

RAPORT ȘTIINȚIFIC

Proiect PN-II-ID-PCCE-2011-2-0028 (contract: 4/30.05.2012)

Faza 2016

SISTEME DE INSPIRAȚIE BIOLOGICĂ PENTRU ENTITĂȚI PROIECTATE STRUCTURAL ȘI FUNCIONAL

PLAN DE REALIZARE A PROIECTULUI - Etapa 2016

An	Etapa	Obiective	Activități	Rezultate livrate pe etapă
2016	Unică	1. Realizarea de matrice macromoleculare biomimetice, active în transfecție	1.1. Obținerea și caracterizarea unor compozite biomimetice injectabile.	3 lucrări ISI 2 participări la manifestări științifice 1 cerere brevet OSIM –București
		2. Evaluarea abilității de transfecție a sistemelor dezvoltate în cadrul proiectului	2.1. Determinarea capacității de complexare a acizilor nucleici cu vectorii non-virali.	
			2.2. Testarea sistemelor de transfecție asupra culturilor celulare.	
		3. Evaluarea potențialului de transfecție al matricelor macromoleculare și al vectorilor asociați.	3.1. Valorificarea abilității de transfecție a matricelor macromoleculare.	
4 Elaborarea unor protocoale de testare electrochimică a sistemelor la nanoscară utile în transfecție	4.1. Cuantificarea electrochimică a nanoentităților cu capacitate de transfecție.			

Preambul

Terapia genetica este una dintre cele mai noi si mai promitatoare metode de tratament pentru afectiuni genetice si alte afectiuni dobandite (infectii virale, artrita reumatica autoimuna, cancer, diabet sau boli vasculare si coronariene). Metoda utilizeaza acizi nucleici naturali sau sintetici ce au rolul de a inlocui/inhiba genele defecte din celule.¹ Transferul direct al materialului genetic in celule sau tesuturi necesita utilizarea a doua categorii de vectori: virali si non-virali. Alegerea unei strategii viabile de transmitere a materialului genetic este foarte importanta. Vectorii non-virali – ce pot fi organici (proteine, lipide, polimeri cationici), anorganici (particule magnetice, “quantum dots”, nanotuburi de carbon, nanoparticule de aur) sau hibride – sunt considerati in ultimii ani o alternativa atractiva, deoarece sunt mai stabili si mai siguri, mai usor de sintetizat si de modificat, si pot fi produsi intr-o varietate de dimensiuni si morfologii pentru a penetra eficient barierele biologice, comparativ cu vectorii virali. Totusi, vectorii non-virali prezinta o capacitate de transfectie mai scazuta fata de vectorii virali, necesitand adesea o optimizare mai atenta. Astfel, obtinerea unor vectori de transfectie non-virali, care sa poseze o capacitate de transfectie ridicata si o citotoxicitate mica, reprezinta o provocare majora pentru transportul ADN-ului.² Printre cele mai studiate sisteme de transfectie non-virale sunt sistemele bazate pe poli(etilenimina), un polimer cationic accesibil, ce combina o abilitate mare de a complexa ADN-ul cu o activitate intrinseca endosomolitica.³ Cu toate acestea poli(etilenimina) prezinta o crestere a toxicitatii odata cu cresterea masei moleculare, chiar daca transfectia creste. Din aceasta cauza este foarte important sa se obtina un echilibru intre eficienta de transfectie si citotoxicitate.

Cateva din strategiile de optimizare a sistemelor de transfectie non-virale implica folosirea căilor descrise mai jos.

- **Nanotehnologii** care permit dezvoltarea unor purtatori bioactivi multifunctionali de dimensiuni mici (suficient de mici pentru a le imbunatati stabilitatea si pentru a facilita internalizarea in celule si penetrarea nucleului, trecand prin citoplasma cu evitarea proceselor endosomiale/lisomiale dupa endocitoza).
- **Biomateriale de origine naturala**, avand in vedere proprietatile lor unice, cum ar fi biodegradabilitatea, biocompatibilitatea si eliberarea controlata, accentuand scaderea toxicitatii la aplicatii ce utilizeaza doze mari.
- **Integrarea vectorilor de transfectie intr-o matrice realizata din biomateriale, cu rol de scaffold.**

In ultimul caz, eliberarea materialului genetic intr-un mod controlat si eficient din materiale biodegradabile a dus la stimularea proceselor celulare, permitand regenerarea tisulara.^{4,5} Eliberarea materialului genetic mediata de o matrice poate reprezenta o unealta fundamentala pentru a promova o expresie transgenica localizata si sustinuta, ce poate fi folosita pentru a directiona procesele celulare pentru un numar mare de aplicatii din ingineria tisulara. In comparatie cu ceilalti factori biologici, care au o durata de viata scurta, ADN-ul isi pastreaza integritatea

structurata si functionala in multi solventi, ceea ce permite eliminarea folosirii unor factori de crestere suplimentari, ce sunt adesea scumpi si inefficienti. Aceasta strategie permite eliminarea barierelor extracelulare, reducand o serie de pasi din sinteza (necesari obtinerii multifunctionalitatii impuse de conditiile trecerii de aceste bariere).

Combinarea matricilor tridimensionale pe baza de polimeri naturali cu un sistem de transfectie non-viral (incluere de ADN condensat in matrice) s-a dovedit a fi o metoda buna pentru a obtine o eficienta si siguranta crescuta in terapia genica.⁶⁻¹⁰

Principalele argumente in acest sens sunt:

1. Eliberarea localizata, sustinuta de plasmid (pADN) poate fi modulata prin modificarea proprietatilor chimice, a morfologiei si structurii matricei, prin controlul parametrilor de sinteza.
2. Matricile bazate pe componente din polimeri naturali sunt superioare din punct de vedere functional, furnizand o matrice biomimetica și domenii cu rol de semnalizare (cum ar fi gelatina, colagenul si glicozaminoglicanii), o biocompatibilitate si biodegradabilitate ridicata. Pentru a controla degradabilitatea si pentru a elimina dezavantajele acestor materiale naturale (cum ar fi proprietatile mecanice slabe) se apeleaza la combinarea biopolimerilor cu polimeri sintetici. Atunci când sunt asociate cu componente anorganice (cum sunt derivații hidroxiapatitei) se pot obține matrice biomimentice utile în transfecția celulelor specifice osului.
3. Studiile pe culturi de celule demonstreaza ca matricile din colagen ce contin ADN condensat cu LIP sau PEI sunt mai eficiente comparativ cu ADN-ul liber.
4. Aceste sisteme ofera protectie impotriva degradarii rapide de catre nucleaza (datorita atat matricei, cat si complexarii ADN-ului).
5. Eficienta transfectiei genice este crescuta datorita ariei active mari a matricei, cat si datorita migrarii celulelor in porii matricilor cu rol de scaffold.

Obiectivul 1. Realizarea de matrice macromoleculare biomimetice, active în transfecție

1.1. Obținerea și caracterizarea unor compozite biomimetice injectabile

In etapa 2016 s-au sintetizat si caracterizat hidrogeluri injectabile pe baza asamblarii G quartet(cvadrupelex) de guanozina (G4).

In prezent o atentie deosebita li se acorda hidrogelurilor biosensibile pe baza de polimeri cu proprietati exceptionale si control spatio-temporal in eliberarea principiile active. Este cunoscut faptul ca hidrogelurile pe baza de alcool polivinilic (PVA) au atras o atentie considerabila datorita gradului ridicat de umflare in apa, toxicitatii intrinseci scazute, biocompatibilitatii, precum si altor proprietati precum

transparenta și o manevrare ușoară. Reticularea PVA utilizând boraxul decurge prin complexarea a două grupuri OH ale monoboratului și două grupuri OH adiacente ale PVA. Formarea acestor complecși este un proces foarte rapid, și conduce la formarea gelurilor polimerice.¹¹

În această direcție, o abordare bazată pe asamblare supramoleculară ar putea fi un instrument puternic pentru producerea de arhitecturi ierarhice microporoase. Dintre ansamblajele supramoleculare cunoscute, formarea G-quadruplețelor (G4) poate decurge în mediu apos. Analogii de guanozină (G) sunt cunoscuți pentru capacitatea lor de a genera hidrogeluri prin formarea de G-quadrupleți în prezența cationilor K^+ , Na^+ sau Ba^{2+} .¹²⁻¹⁵ Mecanismul global este reprezentat de asamblarea direcționată a legăturilor de hidrogen formate între unitățile de G-cvartet, stabilizate de prezența ionilor menționați. Prin aplicarea mecanismului de gelificare a PVA în prezența de borax, cu formarea PVA-ester boric, ar putea conduce la dezvoltarea de hidrogeluri cu structură controlată (tuning previzibil al structurii interne a gelului, prin controlul proceselor de asamblare).

Ciclodextrinele sunt bine cunoscute pentru proprietățile lor de a forma complecși de tip gazda-oaspete, prin înglobarea în cavitatea lor a moleculelor oaspete. Abilitatea ciclodextrinelor de a forma complecși de incluziune a fost explorată în diverse domenii cum ar fi: chimia supramoleculară,¹⁶⁻¹⁸ farmaceutică,¹⁹ științele biomedicale.^{20,21} Prezența ciclodextrinelor în compoziția hidrogelurilor poate îmbunătăți proprietățile acestora, prin modificarea proprietăților reologice în sensul dorit și/sau prin conferirea capacității de eliberare controlată.

În cadrul proiectului am stabilit un procedeu simplu de preparare al hidrogelurilor bazat pe formarea arhitecturii G4, utilizând guanozina (G) grefată pe complexul preformat alcool polivinilic-acid boric, în prezența de Li^+OH^- (PVAB) (Figura 1). Adăugarea β -ciclodextrinei (β CD) în diverse rapoarte molare G/ β CD, conduce la schimbarea proprietăților hidrogelului format, acționând ca adjuvant în generarea complecșilor de incluziune β CD-guanozina (Figura 1).

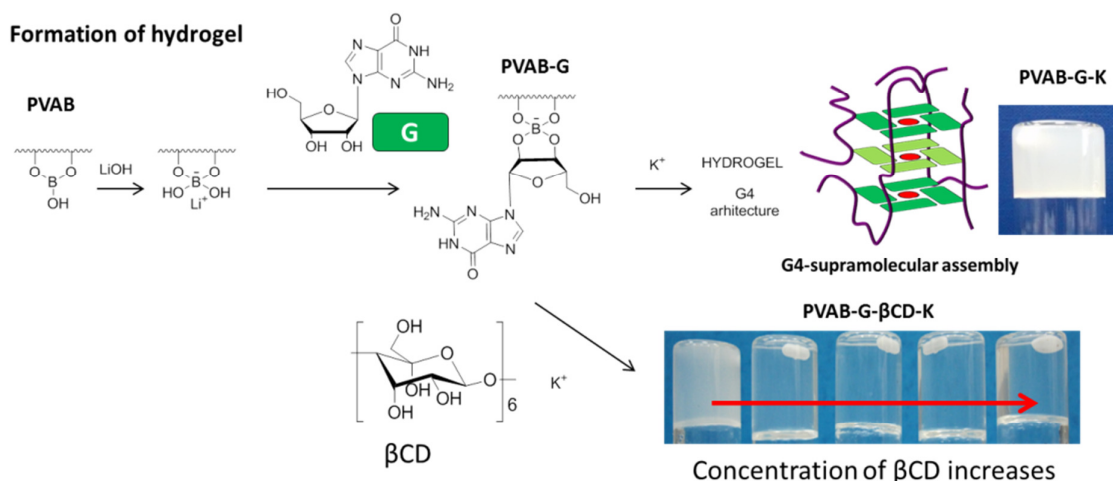


Figura 1. Reprezentarea schematică a formării hidrogelurilor PVA-guanozina.

Spectroscopia ^{11}B RMN (Figura 2, stanga) a fost utilizata pentru a caracteriza formarea borat-esterilor intre PVAB si guanosina (PVAB-G), iar prin ^1H RMN (Figura 2, dreapta) s-a demonstrat formarea complexelor de incluziune guanosina- βCD .

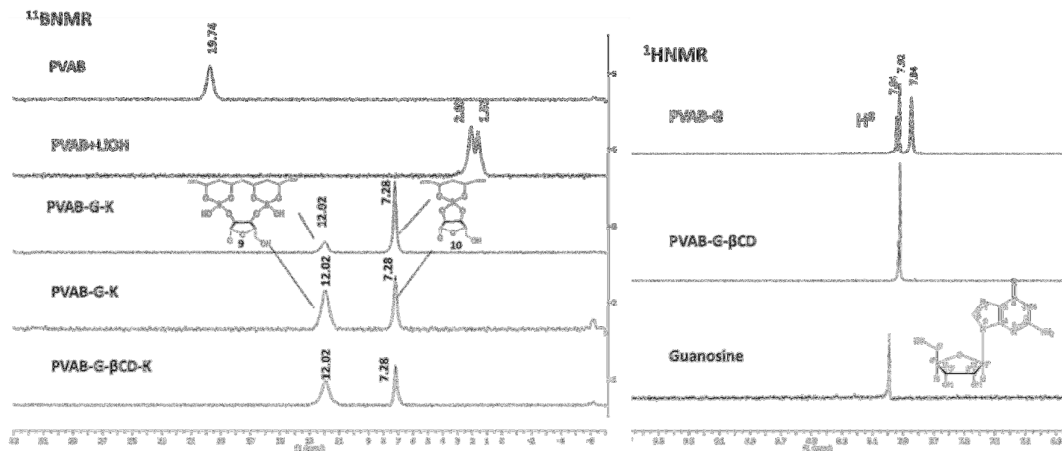


Figura 2. Spectrele ^{11}B RMN si ^1H RMN in D_2O pentru compusii obtinuti.

Este de mentionat faptul ca PVAB-G formeaza arhitecturi supramoleculare ierarhice ordonate, dirijate de prezenta cationilor K^+ , Na^+ sau Ba^{2+} . Pentru a identifica structurile G4 si pentru a distinge structurile paralele din amestecul cu structuri antiparalele s-a utilizat dicroismul circular. Cu ajutorul curbelor obtinute se pot pune in evidenta structurile G-quadruplex paralele. Astfel, acizii nucleici in prezenta de guanosina, prezinta o banda pozitiva la ~ 260 nm si o banda negativa la ~ 240 nm, indicand prezenta unei structuri G-quadruplex paralele.^{22,23} In spectrele de dicroism circular (Figura 3a) s-a observat formarea structurilor G-quadruplex (cvartetului G) (G4) pentru PVAB-G-K si PVAB-G- βCD -K, dar nu si pentru PVAB-G (a se vedea Figura 1 si Figura 3). Prezenta benzilor pozitive in regiunea 290 nm, ar putea indica prezenta G-quadruplexilor (G-cvartetelor) in structura hidrogelului.

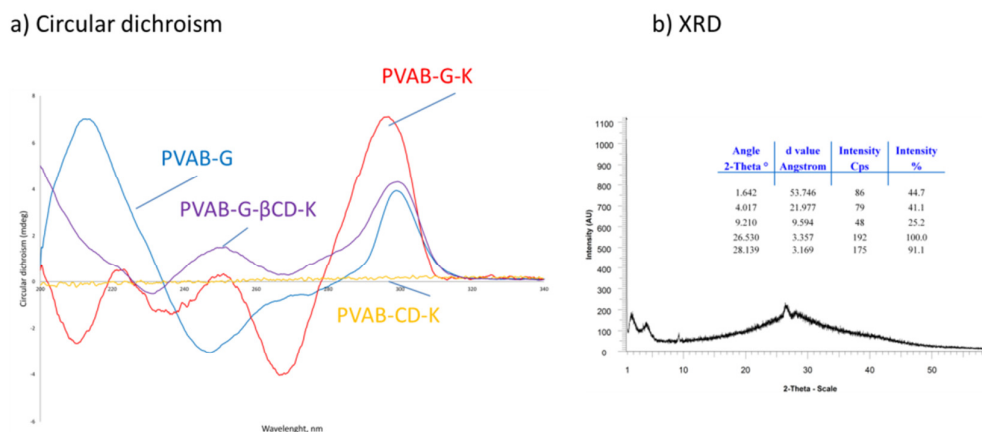


Figura 3. Spectrul de dicroism circular și de difracție a razelor X pentru PVAB-G-K.

Tehnica de difracție cu raze X (XRD) a fost folosita pentru obtinerea dovezilor suplimentare privind formarea G-cvartetului/cvadruplexului. In datele XRD (Figura 2b)

ale PVAB-G-K a fost identificat un pic la $2\theta \approx 26.5^\circ$ ($d = 3.3 \text{ \AA}$), care corespunde cu distanta de conjugare π - π intre doua plane G4-cvartete. Un semnal la $2\theta \approx 4.01^\circ$ corespunde cu o distanta de $21,97 \text{ \AA}$, caracteristica lungimii unui singur G4-cvartet (Figura 3b).

Imagistica SEM (Figura 4) indica faptul că materialele obtinute prezinta o morfologie caracteristica unui hidrogel. Prezenta ionului de K^+ in structurile PVAB-G-K si PVAB-G- β CD-K conduce la obtinerea de geluri cu o structura mai densa si mai compacta in comparatie cu structurile PVAB- Li^+ .

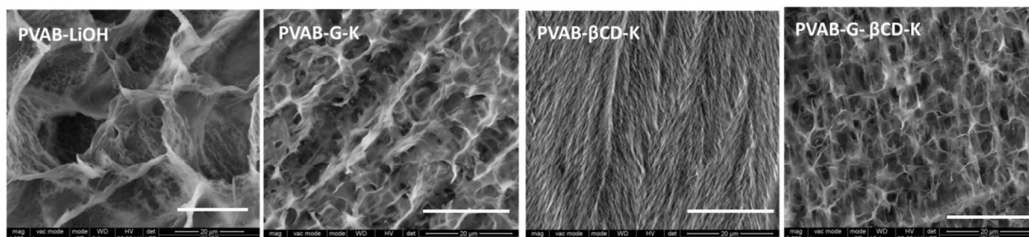


Figura 4. Imaginile SEM pentru PVAB- Li^+ , PVAB-G- K^+ , PVAB-G- β CD- K^+ (scala $20 \mu m$).

Testarea oscilatorie dinamica este o modalitate recunoscuta pentru obtinerea informatiilor despre microstructura materialelor, inclusiv asupra comportamentului lor macroscopic. Astfel, modulele G^* , G' si G'' , factorul de pierderi ($\delta = G \tan'' / G'$) și viscozitatea complexă (η^*) ofera o descriere suficient de fidela a structurii interne a probelor, in limitele domeniului vascoelastic linear.

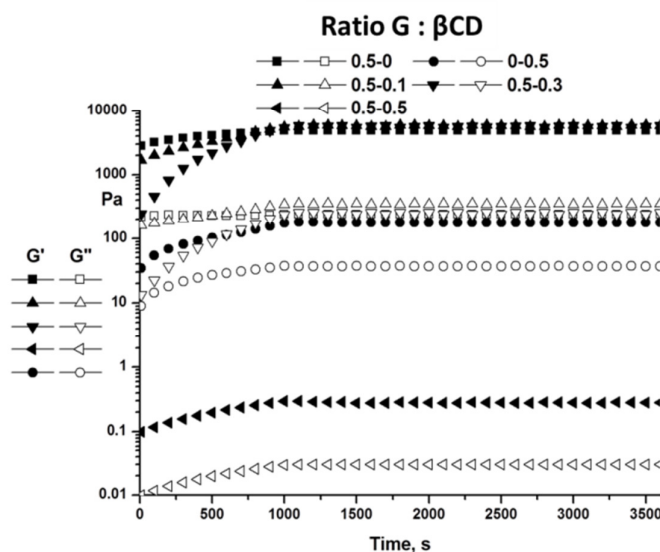


Figura 5. Variatia parametrilor G' si G'' in functie de timp pentru probele PVAB-G- β CD- K^+ , la diverse rapoarte molare G/ β CD.

Pentru toate probele supuse analizei (Figura 5) s-a observat o crestere rapida a modulului G' si atingerea rapida a platoului (in mai putin de 700 s), ceea ce indica

finalizarea gelifierii. Din analiza graficelor se mai poate observa faptul ca raportul molar G : β CD are o influenta considerabila asupra rigiditatii si stabilitatii hidrogelurilor: gelul mai „moale” este obtinut pentru PVAB-G- β CD-K la un raport molar G : β CD =0.5 : 0.5, iar cel mai rigid si mai stabil structural pentru PVAB-G-K, in lipsa β CD.

Obiectiv 1: Concluzii:

- a fost stabilit un procedeu simplu pentru prepararea hidrogelurilor pe baza de asamblare G-quadruplex (G-cvartet), prin formarea esterilor borici evidentiati prin spectroscopie ^{11}B RMN;
- s-a demonstrat structura G-quadruplex (G-cvartet) (asamblare cvadruplex) prin inregistrarea spectrelor de dicroism circular si raze-X;
- a fost stabilit modul de interactiune intre β CD si componentele hidrogelului, prin formarea complexilor de incluziune β CD:guanozina evidentiati in spectrele ^1H RMN;
- au fost studiate proprietatile reologice si morfologice ale hidrogelurilor; gelurile sintetizate sunt suficient de flexibile pentru putea fi considerate injectabile, la rapoarte molare β CD:guanozina mari.

Obiectivul 2. Evaluarea abilității de transfecție a sistemelor dezvoltate în cadrul proiectului.

2.1. Determinarea capacitatii de complexare a acizilor nucleici cu vectorii non-virali.

2.2. Testarea sistemelor de transfectie asupra culturilor celulare.

Obiectivul acestui studiu a fost formularea, caracterizarea si evaluarea transfectiei *in vitro* a unor sisteme de transfectie non-virale noi, sintetizate in cadrul proiectului.

A. Proiectarea, sinteza, caracterizarea și testarea *in vitro* a vectorului genic bazat pe squalenă și bPEI (Sq-bPEI)

Uzual, strategiile utilizate pentru a imbunatati transfectia genica non-virala, vizeaza complexarea materialului genetic cu polimeri sau lipide cationice. Liposomii cationici, lipidele cationice si emulsiile cationice sunt printre cele mai utilizate. Caracteristicile care recomanda includerea lipidelor in acesti purtatori sunt:

- auto-asamblarea in mediu apos, spre exemplu organizarea supramoleculara/autoansamblarea agregatelor lipidice;
- protectia ADN-ului fata de degradarea enzimatica in torentul sanguin;
- capacitatea de a interactiona cu membrana celulara incarcata negativ, pentru a facilita internalizarea celulara;
- citotoxicitate redusa in cazul aplicatiilor ce utilizeaza doze medii;

- abilitatea de a condensa ADN-ul in particule coloidale nanometrice, capabile sa penetreze celulele mamiferelor, *in vitro*;
- imunogenicitate redusa.

Exista si o serie de dezavantaje, cum ar fi: toxicitatea la concentratii mari, prepararea dificila si eficienta scazuta in transfectie.

In incercarea de a obtine nano-purtatori eficienti, siguri si biocompatibili pentru complexarea unor molecule terapeutice au fost realizati si complexi cu nucleolipide neutre sau anionice, ca o alternativa la lipidele cationice.

Squalena este un lipid natural rezultat din biosinteza. Recent Couvreur et al. au folosit avantajele squalenei pentru a dezvolta "squalenoylation nanotechnology",²⁴ ce foloseste squalena ca o componenta de baza in realizarea bioconjugatelor, prin conectarea cu molecule de medicament bioactive (cum ar fi gemcitabina, paclitaxel), ce poate auto-agrega in apa, asigurand o incarcatura mare de medicament fara eliberare rapida. S-a demonstrat ca auto-asamblarea lantului lipidic poate genera nanoparticule multifunctionale prin auto-co-asamblarea diferitelor componente bazate pe squalena functionalizata.²⁵ Acest concept inovativ pentru a imbunatati eficacitatea transportului componentelor terapeutice slab solubile pare sa fie promitator, solutionand o serie de probleme de compatibilizare a compusilor bioactivi.

Unii din membrii echipei prezentului proiect²⁶ au folosit cu succes derivati squalenici (proveniti din Sq-COOH, Sq-OH) pentru a realiza vectori DyNA adaptivi pentru legarea ADN-ului. Dinamerii (DyNA) sunt polimeri dinamici, asociati prin legaturi reversibile, capabili sa raspunda unor stimuli interni sau externi prin schimbarea componentelor.

In acest studiu a fost dezvoltat si caracterizat un compus amfifil bazat pe squalena si bPEI (Sq-bPEI) avand in vedere posibila aplicare in transfectie. Pentru a asigura strabaterea numeroaselor bariere ce apar in procesul de transfectie, in proiectarea conjugatului au fost introduse diferite grupuri functionale, selectate pe baza datelor din literatura (Tabel 1).

Tabel 1. Grupuri functionale avute in vedere la proiectarea conjugatului pe baza de squalena

Componenta	Scopul / Efectul scontat
Squalena	<ul style="list-style-type: none"> - Componenta ce asigura condensarea prin formarea de complexi micelari. - Poate facilita translocarea membranara. - Permite o exprimare mai buna in celulele cardiovasculare. Bioconjugarea cu lipide permite protejarea grupurilor sensibile fata de degradarea enzimatica si cuplarea cu fragmente hidrofobe poate duce la obtinerea unor cojugate amfifile capabile sa traverseze membrana plasmatica prin difuzie pasiva.
bPEI/LPEI (1.8 kDa)	<ul style="list-style-type: none"> - Interactiuni electrostatice cu ADN, eficienta de impachetare la N/P ≥ 2. - Oferă protectie sterica fata de degradarea cu nucleaze.

	<ul style="list-style-type: none"> - Abilitate de a localiza nucleul. - Toxicitatea creste odata cu cresterea masei moleculare. - Fragmente pozitive de PEI confera efectul de <i>proton sponge</i>, facilitand evitarea capturii endosomiale.
Gruparea PEO	<ul style="list-style-type: none"> - Imbunatateste stabilitatea în circulatia sistemica. - Asigura stabilitatea coloidala si protectia la transport.
Gruparea -S-S-	<ul style="list-style-type: none"> - Bioreductibila; se rupe in citoplasma prin mecanisme redox. - Sporeste eficienta de transfectie. - Toxicitate redusa, aproape inexistenta. - Poate imbunatati traficul intracelular.
Gruparea guanidil	<ul style="list-style-type: none"> - Faciliteaza penetrarea membranelor celulare si nucleare crescand astfel eficienta transfectiei.
FITC	<ul style="list-style-type: none"> - Marcare. Permite vizualizarea procesului de transfectie si cinetica de eliberare a sistemului complex.

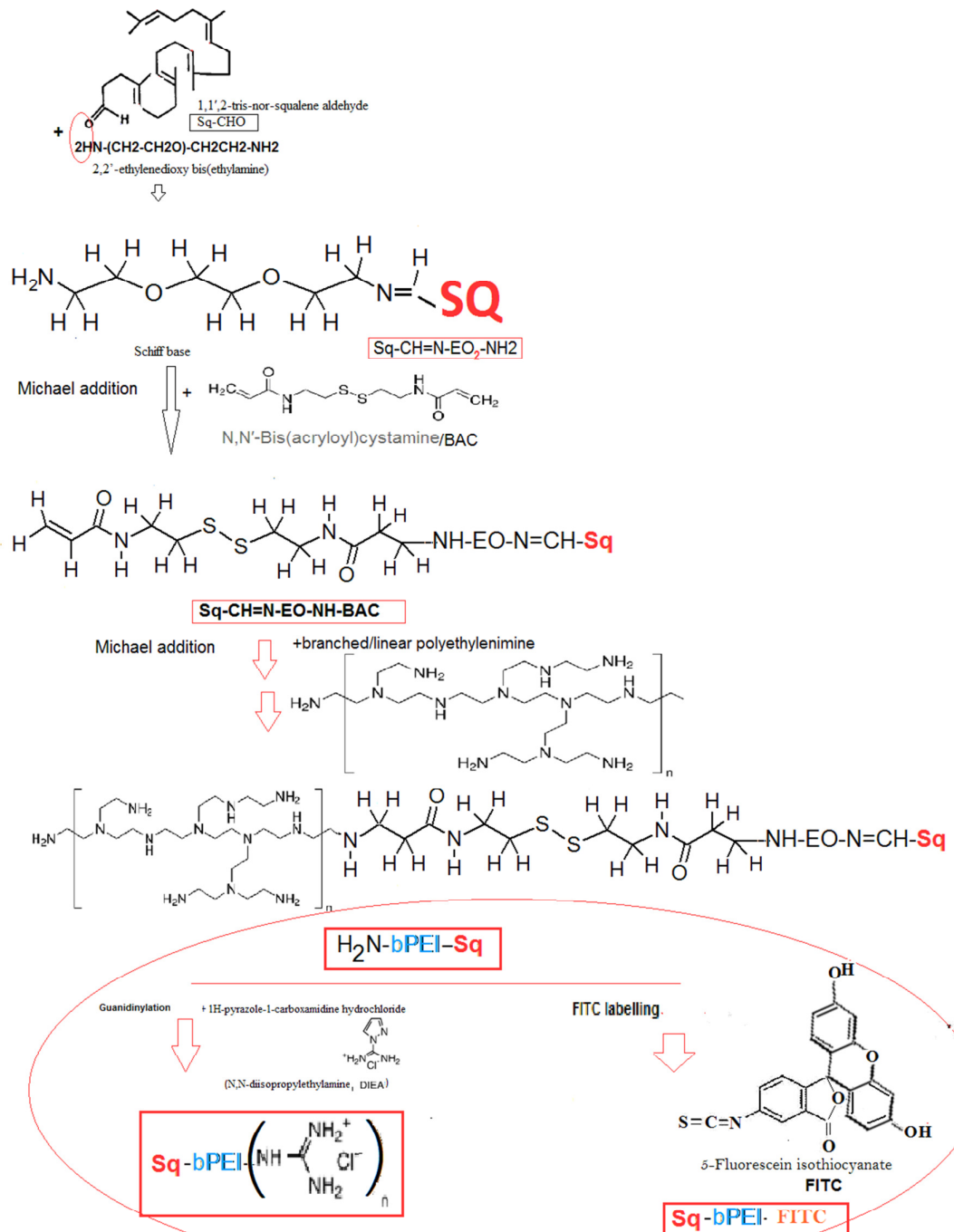
Pentru sinteza complexului au fost utilizate conditii blande (temperatura camerei, solventi uzuali si mediu de reactie apos), conform schemei 1.

