

RAPORT ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC

Denumirea proiectului: PLATFORME DINAMICE CONSTITUȚIONALE PENTRU LIVRARE ȚINTITĂ DE PRINCIPII ACTIVE (DynaCoPlat)

Contract Nr. TE 116/2018

Cod proiect: PN-III-P1-1.1-TE-2016-1180

Coordonator: INSTITUTUL DE CHIMIE MACROMOLECULARĂ „PETRU PONI” DIN IAȘI

Director de proiect: DR. LILIA CLIMA

- **Obiectivele generale urmărite:**

Obiectivul proiectului "Platforme Dinamice Constituționale pentru Livrare Țintită de Principii Active" este formarea și consolidarea unei echipe tinere de cercetători din ICMPP cu domenii de expertiză complementare, în vederea:

- creării unui efect sinergetic în domeniul de cercetare propus și al creșterii contribuției nanomedicinii aplicate în cercetarea translațională;
- pregătirii unor experți competitivi la nivel național și internațional capabili să aducă un aport substanțial în domeniul academic, economic și al sănătății;
- creșterii abilităților tinerilor cercetători de a dezvolta și implementa un domeniu de cercetare independent;
- creșterii vizibilității științifice prin diseminarea rezultatelor în reviste ISI cu factor de impact și depunerea de proiecte naționale și europene (H2020, Era-Net, Euronanomed, etc.).

- **Obiectivele fazelor de execuție:**

Etapa 1 Studii preliminare, de documentare și sinteză în vederea proiectării compoziției platformelor dinamice constituționale și stabilirii procedeele de sinteză a precursorilor pentru obținerea librăriilor de platforme dinamice constituționale.

Etapa 2 Obținerea platformelor dinamice constituționale, studiu de complexare a platformelor dinamice constituționale cu acizii nucleici de interes, formarea de poliplecși, testare *in vitro*.

Etapa 3 Optimizarea compoziției platformelor dinamice constituționale. Obținerea platformelor dinamice constituționale, studiu de complexare a platformelor dinamice constituționale cu acizii nucleici de interes, formarea de poliplecși.

Marcarea platformelor dinamice constituționale cu molecule de țintire, testarea acestora *in vitro*.

1. Introducere

Terapia genică constă în modificarea intenționată a expresiei genei în celule specifice pentru a trata afecțiunile patologice[1]. Aceasta întâmpină numeroase provocări asociate cu țintirea specifică a celulelor, eficiența transferului de gene, reglarea/controlul expresiei genelor și siguranța vectorului. Un rol important revine vectorilor non-virali, micro- și nano-sistemelor multifuncționale inteligente, capabile să elibereze principii active la țintă, sau să asigure medierea transferului genic.

Proprietățile ce stau la baza sintezei vectorilor non-virali de orice natură sunt: capacitatea de a neutraliza sarcina negativă a ADN-ului pentru a preveni repulsia față de suprafața anionică a celulei; capacitatea de condensare a ADN-ului la o scară potrivită care să permită internalizarea celulară (pătrunderea în celulă prin endocitoză, macropinocitoză sau fagocitoză); capacitatea de a proteja ADN-ul de degradarea extra sau intracelulară. Pentru ca un sistem să poată îndeplini toate aceste caracteristici este necesară utilizarea strategiilor de condensare a ADN-ului precum interacțiuni electrostatice, încapsulare sau adsorbție [1, 2].

Dintre **strategiile de proiectare** a vectorilor non-virali, **chimia dinamică constituțională** (CDC) reprezintă o abordare evolutivă [3-5], care permite obținerea diversității chimice, deosebit de importantă în dezvoltarea unor noi materiale "ușor de sintetizat" pentru livrarea de principii active [6-8]. Strategia dinamică constituțională a fost propusă pentru construirea unor biblioteci (librării) de compuși constituționali dinamici (platforme dinamice constituționale, PDC) destinați recunoașterii și transfecției biopolimerilor încărcăți negativ precum acizii nucleici. (**figura 1**).

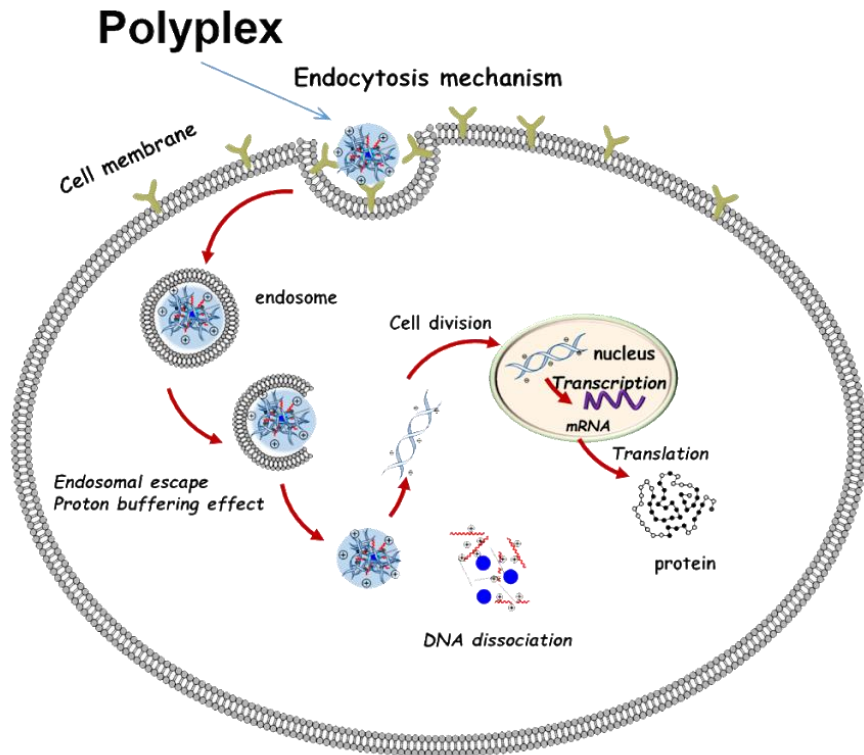
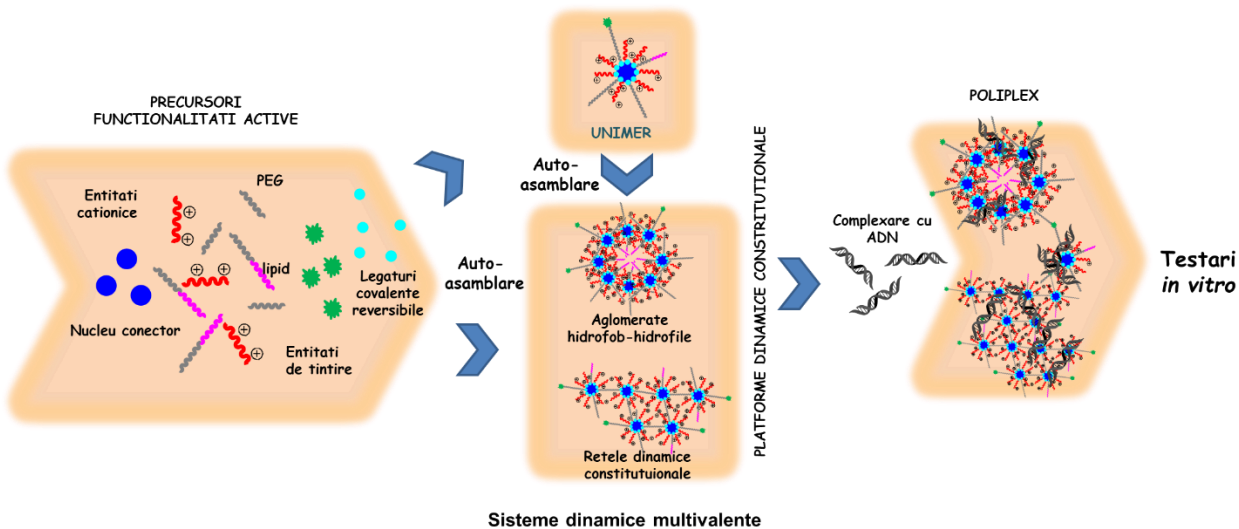


Figura 1. Principiul formării PDC-urilor cu rol de vector non-viral și principiul formării poliplexsilor pe baza acestora. Reprezentarea schematică a mecanismului de penetrare a polyplexului prin endocitoză.

Aceste PDC-uri sunt capabile să genereze spontan arhitecturi supramoleculare organizate, bine definite prin auto-asamblarea componentelor lor, cu capacitate ridicată de complexare a ADN-ului, eficiență în transfecție și citotoxicitate bună. Utilizarea interacțiunilor reversibile, ca interfețe

dinamice între componentele PDC, permite auto-reglarea geometriei tridimensionale a sistemului și a proprietăților funcționale.

Potențialii candidați identificați ca și precursorii cu funcționalități active sunt prezentați în **figura 2**. Dintre aceștia, un rol important revine nucleului conector, care poate fi di-/tri-/tetra- sau polialdehidă. Ținând cont de faptul ca aldehydele pot manifesta o toxicitate sporită în mediul celular [9, 10], se va opta pentru acele aldehide ce nu vor modifica solubilitatea în apă și nu vor diminua viabilitatea celulară a sistemelor obținute.

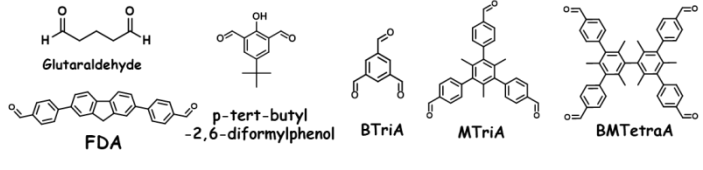
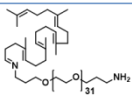
Nucleu conector 	
Legături covalente reversibile 	-C=N-
Polimer biocompatibil	PEG: $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$ 1500 Da 2000 Da 3000 Da $\text{H}_2\text{N}-$ 750 Da 2000 Da 3000 Da
Entități cationice	bPEI: 800 Da; 2000 Da; 25000 Da; 5000 Da; 10000 Da
Trigher de auto-asamblare 	
Molecule de tintire 	Peptide de penetrare celulară, manoză, acid folic

Figura 2. Candidați fezabili ca și precursori cu funcționalități active.

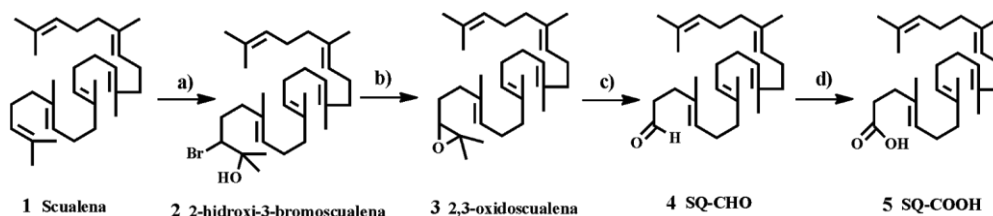
2. Obținerea și studiul proprietăților precursorilor

2.1 Funcționalizarea scualenei cu o grupare carbonil și carboxil

Întrucât structura chimică de terpenoid a scualenei nu permite utilizarea acesteia în obținerea derivaților de interes, a fost necesară funcționalizarea acesteia la un capăt cu o grupare carbonil de tip aldehydă și mai departe cu o grupare carboxil. Gruparea carbonil a fost aleasă să poată reacționa cu amine primare prin formarea unor legături covalente reversibile de tip imină care ulterior sunt esențiale pentru obținerea dinamerilor. Acești dinameri le oferă sistemelor de interes un caracter dinamic. Funcționalizarea scualenei a fost realizată utilizând o formă modificată și optimizată a protocoalelor deja existente în literatură [11, 12]. Gruparea carboxil poate fi reacționată cu aminele

primare prin formarea unor legături covalente peptidice care au un caracter ireversibil și prezintă stabilitate mai ridicată pentru anumite aplicații în domeniul biologic [12-14].

Funcționalizarea scualenei cu o grupare aldehydică (SQ-CHO) și mai apoi cu o grupare carboxil (SQ-COOH) are loc printr-o succesiune de etape conform **schemei 1**.



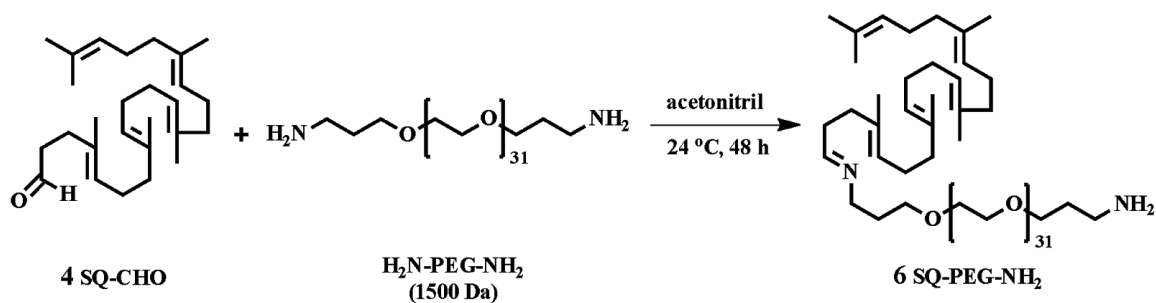
Schema 1. Schema de obținere a derivaților SQ-CHO (4) și SQ-COOH (5). Condiții de reacție: **a)** NBS, THF, 0 °C, 1.5h; **b)** K₂CO₃, MeOH, 25 °C, 2h; **c)** HIO₄ x 2H₂O, H₂O și 1,4-dioxan, 25 °C, 2h; **d)** H₂Cr₂O₇, H₂O și Et₂O, 0 °C, 2h.

S-au obținut 2 compuși esențiali 4 și 5, funcționaliizați cu gruparea carbonil și carboxil ce oferă posibilități de cuplare a lipidului de alte unități reactive.

2.2 Obținerea și caracterizarea scualenei PEGilate

PEG-ul este un polimer ce are ca unitate repetitivă oxidul de etilenă cu o conformație dinamică și dispune de proprietăți superioare în ceea ce privește solubilitatea în apă, biocompatibilitatea și biodegradabilitatea [15]. Utilizarea acestuia în combinație cu o lipidă, nu numai că îi conferă lipidei o solubilitate ridicată în soluții apoase, ci ajută și la stabilizarea sistemului prin formarea de nano-sfere micelare care au caracter amfifilic (PEG este partea hidrofilă și formează învelișul acestor nano-sfere, iar scualena reprezintă partea hidrofobă ce alcătuiește nucleul). De asemenea, utilizarea PEG în formarea conjugatelor pentru transportul și eliberarea de gene și medicamente ajută la creșterea timpului de circulație în fluxul sanguin prin faptul că protejează conjugatul și încarcătura de posibile interacțiuni cu anumiți factori biologici [16].

Compusul SQ-CHO obținut anterior a fost pus în reacție cu poli- (etilenglicol) -bis (3-aminopropil) (Mn ~ 1500 g/mol) (H₂N-PEG-NH₂) în raport molar de 1:1 utilizând protocoalele deja existente în literatură (**schema 2**).



Schema 2. Schema de sinteză a scualenei PEGilate.

Structura chimică a SQ-PEG-NH₂ a fost confirmată prin spectroscopia RMN de proton și carbon. Solubilitatea și stabilitatea scualenei PEGilate au fost investigate în soluții apoase. De asemenea, a fost determinată concentrația critică micelară, precum și abilitatea acestui compus de a forma micle în medii apoase la valoarea CCM de 8.75×10^{-2} mM. În urma acestor studii a fost determinată obținerea unor micle cu dimensiuni medii de 40 Å. Cu ajutorul testului MTS de citotoxicitate *in vitro* pe linia celulară NHDF a fost confirmat faptul că prin PEGilare, scualena posedă un caracter biocompatibil. Rezultatele detaliate au fost descrise în raportul științific aferent etapei 1.

Astfel, utilizarea scualenei PEGilate poate fi propusă pentru obținerea de sisteme cu potențiale aplicații în transportul de gene și medicamente în diferite tipuri de celule.

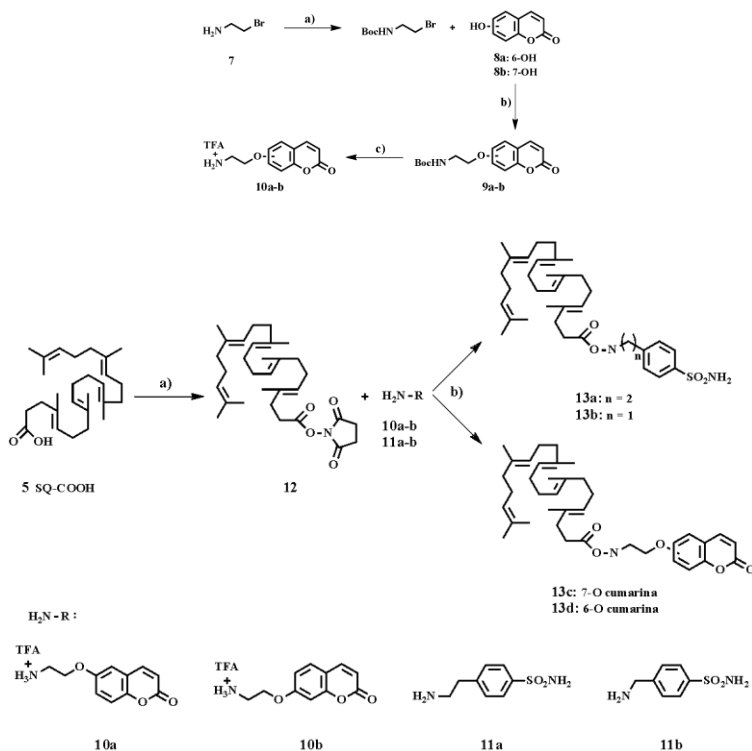
2.3 Utilizarea acidului scualenic la obținerea unor inhibitori ai anhidrazei carbonice

Datorită proprietăților sale remarcabile de biocompatibilitate, viabilitate sporită precum și proprietăților sale de auto-asamblare, ne-am propus să utilizăm scualena funcționalizată în vederea obținerii unor inhibitori ai anhidrazei carbonice (CAI). Anhidrazele carbonice (CA) sunt metaloenzyme omniprezente care au proprietatea de a cataliza hidratarea reversibilă a dioxidului de carbon pentru a genera anionul HCO₃⁻ și cationul H⁺ [17, 18]. Aceste proteine se regăsesc în toate organismele vii și sunt codificate de opt familii de gene nerelaționate: α-, β-, γ-, δ-, ζ-, η-, θ- și ι-CA [19-23]. Anhidrazele carbonice umane (hCA) aparțin familiei α-CA și cuprinde un număr de 15 izoforme, care diferă între ele în funcție de distribuția în țesuturi, localizarea în celule, cât și prin proprietățile cinetice [24, 25]. Reacțiile catalizate de către aceste enzime contribuie la o gamă diversificată de funcții fiziologice ce sunt implicate în diferite mecanisme biologice, printre care amintim de homeostazia acido-bazică din fluxul sanguin, respirația, metabolismul osos și

tumorigeneza [26-28]. Mai mult, deseori prezența unor activități sau niveluri anormale ale acestora a fost asociată cu existența unor diferite boli. Inhibitorii anhidrazei carbonice au fost utilizați clinic ca: diuretici [29], antiglaucomatoase [30], anticonvulsive [31] sau agenți împotriva obezității [32], însă, în ultima perioadă a fost raportată utilizarea acestora pentru tratarea durerilor neuropatice și a tumorilor hipoxice [33-35]. Datorită numărului mare de izoforme ale hCA este nevoie de o îmbunătățire a profilului de inhibare și de selectivitate a CAI existenți, cu scopul limitării efectelor adverse apărute în urma inhibării izoformelor care nu sunt implicate într-o anumită patologie. În acest studiu a fost urmărită obținerea unor hibrizi pe bază de scualenă ce conțin grupări sulfonamidă sau derivați de cumarină. Utilizarea derivaților cu grupări sulfonamidă a fost pusă pe seama faptului că această grupare funcțională îmbunătățește profilul de inhibare selectivă împotriva izoformei hCA II care este implicată în diferite patologii, de exemplu glaucomul și epilepsia. În același timp, derivații cu substrat de cumarină prezintă eficiență împotriva izoformelor hCA IX și hCA XII care sunt asociate cu tumorile.

