezența deoxiribonucleazei, care catalizează scindarea hidrolitică a legăturilor fosfodiesterice din compoziția ADN) faptul că plasmidului înglobat în vectorii nonvirali nu este expus degradării.

În concluzie, studiul derulat în perioada 2022-2023 a concluzionat faptul că sinteza sistemelor **Da** și **Db** (Schema 1) este reproductibilă, respectivele sisteme putând fi utilizate în terapia genică țintită a celulelor tumorale consumatoare de zaharuri. Metoda de sinteză a vectorilor **Da** și **Db** este originală, produsele asigurând o eficiență ridicată în împacheta AND-ului plasmidic. Învelișul lor polimeric conferă o bună protecție genelor transferate. Sistemele prezintă o bună biocompatibilitate, toxicitate *in vitro* scăzută pe linia celulară HGF (non-tumorală) și toxicitate *in vivo* scăzută după administrarea intravenoasă la șoareci. Vectorii propuși pot reprezenta o alternativă pentru transportul și livrarea materialului genetic în celulele canceroase, cu efecte negative minime asupra celulelor sănătoase, la un raport N/P mic (concentrația azot în vector/ concentrația fosfor în ADN), fapt care îi recomandă pentru a fi studiați în continuare în scopuri clinico-terapeutice.

I.2. Proiectarea unei terapii pentru tratarea cancerului cu pro-medicament încărcat în vectorii nonvirali **Db și **Dc**** (prezentați în Schema 1) (*Etapa II/2022 și Etapa III/2023*)

În acest studiu s-a ales drept pro-medicament metotrexatul (MTX), un antagonist al acidului folic, utilizat în terapia cancerului. Metotrexatul are o solubilitate scăzută în medii apoase și prezintă o permeabilitate scăzută în piele. Aceste deficiențe pot fi atenuate prin utilizarea sistemelor de livrare a medicamentelor, inclusiv a nanoparticulele de aur adecvat funcționalizate. Din aceste considerente, conjugatele **Db** care au dovedit citotoxicitate scăzută asupra fibroblastelor non-tumorale au fost funcționalizate prin legarea covalentă cu metotrexat (**Db-MTX**; Schema 1). Pentru a pune în evidență influența prezenței/absenței polietileniminei (PEI) asupra proprietăților biologice au fost sintetizate și conjugate cu miez din aur funcționalizate doar cu PEG și PEG-GA (produsul **Dc**; Schema 1), care au fost apoi funcționalizate covalent cu MTX (**Dc-MTX**; Schema 1). Vectorii nonvirali **Db** și **Dc** expun pe suprafața nanoparticulelor grupări aminice capabile să interacționeze cu grupările carboxilice din structura metotrexatului. Confirmarea structurii chimice și a morfologiei s-au realizat prin spectroscopie UV-Vis, spectroscopie FTIR, DLS și STEM. Imaginile STEM au relevat faptul că sistemele investigate prezintă o morfologie sferică și au diametre de circa 16 nm. Analiza DLS indică valori ale potențialului zeta de 39 mV pentru **Dc** și de 15 mV pentru **Db**, confirmând faptul că nanoparticulele prezintă o bună stabilitate coloidală și atunci când posedă pe suprafață grupări aminice.

Urmare prezenței lanțurilor de PEI pe suprafața lor, vectorii nonvirali **Db-MTX** (Schema 1) pot condensa un plasmid, iar urmare atașării prin legături esterice a MTX la suprafața acestora, compusul farmacologic-activ poate fi eliberat, cu refacerea structurii inițiale a vectorului, sub acțiunea enzimelor esterazice. Se asigură așadar un dublu effect therapeutic: livrarea concomitentă de gene și de principii farmacologic-actives către celulele țintite (prin două mecanisme distincte, respectiv condensarea electrostatică de ADN și legarea covalentă a medicamentelor și a glucozaminei).

Evaluarea *in vitro* a citotoxicității (testul MTT) și a acțiunii antioxidante (testul DPPH) în cazul conjugatelor **Db (AuNP-PEG-PEI-MTX) și **Dc** (AuNP-PEG-MTX) (Schema 1) (*Etapa II/2022 și Etapa III/2023*)**

Testele de citotoxicitate (MTT) asupra fibroblastelor gingivale umane (HGF), indică faptul că vectorii **Db** (AuNP-PEG-PEI-MTX) și **Dc** (AuNP-PEG-MTX) nu afectează viabilitatea celulelor la concentrațiile testate (Figura 6). Asupra liniei celulare MCF7 (de cancer mamar) vectorii în cauză induc efecte citotoxice cu eficacitate mai ridicată decât MTX liber, la aceleași concentrații ale MTX. Testului DPPH a demonstrat faptul că sistemele studiate prezintă o activitate antioxidantă mărită comparativ cu MTX liber, în ordinea: **Dc** > **Db** >> MTX.