Obtinerea compusilor intermediari si finali a fost confirmata prin spectroscopie $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$, FT-IR (Figurile 6-10).

Sinteza purtatorului a inceput de la 1,1,2`tris-nor-squalen aldehida, obtinuta conform literaturii,²⁷ urmata de interactiunea cu 2,2`etilendioxi bis(etilamina) pentru a obtine baza Schiff corespunzatoare. Din aceasta cauza semnalele specifice aldehidei situate la 9.75 ppm in spectrul $^1\text{H-RMN}$, la 202.7 ppm in spectrul $^{13}\text{C-RMN}$ si la 2715 cm^{-1} si 1728 cm^{-1} (νCH si C=O de la aldehida saturata) in FT-IR, dispar si sunt inlocuite cu semnale specifice gruparii iminice la 8 ppm, 167 ppm (N=C) si 1573 cm^{-1} , respectiv. Prezenta gruparii oxietilenice este de asemenea usor de observat, cele mai importante semnale fiind situate in zona 3.4-3.7 ppm, 71 ppm si 1111 cm^{-1} .

Modificarea ulterioara cu N,N`bis(acryloyl)cistamina poate fi evidentiata prin semnalele specifice datorate gruparii amidice (6.75 ppm, 74 si 164 ppm) si gruparilor vinilice (5.7-6.35 ppm, 124, 129 ppm, 3066 si 1620 cm^{-1}). Odata cu aditia bPEI, semnalele specifice gruparilor aminice, iminice si metilenice devin predominante, acoperind o parte din cealalte semnale. Guanidilarea compusului si marcarea cu FITC pot fi observate in principal in spectrele $^1\text{H-RMN}$, pe cand retentia squalenei in structura poate fi confirmata din datele FT-IR (Figurile 9, 10 si Tabelul 2).

Capacitatea Sq-bPEI de a lega ADN-ul de somon a fost evaluata comparativ fata de bPEI prin teste de electroforeza pe gel de agaroză (Figura 11). Dupa cum se poate observa din Figura 11, capacitatea compusilor de a complexa ADN-ul scade in ordinea: Sq-PEI-G>Sq-bPEI>bPEI (5b>5a>bPEI (1.8kDa)). Rapoartele N/P optime determinate sunt de 2, 6 si respectiv 7.



Schema 1. Strategia de sinteza a unui purtator bazat pe Sq-bPEI.

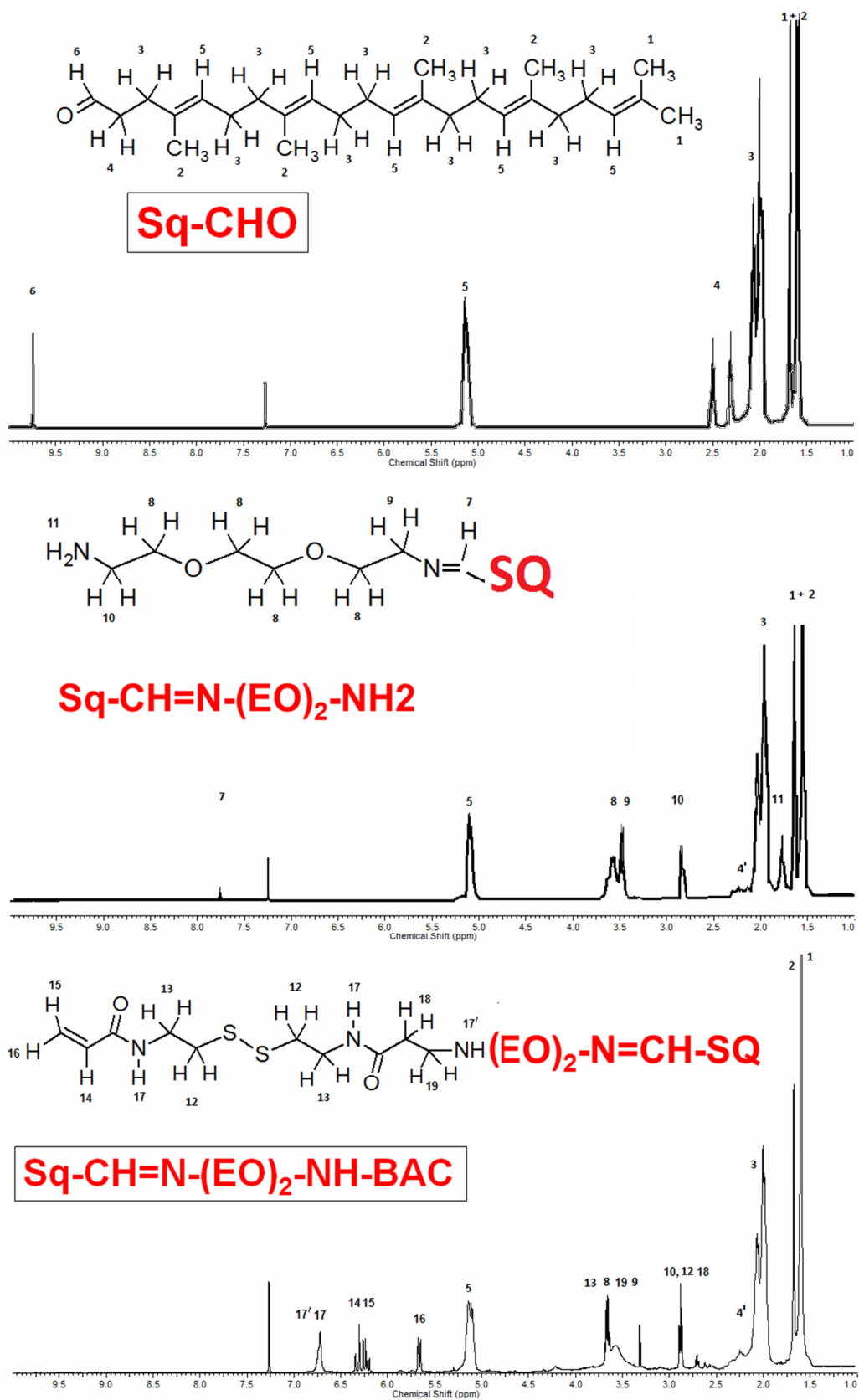


Figura 6. Spectrul ¹H-RMN pentru intermediarii Sq-bPEI (CDCl₃).

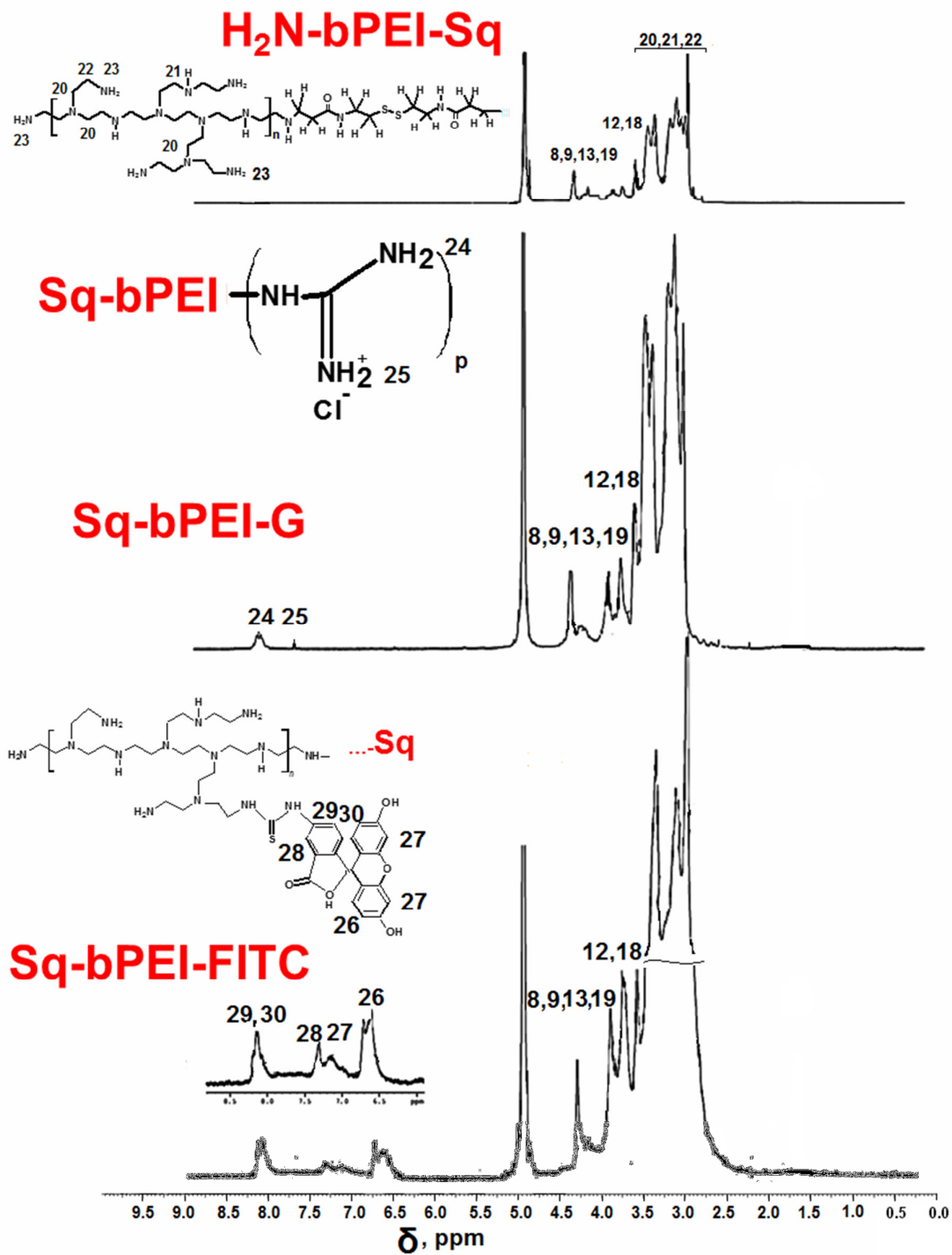


Figura 7. Spectrul ¹H-RMN pentru compusii Sq-bPEI functionalizati (D₂O).

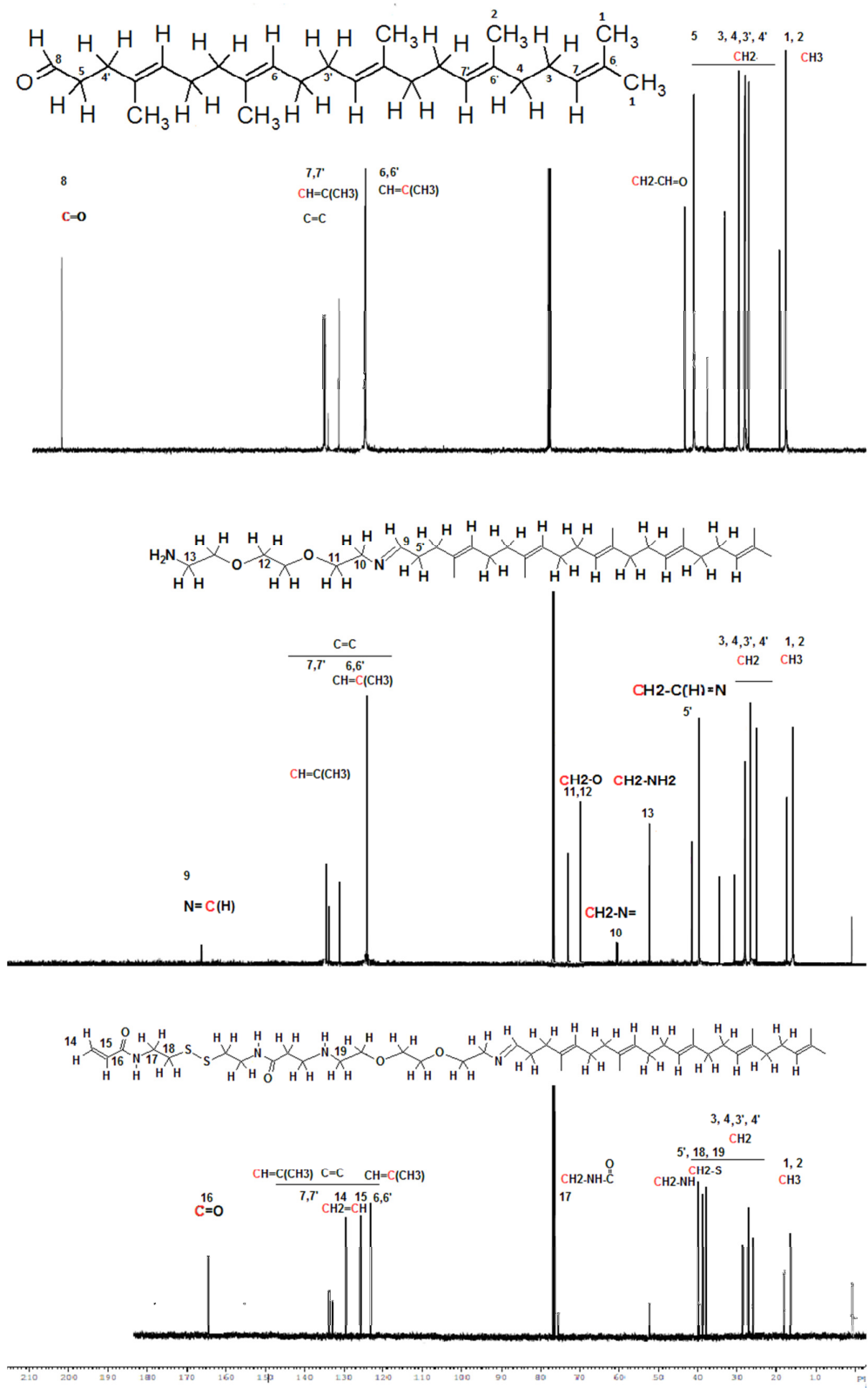


Figura 8. Spectrul ^{13}C -RMN pentru purtatorul Sq-bPEI si intermediarii sai (CDCl_3).

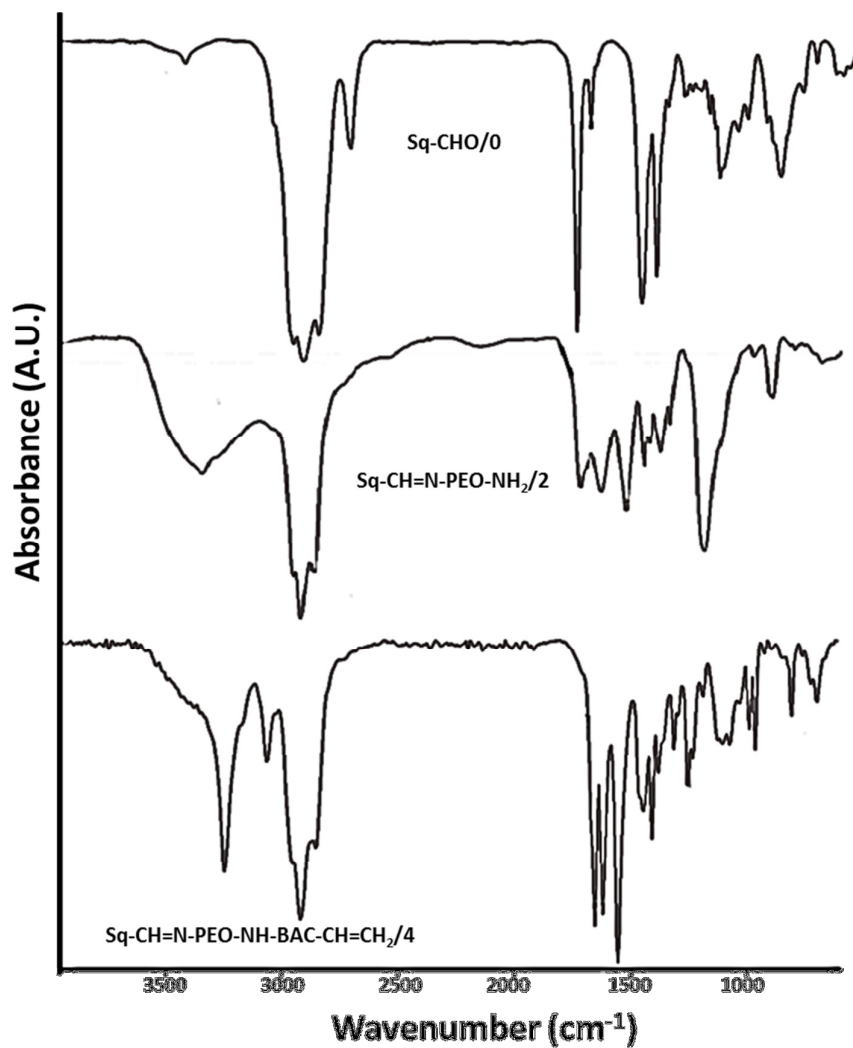


Figura 9. Spectre FT-IR tipice pentru Sq-bPEI si interediarii sai.

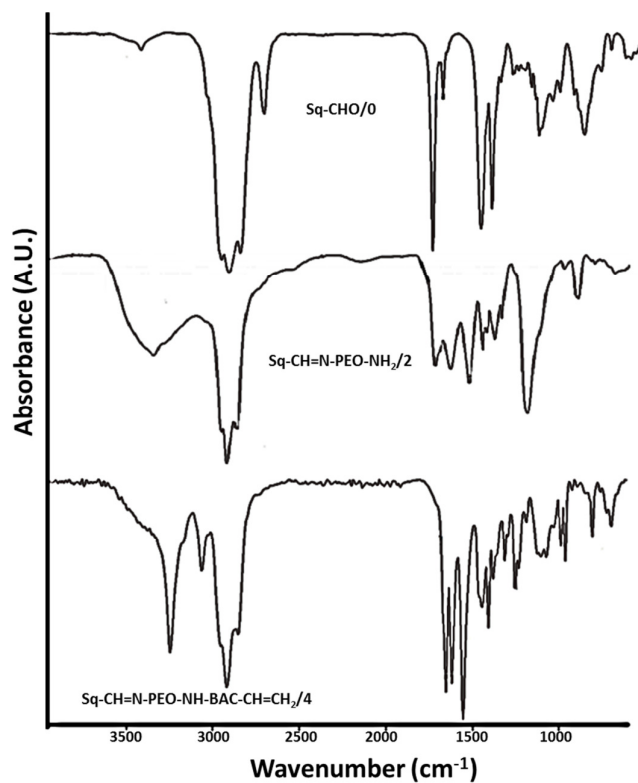


Figura 10. Spectrul FT-IR al Sq-PEI si a derivatilor ei guanidilati sau marcati cu FTIC (fluorescein izotiocianat).

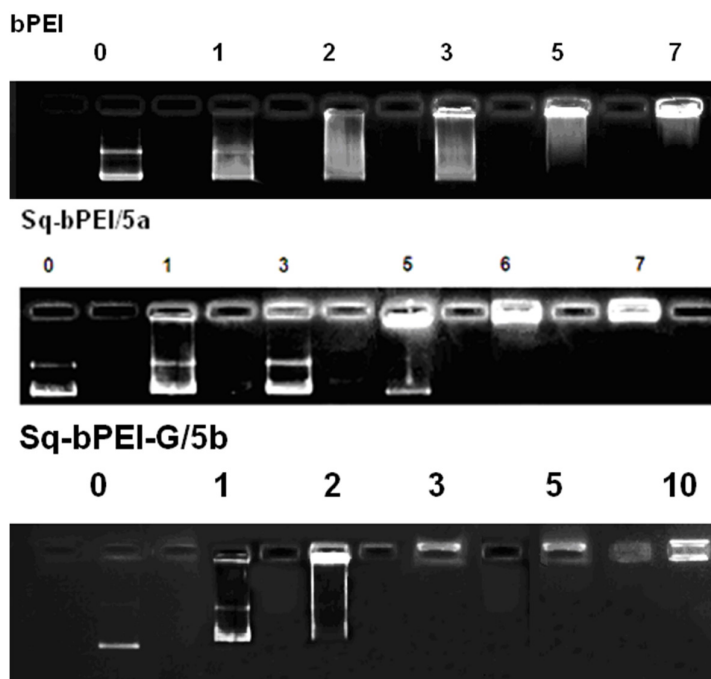
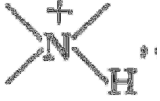


Figura 11. Imaginile obtinute in urma electroforezei pe gel de agarozza pentru purtatorii pe baza de Sq-bPEI comparativ cu bPEI.

Tabelul 2. Interpretarea detaliata a datelor FT-IR.

Cod	Banda	Atribuire
Sq-CHO/0	2964, 2920, 2854 2715 +2854 (partial) 1728 1667 1446, 1382 1106, 990 898, 838	- v(C-H) asim si sim in (=CH, CH ₃ , CH ₂) - v(C-H) aldehida (saturata) - v(C=O) aldehia (saturata) - v(C=C) - δ(C-H) - C-H alchenă disubstituita (trans) - C-H alchenă trisubstituta
Sq-PEO-NH₂/2	3200-3600/peak la 3363 2957, 2925, 2869 1667.5 1573 1471,1378 1309 1111 811	- v(N-H) in amina primara (NH ₂) si imina (NH) (libere sau implicate in puncti de hidrogen) - v(=CH, CH ₂ ,CH ₃) - v(C=C) alifatic - v(C=N) imina / baza Schiff - δ(C-H) - v(C-N) - C-H alchenă disubstituita (trans) - γ(CH)
Sq-BAC-CH=CH₂/4	3200 - 3600 cu peak 3250 3066 2958, 2923, 2855 1652 1620 1553 (mai larg) 1445,1386 1311 1252 1124 1103 1071 989 962 811 696	- v(N-H) imina / baza Schiff si amida (amida secundara, NH asociata prin legaturi de hidrogen - 3250) - v(C-H) in (=CH ₂ vinil) - v(=CH, CH ₃ , CH ₂) - vC=O amida I (saturata) + v(C=C) alifatic - v(C=C) vinil - v(C=N) imina + v(C-N) + NH (amida II) - δ(C-H) (1445 si CH ₂ -S def) - CH ₂ -S- wag - (C-N amide) amida III - v anti-sim (C-O) - v(C-O) + C-H alchenă disubstituita (trans) - v(C-S) - C-H alchenă disubstituita (trans) - δ(H-C-S) bend - γ(CH) - v(C-S)
Sq-bPEI/5a	3600-3200 cu peak la 3433.5	- v(N-H) (NH ₂ , NH amida si imina libera sau asociata prin legaturi de hidrogen)

	2958, 2920, 2852 2480 1647 (wide) 1463 1125 1082-1021 954 850-600	- v(C-H) in (=CH, CH ₃ , CH ₂) - forma protonata  - v(C=O) amida I (saturata) + v(C=C) aliphatic + (NH bend) - (CH) bending - v(C-O-C) + C-H alchenă disubstituita (trans); v(C-N-C) in amina/imina secundara - v(C-S) + v(C-N) in amine terțiare - v(C-N) -NH bend
Sq-PEI-G/5b	3600-3200 cu peak la 3367 2951, 2840 1651 1618 1459 1082 si 1211 954	- v(N-H) (NH ₂ , NH in amide and imine) - v(C-H) din (=CH, CH ₃ , CH ₂) - v(C=O) amida I (saturata) + v (C=C) alifatic + NH bend (sh) 1618/1651 cuplata cu δNH/CN pentru vibratia in plana a druparii guanidil (respectiv v _{as} (CN ₃ H ₅ ⁺) v _s (CN ₃ H ₅ ⁺)) + v(C=N) iminic (baza Schiff) - forma NH ₃ ⁺ in complex - (CH) bending - v(CN), δ(NH) + v (C-O-C) + C-H alchenă disubstituita (trans); v(C-N-C) in amina (secundara sau terțiara), v(C-S) - v(C-N)
Sq-PEI-FITC /5c	3700-3200 cu peak la 3433 3050 (sh), 2959, 2928, 2850 1650 1636 1573 1463+1390 1329, 1299 ,1211, 1108 1171	- v(N-H) (NH ₂ , NH in amide and imine) - v(C-H) din (=CH viniliden si aromatic, CH ₃ , CH ₂) - v(C=O) amida I (saturated) + v(C=C) alifatic + NH bend - v(C=C) aromatic - superpozitie v(C=C) aromatic si v(C=O) in FITC + [v(C=N) imina + v(C-N) + NH def (amida II)] + amida III in tioamida secundara - v(C=C) aromatic + v(C=O) sym + δ(C-H) - v(C-O) - (C-O) fenol (bend)

1021	- v(C-S) + v(C-N) in amina terciara
954	- (C-H) alchenă disubstituita, v(C-N)
915, 852, 812, 771	- CH aromatic (inafara planului) bend
771	- + NCS def

Raportul N/P, respectiv raportul purtator/ADN este un parametru important in realizarea complexului pentru a controla atat eficienta transfectiei cat si citotoxicitatea (Figura 12).

Eficienta transfectiei creste in general odata cu cresterea raportului N/P, insa creste de obicei si citotoxicitatea. S-a observat că un raport mai mare N/P este necesar deoarece purtatorul liber afecteaza caile de asimilare celulara si de transport intracelular.²⁸ Investigatiile asupra transfectiei pe celule HeLa cu gena eGFP in prezenta de bPEI (1.8 kDa) si de purtatorii realizati (Sq-bPEI/5a si Sq-bPEI-G/5b) au indicat un raport optim N/P de 15 pentru 5b si de 20 pentru 5a (Figurile 13, 14). Pentru un raport N/P de 15, Sq-bPEI-G are o eficienta la transfectie de 6.2 ori mai mare, iar pentru un raport N/P de 20 Sq-bPEI de 8.33 ori mai mare decat bPEI simpla. Din aceste date se poate observa ca agregatele lipidice duc la o crestere a acumularilor de bPEI local, efect ce duce la o crestere a eficientei transfectiei. Dupa cum era de asteptat inca din faza de proiectare, guanidilarea vectorului favorizeaza complexarea cu ADN-ul si tot odata marestre abilitatea complexului de a penetra membranele celulare.

