

**ACADEMIA ROMÂNĂ
ȘCOALA DE STUDII AVANSATE A
ACADEMIEI ROMÂNE**

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”

**CONJUGATE PENTRU TRANSPORT ȘI
ELIBERARE DE GENE ȘI MEDICAMENTE**

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător științific,

C.S. I Dr. Mariana PINTEALĂ

Doctorand,

Drd. Bogdan – Florin Crăciun

Academia Română
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Departamentul Filiala Iași
Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" Iași

Nr. 6451 / 28 2020

Doamnei/Domnului _____

Vă facem cunoscut că în ziua de 30 octombrie 2020, la ora 13:00, în sala de conferințe a Institutului de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" Iași, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat cu titlul: "**Conjugate pentru transport și eliberare de gene și medicamente**", autor **Bogdan-Florin Crăciun**, în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat are următoarea componență:

Președinte:

Dr. Valeria Harabagiu, Cercetător Științific gradul I, Director al Institutului de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" din Iași

Conducător de doctorat:

Dr. Mariana Pinteală, Cercetător Științific gradul I, Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" din Iași.

Referenți:

1. **Prof. Dr. Ionel Mangalagiu**, Universitatea "Alexandru Ioan Cuza" din Iași
2. **Prof. Dr. Adrian Covic**, Universitatea de Medicină și Farmacie "Grigore T. Popa", Iași
3. **Dr. Gheorghe Fundueanu-Constantin**, Cercetător Științific gradul I, Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" din Iași

Textul integral al tezei de doctorat, în format tipărit, poate fi consultat la Biblioteca Institutului de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" din Iași.

În conformitate cu Regulamentul privind organizarea și desfășurarea doctoratului pentru acordarea titlurilor științifice în Academia Română, vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica în scris aprecierile și observațiile dumneavoastră.

Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.



DIRECTOR,

Valeria Harabagiu
Dr. Valeria Harabagiu

Mulțumiri

Prezenta teză de doctorat reflectă finalul unei etape importante în formarea mea în plan profesional, iar cu această ocazie doresc să aduc mulțumiri desăvârșite acelor persoane care m-au îndrumat, ajutat și susținut pe parcursul anilor de studii doctorale în vederea elaborării și finalizării tezei de doctorat.

*Cele mai profunde și sincere mulțumiri și întreaga mea recunoștință doamnei **C.S. I Dr. Mariana Pinteală** pentru șansa oferită de a lucra într-un colectiv și laborator de excepție, care au constituit mediul în care am realizat partea de cercetare științifică, contribuind în egală măsură la dezvoltarea mea personală. Doresc să-i mulțumesc pentru modul în care m-a îndrumat și sprijinit pe tot parcursul acestei perioade, tratându-mă ca pe fiul dumneaei. Rodul acestei colaborări frumoase îl constituie prezenta teză de doctorat.*

*Mulțumiri speciale doamnei **C.S. III Dr. Lilia Clima** pentru răbdarea și perseverența de care a dat dovadă în inițierea mea ca tânăr cercetător precum și pentru sprijinul oferit pe toată perioada elaborării și finalizării tezei de doctorat.*

*Deosebite mulțumiri **colegilor** din **IntelCentru** care au adus contribuții directe în elaborarea prezentei teze, făcând totodată ca această perioadă să fie presărată cu multe amintiri și momente frumoase. De asemenea, doresc să adresez mulțumiri și **colegilor** din cadrul departamentelor **institului „Petru Poni”** care au adus contribuții în efectuarea analizelor necesare în perioada stagiului de doctorat.*

*Cu deosebită recunoștință și dragoste, vreau să le mulțumesc în mod special **soției, mamei și surorii** care au fost alături de mine și m-au sprijinit cu multă răbdare și afecțiune în această perioadă.*

*Adresez mulțumiri **Academiei Române și Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”** pentru șansa de a beneficia de stagiul doctoral în cadrul institutului și utilizarea infrastructurii în realizarea cu succes a tuturor obiectivelor.*

*Nu în ultimul rând, doresc să mulțumesc proiectelor **„SupraChem Lab”** European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement Nr. 667387 WIDESPREAD 2-2014; **„TERADOT”** PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0083 contract nr. 37/PCCDI/2018; **„DynaCoPlat”**, PN-III-P1-1.1-TE-2016-1180; **„SATY”**, STAR CDI Nr. 169/20.07.2017; **„5D-nanoP”**, PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0050 și **„INTERA”**, PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0697, contract nr. 13/PCCDI/2018 pentru suportul financiar acordat în această perioadă.*

Vă mulțumesc!

Drd. Bogdan-Florin Crăciun

Cuprins

LISTĂ DE ABREVIERI	1
INTRODUCERE	3
PARTEA I – Stadiul actual al cercetărilor – studiu de literatură	7
CAPITOLUL I - Bioconjugate cu utilizare în transportul și eliberarea de acizi nucleici	7
I.1. Noțiuni generale despre vectorii transportori ai genelor	8
I.1.1. Vectori virali	9
I.1.2. Vectori non-virali	12
I.1.3. Complexarea vectorilor cu acizi nucleici	14
I.2. Bariere intracelulare în transferul de acizi nucleici	15
I.2.1. Absorbția celulară și părăsirea endozomală	16
I.2.2. Mobilitatea citoplasmatică și pătrunderea în nucleu	18
I.3. Clasificarea vectorilor non-virali din punct de vedere al compoziției chimice	18
I.3.1. Vectori non-virali pe bază de lipide	19
I.3.2. Vectori non-virali polimerici	24
I.3.3. Vectori non-virali pe bază de carbohidrați	29
I.3.4. Vectori non-virali cu structuri dendrimerice	33
I.3.5. Vectori non-virali polipeptidici	36
I.3.6. Vectori non-virali pe bază de nanoparticule anorganice	39
I.3.7. Vectorii non-virali hibridi	41
I.4. Concluzii	54
PARTEA a II-a – contribuții personale	55
CAPITOLUL II - Vectori non-virali pe bază de derivați ai scualenei	55
II.1. Motivarea pentru utilizarea scualenei în construcția vectorilor non-virali	56
II.1.1. Adjuvanți pe bază de scualenă pentru formularea de vaccinuri	57
II.1.2. Scualena utilizată ca agent preventiv și protectiv în tratarea cancerului	58
II.2. Sinteza și caracterizarea chimică a aldehidei scualenice și a acidului scualenic (Funcționalizarea scualenei cu o grupare carbonilică sau carboxilică)	59
II.3. Sinteza și caracterizarea scualenei PEG-ilate	61
II.3.1. Motivarea pentru utilizarea polietilenglicolului în construcția vectorilor non-virali	61
II.3.2. Sinteza, caracterizarea chimică și stabilitatea hidrolitică	62
II.3.3. Simularea dinamică moleculară	64
II.3.4. Caracterizarea morfologică prin Microscopia Electronică de Transmisie	65
II.3.5. Determinarea concentrației critice micelare prin fluorescență	66
II.3.6. Determinarea viabilității celulare <i>in vitro</i>	68
II.3.7. Concluzii	70
II.4. Sinteza și caracterizarea scualenei funcționalizată cu benzensulfonamide sau cumarine, ca inhibitori ai anhidrazei carbonice	71

II.4.1. Justificarea obținerii derivaților de scuolenă ca inhibitori ai anhidrazei carbonice	71
II.4.2. Sinteza hibrizilor de scuolenă cu benzensulfonamide sau cumarine	72
II.4.3. Teste <i>in vitro</i> de inhibare a anhidrazei carbonice	73
II.4.4. Studii de modelare moleculară <i>in silico</i>	75
II.4.5. Concluzii	76
II.5. Parte experimentală aferentă capitolului II	77
II.5.1. Materiale	77
II.5.2. Experimental	77
II.5.3. Metode	84
CAPITOLUL III - Librării de vectori non-virali dinamici pe bază de scuolenă	89
III.1. Justificarea sintezei librăriilor de vectori non-virali prin utilizarea principiilor chimiei dinamice constituționale cu aplicații în terapia genică	90
III.2. Proiectarea experimentului și a protocolului de caracterizare pentru vectorii non-virali sintetizați prin chimia dinamică constituțională	92
III.3. Sinteza și evaluarea proprietăților fizico-chimice și biologice ale librăriilor de vectori non-virali pe bază de scuolenă PEG-ilată, polietilenglicol diaminat de diferite mase moleculare și bPEI cu masă moleculară mică (0.8 kDa) conectate prin intermediu legăturilor covalente reversibile de tip imină la un nucleu de 1,3,5-triformilbenzen	95
III.3.1. Sinteza librăriei de vectori non-virali	95
III.3.2. Studii de morfologie și stabilitate coloidală	99
III.3.3. Formarea poliplecșilor vectori non-virali/pCS2	102
III.3.4. Teste <i>in vitro</i> de evaluare a citotoxicității și a eficienței de transfecție	105
III.3.5. Concluzii	110
III.4. Sinteza și evaluarea proprietăților fizico-chimice și biologice ale librăriilor de vectori non-virali pe bază de scuolenă PEG-ilată și bPEI cu masă moleculară 25 kDa conectate prin intermediul legăturilor covalente reversibile de tip imină la un linker difuncțional de aldehydă glutarică	111
III.4.1. Justificarea alegerii componentelor constituente și a protocolului de lucru pentru obținerea librăriei de vectori non-virali	111
III.4.2. Sinteza vectorilor non-virali	112
III.4.3. Caracterizarea morfologică a vectorilor non-virali	114
III.4.4. Determinarea capacității de complexare a vectorilor non-virali cu pCS2	115
III.4.5. Testele <i>in vitro</i> pentru evaluarea citotoxicității și a eficienței de transfecție ale poliplecșilor vector non-viral/pCS2	116
III.4.6. Concluzii	119
III.5. Modificarea vectorilor non-virali pentru aplicații țintite	121
III.5.1. Vectori non-virali pentru terapia genică a cancerului de sân	121
III.5.1.1. Justificarea alegerii ligandului specific pentru terapia țintită a cancerului de sân	121
III.5.1.2. Sinteza vectorului non-viral conjugat cu peptida DP18	122

III.5.1.3. Evaluarea capacității de complexare a vectorilor non-virali cu pCS2	123
III.5.1.4. Testele <i>in vitro</i> de evaluare a eficienței de transfecție	124
III.5.1.5. Concluzii	125
III.5.2. Studiul de marcarea celulară utilizând vectori non-virali fluorescenți	126
III.5.2.1. Justificarea modificării vectorului non-viral cu marker fluorescent	126
III.5.2.2. Sinteza vectorilor non-virali fluorescenți	127
III.5.2.3. Determinarea morfologiei și a dimensiunii vectorilor non-virali prin SEM și DLS	129
III.5.2.4. Studiul de fluorescență în soluție	131
III.5.2.5. Capacitatea vectorilor non-virali de a complexa pCS2	134
III.5.2.6. Testele <i>in vitro</i> de evaluare a citotoxicității și a eficienței de transfecție pe celule HeLa	136
III.5.2.7. Studiul <i>in vitro</i> de imagistică celulară prin fluorescență	138
III.5.2.8. Testele <i>in vitro</i> de evaluare a citotoxicității vectorilor non-virali prin testul MTS	139
III.5.2.9. Concluzii	140
III.6. Parte experimentală aferentă capitolului III	142
III.6.1. Materiale	142
III.6.2. Experimental	142
III.6.3. Metode	149
CONCLUZII GENERALE	154
DISEMINAREA REZULTATELOR	158
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE	161

INTRODUCERE

Încă din anul 1944, an în care Avery și colaboratorii au demonstrat faptul că acidul dezoxiribonucleic (ADN-ul) codifică informații genetice umane¹, au fost publicate numeroase informații genetice prețioase, dar o adevărată revoluție genetică a fost produsă în anul 1953, când Watson și Crick², au publicat structura dublu-elicoidală a ADN-ului, elucidând totodată și mecanismul prin care ADN-ul își atinge ținta din interiorul nucleului celular fără a fi degradat de ADN-ază. Aceste informații prețioase au condus la înțelegerea unor mecanisme de apariție ale tulburărilor umane, precum și la dezvoltarea unor noi metode de tratament, inclusiv terapia genică.³ Totuși, în epoca post-genomică există provocări majore, în special acelea de a înțelege funcțiile moleculelor biologice importante.

Terapia genică poate fi definită ca o tehnică care se ocupă cu tratarea unor boli grave (dobândite sau ereditare) prin rectificarea cauzelor genetice, fie prin înlocuirea genelor defecte cu gene sănătoase, fie prin completarea genelor lipsă.⁴ Noțiunea de terapie genică provine de la termenul de „inginerie genetică” care a fost postulat în 1932 în Ithaca în cadrul celui de ”al VI-lea Congres Internațional de Genetică”.⁵ În terapia genică sunt folosite mai multe tipuri de material genetic, cum ar fi ADN dublu-catenar, ADN mono-catenar sau ADN plasmidic.⁶ Succesul terapiei genice depinde în cea mai mare parte de certitudinea că gena terapeutică este internalizată în celulă fără a fi biodegradată. Însă, este cunoscut faptul că ADN-ul este sensibil la nucleaza din mediul biologic, iar natura polianionică hidrofila a macromoleculii de ADN și dimensiunea mare a acestuia împiedică penetrarea pasivă a membranei celulare.³ Din acest motiv ADN-ul trebuie asociat cu sistemul de livrare sau cu vectorul ce transportă gena terapeutică în celula țintă, protejând gena de degradarea provocată de nucleaze și să existe certitudinea că aceasta transfectează în interiorul celulei.⁷

Contribuțiile semnificative din cercetare aduse în domeniul terapiei genice au ajutat la elucidarea avantajelor și dezavantajelor în utilizarea sistemelor de vectori pentru livrarea și eliberarea materialului genetic. Astfel, au fost puse în evidență componentele esențiale din componența unui vector optim, care să prezinte eficiență de transfecție ridicată, citotoxicitate redusă și o bună capacitate de internalizare celulară.