2.3.1 Sinteza hibrizilor de scualenă cu sulfonamide și cumarine

Sinteza compușilor hibrizi **13a-d** a fost realizată conform schemelor 3 și 4 descrise detaliat în raportul aferent etapei 2. Aici ne vom axa mai mult pe testele *in vitro* și *in silico*.



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

Schema 4. Reprezentarea celor două etape de sinteză a inhibitorilor împotriva CA pe bază de scualenă **13a-d**. Condiții de reacție: **a)** EDC-Cl, NHS, DMF anhidru, 23 °C, 2 – 4 h; **b)** Et₃N, DMF anhidru, 23 °C, 12 – 24 h.

2.3.2 Testele *in vitro* de inhibare a anhidrazei carbonice

Compușii **13a-d** obținuți au fost testați *in vitro* pentru determinarea activității de inhibare împotriva izoformelor hCA I, II, IX și XII care au relevanță fiziologică prin utilizarea testului de hidratare a dioxidului de carbon folosind tehnica prin flux oprit ”stopped-flow” [36]. Activitatea compușilor a fost comparată cu standardul acetazolamidă (AAZ) (**tabelul 1**).

Tabel 1. Rezultatele obținute în urma testelor de inhibare a izoformelor hCA I, hCA II, hCA IX și hCA XII de către compușii hibridi **13a-d** și **AAZ** prin utilizarea testului de hidratare a CO₂ folosind tehnica prin flux oprit [37].

K _i (nM)[38]				
Compus	hCA I	hCA II	hCA IX	hCA XII
13a	3516	62.3	1887	844
13b	6842	5.0	3559	>10000
13c	>10000	>10000	7215	>10000
13d	>10000	>10000	8817	>10000
AAZ	250	12.1	25.8	5.7

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

Rezultatele prezentate în **tabelul 1** arată faptul că izoforma citosolică hCA I a fost inhibată foarte slab de derivații cu sulfonamidă **13a** și **13b** în domeniul de concentrație micromolar (3.5 μ M și respectiv 6.8 μ M). Pe de altă parte, compușii **13c** și **13d** nu au inhibat cele două izoforme citosolice ale anhidrazei carbonice, această proprietate fiind specifică la compușii care au afinitate pentru enzimele asociate cu tumorile. Sulfonamidele derivate cu scualenă **13a** și **13b** au prezentat eficiență ridicată împotriva hCA II având constantele de inhibiție K_i de 62.3 nM și respectiv 5 nM cu un raport de selectivitate ridicat pentru această izoformă (0.033 și respectiv 0.0014). Izoforma hCA XII care este asociată cu tumorile a fost inhibată cel mai eficient de către compusul **13a** având constanta K_i de 844 nM. De asemenea, izoforma hCA IX a fost inhibată în domeniul micromolar de către toți compușii testați, însă, o inhibare selectivă pentru această formă au prezentat-o doar compușii **13c** și **13d**. Analizând rapoartele de selectivitate prezentate în **tabelul 1**, putem concluziona faptul că prin utilizarea scualenei la obținerea compușilor hibridi se obține cea mai

mare selectivitate pentru izoforma hCA II având rapoartele II/IX de 0.033 pentru compusul **13a** și respectiv 0.0014 pentru compusul **13b**.

Având în vedere datele obținute cu privire la activitatea inhibitorie a aminelor pe bază de sulfonamidă (**11a-b**), $K_i = 160$ nM, respectiv 170 nM, valori raportate în literatură pe izoforma hCA II [39] putem spune că derivații **13a-b** au prezentat o inhibiție mult mai bună cu valori ale $K_i = 62.3$ nM, respectiv 5 nM.

2.3.3 Studiile in silico prin modelare moleculară

Pentru a corela structurile chimice cu profilul de inhibare a compușilor **13a** și **13b**, au fost efectuate studii de andocare și optimizări cu centrele active ale CA II (PDB 5LJT) [40]. În toate soluțiile utilizate pentru andocare, derivații cu benzensulfonamidă s-au poziționat profund în regiunea centrelor active, coordinând atomul metalic cu atomul de azot încărcat negativ de la gruparea (SO_2NH_2) care se leagă de atomul de zinc (**figura 3**). De asemenea, au fost observate și legături de hidrogen între grupările care aparțin sulfonamidei NH_2 și $\text{S}=\text{O}$ cu grupările OH și NH ale T199, iar inelul fenil s-a poziționat în zona definită de V121, V143 și L198 (**figura 3**). Lanțurile alifactice ale compușilor **13a** (**figura 3a**) și **13b** (**figura 3b**) sunt dispersate în enzimă unde formează interacțiuni de stabilizare de tipul Van der Waals cu reziduurile din jumătatea lipofilă a centrelor active: I22, F131, V135, P202 și L204. În cazul compusului **13a**, lanțul scualenic ajunge în zona care este expusă la solvent și interacționează cu reziduurile de suprafață R27, P138 și E205, în timp ce compusul **13b** are capacitatea să interacționeze foarte pronunțat și cu zona hidrofobă care este definită de reziduurile F20, P21, I91 și G132. Mai mult, lungimea mai mică a conectorului metilamido (**13b**) față de etilamido (**13a**) duce la formarea unor legături de hidrogen distanțate între amida $\text{C}=\text{O}$ din compusul **13a** și grupările NH_2 din lanțul lateral al Q92. Este posibil ca lungimea mai mică a conectorului metilamido împreună cu rețeaua extinsă formată din contacte hidrofobe să explice un profil mai bun de inhibare a derivatului cu metilamido față de cel cu etilamido.

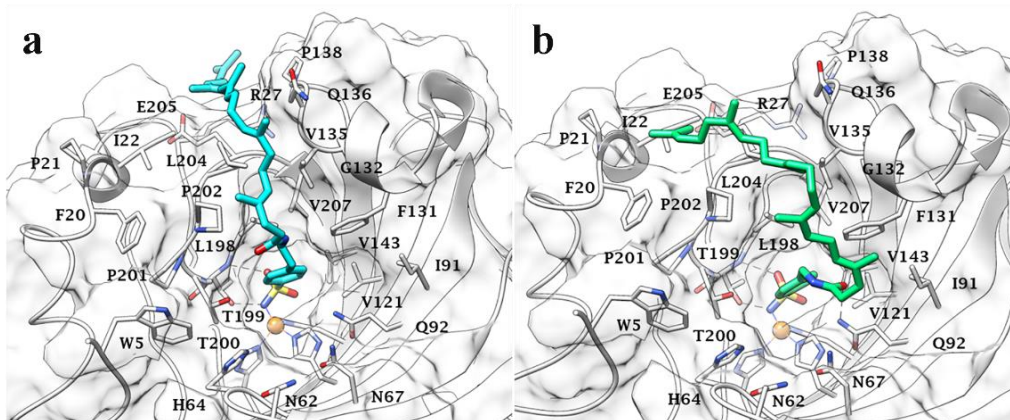


Figura 3. Modul de legare a compușilor **13a** (a) și **13b** (b) în centrele active ale CA II utilizând modelarea moleculară *in silico*. Legăturile de hidrogen sunt reprezentate ca linii întrerupte de culoare neagră [37].

Astfel, în cadrul acestui studiu a fost sintetizată și caracterizată o serie de derivați pe bază de scualenă în vederea evaluării capacității de inhibare a anhidrazei carbonice. Derivații propuși au fost obținuți prin reacții de cuplare plecând de la acidul scualenic și diferiți derivați de cumarină și fenil-sulfonamide. Caracterizarea acestora a fost realizată prin RMN, MS și analiză elementală confirmând obținerea compușilor propuși. Evaluarea *in vitro* pentru determinarea profilului de inhibare a izoformelor hCA I, II, IX și XII, a fost realizată utilizând tehnica în flux oprit în prezența derivaților **13a-d**. Hibrizii ce conțin restul fenil-sulfonamidă (**13a** și **13b**) au prezentat o selectivitate ridicată și un profil de inhibare excelent împotriva izoformei hCA II față de celelalte izoforme tumorale hCA IX și hCA XII. De asemenea, aceștia au prezentat valori ale K_i mult mai bune decât ale compușilor de plecare (**11a-b**). Acțiunea inhibitorie excelentă a acestor compuși (**13a** și **13b**) împotriva izoformei citosolice hCA II îi recomandă ca potențiali candidați în studiile preclinice ale glaucomului sau ale afecțiunilor conexe în care hCA II este implicată.

3. Obținerea și studiul librărilor de platforme dinamice constituționale (PDC)

Aspecte generale. Obținerea PDC-urilor are la bază principiile chimiei dinamice (figura 1), având astfel în compoziția sa: (i) un nucleu conector ce îndeplinește funcția unui centru multifuncțional capabil de legarea covalentă a funcționalităților prin chimia legăturilor covalente reversibile; (ii) trigger de auto-asamblare, (iii) molecule sau polimeri ce sporesc biocompatibilitatea și capacitatea de penetrare a membranei celulare; (iv) molecule sau polimeri capabili să complexeze ADN-ul [6, 41, 42], (v) entități de țintire ce vor facilita fie penetrarea celulară sau nucleară, fie selectivitatea pentru anumite linii celulare transfectate. Aceste componente sunt combinate în rapoarte molare

diferite, obținându-se structuri moleculare (unimeri), ce au capacitate de auto-asamblare, formând astfel PDC-uri. Varietatea largă de precursori (**figura 2**) și posibilitatea de fi combinați în diverse rapoarte, aplicând abordarea combinatorie ca o metodă rapidă de screening, oferă posibilitatea creării unor librării mari de compuși cu proprietăți variate.

În formarea PDC-urilor, un rol important revine polietileniminei (**figura 2**). Polietilenimina, în forma ramificată (bPEI) sau liniară (lPEI) [43] este polimerul cationic cel mai utilizat în transfecție și unul dintre puținii polimeri sintetici care intră în componența unui produs (vaccin pentru eliberarea ADN-ului) aflat în testare la nivel clinic. Utilizarea sa în transfecție este argumentată de: capacitatea ridicată de compactare a ADN-ului, capacitate endozomală intrinsecă, abilitatea de a penetra membrana celulară (endocitoză), efect de compus-tampon (efect de burete de protoni, care facilitează traficul prin citoplasmă și eliberarea materialului genic) [44]. Eficiența în transfecție crește în general cu raportul de N/P (excesul de PEI contribuind la evitarea capturii endozomale) și cu creșterea masei moleculare, dar în același timp acestea duc la creșterea efectului toxic (citotoxicitate ridicată și hemocompatibilitate scăzută) [45]. Lipsa biodegradabilității este însă un dezavantaj major. În timp s-au dezvoltat diverse strategii pentru diminuarea deficiențelor, combinarea cu biopolimeri și PEG fiind printre alternativele des adoptate. Combinarea cu alți polimeri (PEG, peptide, proteine etc) sau compuși biocompatibili precum lipidele, se impune ca o alternativă de ameliorare a unor astfel de deficiențe [46]. Considerând datele de literatură, s-a preferat utilizarea PEI-ului ramificat cu dimensiuni cuprinse între 800 și 25000 Da. Formarea PDC-urilor vizează legarea unui terpenoid (squalena) de nucleul conector, în scopul de a crea un bioconjugat cu abilități de auto-agregare, ce poate genera particule auto-asamblate, în mediu apos [47].

Pe baza precursorilor reprezentați în figura 2 au fost obținute, caracterizate și testate in vitro 5 librării de platforme dinamice constituționale.

3.1 Librăria F

Studiul influenței cantității de PEI în compoziția platformelor dinamice constituționale

Printre cele mai explorate entități ce stau la baza sistemelor de livrare de gene de tip non-viral fac parte compusii cationici, polimeri în cea mai mare parte, printre care PEI, care au făcut în ultimele decenii subiectul numeroaselor studii ce privesc furnizarea de acizi nucleici.

O strategie studiată de diminuare a toxicității PEI-ului este ecranarea poliplexilor de către polimeri hidrofilii, precum polietilenglicolii, albumina serică umană și dextranul. S-a demonstrat că PEG-ilarea PEI-ului duce la creșterea solubilității compleșilor, precum și la reducerea încărcăturii suprafețelor acestora. Cu toate acestea, procesul de PEG-ilare asigură protecția și ecranarea poliplexilor PEI/ADN și, în unele cazuri, reduce interacțiunile ionice nespecifice dintre celulele țintă și complecși, scăzând astfel eficiența de tranfecție.

Am investigat problemele menționate mai sus urmărind abordarea dinamică combinatorială dezvoltată în cadrul grupului nostru pentru a forma o librărie de platforme dinamice constituționale (PDC) care conțin scualena PEG-ilată (SQ-PEG-NH₂), poli- (etilenglicol) -bis (3-aminopropil) (Mn ~ 1500 g/mol) (NH₂-PEG-HN₂), și polietilenimina ramificată cu masa moleculară de 2000 Da (bPEI-2kDa), conectate reversibil într-o structură hiper-ramificată.

Astfel a fost sintetizată librăria de PDC (F1 – F7, **tabelul 2.**) pe baza conceptului descris de noi anterior, folosind interacțiuni reversibile pentru a conecta fragmentele funcționale (i) SQ-PEG-NH₂, (ii) NH₂-PEG-NH₂ și (iii) bPEI-2kDa la 1,3,5-benzenetrialdehida (TA) care servește drept conector trifuncțional.

Tabel 2. Compoziția chimică a PDC-urilor obținute.¹⁷

	SQPEGNH ₂	TA	PEG(NH ₂) ₂	bPEI-2kDa
F1	1	1	0	1.5
F2	1	1	0	2
F3	1	1	0	2.5
F4	1	1	0	3
F5	1	1	0	3.5
F6	1	1	1	1.5
F7	1	1	1	2

E de menționat că raportul dintre bPEI-2kDa și celelalte componente a fost modificat treptat din 1,5 echiv. la 3,5 echiv. în compoziția F1-F5, un ușor exces de PEI fiind necesar pentru a stabili limita toxicității acestuia. Adicional, compușii F6 și F7 au inclus 1 echiv. de NH₂-PEG-NH₂ în compoziția lor. Formarea PVC-urilor și caracterizarea acestora a fost descrisă detaliat în raportul aferent etapei 2. Procesul de auto-asamblare a PDC-urilor F1–F7 a fost studiat și evaluat prin TEM și AFM. Analiza morfologiei particulelor (TEM și AFM) au arătat o tendință similară a procesului de auto-asamblare a acestora în ceea ce privește dimensiunea și forma particulelor formate. Pe

baza acestor studii morfologice, s-au găsit diferențe de dimensiuni care apar din cauza formării PDC-urilor în două situații diferite: a) în prezența $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$ în compoziția lor; b) în absența $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$ în compoziția lor. $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$, fiind un polimer liniar, va declanșa formarea unor PDC-uri mai voluminoase, în timp ce, în absența $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$, bPEI-2kDa, care este un polimer ramificat, va conduce la formarea unor PDC-uri ramificate de dimensiuni mai mici. A fost studiată formarea poliplecșilor prin complexarea platformelor dinamice constituționale cu acizi nucleici prin metoda de gel electroforeză pe agaroză și metoda de excludere a colorantului (dye exclusion assay) cu Gel-Red.

Ambele metode au relevat faptul că toate PDC-urile (F1-F7) manifestă o interacțiune sporită cu ADN-ul investigat. Mai mult decât atât PDC-urile au putut să lege complet ADN-ul începând cu un raport N/P de 10, în timp ce un raport N/P mai mare de 15 a fost necesar pentru bPEI-2kDa, utilizat ca referință pentru a obține legarea completă a ADN-ului.

Eficiența transfecției (**figura 4**) depinde în principal de caracteristicile structurale ale vectorului și de raportul N/P dat de cantitatea de ADN legat de acesta și transportat în celule. Dintre compuşii studiați, F1/pDNA-F5/pDNA au prezentat eficiență de transfecție semnificativ mai mare în comparație cu bPEI-2kDa la raportul de N/P 50, indiferent de raportul de bPEI-2kDa din compoziția lor diferențele de eficiență a transfecției dintre aceștia fiind nesemnificativă.