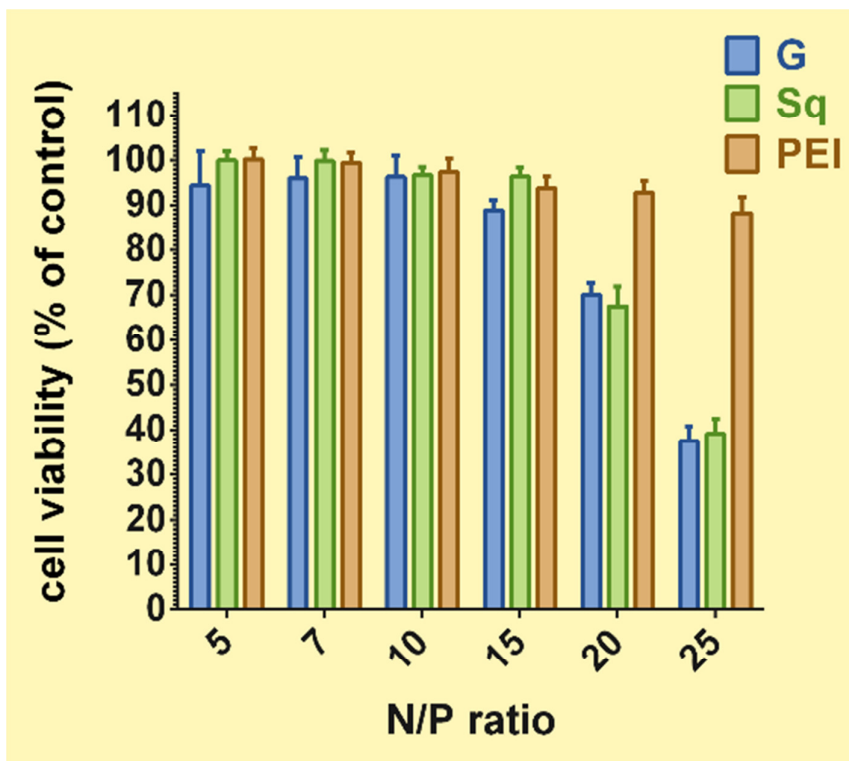
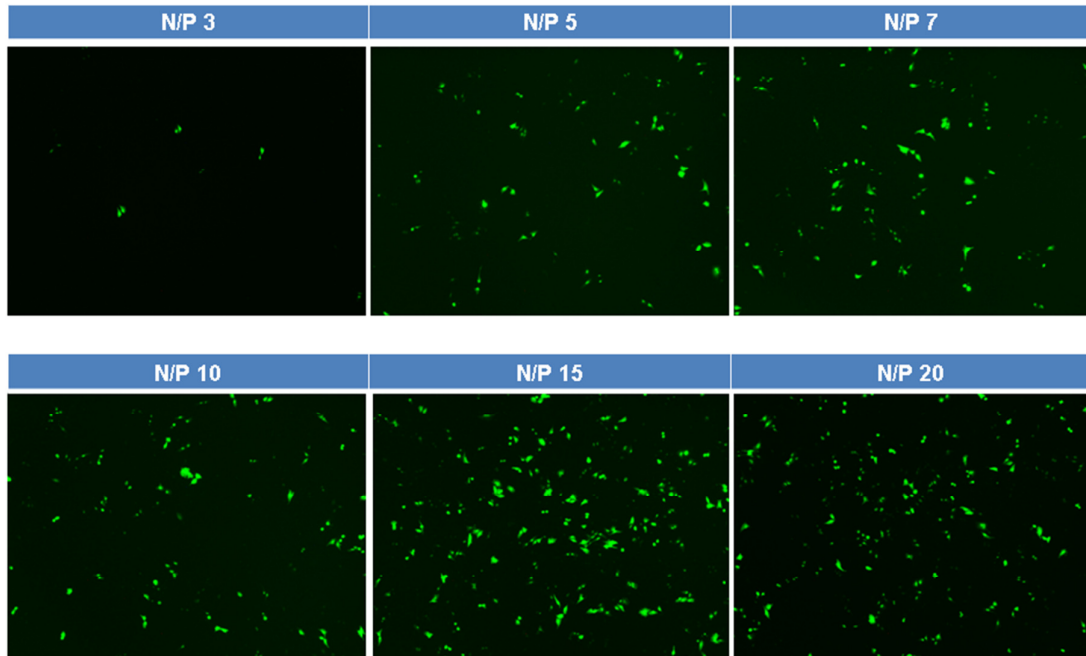


Figura 12. Reprezentare comparativa a profilurilor de citotoxicitate pentru poliplexii formati cu bPEI, Sq-bPEI si Sq-bPEI-G.

Transfection of HeLa cells with reporter gene eGFP
Sq-bPEI-G



Transfection of HeLa cells with reporter gene eGFP
Sq-bPEI-NH₂

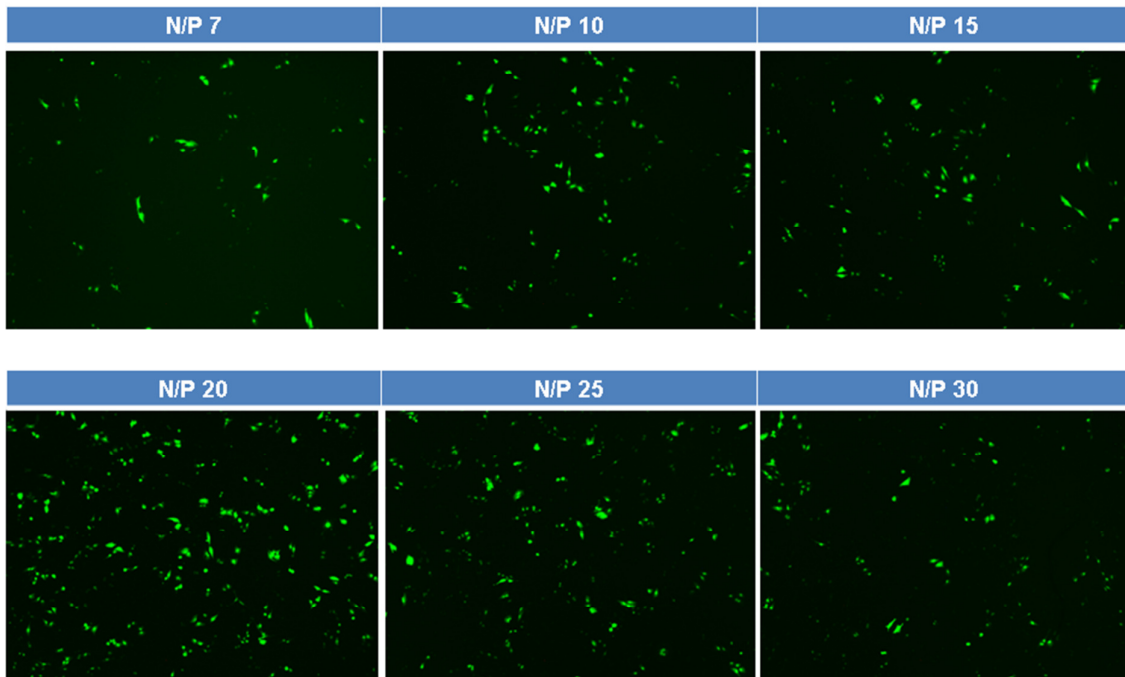


Figura 13. Micrografii de microscopie de fluorescanta la valori diferite ale raportului N/P pentru Sq-bPEI-G si Sq-bPEI din timpul investigatiilor pentru transfectie pe celule HeLa, cu gena eGFP (t=48h).

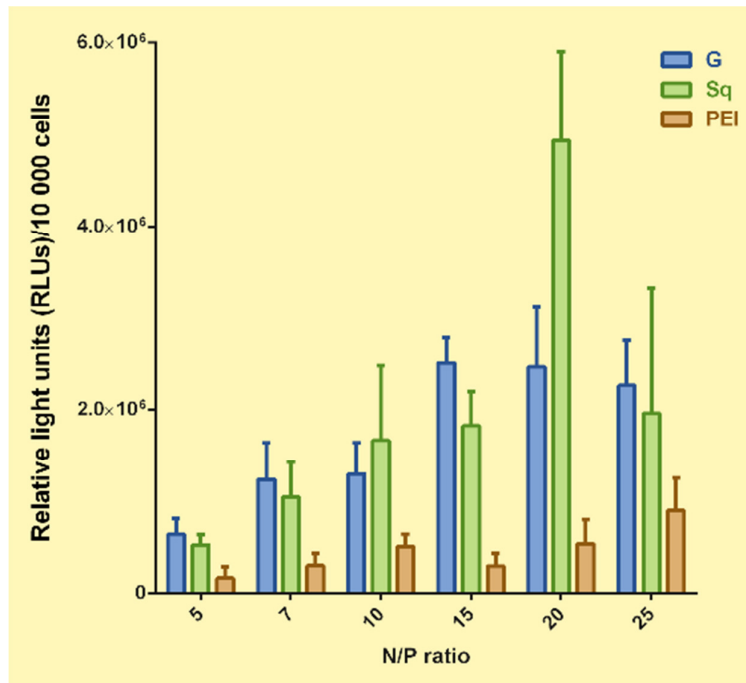
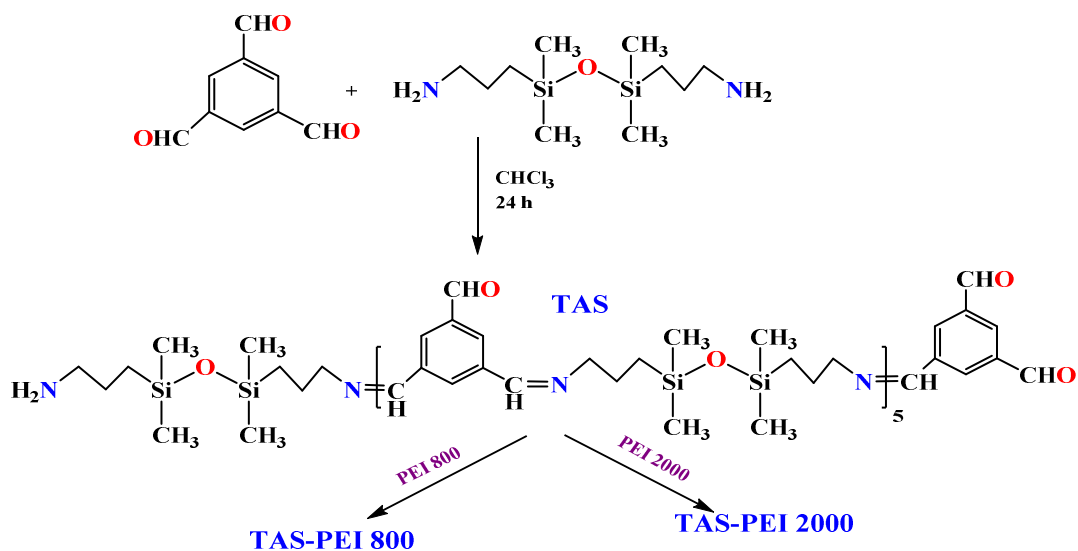


Figura 14. Reprezentare comparativa a expresiei genei Luciferaza pentru bPEI, Sq-bPEI si Sq-bPEI-G.

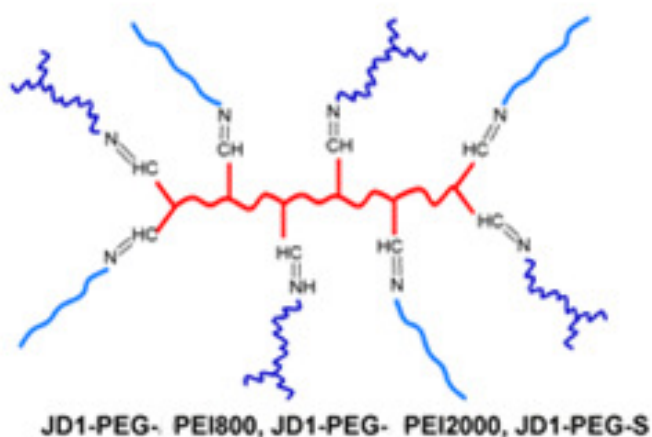
B. Proiectarea, sinteza, caracterizarea si testarea *in vitro* a vectorului genic de tip imina cu structura hidrofob-hidrofil (JD1-PEG-PEI800, JD1-PEI800, JD1-PEI2000 si TAS-PEI2000)

Studiile de literatura arata ca o eficienta mare in transfectie a fost obtinuta in special pentru vectori non-virali care adopta o morfologie sferica și care prezinta o densitate mare de sarcini pozitive pe suprafata, dendrimerii apropiindu-se cel mai mult de aceasta morfologie. Mai mult, studii dedicate relatiei structura/eficienta de transfectie arata ca rezultate foarte bune se obtin pentru un numar mare de generatii, in special cand in fiecare generatie au fost introduse unitati hidrofobe, deoarece acestea faciliteaza penetrarea membranei nucleului. Pe de alta parte, etapa de sinteza si purificare a dendrimerilor este dificila si consumatoare de timp.

In acest context, obiectivul acestui studiu a fost obtinerea unor sisteme pe baza de blocuri structurale hidrofob-hidrofile, conectate intre ele prin legaturi reversibile de tip imina (Schema 2), care permit reorganizari structurale prin reactii de iminare si transiminare, sub presiunea atingerii unor structuri stabile cu energie de suprafata minima, respectiv sferice.



A)



B)

Schema 2. A) Sinteza vectorilor non-virali cu miez polisiloxanic; B) Reprezentarea structurala a vectorilor non-virali cu miez polioximetilenic.

Succesul sintezei a fost confirmata de microscopia electronica de transmisie (TEM), care a relevat formarea de structuri sferice cu diametru corelat cu structura compusilor (Figura 15). Astfel, compusii cu miez polioxipropilena si PEI 800 (*JD1-PEI 800*) au avut un diametru mediu de 6 nm, cel pe baza de PEI 2000 (*JD1-PEI 2000*) de 23 nm, in timp ce compusul pe baza de PEG și PEI (*JD1-PEG-PEI800*) de 50 nm. Pe de alta parte, compușii cu miez polisiloxanic si PEI 800 (TAS-PEI800) au prezentat o dimensiune medie de 20 nm, iar compusii pe baza de PEI 2000 (TAS-PEI2000) de 95 nm.

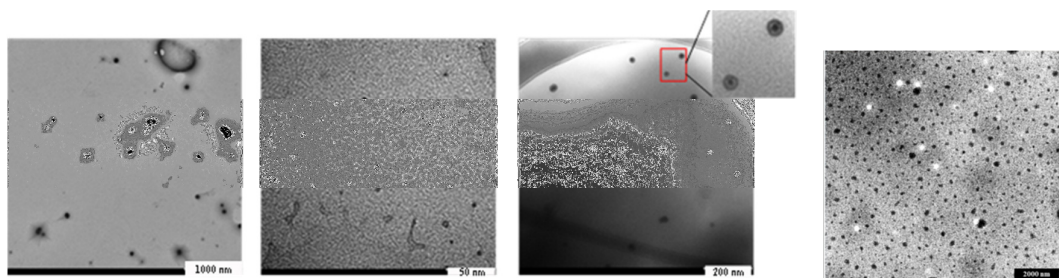


Figura 15. Imagini TEM pentru JD1-PEG-PEI800, JD1-PEI800, JD1-PEI2000 si TAS-PEI2000 (de la stanga la dreapta).

Compusii sintetizati formeaza poliplecsi atat cu ADN-ul de somon (250 perechi de baze), cat si cu ADN dublu catenar de tip plasmidic utilizat in terapia genica (4800 perechi de baze). Capacitatea de complexare a ADN-ului urmarita prin electroforeza pe gel de agaroză (Figura 16), a aratat ca compuşii pe baza de PEI ramificat prezinta o buna capacitate de a diminua mobilitatea electroforetica a ADN-ului prin gelul de agaroză, inca de la rapoarte N/P mici: N/P=1 pentru JD1-PEI 2000; N/P=3 pentru JD1-PEI 800; N/P=300 pentru TAS-PEI800 si N/P=30 pentru(TAS-PEI2000).

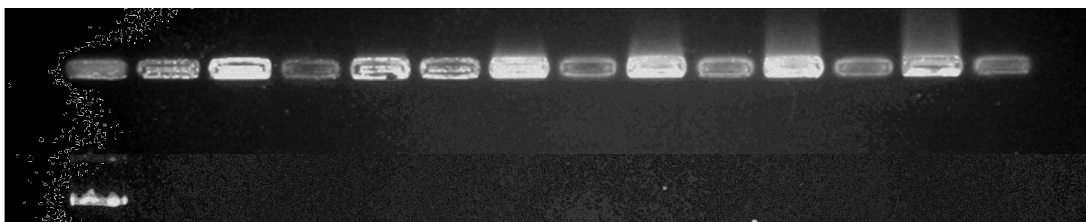


Figura 16. Electroforeza pe gel de agaroză pentru JD1-PEI2000, pentru rapoarte N/P= 1;5;10;50;100;200.

In general, compusii pe baza de grupari hidrofille PEI ramificat au demonstrat o capacitate de transfectie buna pe celule de tip HEK 293T sau HeLa, comparabila cu a etalonului SUPERFECT si mult mai buna decat a PEI-ului liber. Dintre acesti compusi, cei cu miez hidrofob pe baza de polisiloxan au prezentat abilitatea de transfectie cea mai mare (Figura 17).

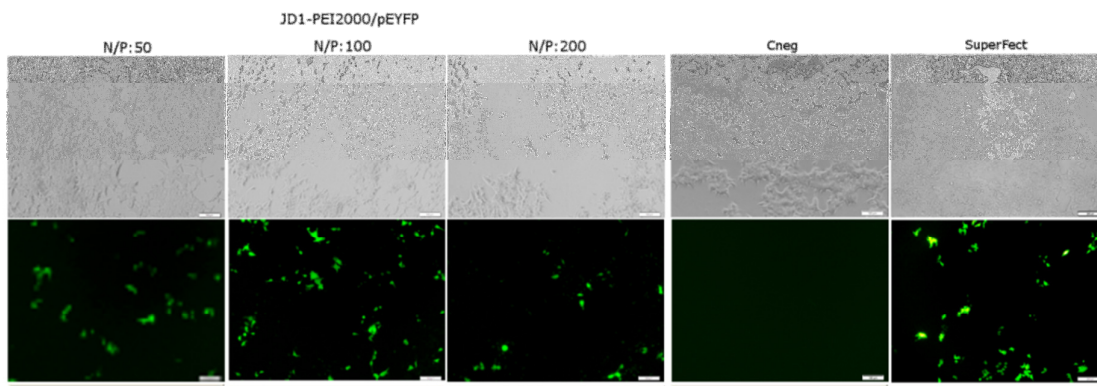


Figura 17. Vizualizarea expresiei proteinei YFP in celulele HEK 293T transfectate cu poliplecşii JD1-PEI2000/pEYFP, JD1-PEI800/pEYFP și JD1-PEG-PEI800/pEYFP la diferite rapoarte N/P. Sunt incluse drept control negativ – celule netratate (Cneg) și drept control pozitiv – celule transfectate cu Superfect.

C. Proiectarea, sinteza, caracterizarea si testarea *in vitro* a vectorului genic de tip polirotaxanic pe baza de polietilen glicol si derivati de β -ciclodextrina

Obiectivul principal a constat in dezvoltarea unui vector non-viral cu o arhitectura functionala complexa, capabil sa indeplineasca anumite cerinte precum: sa permita impachetarea, transportul si eliberarea ADN-ului intr-o maniera convenabila, sa demonstreze biocompatibilitate si clearance (eliminarea ulterioara din organism), sa determine un raspuns citotoxic mic si o eficienta de transfectie inalta.

Terapia genica prin transfectie consta in inserarea unei secvente de ADN in genomul gazdei, in vederea exprimarii produsului codat de gena introdusa sau pentru inhibarea exprimarii unei gene responsabile de afectiune. Candidati notabili pentru terapia genica sunt structurile supramoleculare de tip polirotaxan compuse din molecule de ciclodextrina insiruite pe un polimer liniar. Aceste ansambluri supramoleculare se bazeaza pe legaturi fizice (legaturi de hidrogen, interactii hidrofil/hidrofob, forte Van der Waals etc.) si sunt caracterizate de compozitie precisa, metode de sinteza reproductibile si mobilitatea moleculelor de ciclodextrina de-a lungul lantului polimeric. De asemenea, prezenta moleculelor de ciclodextrina permite obtinerea unei varietati mari de functionalizari in conditiile unui efect citotoxic neglijabil.

In acest cadru, a fost dezvoltat un vector non-viral de tip polirotaxan bazat pe β -ciclodextrina modificata cu dendroni de polietilenimina PEI₂₀₀₀ si un „ax” polimeric de poli(etilen glicol) PEG₁₀₀₀.

Sinteza β -ciclodextrinei acrilate

Functionalizarea β -ciclodextrinei β -CD (Figura 18) cu monomeri nesaturati²⁹ reprezinta o prima etapa in obtinerea structurii supramoleculare. Prezenta

monomerilor cu legaturi duble activate (grupari acrilice) asigura functionalitatea necesara grefarii segmentelor polimerice ulterioare (PEG si/sau PEI), prin reactia de aditie nucleofilica Michael.

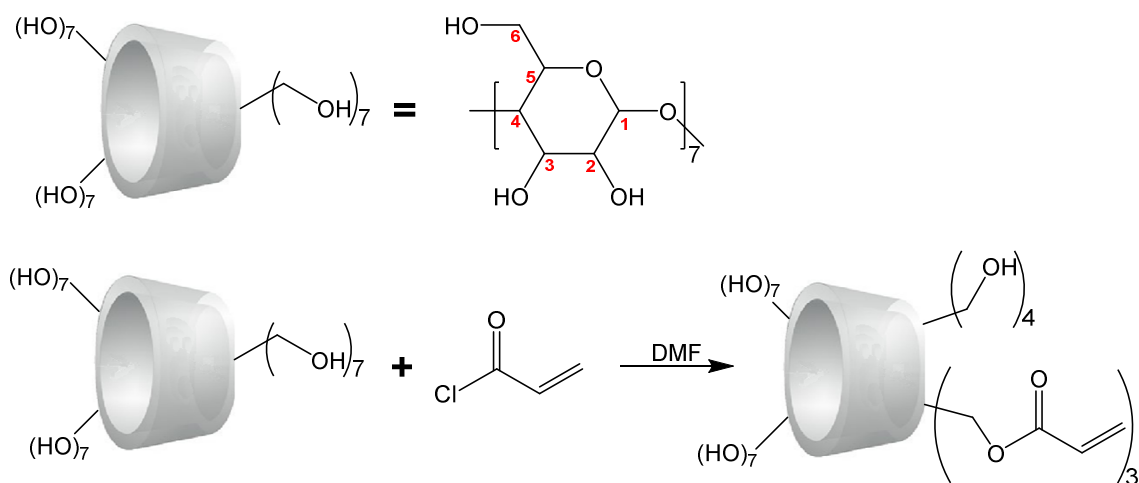


Figura 18. Reprezentare schematica a reactiei de esterificare a β -CD cu clorura de acriloi.

Obtinerea unui numar controlat si reproductibil de grupari acrilice la nivelul gruparilor hidroxilice primare necesita desfasurarea reactiei in conditii anhidre si non-oxidative, cu o viteza mica.

Structura derivatului obtinut ce contine 3 grupari acrilice in pozitia C₆, a fost pusa in evidenta prin spectroscopie FT-IR, ¹H si ¹³C-RMN si analiza elementala.

Sinteza α,ω -bis-propargil PEG

Inainte de a fi utilizat ca „ax” al vectorului rotaxanic, terminatiile hidroxilice ale poli(etilen glicolului) PEG₁₀₀₀ au fost modificate chimic (Figura 19) cu functiuni alchinice, astfel incat sa permita blocarea moleculelor de ciclodextrina prin intermediul reactiei de cicloaditie Huisgen (reactie „Click”).

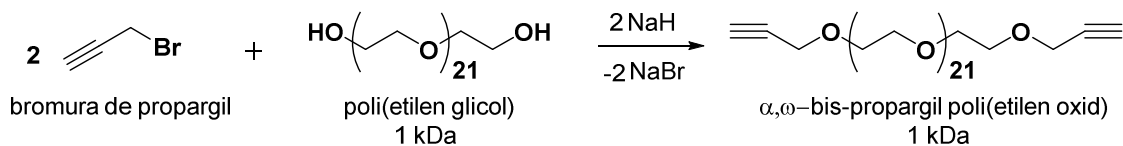


Figura 19. Reprezentare schematica a reactiei de esterificare Williamson a PEG cu bromura de propargil.

Structura derivatului a fost pusa in evidenta prin spectroscopie FT-IR, ¹H si ¹³C-RMN si analiza elementala.

Sinteza 1-(3-bromopropil)silatranului si 1-(3-azidopropil)silatranului

A fost necesara sinteza unui blocator voluminos adecvat care sa impiedice dezasamblarea pseudorotaxanului. In acest scop, initial a fost sintetizat 1-(3-

brompropil)silatranul³⁰ (Figura 20A) iar ulterior a fost convertita halogenura in functiune azidica³¹ (Figura 20B).

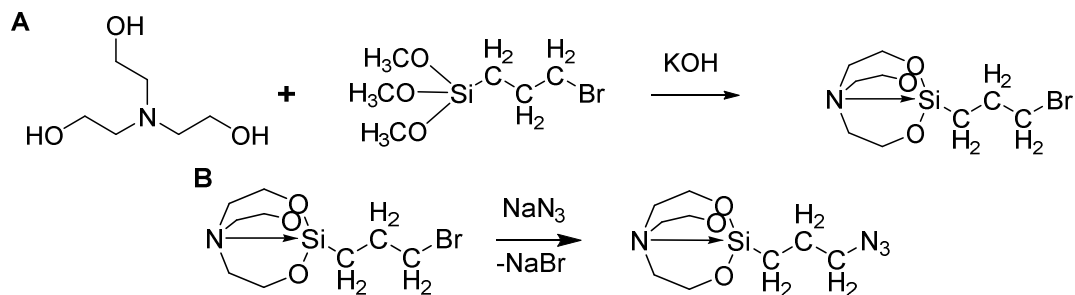


Figura 20. Reprezentare schematica a sintezei 1-(3-brompropil)silatranului (A) si respectiv 1-(3-azidopropil)silatranului (B).

Structura derivatilor a fost pusa in evidenta prin spectroscopie FT-IR, ¹H si ¹³C-RMN si analiza elementala.

Sinteza α,ω -bis-propargil PEG/ β -CD acrilata poli(pseudorotaxanului)

Prepararea complexului pseudorotaxanic a fost realizata prin metoda coprecipitarii (Figura 21).

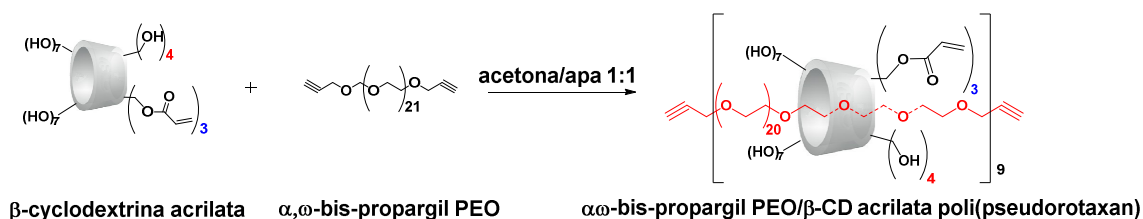


Figura 21. Reprezentare schematica a sintezei α,ω -bis-propargil PEG/ β -CD acrilata poli(pseudorotaxanului) prin coprecipitare.

Structura complexului a fost pusa in evidenta prin spectroscopie FT-IR, ¹H si ¹³C-RMN si analiza elementala.

Analiza produsului de reactie purificat a indicat un numar mediu de 9 molecule de β -CD acrilata pe un lant de α,ω -bis-propargil-poli(etilen oxid).

Sinteza polirotaxanului α,ω -bis-propargil PEG/ β -CD acrilata

Blocarea moleculelor de β -CD acrilata pe lantul de α,ω -bis-propargil PEG a fost realizata prin reactia de cicloaditie Huisgen (reactie „Click”). Aceasta reactie catalizata de cupru si o baza organica, are loc intre functiunile alchinice ale lantului de poli(etilen oxid) si gruparea azidica din 1-(3-azidopropil)silatran.

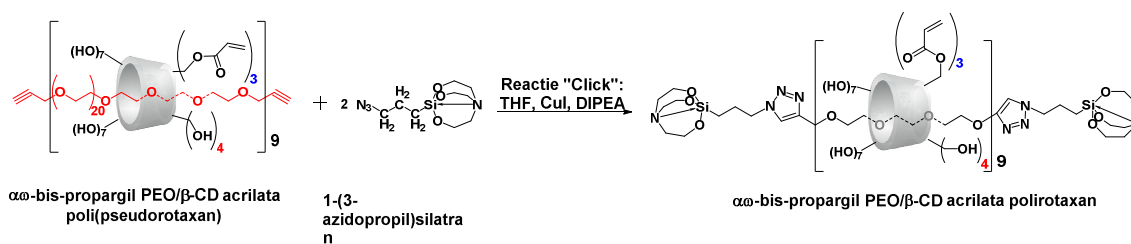


Figura 22. Reprezentare schematica a sintezei polirotaxanului α,ω -bis-propargil PEO/ β -CD acrilata prin reactia de cicloaditie Huisgen (reactie „Click”) cu 1-(3-azidopropil)silatrane.

Un aspect de importanta majora in prepararea unui biomaterial este puritatea inalta a acestuia. De aceea, polirotaxanul sintetizat a fost purificat prin cromatografie preparativa „flash”. Structura polirotaxanului a fost pusa in evidenta prin spectroscopie FT-IR, ^1H si ^{13}C -RMN si analiza elementala.

Sinteza polirotaxanului decorat cu $b\text{PEI}_{2000}$ sau $\text{PEG}_{750}/b\text{PEI}_{2000}$

In cadrul acestei etape au fost aditionate lanturi de poli(etilen imina) ramificata $b\text{PEI}_{2000}$ prin reactia de aditie Michael³² dintre gruparile aminice nucleofile ale dendronului de PEI si legaturile duble activate ale ciclodextrinei acrilate (Figura 23).