Având la bază aceste considerente, în cadrul prezentei teze de doctorat intitulată „**Conjugate pentru transport și eliberare de gene și medicamente**”, a fost urmărită obținerea și optimizarea unor sisteme de vectori non-virali dinamici pentru transportul și eliberarea de gene și medicamente, țintire celulară specifică și imagistică celulară prin fluorescență.

În **prima parte** a tezei de doctorat, **Capitolul I**, este prezentat un studiu de literatură ce are la bază atât principiul fundamental al terapiei genice, cât și studiile actuale privind sistemele de vectori și aplicabilitatea acestora în domeniul biomedical. De asemenea, sunt prezentate în detaliu mecanismele de internalizare celulară ale materialului genetic livrat de vector.

Partea a doua a tezei de doctorat este structurată pe două capitole (**Capitolele II și III**) și prezintă contribuțiile personale cu privire la obținerea, optimizarea și caracterizarea fizico-chimică a sistemelor de vectori non-virali, cât și rezultatele biologice obținute în urma testărilor *in vitro*. Astfel, vor fi prezentate în detaliu: **(a)** sinteza derivaților de scuolenă în vederea determinării proprietăților biologice cu privire la utilizarea acestora în proiectarea și optimizarea unor sisteme de vectori non-virali, precum și evaluarea capacității de inhibiție a unor derivați asupra unor izoforme de anhidrază carbonică umană (**Capitolul II**); **(b)** proiectarea, obținerea, optimizarea și caracterizarea fizico-chimică a unor librării de vectori non-virali pe bază de scuolenă PEG-ilată ($M_{PEG}=1.5$ kDa). În funcție de aplicabilitatea acestora, utilizând ca structură de bază scuolena PEG-ilată, au fost obținute 3 librării de vectori ce conțin: **(i)** 1,3,5-triformilbenzen, PEG diaminat de diferite mase moleculare (1.5, 2 și 3 kDa) și bPEI cu masă moleculară de 0.8 kDa (livrare de material genetic). De asemenea, vectorul non-viral cu cele mai bune proprietăți biologice a fost funcționalizarea cu un peptid adecvat pentru livrare și țintire celulară specifică; **(ii)** aldehydă glutarică și bPEI cu masă moleculară de 25 kDa (livrare de material genetic); **(iii)** derivați de *p*-fenol dicarbonilici și bPEI cu mase moleculare de 0.8 și 2 kDa (livrare și imagistică celulară prin fluorescență) (**Capitolul III**). În componența fiecărui subcapitol din partea de rezultate proprii se regăsesc obiectivele studiului, justificarea importanței abordării temei ce este propusă spre dezvoltare, descrierea experimentului (inclusiv a metodelor de sinteză), caracterizarea fizico-chimică, rezultatele obținute în urma testărilor biologice *in vitro*. De asemenea, fiecare subcapitol are în încheiere concluziile aferente fiecărui studiu și partea experimentală.

Capitolul II prezintă o metodă eficientă de obținere a derivaților de scuolenă ce conțin grupări aldehydice, carboxilice sau unități de PEG (-PEG-NH₂). Aceștia au fost caracterizați structural utilizând spectroscopia RMN (¹H și ¹³C). În cazul derivatului cu unități de PEG a fost determinată stabilitatea hidrolitică, concentrația critică micelară, precum și abilitatea de a forma miclele în medii apoase. Concentrația critică micelară a fost determinată prin înregistrarea spectrelor de fluorescență ale soluțiilor apoase ce conțin piren, utilizat drept fluorofor. Morfologia, dimensiunea și polidispersitatea miclelelor au fost determinate prin TEM. De asemenea, utilizând testul MTS de citotoxicitate *in vitro* pe linia celulară NHDF a fost determinată biocompatibilitatea scuolenei PEG-ilate. În urma acestor experimente a fost confirmată obținerea unui derivat de

scualenă ce poate fi propus pentru obținerea de sisteme cu potențiale aplicații în transportul de gene și medicamente în diferite tipuri de celule.

Într-un alt studiu al **Capitolului II** este prezentată sinteza și caracterizarea seriei de derivați pe bază de scualenă ce au fost obținuți prin formarea legăturilor amidice între componentele sistemului final, plecând de la acidul scualenic și diferiți derivați de cumarină sau benzensulfonamide. Caracterizarea compușilor rezultați a fost realizată prin intermediul spectroscopiei RMN, spectrometriei de masă și analiza elementală. De asemenea, sunt prezentate rezultatele obținute după evaluarea *in vitro* a derivaților de scualenă obținuți pentru determinarea profilului de inhibare a unor izoforme de anhidrază carbonică umană, utilizând tehnica în flux oprit. Derivații de scualenă au prezentat o selectivitate ridicată și un profil de inhibare excelent împotriva izoformei hCA II față de celelalte izoforme utilizate, cât și valori ale constantei de inhibiție mult mai bune decât ale compușilor de plecare. Rezultatele obținute sunt promițătoare, recomandând derivați sintetizați ca potențiali candidați în studiile preclinice ale glaucomului sau ale afecțiunilor conexe în care hCA II este implicată.

Capitolul III, așa cum a fost menționat anterior, cuprinde 4 studii individuale. Primul dintre acestea descrie proiectarea și sinteza unei librării de vectori non-virali dinamici ce posedă compoziție variabilă, formată din scualenă PEG-ilată, nucleul de 1,3,5-triformilbenzen, H₂N-PEG-NH₂ cu trei mase moleculare diferite (1.5, 2, și 3 kDa) și polietilenimină ramificată cu masă moleculară mică (0.8 kDa). Caracterizarea morfologică a vectorilor obținuți a demonstrat obținerea unor particule cu dimensiuni mici datorită apariției interacțiunilor sterice între moleculele din componența sistemelor finale. În urma testărilor biologice *in vitro* pe celule HeLa, a fost observată o creștere a eficienței de transfecție odată cu creșterea conținutului de PEG, cât și o creștere a biocompatibilității *in vitro* odată cu creșterea masei moleculare a PEG.

Cel de-al doilea studiu, prezentat în **Capitolul III**, a avut la bază investigarea proprietăților biologice a unor sisteme de vectori non-virali dinamici pe bază de scualenă PEG-ilată, aldehidă glutarică și polietilenimină ramificată cu masa moleculară de 25 kDa. Vectorii non-virali au fost caracterizați din punct de vedere morfologic prin TEM, iar în urma acestui studiu a fost observată capacitatea compușilor sintetizați de a forma structuri sferice de tip „nucleu-înveliș”. De asemenea, a fost determinată abilitatea vectorilor de a complexa pCS2 prin electroforeză pe gel de agaroză. Au fost realizate testări *in vitro* de determinare a citotoxicității și a eficienței de transfecție pe celule HeLa, în urma cărora a fost demonstrat faptul că acestea sunt dependente de cantitatea de bPEI-25kDa, cât și de raportul N/P utilizat. Acest studiu a determinat recomandarea utilizării

cu succes a bPEI-25kDa în obținerea sistemelor constituționale dinamice ce pot fi utilizați ca vectori non-virali pentru transportul și transfecția acizilor nucleici.

Cel de-al treilea studiu prezentat în **Capitolul III** are ca obiectiv conjugarea cu peptida DP18 a vectorului pe bază de scuolenă PEG-ilată, nucleul de 1,3,5-triformilbenzen, H₂N-PEG-NH₂ cu masa moleculară de 1.5 kDa și polietilenimină ramificată cu masă moleculară mică (0.8 kDa), fiind sistemul cu cele mai promițătoare proprietăți biologice, din cadrul primului studiu din acest capitol, în vederea țintirii celulare specifice. În urma acestui studiu a fost observat faptul că prin conjugarea sistemului cu peptida DP18 se imprimă o specificitate în țintirea liniei celulare tumorale MCF7.

În ultimul studiu al **Capitolului III** a fost obținută o librărie de vectori non-virali cu proprietăți emise în soluții apoase. Compoziția librăriei de vectori este diferită atât prin substituenții de la nivelul nucleului fluorescent, cât și prin masa moleculară a policationului bPEI (0.8 kDa sau 2 kDa). În urma caracterizării morfologice prin SEM a rezultat faptul că vectorii se autoasamblează în structuri de tip „nucleu-înveliș”, observații ce au fost confirmate și de analiza DLS. De asemenea, au fost realizate studii de absorbție și de fluorescență în urma cărora au fost observate proprietățile emise ale vectorilor, confirmate și vizual la 365 nm sub lampa UV. Formarea poliplecșilor a fost determinată prin electroforeză în gel de agaroză, iar studiile *in vitro* de evaluare a viabilității celulare precum și a eficienței de transfecție au fost realizate pe celule tumorale HeLa. Studiile de imagistică celulară *in vitro* prin fluorescență au demonstrat internalizarea cu succes a vectorilor atât în citoplasmă, cât și în nucleul celular.

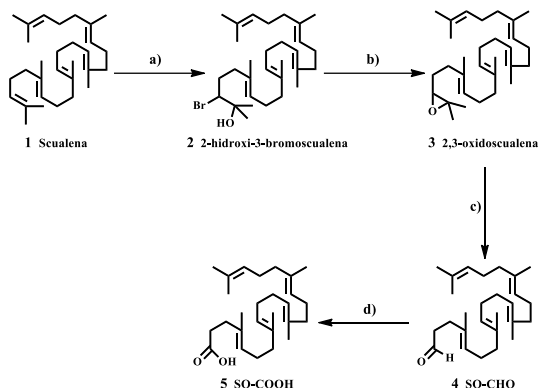
Teza de doctorat se încheie cu prezentarea concluziilor generale rezultate din fiecare studiu întreprins, diseminarea rezultatelor obținute în perioada studiilor de doctorat și bibliografia aferentă.

Rezultatele obținute și prezentate în cadrul tezei de doctorat „**Conjugate pentru transport și eliberare de gene și medicamente**”, au făcut până în prezent subiectul a 4 lucrări științifice publicate în jurnale cotate ISI și a 7 comunicări (orale sau poster) la manifestări științifice internaționale și naționale. De asemenea, au fost publicate sau sunt în curs de publicare și 2 lucrări în jurnale cotate ISI pe subiecte conexe temei abordate în prezenta lucrare.

CAPITOL II – Vectori non-virali pe bază de derivați ai scualenei

II.2. Sinteza și caracterizarea chimică a aldehidei scualenice și a acidului scualenic (Funcționalizarea scualenei cu o grupare carbonilică sau carboxilică)

Funcționalizarea scualenei cu o grupare aldehydică (SQ-CHO) are loc printr-o succesiune de etape conform **schemei II.1.** (1÷4), iar gruparea carboxilică a fost obținută prin reacția de oxidare a grupării carbonilice atașată anterior la lanțul scualenic (SQ-COOH, **schema II.1.** (5)).



Schema II.1. Schema de obținere a derivaților SQ-CHO (4) și SQ-COOH (5). Condiții de reacție: **a)** NBS, THF, 0 °C, 1.5h; **b)** K₂CO₃, MeOH, 25 °C, 2h; **c)** HIO₄ x 2H₂O, H₂O și 1,4-dioxan, 25 °C, 2h; **d)** H₂Cr₂O₇, H₂O și Et₂O, 0 °C, 2h.

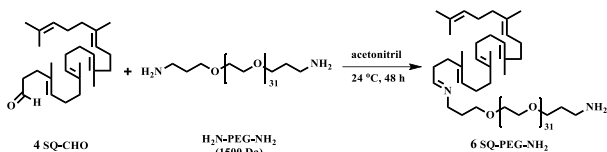
Confirmarea obținerii intermediarilor de reacție și a compușilor de interes (SQ-CHO și SQ-COOH) fost confirmată cu ajutorul spectroscopiei de rezonanță magnetică de proton (¹H-RMN) și de carbon (¹³C-RMN).

II.3. Sinteza și caracterizarea scualenei PEG-ilate

II.3.2. Sinteza, caracterizarea chimică și stabilitatea hidrolitică

PEG-ilarea scualenei (**schema II.2.**) a fost realizată prin aplicarea protocoalelor deja existente în literatură.^{8,9} Pe scurt, grupările alchidice din compusul SQ-CHO (5) au fost reacționate cu grupările aminice primare din α,ω -bis(3-aminopropil)polietilenglicol (H₂N-PEG-NH₂ – 1.5 kDa) în raport molar CHO:NH₂=1:1. Reacția a avut loc în acetonitril, la temperatura camerei, timp de 48 de ore, sub agitare

continuă și sub atmosferă de azot, obținându-se compusul de interes scualena PEG-ilată (SQ-PEG-NH₂ (6), **schema II.2.**).



Schema II.2. Schema de sinteză a scualenei PEG-ilate.

Structura chimică a SQ-PEG-NH₂ (6) a fost confirmată prin spectroscopia RMN de proton și carbon.

În vederea realizării unui studiu de stabilitate în soluții apoase, SQ-PEG-NH₂ a fost solubilizată în apă deuterată, iar monitorizarea pe parcursul a 10 zile s-a realizat prin intermediul spectrelor ¹H-RMN. În urma acestui studiu a fost observată o hidroliză a produsului de doar 0.2 %, demonstrând o stabilitate ridicată a scualenei PEG-ilate.

II.3.4. Caracterizarea morfologică prin Microscopia Electronică de Transmisie

Pentru a observa caracteristicile morfologice și dimensionale ale scualenei PEG-ilate în apă a fost utilizată microscopia electronică de transmisie (TEM). Imaginile TEM (**figura II.6a** și **6b**) ale conjugatelor SQ-PEG-NH₂ depuse pe grilă TEM din soluții apoase pun în evidență formarea unor micelle cu formă sferică și cu valori ale diametrelor cuprinse între 20 și 55 nm (**figura II.6c**).