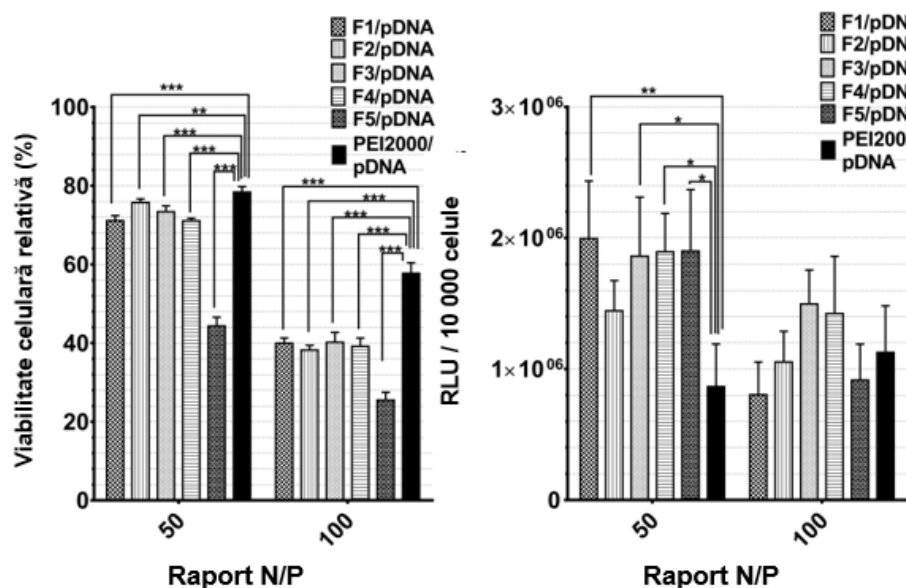


Figura 4. Graficul reprezintă viabilitatea celulară relativă și eficiența transfecției (unități de lumină relative (RLU)/10 000 celule însămânțate) a celulelor Hela tratate cu poliplecși la rapoarte N/P de 50 și 100 (*PEI2000=bPEI-2kDa). Rezultatele sunt prezentate ca o valoare medie $\pm$ deviație standard (S.D.), $n = 5-7$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ și *** $p < 0,001$ conform testului student t.¹⁷

Odată cu creșterea raportului N/P la 100 eficiența de transfecție a scăzut considerabil. Rezultatele obținute sugerează că raportul optim de PEI în compoziția PDC-urilor este de 1,5 echiv. iar cel mai eficient raport N/P este 50. Astfel, studiile de citotoxicitate și transfecție pentru compușii F6/pDNA și F7/pDNA au fost efectuate ținând cont de condițiile optime.

În general, s-a constatat că PDC-urile studiate au prezentat eficiență de transfecție semnificativ mai mare în comparație cu bPEI-2kDa de referință la raportul N/P de 50, indiferent de raportul de PEI din compoziția PDC-urilor, în timp ce eficiența de transfecție scade considerabil odată cu creșterea raportului N/P la 100. NH₂-PEG-NH₂ induce o diferență subtilă, îmbunătățind eficiența de transfecție la raportul N/P 30 și 50. Astfel, rezultatele obținute sugerează că raportul optim de PEI din compoziția PDC-urilor în acest scenariu particular este de 1,5 echivalenți, raportul cel mai eficient de N/P este 50, în timp ce prezența a 1 echiv. NH₂-PEG-NH₂ este necesară pentru a obține cea mai bună eficiență în transfecția ADN-ului pDNA în celulele HeLa.

3.2 *Librăria NV*

Efectul generat de lungimea PEG-ului în compoziția PDC asupra eficienței de transfecție și citotoxicității

Un studiu important realizat în cadrul proiectului a fost axat pe librăria NV de PDC care conține fragmentele funcționale (i) SQ-PEG-NH₂, (ii) NH₂-PEG-NH₂ și (iii) bPEI-0.8kDa la 1,3,5-benzenetrialdehida (TA) care servește drept conector trifuncțional. A fost studiată influența sinergetică a lungimii PEG din compoziția PDC asupra efectului de transfecție și toxicității.

3.2.1 Sinteza și caracterizarea PDC urilor

Librăria NV (NV1 – NV30, **tabelul 3**) este formată din scualenă PEGilată, H₂N-PEG-NH₂ cu trei mase moleculare diferite (1.5, 2, și 3 kDa) și polietilenimină ramificată cu masă moleculară mică (0.8 kDa), aceste componente fiind conectate prin legături covalente reversibile de tip imină la un nucleu de TA. Ideea studiului a fost de a obține o librărie ce conține vectori în compoziția cărora să fie variat raportul molar de H₂N-PEG-NH₂ utilizat (de la 0.1 echivalenți la 1 echivalent) precum și masa moleculară a acestui polimer de la 1.5 kDa la 3 kDa.

Tabel 3. Compoziția chimică a PDC-urilor NV1-NV30 obținute.

Vector*	Etapa I		Etapa a II-a		Etapa a III-a	
	SQ-PEG-NH ₂ -TA		H ₂ N-PEG-NH ₂ *		bPEI-0.8kDa	
	M (kDa)	Raport molar (ech)	M (kDa)	Raport molar (ech)	M (kDa)	Raport molar (ech)

NV01 – NV10	2	1	1.5	0.1 – 1	0.8	1.5
NV11 – NV20	2	1	2	0.1 – 1	0.8	1.5
NV21 – NV30	2	1	3	0.1 – 1	0.8	1.5

*denumirea vectorilor a fost făcută ținând cont de lungimea lanțului de PEG și în funcție de raportul molar de PEG(NH₂)₂ utilizat în etapa a doua. Spre exemplu NV01 conține 0.1 echivalenți de PEG(NH₂)₂ cu masa moleculară de 1.5 kDa, iar NV10 conține 1 echivalent din același PEG. (tabelul complet se regăsește în subcapitolul experimental).

Deoarece PDC-urile din librăria NV sunt predispuși la formarea sistemelor de auto-asamblare în apă, un obiectiv importat a fost punerea în evidență a influenței lungimii moleculelor de PEG în procesul de auto-asamblare. Astfel au fost investigate PDC urile ce contin moleculele de H₂N-PEG-NH₂ de 1500, 2000 și 3000 Da.

Astfel au fost studiate NV10, NV20 și NV30 prin tehnicile TEM și DLS. Analizând imaginile TEM, s-a putut observa formarea de particule sferice pentru toate PDC-urile investigate. Interesant este că schimbarea H₂N-PEG-NH₂ de la 1500 Da (NV10) la 2000 Da (NV20) și la 3000 Da (NV30), a dus la scăderea dimensiunii particulelor, arătând influența clară a lungimii unității PEG asupra formării PDCurilor. S-a observat, de asemenea, că în cazul NV20 și NV30, care conțin unitățile mai lungi de PEG, a avut loc o aglomerare parțială de particule. Datele TEM au fost bine susținute de analiza DLS. În cazul NV10, la diferite concentrații analizate, s-a observat o scădere puternică a mărimii hidrodinamice a particulelor odată cu creșterea concentrației, prezentând un comportament similar cu cel micelar.

Abilitățile de interacțiune ale compușilor NV1-NV30 cu pDNA au fost studiate cu ajutorul electroforezei în gel de agaroză, utilizând bPEI-0.8kDa drept compus de referință.

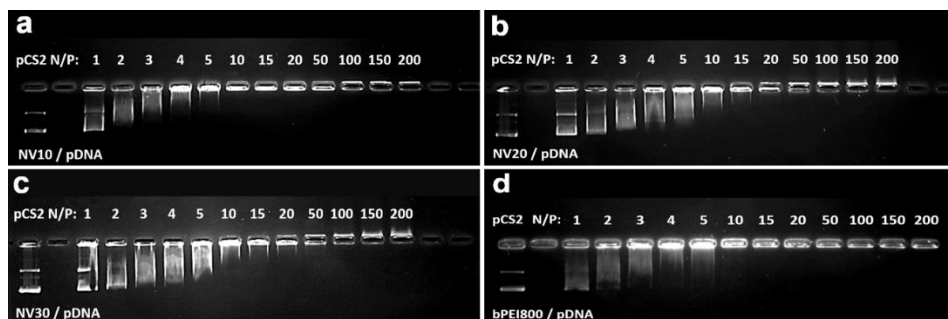


Figura 5. Studiu de electroforeză pe gel de agaroză pentru procesul de complexare dintre pDNA și NV10, NV20, NV30 rapoarte N/P corespunzătoare (a) NV10/pDNA, (b) NV20/pDNA, (c) NV30/pDNA and (d) bPEI-0.8kDa/pDNA.

S-a observat că creșterea lungimii $\text{H}_2\text{N-PEG-NH}_2$ de la 1500 Da la 3000 Da în compoziția NV-urilor se traduce prin slăbirea capacității de legare a pDNA (**figura 5**). Dependența observată ar putea fi atribuită unui grad de împiedicare sterică a unităților bPEI-0.8 kDa de lungimea unităților PEG utilizate în PDCuri.

Au fost înregistrate imagini AFM (**figura 6**) pentru NV10/pDNA, NV20/pDNA, NV30/pDNA pentru a pune în evidență formarea poliplecșilor.

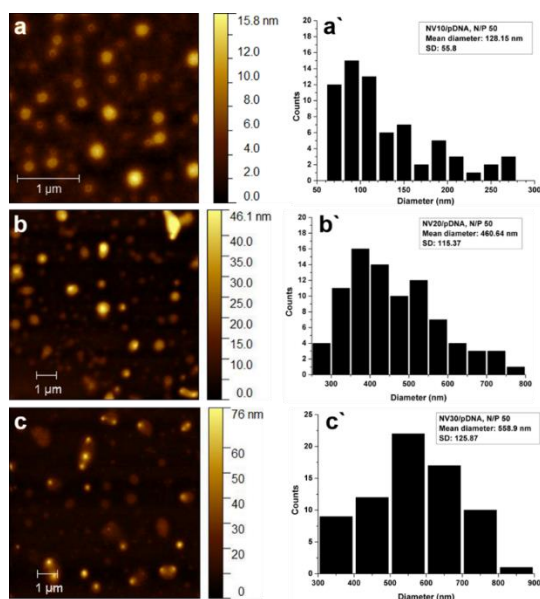


Figura 6. Imagini AFM înregistrate pentru: (a) poliplexul NV10/pDNA, (b) poliplexul NV20/pDNA și (c) poliplexul NV30/pDNA.

Pentru poliplecșii NV10/pDNA la raportul N/P 50, imaginile AFM au evidențiat particule bine definite de formă sferică (**figura 6a**) cu distribuția dimensiunilor de ~ 130 nm (**figura 6a'**), având o dimensiune potrivită pentru înglobarea în celulă. Poliplecșii NV20/pDNA și NV30/pDNA (**figura 6b, c**) au arătat formarea de particule mai mari cu dimensiuni cuprinse între 460 și respectiv 560 nm (**figura 6b', c'**), indicând o influență clară a lungimii unității PEG în mecanismul de formare a poliplecșilor.

3.2.2. Testări biologice in vitro

Polipecșii NV1-NV30/pDNA au fost formați la raportul N/P 50 și 100 și s-au testat pe linia celulară HeLa folosind ca referință bPEI-0.8kDa, acesta fiind utilizată în compoziția vectorilor. Pentru aceste probe analizate, eficiența transfecției a fost mai semnificativă la raportul N/P 100 comparativ cu raportul N/P 50.

Evaluarea toxicității polipeptidelor NV/pDNA, s-a efectuat cu ajutorul testului MTS și rezultatele obținute sunt reprezentate grafic în **figura 7b**, viabilitatea celulelor fiind calculată și exprimată în procente în raport cu viabilitatea celulelor netratate (viabilitate 100%).

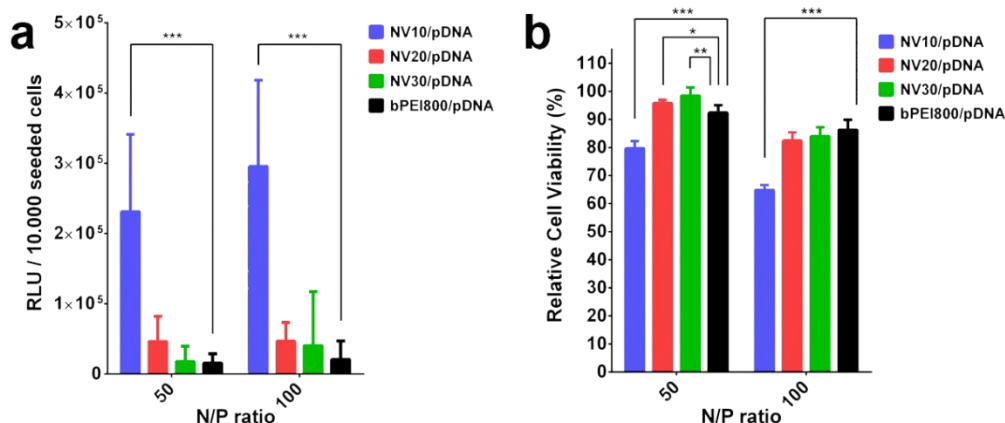


Figura 7. Testări *in vitro* ale polipeptidelor NV10, NV20, NV30 pe celule HeLa: (a) eficiența de transfecție, (b) toxicitatea celulară.

Astfel, s-a constatat că utilizarea H₂N-PEG-NH₂ cu mase moleculare mai mari în compoziția PDC a mărit biocompatibilitatea vectorului, dar, cu toate acestea, a dus la scăderea eficienței de transfecție (**figura 7a**). Rezultatele obținute în urma testărilor biologice *in vitro* pe celule HeLa, a fost observat faptul că prin creșterea raportului molar de H₂N-PEG-NH₂ de la 0.1 echivalenți până la 1 echivalent a rezultat o îmbunătățire semnificativă a eficienței de transfecție. În general, probele analizate la rapoarte N/P de 100, au prezentat eficiență de transfecție superioară comparativ cu raportul N/P de 50. Mai mult, masa moleculară a H₂N-PEG-NH₂ a prezentat o influență semnificativă atât în cazul eficienței de transfecție cât și în cazul viabilității celulare. Astfel, prin utilizarea lanțurilor de PEG cu mase moleculare de 2 kDa și 3 kDa la obținerea vectorilor non-virali duce la creșterea biocompatibilității acestora *in vitro* concomitent cu diminuarea eficienței de transfecție pe linia celulară HeLa.

1. Studii *in vitro* de țintire specifică celulară a vectorului NV10

Tratamentele actuale pentru diferite forme de cancer sunt deseori ineficiente datorită absorbției nespecifice a agenților terapeutici de către țesuturile periferice. Pentru eliminarea acestor probleme, au fost utilizate o serie de abordări cu scopul de a îmbunătăți absorbția agentului chimioterapeutic de către celulele tumorale fără a altera celulele și țesuturile sănătoase. Una dintre aceste abordări implică utilizarea liganzilor pentru țintire, de tipul anticorpilor modificați precum și peptidele cu afinitate tumorală, aceștia au primit o atenție considerabilă întrucât au capacitatea

de a ținti receptorii specifici din celulele canceroase [48-51]. Liganzii de tipul celor menționați anterior sunt conjugați la agenții chimioterapeutici obținându-se conjugate anticorp-medicament sau conjugate peptidă-medicament (CPM) care livrează specific agenții chimioterapeutici la celulele tumorale [52-55]. Proiectarea CPM din punct de vedere structural implică o selectare adecvată a peptidei, a conectorului care asigură un timp suficient pentru a tranzita prin sistemul circulator până la țesutul tumoral unde este scindat și nu în ultimul rând a medicamentului chimioterapeutic.

Cancerul de sân triplu negativ este o formă foarte agresivă a cancerului de sân care prezintă o dificultate ridicată de a fi ținută în mod specific. Această dificultate de ținere se datorează lipsei de expresie a receptorilor hormonal (estrogen și progesteron) precum și a receptorului HER2 [56, 57]. Principalul tratament pentru combaterea acestei forme de cancer este chimioterapia [56], însă în ultima perioadă au fost propuse câteva peptide pentru ținerea receptorilor existenți în celulele responsabile pentru cancerul de sân [53, 58-61]. Spre exemplu peptida WXEAAAYQRFL, denumită în continuare DP18, se leagă de cheratina 1 (KRT1) care joacă un rol important în cancerul de sân triplu negativ [62, 63].

3.2.1.1 Sinteza vectorului NV10 conjugat cu peptida DP18

Conjugarea vectorului non-viral NV10, a fost făcută în două etape (**schema 5**) conform protocolului descris în literatură [64] și utilizând componentele în cantitățile prezentate în **tabelul 4**.

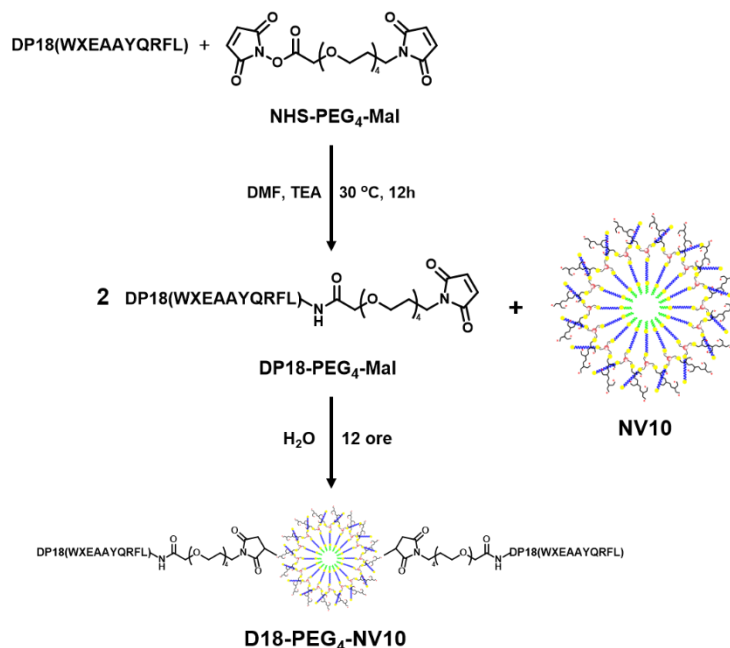
Tabel 4. Cantitățile componentelor utilizate la conjugarea NV10 cu peptida DP18.

	DP18	Mal-PEG₄-NHS	NV10
M (Da)	1399.64	513.50	~ 4325.00
m (mg)	6.50	2.37	10.00
n (nmol)	4.60	4.60	2.30

În prima etapă, peptida DP18 a fost funcționalizată cu conectorul Mal-PEG₄-NHS în mediu de dimetilformamidă și trietil amină la 30°C pentru 12 ore. Amestecul de reacție a fost concentrat la sec, folosind instalația de vid înaintat, iar reziduul rămas a fost purificat prin cromatografia pe coloană cu silica gel ducând la obținerea DP18-PEG₄-Mal sub forma unei pulbere albe.

În a doua etapă, compusul DP18-PEG₄-Mal obținut anterior a fost solubilizat în apă ultrapură, iar peste soluția obținută a fost adăugat vectorul NV10 sub formă de soluție apoasă în raportul molar de 2 la 1. Amestecul de reacție a fost lăsat la agitare magnetică, în condiții

ambientale pentru 12 ore după care a fost filtrat rezultând compusul DP18-PEG4-NV10 în soluție apoasă.



Schema 5. Etapele de obținere a vectorului NV10 conjugat cu peptide DP18.

Vectorul funcționalizat a fost utilizat fără purificare ulterioară în determinarea specificității acestuia cu privire la eficiența de transfecție pentru linia celulară MCF7.