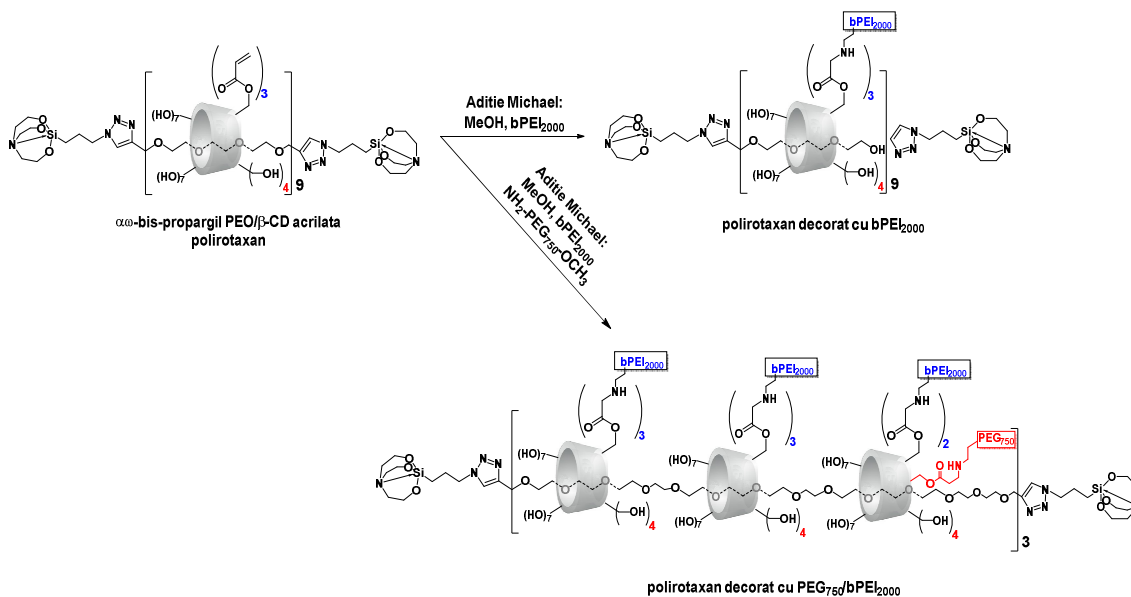


Figura 23. Reprezentare schematica a reactiei de aditie Michael a $b\text{PEI}_{2000}$ sau $b\text{PEI}_{2000}/\text{NH}_2\text{-PEG}_{750}\text{-OCH}_3$ la gruparile acrilice din polirotaxan.

De asemenea, a fost preparat si un rotaxan decorat prin acelasi mecanism de aditie cu lanturi de metoxi-poli(etilen glicol)amina $\text{NH}_2\text{-PEG}_{750}\text{-OCH}_3$ si $b\text{PEI}_{2000}$.

Purificarea structurilor rotaxanice a fost realizata prin dializa in apa deionizata timp de 7 zile intr-o membrana de dializa cu pori de 3500 Da.

Structura polirotaxanului decorat cu bPEI₂₀₀₀ sau bPEI₂₀₀₀/NH₂-PEG₇₅₀-OCH₃ a fost pusă în evidență prin spectroscopie FT-IR, ¹H și ¹³C-RMN, analiză elementală și cromatografie de gel-permeatie.

Raportul compozitional al polirotaxanului a fost de α,ω -bis-propargil PEO: β -CD:PEI de 1:9:27 iar în cazul rotaxanului decorat cu lanțuri de PEG₇₅₀ raportul compozitional a fost estimat ca fiind α,ω -bis-propargil PEO: β -CD:PEI:PEG₇₅₀ = 1:9:24:3.

Testarea abilității de complexare a acizilor nucleici

Capacitatea vectorului de a împacheta acizi nucleici a fost testată prin electroforeza pe gel de agaroză. În acest scop a fost preparat poliplexul (complex compact dintre grupările aminice ale vectorului și resturile fosfat ale acidului nucleic stabilizat prin interacții ionice) prin amestecare și ulterior incubarea vectorului și ADN-ului plasmidic pEYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein) la diferite rapoarte compozitionale N/P. A fost evaluată și migrarea plasmidului liber drept probă de control (Figura 24).

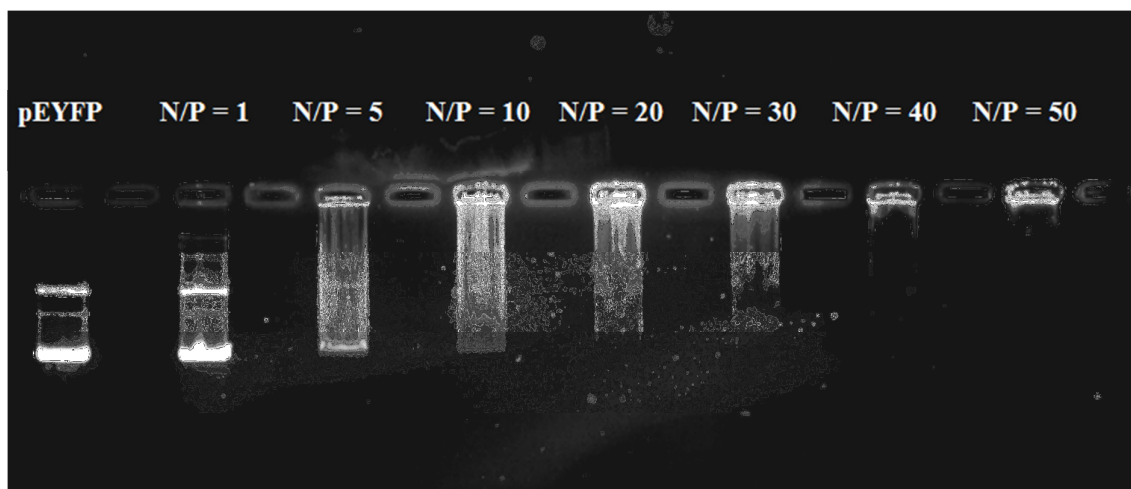


Figura 24. Migrarea electroforetică a poliplexului ROT-PEI/pEYFP la N/P = 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 în comparație cu plasmidul liber.

Migrarea acidului nucleic plasmidic este blocată la N/P > 40 unități în cazul polirotaxanului decorat cu bPEI₂₀₀₀.

Potentialul zeta al particulelor de poliplex

A fost evaluat potentialul zeta al particulelor de poliplex cu raport compozitional N/P de 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60 și 80 de unități (Figura 25).

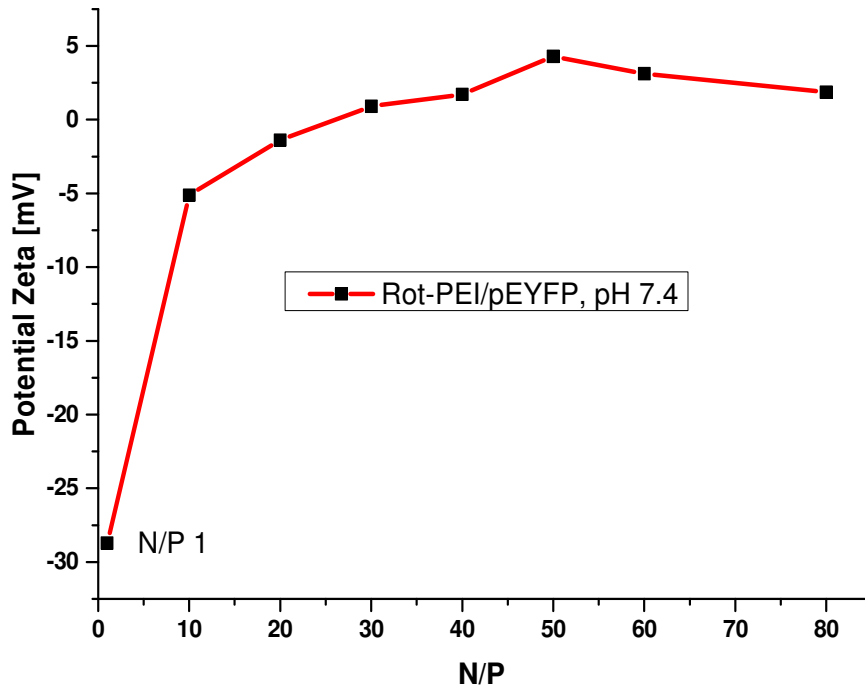


Figura 25. Potentialul zeta al poliplexului ROT-PEI/pEYFP in functie de raportul N/P.

La valori N/P mici (< 20 unitati) potentialul zeta al poliplexului este negativ, indicand o cantitate insuficienta de vector care sa impacheteze acidul nucleic. Valoarea maxima a potentialului zeta (< 5mV) a fost observata la un raport N/P de 5 unitati. Cresterea raportului compozitional peste aceasta valoare nu determina o crestere a potentialului zeta, acesta din urma mentinandu-se usor pozitiv. Acest fenomen este pus pe seama arhitecturii spatiale complexe a poliplexului care desi este o structura policationica, la nivelul suprafetei exista o cantitate mica de sarcini pozitive. Avantajul unui astfel de poliplex, a carui sarcina tinde spre neutralitate este abilitatea de penetrare a celulelor si printr-un mecanism de difuzie si nu doar endocitoza. In conditiile in care cresterea potentialului zeta determina cresterea citotoxicitatii³³ rezultatele masurarilor de potential zeta indica o posibila citotoxicitate redusa a poliplexului ROT-PEI/pEYFP.

Evaluarea dimensionala si morfologica prin microscopie electronica de transmisie TEM

Imaginile obtinute in urma analizei prin microscopie electronica de transmisie a vectorului (polirotaxan decorat cu PEI) au indicat prezenta unor particule sferice cu un diametru mediu de 58 nm (Figura 26).

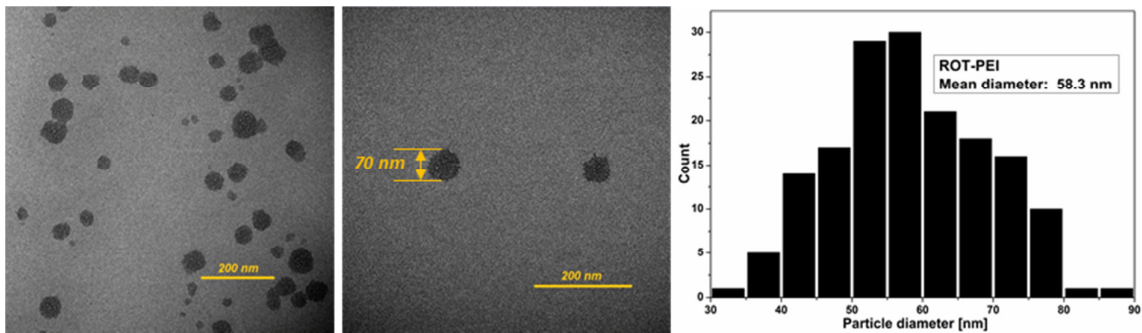


Figura 26. Imagini TEM si distributia dimensionala a particulelor de vector ROT-PEI.

In cazul poliplexului ROT-PEI/pEYFP la un raport N/P de 30 de unitati (Figura 27) particulele au diametre cuprinse in intervalul 20-180 nm (diametru mediu de 92 nm). Cresterea raportului compozitional N/P la 80 de unitati determina o scadere semnificativa a diametrului in intervalul 40-100 nm (diametru mediu de 64 nm).

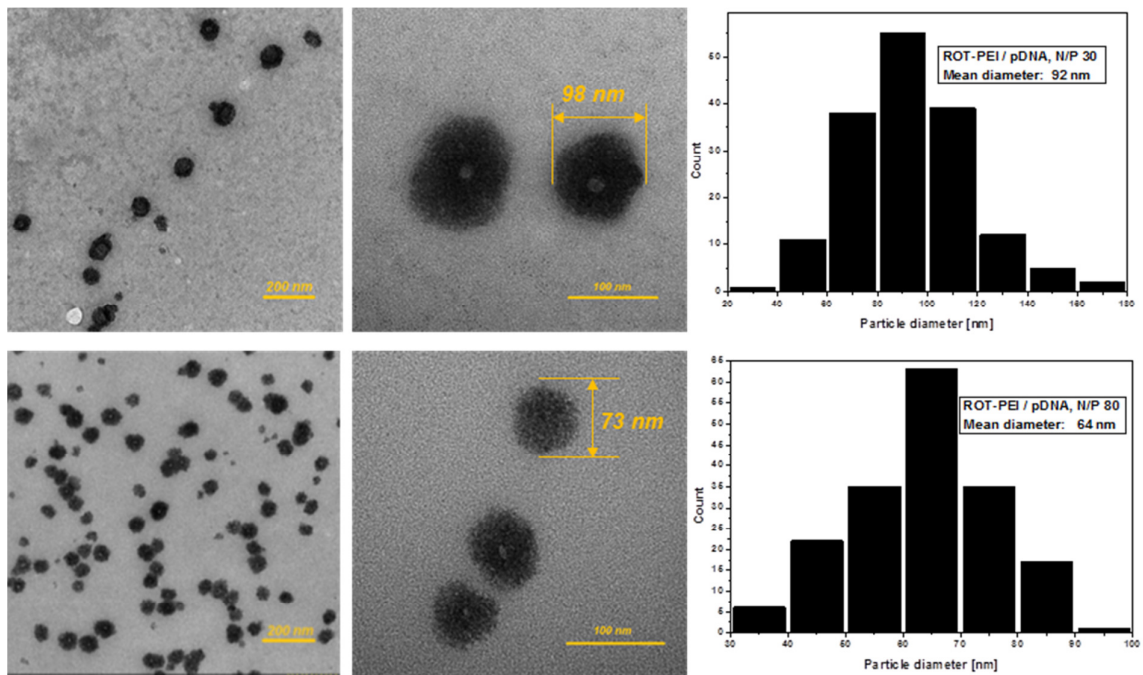


Figura 27. Imagini TEM si distributia dimensionala ale poliplexului ROT-PEI/pEYFP la un raport N/P30 (linia superioara) si 80 (linia inferioara).

Din punct de vedere morfologic, particulele de poliplex prezinta o scadere a densitatii in zona centrala sugerand faptul ca poliplexul adopta o forma de inel cel mai probabil din cauza structurii de polirotaxan. De asemenea, aceasta particularitate poate fi datorata si blocatorului hidrofob.

Evaluarea vectorilor in silico

Structura vectorului polirotaxanului a fost contruita initial in concordanta cu datele experimentale iar apoi modelata prin metodata Dinamica Moleculara utilizand un mediu de simulare Maestro ce consta intr-un spatiu paralelipipedic cu 49582 molecule de apa, 786 ioni de clor Cl^- si 138 ioni de sodiu Na^+ care asigura o neutralitate a sistemului cu o concentratie de sare de 150 mM. Structura echilibrata obtinuta prin aceasta metoda are o forma alungita cu o lungime de ~ 13.5 nm si un diametru transversal de ~ 6.7 nm.

De asemenea, analiza hartilor bidimensionale a densitatii diferitelor componente ale sistemului reflecta structura interna a agregatului: ionii de Cl^- sunt internalizati ca urmare a prezentei dendronilor de PEI in timp ce ionii de Na^+ sunt expulzati catre exterior.

Diametrul transversal al polirotaxanului de ~ 6.7 nm este foarte apropiat de dimensiunea nucleului histonic (Figura 29) al nucleozomilor (~ 6.5 nm).

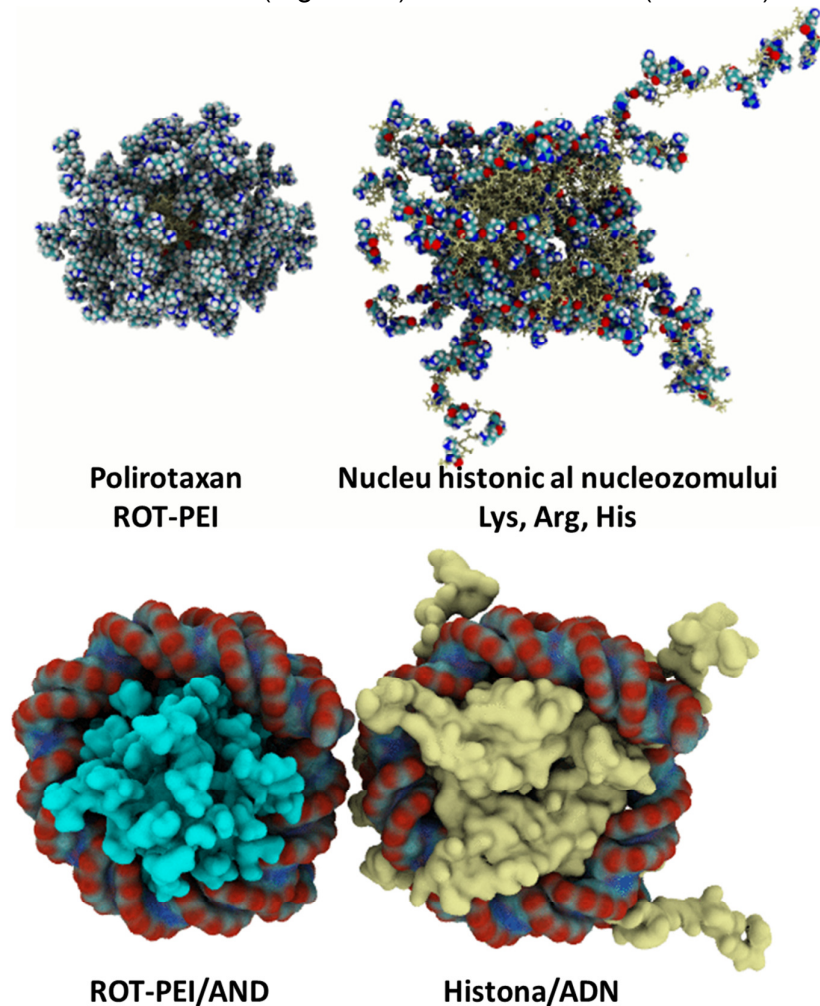


Figura 29. Reprezentare a rotaxanului in comparatie cu nucleul histonic si a agregatelor polirotaxan/ADN si histona/ADN.

Rezultatele simulării prin Dinamica Moleculară a interacției dintre ADN-ul dublu catenar ADN_{dc} și PEI au indicat faptul că cele două concavități ale acidului nucleic (Figura 30) rămân nemodificate în urma interacției cu dendronul cationic de PEI. Aceste rezultate au fost confirmate de analiza prin dicroism circular (Figura 30).

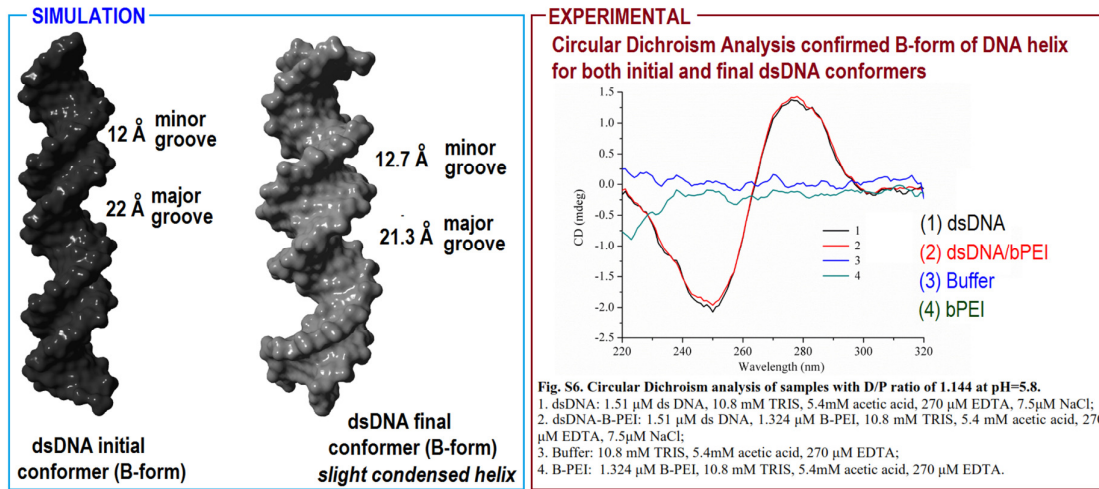


Figura 30. Simulare prin Dinamica Moleculară a ADN_{dc} (stanga) și rezultate experimentale de Dicroism Circular înainte și după interacția ADN_{dc} și PEI (dreapta).

Evaluarea citotoxicității vectorilor și poliplexilor

Citotoxicitatea conjugatelor sintetizate și a poliplexilor transportori de ADN plasmidic a fost investigată pe culturi celulare HEK 293T utilizând testul MTT. Viabilitatea celulară atât în cazul ROT-PEI cât și a poliplexului cu pCS2+MT-Luc, a fost peste 95% (Figura 31).

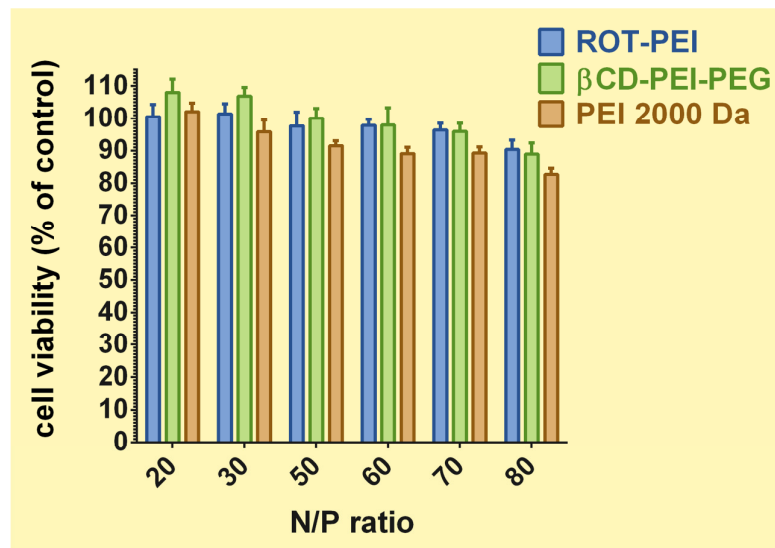


Figura 31. Citocompatibilitatea vectorilor.

Evaluarea eficienței de transfecție

Eficiența de transfecție a poliplexurilor bazate pe conjugatele sintetizate a fost determinată prin două tehnici complementare: microscopie de fluorescență pentru evaluarea calitativă a abundenței de celule transfectate (Figura 32) și prin cuantificarea abilității de transfecție a poliplexurilor (Figura 33). În vederea realizării acestor evaluări, vectorii testați au fost încărcati cu gena Luciferaza (pCS2+MT-Luc) ce codifică o proteină fluorescentă verde 9eGFP). Celulele HeLa au fost transfectate cu poliplexuri formate prin combinarea plasmidului pCS2+MT-Luc cu vectorul polirotaxanic.

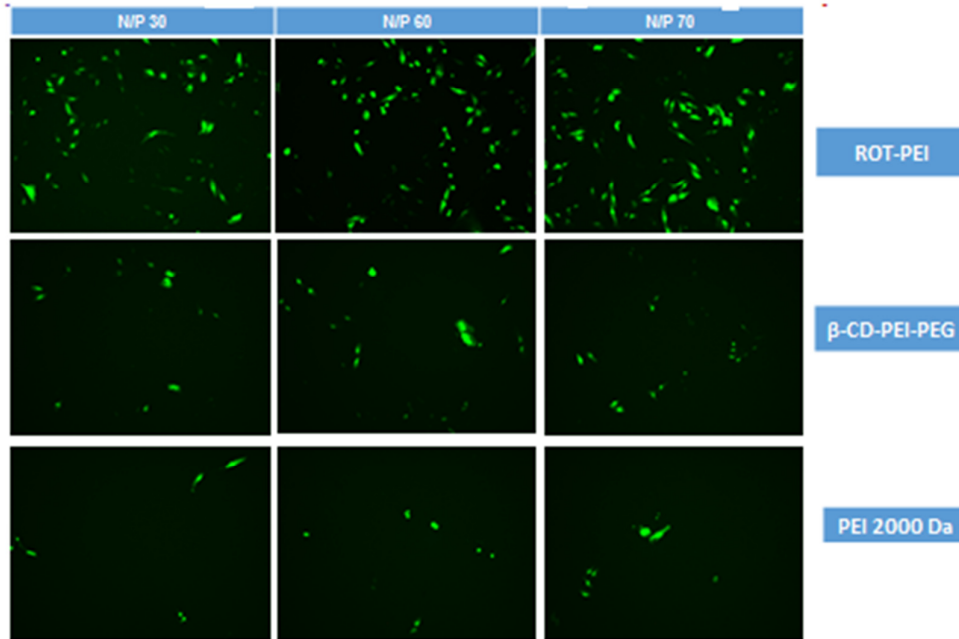


Figura 32. Imagini de microscopie de fluorescență a celulelor HeLa transfectate cu gena reporter eGFP prin poliplexul vector non-viral ROT-PEI/pCS2+MT-Luc și conjugatul β -CD-PEI-PEG).

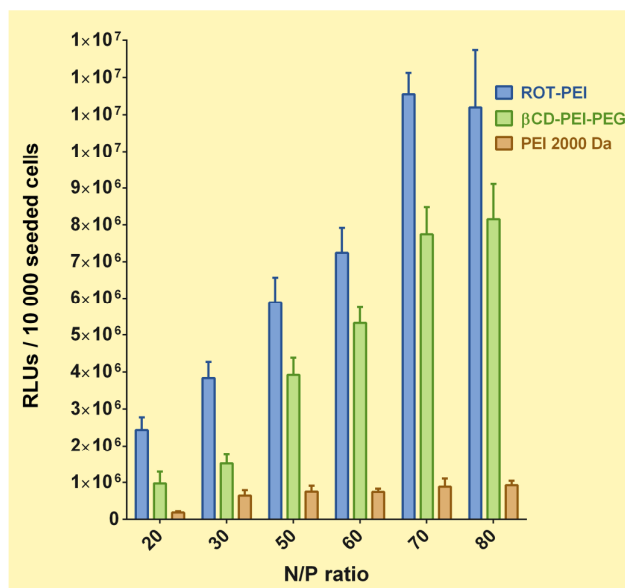


Figura 33. Cuantificarea abilitatii de transfectie a poliplexilor transportori de gena Luciferaza (rezultate raportate ca unitati de lumina relative RLU per 10 000 celule transfectate).

Rezultatele celor doua forme de evaluare a eficientei de transfectie prezentate in Figurile 32 si 33 indica faptul ca pentru orice raport compozitional N/P, poliplexii rotaxanului ROT-PEI prezinta cea mai mare eficienta de transfectie.

D. Biosinteza si caracterizarea exopolizaharidelor produse de bacterii lactice, alternativa pentru sinteza vectorilor non-virali pentru terapia genica

Scopul acestui studiu a fost obtinerea unei structuri de tip exopolizaharid (EPZ) care poate fi functionalizata ulterior adecvat in scopul obtinerii unei noi clase de vectori non-virali pentru terapia genica.

D.1. Biosinteza exopolizaharidelor (EPZ) din bacterii lactice

Datorita constientizarii problemelor de mediu cu care ne confruntam in zilele noastre, se constata un interes crescut pentru biopolimeri, in scopul dezvoltarii de materiale prietenoase cu mediul inconjurator si care sa suporte ulterior reactii chimice pentru o functionalizare adecvata cu aplicatia dorita. Trendul orientarii pentru biopolimeri precum si dezvoltarea produselor inovative au dus la renasterea cercetarilor interdisciplinare la nivel global pentru exopolizaharidele bacteriene (EPZ). Biodisponibilitatea si natura netoxica a EPZ rezulta din utilizarea acestora in numeroase aplicatii medicale cum ar fi ingineria tisulara, sisteme de eliberare controlata a medicamentelor etc.³⁴ Acesti biopolimeri se prezinta, in general, sub forma capsulara de EPZ, sau ca forme vascoase.³⁵

Datorita diversitatii structurale si functionale, precum si efectelor valoroase ale acestor polimeri, biosinteza extracelulara a EPZ prin fermentare utilizand bacterii lactice (LAB) a fost considerata foarte interesanta pentru acest proiect. Printre factorii

importanti care influenteaza biosinteza EPZ se numara: compozitia mediului de cultura, tipul surselor de carbon si azot, precum si conditiile de incubare (timpul, viteza de agitare si temperatura).

Conditii de fermentare

Pentru realizarea experimentelor fermentative s-au folosit doar componente naturale in compozitia mediului de cultura. Acesta imita mediul de cultura reprezentativ pentru LAB si prezinta urmatoarea compozitie: 150 g/L zahar tos, 30 g/L extract de drojdie, 10 g/L lapte praf, 0.05 g/L sulfat de mangan si 0.2 g/L sulfat de magneziu. Mediul de cultura a fost sterilizat 20 de min la 120°C, inoculat cu 10% inocul proaspat de 48h ($A_{600\text{ nm}}=0.5$) si incubat la 33°C, 48h. La sfarsitul procesului fermentativ s-a realizat inactivarea enzimatica dupa datele de literatura.³⁶ Acest mediu de cultura nou permite obtinerea unor cantitati mult mai mari de EPZ fata de cele raportate in literatura si obtinute din medii sintetice, si anume 26.6 g EPZ liofilizat/ L mediu de cultura.