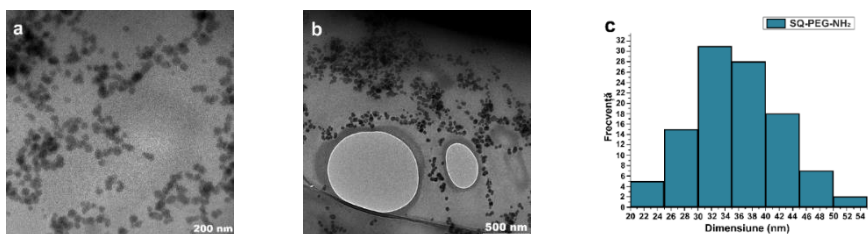


Figura II.6. Imaginile TEM la diferite magnitudini ale SQ-PEG-NH₂ depusă pe grila TEM din soluții apoase: **a)** scală de 200 nm; **b)** scală de 500 nm; **c)** distribuția dimensională.¹⁰

II.3.5. Determinarea concentrației critice micelare prin fluorescență

În această lucrare concentrația critică micelară (CCM) a fost determinată prin înregistrarea spectrelor de fluorescență ale soluțiilor apoase (21 de probe) de diverse

concentrații în SQ-PEG-NH₂ ($5.13 \times 10^{-3} \text{ M} \div 3.24 \times 10^{-8} \text{ M}$) și un fluorofor la concentrație constantă, în cazul nostru piren $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ (**figura II.7.**).

Spectrul de fluorescență al pirenului (**figura II.7.**) oferă informații despre polaritatea locală din vecinătatea imediată a acestuia bazându-se pe raportul intensităților dintre primul și al treilea maxim de emisie (I_1/I_3) (**figura II.7. insert**).

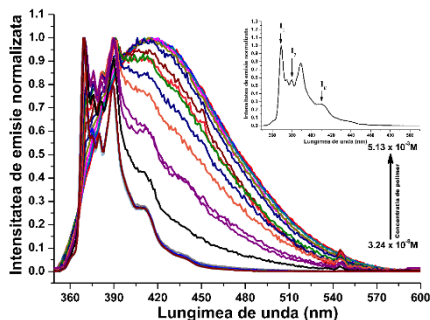


Figura II.7. Spectrele de emisie normalizate ale soluțiilor apoase de piren ($5 \times 10^{-7} \text{ M}$) în prezență de SQ-PEG-NH₂ la diferite concentrații (de la $3.24 \times 10^{-8} \text{ M}$ ÷ $5.13 \times 10^{-3} \text{ M}$); I_1 , I_3 , I_E – intensitățile normalizate ale picurilor 1 și 3, respectiv a excimerului; $\lambda_{ex} = 334 \text{ nm}$.¹⁰

Valoarea CCM caracteristică soluției apoase de scualenă PEG-ilată a fost determinată prin construcția graficelor (**figura II.8.**) pe baza valorile rapoartelor I_1/I_3 sau I_E/I_3 în funcție de concentrația (C) SQ-PEG-NH₂ la concentrație constantă a pirenului ($5 \times 10^{-7} \text{ M}$). Intersecția tangențelor în punctele de inflexiune ale celor două grafice la concentrația de 0.1620 mg/mL ($8.75 \times 10^{-2} \text{ mM}$) SQ-PEG-NH₂ reprezintă valoarea CCM, sugerând faptul că scualena PEG-ilată există sub formă de micle la concentrații \geq de 0.1620 mg/mL . De asemenea, se poate trage concluzia că odată cu creșterea concentrației peste limita de CCM, dimensiunea agregatelor crește.

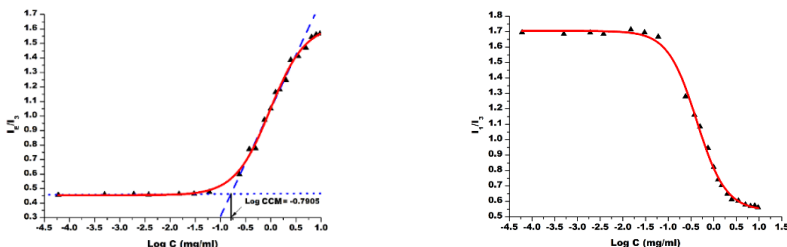


Figura II.8. Determinarea CCM în soluții apoase a SQ-PEG-NH₂ (mg/mL) prin fitarea sigmoidală Boltzmann a raportului I_E/I_3 (**stânga**) sau I_1/I_3 (**dreapta**) în funcție de Log C (C: concentrația SQ-PEG-NH₂, mg/mL); concentrația pirenului $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ și $\lambda_{ex} = 334 \text{ nm}$.¹⁰

II.3.6. Determinarea viabilității celulare in vitro

Citotoxicitatea scualenei PEG-ilate a fost testată prin determinarea activității metabolice celulare (testul MTS).¹¹ Viabilitatea celulară a fost calculată și exprimată ca procente relative față de viabilitatea celulelor netratate, acestea din urmă fiind considerate ca având viabilitate de 100 % (**figura II.9.**).

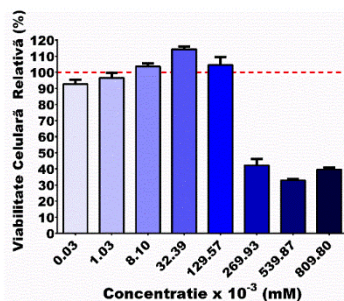


Figura II.9. Viabilitatea celulară relativă a SQ-PEG-NH₂ la diferite concentrații pe linia celulară NHDF.¹⁰

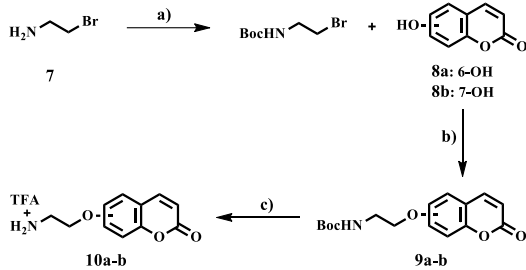
În **figura II.9.** se poate observa faptul că la concentrații care se situează în intervalul $0.003 \div 12.957 \times 10^{-2}$ mM, soluțiile de scualenă PEG-ilată au viabilitate celulară bună, în timp ce la concentrații mai ridicate ($26.993 \div 80.98 \times 10^{-2}$ mM) viabilitatea celulară scade până la o valoare de aproximativ 40 %.

În concluzie, soluțiile de SQ-PEG-NH₂ ce prezintă viabilitate pe fibroblaști prezintă o limitare a utilizării acestora ca vectori non-virali în intervalul de concentrație $0.003 - 13 \times 10^{-2}$ mM.

II.4. Sinteza și caracterizarea scualenei funcționalizată cu benzensulfonamide sau cumarine, ca inhibitori ai anhidrazei carbonice

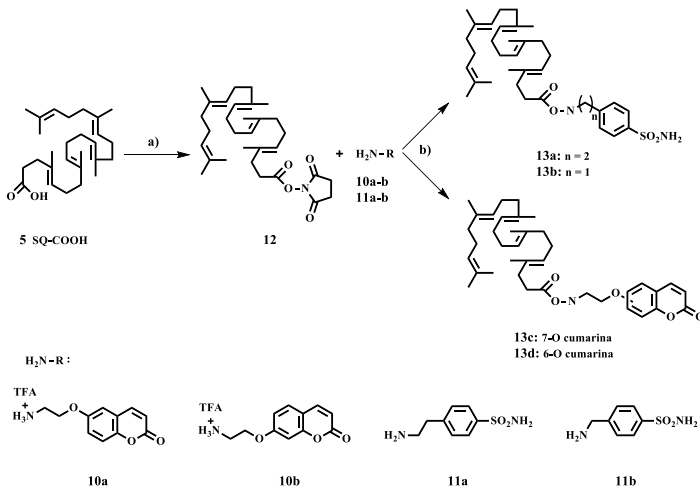
II.4.2. Sinteza hibridilor de scualenă cu benzensulfonamide sau cumarine

Etaplele de sinteză ale derivaților de cumarină (10a și 10b) sunt prezentate în **Schema II.3.** Pe scurt, prima etapă de sinteză debutează prin protejarea grupării aminice primare din structura 1-bromoetilamină (7), iar produsul de reacție a fost reacționat cu 6-hidroxicumarină și 7-hidroxicumarină (8a și 8b) prin reacția de O-alchilare. În ultima etapă, derivații intermediari 9a și 9b au fost deprotejați cu acid trifluoroacetic, obținându-se compușii de interes 10a și 10b.



Schema II.3. Etapele de sinteză ale derivaților de cumarină 10a și 10b. Condiții de reacție: **a)** (Boc)₂O, Et₃N, DCM; **b)** K₂CO₃, DMF, 60°C, 12 h; **c)** TFA, DCM.

Sinteza compușilor hibridi 13a÷d (**schema II.4.**) a fost realizată prin aplicarea unor protocoale existente în literatură¹² și care au suferit modificări specifice. Protocolul de obținere a hibrizilor 13a÷d, prezentat în **schema II.4.**



Schema II.4. Reprezentarea etapelor de sinteză a inhibitorilor împotriva CA pe bază de scualenă funcționalizată cu grupări sulfonamidice 13a și 13b și a celor pe bază de scualenă funcționalizată cu cumarine 13c și 13d. Condiții de reacție: **a)** EDC-Cl, NHS, DMF anhidru, 23 °C, 2 – 4 h; **b)** Et₃N, DMF anhidru, 23 °C, 12 – 24 h.

II.4.3. Teste *in vitro* de inhibare a anhidrazei carbonice

Compușii 13a-d obținuți au fost testați *in vitro* pentru determinarea activității de inhibare a izoformelor hCA I, II, IX și XII prin tehnica în flux oprit ”stopped-flow”.¹³ În urma testării au fost determinate două caracteristici ale compușilor: activitatea inhibitorie și selectivitatea compușilor pe izoforma hCA II.

Rezultatele experimentale obținute sunt prezentate în **tabelul II.1**.

Tabel II.1. Activitatea inhibitorie și raportul de selectivitate pentru compușii 13a-d și AAZ pe izoformele hCA I, hCA II, hCA IX și hCA XII, obținute prin utilizarea testului de hidratare a CO₂ folosind tehnica prin flux oprit.¹⁴

Compus	K _i (nM)[*]				Raport de selectivitate
	hCA I	hCA II	hCA IX	hCA XII	(CA II/IX)
13a	3516	62.3	1887	844	0.0330
13b	6842	5.0	3559	>10000	0.0014
13c	>10000	>10000	7215	>10000	>1.386
13d	>10000	>10000	8817	>10000	>1.134
AAZ	250	12.1	25.8	5.7	0.468

[*] Rezultatele sunt exprimate ca medie a trei determinări diferite utilizând tehnica prin flux oprit, erorile valorilor raportate au fost situate în intervalul $\pm 5 - 10$ %.

Rezultatele prezentate arată faptul că izoforma citosolică hCA I a fost inhibată foarte slab de derivații cu sulfonamidă 13a și 13b în domeniul de concentrație nanomolar (3516 nM și respectiv 6842 nM). Însă, tot în cazul compușilor 13a și 13b a fost obținută o eficiență ridicată împotriva hCA II, prezentând constante de inhibiție K_i de 62.3 nM și respectiv 5 nM.

CAPITOLUL III – Librării de vectori non-virali dinamici pe bază de scuolenă

III.1. Justificarea sintezei librărilor de vectori non-virali prin utilizarea principiilor chimiei dinamice constituționale cu aplicații în terapia genică

Deficiențele majore din terapia genică sunt asociate cu dezvoltarea unor micro- și nanosisteme multifuncționale de transport, cunoscute sub numele de vectori, ce sunt capabile să transporte și să elibereze în mod specific cantități impresionante de material genetic sau să asigure medierea transferului genic. Bazându-se pe arhitectura și proprietățile intrinseci, vectorii virali încă prezintă cele mai bune rezultate în terapia genică.¹⁵⁻²⁰ Ca o alternativă, celelalte abordări se bazează pe utilizarea sistemelor non-virale de transport și eliberare a genelor, iar prin îmbunătățirea continuă a acestor sisteme se încearcă mimarea eficienței vectorilor virali pe cale sintetică.²¹⁻²⁴

III.3. Sinteza și evaluarea proprietăților fizico-chimice și biologice ale librărilor de vectori non-virali pe bază de scuolenă PEG-ilată, polietilenglicol diaminat de diferite mase moleculare și bPEI cu masă moleculară mică (0.8 kDa) conectate prin intermediul legăturilor covalente reversibile de tip imină la un nucleu de 1,3,5-triformilbenzen

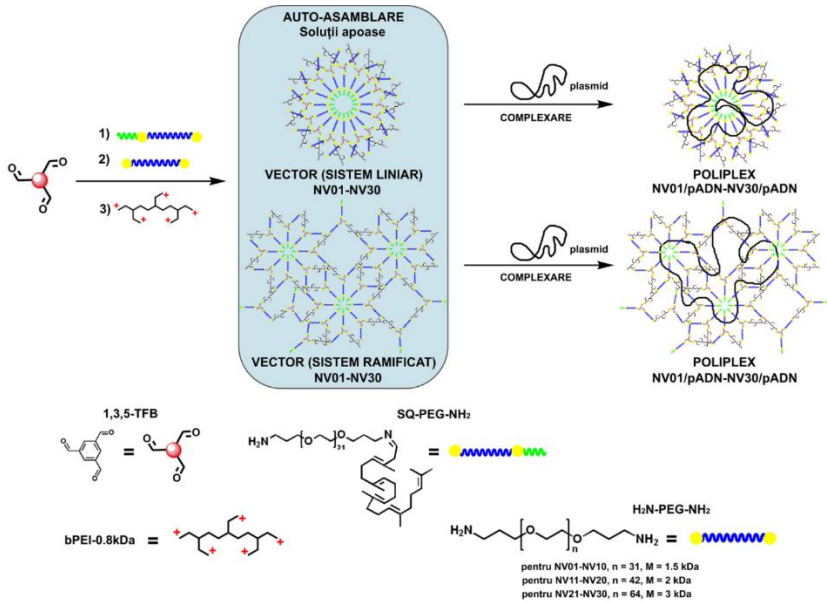
III.3.1. Sinteza librăriei de vectori non-virali

Protocolul de sinteză utilizat se bazează pe conectarea componentelor de interes la un nucleu multifuncțional prin legături covalente reversibile de tip imină, cu scopul obținerii unor structuri supramoleculare ramificate. Astfel, la nucleul de 1,3,5-TFB au fost conectate în rapoarte molare diferite următoarele componente:

- SQ-PEG-NH₂ – ca unitate amfifilă întrucât este cunoscută în literatură pentru abilitatea de a se autoasambla în soluții apoase;^{10,25-28}
- segmente de H₂N-PEG-NH₂ cu trei lungimi diferite ale lanțului macromolecular (M = ~ 1.5, 2 și 3 kDa) – au capacitatea de a îmbunătăți solubilitatea în apă și de a reduce imunogenitatea sistemului;
- bPEI-0.8kDa - prezintă un caracter cationic capabil să împacheteze acizii nucleici prin interacțiuni electrostatice.