În concluzie, coroborând rezultatele obținute, s-a evidențiat faptul că sistemul care are în compoziție numai lanțuri de PEG funcționalizate cu MTX și unități de glucozamină prezintă activități antitumorale și antioxidante mărite atât față de sistemul cu PEI, cât și față de MTX liber. Activitatea antitumorală globală a conjugatului **Db** (AuNP-PEG-PEI-MTX) este sporită de abilitatea de transfectare a plasmidelor vehiculate. Acest fapt a fost pus în evidență prin testele de transfecție pe linia celulară HeLa, utilizând un plasmid ce produce o proteină fluorescentă (pCS2+NLS+eGFP).

I.3. Proiectarea vectorilor nonvirali pentru imagistica medicală PET și SPECT (Etapa III/2023)

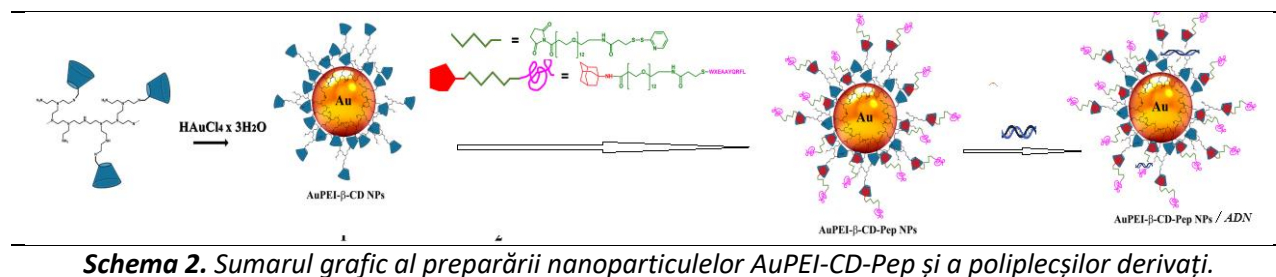
Cererea de produse radiofarmaceutice ușor accesibile și adecvate bolilor particular vizate este una dintre cele mai persistente preocupări în medicina de precizie ce face apel la imagistica nucleară. Vectorii nonvirali AuPEG-PEI și AuNP-PEG-PEI-GA includ în compoziția lor componente versatile, ce pot fi funcționalizate în mod nuanțat, cum sunt (i) miezul biocompatibil nanoparticulat din aur, (ii) prezența PEI la periferia nanoparticulei (asigurând captarea radioizotopilor), (iii) prezența secvențelor de glucozamină (care asigură acumularea vectorilor în zonele cu consum mare de glucoză) și (iv) prezența PEG în manta (fapt care sporește biocompatibilitatea și stabilitatea coloidală a vectorilor în fluidele biologice). În virtutea acestor particularități compoziționale și funcționale considerăm că vectorii dezvoltați sunt ași testării pentru aplicații în imagistica SPECT și PET.

Conjugatele AuPEG-PEI și AuNP-PEG-PEI-GA obținute au fost radiomarcate cu ^{99m}Tc (pentru SPECT) sau ^{68}Ga (pentru PET). Biocompatibilitatea conjugatelor nemarcate și marcate a fost evaluată asupra fibroblastelor non-tumorale, iar randamentul de radiomarcare al vectorilor s-a determinat prin tehnica cromatografiei instantanee în strat subțire.

Materialele multimodale nou dezvoltate au prezentat o biocompatibilitate bună și o capacitate excelentă de radiomarcare, oferind perspective remarcabile pentru utilizarea ca radiotrasori în imagistica SPECT și PET. Potențialul promițător al utilizării acestor agenți ca instrumente de diagnostic în evaluările *in vivo* ulterioare a fost demonstrat prin biocompatibilitatea *in vitro* pe fibroblaste normale.

II. Vectori nonvirali cu miez de aur funcționalizați cu polietilenimină ramificată, pre-funcționalizată cu unități de β -ciclodextrină (AuPEI-CD; Schema 2) (Etapa I/2021 și Etapa II/2023).