D.2. Extractia si purificarea exopolizaharidelor (EPZ)

Primul pas a fost indepartarea proteinelor si a biomasei celulare prin precipitare cu 20% acid triclor acetic (TCA) si centrifugare 10 min la 4°C si 10.000 rpm, (Beckman Coulter Allegra[®] X-22). Precipitarea si separarea EPZ s-a realizat dupa procedeul publicat de Tayuan A. si colab in 2011. EPZ a fost spalat de trei ori cu etanol rece, redizolvat in apa bidistilata si supus dializei (membrana de 14 kDa) impotriva apei distilate, timp de 3 zile, la temperatura camerei. Cuantificarea gravimetrica a EPZ s-a realizat dupa liofilizarea acestora utilizand un liofilizator ALPHA 2-4 LD Plus, iar rezultatele au fost exprimate in g polimer uscat/L mediu de cultura.³⁷

D.3. Caracterizarea fizico-chimica a exopolizaharidelor

a) Analiza FT-IR a EPZ produs de *Weissella confusa* in mediu de cultura natural

Spectrul FT-IR al EPZ purificat a fost comparat cu cel al dextranului pur. Probele au fost inregistrate in pastila de KBr, utilizand un spectrometru Bruker Vertex 70 (Figura 34).

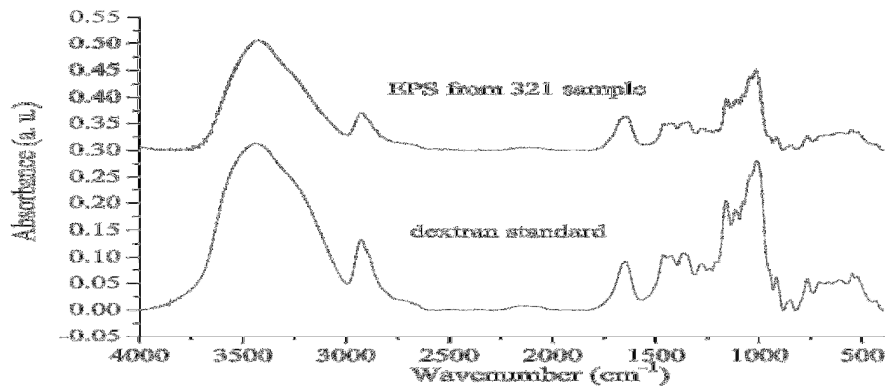


Figura 34. Spectrele FT-IR ale: dextran pur, $M_w=40000$ si EPZ purificat produs de *Weissella confusa* mediu de cultura natural.

Au fost identificate benzile caracteristice pentru proba EPZ de la 2926 cm^{-1} si pentru dextran de la 2925 cm^{-1} .³⁸ Prezenta semnalelor cu intensitate medie de la 1668 si 1655 cm^{-1} pentru EPZ si dextran reprezinta vibratia de legatura a gruparii C-OH din unitatea glucopiranozica,³⁹ care sugereaza natura zaharidica a probelor. Picurile de la 1458 and 1342 cm^{-1} sunt atribuite deformarii asimetrice a legaturii C-H, confirmand natura polizaharidica a compusilor.⁴⁰ Prezenta configuratiei α -anomerice si cea de scaun a unitatii glucopiranozice sunt confirmate de prezenta semnalelor la 843 cm^{-1} pentru proba de EPZ si la 845 cm^{-1} pentru dextran.⁴¹ Luandu-se in calcul toate asemanarile dintre proba noastra de EPZ si cea de dextran ($M_w=40.000$) putem preciza ca tulpina *Weissella confusa* biosintetizeaza dextran in mediul de cultura natural propus.

b) Analiza spectroscopica RMN

Pentru analiza RMN, probele au fost dizolvate in apa deuterata continand ca standard intern TSP. Spectrele au fost inregistrate pe un spectrometru Bruker Avance III 400 MHz echipat cu o detectie inversa de 5 mm a probelor in gradient $-Z$, operand la 400.1 si 100.6 MHz pentru nucleii ^1H si ^{13}C . Spectrele ^1H and ^{13}C RMN obtinute arata semnale caracteristice exopolizaharidelor. Bazandu-ne pe date deja raportate de Chen Y. si colab. in 2013, putem deduce ca exopolizaharidul produs de *Weissella confusa* este dextran.

c) Analiza compozitiei in monozaharide a EPZ purificat

Pentru analiza cantitativa in monozaharide a probei de EPZ, aceasta a necesitat hidroliza compusului obtinut iar compusul rezultat a fost analizat prin HPLC. Analiza HPLC s-a realizat folosind un sistem Perkin Elmer HPLC echipat cu un detector Flexar Refractive Index LC. Rezultatele prezentate in Figura 35 indica faptul ca singurul monozaharid prezent in structura polimerului este glucoza.

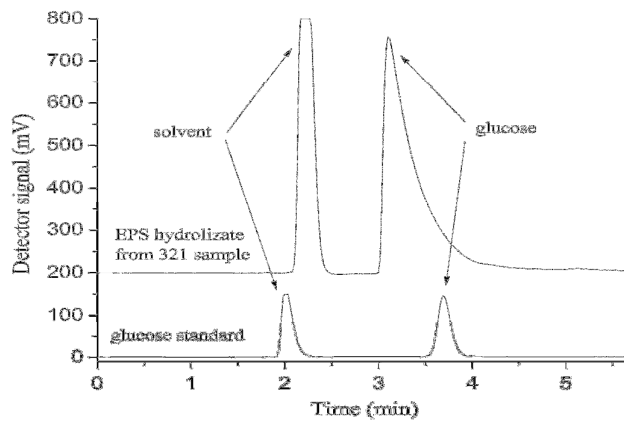


Figura 35. Cromatograma HPLC pentru standardul de glucoza si proba hidrolizata de EPZ produsa de tulpina *Weissella confusa* in mediu de cultura natural.

d) Analiza GPC a probei de EPZ purificat

Cromatografia pe gel permeabil (GPC) s-a realizat folosind un instrument Polymer Laboratories System (PL-GPC 120, Varian) echipat cu indice de refractie (Figura 36). Prin aceasta metoda s-au obtinut 4 fractii cu mase cuprinse intre 10^2 si 10^6 . Fractiile cu masa moleculara mare ($M_w=1.6 \times 10^7$ si 3.3×10^5 g/mol) sunt notate cu 1 si 2, iar cele cu masa moleculara mica (LMW 4.4×10^2 si 1.6×10^2 g/mol) cu 3 si 4. De asemenea, pentru fiecare proba se poate observa un indice de polidispersitate mic, ceea ce inseamna ca fiecare fractie este monodispersa (fractia 1 - 1.29 PD; fractia 2 - 1.0 PD, fractia 3 - 1.18 PD). Este cunoscut faptul ca pentru un polimer a carui sinteza este foarte bine controlata se obtine in indice de polidispersitate cuprins intre 1,02 si 1,10.

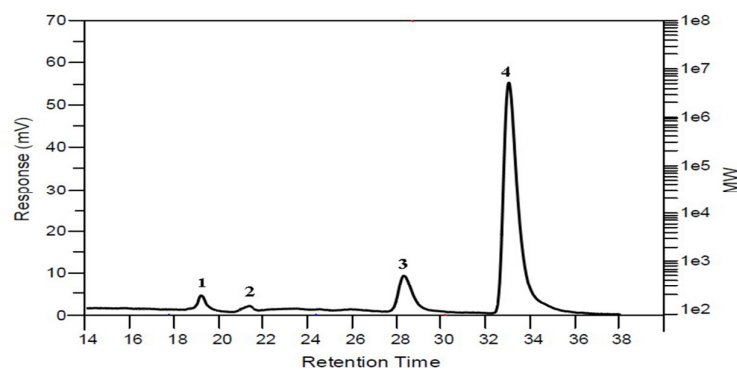


Figura 36. Curba GPC curve pentru proba de EPZ produsa de tulpina *Weissella confusa* in mediul de cultura natural.

e) Analizele TGA/DTG si DSC

Masuratorile TGA, DTG si DSC s-au realizat cu un dispozitiv Maia F3 200 DSC (Netzsch, Germany). Comparand profilul de degradare a probei de EPZ biosintetizata de tulpina *Weissella confusa* cu cel al dextranului pur (Figura 37A) putem concluziona ca degradarea probei de EPZ prezinta un comportament asemanator cu a dextranului (Maia J. si colab. 2011). Se poate observa din cea de-a doua incalzire din curba DSC a probei de EPZ si a dextranului (Figura 37B), ca dextranul prezinta un domeniu de temperatura a tranzitiei sticloase la $T_g \approx 220^\circ\text{C}$, in conformitate cu datele de literatura (Stanciu M.C., Nichifor M., 2015).⁴²

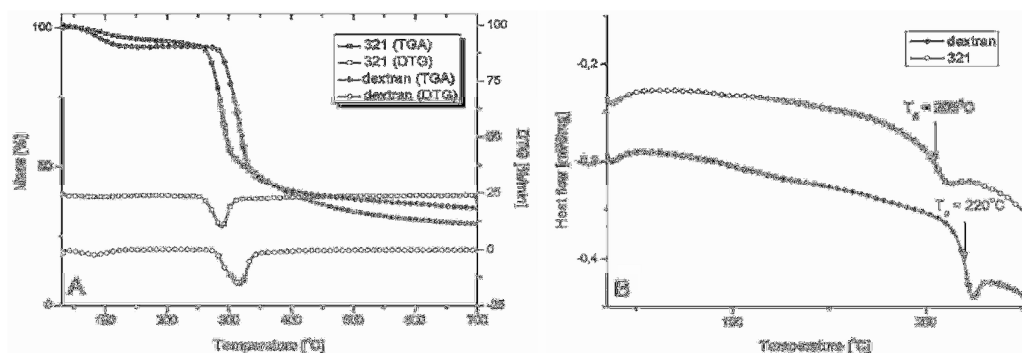


Figura 37. Analizele TGA (stanga) si DSC (dreapta) pentru proba de EPS extrasa din mediul de cultura natural care a fost inoculat cu *Weissella confusa* si a dextranului pur (Mn 40000).

Proba EPZ produsa de *Weissella confusa* prezinta o temperatura T_g la 205°C . Acest aspect poate fi explicat prin faptul ca *Weissella confusa* produce un dextran ce prezinta o mobilitate a segmentelor lantului mult mai ridicata si asta datorita structurii acestuia mult mai amorfe.

f) Concluzii

- Luand in considerare rezultatele analizelor FT-IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HPLC si TGA/DTA, proba de EPZ extrasa din mediul de cultura fermentativ prezinta structura de dextran, cu o compozitie in glucoza de 100%.
- Masa moleculara foarte ridicata detectata prin analiza GPC, clasifica EPZ produs de tulpina *Weissella confusa* drept un candidat bun pentru dezvoltarea de produse utilizate in aplicatii medicale.
- Luandu-se in considerare cantitatea foarte mare de EPZ obtinuta in urma procesului fermentativ (26.6 g polimer uscat/L mediu de cultura) precum si compozitia naturala a mediului de cultura, acest biopolimer este obtinut prin proceduri ieftine intr-un timp foarte scurt, si i se pot atribui multe aplicatii functionale.

- Compoziția naturală a mediului de cultură este propice obținerii de EPZ care mai apoi să fie utilizate în domeniul farmaceutic.
- Structura EPZ obținută prezintă caracteristici de a fi funcționalizată în scopul obținerii unor noi clase de vectori non-virali ce pot avea aplicații în terapia genică.

E. Dezvoltarea unui echipament destinat sintezei nanoparticulelor de hidroxiapatită în prezența biomacromoleculor

În cadrul etapei 2013 a proiectului s-a brevetat un procedeu pentru controlul caracteristicilor particulelor de hidroxiapatită sintetizată în prezența biomacromoleculor. Cererea de brevet a fost înregistrată la OSIM-București sub numărul A00710 din 27.09.2013. În prezent raportată etapă, s-a dezvoltat și echipamentul necesar sintezei particulelor de hidroxiapatită în câmp electric aplicat în regim capacitiv. Noua cerere de brevet a fost înregistrată la OSIM- București sub numărul A00615 din 07.09.2016.

Problema pe care o rezolvă invenția este legată de eliminarea efectelor nedorite ale proceselor de electrod în sistemele de reacție controlate prin câmp electric, sisteme destinate obținerii prin precipitare a particulelor de hidroxiapatită sintetică, chemo- și morfo-mimetică în raport cu bioapatita. Instalația, conform invenției, permite controlul gradului de cristalinitate, dimensiunilor, morfologiei și distribuției fazelor cristaline și amorse în cazul particulelor de hidroxiapatită sintetizate în mediu lichid și în câmp electric de înaltă intensitate, inclusiv în prezența compușilor (bio)macromoleculari susceptibili denaturării (în particular a proteinelor și în speță a atelocolagenului), compuși utilizați ca matriță pentru nucleerea și creșterea cristalelor ori particulelor cristalin-amorse. Soluția inventivă constă în:

- separarea printr-o barieră impermeabilă și dielectrică a electrozilor de volumul soluției apoase ori a emulsiei în care are loc sinteza;
- numărul, forma și geometria amplasării electrozilor care alcătuiesc sistemul capacitiv de aplicare a potențialelor de control al proceselor;
- modalitatea de conectare a electrozilor la sursele de înaltă tensiune, în vederea eliminării efectelor ripplei respectivelor surse, ripple care conduce la disiparea suplimentară de energie între electrozii cuplați capacitiv, disipare soldată cu încălzirea inutilă a mediului lichid;
- modul de control al evoluției în timp a potențialului aplicat electrozilor, prin polaritatea, forma și frecvența curenților electrici debitați de către surse;
- modul de distribuire a valorilor potențialelor de lucru în raport cu masa generală și respectiv cu masa blocurilor electronice, în vederea protejării sistemelor de control împotriva scurgerilor accidentale dinspre sursele de înaltă tensiune, dar și pentru garantarea siguranței în funcționare.

În principiu, instalația pentru controlul sintezei particulelor de hidroxiapatită prin intermediul câmpului electric aplicat în regim capacitiv, instalație care face obiectul cererii de invenție, se compune din:

- reactorul chimic propriu-zis;
- partea electrică a sistemului de control al sintezei, inclusiv electrozii;
- sursele de înaltă și joasă tensiune;
- circuitul pentru ridicarea potențialului masei circuitelor de joasă tensiune în raport cu masa surselor de înaltă tensiune și cu electrozii de lucru;
- sistemul digital pentru controlul evoluției în timp a potențialelor de lucru;
- sistemele de deservire a reactorului.

Avantajele instalației ce face obiectul prezentei invenții sunt:

- (i) - absența impurificării mediului de reacție cu compuși rezultați în urma proceselor electrochimice derulate la interfața electrozilor cu mediul de reacție;
- (ii) - posibilitatea de a conduce orice tip de sinteză prin nucleere / cristalizare / precipitare controlată a hidroxiapatitei, inclusiv utilizând compuși (bio)macromoleculari cu rol de matrice pentru dirijarea nucleerii, limitarea creșterii particulelor și controlul morfologiei acestora din urmă;
- (iii) - evitarea apariției proceselor fizico-chimice ce ar putea denatura compuși biomacromoleculari utilizați în sinteză (în speță proteinele);
- (iv) - posibilitatea de a controla polaritatea și variația potențialelor electrice între electrozi, atât ca valoare și evoluție în timp (pe cale electronică și ca urmare a geometriei electrozilor), cât și ca repetabilitate, ciclicitate și cadență (urmare a geometriei și mișcării electrodului central în raport cu cei încastrați în pereții reactorului);
- (v) - evitarea disipării suplimentare de energie cauzată de ripplel surselor (și soldată cu încălzirea locală a mediului lichid);
- (vi) - posibilitatea de a programa funcționarea generatorului de funcții care controlează sursele de înaltă tensiune, local și prin intermediul unui computer extern;
- (vii) - posibilitatea de a controla procesele de sinteză atât prin bucle locale automate (la nivelul sistemelor de dozare a reactivilor, de termostatare și de agitare / recirculare), cât și prin intermediul unui computer extern.

Figura 38 prezintă schema bloc a instalației pentru controlul sintezei particulelor de hidroxiapatită prin intermediul câmpului electric aplicat în regim capacitiv, conform invenției, iar Figura 39 schema funcțională a instalației.

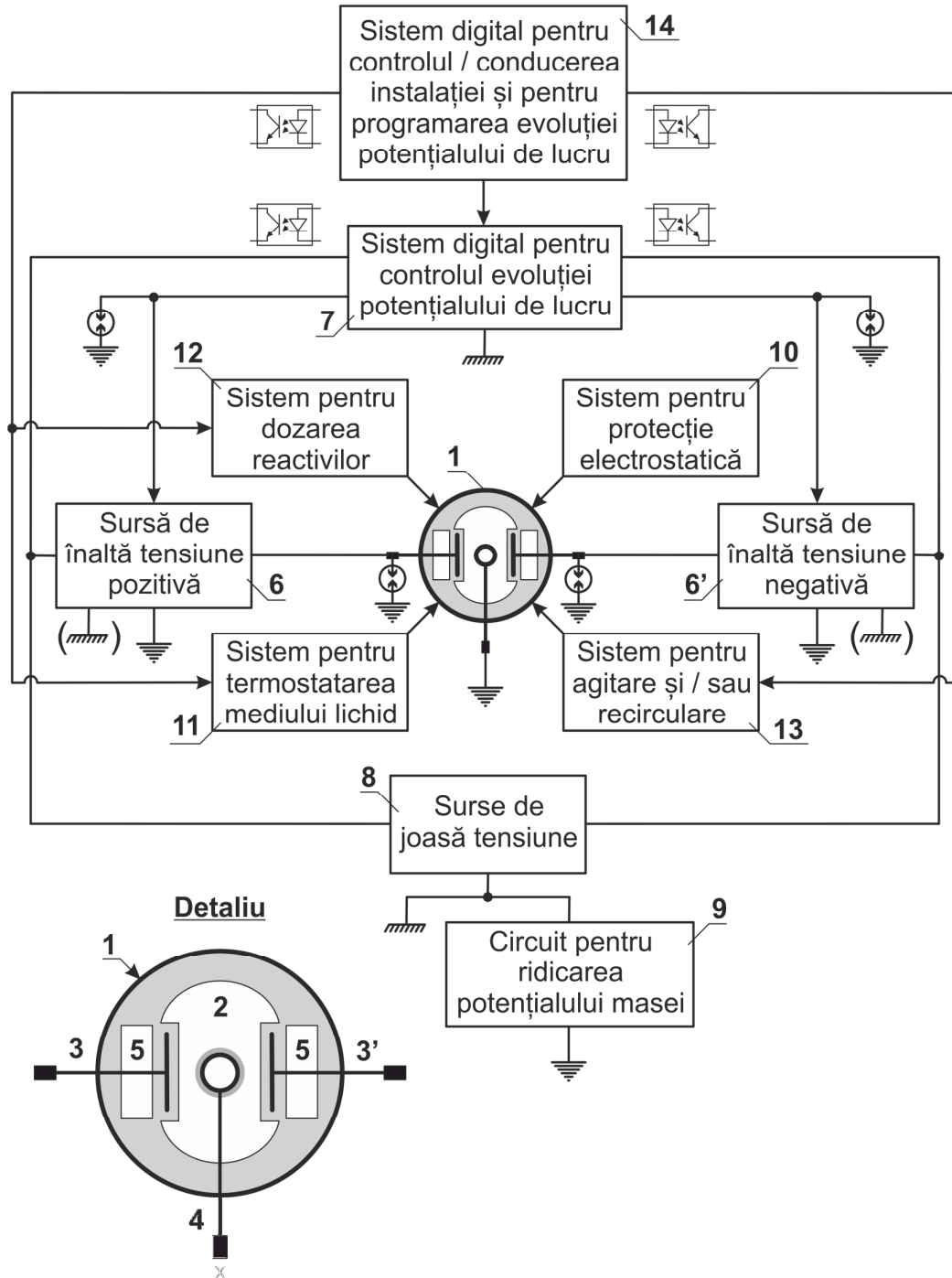


Figura 38. Schema bloc a instalației brevetate.

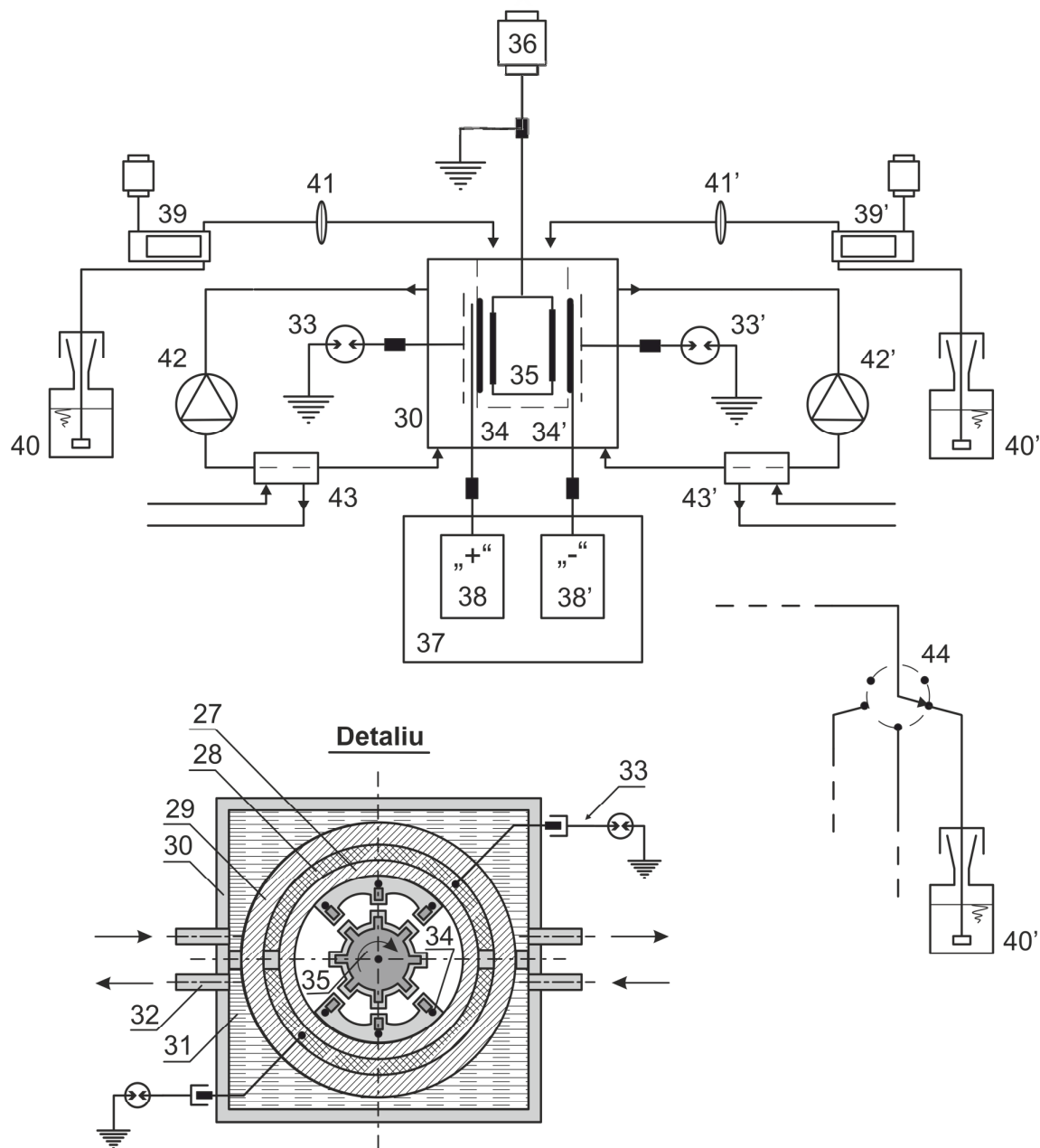


Figura 39. Schema funcțională a instalației brevetate.

Utilizând această instalație se obțin compozite anorganic – organic, în care cristalele de hidroxiapatită calciu-deficientă sunt nucleate și crescute în matricea unui compus biomacromolecular (atelocolagen sau polizaharid). Compozitul poate avea caracteristicile unui hidrogel și proprietăți tipice scaffold-urilor destinate cultivării *ex vivo* a celulelor. În plus, scaffold-urile astfel generate pot susține procesele de transfectare a celulelor fie utilizându-se acizi nucleici „nuzi”, fie cargocomplecși ai acizilor nucleici cu carrier-ii dezvoltați în cadrul proiectului. Astfel de scaffold-uri sunt aplicabile în transfectarea celulelor specifice osului.

Obiectivul 2'. Evaluarea capacitatii de eliberare controlata a unor medicamente din nanoparticule inteligente

2'.1. Nanoparticule inteligente pe baza de Pululan-g-poli(N-isopropilacrilamida) pentru eliberarea controlata a indometacinei

In ultimii zece ani cercetatorii au fost foarte implicati in realizarea sistemelor inteligente de eliberare controlata a medicamentelor care sunt capabile sa elibereze "la cerere" doza terapeutica. Vehiculele de transport si eliberare controlata a medicamentelor, la scara nanometrica, au fost formulate din polimeri termosensibili biodegradabili si biocompatibili si reprezinta o abordare promitatoare pentru eliberarea medicamentelor lipofile. Poli(N-isopropilacrilamida) (pNIPAAm), datorita proprietatilor sale deosebite, a fost folosita in acest studiu la obtinerea copolimerilor cu pululan si apoi a micelilor polimerice sensibile la stimuli, destinate eliberarii controlate a medicamentelor. pNIPAAm prezinta in apa o tranzitie de faza reversibila la aproximativ 32°C, tranzitie cunoscuta sub denumirea de temperatura critica de solubilizare (lower critical solution temperature, LCST). Micelele pot fi obtinute prin ridicarea temperaturii deasupra temperaturii critice a bloc-copolimerului care contine pNIPAAm, unde pNIPAAm formeaza miezul hidrofobic sau prin nanoprecipitare sub LCST, in prezenta unui medicament hidrofob. Copolimerii bloc sunt la baza polimerilor care formeaza micelle termosensibile.

Cu scopul de a realiza transportori nanoparticulati termosensibili cu o eficienta buna de inglobare a medicamentelor lipofile, au fost conceputi si sintetizati copolimeri termosensibili dublu-hidrofilici de tipul pululan-g-poli(N-isopropilacrilamida) (P-g-pNIPAAm) cu doua mase moleculare a grefelor termosensibile. Acestia au fost ulterior folositi pentru prepararea nanoparticulelor incarcate cu indometacina prin metoda dializei si nanoprecipitarii. Polimerii formeaza agregate in solutii apoase la o concentratie de 10 g/L deasupra temperaturii critice de agregare (3.36 g/L) si sub temperatura critica de solubilizare (LCST).

Spectrele FT-IR au pus in evidenta faptul ca forta motrice care produce agregarea are la baza legaturile de hidrogen dintre indometacina si lanturile de pNIPAAm ale copolimerului. Nanoparticule cu o structura compacta si uniforma s-au format dupa legarea indometacinei, sub LCST.

Au fost investigate efectul compozitiei copolimerului, concentratiei si a raportului polimer/medicament asupra marimii particulelor, continutului de medicament (DLC) si eficientei de incorporare (EE). S-a demonstrat ca DLC creste cu cresterea continutului de medicament in amestecul initial, atingand o valoare maxima de 40% la un raport de 1/1. Marimea nanoparticulelor de P-g-pNIPAAm incarcate cu medicament scade cu cresterea masei moleculare a unitatilor termosensibile, cu cantitatea de medicament inglobata si cu concentratia copolimerului. Astfel, au fost obtinute particule mai mici (145 nm) cu o distributie mai ingusta atunci cand s-au folosit polimeri cu o masa moleculara mai mare a grefelor.

Eficiența de înglobare a medicamentului a ajuns până la 80% atunci când raportul indometacina/polimer a fost de 1/1, iar concentrația polimerului 10 g/L. Viteza de eliberare a indometacinei din nanoparticule a fost influențată de temperatura, datorită ruperii legăturilor de hidrogen la temperaturi înalte, de gradul de încărcare cu medicament și de pH-ul mediului de eliberare.

2'.2. Sinteza și caracterizarea complexelor de incluziune pe baza de nitrat de propiconazol și β-ciclodextrine substituie.

Obiectivul principal al acestui studiu este raportarea sintezei și caracterizării complexelor de incluziune formați între nitratul de propiconazol (PCZH-NO₃) și sulfobutil eter-(β-CD-SNa) (SBE7-β-CD, Captisol), β-ciclodextrin-sulfat (β-CD-SNa) și monoclorotriazinil-β-ciclodextrina (β-CD-SNa) (Figura 40). Importanța acestui studiu derivă din faptul că infecțiile fungice au devenit recent o problemă medicală acută, alimentată, în mod paradoxal, de metodele de tratament tot mai sofisticate, în timp ce azolii, diazoli și triazolii, cum ar fi PCZH-NO₃, reprezintă o clasă de derivați chimici recunoscută de comunitatea științifică și medicală în ceea ce privesc proprietățile antifungice. Rezultatele obținute vor confirma formarea complexelor supramoleculare, stabilind raportul de combinație dintre componente și relația structură-stabilitate.