Complexarea plasmidului, precum și transportul și eliberarea acestuia în celulele umane de către vectorii obținuți, au fost puse în evidență prin electroforeza în gel de agaroză, AFM și prin determinarea eficienței de transfecție *in vitro* pe linia celulară HeLa.

Procedeele de obținere a vectorilor non-virali are loc în trei etape (**schema III.1.**).



Schema III.1. Etapele de sinteză ale vectorilor non-virali și a poliplexșilor aferenți acestora.²⁹

Vectorii non-virali obținuți au fost notați cu NV01 – NV30. O scurtă prezentare a componenței acestora este reprezentată de păstrarea raportului molar SQ-PEG-NH₂:1,3,5-TFB:bPEI-0.8kDa de 1:1:1.5, iar raportul molar de H₂N-PEG-NH₂ a fost schimbat progresiv de la 0.1 până la 1 echivalenți. O altă caracteristică a vectorilor este reprezentată de utilizarea H₂N-PEG-NH₂ cu diferite mase moleculare: 1.5 kDa (NV01-NV10), 2 kDa (NV11-NV20) și 3 kDa (NV21-NV30).

III.3.2. Studii de morfologie și stabilitate coloidală

Întrucât vectorii ce aparțin librăriei de vectori non-virali (NV) sunt susceptibili autoasamblării în soluții apoase datorită caracterului hidrofob/hidrofil^{10,25,30}, scopul

acestui studiu a fost de a compara influența lungimii lanțului macromolecular de PEG în procesul de formare al agregatelor și asupra proprietăților biologice.

După o analiză atentă a imaginilor TEM corespunzătoare vectorilor analizați, a fost observată formarea unor particule cu morfologie sferică (**figura III.3.**). Foarte interesant este faptul că prin creșterea masei moleculare a precursorului H₂N-PEG-NH₂ de la 1.5 kDa până la 3 kDa (1.5 kDa: NV10, **figura III.3a,b**; 2 kDa: NV20, **figura III.3d,e**; 3 kDa: NV30, **figura III.3g,h**) se observă o diminuare a diametrului particulelor, ceea ce confirmă observațiile din literatură³¹ și anume că lungimea lanțului macromolecular de PEG influențează dimensiunea finală a conjugatului (**figura III.3c,f,i**).

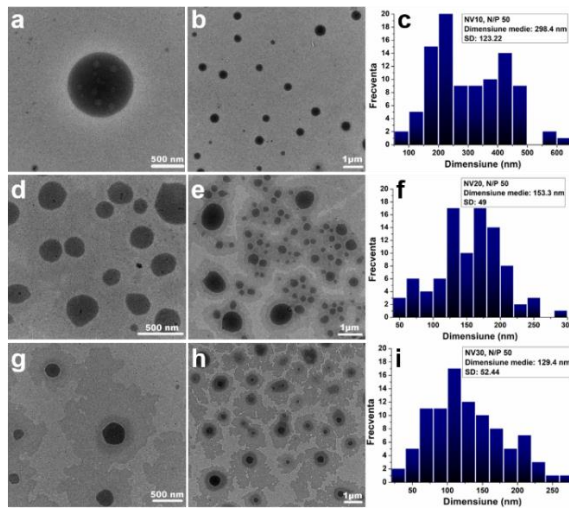


Figura III.3. Microimaginele TEM pentru vectorii (a,b) NV10; (d,e) NV20; (g,h) NV30; distribuțiile dimensionale medii ale particulelor formate în apă a vectorilor: (c) NV10, (f) NV20 și (i) NV30. Pentru determinarea distribuțiilor au fost măsurate 90 de particule pentru fiecare probă.²⁹

Rezultatele obținute prin tehnica TEM sunt confirmate în totalitate și prin investigarea soluțiilor apoase ale vectorilor NV20 și NV30 prin tehnica DLS.

III.3.3. Formarea poliplecșilor vectori non-virali/pCS2

Următorul pas în acest studiu a fost de a determina abilitatea vectorilor non-virali de a complexa pCS2+MT-Luc (pCS2) cu ajutorul electroforezei în gel de agaroză.

Mobilitatea electroforetică a pCS2 a fost determinată în prezența fiecărui vector non-viral și a bPEI-0.8kDa la diferite rapoarte N/P, unde N este conținutul de azot din structura vectorului non-viral, iar P este conținutul de fosfor din structura plasmidului. Ca probă martor a fost folosit plasmidul liber, iar ca probă de control mobilitatea electroforetică a pCS2 în prezența vectorului bPEI-0.8kDa la diferite rapoarte N/P.

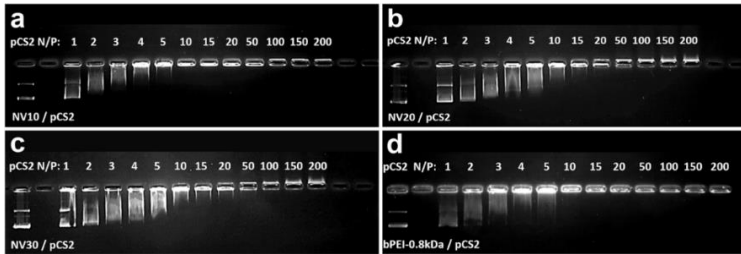


Figura III.5. Mobilitatea electroforetică a pCS2+MT-Luc în prezența vectorilor non-virali la diferite rapoarte N/P: (a) NV10; (b) NV20; (c) NV30; (d) bPEI-0.8kDa.²⁹

Analizând imaginile de electroforeză ale pCS2 în prezența sau absența unui vector non-viral propus de noi sau a bPEI-0.8kDa, ca vector model, la diferite rapoarte N/P (**figurile III.5.** și **III.6.**), se poate observa că vectorul NV10 prezintă o capacitate de complexare a plasmidului asemănătoare cu cea a compusului model bPEI-0.8kDa (**figura III.5d**), iar odată cu creșterea masei moleculare a PEG din structura vectorului non-viral scade capacitatea de complexare a plasmidului de către vectorii NV20 și NV30.

De asemenea, interacțiunea dintre sistemele non-virale și plasmid, care conduce la obținerea poliplecșilor corespunzători, a fost studiată prin microscopia de forță atomică (AFM). Astfel, prin AFM au fost studiate probele ce conțin poliplecșii NV10/pCS2, NV20/pCS2 și NV30/pCS2 (**figura III.7.**), în scopul de a observa influența lungimii lanțului de PEG asupra morfologiei și dimensiunii poliplecșilor studiați.

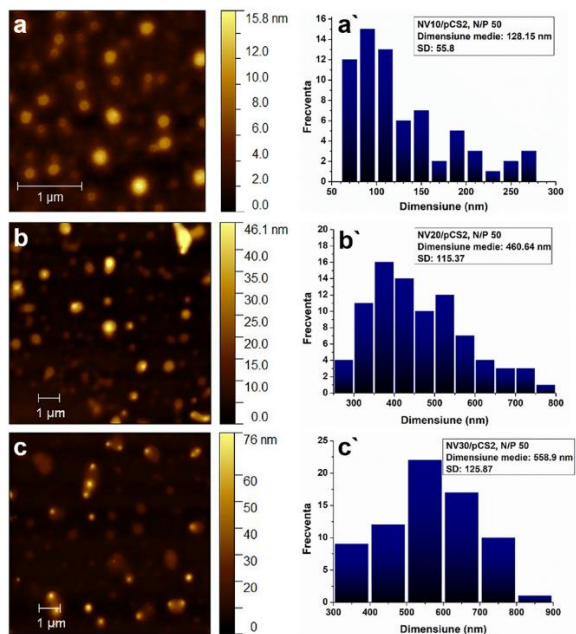


Figura III.7. Imaginile AFM și distribuția dimensională corespunzătoare polipecșilor: (**a, a`**) NV10/pCS2; (**b, b`**) NV20/pCS2; (**c, c`**) NV30/pCS2 la rapoarte N/P de 50. Pentru realizarea distribuțiilor dimensionale au fost măsurate în medie un număr de 80 de particule utilizând programul ImageJ 1.48r.²⁹

Pentru a furniza un transport extins prin fluxul sanguin, dimensiunea polipecșilor trebuie să fie cuprinsă între 10 și 200 nm. În caz contrar, nanoparticulele cu dimensiuni sub 10 nm sunt eliminate rapid de către rinichi, iar particulele cu dimensiuni mai mari de 200 nm sunt eliminate de către sistemul reticuloendotelial (RES)³²⁻³⁴. În cazul complexului NV10/pCS2 la un raport N/P de 50, analiza AFM (**figura III.7a**) a arătat prezența unor particule sferice, cu forme bine definite și o valoare medie a diametrului de aproximativ 130 nm (**figura III.7a`**). Pe de altă parte, polipecșii NV20/pCS2 și NV30/pCS2 (**figura III.7b,c**) au prezentat obținerea unor agregate mai mari, cu dimensiuni cuprinse între 460 și 560 nm (**figurile III.7b`** și **III.7c`**), ceea ce demonstrează o influență clară a lungimii moleculelor de PEG asupra mecanismului de formare a polipecșilor.

III.3.4. Teste *in vitro* de evaluare a citotoxicității și a eficienței de transfecție

Pentru a putea fi comparată eficiența de transfecție și citotoxicitatea pe celule HeLa a poliplecșilor NV10/pCS2, NV20/pCS2 și NV30/pCS2, la rapoarte N/P de 50 și 100, a fost realizat un studiu care a avut ca scop determinarea influențelor apărute în urma utilizării unor lungimi diferite ale lanțurilor de PEG (**figura III.9.**).

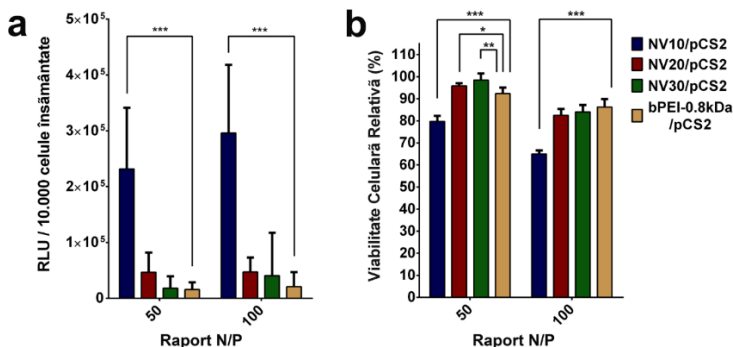


Figura III.9. Testările biologice *in vitro* a poliplecșilor NV10/pCS2, NV20/pCS2 și NV30/pCS2, cu rapoarte N/P de 50 și 100, pe celule HeLa: **(a)** eficiența de transfecție; **(b)** viabilitatea celulară. Rezultatele sunt prezentate ca valori medii ± deviația standard (SD); n = 6-8. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ și *** $p < 0.001$ prin utilizarea testului t-student.

În urma acestui studiu se poate observa ca poliplexul NV10/pCS2 prezintă o eficiență de transfecție mai mare decât omologii săi la ambele rapoarte N/P studiate (**figura III.9a**). De asemenea, eficiența de transfecție obținută la raportul N/P de 100 este mai mare față de cea obținută în cazul raportului N/P de 50. În ceea ce privește citotoxicitatea complexelor studiate, se poate observa o biocompatibilitate mai pronunțată în cazul poliplecșilor NV20/pCS2 și NV30/pCS2 față de omologii lor NV10/pCS2 (**figura III.9b**). Această observație fiind explicată de lungimea lanțului de PEG utilizat în construcția vectorilor.

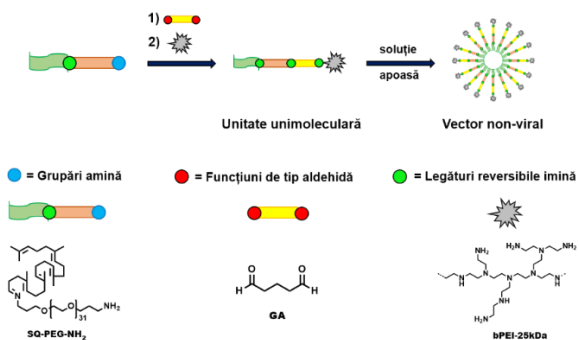
III.4. Sinteza și evaluarea proprietăților fizico-chimice și biologice ale librăriilor de vectori non-virali pe bază de scualenă PEG-ilată și bPEI cu masă moleculară 25 kDa conectate prin intermediul legăturilor covalente reversibile de tip imină la un linker difuncțional de aldehydă glutarică

III.4.1. Justificarea alegerii componentelor constituente și a protocolului de lucru pentru obținerea librăriei de vectori non-virali

În literatură este cunoscut faptul că polietilenimina este un polimer biocompatibil ce poate fi utilizat în terapia genică, ca agent folosit în procesele de transfecție genică. Scopul prezentului studiu a fost de a obține un sistem dinamic pe bază de bPEI-25kDa care să posedă eficiență superioară de transfecție a pCS2, dar care să manifeste o citotoxicitate moderată, datorită componentelor sale biocompatibile cum sunt scualena și PEG-ul.