3.2.1.2 Evaluarea capacității de complexare a plasmidului pCS2

Capacitatea conjugatului DP18-PEG₄-NV10 de a împacheta plasmidul pCS2 a fost evaluată utilizând electroforeza în gel orizontal de agaroză (**figura 8**). Mobilitatea electroforetică a poliplexului DP18-PEG₄-NV10/pCS2 a fost determinată la diferite rapoarte N/P și a fost comparată cu cea a plasmidului liber (**figura 8a**). De asemenea, rezultatele obținute au fost comparate și cu cele obținute în cazul poliplexului NV10/pCS2.

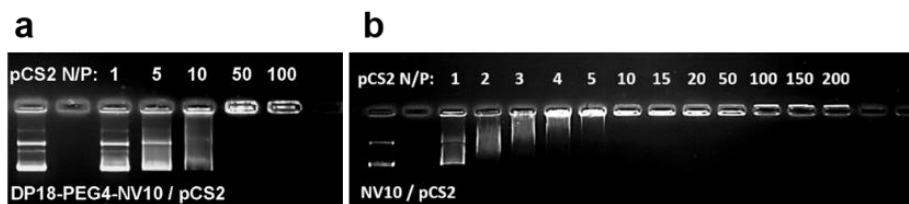


Figura 8. Mobilitatea electroforetică a poliplexului DP18-PEG₄-NV10/pCS2 (**a**) și a poliplexului NV10/pCS2 (**b**).

Rezultatele obținute în urma determinării capacității de complexare a plasmidului pCS2 de către DP18-PEG₄-NV10, atestă faptul că acesta împachetează complet plasmidul între raportul N/P de 10 și raportul N/P de 50. De asemenea, prin compararea rezultatelor obținute în cazul

poliplexului DP18-PEG₄-NV10 (**figura 8a**) cu cele obținute pentru poliplexul fără peptidă NV10/pCS2 (**figura 8b**), a fost observată o diminuare a capacității de complexare a plasmidului pCS2 după conjugare a vectorului NV10 cu peptida DP18. Astfel capacitatea de complexare a scăzut, conjugatul DP18-PEG₄-NV10 necesitând un raport N/P mai mare pentru formarea completă a poliplexului.

3.2.1.3 Testele *in vitro* de evaluare a eficienței de transfecție

Întrucât peptida DP18 prezintă afinitate pentru linia celulară MCF7, testele de evaluare *in vitro* a eficienței de transfecție au fost făcute comparativ pe două linii celulare canceroase, HeLa și respectiv MCF7. Pentru a putea observa mai bine specificitatea peptidei pentru linia MCF7, în acest studiu a fost folosit atât poliplexul DP18-PEG₄-NV10/pCS2 cât și poliplexul NV10/pCS2 la diferite rapoarte N/P, iar rezultatele obținute în urma testării sunt reprezentate grafic ca valori medii $\pm$ deviația standard (S.D.) (**figura 9**).

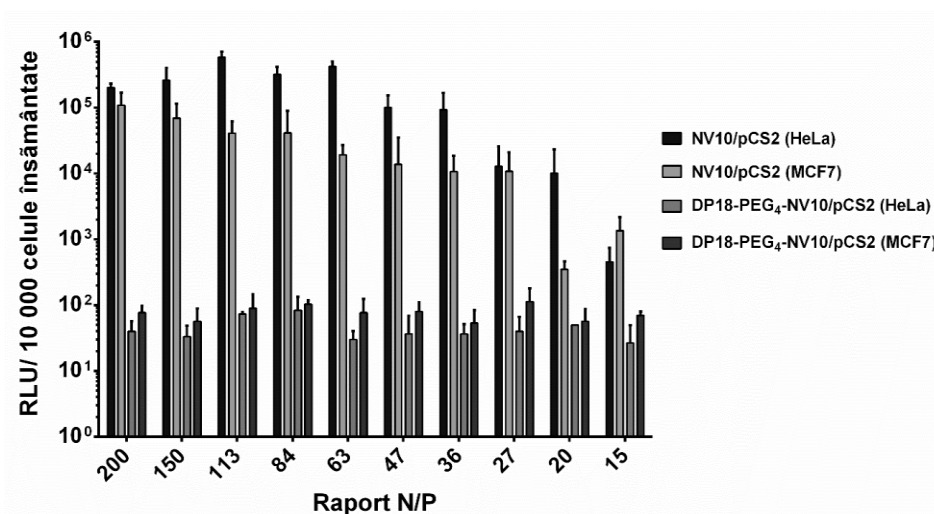


Figura 9. Eficiența de transfecție a poliplexșilor DP18-PEG₄-NV10/pCS2 și NV10/pCS2 pe liniile celulare HeLa și MCF7. Rezultatele sunt exprimate ca unități relative de luminescență (RLU) pe 10000 de celule însămânțate.

Analizând rezultatele reprezentate în **figura 9**, se poate observa o diferență considerabilă a eficienței de transfecție pe liniile HeLa și MCF7 între poliplexul NV10/pCS2 și poliplexul DP18-PEG₄-NV10/pCS2. Astfel, poliplexul NV10/pCS2 prezintă o eficiență superioară pe ambele linii celulare la toate rapoartele N/P studiate în comparație cu poliplexul DP18-PEG₄-NV10/pCS2, manifestând o oarecare specificitate pentru linia celulară HeLa, în acest caz obținându-se valori mai ridicate ale eficienței de transfecție. În același timp, rezultatele obținute în cazul poliplexului DP18-PEG₄-NV10/pCS2, deși sunt considerabil mai mici, atestă faptul că acesta are afinitate pentru linia celulară MCF7, așa cum era de așteptat.

Rezultatele obținute în urma acestui studiu demonstrează faptul că prin conjugarea vectorilor non-virali cu peptida DP18 se obține o transfecție specifică pentru linia MCF7. De asemenea, inevitabil au apărut și o serie de necunoscute în ceea ce privește diminuarea eficienței de transfecție în urma procesului de conjugare a vectorului cu peptida DP18. Aceste necunoscute reprezintă scopul continuării acestui studiu prin investigarea tuturor factorilor care declanșează diminuarea eficienței de transfecție.

În urma acestui studiu a fost realizată conjugarea vectorului NV10 cu peptida D18 în raport de 1 la 2, folosind protocoalele existente în literatură și modificate pentru sistemul nostru, obținând conjugatul DP18-PEG₄-NV10. În urma testului pentru determinarea capacității de complexare a plasmidului pCS2 de către vectorul DP18-PEG₄-NV10 a fost observată o scădere a capacității de complexare în comparație cu vectorul de plecare NV10. Rezultatele obținute în urma determinării eficienței de transfecție au arătat faptul că prin conjugarea vectorilor cu peptida DP18 se obține o specificitate pentru linia celulară tumorală MCF7 după cum era de așteptat. Însă, eficiența de transfecție în cazul conjugatului studiat a suferit o diminuare pe ambele linii celulare studiate, fapt care duce la concluzia că sistemul are nevoie de optimizare în ceea ce privește compoziția cât și puritatea vectorului, caracterizarea completă a derivaților din punct de vedere structural și morfologic, cât și testarea in vitro a mai multor vectori.

Scopul acestui studiu a fost îndeplinit cu succes, iar studiile ulterioare se vor axa pe partea de sinteză și izolare a conjugatului de interes precum și pe posibilitatea de a utiliza diferite rapoarte între vector și peptidă.

3.3. Librăria BF

Studiul influenței moleculelor de PEI cu masa moleculară de 25 kDa asupra proprietăților vectorilor non-virali pe bază de scuolenă

În urma studiului prezentat, au fost obținute o serie de rezultate în ceea ce privește obținerea și testarea biologică a unor sisteme de vectori non-virali dinamici pe bază de scuolenă PEGilată, glutaraldehidă și polietilenimină ramificată cu masa moleculară de 25 kDa. Astfel, a fost obținută o serie de 5 vectori non-virali a căror compoziție diferă prin raportul molar de bPEI-25kDa utilizat. În urma studiilor de morfologie a fost observat faptul că vectorii prezintă în medii apoase o structură sferică de tip nucleu-înveliș, care este datorată caracterului amfifilic care conține o parte hidrofobă (scuolenă) și o parte hidrofilă (polietilenimină). Dimensiunile particulelor măsurate pe baza imaginilor TEM prezintă dispersie neuniformă, cu valori cuprinse între 269 nm și 1632 nm

având o valoare medie de 680 nm. Prin electroforeza în gel de agaroză a fost determinată abilitatea vectorilor BF1-BF5 de a complexa plasmidul pCS2, rezultatele acestui studiu atestă faptul că vectorii non-virali obținuți au capacitatea de a împacheta complet plasmidul începând cu valori ale raportului N/P de 5. Testările *in vitro* de determinare a citotoxicității și a eficienței de transfecție pe celule HeLa, au generat o serie de rezultate interesante care au demonstrat faptul că prin utilizarea bPEI-25kDa în diferite rapoarte molare în compoziția vectorilor de acest tip duc la rezultate diferite în ceea ce privește eficiența de transfecție care este strâns legată de compoziția și de raportul acestora în moleculă. Din punct de vedere al toxicității, nivelul citotoxic nu a suferit schimbări substanțiale în aceste cazuri, viabilitatea celulară în cazul poliplecșilor BF1-BF5/pCS2 prezentând valori similare cu martorul bPEI-25kDa la rapoartele N/P de 5 și 7. În schimb, la raportul N/P de 10, poliplecșii obținuți au prezentat o toxicitate mai mare decât în cazul martorului ce poate fi explicată de concentrația mărită a glutaraldehidei, cunoscută în literatură că induce toxicitate la testările *in vitro* pe celule.

Concluzia globală a acestui studiu este că sistemele pe bază de scualenă PEGilate, glutaraldehydă și bPEI-25kDa pot fi utilizate cu succes la rapoartele N/P 5 având compoziția vectorului BF4 și N/P 7 având compoziția vectorului BF5. Astfel, bPEI-25 kDa poate fi integrat cu succes în sistemele constituționale dinamice pentru a fi utilizate ca vectori non-virali pentru transportul și transfecția acizilor nucleici.

3. Librăria DA

Studiul de marcare celulară utilizând vectori non-virali fluorescenți

Imagistica prin fluorescență este o tehnică utilizată des în ultima perioadă pentru vizualizarea și supravegherea anumitor țesuturi sau procese biologice *in vitro* și *in vivo* [65, 66]. Această tehnică este deosebit de importantă datorită cererii continue de compuși fluorescenți fotostabili, în special pentru microscopie *in vivo*, pentru a obține imagini de înaltă calitate și pentru a permite monitorizarea prelungită a celulelor în timp, toate acestea folosind metoda de biomarcare fluorescentă [67, 68].

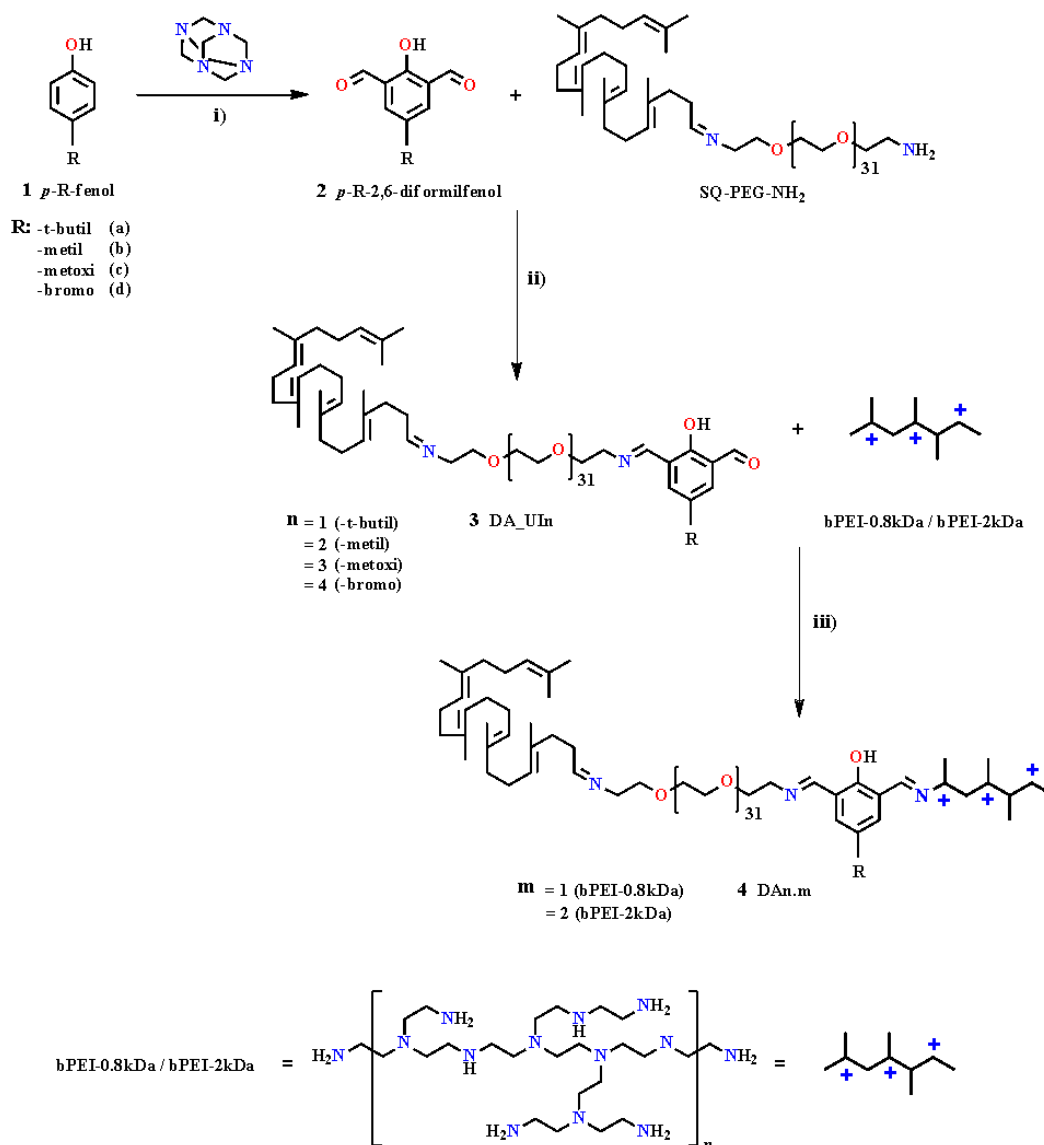
Pentru marcare intracelulară, moleculele sau biomoleculele fluorescente trebuie să penetreze membrana plasmatică celulară. Deseori, această proprietate este asigurată prin conjugarea acestora cu diferite molecule polimerice cationice, cunoscute pentru creșterea eficienței de penetrare a membranei celulare, spre exemplu PEI, care datorită grupărilor aminice ușor protonabile, pot

facilita interacțiunea cu proteoglicanii de pe suprafața celulelor precum și cu sindecanii proteici transmembranari ușurând astfel penetrarea celulară [69, 70].

Având în vedere cele prezentate anterior, ne-am propus obținerea și caracterizarea unor vectori non-virali pe bază de scuolenă PEGilată și polietilenimină ramificată cu masă moleculară mică (0.8, 2 kDa), acestea fiind conectate prin legături covalente reversibile de tip imină pe un substrat fluorescent derivat de la fenoli *p*-substituiți cu diferite grupări funcționale. Vectorii non-virali obținuți au fost caracterizați fizico-chimic utilizând tehnici uzuale și care au aplicabilitate în cazul acestor sisteme. De asemenea, aceștia au fost studiați din punct de vedere al comportamentului biologic *in vitro* pe linia celulară HeLa concomitent cu vizualizarea acestui comportament prin microscopia optică de fluorescență.

3.3.1 Sinteza vectorilor non-virali fluorescenți

Sinteza librăriei de vectori non-virali fluorescenți DA a fost realizată în trei etape succesive conform **schemei 6** prin utilizarea protocoalelor raportate în literatură [71-74]. În prima etapă (i) au fost obținuți compușii diformilați fluorescenți (**2a-d**) derivați de la fenolii *p*-substituiți disponibili comercial (**1a-d**) prin utilizarea reacției Duff [75] conform procedeele de sinteză raportate de Lindoy [76]. În prima etapă a sintezei, fenolii *p*-substituiți (**1a-d**) au fost tratați cu urotropină în mediu de acid trifluoroacetic sub agitare magnetică, la reflux pentru 48 - 90 de ore. Parcurusul reacției a fost monitorizat prin TLC și obținerea compușilor diformilați (**2a-d**) a fost confirmată prin spectroscopia RMN și FTIR. În a doua etapă (ii), derivații diformilați de fenol *p*-substituit (**2a-d**) au fost solubilizați într-un volum minim de clorură de metilen, iar peste soluțiile obținute a fost adăugată o soluție de SQ-PEG-NH₂ (obținută anterior – capitolul II) [71, 77] în acetonitril în raport molar 1:1. Amestecurile de reacție au fost agitate magnetic pentru 48 ore la temperatură ambientală (23 °C) sub atmosferă de azot, obținându-se în randamente cantitative derivații intermediari (**3**) denumiți DA_UI1 – DA_UI4. În ultima etapă (iii), compușii intermediari (**3**) au fost funcționalizați prin legături covalente reversibile de tip imină cu bPEI-0.8kDa și bPEI-2kDa (în raport molar 1:1) în soluții apoase sub agitare magnetică pentru 48 de ore la temperatură ambientală (23 °C), obținându-se vectorii non-virali fluorescenți (**4**) denumiți DA1.1 – DA4.2 conform **tabelului 5**.



Schema 6. Etapele de obținere a vectorilor non-virali fluorescenți DA. Condiții de reacție: **i)** urotropină, TFA, reflux, 48 – 90 h; **ii)** Acetonitril / DCM, 24 °C, 48 h; **iii)** apă ultrapură, 24 °C, 48 h.

Denumirea vectorilor a fost dată în funcție de tipul substituentului existent în poziția *para* la substratul fenolic precum și în funcție de masa moleculară a PEI folosită, conform **tabelului 5**.

Tabel 5. Denumirea vectorilor conform componentelor utilizate la sinteze.

Denumire	<i>p</i> -R-2,6-diformilfenol		SQ-PEG-NH ₂	bPEI-MDa	
	R	Raport molar (echiv.)	Raport molar (echiv.)	M (kDa)	Raport molar (echiv.)
DA1.1	- <i>t</i> Bu	1	1	0.8	1
DA1.2	- <i>t</i> Bu	1	1	2	1
DA2.1	-CH ₃	1	1	0.8	1
DA2.2	-CH ₃	1	1	2	1
DA3.1	-OCH ₃	1	1	0.8	1
DA3.2	-OCH ₃	1	1	2	1

DA4.1	-Br	1	1	0.8	1
DA4.2	-Br	1	1	2	1

Vectorii non-virali fluorescenți au fost stocați pentru studiile ulterioare în soluții apoase la temperatura de 4 °C.