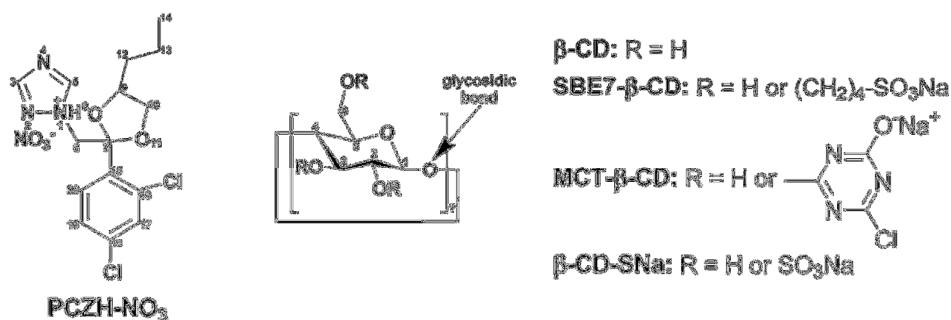


Figura 40. Structurile chimice ale PCZH-NO₃, β-CD și derivatelor acestora utilizate în acest studiu.

Complexii de incluziune formați între ciclodextrinele modificate chimic și PCZH-NO₃ au fost preparați prin metoda liofilizării, utilizând un amestec de solvent format din apă și etanol în raport de combinație 1:1 (v/v), în care au fost dizolvate atât ciclodextrinele modificate cât și medicamentul. Ulterior, soluțiile fiecărei ciclodextrine modificate (SBE7-β-CD, MCT-β-CD, β-CD-SNa) au fost amestecate separat cu soluția medicamentului (PCZH-NO₃), astfel încât să se obțină un raport de amestecare ciclodextrina : medicament = 1 : 1. Amestecurile de soluții au fost supuse agitării până când s-a observat apariția turbidității, după care s-au supus liofilizării.

Complecșii de incluziune sunt sub forma de pudra alba, cu un randament de reacție apropiat de 100%, așa cum au arătat studiile DSC.⁴³

Formarea complecșilor de incluziune a fost confirmată cu ajutorul tehnicilor de caracterizare RMN. Datorită complexității sistemului, în care pozițiile de substituție a ciclodextrinelor sunt distribuite statistic, formarea complecșilor de incluziune a fost dedusă în majoritatea cazurilor din deplasările chimice ale protonilor aromatici din PCZH-NO₃. Spectrele ¹H-RMN evidențiază schimbări ale frecvenței de rezonanță în cazul protonilor aromatici, atât a triazolului, cât și a unității 2,4-diclorfenilice. Variația deplasărilor chimice a fost atribuită perturbărilor induse acestor protoni datorită includerii în cavitatea ciclodextrinelor. Formarea complecșilor de incluziune a fost demonstrată suplimentar prin experimente ROESY. Spectrele ROESY (Figura 41) ale complecșilor de incluziune MCT-b-CD/PCZH-NO₃ and SBE7-b-CD/PCZH-NO₃ evidențiază semnale NOE generate de interacțiunea ciclului 2,4-diclorfenilic din PCZH-NO₃ cu protonii din cavitatea derivatilor de ciclodextrina. În consecință, se poate afirma că există în mod simultan două tipuri de complecși de incluziune: primul tip, în care ciclul 2,4-diclorfenilic intră în cavitatea ciclodextrinelor, și al doilea tip, în care ciclul triazolic se găsește inclus în cavitate. Datele obținute sugerează coexistența mai multor conformeri, ceea ce este o confirmare a studiilor teoretice anterioare.²⁰

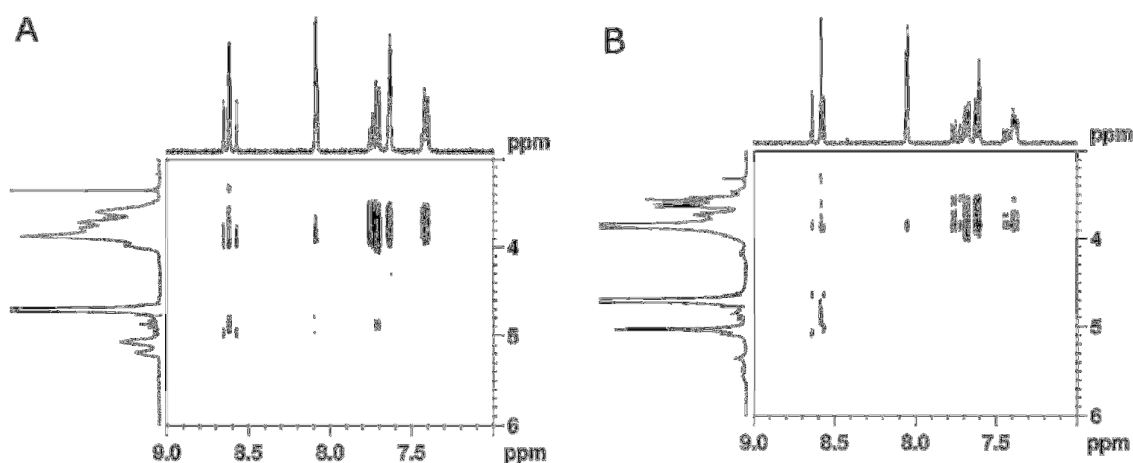


Figura 41. Spectrele ROESY ale complecșilor de incluziune (A) SBE7-b-CD/PCZH-NO₃ și (B) MCT-b-CD/PCZH-NO₃.

Spectrul 2D ROESY a complexului de incluziune b-CD-SNa/PCZH-NO₃ nu este concludent, probabil datorită radicalilor sulfat (–SO₃[–]) legați de atomii de oxigen hidroxilici.

Constantele de asociere (K_a) ale complecșilor de incluziune au fost determinate prin tehnici de titrare a ¹H-RMN a PCZH-NO₃ cu fiecare ciclodextrina modificată, utilizând deplasările chimice ale protonilor 2,4-diclorfenilici și aplicând o versiune modificată a ecuației Hildebrand.⁴⁴ În acest experiment, spectrele ¹H-RMN ale amestecurilor de soluții de medicament și ciclodextrine au fost obținute

mentinand constanta concentratia de PCZH-NO₃, variind concentratia ciclodextrinelor modificate. Reprezentarea grafica a ecuatiei Hidebrand adaptata pentru RMN furnizeaza drepte, ceea ce confirma faptul ca complexii de incluziune au o stoechiometrie dictata de raportul de amestecare de 1:1 (mol/mol).⁴⁵ Valorile constantelor de asociere sunt 1050 si 250 M⁻¹ corespunzatoare complexilor de incluziune SBE7-β-CD si MCT-β-CD.

Activitatea antifungica a complexilor a fost testata pe 20 de izolate clinice din genul *Candida* (10 *C. albicans* + 10 *C. glabrata*) cultivate in faza planctonica. Evaluarea susceptibilitatii *in vitro* a fost realizata conform recomandarilor EUCAST EDef 7.2.⁴⁶ Impotriva levurilor planctonice, toti cei patru complexi au prezentat activitate antifungica la concentratii scazute si similare (Figura 42). Experimentele au aratat ca, in majoritatea cazurilor, valorile concentratiei minime inhibitorii (CMI) au fost in concordanta, diferentele fiind in limitele intervalului acceptat, de ± o dilutie log₂ (binara seriata).⁴⁷ Aceasta similaritate sugereaza ca natura ciclodextrinei nu influenteaza in mod semnificativ comportamentul *in vitro* al PCZH-NO₃ fata de celulele fungice.

Citotoxicitatea a fost evaluata pe fibroblasti umani dermici normali – NDHF (PromoCell) utilizandu-se testul CellTiter 96[®]AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) aplicand protocolul recomandat de producator.⁴⁸ Curbele de regresie neliniară au arătat complexul PCZH-NO₃ cu β-CD parentală a fi mai toxic decât complexii cu cei trei derivați de β-CD. Concentratiile inhibitorii mediane (IC₅₀) au fost cu 2-3 ordine de marime mai ridicate fata de concentratiile necesare pentru activitate antifungica.

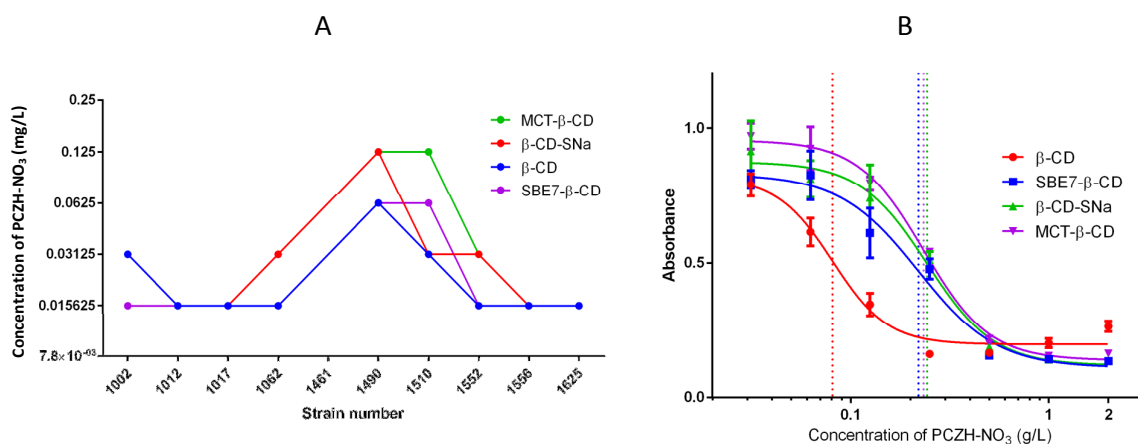


Figura 42. Activitatea biologica a complexilor de incluziune.

A: Concordanta valorilor CMI ale celor patru complexi de incluziune ai PCZH-NO₃ cu β-CD si derivatii ei testati pe izolate de *Candida albicans*;

B: Citotoxicitatea celor patru complexi de incluziune ai PCZH-NO₃ cu β-CD si derivatii ei – fitare neliniara a curbelor doza-raspuns. Liniile punctate indica valorile IC₅₀.

Concluzii:

Studiile ^1H - and 2D ROESY RMN au evidențiat formarea complexelor de incluziune între propiconazolul nitrat și trei tipuri de ciclodextrine modificate chimic.

Titrarea RMN a permis măsurarea constantei de asociere, evidențiind faptul că PCZH- NO_3 formează cel mai stabil complex de incluziune cu SBE7-b-CD, probabil datorită interacțiunilor ciclurilor organice de dioxanil și triazolic cu atomii de oxigen glicozidici sau cu grupele $-\text{SO}_3^-$. Adicional, experimentele de titrare au furnizat valorile raportului de complexare între cei doi componente ai complexelor de incluziune ca fiind de 1:1.

Lipsa diferențelor semnificative în testele de sensibilitate antifungică și diferențele de citotoxicitate între complexul cu β -CD parentală și complexii cu derivați ai acesteia sugerează că tipul de ciclodextrină ar fi mai important pentru interacțiunea azolului cu gazda infectată decât pentru activitatea antifungică propriu-zisă.

2.3. Noi materiale hibride pe baza de hidroxizi dublu lamelari (LDHs) folosite ca sisteme de eliberare controlată a medicamentelor

Hidroxizii dublu lamelari (LDHs) reprezintă o clasă de materiale cu structură stratificată, în care straturile sunt încărcate pozitiv, iar stabilitatea structurii este asigurată de cationi, care leagă electrostatic straturile adiacente.⁴⁹ LDHs sunt materiale biocompatibile care pot fi utilizate ca matrici pentru stocarea de biomolecule/medicamente, dar și ca sisteme cu eliberare controlată a acestora.⁵⁰⁻⁵³

Numeroase studii arată că prin intercalarea medicamentelor în straturile de LDHs nu se reduc numai efectele secundare ale medicamentului, ci în unele cazuri, se observă și o creștere importantă a solubilității acestora. Clorhidratul de tramadol (TrH) este un medicament din clasa opioidelor utilizat pentru a trata durerea moderată până la cea severă. TrH este rapid procesat de către organismul uman și efectul terapeutic se pierde în numai patru până la aproximativ șase ore, iar pentru a se menține efectul terapeutic ar trebui să se administreze până la cinci doze zilnice. Prin urmare, mai multe sisteme de eliberare controlată a TrH au fost dezvoltate folosind diferite materiale compozite de tip montmorillonit, microparticule pe baza de etilceluloză sau fibre schimbătoare de ioni.⁵⁴

Având în vedere acest fapt, ne-am orientat atenția spre obținerea de noi materiale hibride pe baza de hidroxizi dublu lamelari (LDHs) capabile să intercaleze medicamente și să acționeze ca sisteme eficiente de eliberare a acestora. Clorhidratul de tramadol a fost ales ca medicament model, și a fost intercalat într-o matrice de ZnAl LDH sub formă nitrat folosind metoda schimbului ionic. TrH a fost utilizat în diferite cantități de câte 0,1, 0,4 și 0,8 g pentru fiecare 2 g ZnAl LDH. Precursorii și materialele hibride au fost caracterizate prin XRD, FT-IR, RAMAN, EDX și SEM.

Difractogramele XRD (Figura 43) prezinta reflexii simetrice ale planurilor (003), (006), (009) și (110), caracteristice materiale stratificate. Conform datelor XRD, intercalarea moleculelor de TrH s-a realizat numai in cazul compusilor ZnAILDH_TrH 0.4 si ZnAILDH_TrH 0.8, atunci cand are loc o crestere a distantei interlamelare de la 8.74 Å pentru ZnAILDH la 9.29 Å si 11.55 Å pentru compusii hibridi. In cazul ZnAILDH_TrH 0.1 intercalarea nu s-a realizat (nu exista nici o schimbare in difractograma XRD), dar a avut loc adsorbția moleculelor de TrH pe suprafața LDHs.

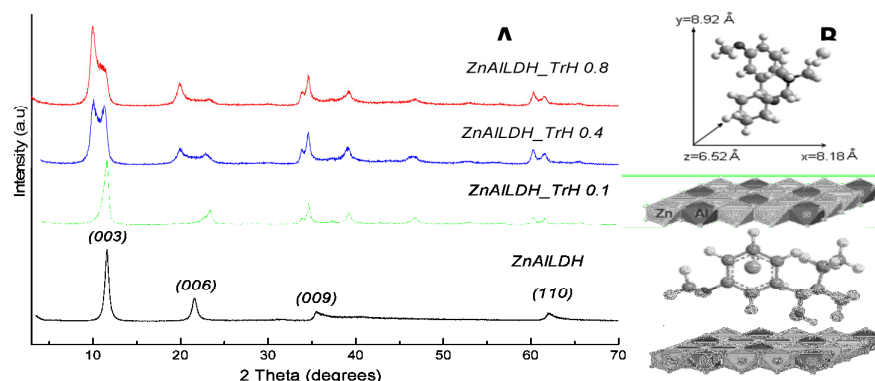


Figura 43. (A) Difractogramele XRD pentru ZnAILDH, ZnAILDH_TrH 0.1, ZnAILDH_TrH 0.4 si ZnAILDH_TrH0.8; **(B)** Reprezentarea tridimensională a moleculei de TrH și modelul propus pentru orientarea TrH in spațiul interlamelar.

Spectroscopia FT-IR și Raman ne ofera informații despre natura ionilor prezenți între straturi. In spectrele FT-IR și Raman ale materialelor hibride pot fi observate benzi de absorbție caracteristice matricei LDH cu o serie de benzi de vibrație caracteristice ale TrH (Figura 44).

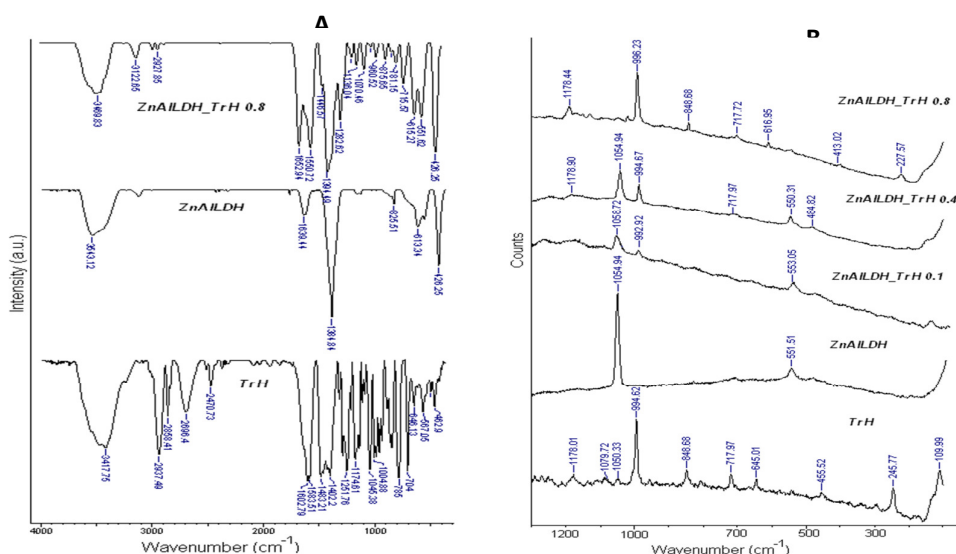


Figura 44. (A) Spectrele FT-IR și **(B)** RAMAN înregistrate pentru compusii indicați.

Analiza EDX confirma prezenta medicamentului in compusul hibrid, prin cresterea procentului de carbon si prin prezenta clorului, existent in moleculele de TrH (Figura 45).

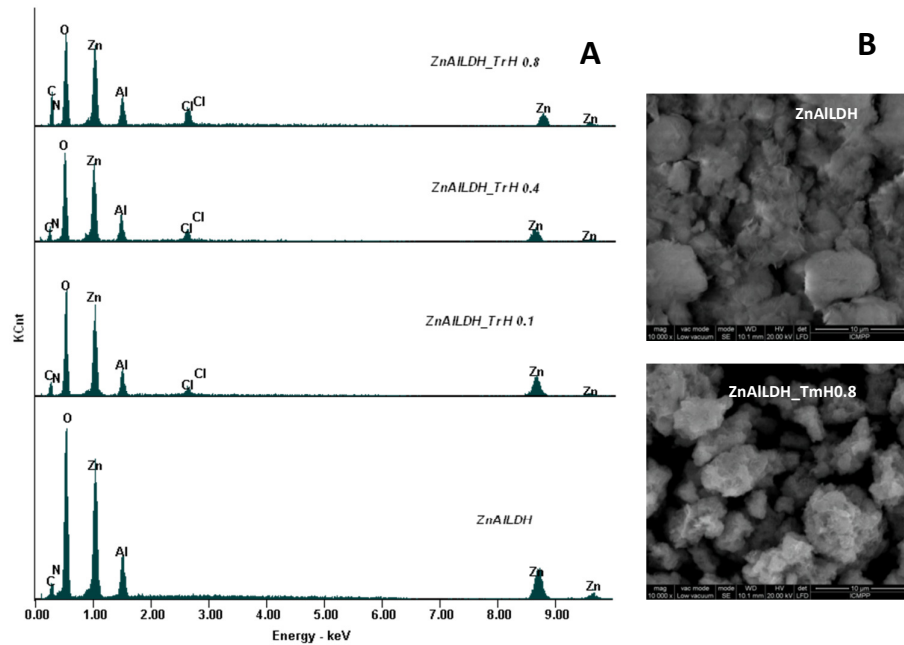


Figura 45. (A) Spectrele EDX pentru ZnAILDH, ZnAILDH_TrH 0.1, ZnAILDH_TrH 0.4 si ZnAILDH_TrH 0.8; (B) Micrografiile SEM pentru ZnAILDH si ZnAILDH_TrH 0.8

Microfotografiile SEM (Figura 45B) pentru ZnAILDH redau o structura poroasa, cu particule de forma hexagonala, bine definite, cu dimensiuni în domeniul 1-1.5 μm .

Rezultatele obtinute indica faptul ca TrH este prezent in spatiul interlamelar in cazul ZnAILDH_TrH 0.4 si ZnAILDH_TrH 0.8, atunci cand s-a utilizat o cantitate mai mare de TrH pentru schimbul ionic. Din spectrele FT-IR si RAMAN (Figura 44) se poate observa absenta benzilor de vibratie caracteristice ionilor nitrat, ceea ce confirma inlocuirea lor cu anioni de medicament. In celelalte cazuri a fost observata o intercalarea partiala a TrH intre straturi si o absorbtie semnificativa pe suprafata ZnAILDH. Acest studiu sugereaza ca TrH poate fi intercalat in straturile de ZnAILDH, iar noile materiale hibride ar putea deschide perspective interesante pentru obtinerea de rezervoare pentru medicamente si a sistemelor cu eliberare controlata.

Obiectivul 3. Evaluarea potențialului de transfecție al matricelor macromoleculare și al vectorilor asociați

Pentru indeplinirea acestui obiectiv au fost examinate efectele incorporarii unor polipectsi sintetizati in cadrul proiectului (Sq-bPEI si Sq-bPEI-G(Sq-bPEI si Sq-

bPEI-G, sintetizati in etapa 2016, C60-bPEI si cD₄^H-bPEI sintetizati in perioada 2013-2015) intr-o matrice 3D hibrida, biomimetica si macroporoasa (sintetizata in etapa 2015) utilizabila in regenerarea tesuturilor dure (osoase).

3.1. Valorificarea abilitatii de transfectie a matricelor macromoleculare incarcate cu diferiti poliplecsi (Poliplecsi vector/dsADN incarcate in matrici macroporoase hibride. Studiul cineticii de eliberare a materialului genic si al eficientei de transfectie *in vitro*).

Poliplecsii incarcate in matricile macroporoase

In acest studiu au fost incarcate in matrici macroporoase hibride poliplecsi complet caracterizati pe baza de vectori non-virali de tipul: Sq-bPEI (Schema 1, etapa 2016). C60-PEI (Figura 46)⁵⁵ si cD₄^H(Figura 47)⁵⁶ (conform publicatiilor rezultate din acest proiect). Poliplecsii au fost formati prin interactiunea dintre vectorul non-viral si dsADN de somon sau ADN plasmidic. Din aceste datele preliminare obtinute pentru vectorii non-virali Sq-bPEI (Obiectiv 2, etapa 2016), pentru urmarirea efectelor in transfectie dupa inglobarea poliplecsilor corespunzatori in matricea 3D hibrida au fost utilizati numai poliplecsii cu raport N/P de 10. De asemenea, experimentele anterioare au demonstrat ca cea mai buna eficienta de transfectie a celulelor HEK 293T, fara un efect citotoxic semnificativ, s-a obtinut la un raport N/P=60 intre cD4-AGE-PEI si pDNA si 30 intre C60-PEI si pDNA (Uritu CM et al., 2015).

De asemenea, au fost formate poliplecsi intre PEI 25kDa ramificat si pDNA la un raport de N/P=2 (stabilit in studii anterioare ca fiind optim pentru a se obtine o eficienta mare de transfectie si avand o citotoxicitate scazuta).

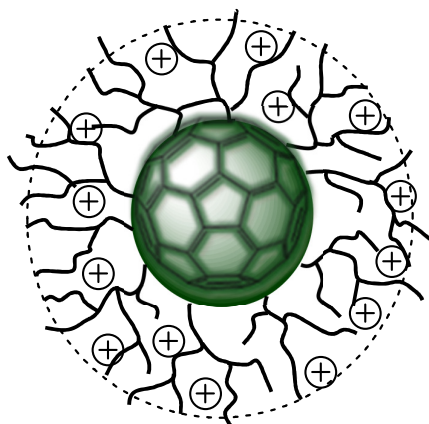


Figura 46. Vector bazat pe bPEI cu miez format din C60.

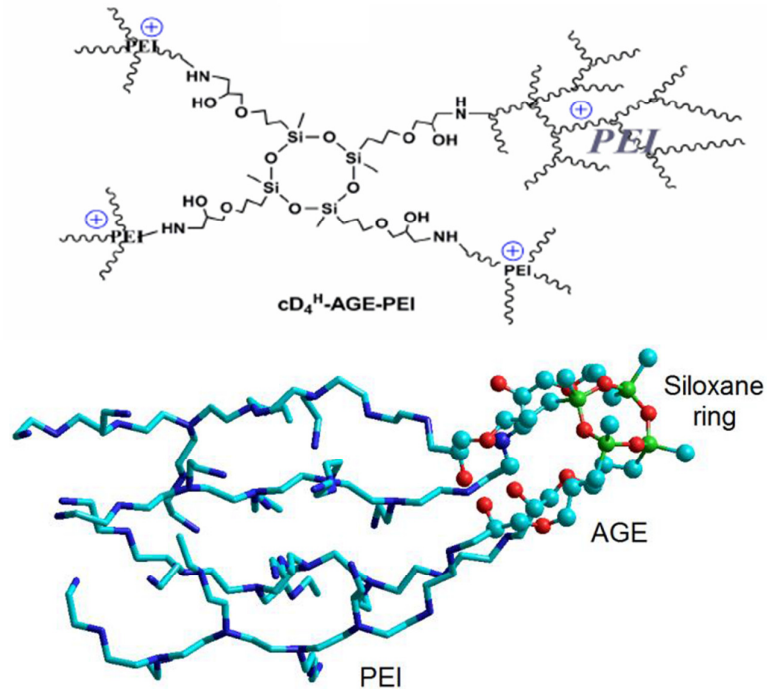


Figura 47. Vector hiperramificat cu bPEI si miez cD_4^H .

Matrici macromoleculare incarcate cu diferiti polipepsi

S-au dezvoltat mai multe sisteme complexe prin imobilizarea unor polipepsi in matrici macroporoase hibride sintetizate anterior (raportul din 2015), cu arhitectura poroasa si rezistenta mecanica optimizata in vederea aplicarii pentru regenerarea osoasa.

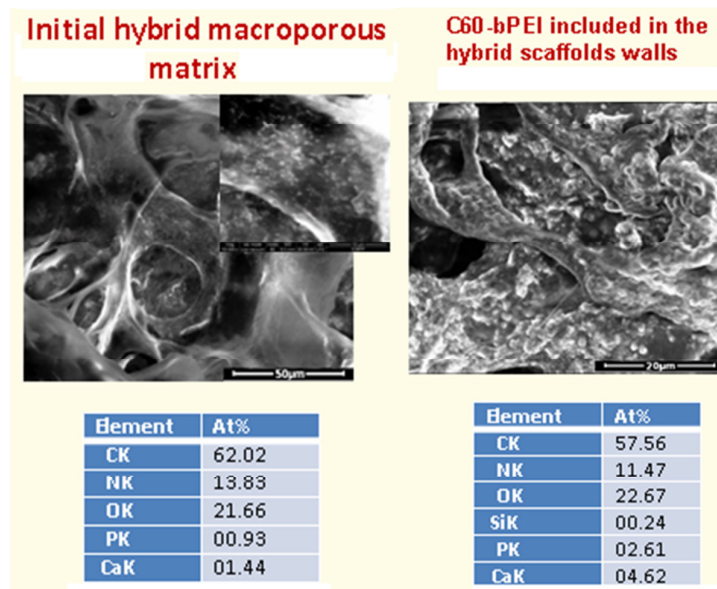
Avand in vedere posibila aplicatie ca sisteme pentru regenerarea osoasa, s-a luat in considerare structura osului natural, dorindu-se obtinerea unor materiale hibride cat mai apropiate ca structura si proprietati. Formularile selectate includ doi biopolimeri, principalele componente ale matricii extracelulare (proteina/ateocolagen si GAG/derivat de acid hialuronic), un derivat de poli(ϵ -caprolactona) care este un polimeri sintetic cu rol de agent de reticulare si de control al ratei de degradare, si nanohidroxiapatita functionalizata la suprafata cu polietilenimina liniara (LPEI, 1.8kDa) (criogel CH10P10HAp25-15, matrici formate din atelocolagen (68%), dimetilsilandioliolhialuronat (7%), policaprolactona (7%), hidroxiapatita functionalizata cu 5% liniar PEI (18%) cu un diametru de 5 mm au fost hidratate in prezenta de pDNA (plasmidele pEYFP sau pCMV-luc) necomplexat sau a poliplexelor formate intre vectorii mentionatisau PEI 25k si pDNA. Plasmidul pCMV-luc este un plasmid ce codifica enzima luciferaza sub promotorul pentru citomegalovirus (CMV), iar eficienta de transfectie poate fi urmarita cu ajutorul unui luminometru. Plasmidul pEYFP-C1 codifică o proteină fluorescentă (excitație/emisie: 513/527 nm), ce poate fi vizualizată cu ajutorul microscopului de fluorescență, folosind filtrul pentru FITC). Drept controale au fost folosite probe de poliplexe sau PEI 25K/pDNA cu aceeasi concentratie de ADN, dar in absenta matriciei). Functionalizarea de suprafata a

hidroxiapatitei si dimensiunile din domeniul nano favorizeaza distributia uniforma a materialului anorganic in matrice, asigurand implicit o crestere a rezistentei mecanice. Criogelarea a fost aleasa ca metoda de preparare pentru a asigura morfologia si porozitate optima (pori interconectati cu dimensiunea de 80-100µm). Compozitia sistemului a fost proiectata pentru a permite interactiuni specifice cu poliplecsii.