III.4.2. Sinteza vectorilor non-virali

Sinteza vectorilor non-virali care fac obiectul acestui studiu a fost realizată în două etape (**schema III.2.**). În prima etapă, derivatul polimeric pe bază de SQ-PEG-NH₂ a fost funcționalizat cu GA printr-o cuplare covalentă reversibilă de tip imină obținându-se compusul intermediar SQ-PEG-GA. În a doua etapă a procedurii de sinteză, compusul intermediar SQ-PEG-GA a fost funcționalizat cu bPEI-25kDa, obținându-se sistemele denumite BF1-BF5.



Schema III.2. Etapele de sinteză a vectorilor non-virali dinamici BF1-BF5. Condițiile de reacție utilizate sunt: 1) H₂O, 23 °C, 24 ore, agitare magnetică; 2) H₂O, 23 °C, 24 ore, agitare magnetică.

Acest studiu vine ca o continuare la studiul precedent (subcapitolul III.3.), urmărind simplificarea sistemelor obținute precum și limitarea obținerii unor rețele ramificate care conduc la creșterea în dimensiune a vectorilor non-virali doriți.²⁹

III.4.3. Caracterizarea morfologică a vectorilor non-virali

Microimaginele TEM obținute în cazul SQ-PEG-NH₂ (**figura III.10a**) indică obținerea unei morfologii globulare, cu dimensiuni cuprinse între 30-40 nm.

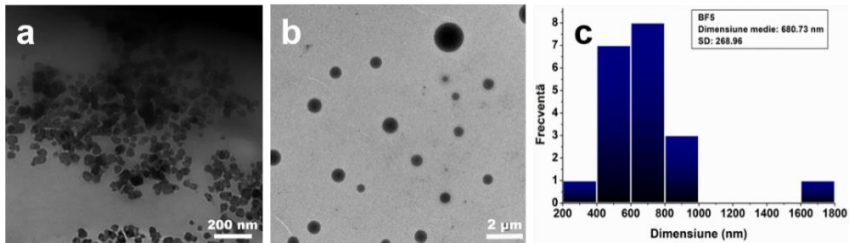


Figura III.10. Microimaginele TEM și distribuția dimensională corespunzătoare compușilor: (a) SQ-PEG-NH₂; (b) BF5; (c) Distribuția dimensiunilor a vectorului BF5/20 particule.

De asemenea, rezultatele TEM obținute în cazul vectorului dinamic BF5 (**figura III.10b**) ne confirmă faptul că sistemele obținute posedă o morfologie sferică de tip „nucleu-înveliș”, unde partea hidrofobă a sistemelor (scualena) este miezul întunecat a particulelor, iar partea hidrofilă (polietilenimina) este situată la exterior, fiind mai deschisă la culoare. Dimensiunea particulelor sferice este dispersă, aceasta variind de la 269 nm la 1632 nm, cu o valoare medie de 680 nm (S.D. 269 nm) (**figura III.10c**).

III.4.4. Determinarea capacității de complexare a vectorilor non-virali cu pCS2

Abilitatea de împachetare a pCS2 de către vectorii dinamici BF, a fost evaluată prin intermediul electroforezei în gel de agaroză la diferite rapoarte N/P (raportul dintre numărul de atomi de azot din componența polimerului cationic și numărul de atomi de fosfor din plasmid) (**figura III.12.**).

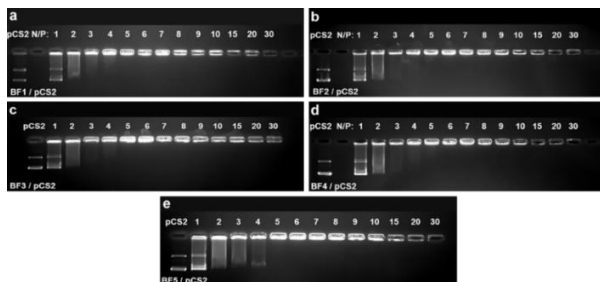


Figura III.12. Mobilitatea electroforetică a pCS2 în prezența vectorilor (a) BF1, (b) BF2, (c) BF3, (d) BF4 și (e) BF5, în diferite rapoarte N/P.

Rezultatele obținute în urma studiului de complexare a pCS2 de către vectorii BF demonstrează faptul că prin modificarea raportului molar bPEI-25kDa/SQ-PEG-GA, nu apar modificări semnificative în capacitatea vectorilor de a complexa plasmidul. Acesta este împachetat complet începând cu rapoarte N/P de 5 (figura III.12a-e), ceea ce indică o capacitate ridicată a vectorilor de a forma poliplecși la concentrații foarte mici.

III.4.5. Testele *in vitro* pentru evaluarea citotoxicității și a eficienței de transfecție ale poliplecșilor vector non-viral/pCS2

Evaluarea citotoxicității *in vitro* și a eficienței de transfecție a poliplecșilor BF1-BF5/pCS2 a fost realizată pe linia celulară HeLa la trei rapoarte N/P diferite (5, 7 și 10) (figura III.13).

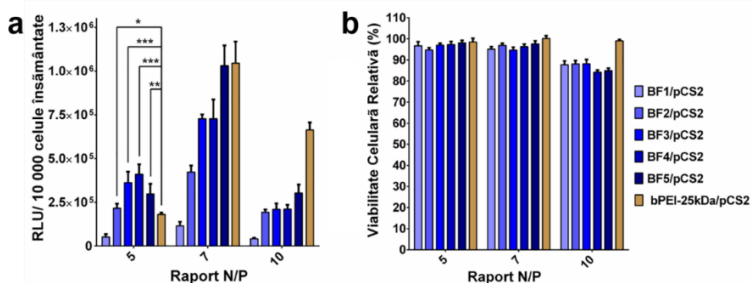


Figura III.13. (a) Eficiența de transfecție și (b) citotoxicitatea *in vitro* ale poliplecșilor BF1-BF5/pCS2 pe celule HeLa. Rezultatele pentru eficiența de transfecție sunt exprimate ca unități relative de luminescență (RLU) pe 10000 de celule însămânțate. Testarea citotoxicității *in vitro* a fost realizată prin aplicarea testului MTS pe celule HeLa. Rezultatele sunt prezentate ca valori medii ± deviația standard (S.D.); n = 6. * p < 0.05, ** p < 0.01 și *** p < 0.001 prin utilizarea testului t-student.

Eficiența de transfecție a poliplecșilor BF1-BF5/pCS2 *in vitro* a fost realizată folosind reactivul BrightGlo™ Luciferase pe celule canceroase HeLa, iar rezultatele obținute au fost comparate cu cele obținute pe poliplexul martor bPEI-25kDa/pCS2 (**figura III.13a**). Astfel, la raportul N/P de 5, poliplecșii BF2-BF5/pCS2 au prezentat o eficiență de transfecție superioară față de cea a matorului bPEI-25kDa/pCS2 la același raport N/P.

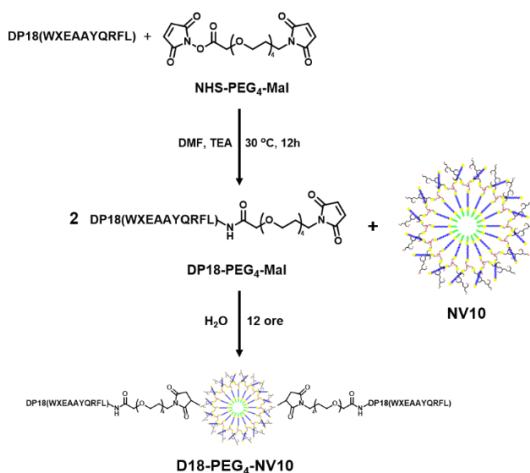
Toți poliplecșii studiați au fost analizați *in vitro* pe linia celulară HeLa pentru a determina nivelul citotoxic (**figura III.13b**). Din rezultatele obținute în urma testării, a fost demonstrat că poliplecșii posedă un caracter citotoxic moderat la toate rapoartele N/P studiate. La raportul N/P de 5, poliplecșii posedă o viabilitate celulară de aproximativ 100 %, fiind similară cu cea a matorului bPEI-25kDa/pCS2, aceste rezultate susțin rezultatele obținute în testele de determinare a eficienței de transfecție.

III.5. Modificarea vectorilor non-virali pentru aplicații țintite

III.5.1. Vectori non-virali pentru terapia genică a cancerului de sân

III.5.1.2. Sinteza vectorului non-viral conjugat cu peptida DP18

Conjugarea vectorului NV10 (descriș în subcapitolul III.3) a fost realizată în două etape (**schema III.3.**) prin aplicarea unui protocol descriș în literatură.³⁵



Schema III.3. Etapele de obținere a vectorului NV10 conjugat cu peptide DP18.

Astfel, în prima etapă, peptida DP18 a fost funcționalizată cu Mal-PEG₄-NHS în raport molar DP18/Mal-PEG₄-NHS de 1:1. Reacția a fost realizată în mediu de dimetilformamidă și trietilamină la 30 °C pentru 12 ore sub agitare continuă. În a doua etapă, compusul DP18-PEG₄-Mal a fost solubilizat în apă ultrapură, iar peste soluția obținută a fost adăugat, sub formă de soluție apoasă, vectorul NV10 în raport molar DP18-PEG₄-Mal/NV10 de 2:1. Amestecul de reacție a fost lăsat la agitare magnetică, în condiții ambientale pentru 12 ore.

III.5.1.3. Evaluarea capacității de complexare a vectorilor non-virali cu pCS2

Capacitatea conjugatului DP18-PEG₄-NV10 de a împacheta pCS2 a fost evaluată prin intermediul electroforezei în gel de agaroză (**figura III.16.**). Mobilitatea electroforetică a pCS2 în prezența vectorului non-viral DP18-PEG₄-NV10 a fost determinată la diferite rapoarte N/P și a fost comparată cu cea a plasmidului liber. De asemenea, rezultatele obținute au fost comparate și cu cele obținute în cazul poliplexului NV10/pCS2.

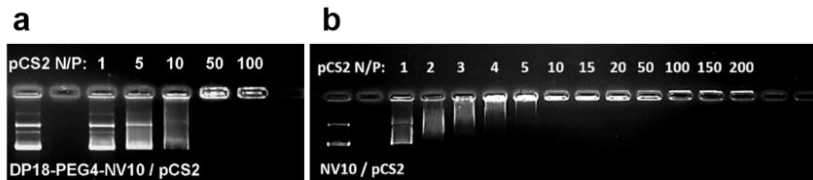


Figura III.16. Mobilitatea electroforetică a pCS2 în prezența de (a) DP18-PEG₄-NV10 și (b) NV10.

Rezultatele obținute în urma determinării capacității de complexare a pCS2 de către DP18-PEG₄-NV10, atestă faptul că acesta împachetează complet plasmidul începând cu raportul N/P de 10, iar la raportul N/P de 50 plasmidul este complet împachetat (**figura III.16a**), în timp ce în cazul vectorului NV10 plasmidul este complet împachetat la raportul N/P de 10.

III.5.1.4. Testele *in vitro* de evaluare a eficienței de transfecție

Întrucât peptida DP18 prezintă afinitate pentru linia celulară MCF7, testarea de evaluare *in vitro* a eficienței de transfecție a fost realizată atât pe linia celulară specifică MCF7 cât și pe linia celulară nespecifică HeLa. Pentru a determina specificitatea

peptidei DP18 atașată vectorului NV10 au fost efectuate studii atât pe poliplexul DP18-PEG₄-NV10/pCS2 cât și pe NV10/pCS2 la diferite rapoarte N/P, iar rezultatele obținute în urma testării sunt reprezentate grafic ca valori medii ± deviația standard (S.D.) (**figura III.17.**).

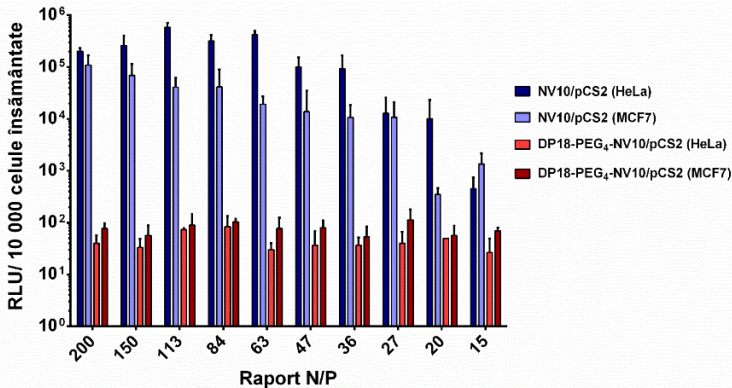


Figura III.17. Eficiența de transfecție a poliplexșilor DP18-PEG₄-NV10/pCS2 și NV10/pCS2 pe liniile celulare HeLa și MCF7. Rezultatele sunt exprimate ca unități relative de luminescență (RLU) pe 10000 de celule însămânțate.

Poliplexul NV10/pCS2 prezintă o eficiență superioară de transfecție pe ambele linii celulare la toate rapoartele N/P studiate, în timp ce poliplexul DP18-PEG₄-NV10/pCS2 manifestă o ușoară specificitate pentru linia celulară HeLa. De remarcant este faptul că, deși aparent eficiența de transfecție a poliplexului DP18-PEG₄-NV10/pCS2 este mai mică pe ambele linii celulare, se poate observa totuși că vectorul non-viral modificat DP18-PEG₄-NV10 prezintă o afinitate mai mare pentru linia celulară MCF7.