Urmare studiilor efectuate în etapa 2021, în care s-au evaluat procedeele de sinteză regăsite în literatura de specialitate (*detalii furnizate în raportul științific din Etapa I/2021*), în etapa 2023 am optat ca, pentru obținerea conjugatelor AuPEI funcționalizate cu β -ciclodextrină (β -CD), să aplicăm o metodă de sinteză modificată propusă de Forrest¹ și Pun², în care masa moleculară a polietileniminei ramificate (bPEI) a fost de 25kDa. Prima etapă a sintezei a constat în funcționalizarea bPEI cu unități de ciclodextrină, prin reacția dintre mono-6-O-(*p*-toluensulfonil)- β -ciclodextrinei (*sintetizată în prealabil, raport Etapa I/2021*) cu bPEI în DMSO. Amestecul de reacție a fost agitat sub atmosferă inertă timp de 72 ore la 70°C iar produsul de reacție a fost separat prin centrifugare, spălare cu acetonă, resolubizare în apă, urmată de filtrare pe filtru Amicon Ultra-15, cu MWCO 10.000 Da. Din spectrele $^1\text{H-RMN}$ s-a determinat un raport molar β -CD/bPEI=26.



A doua etapă de sinteză a constat în prepararea conjugatelor AuPEI-β-CD. Peste o soluție apoasă a acidului cloroauric ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) s-a adăgat, prin picurare și agitare la temperatura camerei, o soluție apoasă a bPEI-β-CD, pentru a se obține un raport masic $\text{HAuCl}_4/\text{bPEI-}\beta\text{-CD}$ de 1:4 g/g. Amestecul rezultat a fost iradiat 2,5 minute într-un cuptor cu microunde, până la virajul culorii spre roșu. Produsul solid a fost recuperat prin filtrare pe un filtru Amicon Ultra-15 cu MWCO 50.000 Da, rezultând o masă vâscoasă, de culoare roșie. Caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor a fost realizată prin UV-Vis, FTIR, TGA SEM, TEM, DLS. Conform aceluiași protocol s-au obținut și nanoparticule de aur cu manta din bPEI nemodificat (AuPEI-PEI).

A treia etapă de sinteză a constat în funcționalizarea peptidului WXEAAYQRFL (Chempeptide Ltd., Shanghai, China), specific pentru țintirea celulelor MCF7 (de cancer mamar), prin cuplarea acestuia în soluție apoasă cu 1-adamantilamină (Ad), în raport molar 1:1, prin intermediul ligantului 3-(2-piridilditio)propionat de polietilenglicol-succinimidil (PEG12 SPDP). Amestecul de reacție a fost menținut sub agitare timp de 24 h la temperatura camerei, apoi a fost centrifugat, iar supernatantul (ce conține produsul de reacție) s-a utilizat în continuare ca atare. Structura chimică a produsului de reacție a fost pusă în evidență prin MALDI-Tof (matrice DHB), rezultând un raport m/z de 2705, corespunzător compusului vizat.

Imaginile TEM au indicat o morfologie sferică a conjugatelor, cu diametrul mediu de circa 10 nm. Se remarcă și prezența unui număr redus de nanoparticule cu dimensiuni mai mari, rezultate în urma agregării, fapt care conduce creșterea polidispersității sistemului. Totuși, valorile de circa 53 mV determinate pentru potențialul zeta al nanoparticulelor indică o bună stabilitate a acestora în fluidele biologice, neafectată de formarea agregatelor.

În ultima etapă a testărilor, nanoparticulele AuPEI-β-CD au fost incubate timp de 24 ore cu peptidul funcționalizat cu adamantil, după care a fost adăgat plasmidul pCS2+MT-Luc, în raport N (azot din conjugat) : P (din plasmid) de 1 : 50 (determinat din studiile de electroforeză), iar amestecul rezultat a fost incubat la temperatură de 25°C, timp de 30 min (Schema 2). În urma efectuării testului de protecție la degradarea enzimatică cu deoxiribonucleaza s-a constatat faptul că plasmidul pCS2+MT-Luc, înglobat în vectorii nonvirali, nu este supus degradării enzimatice (Figura 17).