3.3.2 Determinarea morfologiei și a dimensiunii vectorilor prin SEM și DLS

Vectorii librăriei DA, conținând SQ-PEG-NH₂, se supun procesului de auto-asamblare în soluții apoase sub forma unor particule sferice de tipul nucleu-înveliș.

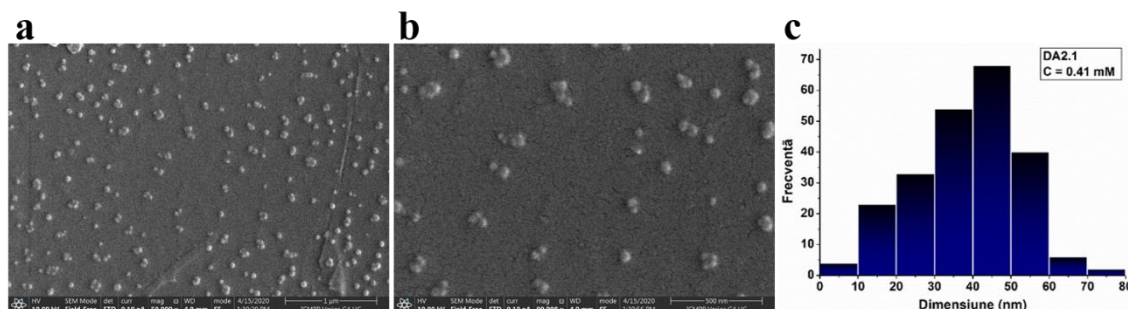


Figura 10. Microimaginele SEM pentru vectorul non-viral DA2.1 la scala de 1 μm (a) și la scala de 500 nm (b), precum și distribuția dimensiunilor ale acestuia (c). La determinarea distribuției dimensiunilor a fost folosit programul ImageJ și au fost măsurate 230 de particule.

Studii de morfologie prin microscopia electronică de baleiaj (SEM) pe exemplul vectorului DA2.1 (**figura 10**) au arătat că vectorul DA2.1 la concentrația de 0.41 mM (**figura 10a-b**), formează particule sferice de tipul nucleu-înveliș a căror dimensiune este uniformă și care au o valoare medie a distribuției dimensiunilor de aproximativ 38 nm (**figura 10c**).

Pentru a determina dimensiunile vectorilor în medii apoase, soluțiile au fost analizate prin tehnica DLS, ce implică determinarea diametrului hidrodinamic al acestora. În acest scop, probele au fost analizate la trei concentrații diferite (0.18 mM, 0.41 mM și 0.81 mM), iar rezultatele obținute sunt reprezentate grafic în **figura 11**.

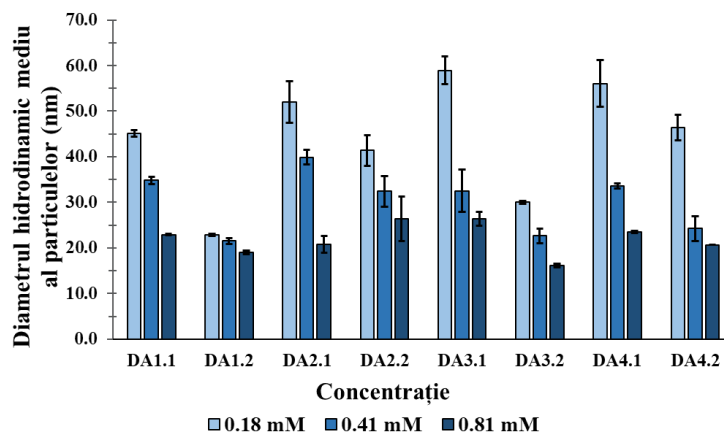


Figura 11. Diametrele hidrodinamice medii ale particulelor determinate prin analiza DLS.

Rezultatele obținute în urma măsurătorilor DLS a soluțiilor apoase ce conțin vectorii non-virali DA1.1 – DA4.2, la trei concentrații diferite, demonstrează faptul că diametrele hidrodinamice sunt influențate atât de compoziția vectorilor cât și de concentrația utilizată la efectuarea determinărilor. Astfel, vectorii ce au în compoziție bPEI-0.8kDa au prezentat valori mai mari ale diametrului hidrodinamic (45 – 60 nm) decât în cazul vectorilor ce au în compoziție bPEI-2kDa (25 – 45 nm), la concentrația de 0.18 mM. Această observație poate fi pusă pe seama fenomenului de auto-asamblare a vectorilor, dimensiunile mai mici obținute în cazul vectorilor cu bPEI-2kDa apar datorită unor interacțiuni intramoleculare mai puternice care duc la o împachetare mai strânsă a componentelor din componența vectorilor [78]. De asemenea, este clar faptul că dimensiunile diametrului hidrodinamic sunt dependente de concentrația soluțiilor utilizate. Astfel, odată cu creșterea concentrației, valorile diametrelor hidrodinamice scad, acest lucru fiind observat și în cadrul altor studii raportate în literatură [73, 79-81]. Acest comportament este atribuit fenomenului de auto-aranjare micelară [82]. De asemenea, rezultatele obținute în urma analizei DLS a soluției ce conține vectorul DA2.1 la concentrația de 0.41 mM confirmă dimensiunile obținute în urma analizei SEM. Astfel putem conclud că dimensiunile vectorilor sunt cuprinse între 20-60 nm și variază dependent de natura nucleului fluorescent, a lanțului de PEI integrat în structură precum și de concentrația vectorilor în soluțiile apoase.

3.3.3 Studiul de fluorescență în soluție

Scopul acestui studiu a fost obținerea unor vectori non-virali cu proprietăți de emisie în soluții apoase pentru a fi utilizați în studierea unor mecanisme de internalizare în structurile celulare folosind imagistica prin fluorescență. În vederea realizării acestui obiectiv, primul pas a

fost studierea compușilor de plecare și vectorii obținuți pe baza acestora din punct de vedere al capacității de absorbție și de emisie folosind spectrofotometrul UV-Vis, respectiv de fluorescență.

Spectrele de absorbție și de emisie ale compușilor mai sus menționați, au fost înregistrate în soluții apoase, având concentrația de 1×10^{-4} M, prin utilizarea unor cuve de cuarț cu drumul optic de 10 mm, iar spectrele obținute sunt prezentate în **figura 12** și **13**.

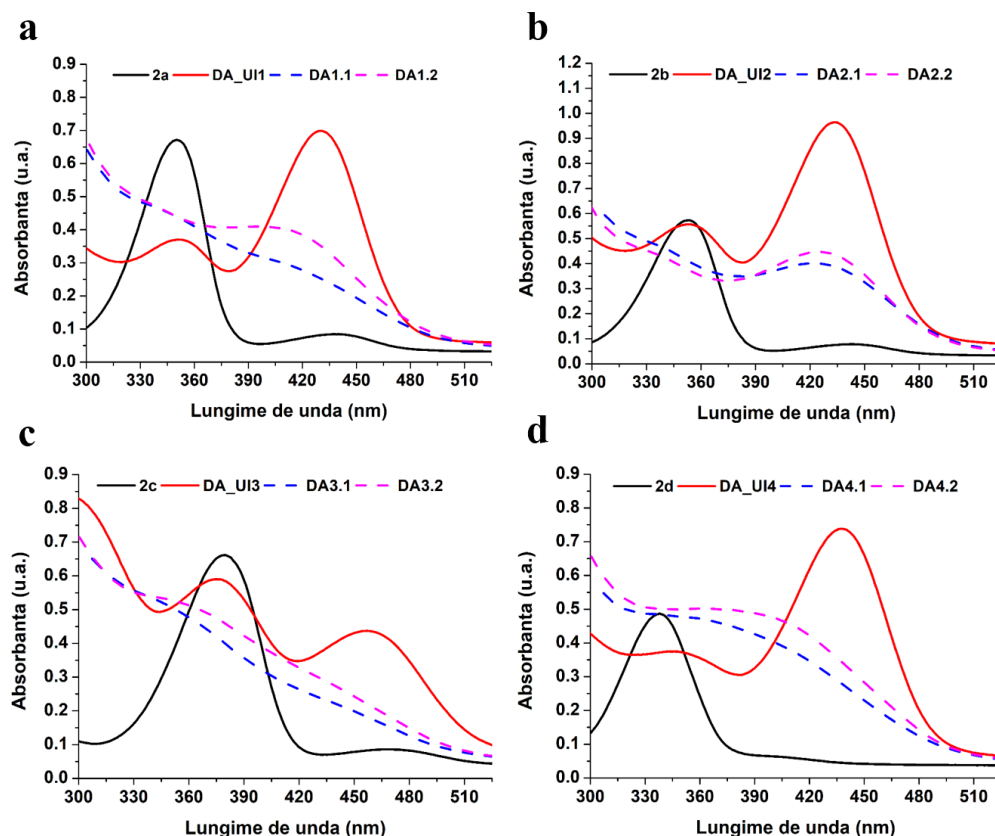


Figura 12. Spectrele UV-Vis ale vectorilor non-virali DA și a derivaților intermediari în soluții apoase la concentrația de 1×10^{-4} M.

În spectrele UV-Vis a compușilor de plecare **2a-d** dizolvați într-un amestec etanol/apă (**figura 12a-d**) se poate observa apariția a două benzi de absorbție. Cea mai intensă bandă prezintă maximul la aproximativ 355 nm, iar cea de-a doua bandă, de intensitate redusă, la aproximativ 450 nm (*linia neagră continuă*). Pe baza datelor din literatură cele două benzi au fost atribuite tranzițiilor electronice în doi conformeri ce conțin (i) OH-ul fenolic nemodificat sau (ii) OH-ul fenolic deprotonat (O⁻) [83, 84]. Este cunoscut faptul că acești doi conformeri prezintă benzi de intensități diferite, raportul dintre acestea variind în funcție de polaritatea solventului utilizat [84]. Astfel, putem spune că în cazul compușilor **2a-d** avem majoritar conformerul nemodificat datorită intensității ridicate a benzii cu maximul la 355 nm.

Derivații intermediari DA_UI1-4 prezintă aceleași benzi de absorbție în spectrele UV-Vis (**figura 12a-d**), însă intensitatea acestora este modificată (*linie roșie continuă*). Intensitatea benzii de la 355 nm este diminuată, în timp ce banda de la 450 nm se intensifică, acest lucru fiind în acord cu formarea majoritară a conformerului ce conține O⁻, probabil favorizată de formarea de legături de hidrogen în prezență de SQ-PEG-NH₂. Excepție de la această regulă face compusul **2c** (**figura 12c**) care prezintă benzile celor doi conformeri în rapoarte aproape egale.

Pentru vectorii DA1.1-DA4.2 care conțin în plus bPEI-0.8kDa sau bPEI-2kDa, profilul spectrelor de absorbție se menține (*linie albastră întreruptă și linie roz întreruptă*), însă benzile prezintă o intensitate mai redusă, în acord cu ecranarea moleculelor fluorescente indusă de prezența macromoleculelor de PEI cu grad de ramificare mare [78].

În urma rezultatelor obținute, a fost realizat un studiu de fluorescență în soluție a compușilor anterior menționați prin excitarea soluțiilor cu lungimea de undă caracteristică benzii de la aproximativ 355 nm, rezultatele fiind prezentate grafic în **figura 13**.

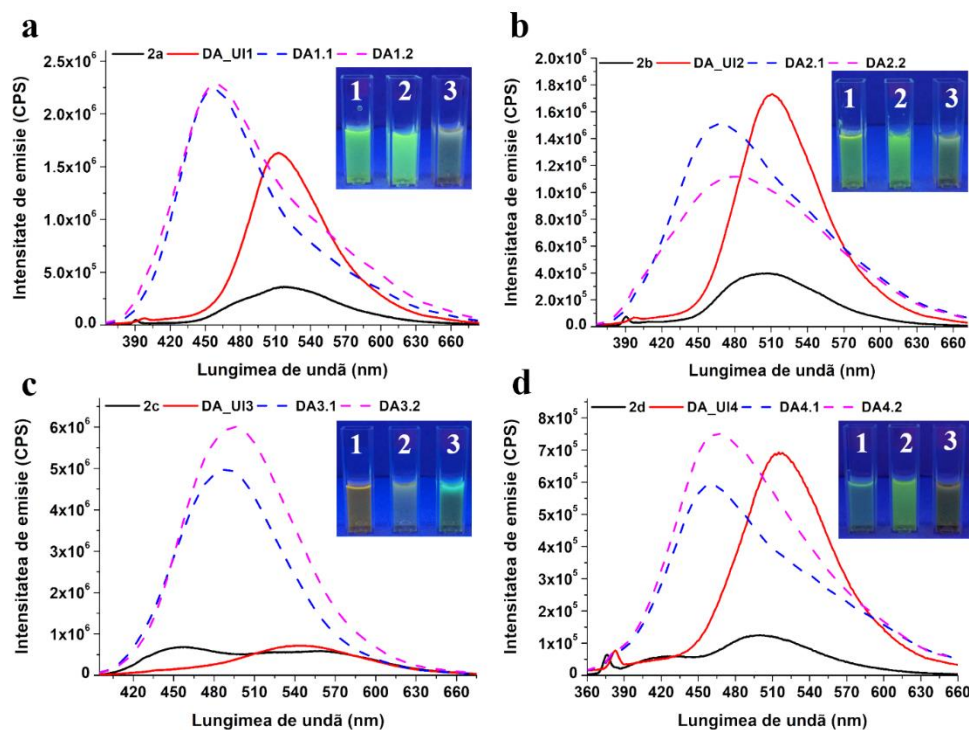


Figura 13. Spectrele de emisie ale vectorilor non-virali DA și a derivaților intermediari în soluții apoase la concentrația de 1×10^{-4} M.

Compușii de plecare **2a-d** prezintă o bandă de emisie largă de intensitate mică (**figura 13a-d**) cu un maxim la 510 nm în cazul compușilor **2a** și **2b** și două maxime în cazul compușilor **2c** (450 și 570 nm) și **2d** (420 și 510 nm). Interesant este faptul că în urma iradierii probelor cu o

lampă UV (excitare cu lungimea de undă = 365 nm), culoarea luminii emise observată cu ochiul liber în cazul compușilor **2a-b** (**figura 13a-b, insert 1**) este galben-verde, a compusului **2c** este portocalie (**figura 13c, insert 1**) și în cazul probei **2d** este albastră (**figura 13d, insert 1**).

Compușii intermediari DA_UI1, DA_UI2 și DA_UI4 prezintă un maxim de emisie intens la 515 nm, în timp ce compusul DA_UI3 prezintă un maxim de emisie de intensitate asemănătoare compusului de plecare **2c**, la o lungime de undă de 540 nm. Intensitatea fluorescenței compușilor intermediari a fost observată și în urma iradierii probelor cu o lampă UV cu $\lambda=365$ nm, unde s-a observat o fluorescență mai pronunțată în cazul compușilor DA_UI1, DA_UI2 și DA_UI4 față de cea a compusului DA_UI3. De asemenea, culoarea luminii emise în cazul celor trei compuși cu fluorescență pronunțată este galben-verzuie, iar a compusului DA_UI3 este galben-portocaliu, conform cu deplasarea observată în spectrul de emisie (**figura 13, insert 2**).

Spectrele de fluorescență ale vectorilor DA1.1-DA4.2 prezintă benzi de emisie intense în domeniul spectral 420 – 600 nm cu un maxim observat la 460 nm în cazul compușilor DA1.1, DA1.2, DA4.1 și DA4.2. În cazul compușilor DA2.1 și DA2.2, se observă o bandă de emisie largă deplasată spre albastru, față de compusul intermediar, cu un maxim la 475 nm. De asemenea, o deplasare mai pronunțată spre albastru a benzii de emisie, de intensitate superioară compușilor intermediari corespunzători, a fost observată în cazul compușilor DA3.1 și DA3.2, prezentând un maxim la 495 nm. Culoarea luminii emise sub lampa UV a vectorilor DA1.1, DA2.1 și DA4.1 este galben-portocalie, în timp ce în cazul vectorului DA3.1 este albastru-verde (**figura 13, insert 3**). În cazul spectrelor de emisie ale acestor compuși, se remarcă o deplasare spre albastru a culorii luminii emise față de compușii de plecare, fenomen posibil asociat cu formarea de agregate, demonstrată de măsurătorile DLS prezentate anterior [85, 86].

3.3.4 Capacitatea vectorilor de a complexa plasmidul

Pentru a determina capacitatea vectorilor DA1.1 – DA4.2 de a complexa plasmidul pCS2 a fost utilizată electroforeza în gel de agaroză, iar mobilitatea electroforetică a poliplecșilor obținuți a fost evaluată la diferite rapoarte N/P (**figura 14**). Rezultatele obținute în cazul poliplecșilor au fost raportate la mobilitatea electroforetică a plasmidului necomplexat și au fost comparate cu capacitatea de complexare a polimerului policationic utilizat la formarea acestor sisteme, bPEI-0.8kDa respectiv bPEI-2kDa.

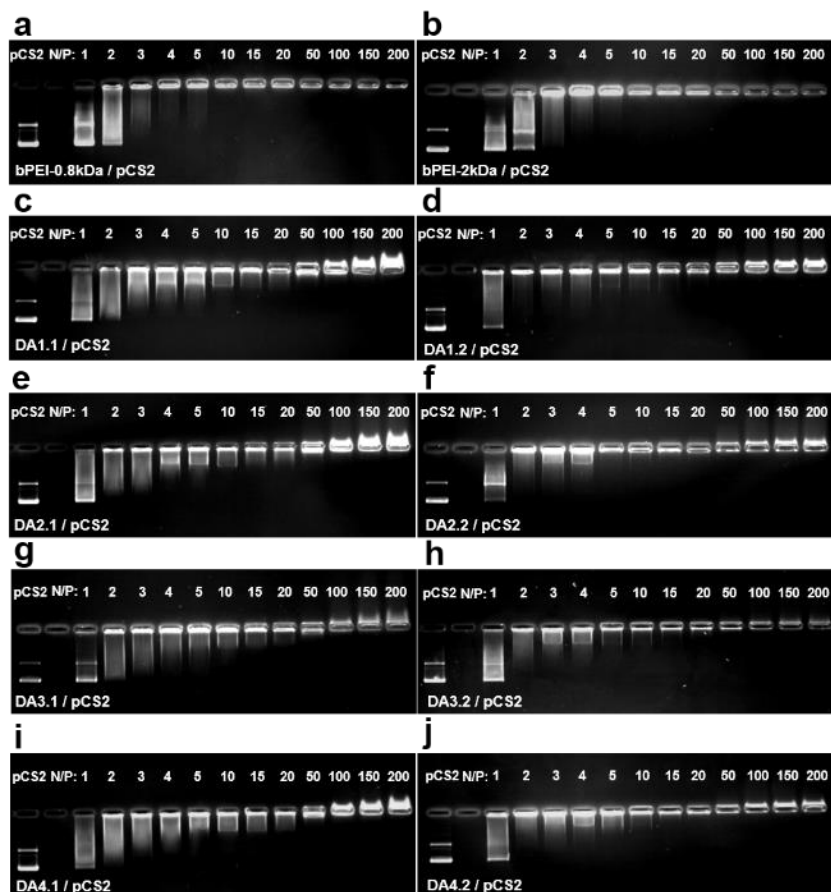


Figura 14. Mobilitatea electroforetică a poliplecșilor obținuți prin complexarea plasmidului pCS2 de către vectorii non-virali fluorescenți DA1.1 (c), DA1.2 (d), DA2.1 (e), DA2.2 (f), DA3.1 (g), DA3.2 (h), DA4.1 (i), DA4.2 (j) la diferite rapoarte N/P comparate la mobilitatea electroforetică a poliplecșilor obținuți cu bPEI-0.8kDa (a) și bPEI-2kDa (b) folosite drept control.