III.5.2. Studiul de marcarea celulară utilizând vectori non-virali fluorescenți

III.5.2.1. Justificarea modificării vectorului non-viral cu marker fluorescent

Imagistica prin fluorescență este o tehnică utilizată des în ultima perioadă pentru vizualizarea și supravegherea anumitor țesuturi sau procese biologice *in vitro* și *in vivo*^{36,37}. Imagistica prin fluorescență prin intermediul compușilor fluorescenți de marcarea celulară este deosebit de importantă în special pentru microscopia *in vivo*,

pentru a confirma această ipoteză, au fost realizate studii de morfologie prin microscopia electronică de baleiaj (SEM) pe exemplul vectorului DA2.1 (**figura III.18.**).

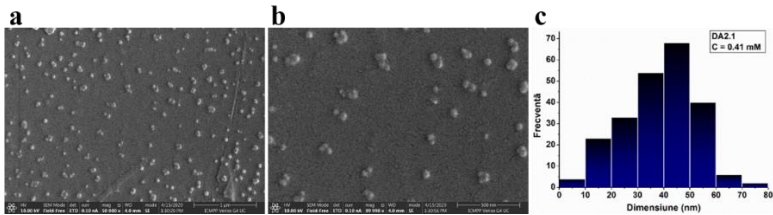


Figura III.18. Microimaginele SEM și distribuția dimensională pentru vectorul non-viral DA2.1: (a) la scala de 1 μm; (b) la scala de 500 nm și (c) distribuția dimensională. Pentru determinarea distribuției dimensiunilor particulelor au fost măsurate 230 de particule, iar pentru prelucrarea datelor a fost folosit programul ImageJ.

Microimaginele obținute în urma analizei SEM pentru compusul DA2.1 la concentrația de 0.41 mM (**figura III.18a-b**), atestă formarea particulelor sferice de tip „nucleu-înveliș” a căror dimensiune este uniformă și care au o valoare medie a diametrului de aproximativ 38 nm (**figura III.18c**). Acest aspect atestă că dimensiunea vectorului DA2.1 este apropiată de cea a scualenei PEG-ilate¹⁰, prezentând o structură compactă și organizată, cu miezul format din sculenă și fluorofor, iar învelișul este format de bPEI-0.8kDa.

Pentru a determina dimensiunile vectorilor în medii apoase, soluțiile au fost analizate prin tehnica DLS. În acest scop, probele au fost analizate la trei concentrații diferite, iar rezultatele obținute sunt reprezentate grafic în **figura III.19**.

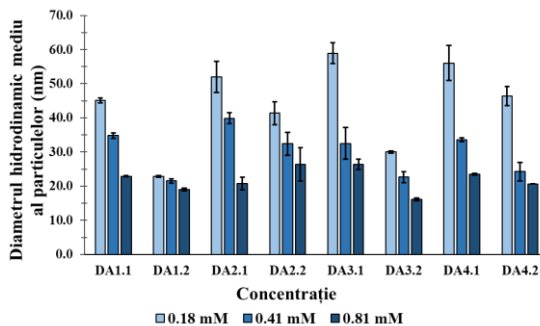


Figura III.19. Diametrele hidrodinamice medii ale particulelor DA în medii apoase, determinate prin analiza DLS.

Rezultatele obținute arată faptul că vectorii ce au în compoziție bPEI-0.8kDa au prezentat valori mai mari ale diametrului hidrodinamic (45 – 60 nm) în comparație cu cele ale vectorilor ce au în compoziție bPEI-2kDa (25 – 45 nm), la concentrația de 0.18 mM.

III.5.2.4. Studiul de fluorescență în soluție

Spectrele de absorbție și de emisie ale compușilor mai sus menționați, au fost înregistrate în soluții apoase, având concentrația de 1×10^{-4} M, prin utilizarea unor cuve de cuarț cu drumul optic de 10 mm. Spectrele obținute în urma excitării soluțiilor cu lungimea de undă corespunzătoare din spectrele de absorbție sunt prezentate în **figura III.21**.

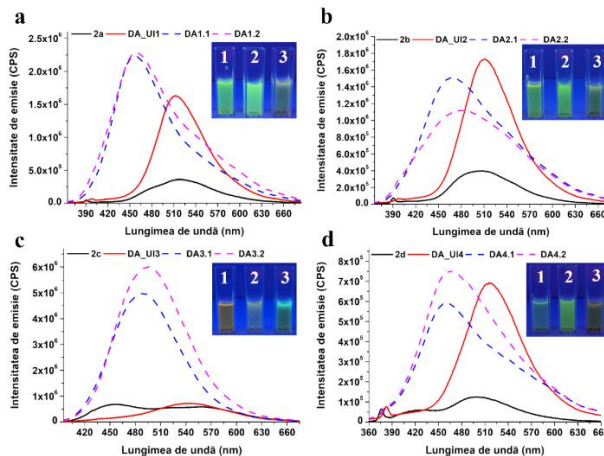


Figura III.21. Spectrele de emisie ale vectorilor non-virali DA și a derivaților intermediari în soluții apoase la concentrația de 1×10^{-4} M.

Compușii de plecare 2a-d prezintă o bandă de emisie largă de intensitate mică (**figura III.21a-d**) cu un maxim la 510 nm în cazul compușilor 2a și 2b și două maxime în cazul compușilor 2c (450 și 570 nm) și 2d (420 și 510 nm).

Compușii intermediari DA_UI1, DA_UI2 și DA_UI4 prezintă un maxim de emisie intens la 515 nm, în timp ce compusul DA_UI3 prezintă un maxim de emisie de intensitate asemănătoare compusului de plecare 2c, la o lungime de undă de 540 nm. De asemenea, culoarea luminii emise în cazul celor trei compuși cu fluorescență pronunțată

este galben-verzuie, iar a compusului DA_UI3 este galben-portocaliu, conform cu deplasarea observată în spectrul de emisie (**figura III.21, insert 2**).

Spectrele de fluorescență ale vectorilor DA1.1-DA4.2 prezintă benzi de emisie intense în domeniul spectral 420 – 600 nm cu un maxim observat la 460 nm în cazul compușilor DA1.1, DA1.2, DA4.1 și DA4.2. În cazul compușilor DA2.1 și DA2.2, se observă o bandă de emisie largă deplasată spre albastru, față de compusul intermediar, cu un maxim la 475 nm, iar în cazul compușilor DA3.1 și DA3.2, se observă un maxim la 495 nm.

În cazul spectrelor de emisie ale acestor compuși, se remarcă o deplasare spre albastru a culorii luminii emise față de compușii de plecare, fenomen posibil asociat cu formarea de agregate, demonstrată de măsurătorile DLS prezentate anterior.^{42,43}

III.5.2.5. Capacitatea vectorilor non-virali de a complexa pCS2

Pentru a determina capacitatea vectorilor DA1.1 – DA4.2 de a complexa pCS2 a fost utilizată electroforeza în gel de agaroză, iar mobilitatea electroforetică a pCS2 în prezență de DA1.1 – DA4.2 la diferite rapoarte N/P este prezentată în **figura III.22**.

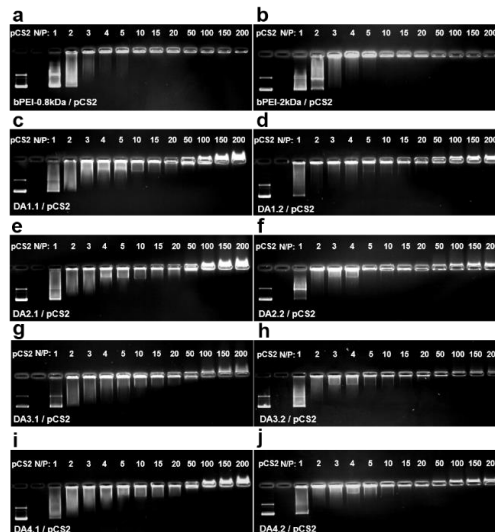


Figura III.22. Mobilitatea electroforetică a pCS2 în prezența (a) bPEI-0.8kDa și (b) bPEI-2kDa, folosite drept control, și în prezența vectorilor fluorescenți (c) DA1.1, (d) DA1.2, (e) DA2.1, (f) DA2.2, (g) DA3.1, (h) DA3.2, (i) DA4.1, (j) DA4.2, în diferite rapoarte N/P.

Rezultatele obținute în urma acestui studiu și prezentate în **figura III.22**, atestă faptul că vectorii non-virali fluorescenți DA1.1, DA2.1, DA3.1 și DA4.1 care au în compoziție bPEI-0.8kDa au capacitatea de a complexa complet pCS2 începând cu rapoartele N/P de 50 (**figura III.22c,e,g,i**). În cazul vectorilor non-virali DA1.2, DA2.2, DA3.2 și DA4.2 pe bază de bPEI-2kDa se poate observa o împachetare completă a plasmidului începând cu rapoartele N/P de 20 (**figura III.22d,f,h,j**). Capacitatea vectorilor non-virali studiați fiind mai scăzută decât în cazul martorilor utilizați (bPEI-0.8kDa **figura III.22a**) și (bPEI-2kDa **figura III.22b**).

Acest fenomen de diminuare a capacității de complexare a plasmidului este pus pe seama interacțiunilor intermoleculare dintre PEG și PEI care conduc la o ecranare a sarcinilor pozitive prezente la suprafața moleculelor de PEI.⁴⁴

III.5.2.6. Testele *in vitro* de evaluare a citotoxicității și a eficienței de transfecție pe celule HeLa

Eficiența de transfecție *in vitro* a poliplecșilor DA1.1-DA4.2/pCS2 la rapoartele N/P de 50 și de 100 (**figura III.23a**) a fost evaluată pe linia celulară HeLa folosind reactivul Bright-Glo™ Luciferase de la Promega, iar rezultatele obținute au fost comparate cu martorii bPEI-0.8kDa/pCS2 și bPEI-2kDa/pCS2.

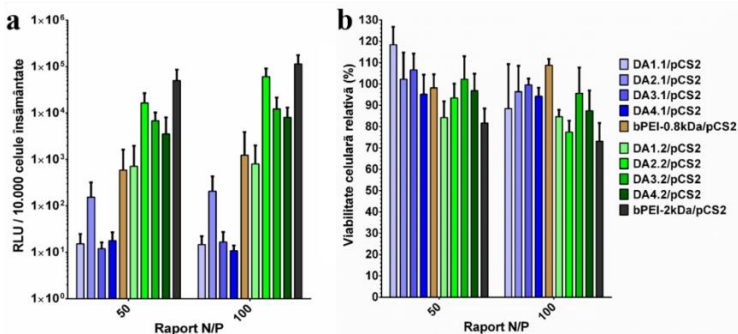


Figura III.23. (a) Eficiența de transfecție și (b) viabilitatea celulară *in vitro* a poliplecșilor DA1.1/pCS2-DA4.2/pCS2. Rezultatele pentru eficiența de transfecție sunt exprimate ca unități relative de luminescență (RLU) pe 10000 de celule însămânțate. Citotoxicitatea a fost determinată prin testul MTS pe celule HeLa. Rezultatele sunt prezentate ca valori medii ± deviația standard (S.D.); n = 18.

Rezultatele prezentate în **figura III.23a** ne arată faptul că poliplecşii investigaţi prezintă eficienţă de transfecţie mai redusă comparativ cu martorii utilizaţi la ambele rapoarte N/P, excepţie o fac poliplecşii DA2.1/pCS2 şi DA2.2/pCS2 care prezintă o eficienţă de transfecţie asemănătoare cu cea a martorilor utilizaţi.

Rezultatele de citotoxicitate obţinute pe celule HeLa sunt reprezentate grafic în **figura III.23b**. Astfel, se poate observa faptul că poliplecşii prezintă o viabilitate celulară mai ridicată decât martorii utilizaţi, acest lucru putând fi pus pe seama scualenei PEG-ilate care prezintă biocompatibilitate ridicată¹⁰ şi care ajută la diminuarea efectului citotoxic a moleculelor de PEI utilizate.

III.5.2.7. Studiul *in vitro* de imagistică celulară prin fluorescenţă

Capacitatea de internalizare a vectorilor non-virali fluorescenţi DA2.1 şi DA2.2 în celulele HeLa, a fost examinată utilizând microscopia prin fluorescenţă sub excitaţie cu lumină UV ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$) a celulelor HeLa incubate în prezenţa vectorilor menţionaţi anterior (**figura III.24**).

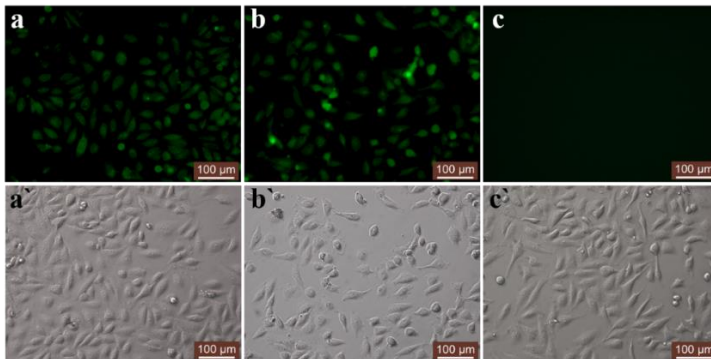


Figura III.24. Imagini obţinute cu microscopia prin fluorescenţă pentru celulele HeLa tratate cu: (a) vectorul DA2.1, (b) vectorul DA2.2 şi (c) celule netratate după 30 minute de incubare.

Imagini obţinute cu microscopia în câmp luminat pentru celulele HeLa tratate cu: (a') vectorul DA2.1, (b') vectorul DA2.2 şi (c') celule netratate.