Testele MTT pentru evaluarea citotoxicității vectorilor AuPEI-β-CD, AuPEI-β-CD-pep și complexului AuPEI-β-CD-pep / pCS2+MT-Luc (numit în continuare poliplex) pe celule HeLa și pe celele de interes MCF7 (cancer de sân) au arătat că citotoxicitatea este bună și acceptabilă (>70%) pentru poliplecșii formați, în timp ce vectorii necomplexați cu plasmid prezintă o citotoxicitate mai mare față de celulele testate. Valorile relativ mari ale citotoxicității pe celulele HeLa și MCF7 sunt contrazise de testele *in vivo* (prezentate în cele ce urmează) deoarece administrarea acestora pe șoareci nu a produs efecte negative asupra organelor investigate. Testele privind capacitatea de transfecție indică faptul că poliplexul AuPEI-

β -CD-pep/pCS2+MT-Luc prezintă o capacitate de transfecție mult mai mare față de celulele MCF7, putându-se concluziona că acesta asigură specificitatea necesară în pransfectarea celulelor MCF7.

Testarea *in vivo* a fost efectuată de către un colectiv din cadrul Univeristății de Științele Vieții, “Ion Ionescu de la Brad” din Iași, în conformitate cu directiva UE 63/2010, iar toate procedurile experimentale au fost aprobate de Comitetul de Etică al Universității (aviz nr. 404/18.07.2023). Testele *in vivo* au făcut obiectul *Contractului de prestări servicii pentru proiecte de cercetare, nr. 1333/3.04.2023*, încheiat între Institutul de Chimie Macromoleculară “Petru Poni” și Univeristatea de Științele Vieții “Ion Ionescu de la Brad”.

Testarea *in vivo* a poliplexului AuPEI-CD-Pep/pCS2+NLS-eGFP

Animalele utilizate în studiu au fost șoareci CD1, achiziționați de la Institutul Cantacuzino București, stațiunea Băneasa – femele în vârstă de 8 săptămâni. Aclimatizarea animalelor s-a făcut în condiții identice de temperatură (25°C) și umiditate (60 %), cu acces permanent la apă (*ad libitum*) și hrană, iar ciclul lumină/întuneric asigurat a fost de 12 ore. Cazarea animalelor s-a făcut în cuști de policarbonat autoclavabile de 1500 cm², aproximativ 300 cm²/șoarece. Animalele au dispus de hrană standardizată – Institutul Cantacuzino.

Pentru experiment s-au utilizat plasmidul pCS2+NLS-eGFP, vectorul de transfecție AuPEI-CD-Pep și celulele MCF7. Plasmidele menționate conțin genele reporter pentru *green fluorescent protein*, iar concentrația în ADN și gradul de puritate au fost determinate spectrofotometric cu ajutorul unui spectrofotometru de microvolum (Denovix), prin măsurarea absorbției la 260 nm și prin calcularea raportului absorbțiilor la 260 și 280 nm.

Rezultatele testării vectorului nonviral AuPEI-CD pe șoareci BALB/c au arătat că acesta este non-toxic și nu induce modificări ale parametrilor evaluați la doza repetată de 500 mg/kg. Așadar, vectorul AuPEI-CD nu a afectat sănătatea animalelor utilizate în studiu. Acest rezultat ne-a permis să continuăm studiul prin administrarea de poliplecși AuPEI-CD-Pep/pCS2+NLS-eGFP (Pep: peptid specific pentru targetarea celulelor tumorale MCF7; plasmida utilizată: pCS2+NLS-eGFP capabilă să inducă exprimarea proteinei fluorescente) șoarecilor cărora li s-au administrat în prealbil cellule tumorale MCF7. Studiile de bioluminescență au arătat că poliplecșii transfectează celulele MCF7, fapt care recomandă vectorul AuPEI-CD pentru aplicații în terapia genică. Studiile se află momentan în curs de derulare, vectorii testându-se pe animale cu tumori induse.

III. Activități support:

III.1. Sinteza și caracterizarea unor combinații complexe cu metale rare, ca potențiali fluorofori pentru obținerea unor complecși de incluziune ai β -ciclodextrinei (*detaaliile sunt prezentate în raportul Etapei I/2021*).

III.2. Studii preliminare referitoare la acoperirea particulelor de aur cu inveliș de rețele supramoleculare de ciclodextrine (*detaaliile sunt prezentate în raportul Etapei I/2021*).

III.3. Caracterizarea unor combinații complexe pe bază de telur, ca potențiali furnizori de radicali liberi în țesutul tumoral (*detaalii sunt prezentate in raportul Etapei II/2022*).