Formulara de baza a fost preparata prin incubarea matricii intr-o solutie apoasa de poliplex la temperatura camerei timp de 60 de minute, urmata de liofilizare. Pentru a nu afecta proprietatile mecanice ale sistemului a fost utilizata o cantitate de 5% ADN, raportat la masa matricii.

Pentru a evalua cinetica de eliberare a ADN-ului, vectorii au fost marcati cu FTIC (Fluorescein isothiocyanate) Pentru a examina efectul inserarii poliplexului in peretii matricii, pe langa metoda mentionata mai sus, s-a apelat si la realizarea unei matrici in care purtatorul C60-bPEI-FITC a fost introdus intre precursorii matricii inaintea criogelarii.

Din imaginile SEM se poate observa ca datorita functionalitatii mari a matricii, poliplexul poate fi imobilizat prin interactiuni non-covalente nu doar la supafata matricii, ci si in interiorul porilor (Figura 48). In timpul incubarii s-a observat disparitia poliplexului din solutie, fapt ce indica afinitatea mare a sa pentru matrice (colagenul poate el insusi complexa cu ADN-ul, iar nHAp si gAG pot dezvolta interactiuni specifice cu PEI). In cazul criogelului in care purtatorul C60-bPEI-FITC a fost introdus de la inceputul sintezei se poate observa clar o ingrosare a peretilor porilor. Se pot observa particule cu dimensiunea cuprinsa intre 500-700 nm dispersate uniform in matrice. Retentia materialului ce contine bPEI a fost confirmata si cu ajutorul analizei EDX.



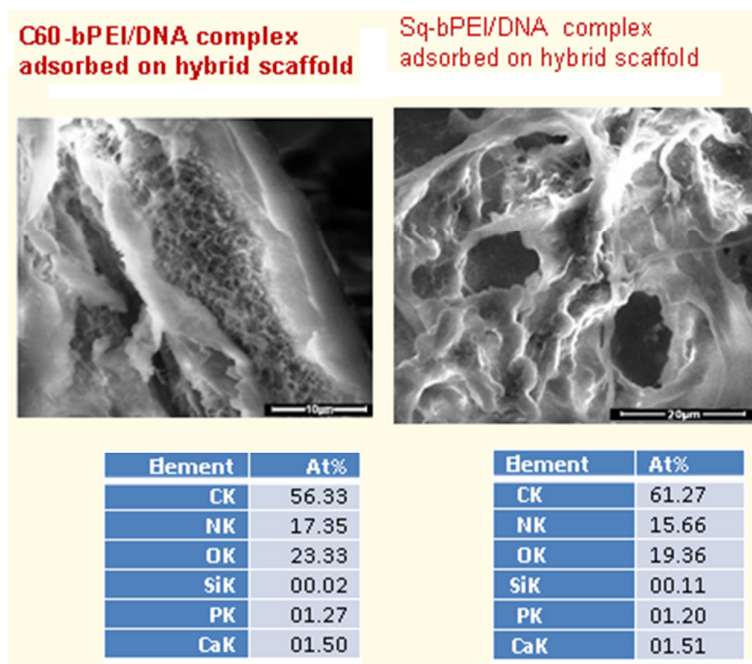


Figura 48. Micrografiile SEM si datele EDX ce confirma adsorbtia eficienta a poliplexului si incluziunea vectorilor Sq-bPEI-FITC si C60-bPEI-FITC in structura criogelului.

Pentru a studia cinetica de eliberare, matricile hibride au fost imersate in apa si incubate la 37°C pe un agitator la 200 rpm. La diferite intervale de timp, 100µL de supernatant au fost extrase, diluate de 100 de ori si analizate spectral prin teste UV-VIS si de fluorescenta. In cazul analizei UV-VIS, testele au fost efectuate folosind ca martor supernatantul de la o matrice ce nu contine poliplex. Dupa fiecare extractie, probele au fost completate cu apa bidistilata pentru a ajunge la volumul initial.

Pentru sistemul care contine criogel hibrid si poliplexul format din Sq-bPEI-FITC si ADN de somon, rezultatele evaluarii cineticii sunt prezentate in Figura 49.

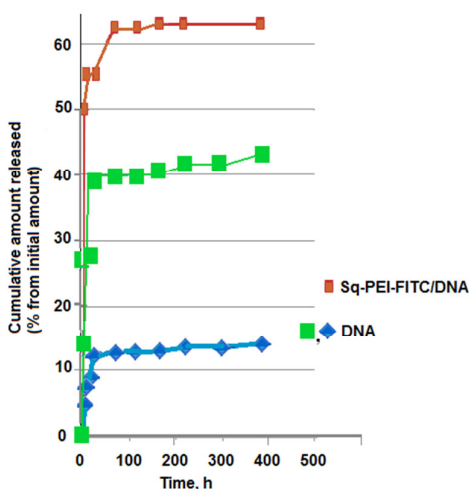


Figura 49. Evaluare cantitativa a cineticii de eliberare a vectorului wt% Sq-bPEI-FITC; wt% ADN de somon si wt% vector plus ADN.

Deși raportul masic între vector și ADN este 2, în primele 24 de ore se eliberează de 10 ori mai mult vector decât ADN. Acest lucru indică faptul că inițial se eliberează purtătorul liber ce este slab adsorbit la suprafața matricei. De asemenea, graficul evidențiază menținerea unei concentrații ridicate de ADN în micro-mediul matricei prin eliberare sustinută. O perioadă îndelungată după 100h raportul vector /ADN rămâne la o valoare de circa 5.

Poliplexul eliberat a fost supus analizei prin electroforeza pe gel de agaroză pentru a determina integritatea acestuia. Pe parcursul experimentului nu s-au observat modificări.

Testarea capacității matricei de a livra poliplexele înglobate și de a realiza transfecție celulară

A. Studiile preliminare au verificat faptul că eliberarea materialului genetic *in vitro* prezintă capacitatea de transfecție. Studiul comparativ *in vitro* al eficienței de transfecție între poliplexii formați între vectorul cD4-bPEI și plasmidul CMV-luc (pCMV-luc) la N/P=60, poliplexii formați între bPEI (25kDa) și pCMV-luc (N/P=2), și pCMV necomplexat - a evidențiat o expresie genică mai bună pentru proba bazată pe cD4-bPEI (1.8kDa) (Figurile 50 și 51) atât în forma liberă cât și inclusă în matrice. S-a obținut o capacitate prelungită de expresie a genelor (sistemele cu matrice erau active și după 196 de ore, față de cele fără, care sunt limitate la 86 de ore), la nivele bune, fără afectarea celulelor în cazul includerii în matrice. Evaluarea expresiei genelor în timp a fost efectuată pe celule HEK 293T.

Experimentele au evidențiat, de asemenea, că matricile nu au împiedicat procesul de transfecție și nici nu au avut un efect negativ asupra culturilor de celule.

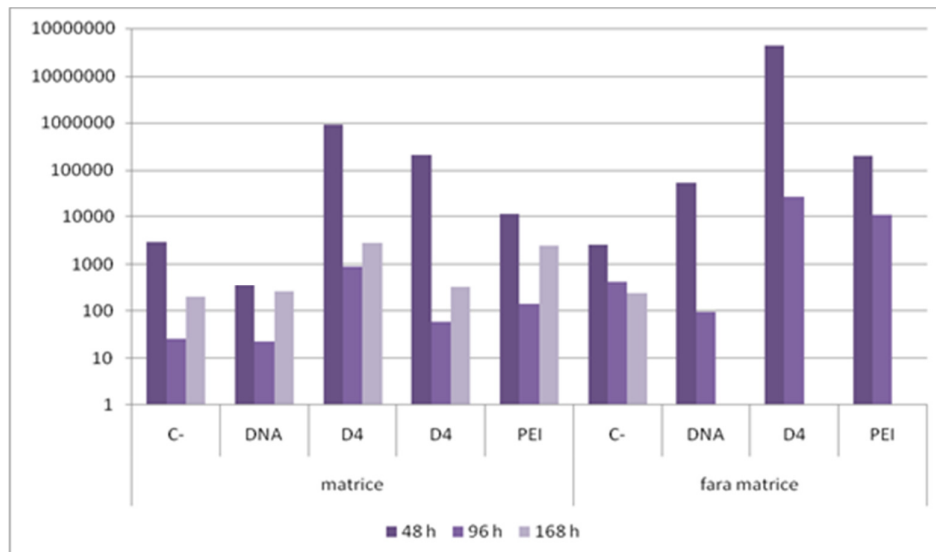


Figura 50. Eficiența la transfecție evaluată comparativ pentru diferite sisteme:

C- celule de control (HEK 293T);

DNA- celule incubate doar cu pADN;

D4- celule incubate cu D4-PEI/pCMV-luc(N/P=60);

PEI celule incubate cu PEI25k/pCMV-luc (N/P=2)

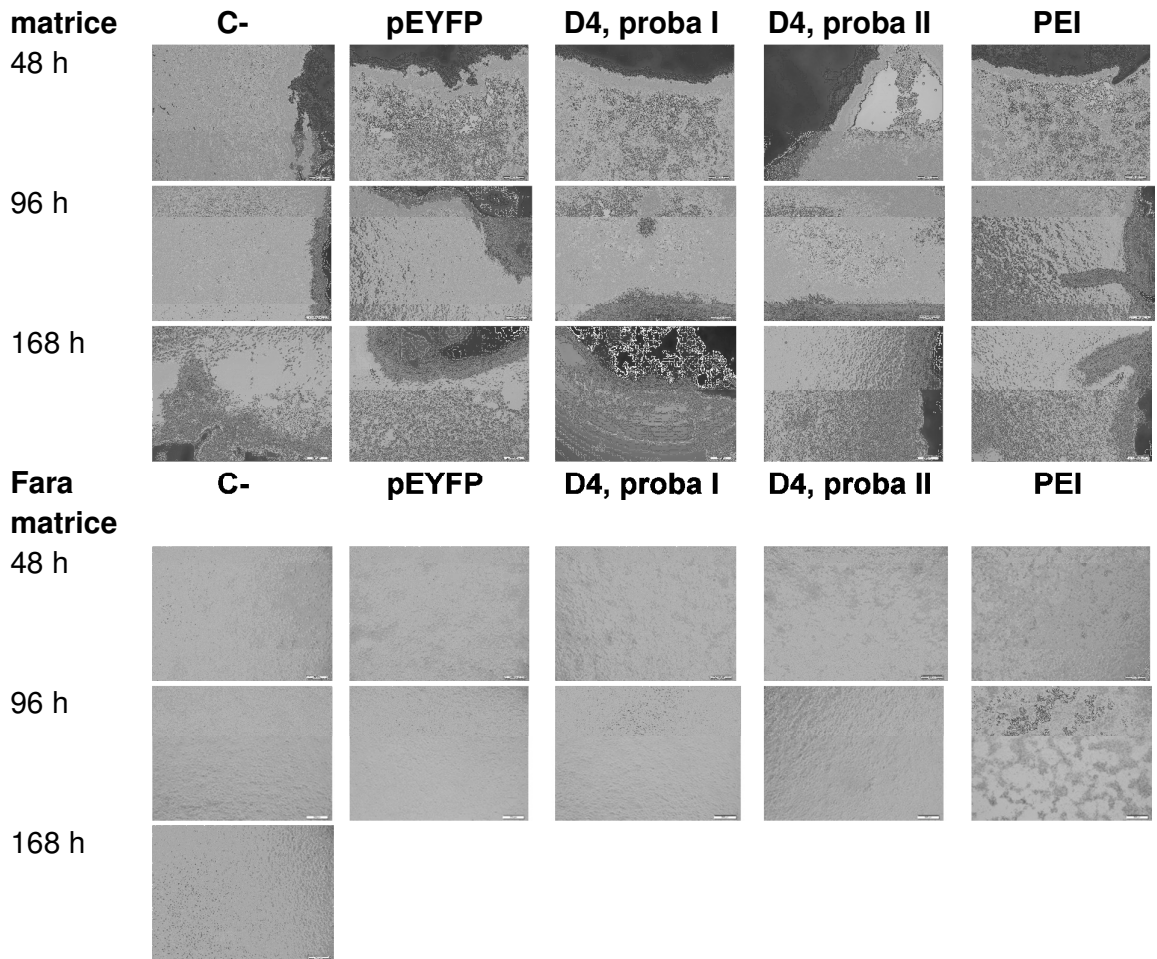


Figura 51. Imagini ale culturilor de celule la diferite momente de timp din timpul investigatiei.

B. Capacitatea matricelor ce contin C60-PEI (Uritu MC si colab.) inclus in peretii matricei de a media transfectia plasmidului pEYFP (complexat ulterior cu C60-PEI din membrana) in celulele HEK 293T a fost urmarita cu ajutorul microscopului de fluorescanta. Imaginile campurilor de contrast de faza suprapuse peste cele de fluorescanta se pot observa in Figura 52. Se poate constata o transfectie foarte buna a celulelor incubate cu poliplexe C60-PEI/pEYFP libere la 3 si 6 zile de incubare, o exprimare a proteinei fluorescente observandu-se in cateva celule pana la 13 zile de incubare poliplexe-celule. In cazul formarii poliplexelor intre plasmidul pEYFP si C60-PEI imobilizat in matrice, se observa dupa 3 zile de incubare matrice/poliplexe-celule, ca poliplexele formate in matrice sunt capabile sa realizeze transfectia celulelor din vasul de cultura peste care au fost adaugate. Acest fapt sugereaza ca poliplexele sunt eliberate din matrice si sunt capabile sa determine exprimarea proteinei fluorescente. Proteina fluorescenta este observata pana la 13 zile de incubare matrice/poliplexe cu celulele. Se poate remarca degradarea progresiva a matricei incepand cu 6 zile de incubare la 37°C in prezenta celulelor, iar la 17 zile cand

integritatea matricei este serios afectata nu se mai poate observa prezenta proteinei fluorescente in celule.

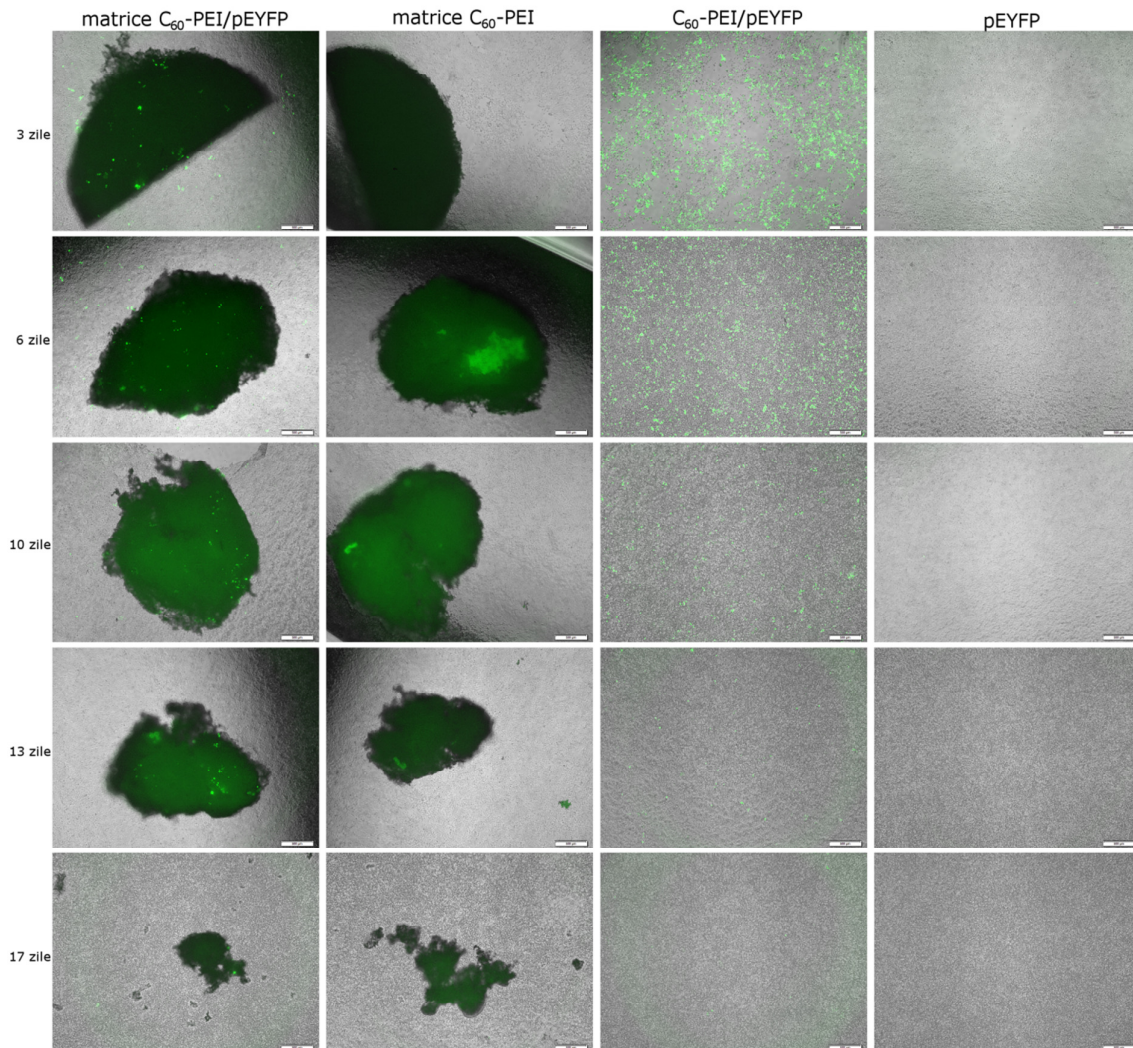


Figura 52. *Exprimarea proteinei YFP in celulele HEK 293T incubate in prezenta matricelor ce contin C60-PEI inclus in peretii matricei si complexat cu pEYFP la un raport N/P=30. Drept control sunt prezentate imaginile obtinute in cazul folosirii matricelor in absenta pEYFP si imaginile obtinute cand transfectia a fost realizata cu poliplexele C60-PEI/pEYFP la raport N/P=30 sau cu plasmidul pEYFP necomplexat folosit in aceeasi concentratie ca cea utilizata pentru realizarea poliplexelor. Imaginile reprezinta suprapunerea dintre imaginile de fluorescanta si imaginile de contrast de faza. Bara: 500 μ m.*

Rezultatele care redau analiza cantitativa a nivelului de exprimare in timp a proteinei fluorescente folosind citometria de flux sunt prezentate in Figura 53. La intervalele de timp mentionate, o parte din celulele tripsinizate de pe placile de

cultura incubate in prezenta matricelor cu C60-PEI complexate cu pEYFP, sau a matricelor C60-PEI si in prezenta poliplexelor C60-PEI/pEYFP libere sau pEYFP au fost investigate cu ajutorul citometrului de flux. Se observa un procent ridicat de celule care exprima proteina YFP (aprox. 45 %) la 3 zile de la incubarea celulelor in prezenta matricelor C60-PEI/pEYFP iar exprimarea proteinei fluorescente in celule este foarte scazuta dupa 6 zile. In cazul poliplexelor C60-PEI libere, o exprimare a proteinei fluorescente in aprox. 20 % dintre celule este determinata la 6 zile de la transfecția cu poliplexele libere.

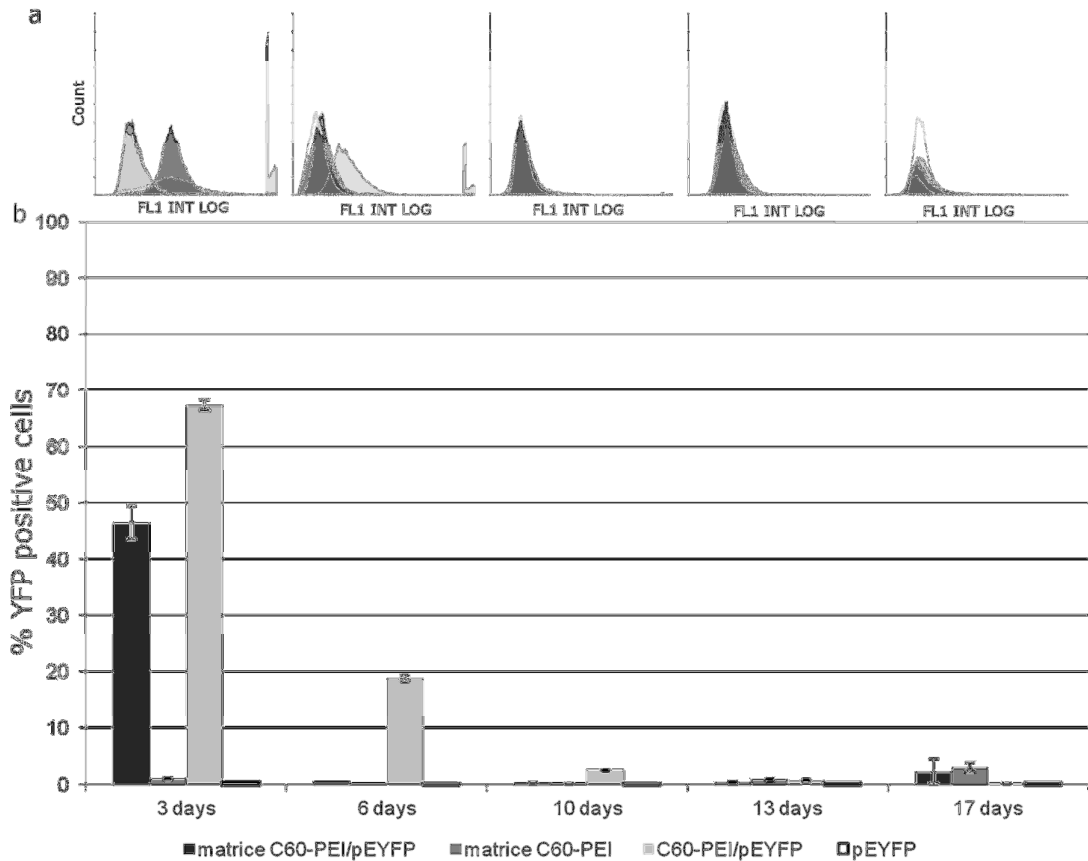


Figura 53. Analiza, in timp, cu ajutorul citometriei de flux a expresiei proteinei fluorescente YFP in celulele HEK 293T incubate cu poliplexe formate intre C60-PEI imobilizat in matrice si pEYFP (matrice C60-PEI/pEYFP), matrice fara plasmid (matrice C60-PEI), poliplexe libere (C60-PEI/pEYFP) si pDNA necomplexat (pEYFP). Sunt prezentate histogramele cell count versus fluorescanta masurata in canalul FL1 (a) si reprezentarea statistica a % de celule pozitive pentru proteina YFP in timp (b).

Investigarea matricei ce contine imobilizat in pereti vectorul C60-PEI-FITC (cuplat cu molecula fluorescanta FITC) in aceleasi conditii ca si matricea ce contine C60-PEI este redată in Figurile 54 si 55. Se poate observa prezenta FITC in peretii matricei si de asemenea ca matricea nu are efect citotoxic asupra celulelor HEK

293T. Datele obtinute cu ajutorul citometriei de flux arata o transfectie de aprox. 40 % la 3 zile de la incubare matrice/poliplexe-celule. La 6 zile, numarul de celule transfectate este de aprox. 5 % care nu difera de rezultatul obtinut cu matricea cu C60-PEI-FITC in absenta pEYFP sugerand un rezultat fals pozitiv dat probabil de FITC-ul eliberat din matrice si preluat de celule care poate fi detectat in acelasi canal de fluorescenta FL1 de catre citometrul de flux (Figura 53).

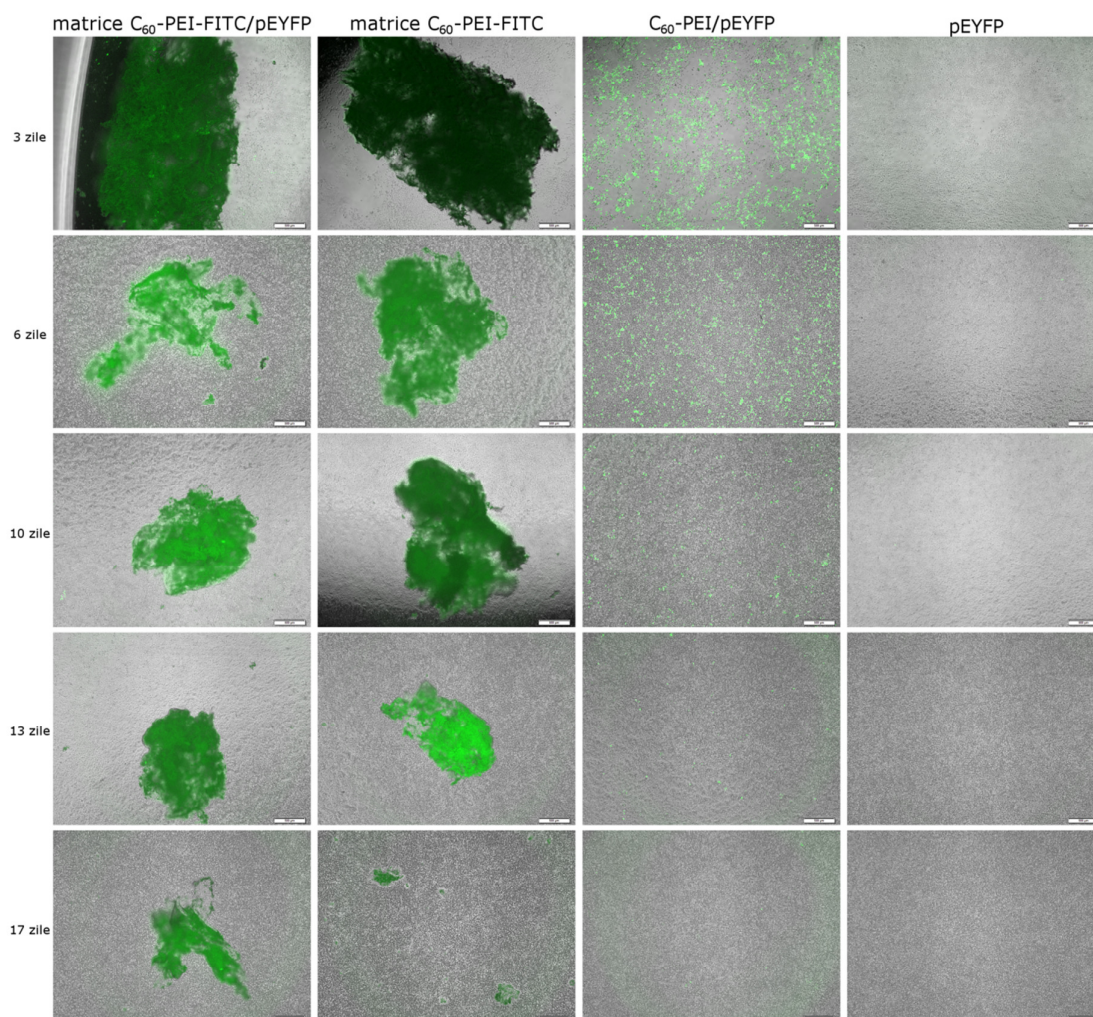


Figura 54. *Exprimarea proteinei YFP in celulele HEK 293T incubate in prezenta matricelor ce contin C60-PEI-FITC inclus in peretii matricei si complexat cu pEYFP la un raport N/P=30 Drept control sunt prezentate imaginile obtinute in cazul folosirii matricelor in absenta pEYFP si imaginile obtinute cand transfectia a fost realizata cu poliplexele C60-PEI-FITC/pEYFP la raport N/P=30 sau cu plasmidul pEYFP necomplexat folosit in aceeaasi concentratie ca cea utilizata pentru realizarea poliplexelor. Imaginile reprezinta suprapunerea dintre imaginile de fluorescenta si imaginile de contrast de faza. Bara: 500 µm.*

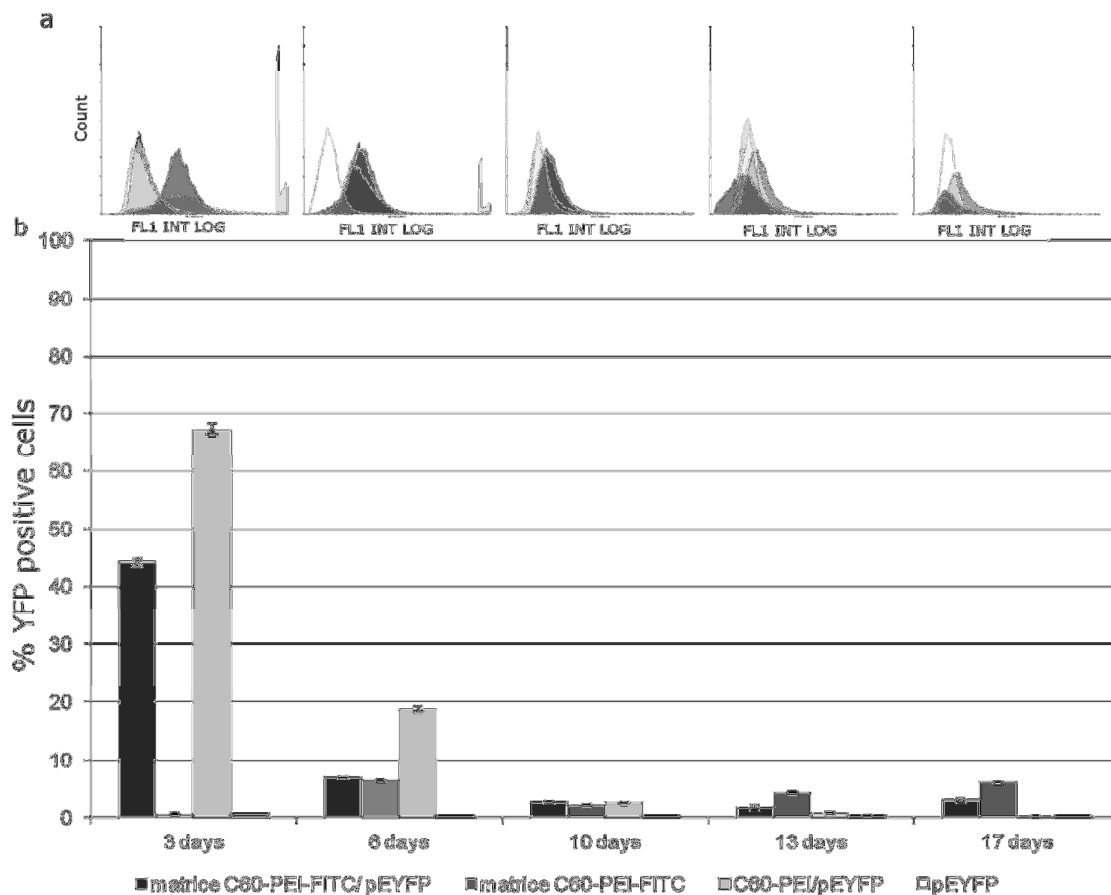


Figura 55. Analiza, in timp, cu ajutorul citometriei de flux a expresiei proteinei fluorescente YFP in celulele HEK 293T incubate cu poliplexe formate intre C60-PEI-FITC imobilizat in matrice si pEYFP (matrice C60-PEI-FITC/pEYFP), matrice fara plasmid (matrice C60-PEI-FITC), poliplexe libere (C60-PEI/pEYFP) si pDNA necomplexat (pEYFP). Sunt prezentate histogramele cell count versus fluorescena masurata in canalul FL1 (a) si reprezentarea statistica a % de celule pozitive pentru proteina YFP in timp (b).