Imaginile obţinute prin microscopia de fluorescenţă pentru vectorii DA2.1 (**figura III.24a**) şi DA2.2 (**figura III.24b**) la concentraţia de 1 mM, după 30 de minute de incubare, atestă faptul că aceştia au fost internalizaţi cu succes de către celulele HeLa şi se regăsesc atât în citoplasmă cât şi în nucleul celulelor. Pentru a exclude apariţia unei posibile interferenţe dată de auto-fluorescenţa celulelor HeLa, a fost utilizat un control

care reprezintă celule netratate (**figura III.24c**), iar imaginea obținută în acest caz demonstrează faptul că celulele HeLa netratate nu prezintă fluorescență.

III.5.2.8. Testele *in vitro* de evaluare a citotoxicității vectorilor non-virali prin testul MTS

A fost efectuat un studiu de viabilitate celulară, în cazul vectorii non-virali fluorescenți DA2.1 și DA2.2 au fost testați la trei concentrații diferite, utilizând testul MTS pe celule HeLa. Rezultatele obținute și reprezentate grafic în **figura III.25**, sunt exprimate sub formă de viabilitatea celulară relativă (%) care a fost calculată în funcție de viabilitatea celulară a celulelor netratate (viabilitatea celulară de 100 %).

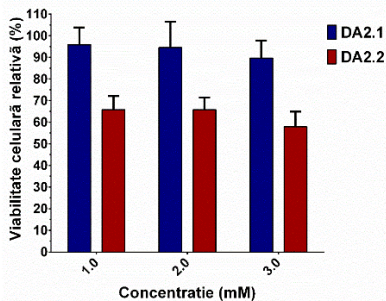


Figura III.25. Citotoxicitatea vectorilor DA2.1 și DA2.2 determinată *in vitro* prin testul MTS pe celule HeLa. Rezultatele sunt prezentate ca valori medii \pm deviația standard (S.D.); $n = 6$.

Examinând rezultatele obținute în urma acestui studiu, se poate observa faptul că vectorul DA2.1 prezintă biocompatibilitate ridicată, viabilitatea celulară la cele trei concentrații studiate având valori de aproximativ 95 %, cu diferențe nesemnificative la creșterea concentrației de la 1 mM la 3 mM. În cazul vectorului DA2.2, viabilitatea celulară este mai redusă, aceasta având valori de aproximativ 65 %. Această scădere a viabilității celulare în cazul vectorului DA2.2 este pusă pe seama prezenței moleculelor de bPEI-2kDa, fiind cunoscut faptul că induce o citotoxicitate mai ridicată decât omologul său bPEI-0.8kDa.²¹

CONCLUZII GENERALE

Rezultatelor obținute în cadrul tezei de doctorat „**Conjugate pentru transport și eliberare de gene și medicamente**” conduc la o serie de concluzii generale, înglobând fiecare capitol din partea de contribuții personale, după cum urmează:

Capitolul II.

➤ S-a realizat sinteza și caracterizarea scualenei cu grupări aldehidice, carboxilice și cu unități PEG (-PEG-NH₂). Obținerea acestora a fost demonstrată prin spectroscopia RMN de proton și carbon.

➤ În cazul derivatului cu unități PEG a fost determinată stabilitatea hidrolitică pe parcursul a 10 zile prin spectroscopia RMN, observându-se o stabilitate ridicată în soluțiile apoase.

➤ Procesul de autoasamblare al scualenei PEG-ilate sub formă de micelle a fost demonstrat atât prin simulare dinamică moleculară, cât și prin TEM. Prin TEM a fost determinată distribuția dimensională a micelilor, fiind cuprinse între 20 și 55 nm.

➤ A fost realizat un studiu prin fluorescență pentru determinarea concentrației critice micelare (8.75×10^{-2} mM) a scualenei PEG-ilate în soluții apoase, utilizând pirenul ca fluorofor.

➤ În urma studiului de citotoxicitate au fost obținute cele mai bune rezultate pentru scualena PEG-ilată în intervalul de concentrații $0.003-12.957 \times 10^{-2}$ mM, când viabilitatea celulară a fost peste 95 %.

Având la bază concluziile menționate anterior, putem trage concluzia că scualena PEG-ilată poate fi utilizată în obținerea vectorilor non-virali la concentrații cuprinse între $8.75 \times 10^{-2} - 13 \times 10^{-2}$ mM, când scualena PEG-ilată prezintă o bună citotoxicitate și o capacitate excelentă de a forma micelle.

➤ Au fost prezentate etapele de sinteză a derivaților pe bază de scualenă și cumarine sau benzensulfonamide, plecând de la acidul scualenic, prin legături amidice. Compușii obținuți au fost caracterizați structural prin spectroscopia RMN, spectrometria de masă și analiză elementală, confirmând obținerea acestora.

➤ A fost realizat un experiment *in vitro* utilizând tehnica în flux oprit pentru a determina capacitatea inhibitorie a derivaților pe bază de scualenă și cumarine sau

benzensulfonamide împotriva unor izoforme ale anhidrazei carbonice umane. Rezultatele obținute au demonstrat o selectivitate ridicată pentru izoforma hCA II în cazul derivatului pe bază de SQ și benzensulfonamidă, ce prezintă o singură unitate metilenică între cele două structuri de bază. Acest aspect se bazează pe rezultatele obținute în cazul constantei de inhibiție a cărei valoare indică o inhibare mai pronunțată decât cea a standardului comercial utilizat, acetazolamidă.

➤ Au fost realizate studii de modelare moleculară *in silico* asupra modului de acțiune a derivaților de scualenă și cumarine sau benzensulfonamide pe izoformele de anhidrază carbonică de interes. Acestea au evidențiat un profil de inhibare mai pronunțat a derivatului de scualenă modificată cu benzensulfonamidă ce posedă în structură numai o unitate metilenică (cel mai scurt conector).

Toate rezultatele prezentate în cadrul acestui studiu, recomandă derivații pe bază de scualenă și benzensulfonamidă ca potențiali candidați în studiile preclinice ale glaucomului sau ale afecțiunilor conexe în care hCA II este implicată.

Capitolul III.

➤ A fost realizată obținerea și caracterizarea a 3 librării de vectori non-virali.

a) Prima librărie are în componență vectori non-virali pe bază de scualenă PEG-ilată, 1,3,5-triformilbenzen, PEG diaminat de diferite mase moleculare (1.5, 2 și 3 kDa) și PEI (0.8 kDa). Autoasamblarea vectorilor non-virali componenți ai primei librării a fost demonstrată prin TEM, fiind observată prezența unor particule sferice cu dimensiuni medii descrescătoare odată cu creșterea masei moleculare a PEG-ului. Acest aspect, a fost confirmat și prin analiza DLS. De asemenea, în vederea determinării stabilității coloidale a fost evaluat potențialul Zeta al soluțiilor apoase, unde a fost observată o diminuare a potențialului Zeta odată cu creșterea lungimii lanțului de PEG, conducând astfel la o stabilitate coloidală scăzută a vectorilor în soluțiile apoase.

Abilitatea vectorilor de a complexa pCS2 a fost determinată prin electroforeza în gel de agaroză, iar rezultatele obținute au demonstrat faptul că această abilitate este influențată într-un mod clar de lungimea lanțului de PEG din componența vectorilor. Astfel, odată cu creșterea lungimii lanțului de PEG, această abilitate scade, ducând la formarea polipelecșilor la rapoarte N/P mai mari. De asemenea, prin tehnica AFM, a fost

pus în evidență faptul că utilizarea unui lanț mai lung de PEG, conduce la creșterea dimensiunilor polipeptidelor obținute.

În vederea atingerii scopului acestui studiu, au fost realizate studii de determinare a citotoxicității și a eficienței de transfecție *in vitro* pe linia celulară tumorală HeLa. Astfel, rezultatele obținute au demonstrat o eficiență de transfecție promițătoare în cazul polipeptidelor ce conțin PEG cu masa moleculară de 1.5 kDa, în timp ce o viabilitate celulară ridicată a fost obținută pentru polipeptidii cu PEG de masă moleculară de 2 și 3 kDa.

În urma rezultatelor obținute prin DLS, TEM, cât și valorile obținute pentru potențialul Zeta (> 10 mV) recomandă soluțiile de vectori pentru aplicații biomedicale. Mai mult, în urma complexării acestora cu pCS2 au fost obținute rezultate promițătoare cu privire la livrarea materialului genetic.

b) Altă librărie de vectori non-virali, prezentată în cadrul acestui capitol, a fost constituită pe bază de SQ-PEG-NH₂, aldehydă glutarică și bPEI cu masa moleculară de 25 kDa. Obținerea vectorilor a fost confirmată prin spectroscopia RMN. Caracterizarea morfologică a fost realizată prin TEM, unde a fost observată autoasamblarea vectorilor sub formă de particule sferice a căror distribuție a dimensiunilor prezintă o valoare medie de 680 nm. Complexarea pCS2 de către vectorii menționați anterior are loc la rapoarte N/P de 5, această valoare nu este influențată de raportul molar SQ-PEG-NH₂/bPEI utilizat în componența vectorilor. Testele biologice *in vitro* pe linia celulară HeLa ale polipeptidelor derivați au demonstrat o eficiență de transfecție superioară față de martorul bPEI, la rapoarte N/P de 5. La rapoarte N/P mai mari a fost evidențiată o eficiență de transfecție scăzută bazată pe citotoxicitatea ridicată a bPEI de 25 kDa la concentrații crescute. Rezultatele de citotoxicitate obținute în cazul polipeptidelor la raportul N/P de 5 au fost promițătoare, prezentând o viabilitate celulară de aproximativ 100 %.

În urma studiului efectuat putem trage concluzia că vectorii pe bază de scualenă PEG-ilată, aldehydă glutarică și PEG cu masa moleculară de 25 kDa pot fi utilizați cu succes în livrarea materialului genetic la rapoarte N/P de 5.

c) A fost realizat un studiu de țintire celulară specifică pe linia celulară MCF7 (cancer de sân), utilizând vectorul NV10, componentă a librăriei de la punctul (a), funcționalizat cu peptida DP18 (capabilă să identifice suprafața celulelor MCF7). În acest context, a fost evaluată capacitatea de complexare a pCS2 de către conjugatul NV10-DP18, observându-se o împachetare completă a plasmidului la un raport N/P >10. De asemenea, în urma testelor de eficiență în transfecție pe liniile celulare HeLa și MCF7 s-a obținut specificitate pentru linia celulară MCF7.

Aceste rezultate recomandă utilizarea peptidei DP18 în obținerea vectorilor non-virali cu un grad mare de specificitate pentru linia celulară MCF7.

d) Cea de-a treia librărie conține vectori non-virali fluorescenți pe bază de SQ-PEG-NH₂, derivați de *p*-fenol diformilați și bPEI cu mase moleculare diferite (0.8 sau 2 kDa). Obținerea acestora a avut la bază sinteza derivaților de *p*-fenol, prin grefarea grupărilor aldehidice pe nucleul fenilic, care au fost capabile să reacționeze cu grupările aminice primare din structura conjugatului SQ-PEG-NH₂ și a celor din de bPEI, rezultând grupări iminice. Caracterizarea structurală a derivaților obținuți a fost realizată prin spectroscopia RMN și FTIR. Studiile efectuate prin tehnica SEM au demonstrat autoasamblarea vectorilor sub forma unor particule sferice de tip „nucleu-înveliș”, cu distribuție dimensională uniformă și cu valori medii de aproximativ 38 nm. În urma măsurătorilor DLS au fost obținute diametre hidrodinamice cuprinse între 45-60 nm, în cazul vectorilor ce conțin bPEI-0.8kDa și 25-45 nm în cazul vectorilor ce au în compoziție bPEI-2kDa. Aceste rezultate au la bază interacțiunea intramoleculară dintre lanțurile de PEI și PEG, conducând la o împachetare mai strânsă a ghemului macromolecular. Studiile de fluorescență au avut la bază înregistrarea spectrelor de absorbție a vectorilor în soluții apoase, punând în evidență un maxim de absorbție la aproximativ 355 nm. Utilizând această informație, spectrele de fluorescență au fost înregistrate în urma excitării soluțiilor cu o lungime de undă de 355 nm, obținându-se maxime de emisie de intensitate mărită față de compușii individuali, constituenți ai vectorilor non-virali (derivații diformilați de *p*-fenol).

În urma studiilor *in vitro* privind evaluarea capacității de complexare a pCS2 de către vectorii fluorescenți a fost observată o diminuare a acesteia odată cu scăderea masei

moleculare de bPEI din structura vectorului non-viral. Citotoxicitatea și eficiența de transfecție *in vitro* a poliplecșilor a fost evaluată pe linia celulară HeLa, iar rezultatele au evidențiat o eficiență de transfecție asemănătoare cu cea a matorului utilizat (bPEI) în cazul poliplecșilor ce au în componență derivatul de *p*-metil-2,6-diformilfenol. Mai mult, în cazul viabilității celulare, toți poliplecșii investigați au prezentat valori asemănătoare cu cele obținute în cazul matorilor (bPEI).

Vectorii fluorescenți cu cele mai promițătoare proprietăți biologice au fost testați *in vitro* prin imagistică de fluorescență în vederea evidențierii internalizării în celulele HeLa. În urma acestor studii au fost obținute rezultate promițătoare cu privire la internalizarea vectorilor fluorescenți atât în citoplasmă, cât și în nucleul celular.

Rezultatele obținute în cadrul acestui subcapitol, recomandă utilizarea vectorilor pe bază de SQ-PEG-NH₂, derivați de p-metil-2,6-diformilfenol și bPEI cu mase moleculare diferite (0.8 sau 2 kDa) în livrarea de material genetic, cât și în imagistica celulară.