III. 4. Sinteza și caracterizarea compușilor de incluziune ibuprofen/ β -ciclodextrină. Caracterizare fizico-chimică și evaluarea profilului de eliberare *in vivo* a medicamentului (*Etapa 2023*).

III.5. Obținerea agregatelor supramoleculare de nanoparticule din aur compacte, cu spectru larg de absorbție în domeniul vizibil, destinate aplicațiilor de fototermie (Etapa III/2023).

III.6. Electrodepunerea de nanoparticule de aur și aplicarea electrozilor modificați în detecția electrochimică a nitritului din ape (Etapa III/2023).

DISEMINAREA REZULTATELOR ȘTIINȚIFICE

Rezultatele derulării proiectului TM-Vector au fost publicate în reviste cotate ISI, astfel: șapte articole publicate, patru articole în evaluare (trimise spre publicare la editurile RSC, CellPress și Taylor & Francis, Elsevier) și o cerere de brevet. De asemenea, au fost prezentate: în Etapa I/2021 două conferințe și trei comunicări orale; în Etapa II/2022 două conferințe și șase comunicări orale/postere, iar în Etapa III/2023 4 conferințe și 1 poster la manifestări științifice naționale și internaționale. Conferințele / comunicările / posterele pentru etapele I/2021 și II/2022 se regăsesc în rapoartele Etapelor I/2021 și II/2022, iar pentru Etapa III/2023 sunt prezentate mai jos. În etapa 2023 s-a realizat și un stagiu de cercetare de scurtă durată, la Institutul Ilie Murgulescu, București, pentru training în problematica rezonanței electronice de spin.

Lista lucrărilor publicate sau aflate în evaluare în perioada 2021-2023

1. M.C. Sardaru, I. Rosca, S. Morariu, E.L. Ursu, R. Ghiarasim, A. Rotaru. Injectable Thixotropic β -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>
3. Petreni A, Iacobescu A, Simionescu N, Petrovici AR, Angeli A, Fifere A, Pinteala M, Supuran CT. Carbonic Anhydrase inhibitors bearing organotelluride moieties as novel agents for antitumor therapy. *Eur J Med Chem.* 2022 Oct 3;244:114811; <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114811>
4. Dimofte A, Simionescu N, Petrovici A-R, Spiridon I. Probiotic Properties of Weissella confusa PP29 on Hibiscus sabdariffa L. Media. Fermentation. 2022; 8(10):553. <https://doi.org/10.3390/fermentation8100553>
5. Condurache M-I, Petrovici A-R, Simionescu N, Profire B-S, Confederat L-G, Bujor A, Miron A, Profire L. Simultaneous Determination of Glibenclamide and Silymarin Released from Chitosan Microparticles by HPLC-ESI-MS Technique: Method Development and Validation. *Pharmaceutics.* 2022; 14(10):2164; <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102164>
6. Craciun BF, Clima L, Bostiog DI, Silion M, Calin M, Peptanariu D, Pinteala M. Multilayer gold nanoparticles as nonviral vectors for targeting MCF-7 cancer cells. *Biomater Adv.* 2023 Jan;144:213201; <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213201>
7. Vasincu IM, Apotrosoaei M, Lupascu F, Iacob AT, Giusca SE, Caruntu ID, Marangoci NL, Petrovici AR, Stanciu GD, Tamba BI, Profire BS, Focsa AV, Pinteala M, Profire L. Complexes of Ibuprofen Thiazolidin-4-One Derivatives with β -Cyclodextrin: Characterization and In Vivo Release Profile and Biological Evaluation. *Pharmaceutics.* 2023 Oct 19;15(10):2492; <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15102492>