Efectul produsilor de degradare a matricelor asupra viabilitatii celulelor HEK 293T

A fost urmarita viabilitatea celulelor HEK 293T la 48 de ore de incubare in prezenta produsilor de degradare a matricelor rezultati in urma incubarii matricelor la 37°C pentru 24, 48 si 72 de ore in mediu de cultura DMEM suplimentat cu 10 % ser. Rezultatele unui experiment reprezentativ efectuat in triplicat pentru matricele ce contin vectorul C60-PEI imobilizat in pereti, in absenta sau prezenta pEYFP (pentru a se obtine un raport N/P=30 cu C60-PEI) sunt prezentate in Figura 56. Se poate observa o scadere a viabilitatii cu aproximativ 20 % atat pentru matricele cu C60-PEI cat si pentru matricele cu poliplexe C60-PEI/pEYFP (la N/P=30). Incubarea cu solutiile de plasmid expuse la 37°C nu are efect asupra viabilitatii celulare, in timp ce incubarea cu solutiile de contin poliplexe libere C60-PEI/pEYFP (N/P=30) expuse

pentru diverse intervale de timp la 37°C in mediu de cultura cu ser determina o scadere a viabilitatii cu aproximativ 30-40 %.

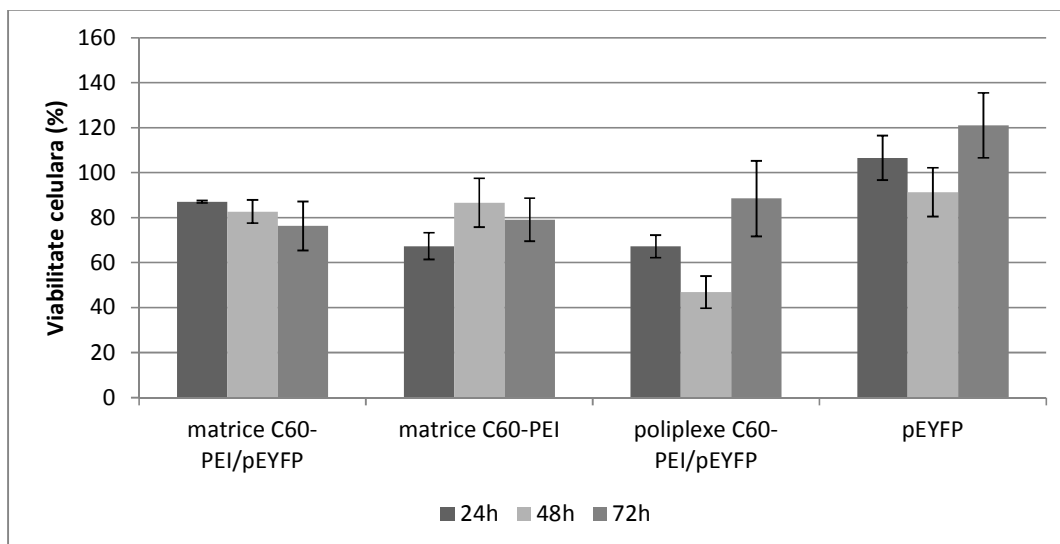


Figura 56. Citotoxicitatea produsilor de degradare a matricelor cu C60-PEI complexat cu pEYFP (matrice C60-PEI/pEYFP: N/P=30), matricelor necomplexate cu pEYFP (matrice C60-PEI), poliplexelor C60-PEI/pEYFP libere in absenta matricelor (poliplexe C60-PEI/pEYFP: N/P=30) si pEYFP necomplexat in absenta matricii (pEYFP) rezultati dupa incubarea la 37°C in mediu cu ser pentru 24, 48 si 72 de ore asupra celulelor HEK 293T. Rezultatele sunt exprimate ca procent din control celulele incubate in mediu de cultura in absenta produsilor de degradare pentru care viabilitatea a fost considerata 100%.

In Figura 57 este prezentata citotoxicitatea produsilor de degradare (rezultati in urma incubarii matricelor la 37°C pentru 24, 48 si 72 de ore in mediu de cultura DMEM suplimentat cu 10% ser) a matricelor formate din atelocolagen (68%), dimetilsilandioliolhialuronat (7%), policaprolactona (7%), hidroxiapatita functionalizata cu 5% PEI liniar (18%), goale (matrice) sau incarcate cu plasmidul pEYFP (matrice pDNA), cu poliplexe D4-AGE-PEI/pEYFP (matrice D4-AGE-PEI/pDNA) sau cu poliplexe PEI 25K/pEYFP (matrice PEI 25K/pDNA). Drept controale au fost folosite plasmidul si poliplexele libere. Se poate observa ca produsii de degradare ai matricii in absenta sau prezenta plasmidului sau a poliplexelor D4-AGE-PEI/pDNA rezultati dupa incubarea matricelor pentru 24h la 37°C in mediu de cultura cu 10% ser determina o scadere a viabilitatii celulare la aproximativ 60%. In cazul in care celulele HEK 293T au fost incubate cu produsii de degradare rezultati dupa 48h, respectiv 72h incubare a matricelor libere sau ce contin inglobate plasmidul pDNA sau poliplexele D4-AGE-PEI/pDNA la 37°C in mediu de cultura se observa o viabilitate celulara crescuta comparativ cu incubarea cu produsii rezultati dupa 24h, fapt ce poate fi explicat prin diluarea produsilor toxici dupa recoltarea unui volum din mediu de incubare si reimprospatarea lui.

Produsii de degradare a matricelor ce contin poliplexe PEI 25K/pDNA inglobate reduc viabilitatea celulara la aproximativ 40%, in timp ce incubarea celulelor cu mediul provenit de la poliplexele PEI 25K/pDNA libere tinute la 37°C pentru 24 de ore determina o scadere a viabilitatii la mai putin de 20%. Astfel, in cazul folosirii ca vector de transfectie a polimerului cationic PEI 25kDa care are toxicitate celulara crescuta, inglobarea poliplexelor PEI 25K/pDNA in matrice determina reducerea semnificativa a citotoxicitatii acestora comparativ cu poliplexele libere ($p=0.005$).

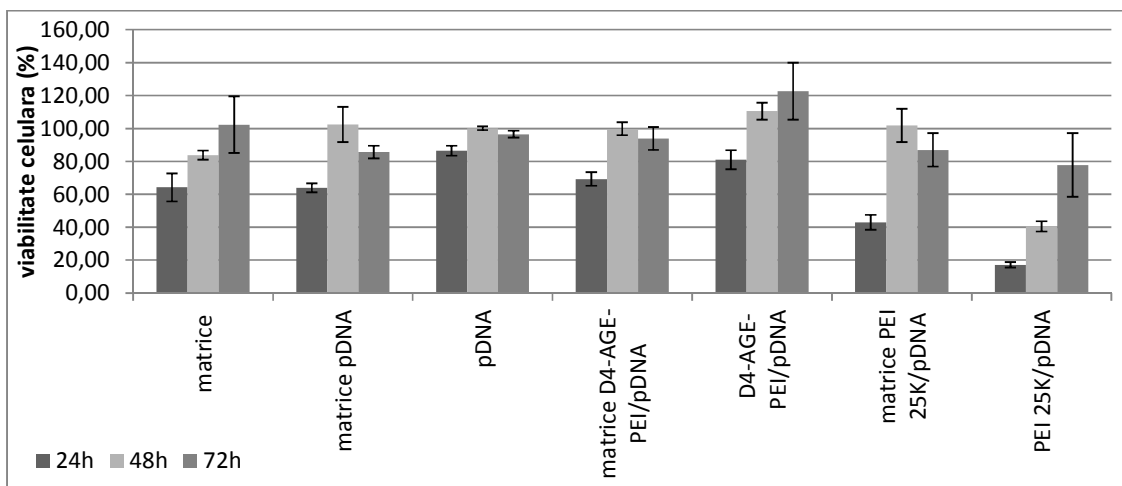


Figura 57. Citotoxicitatea produsilor de degradare a matricelor formate din atelocolagen (68%), dimetilsilandiolihiuronat (7%), policaprolactona (7%), hidroxiapatita functionalizata cu 5% PEI liniar (18%) goale (matrice) sau incarcate cu plasmidul pEYFP (matrice pDNA), cu poliplexe D4-AGE-PEI/pEYFP (matrice D4-AGE-PEI/pDNA) sau cu poliplexe PEI 25K/pEYFP (matrice PEI 25K/pDNA) rezultati dupa incubarea la 37°C in mediu cu ser pentru 24, 48 si 72 de ore asupra celulelor HEK 293T. Rezultatele sunt exprimate ca procent din control (celulele incubate in mediu de cultura in absenta produsilor de degradare pentru care viabilitatea a fost considerata 100%).

In concluzie, pentru incarcarea poliplexsilor C60-PEI/dsADN se pot preciza:

1) Matricele formate din atelocolagen (68%), dimetilsilandiolihiuronat (7%), policaprolactona (7%), hidroxiapatita functionalizata cu 5% liniar PEI (18%) pot fi incarcate cu poliplexe formate intre conjugatii polimerici cu PEI si ADN plasmidic si sunt capabile sa actioneze ca un rezervor care poate furniza in timp material genetic ce poate determina expresia sustinuta a unei anumite proteine in celule din vecinatate. Expresia proteinei care poate fi observata pana la aproximativ o luna, cand se observa degradarea accentuata a matricei. De asemenea, in cazul poliplexelor formate intre PEI 25 kDa si pDNA, inglobarea poliplexelor in matrice determina reducerea toxicitatii acestora, obtinandu-se in acelasi timp o transfectie crescuta a genei dorite in celule.

2) In cazul imobilizarii vectorului C60-PEI in peretii matricei, complexarea acestuia cu pDNA determina exprimarea proteinei codificate de plasmid in aproximativ 40% din celulele peste care au fost adaugate matricele, la 3 zile de incubare matrice/poliplexe-celule. Celule pozitive pentru proteina fluorescanta codificata de plasmidul complexat cu vectorul imobilizat in membrana pot fi observate pentru perioade de timp de pana la 13 zile. Degradarea matricei are loc progresiv, la 17 zile de incubare matrice-celule observandu-se o degradare accentuata a acesteia. Nu a fost observat un efect citotoxic al matricei asupra celulelor HEK 293T.

3) Produsii de degradare a matricelor formate din atelocolagen (68%), dimetilsilandiolihiuronat (7%), policaprolactona (7%), hidroxiapatita functionalizata cu 5% liniar PEI (18%) rezultati in urma incubarii matricelor in mediu de cultura DMEM suplimentat cu 10% ser timp de 24 de ore la 37°C determina o scadere a viabilitatii celulare la 60%.

4) Produsii de degradare a matricelor ce contin C60-PEI, rezultati in urma incubarii matricelor in mediu de cultura cu ser pentru 24, 48, 72 de ore nu au avut un efect drastic asupra viabilitatii celulare, determinand o scadere a viabilitatii celulelor HEK 293T cu aproximativ 20 % la 48 de ore de incubare a acestora in prezenta produsilor de degradare.

Rezultatele științifice ale derulării etapei 2016 în cadrul proiectului PN-II-ID-PCCE-2011-2-0028

Sinoptic:

- lucrări științifice publicate: **X**;
 - lucrări științifice acceptate pentru publicare: **X** (până la 30.10.2016);
 - lucrări științifice publicate în periodice ale unor conferințe: **x**;
 - lucrări științifice trimise spre publicare: **X**;
 - participări la manifestări științifice: **X**;
 - lucrări prezentate ca poster: **X**;
 - stagii de cercetare: **X**;
 - sustinere teze de doctorat cu finantare partiala de la proiect: **Adina, Bogdan.**
- Andrei, Alina Nicolescu,
- cereri de brevet: **1.**

Bibliografie

(1) Elouahabi, A.; Ruysschaert, J.-M. Formation and Intracellular Trafficking of Lipoplexes and Polyplexes. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2005**, *11*, 336–347.

- (2) Wang, T.; Upponi, J. R.; Torchilin, V. P. Design of Multifunctional Non-Viral Gene Vectors to Overcome Physiological Barriers: Dilemmas and Strategies. *Int. J. Pharm.* **2012**, *427*, 3–20.
- (3) Lungwitz, U.; Breunig, M.; Blunk, T.; Göpferich, A. Polyethylenimine-Based Non-Viral Gene Delivery Systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV* **2005**, *60*, 247–266.
- (4) Bonadio, J.; Smiley, E.; Patil, P.; Goldstein, S. Localized, Direct Plasmid Gene Delivery in Vivo: Prolonged Therapy Results in Reproducible Tissue Regeneration. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 753–759.
- (5) Fang, J.; Zhu, Y. Y.; Smiley, E.; Bonadio, J.; Rouleau, J. P.; Goldstein, S. A.; McCauley, L. K.; Davidson, B. L.; Roessler, B. J. Stimulation of New Bone Formation by Direct Transfer of Osteogenic Plasmid Genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 5753–5758.
- (6) Keeney, M.; van den Beucken, J. J. J. P.; van der Kraan, P. M.; Jansen, J. A.; Pandit, A. The Ability of a Collagen/Calcium Phosphate Scaffold to Act as Its Own Vector for Gene Delivery and to Promote Bone Formation via Transfection with VEGF(165). *Biomaterials* **2010**, *31*, 2893–2902.
- (7) Scherer, F.; Schillinger, U.; Putz, U.; Stemberger, A.; Plank, C. Nonviral Vector Loaded Collagen Sponges for Sustained Gene Delivery in Vitro and in Vivo. *J. Gene Med.* **2002**, *4*, 634–643.
- (8) Cohen-Sacks, H.; Elazar, V.; Gao, J.; Golomb, A.; Adwan, H.; Korchoy, N.; Levy, R. J.; Berger, M. R.; Golomb, G. Delivery and Expression of pDNA Embedded in Collagen Matrices. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2004**, *95*, 309–320.
- (9) Cao, X.; Deng, W.; Wei, Y.; Yang, Y.; Su, W.; Wei, Y.; Xu, X.; Yu, J. Incorporating pTGF- β 1/Calcium Phosphate Nanoparticles with Fibronectin into 3-Dimensional Collagen/Chitosan Scaffolds: Efficient, Sustained Gene Delivery to Stem Cells for Chondrogenic Differentiation. *Eur. Cell. Mater.* **2012**, *23*, 81–93.
- (10) Raftery, R. M.; Walsh, D. P.; Castaño, I. M.; Heise, A.; Duffy, G. P.; Cryan, S.-A.; O'Brien, F. J. Delivering Nucleic-Acid Based Nanomedicines on Biomaterial Scaffolds for Orthopedic Tissue Repair: Challenges, Progress and Future Perspectives. *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla* **2016**, *28*, 5447–5469.
- (11) Keita, G.; Ricard, A.; Audebert, R.; Pezron, E.; Leibler, L. The Poly(vinyl Alcohol)-Borate System: Influence of Polyelectrolyte Effects on Phase Diagrams. *Polymer* **1995**, *36*, 49–54.
- (12) Peters, G. M.; Skala, L. P.; Plank, T. N.; Hyman, B. J.; Manjunatha Reddy, G. N.; Marsh, A.; Brown, S. P.; Davis, J. T. A G4·K⁺ Hydrogel Stabilized by an Anion. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12596–12599.

- (13) Peters, G. M.; Skala, L. P.; Plank, T. N.; Oh, H.; Reddy, G. N. M.; Marsh, A.; Brown, S. P.; Raghavan, S. R.; Davis, J. T. G4-quartet·M(+) Borate Hydrogels. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 5819–5827.
- (14) Yu, Y.; Nakamura, D.; DeBoyace, K.; Neisius, A. W.; McGown, L. B. Tunable Thermoassociation of Binary Guanosine Gels. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 1130–1134.
- (15) Buerkle, L. E.; Rowan, S. J. Supramolecular Gels Formed from Multi-Component Low Molecular Weight Species. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 6089–6102.
- (16) Wenz, G.; Han, B.-H.; Müller, A. Cyclodextrin Rotaxanes and Polyrotaxanes. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 782–817.
- (17) Harada, A.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H. Cyclodextrin-Based Supramolecular Polymers. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 875–882.
- (18) Nepogodiev, S. A.; Stoddart, J. F. Cyclodextrin-Based Catenanes and Rotaxanes. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1959–1976.
- (19) Marangoci, N.; Maier, S. S.; Ardeleanu, R.; Arvinte, A.; Fifere, A.; Petrovici, A. R.; Nicolescu, A.; Nastasa, V.; Mares, M.; Pasca, S. A.; *et al.* Low Toxicity β -Cyclodextrin-Caged 4,4'-bipyridinium-Bis(siloxane): Synthesis and Evaluation. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, *27*, 546–557.
- (20) Fifere, A.; Marangoci, N.; Maier, S.; Coroaba, A.; Maftei, D.; Pinteala, M. Theoretical Study on β -Cyclodextrin Inclusion Complexes with Propiconazole and Protonated Propiconazole. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 2191–2201.
- (21) Sillion, M.; Dascalu, A.; Simionescu, B. C.; Pinteala, M.; Ungurenasu, C. Synthesis and Anti-HIV Activity of β -Cyclodextrin-C6-Sulfate/3-Azido-3'-Deoxythymidine Inclusion Complex. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2011**, *49*, 1730–1733.
- (22) Hazel, P.; Huppert, J.; Balasubramanian, S.; Neidle, S. Loop-Length-Dependent Folding of G-Quadruplexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16405–16415.
- (23) Plank, T. N.; Davis, J. T. A G4·K⁺ Hydrogel That Self-Destructs. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 5037–5040.
- (24) Allain, V.; Bourgaux, C.; Couvreur, P. Self-Assembled Nucleolipids: From Supramolecular Structure to Soft Nucleic Acid and Drug Delivery Devices. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 1891–1903.
- (25) Bui, D. T.; Nicolas, J.; Maksimenko, A.; Desmaële, D.; Couvreur, P. Multifunctional Squalene-Based Prodrug Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2014**, *50*, 5336–5338.

- (26) Clima, L.; Peptanariu, D.; Pinteala, M.; Salic, A.; Barboiu, M. DyNAVectors: Dynamic Constitutional Vectors for Adaptive DNA Transfection. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 17529–17531.
- (27) Ceruti, M.; Balliano, G.; Viola, F.; Cattell, L.; Gerst, N.; Schuber, F. Synthesis and Biological Activity of Azasqualenes, Bis-Azasqualenes and Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **1987**, *22*, 199–208.
- (28) Xu, T.; Liu, W.; Wang, S.; Shao, Z. Elucidating the Role of Free Polycationic Chains in Polycation Gene Carriers by Free Chains of Polyethylenimine or N,N,N-Trimethyl Chitosan plus a Certain Polyplex. *Int. J. Nanomedicine* **2014**, *9*, 3231–3245.
- (29) Zintchenko, A.; Philipp, A.; Dehshahri, A.; Wagner, E. Simple Modifications of Branched PEI Lead to Highly Efficient siRNA Carriers with Low Toxicity. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 1448–1455.
- (30) Voronkov, M. G.; Dyakov, V. M. Process for the Production of 1-Organylsilatrane and Carbofunctional Derivatives Thereof. **1977**.
- (31) Singh, R.; Puri, J. K.; Sharma, R. P.; Malik, A. K.; Ferretti, V. Synthesis, Characterization and Structural Aspects of 3-Azidopropylsilatrane. *J. Mol. Struct.* **2010**, *982*, 107–112.
- (32) Gil, E. S.; Wu, L.; Xu, L.; Lowe, T. L. β -Cyclodextrin-Poly (β -Amino Ester) Nanoparticles for Sustained Drug Delivery across the Blood–brain Barrier. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3533–3541.
- (33) Zhou, Y.; Wang, H.; Wang, C.; Li, Y.; Lu, W.; Chen, S.; Luo, J.; Jiang, Y.; Chen, J. Receptor-Mediated, Tumor-Targeted Gene Delivery Using Folate-Terminated Polyrotaxanes. *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 1067–1076.
- (34) Nwodo, U. U.; Green, E.; Okoh, A. I. Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 14002–14015.
- (35) Wang, Y.; Li, C.; Liu, P.; Ahmed, Z.; Xiao, P.; Bai, X. Physical Characterization of Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus Plantarum* KF5 Isolated from Tibet Kefir. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82*, 895–903.
- (36) Li, W.; Mutuvulla, M.; Chen, X.; Jiang, M.; Dong, M. Isolation and Identification of High Viscosity-Producing Lactic Acid Bacteria from a Traditional Fermented Milk in Xinjiang and Its Role in Fermentation Process. *Eur. Food Res. Technol.* **2012**, *235*, 497–505.
- (37) Chintana Tayuan. Growth and Exopolysaccharide Production by *Weissella* Sp. from Low-Cost Substitutes for Sucrose. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2011**, *5*.
- (38) Xiao, Q.; Tong, Q.; Lim, L.-T. Drying Process of Pullulan Edible Films Forming Solutions Studied by ATR-FTIR with Two-Dimensional Correlation Spectroscopy. *Food Chem.* **2014**, *150*, 267–273.

- (39) Ahmed, Z.; Wang, Y.; Anjum, N.; Ahmad, H.; Ahmad, A.; Raza, M. Characterization of New Exopolysaccharides Produced by Coculturing of *L. Kefiranofaciens* with Yoghurt Strains. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *59*, 377–383.
- (40) Samal, P. K.; Dangi, J. S. Isolation, Preliminary Characterization and Hepatoprotective Activity of Polysaccharides from *Tamarindus Indica* L. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *102*, 1–7.
- (41) Chen, Y.; Mao, W.; Gao, Y.; Teng, X.; Zhu, W.; Chen, Y.; Zhao, C.; Li, N.; Wang, C.; Yan, M.; *et al.* Structural Elucidation of an Extracellular Polysaccharide Produced by the Marine Fungus *Aspergillus Versicolor*. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *93*, 478–483.
- (42) Stanciu, M. C.; Nichifor, M. New Biocompatible Amphiphilic Diblock Copolymer Based on Dextran. *Eur. Polym. J.* **2015**, *71*, 352–363.
- (43) Minea, B.; Marangoci, N.; Peptanariu, D.; Rosca, I.; Nastasa, V.; Corciova, A.; Varganici, C.; Nicolescu, A.; Fifere, A.; Neamtu, A.; *et al.* Inclusion Complexes of Propiconazole Nitrate with Substituted β -Cyclodextrins: The Synthesis and in Silico and in Vitro Assessment of Their Antifungal Properties. *New J. Chem.* **2016**, *40*, 1765–1776.
- (44) Fielding, L. Determination of Association Constants (K_a) from Solution NMR Data. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6151–6170.
- (45) Ali, S. M.; Asmat, F.; Koketsu, M. ^1H NMR Spectroscopic Investigation of β -Cyclodextrin Inclusion Compounds with Parecoxib. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, *59*, 191–196.
- (46) Arendrup, M. C.; Cuenca-Estrella, M.; Lass-Flörl, C.; Hope, W.; EUCAST-AFST. EUCAST Technical Note on the EUCAST Definitive Document EDef 7.2: Method for the Determination of Broth Dilution Minimum Inhibitory Concentrations of Antifungal Agents for Yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2012**, *18*, E246-247.
- (47) Andrews, J. M. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *48 Suppl 1*, 5–16.
- (48) CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay System Protocol <https://www.promega.ro/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol/> (accessed Sep 12, 2016).
- (49) Bravo-Suárez, J. J.; Páez-Mozo, E. A.; Ted Oyama, S. Microtextural Properties of Layered Double Hydroxides: A Theoretical and Structural Model. *Microporous Mesoporous Mater.* **2004**, *67*, 1–17.

- (50) Rives, V.; del Arco, M.; Martín, C. Layered Double Hydroxides as Drug Carriers and for Controlled Release of Non-Steroidal Antiinflammatory Drugs (NSAIDs): A Review. *J. Controlled Release* **2013**, *169*, 28–39.
- (51) San Román, M. S.; Holgado, M. J.; Salinas, B.; Rives, V. Characterisation of Diclofenac, Ketoprofen or Chloramphenicol Succinate Encapsulated in Layered Double Hydroxides with the Hydrotalcite-Type Structure. *Appl. Clay Sci.* **2012**, *55*, 158–163.
- (52) del Arco, M.; Fernández, A.; Martín, C.; Rives, V. Release Studies of Different NSAIDs Encapsulated in Mg,Al,Fe-Hydrotalcites. *Appl. Clay Sci.* **2009**, *42*, 538–544.
- (53) Yang, J.-H.; Han, Y.-S.; Park, M.; Park, T.; Hwang, S.-J.; Choy, J.-H. New Inorganic-Based Drug Delivery System of Indole-3-Acetic Acid-Layered Metal Hydroxide Nanohybrids with Controlled Release Rate. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 2679–2685.
- (54) Gao, Y.; Yuan, J.; Liu, H.; Yang, Y.; Hou, Y.; Li, S. Tramadol Loading, Release and Iontophoretic Characteristics of Ion-Exchange Fiber. *Int. J. Pharm.* **2014**, *465*, 102–111.
- (55) Uritu, C. M.; Varganici, C. D.; Ursu, L.; Coroaba, A.; Nicolescu, A.; Dascalu, A. I.; Peptanariu, D.; Stan, D.; Constantinescu, C. A.; Simion, V.; *et al.* Hybrid Fullerene Conjugates as Vectors for DNA Cell-Delivery. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 2433–2446.
- (56) Uritu, C. M.; Calin, M.; Maier, S. S.; Cojocar, C.; Nicolescu, A.; Peptanariu, D.; Constantinescu, C. A.; Stan, D.; Barboiu, M.; Pinteala, M. Flexible Cyclic Siloxane Core Enhances the Transfection Efficiency of Polyethylenimine-Based Non-Viral Gene Vectors. *J Mater Chem B* **2015**, *3*, 8250–8267.