Rezultatele obținute în urma acestui studiu și prezentate în **figura 14a-j**, atestă faptul că vectorii non-virali fluorescenți DA1.1, DA2.1, DA3.1 și DA4.1 care au în compoziție bPEI-0.8kDa au capacitatea de a complexa complet plasmidul pCS2 începând cu rapoartele N/P de 50 (**figura 14c,e,g,i**), această capacitate fiind mai scăzută decât în cazul matorului utilizat (bPEI-0.8kDa) care împachetează complet plasmidul la raportul N/P de 10 (**figura 14a**). În cazul vectorilor non-virali DA1.2, DA2.2, DA3.2 și DA4.2 care au în compoziție bPEI-2kDa, se poate observa o împachetare completă a plasmidului pCS2 de către aceștia începând cu rapoartele N/P de 20 (**figura 14d,f,h,j**) în timp ce matorul utilizat (bPEI-2kDa) împachetează complet plasmidul începând cu raportul N/P de 10 (**figura 14b**). Acest fenomen de diminuare a capacității de complexare a plasmidului este pus pe seama interacțiunilor intermoleculare dintre PEG și PEI care duc la o ecranare a sarcinilor pozitive prezente la suprafața moleculelor de PEI [79].

3.3.5 Testele *in vitro* de evaluare a citotoxicității și a eficienței de transfecție pe celule HeLa

Testarea biologică *in vitro* a poliplecșilor DA1.1-DA4.2/pCS2 în vederea determinării citotoxicității și eficienței de transfecție a fost realizată în triplicat, iar rezultatele prezentate în **figura 15** reprezintă media rezultatelor din cele trei experimente.

Eficiența de transfecție *in vitro* a poliplecșilor DA1.1-DA4.2/pCS2 la rapoartele N/P 50 și 100 (**figura 15a**) a fost evaluată pe linia celulară HeLa folosind reactivul Bright-Glo™ Luciferase de la Promega, iar rezultatele obținute au fost comparate cu martorii bPEI-0.8kDa/pCS2 și bPEI-2kDa/pCS2 întrucât aceștia se regăsesc în compoziția vectorilor non-virali obținuți și este cunoscut în literatură faptul că acești polimeri policationici au capacitatea de a complexa și de a transfecta plasmidul fără a fi funcționalizați cu alți compuși.

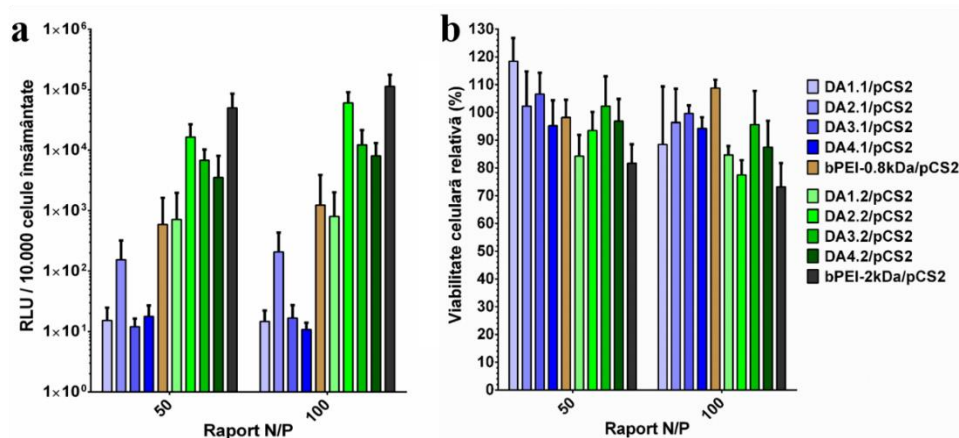


Figura 15. Eficiența de transfecție *in vitro* a poliplecșilor DA1.1/pCS2-DA4.2/pCS2 (a). Rezultatele sunt exprimate ca unități relative de luminescență (RLU) pe 10000 de celule însămânțate. Citotoxicitatea poliplecșilor DA1.1/pCS2-DA4.2/pCS2 determinată *in vitro* prin MTS pe celule HeLa (b). Rezultatele sunt prezentate ca valori medii $\pm$ deviația standard (S.D.); n = 18.

Rezultatele obținute în urma acestei testări (**figura 15a**) ne arată că poliplecșii investigați prezintă eficiență de transfecție mai redusă comparativ cu martorii utilizați la ambele rapoarte N/P, excepție o fac poliplecșii DA2.1/pCS2 și DA2.2/pCS2 care prezintă o eficiență de transfecție asemănătoare cu cea a martorilor utilizați. În același timp, poliplecșii DA1.1/pCS2, DA2.1/pCS2, DA3.1/pCS2 și DA4.1/pCS2 care au în compoziție bPEI-0.8kDa prezintă eficiență de transfecție mai redusă decât poliplecșii DA1.2/pCS2, DA2.2/pCS2, DA3.2/pCS2 și DA4.2/pCS2 care au în compoziție bPEI-2kDa, acest lucru fiind normal întrucât bPEI-2kDa dispune de un grad mai mare de ramificarea care ajută la complexarea unei cantități mai ridicate de plasmid [78]. De asemenea, comparând rezultatele obținute la cele două rapoarte N/P, se poate spune că nu există diferențe

semnificative între eficiențele de transfecție obținute la raportul N/P de 50 față de cele obținute la raportul N/P de 100, acest lucru fiind anormal, întrucât în studii precedente [71-74], poliplecșii au prezentat eficiențe de transfecție superioare la rapoartele N/P de 100 față de rapoartele N/P de 50.

Determinarea *in vitro* a citotoxicității poliplecșilor DA1.1-DA4.2/pCS2 pe linia celulară HeLa a fost realizată prin utilizarea tehnicii de determinare a activității metabolice celulare (MTS) [87, 88]. Rezultatele obținute în urma acestei determinări sunt reprezentate grafic în **figura 15b** și sunt exprimate sub formă de viabilitatea celulară relativă (%) care a fost calculată în funcție de viabilitatea celulară a celulelor netratate (viabilitatea celulară de 100%). Prin analiza rezultatelor obținute în cazul poliplecșilor DA1.1-DA4.2/pCS2 la raportul N/P de 50 se poate observa faptul că aceștia prezintă o viabilitate celulară mai ridicată decât martorii utilizați (bPEI-0.8kDa/pCS2 și bPEI-2kDa/pCS2), acest lucru putând fi pus pe seama scualenei PEGilate care prezintă biocompatibilitate ridicată [77] și care ajută la diminuarea efectului citotoxic a moleculelor de PEI utilizate. În același timp, rezultatele obținute la raportul N/P de 100 arată faptul că poliplecșii DA1.1/pCS2, DA2.1/pCS2, DA3.1/pCS2 și DA4.1/pCS2 manifestă o viabilitate celulară nesemnificativ redusă față de martorul bPEI-0.8kDa/pCS2 în timp ce poliplecșii DA1.2/pCS2, DA2.2/pCS2, DA3.2/pCS2 și DA4.2/pCS2 prezintă viabilitate celulară mai ridicată comparativ cu martorul bPEI-2kDa/pCS2, aceste observații nu au fost puse pe seama unui anumit fenomen, având nevoie de studii complementare de determinare a relației dintre structură - auto-asamblare - citotoxicitate – transfecție.

Rezultatele obținute în urma acestor testări demonstrează faptul că deși există variații ale viabilității celulare obținute în cazul poliplecșilor DA1.1-DA4.2/pCS2 la ambele rapoarte N/P, aceste variații sunt nesemnificative și manifestă o dependență moderată de compoziția poliplecșilor studiați. În acest caz, putem spune că poliplecșii obținuți prezintă citotoxicitatea redusă la rapoartele N/P de 50 și 100, iar utilizarea acestora în studii ulterioare poate fi făcută fără a afecta țesuturile biologice de interes. În ceea ce privește eficiența de transfecție, poliplecșii care au în componență vectorii non-virali fluorescenți DA2.1 și DA2.2 au prezentat cele mai bune rezultate dintre toți poliplecșii studiați, fiind folosiți în continuare la studiul de imagistică celulară prin fluorescență.

3.3.6 Studiul *in vitro* de imagistică celulară prin fluorescență

Capacitatea de internalizare a vectorilor non-virali fluorescenți DA2.1 și DA2.2 în celulele HeLa, a fost examinată utilizând microscopia prin fluorescență sub excitare cu lumină UV a celulelor HeLa incubate cu vectorii menționați anterior (**figura 16**).

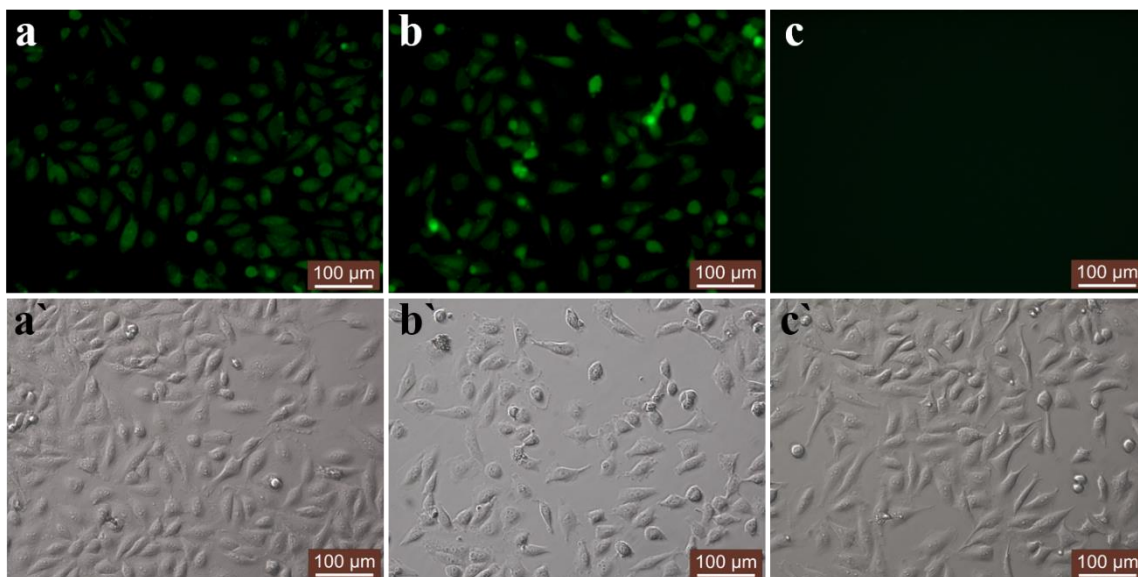


Figura 16. Imagini obținute cu microscopia prin fluorescență pentru celulele HeLa tratate cu vectorul DA2.1 (**a**), cu vectorul DA2.2 (**b**) și netratate (**c**) după 30 minute de incubare. Imagini obținute cu microscopia în câmp luminat pentru celulele HeLa tratate cu vectorul DA2.1 (**a'**), cu vectorul DA2.2 (**b'**) și netratate (**c'**).

Imaginile obținute prin microscopia de fluorescență pentru vectorii DA2.1 (**figura 16a**) și DA2.2 (**figura 16b**), după 30 de minute de incubare la concentrația de 1 mM, atestă faptul că aceștia au fost internalizați cu succes de către celulele HeLa și se regăsesc atât în citoplasmă cât și în nucleul celulelor. Pentru a exclude interferența posibilă de auto-fluorescență dată de celulele HeLa, a fost utilizat un control care reprezintă celule netratate (**figura 16c**), iar imaginea obținută în acest caz demonstrează faptul că celulele HeLa netratate nu prezintă fluorescență. În urma acestui studiu se poate spune că vectorii non-virali DA2.1 și DA2.2 prezintă proprietăți de emisie satisfăcătoare ce nu sunt restricționate de anumiți factori biologici, iar internalizarea acestora în structurile celulare poate fi vizualizată cu succes fără a provoca leziuni materialului biologic studiat.

3.3.7 Testele *in vitro* de evaluare a citotoxicității vectorilor DA2.1 și DA2.2 prin MTS

Întrucât biocompatibilitatea acestor vectori este esențială pentru a putea fi utilizați în anumite studii de imagistică celulară, a fost efectuat un studiu de viabilitate celulară realizat prin utilizarea tehnicii de determinare a activității metabolice celulare (MTS) pe celule HeLa [87, 88]. În acest

scop, vectorii non-virali fluorescenți DA2.1 și DA2.2 au fost testați la trei concentrații diferite. Rezultatele obținute și reprezentate grafic în **figura 17** sunt exprimate sub formă de viabilitatea celulară relativă (%) care a fost calculată în funcție de viabilitatea celulară a celulelor netratate (viabilitatea celulară de 100%).

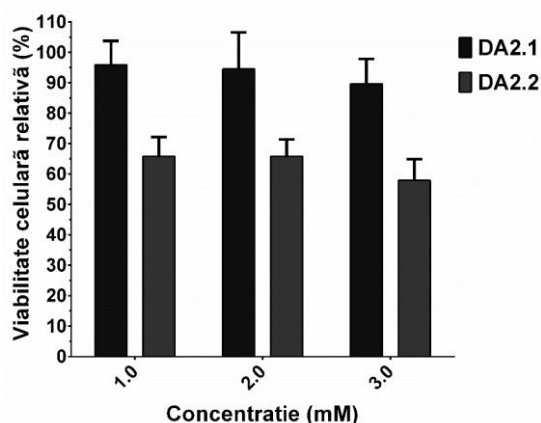


Figura 17. Citotoxicitatea vectorilor DA2.1 și DA2.2 determinată *in vitro* prin MTS pe celule HeLa. Rezultatele sunt prezentate ca valori medii $\pm$ deviația standard (S.D.); $n = 6$.

Examinând rezultatele obținute în urma acestui studiu, se poate observa faptul că vectorul DA2.1 prezintă biocompatibilitate ridicată, viabilitatea celulară la cele trei concentrații studiate prezintă valori de aproximativ 95%, cu diferențe nesemnificative la creșterea concentrației de la 1 mM la 3 mM. În cazul vectorului DA2.2, viabilitatea celulară este mai redusă, aceasta având valori de aproximativ 65%. Această scădere a viabilității celulare în cazul vectorului DA2.2 este pusă pe seama prezenței moleculelor de bPEI-2kDa, care este cunoscut că induce o citotoxicitate mai ridicată decât omologul său bPEI-0.8kDa [78]. În urma acestui studiu, putem evidenția potențialul vectorului DA2.1 de a fi utilizat cu succes în studii ulterioare de imagistică celulară.

În cadrul studiului prezentat a fost obținută o librărie ce conține 8 vectori non-virali (DA1.1 – DA4.2) cu proprietăți emise în soluții apoase. Compoziția vectorilor diferă atât prin nucleul fluorescent utilizat cât și prin masa moleculară a policationului folosit (bPEI de 0.8 kDa sau 2 kDa). Morfologia acestora a fost determinată prin SEM, iar rezultatele obținute atestă faptul că vectorii prezintă structuri sferice auto-asamblate de tipul nucleu-înveliș, a căror dimensiune este dispersă și variază între 10 și 70 nm având o valoare medie a distribuției dimensiunilor de 38.6 nm. Aceste observații au fost confirmate și de analiza DLS a soluțiilor apoase cu vectorii DA1.1 – DA 4.2, rezultatele obținute în acest caz demonstrând faptul că dimensiunile vectorilor sunt influențate atât de natura nucleului fluorescent utilizat cât și de concentrația soluției analizate,

aceste rezultate fiind în acord cu literatura de specialitate. Studiul pentru evaluarea capacității de emisie a compușilor studiați în soluție a fost realizat prin înregistrarea și prelucrarea spectrelor de absorbție și de emisie la concentrația de 1×10^{-4} M. Rezultatele obținute au arătat faptul că toți compușii obținuți inclusiv cei intermediari prezintă proprietăți fluorescente în soluții apoase la concentrația studiată, iar emisia lor la 365 nm sub lampa UV diferă în funcție de gradul de substituție și de substituentul din poziția para a nucleului fenolic.

De asemenea, pe baza spectrelor de fluorescență a fost observat faptul că intensitatea de emisie este mai accentuată în cazul vectorilor non-virali DA1.1 – DA4.2 comparativ cu derivații fenolici de plecare. Rezultatele obținute prin electroforeză atestă complexarea eficientă a vectorilor cu plasmid începând cu rapoartele N/P de 50 în cazul vectorilor ce au în compoziție bPEI-0.8kDa, pe când vectorii ce conțin bPEI-2kDa formează poliplecșii la rapoarte N/P de 20. Aceste observații fiind foarte bine corelate cu literatura. În ceea ce privește studiile in vitro de evaluare a viabilității celulare precum și a eficienței de transfecție, a fost observat faptul că poliplecșii obținuți prin complexarea plasmidului pCS2 de către vectorii DA1.1 – DA4.2 prezintă o citotoxicitate satisfăcătoare la ambele rapoarte N/P studiate (50 și 100), dintre aceștia remarcându-se poliplecșii obținuți cu vectorii DA2.1 și DA2.2 care au prezentat eficiențe de transfecție comparabile cu cele ale martorilor utilizați.