8. Bostiog DI, Natalia Simionescu N, Coroaba A, Marinas IC, Chifiriuc MC, Gratiela Gradisteanu Pircalabioru G, Maier SS, Pinteala M. Multi-Shell Gold Nanoparticles Functionalized with Methotrexate: A Novel Nanotherapeutic Approach for Improved Antitumoral and Antioxidant Activity and Enhanced Biocompatibility. *Drug Delivery*, *Submission ID: 236177022*
9. Cristina Mariana Uritu, Cristina Al-Matarneh, Denisse Bostiog, Adina Coroaba, Vlad Ghizdovat, Silviu Filipiuc, Natalia Simionescu, Cipriana Stefanescu, Valentin Nastasa, Bogdan Tamba, Stelian Maier and Mariana Pinteala Surface-modified gold nanoparticles: A step toward structural-functional hybrid PET/SPECT radiopharmaceuticals. *Journal of Materials Chemistry B*, în etapa de recenzie (<https://submissions.rsc.org/tracker/TB-ART-11-2023-002654?t=YqB9CQL792c%2FxdmpilgzYUoTCplxszfF80TCVqk8BuHVQ%3D%3D>)
10. Bostiog Denisse-Iulia, Nastasa Valentin, Al-Matarneh Maria Cristina, Peptanariu Dragos, Mares Mihai, Pasca Sorin-Aurelian, Bostanaru-Iliescu Andra-Cristina, Craciun Bogdan Florin, Maier Stelian Sergiu, Pinteala Mariana. Simple yet versatile conjugation and decoration strategy to produce nanoparticulate gene vectors. In vitro and in vivo evidence of their functionality and safety in use. *HELIYON-D-23-53295* (<https://www2.cloud.editorialmanager.com/heliyon/default2.aspx>)
11. O.E. Carp, M. Pinteala, A. Arvinte. Electrodeposition of Au nanoparticles on 2D layered materials and their applications in electrocatalysis of nitrite. În evaluare la *Nano Materials Science*, *manuscript ID: NMS-2023-0176*

Cerere Brevet de Invenție nr. A/00143/2023 cu titlul: “Procedeu de obținere a agregatelor supramoleculare de nanoparticule de aur compacte, cu spectru larg de absorbție în domeniul vizibil, cu aplicații în fototermie”, Autori: Ursu Elena-Laura, Sardaru Monica-Cornelia, Ursu Cristian, Rotaru Alexandru.

Participări la conferințe naționale și internaționale în Etapa III/2023

1. Ioan-Andrei Dascalu', Manuela Calin, Cristina Mariana Uritu, Mariana Pinteala. *Design and Characterization of Nanocarriers for Gene Therapy based on Polycations as Polyplexes*. The 12th World Gene Convention-2023 (WGC-2023), 9-11 Ianuarie 2023, Sapporo, Japonia – prezentare orală.
2. Denisse-Iulia Bostiog, Natalia Simionescu, Bogdan Florin Craciun, Mariana Pinteala. *Methotrexate-functionalized multi-shell gold nanoparticles for drug delivery applications*. Conferința XXXIIIth Edition of the International Congress of Apollonia University of Iasi. 02-02.03.2023 – prezentare orală.
3. D.I. Bostiog, C. M. Uritu, C. M. Al-Matarneh, A. Coroaba, N. Simionescu, V. Ghizdovat, S. I. Filipiuc, B. I. Tamba, C. Stefanescu, V. Nastase, M. Pinteala. *Innovations in Cancer Imaging and Therapy: The Role of Nanoparticles and Radiotracers*. STEPI12 - Polyimides & High Performance Polymers, 4-7.06.2023, Montpellier, France – prezentare orală.
4. Adrian Fifere, Irina Rosca, Ioana-Andreea Turin Moleavin, Alexandra Sarghi, Mariana Pinteala. *Magnetic nanoparticles as carriers for antibiotics and antioxidants that interact synergistically*. 2nd International Chemistry Conference – CHEMEET 2023, 26-28.06.2023, Madrid, Spania, virtual conference – prezentare orală.
5. Narcisa Marangoci, Alexandra Sarghi, Ioana-Andreea Turin-Moleavin, Adrian Fifere. *Organotellurides as generators of free radicals. Study by electronic spin resonance spectroscopy*. 2nd International Chemistry Conference – CHEMEET 2023, 26-28.06.2023, Madrid, Spania, virtual conference – poster.

Stagiu de cercetare:

1. Fifere Adrian - Stagiu de cercetare la Institutul de Chimie Fizica "Ilie Murgulescu" din București, în perioada 5 – 11 februarie 2023.

Director proiect,

Dr. Mariana Pinteală

Bibliografie

¹ M.L. Forrest, N. Gabrielson, D.W. Pack, Cyclodextrin–polyethylenimine conjugates for targeted in vitro gene delivery, *Biotechnol. Bioeng.* 89 (4) (2005) 416–423, <https://doi.org/10.1002/bit.20356>.

² S.H. Pun, N.C. Bellocq, A. Liu, G. Jensen, T. Machemer, E. Quijano, et al., Cyclodextrin-modified polyethylenimine polymers for gene delivery, *Bioconjug. Chem.* 15 (4) (2004) 831–840, <https://doi.org/10.1021/bc049891g>.