DISEMINAREA REZULTATELOR

Lucrări publicate în jurnale științifice cotate ISI a căror rezultate au făcut subiectul tezei de doctorat:

1. Synthesis, computational studies and assessment of *in vitro* activity of squalene derivatives as carbonic anhydrase inhibitors; Clima, L.; **Craciun, B.F.**; Angeli, A.; Petreni, A.; Bonardi, A.; Nocentini, A.; Carta, F.; Gratteri, P.; Pinteala, M. and Supuran, C.T.; *ChemMedChem*, (2020) *lucrare acceptată* (IF: 3.124);

2. Tunable composition of dynamic non-viral vectors over the DNA polyplex formation and nucleic acid transfection; Clima, L.; **Craciun, B.F.**; Gavril, G. and Pinteala, M.; *Polymers*, (2019) 11, 1313 (IF: 3.426);

3. Synergistic effect of low molecular weight polyethylenimine and polyethylene glycol components in dynamic nonviral vector structure, toxicity, and transfection efficiency; **Craciun, B.F.**; Gavril, G.; Peptanariu, D.; Ursu, L.E.; Clima, L. and Pinteala M.; *Molecules*, (2019) 24, 1460 (IF: 3.267);

4. PEGylated squalene: a biocompatible polymer as precursor for drug delivery; **Crăciun, B.F.**; Vasiliu, T.; Marangoci, N.; Pinteală, M. and Clima, L.; *Rev. Roum. Chim.*, (2018) 63, 621-628 (IF: 0.381).

Capitole în cărți

Polymeric carriers for transporting nucleic acids - Contributions to the field; Clima, L.; Dascalu, A.I.; **Craciun, B.**; Pinteala, M.; În cartea *New Trends in Macromolecular and Supramolecular Chemistry for Biological Applications*; Editată de Abadie, M.; Pinteala, M. and Rotaru, A.; *Springer*, (2020), *trimisă spre publicare*.

Lucrări publicate în reviste științifice cotate ISI care sunt conexe cu subiectul tezei de doctorat (rezultate care nu sunt incluse în teza de doctorat):

1. Combined *in silico* and experimental study of PEI-PEG-dsDNA polyplex formation. The importance of PEG size to vector-nucleic acid binding and biocompatibility; Vasiliu, T.; **Craciun, B.F.**; Neamtu, A.; Clima, L.; Isac, D.L.; Maier, S.S.; Pinteala, M.; Mocchi, F. and Laaksonen A.; *Biomaterials*, (2020), *lucrare trimisă spre publicare* (IF: 10.317);

2. Insights of the antimicrobial activity of piperine extracted from piper nigrum L; Moraru, A.C.; Roșca, I.; **Crăciun, B.**; Nicolescu, A.; Chiriac, A.E. and VOICU, V.; *Farmacia*, (2019) 67, 1099 (IF: 1.607).

În perioada studiilor de doctorat, doctorandul a făcut parte din echipa de implementare a următoarelor proiecte:

➤ „Laboratory of Supramolecular Chemistry for Adaptive Delivery Systems (**SupraChem Lab**)”, Horizon 2020 WIDESPREAD 2-2014: ERA Chairs, nr: 667387.

➤ „Platforme teranostice antitumorale pe bază de carbon dots și matrici polimerice (**TERADOT**)”, PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0083 contract nr. 37/PCCDI/2018.

➤ „Platforme dinamice constituționale pentru livrare țintită de principii active (**DynaCoPlat**)”, PN-III-P1-1.1-TE-2016-1180.

➤ „Micro-propulsoare hibride pentru sateliți (**SATY**)”, STAR CDI Nr. 169/20.07.2017.

➤ „Mimarea mecanismelor viului prin abordări ale chimiei supramoleculare, în cinci dimensiuni (**5D-nanoP**)”, PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0050.

➤ “Terapii inteligente pentru boli non-comunicabile, bazate pe eliberarea controlată de compuși farmacologici din celulele încapsulate după manipulare genetică sau bionanoparticule vectorizate (**INTERA**)”, PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0697, contract nr. 13/PCCDI/2018.

Mobilități pe perioada studiilor de doctorat

1. Stagiu de practică - schimb de experiență la Universitatea din Florența, Italia, Departamentul de Științe Farmaceutice și Nutriceutice, sub îndrumarea d-lui prof. Claudiu T. Supuran, pentru două luni în perioada 10 iulie – 10 septembrie 2019.

Participări la manifestări științifice internaționale / naționale:

Comunicări orale

1. Dynamic constitutional systems used for drugs and genes delivery, **Crăciun, B.F.**; Clima, L.; Pricope, G.; Peptanariu, D. and Pinteala, M.; *Prima conferință Balcanică pe Micologie Medicală și Micotoxicologie, Balkan Fungus 2018*, 13-15 septembrie **2018**, Timișoara, România.

2. Squalene based dynamic supramolecular systems for gene therapy; **Crăciun, B.F.**; Clima, L.; Pricope, G. and Pinteală, M.; *Conferința Școlii Doctorale TUIAȘI 2018*, 23-24 mai **2018**, Iași, România.

3. Non-viral vectors based on PEGylated Squalene; **Craciun, B.F.**; Pinteala, M. and Clima, L.; *al IV-lea Colocviu Franco-Român pe Chimie Medicală*, 5-7 octombrie **2017**, Iași, România.

4. Self-assembled polymeric vectors for gene delivery; **Craciun, B.F.** and Clima, L.; *al XIX-lea Simpozion Cristofor I. Simionescu – Frontiere în Știința Macromoleculară și Supramoleculară*, 13-14 iunie **2017**, Iași, România.

Postere

1. Squalene based polymeric nanocarriers for genes delivery: *in vitro* studies; **Craciun, B.F.**; Clima, L.; Gavril, G.; Peptanariu, D. and Pinteala, M.; Conferința

internațională "Achievements and perspectives of modern chemistry", 09-11 Octombrie **2019**, Chișinău, Republica Moldova.

2. Lipid based non-viral dynamic vectors: Influence of polyethylene glycol ratio from its composition on transfection efficiency; **Crăciun, B.F.**; Clima, L.; Gavril, G.; Peptanariu, D. and Pinteala, M.; *a XXXV-a Conferință Națională de Chimie*, 2-5 octombrie **2018**, Calimănești – Căciulata, Vâlcea, România.

3. Dynamic Constitutional Frameworks, based on Squalene, PEG and PEI components as DNA packing drug delivery nanocarriers; **Crăciun, B.F.**; Clima, L.; Pinteala, M. and Barboiu, M.; *a XXXIV-a Conferință Națională de Chimie*, 4-7 Octombrie **2016**, Călimănești - Căciulata, Vâlcea, România.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- (1) Avery, O. T.; Macleod, C. M.; McCarty, M. *J Exp Med* **1944**, *79*, 137.
- (2) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature* **1953**, *171*, 737.
- (3) Nam, H. Y.; Park, J. H.; Kim, K.; Kwon, I. C.; Jeong, S. Y. *Archives of Pharmacal Research* **2009**, *32*, 639.
- (4) Sandhu, J. S.; Keating, A.; Hozumi, N. *Critical Reviews in Biotechnology* **1997**, *17*, 307.
- (5) Wolff, J. A.; Lederberg, J. *Hum Gene Ther* **1994**, *5*, 469.
- (6) Ferreira, G. N. M.; Monteiro, G. A.; Prazeres, D. M. F.; Cabral, J. M. S. *Trends in Biotechnology* **2000**, *18*, 380.
- (7) Gardlík, R.; Pálffy, R.; Hodosy, J.; Lukács, J.; Turna, J.; Celec, P. *Medical Science Monitor* **2005**, *11*, RA110.
- (8) Clima, L.; Peptanariu, D.; Pinteala, M.; Salic, A.; Barboiu, M. *Chem Commun* **2015**, *51*, 17529.
- (9) Desmaele, D.; Gref, R.; Couvreur, P. *J Control Release* **2012**, *161*, 609.
- (10) Craciun, B. F.; Vasiliu, T.; Marangoci, N.; Pinteala, M.; Clima, L. *Revue Roumaine de Chimie* **2018**, *63*, 621.
- (11) Barltrop, J. A.; Owen, T. C.; Cory, A. H.; Cory, J. G. *Bioorg Med Chem Lett* **1991**, *1*, 611.
- (12) Bua, S.; Di Cesare Mannelli, L.; Vullo, D.; Ghelardini, C.; Bartolucci, G.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T.; Carta, F. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60*, 1159.
- (13) Khalifah, R. G. *Journal of Biological Chemistry* **1971**, *246*, 2561.
- (14) Clima, L.; Craciun, B. F.; Angeli, A.; Petreni, A.; Bonardi, A.; Nocentini, A.; Carta, F.; Gratteri, P.; Pinteala, M.; Supuran, C. T. *ChemMedChem* **2020**, *Accepted Manuscript*.
- (15) Ginn, S. L.; Amaya, A. K.; Alexander, I. E.; Edelstein, M.; Abedi, M. R. *The Journal of Gene Medicine* **2018**, *20*, e3015.
- (16) Hanna, E.; Rémuzat, C.; Auquier, P.; Toumi, M. *Journal of Market Access & Health Policy* **2017**, *5*, 1265293.
- (17) Dunbar, C. E.; High, K. A.; Joung, J. K.; Kohn, D. B.; Ozawa, K.; Sadelain, M. *Science* **2018**, *359*, eaan4672.
- (18) Thapa, B.; Narain, R. In *Polymers and Nanomaterials for Gene Therapy*; Narain, R., Ed.; Woodhead Publishing: 2016, p 1.
- (19) Muramatsu, S.-i. In *CANCER SCIENCE*; WILEY 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: 2018; Vol. 109, p 1200.
- (20) Papadopoulos, K. I.; Wattanaarsakit, P.; Prasongchean, W.; Narain, R. In *Polymers and Nanomaterials for Gene Therapy*; Narain, R., Ed.; Woodhead Publishing: 2016, p 231.
- (21) Neu, M.; Fischer, D.; Kissel, T. *The Journal of Gene Medicine* **2005**, *7*, 992.
- (22) Wu, P.; Chen, H.; Jin, R.; Weng, T.; Ho, J. K.; You, C.; Zhang, L.; Wang, X.; Han, C. *Journal of Translational Medicine* **2018**, *16*, 29.
- (23) Ailincăi, D.; Tartau Mititelu, L.; Marin, L. *Drug Delivery* **2018**, *25*, 1080.
- (24) Zakeri, A.; Kouhbanani, M. A. J.; Beheshtkhoo, N.; Beigi, V.; Mousavi, S. M.; Hashemi, S. A. R.; Karimi Zade, A.; Amani, A. M.; Savardashtaki, A.; Mirzaei, E.; Jahandideh, S.; Movahedpour, A. *Nano Reviews & Experiments* **2018**, *9*, 1488497.
- (25) Clima, L.; Peptanariu, D.; Pinteala, M.; Salic, A.; Barboiu, M. *Chem Commun (Camb)* **2015**, *51*, 17529.
- (26) Bekkara-Aounallah, F.; Gref, R.; Othman, M.; Reddy, L. H.; Pili, B.; Allain, V.; Bourgaux, C.; Hillaireau, H.; Lepêtre-Mouelhi, S.; Desmaële, D.; Nicolas, J.; Chafi, N.; Couvreur, P. *Advanced Functional Materials* **2008**, *18*, 3715.
- (27) Desmaële, D.; Gref, R.; Couvreur, P. *J Control Release* **2012**, *161*, 609.

- (28) Lepeltier, E.; Bourgaux, C.; Rosilio, V.; Poupaert, J. H.; Meneau, F.; Zouhiri, F.; Lepêtre-Mouelhi, S.; Desmaële, D.; Couvreur, P. *Langmuir* **2013**, *29*, 14795.
- (29) Clima, L.; Craciun, B. F.; Gavril, G.; Pinteala, M. *Polymers* **2019**, *11*, 1313.
- (30) David, G.; Clima, L.; Calin, M.; Constantinescu, C. A.; Balan-Porcarasu, M.; Uritu, C. M.; Simionescu, B. C. *Polym Chem* **2018**, *9*, 1072.
- (31) Tripathi, S. K.; Gupta, K. C.; Kumar, P. *Molecular BioSystems* **2013**, *9*, 2322.
- (32) Gaur, U.; Sahoo, S. K.; De, T. K.; Ghosh, P. C.; Maitra, A.; Ghosh, P. K. *Int J Pharmaceut* **2000**, *202*, 1.
- (33) Reddy, L. H.; Sharma, R. K.; Murthy, R. S. R. *Journal of Drug Targeting* **2004**, *12*, 443.
- (34) Petros, R. A.; DeSimone, J. M. *Nature Reviews Drug Discovery* **2010**, *9*, 615.
- (35) Li, X.; Xie, Z.; Xie, C.; Lu, W.; Gao, C.; Ren, H.; Ying, M.; Wei, X.; Gao, J.; Su, B.; Ren, Y.; Liu, M. *Bioconjugate Chemistry* **2015**, *26*, 1494.
- (36) Xia, T.; Li, N.; Fang, X. *Annual Review of Physical Chemistry* **2013**, *64*, 459.
- (37) Stennett, E. M. S.; Ciuba, M. A.; Levitus, M. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43*, 1057.
- (38) Lichtman, J. W.; Conchello, J.-A. *Nature Methods* **2005**, *2*, 910.
- (39) Stephens, D. J.; Allan, V. J. *Science* **2003**, *300*, 82.
- (40) Craciun, B. F.; Gavril, G.; Peptanariu, D.; Ursu, L. E.; Clima, L.; Pinteala, M. *Molecules* **2019**, *24*, 1460.
- (41) Pricope, G.; Pinteala, M.; Clima, L. *Rev Roum Chim* **2018**, *63*, 7.
- (42) Banerjee, S.; Both, A. K.; Sarkar, M. *ACS Omega* **2018**, *3*, 15709.
- (43) Satpathi, S.; Gavvala, K.; Hazra, P. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2015**, *17*, 20725.
- (44) Sung, S.-J.; Min, S. H.; Cho, K. Y.; Lee, S.; Min, Y.-J.; Yeom, Y. I.; Park, J.-K. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2003**, *26*, 492.