Având în vedere cele menționate anterior, acești vectori au fost aleși pentru a fi studiați prin imagistică celulară in vitro. În urma tratării celulelor HeLa cu vectorii DA2.1 și DA2.2 la concentrațiile de 1 mM, 2 mM și 3 mM, a fost observată o internalizare imediată a vectorilor în celule (după doar 30 de minute), cele mai bune rezultate fiind obținute în cazul concentrației de 1 mM. Imaginile obținute în acest caz la utilizarea microscopiei optice prin fluorescență, prezintă internalizarea cu succes a vectorilor în structurile celulare, aceștia regăsindu-se atât în citoplasmă cât și în nucleul celulelor. De asemenea, citotoxicitatea acestora determinată prin MTS pe celule HeLa este nesemnificativă la concentrațiile studiate. Toate aceste rezultate recomandă vectorii DA2.1 și DA2.2 ca potențiali candidați pentru studii ulterioare de imagistică celulară, în special vectorul DA2.1 care a manifestat o citotoxicitate mai redusă decât omologul său DA2.2. **Astfel, conceptul de platformă dinamică funcțională poate căpăta noțiunea de TERANOSTIC fiind un vector pentru transportul acizilor nucleici, totodată fiind fluorescent și potrivit studiilor de imagistică fluorescentă.**

4. *Studiu in silico și in vitro ale unor ansambluri host-guest (oaspete-gază) supramoleculare sensibile la pH, pentru marcarea organitelor celulare acide*

Au fost studiate *in silico* și *in vitro* trei sisteme cu caracter **supramolecular** dinamic de tip **host-guest (oaspete-gază)** a sărurilor fluorescente de indolizinium și β -ciclodextrina (β -CD). Pentru a demonstra posibilitatea formării ambelor specii supramoleculare de incluziune cu ciclodextrina (raport 1:1 și 1:2) observate în experimentele ESI-MS, s-au efectuat studii de modelare moleculară. Calculele au fost efectuate prin metoda AutoDock Vina, implementată în pachetul software YASARA Structure [6]. Astfel, β -CD și complexii de incluziune investigați au fost construiți și optimizați pentru prima dată la nivel teoretic PM3, folosind software-ul Hyperchem [89] și ulterior exportați în programul YASARA. După optimizare, simulările de modelare moleculară au indicat (**figura 18**) posibilitatea formării ambilor complecși în raport molar 1:1 și 1:2 corespunzători compușilor cu β -CD. În cazul complexelor în raport molar 1:1, toți compușii cercetați au fost incluși în cavitatea ciclodextrinei, adoptând o conformație semipliată, molecula de ciclodextrină acoperind cea mai mare regiune a părții interioare de 4,4'-bipiridil a compușilor.

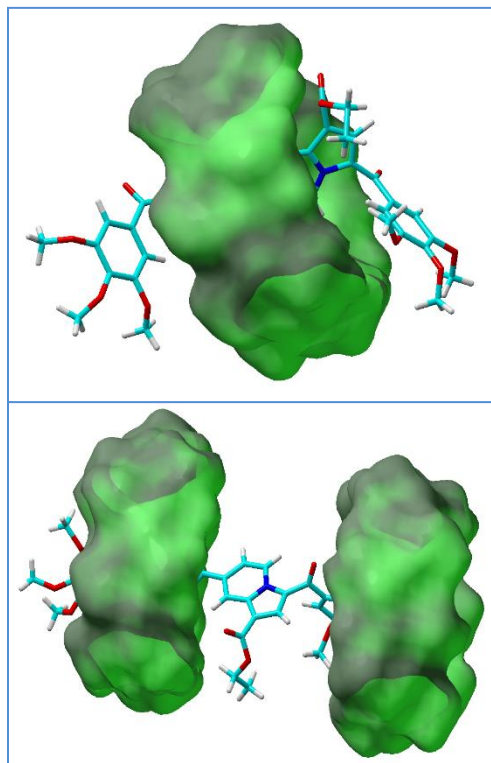


Figura 18. Exemplu de modele moleculare de simulare a unui reprezentant supramolecular dynamic în raport de 1:1 (sus) și 1:2 (jos).

Evaluarea citotoxicității compușilor de incluziune în comparație cu cea a compușilor inițiali, s-a realizat folosind metoda MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazoliu. Testul a fost realizat utilizând linia de celule canceroase HeLa, aparținând cancerului cervical (**figura 19, stanga**). S-a observat faptul că viabilitatea celulară a fost semnificativ îmbunătățită prin formarea complexelor de incluziune. Compușii inițiali au prezentat o toxicitate puternică la toate concentrațiile investigate, valorile viabilității celulare nu au depășit 10%.

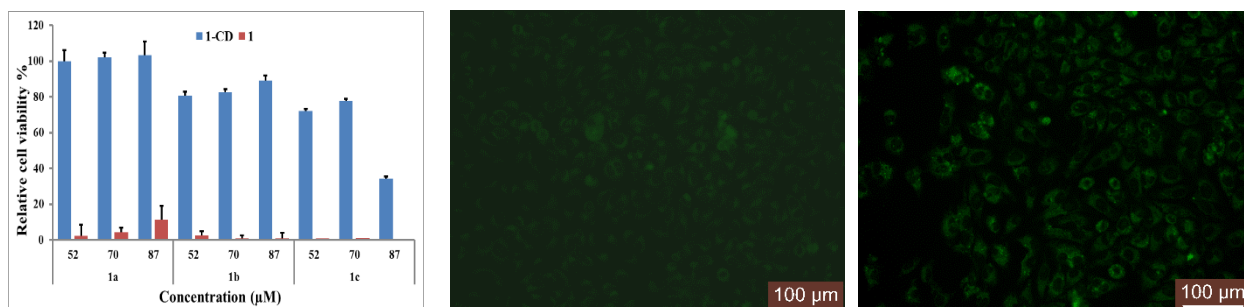


Figura 19. Rezultatele testului MTS de viabilitate celulară (stanga) *in vitro* pentru compușii de plecare (roșu), respectiv compușii de incluziune (albastru) la concentrații diferite; exemplu de imagine pentru complexul de incluziune acumulat în liniile de celule HeLa după 15 minute (mijloc), respectiv 24h de incubare (dreapta).

Compușii de incluziune investigați au fost evaluați pentru capacitatea lor de a penetra membrana celulară, și de a pătrunde în interiorul celulei, dar și cea de marcarea componentelor celulare în celulele vii în microscopia de fluorescență. Astfel, celulele HeLa au fost incubate cu o soluție apoasă de complecși de incluziune, apoi s-au comparat imaginile (după 15 minute, respectiv 24h) înregistrate cu un microscop Leica DMI 300 B inversat cu filtru GFP fluorescent (**figura 19**). După 15 minute de incubare a celulelor HeLa cu soluțiile investigate, a fost observată o localizare intracelulară, extranucleară, clar vizibilă pentru toate eșantioanele (**figura 19, stanga**). Incubarea celulelor tratate până la 24h, a evidențiat o creștere puternică a semnalului fluorescent, însoțită de aglomerații localizate particular în citoplasmă (**figura 19, dreapta**). Aceste localizări specifice a complecșilor de incluziune au fost examinate în continuare folosind markeri specifici ai organelor celulare (**figura 20**).

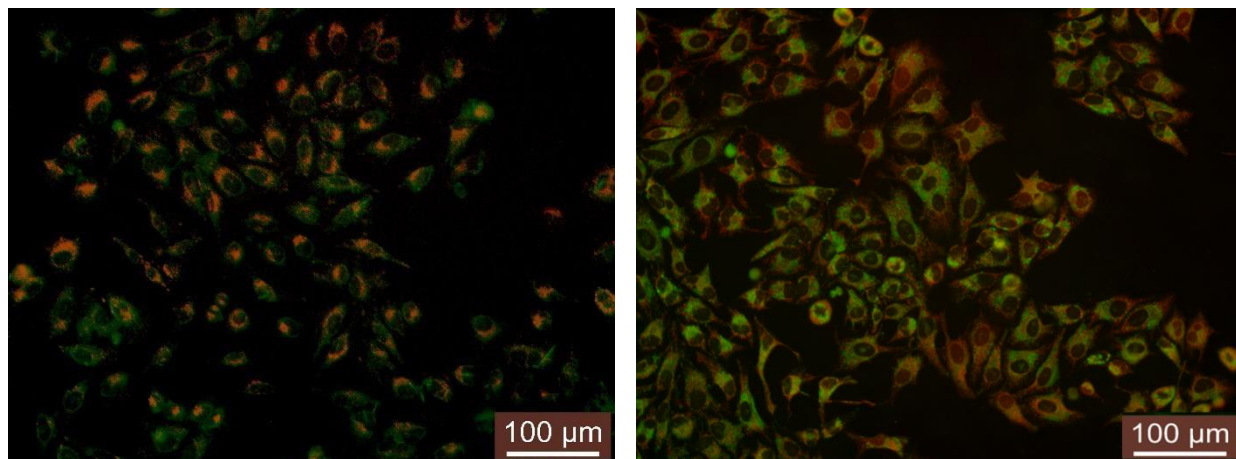


Figura 20. Exemple de imagini pentru distribuția în celule a complecșilor de incluziune, suprapuse cu imagini de co-localizare cu LysoTracker red (stanga) și MitoTracker red (dreapta).

Astfel, pentru a verifica specificitatea complexelor de incluziune de a marca selectiv organellele celulare, s-au efectuat experimente de co-colorare (co-developare) paralele în celulele HeLa cu LysoTracker (**figura 20, stanga**) și MitoTracker (**figura 20, dreapta**). Suprapunerea imaginilor rezultate a sugerat localizarea perfectă a complexelor de incluziune în lizozomi. Experimentul de co-developare efectuat în mod similar cu MitoTrackerRed pe celulele HeLa incubate 24h cu soluțiile compușilor de incluziune, a condus la rezultate diferite, complexii prezentând o distribuție și o localizare parțial în afara mitocondriilor.

5. *Librăria Vector*

Studiul combinat in silico și experimental al formării poliplexului dintre dsADN și vectorii non-virali tip squalenă-PEG-PEI

Mai multe studii experimentale au arătat că lungimea lanțului macromolecular de PEG din structura unui vector non-viral influențează eficiența împachetării ADN-ului sau ARN-ului [90-92]. Cu toate acestea, nu sunt cunoscute studii sistematice privind influența masei moleculare de PEG din structura vectorului non-viral asupra eficienței de impachetare a materialului genetic pe de o parte și pe de altă parte asupra eficienței poliplexului format în transfecție. Aceste studii lipsesc deoarece obținerea unor date structurale prin metode experimentale este foarte dificil. Astfel, utilizarea metodelor de chimie computațională pentru a simula *in silico* sistemele auto-asamblate de tip poliplex este o strategie ideală pentru a obține informațiile moleculare necesare înțelegerii mecanismelor de auto-asamblare.

Studiul de față descrie o procedură paralelă (i) de modelare și simulare și (ii) de sinteză experimentală și investigație instrumentală, în măsură să dovedească efectul caracteristicilor moleculare și a cantității locale a agentului „stealth” (în cazul de față PEG) utilizat pentru protejarea segmentului policationic al vectorilor față de eficiența lor de legare și transport ale ADN-ului. Principalul scop a fost acela de a identifica *in silico* mecanismul prin care lungimea lanțului PEG interacționează cu catenele PEI ramificat, împiedicând formarea poliplexului, în contextul celei mai bune simulări posibile a condițiilor experimentale.

A fost sintetizată o bibliotecă de 3 compuși (vector 500, vector 1500 și vector 3000). În prima etapă (**figura 21**), gruparea aldehydică din derivatul α -carbonil-squalena a fost reacționată cu o grupare aminică a α,ω -bis(2-aminoetil)polietilen glicolului (PEG) de diferite mase moleculare (500, 1500, 3000 Da), rezultând intermediarii de reacție squalenă-PEG cu diferite mase moleculare ale PEG și funcționalizați cu grupări aminice primare terminale (Sq-PEG-NH₂). În etapa

următoare de reacție, cuplarea derivatului Sq-PEG-NH₂ cu bPEI-0.8kDa s-a realizat prin intermediul agentului de cuplare 2,6-diformil-4-metilfenol (FDA2). FDA2 este un compus reactiv difuncționalizat cu grupări aldehydice, acestea reactionează rapid și în condiții blânde de reacție cu grupările aminice primare, rezultând legăturile iminice (-CH=N-) dinamice (**figura 21**) [93].

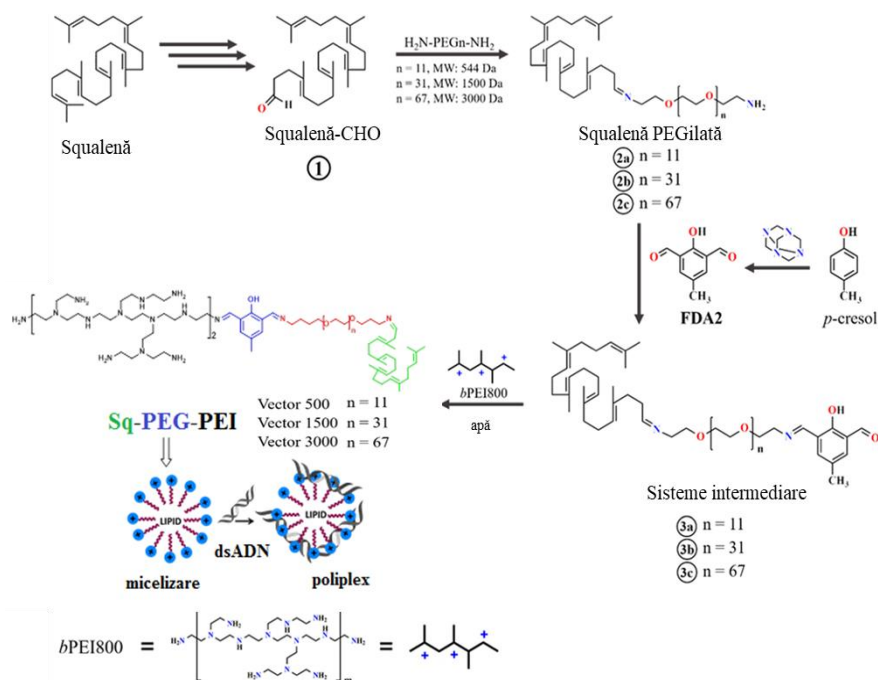


Figura 21. Procedul de obținere a conjugatului Sq-PEG-PEI. Squalena este afișată în verde, în timp ce PEG cu n = 11, 31 și 61 de unități repetate, sunt afișate în roșu. Dialdehida a fost descrisă în albastru, în timp ce bPEI-0.8kDa ramificată în negru.

3.5.1 Simulare in silico pentru obținerea structurilor micelizate a vectorilor Sq-PEG-PEI și a interacției acestora cu dsADN

Au fost simulate structurile vectorilor non-virali (Sq-PEG-PEI) prezentate în **figura 21** și au primit coduri în funcție de masa moleculară a PEG-ului, după cum urmează: VECTOR 500 (Sq-PEG-PEI în care masa moleculară a PEG-ului este de 500 Da), VECTOR 1500 (Sq-PEG-PEI în care masa moleculară a PEG-ului este de 1500 Da) și VECTOR 3000 (Sq-PEG-PEI în care masa moleculară a PEG-ului este de 3000 Da), iar numărul corespunzător de unități PEG repetate (n) este de 11, 31, respectiv 62. Structurile de pornire și configurațiile vectorilor au fost construite folosind software-ul Avogadro [87]. Pe baza valorilor pKa [94], la pH = 7.4 gradul de protonare al PEI este de 50% (10 grupari aminice din totalul de 20 sunt protonate), oferind o încărcare netă de +10. Fragmentul de dsADN simulat cuprinde 25 de perechi de baze, cu secvența 5-CAAGCCCTTAACGAACTTCAACGTA-3 și a fost creat folosind software-ul Ambertools18

[95]. Sarcina totală a moleculei de dsADN este de -48 (numărul de grupări fosfat). Parametrizarea vectorului a fost realizată prin aplicarea metodologiei câmpului de forță GAFF2 [96]. Sarcinile atomice parțiale ale vectorului au fost calculate utilizând metodologia RESP [96] ce a fost adaptată și perfecționată în lucrarea L. Epure *și colab.* [97]. Câmpul de forță Amber FF14SB DNA.bsc1 [98] a fost utilizat în parametrizarea dsADN-ului, iar pentru descrierea ionului s-au utilizat parametrii ionsjc_tip3p [99].

Pentru a simula mai bine condițiile „reale” ale complexării vectorilor cu dsADN, a fost implementat un protocol de simulare în două etape: „agregarea” urmată de „complexare”. Agregarea se referă la procesul de micelizare a vectorilor, iar complexarea la formarea polipeșilor dintre vectori și ADN.

A fost urmărit procesul de agregare (micelizare) al vectorilor în soluție apoasă (**figura 22**).

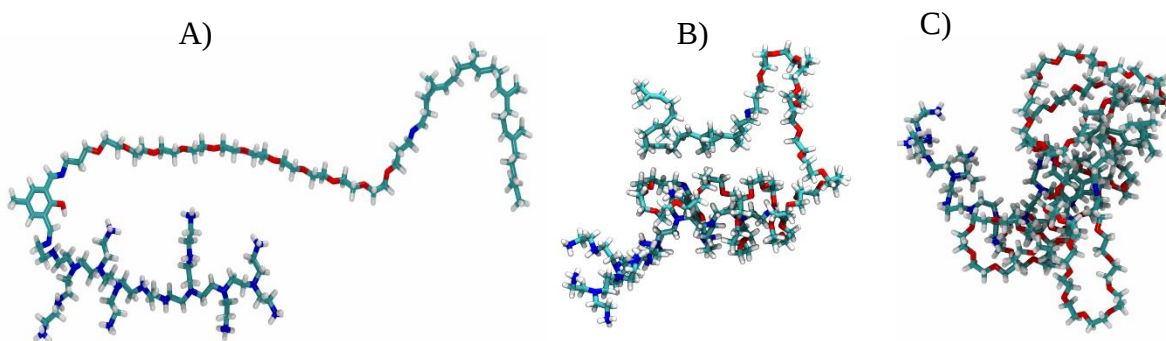


Figura 22. Conformațiile de pornire ale celor trei vectori folosiți pentru simulările de agregare. A) conformația extinsă a VECTOR 500. B) și C) conformațiile pre-colasate ale VECTOR 1500, respectiv VECTOR 3000. Codificarea coloristică a atomilor de polimer este următoarea: azuriu pentru C; roșu pentru O; albastru pentru N; alb pentru H.

Rezultatele de simulare arată, că lanțurile PEG interacționează cu atomii N protonați ai catenelor de PEI, formând legături de hidrogen. Aceste interacțiuni sunt atât de puternice încât, odată formate, structura colapsată rămâne stabilă pe întreaga simulare, iar numărul legăturilor de hidrogen este invers proporțional cu numărul de atomi liberi de N.

Rezultatele metodelor computaționale sunt în concordanță cu datele experimentale astfel, valorile măsurate ale potențialului Zeta al vectorilor în soluție (**tabelul 6**) indică faptul că încărcarea electrostatică a suprafeței scade odată cu creșterea lungimii lanțului de PEG. Acest fenomen este în bună corelație cu observațiile obținute pe baza simulărilor MD și care arată că în cazul sistemelor VECTOR 1500 și VECTOR 3000 lanțul de PEG acoperă lanțurile PEI, protejând atomii de azot

din structura PEI, în timp ce sistemul VECTOR 500 are cea mai mare parte a catenelor de PEI neprotejate de PEG și care sunt orientate spre suprafața agregatului.

Tabel 6. Valori experimentale ale potențialului Zeta pentru fiecare vector testat.

Vector	Potențialul Zeta măsurat (mV)	Valoarea medie (mV)	Deviația standard
Vector 500	14.49	14.07	±0,3007
	13.82		
	13.89		
Vector 1500	6.1	6.67	±0,5436
	6.5		
	7.4		
Vector 3000	4.32	5.17	±0,611
	5.73		
	5.46		

3.5.2 Simularea formării poliplexului.

Pentru a imita experimentul, simularea MD a implicat generarea soluțiilor echilibrate de vectori până la micelizare. Acest lucru este de o importanță crucială pentru următoarea etapă, când are loc interacțiunea vectorilor Sq-PEG-PEI (cu diferite mase moleculare ale PEG) cu dsADN, pentru a forma structuri supramoleculare de tip poliplex. Simulările MD s-au realizat pe scale de timp de lungimi suficiente pentru a permite identificarea mecanismelor cheie prin care lanțurile de PEG interacționează cu cele de PEI ramificat și, de asemenea, să explicăm de ce lungimea lanțului de PEG afectează procesul de auto-asamblare între vectorul non-viral și dsADN. Trebuie subliniat faptul că, dimensiunile mari ale sistemelor și simulările desfășurate pe intervale de timp lungi au prezentat o importanță fundamentală în explicarea mecanismului de formare al poliplexului. **figurile 23, 24 și 25** prezintă instantanee reprezentative ale configurațiilor inițiale și finale ale fiecărui sistem vector și ADN, împreună cu inserții care detaliază interacțiunile dintre PEI și ADN. În modelul experimental precum și cel in silico s-a folosit dsADN scurt, cu 25 de perechi de baze cu secvența sens 5'-CAAGCCCTTAACGAACCTCAACGTA-3' și secvența anti-sens 5'-TACGTTGAAGTTCGTTAAGGGCTTG-3' complementară.

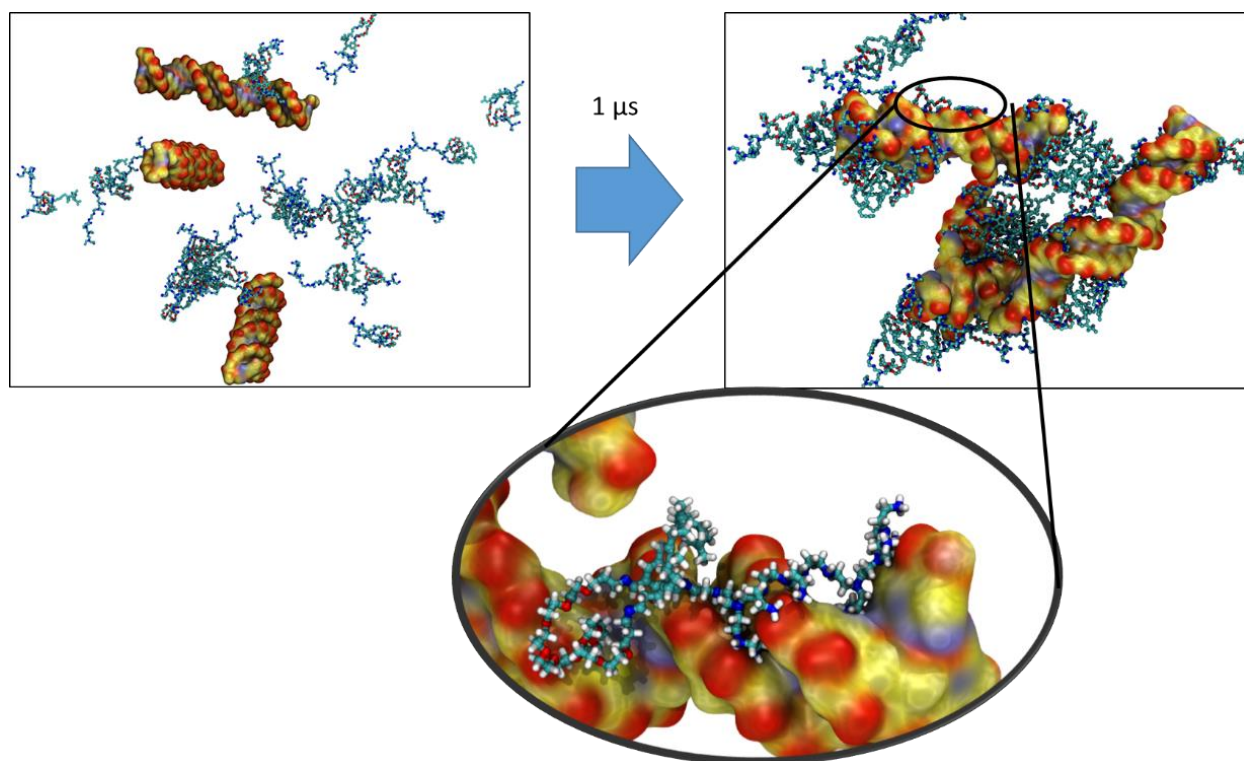


Figura 23. Interacțiunea VECTOR 500 cu ADN-ul 25 ba. Atomii de carbon sunt colorați în azuriu în cazul vectorului, iar în galben pentru molecula de ADN. Pentru toate moleculele, atomii de azot sunt în albastru, atomii de oxigen sunt în roșu, iar atomii de hidrogen în alb.

Pe baza analizei vizuale a traiectoriei VECTOR 500 (**figura 23**), este evident că PEI ramificat interacționează puternic cu dsADN-ul. Micelele se „lipesc” de ADN, când catenele de PEI interacționează atât cu canelurile majore, cât și cu cele minore ale ADN-ului.

În cazul VECTOR 1500, observăm aproape aceleași interacțiuni ca și în cazul VECTOR 500 (**figura 24**).

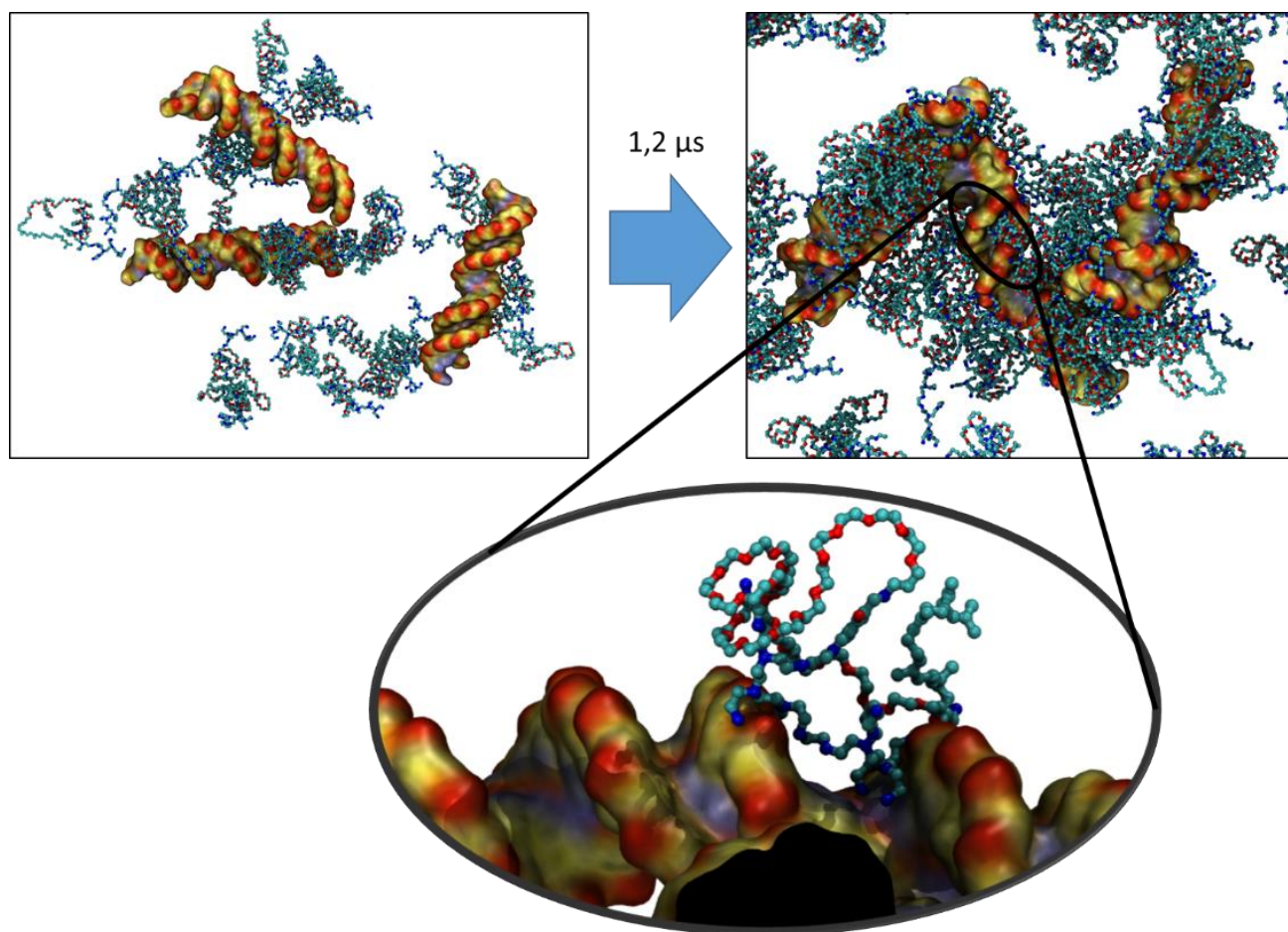


Figura 24. Interacțiunea VECTOR 15000 cu ADN-ul. Atomii de carbon sunt colorați în azuriu în cazul vectorului și în galben pentru molecula de ADN. Pentru toate moleculele, atomii de azot sunt albaștri, atomii de oxigen sunt roșii, iar atomii de hidrogen albi.

În schimb, analiza vizuală pentru sistemul VECTOR 3000 (**figura 25**) arată că numărul interacțiunilor dintre catenele PEI și dsADN este mai mic în comparație cu ceilalți vectori, fapt argumentat de faptul că lungimea lanțului de PEG fiind mare a condus la diminuarea drastică a cantității de PEI liber și care să fie capabil să interacționeze cu lanțurile de dsADN.

De remarcat faptul că micellele preformate ale tuturor celor trei vectori sunt capabile să interacționeze cu cele 3 molecule de dsADN adăugate inițial în celula de simulare, iar procesul de complexare este mediat de numărul atomilor de azot liberi necomplexați de lanțurile PEG.

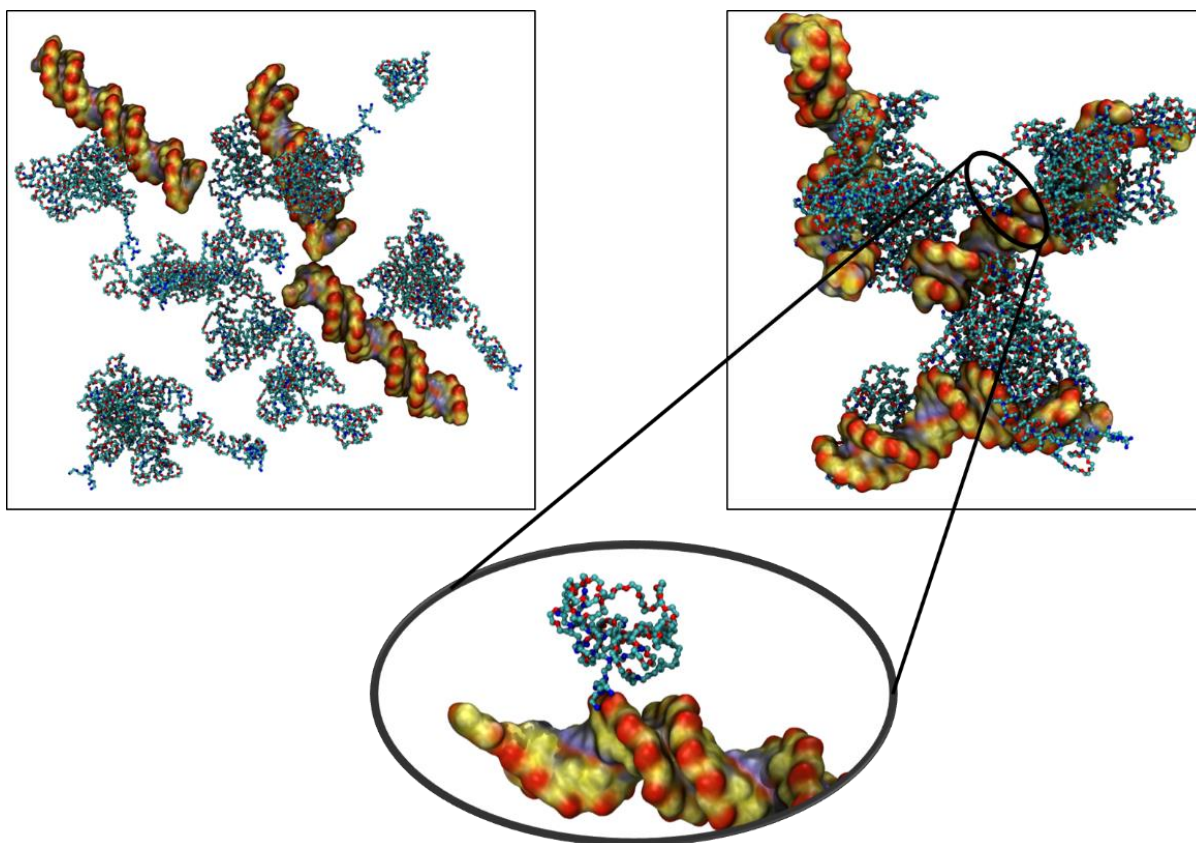


Figura 25. VECTOR 3000 care interacționează cu ADN-ul. Atomii de carbon sunt colorați în azuriu în cazul vectorului, iar în galben pentru molecula de ADN. Pentru toate moleculele, atomii de azot sunt albaștri, atomii de oxigen sunt roșii, iar atomii de hidrogen albi.

Experimental, interacțiunea vectorilor sintetizați cu dsADN-ul a fost investigată prin electroforeză pe gel de agaroză. Prin această metodă s-au pus în evidență proprietățile de auto-asamblare dintre vectorii Sq-PEG-PEI și dsADN în funcție de lungimea lanțului de PEG, fapt observat simultan în simulările efectuate

Tendința electroforetică observată în **figura 26** indică faptul că odată cu creșterea masei moleculare a lanțului de PEG din structura vectorului, conduce la creșterea raportului N/P necesar pentru a lega complet aceeași cantitate de dsADN. Această observație este în concordanță cu măsurătorile de potențial Zeta, precum și cu simulările MD, și, totodată, confirmând faptul că odată cu creșterea numărului de sarcini pozitive neprotejate de pe suprafața agregatului de vector conduce la formarea poliplecșilor în prezența dsADN la rapoarte N/P mai mici (1,5 pentru PEG 500; 2,5 pentru PEG 1500; 3,0 pentru PEG 3000).

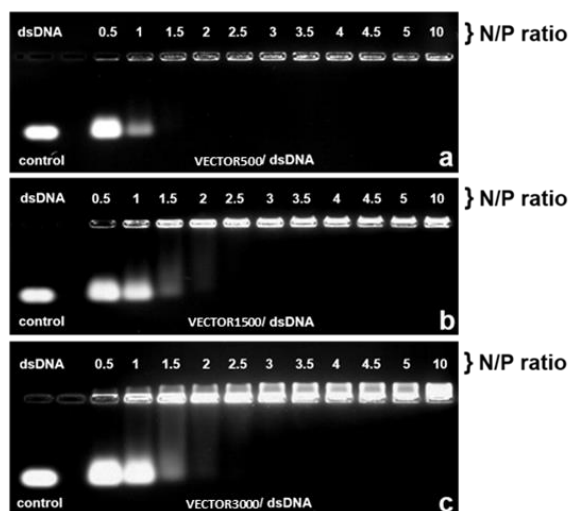


Figura 26. Mobilitatea electroforetică a polipecșilor formată prin complexarea dsADN cu VECTOR 500, 1500 și 3000, la diferite rapoarte N/P.

Rezultatele simulărilor pe care le-am efectuat sunt confirmate și validate prin acordul excelent cu rezultatele experimentelor de laborator. Detaliile și interacțiunile atomiste pe care le-am observat în MD explică foarte bine diferențele în comportamentul vectorilor. Într-adevăr, încărcarea mai mare a suprafeței VECTOR 500 în comparație cu VECTORII 1500 și 3000, așa cum au fost relevate de datele potențialului Zeta din **tabelul 6**, poate fi explicată prin localizarea lanțului de PEG în agregate, observate în simulările MD. În cazul VECTOR 500, PEG formează un strat intermediar între miezul de squalenă și PEI, plasat la exteriorul ansamblului. Pentru ceilalți doi vectori, lanțul PEG de dimensiuni mai mari este capabil să se înfășoare în jurul unei porțiuni mai mari de PEI, generând astfel un strat exterior mixt, care include atât PEG, cât și PEI, scăzând practic sarcina de pe suprafața agregatului. Un astfel de efect este predominant în cazul VECTOR 3000.

Simularea polipecșilor studiați ne permite să explicăm rezultatele analizelor de electroforeză pe gel de aragoză, care indică faptul că lungimea fragmentului PEG joacă un rol crucial în capacitatea sistemelor de a lega dsADN. De fapt, experimentele arată că atunci când este implicat un segment PEG mai scurt, legarea dsADN-ului are loc la rapoarte N/P foarte mici. Conform simulărilor noastre, VECTOR 500 este capabil să interacționeze mai puternic cu ADN-ul în comparație cu vectorii mai mari, în principal datorită prezenței PEI în stratul exterior în cantitate mai mare. Acest lucru îi permite să formeze mai multe legături de hidrogen cu dsADN-ul și, prin urmare, să-l lege la un raport N/P foarte scăzut. Pentru vectorii mai mari, legarea completă are loc la un raport N/P mai mare, fapt care este bine explicat prin simulări și care

indică modul în care PEG protejează sarcinile de pe lanțul PEI, acționând, de asemenea, ca o barieră de distanțare fizică între PEI și ADN.

Înțelegerea fenomenului de ecranare este importantă pentru proiectarea rațională a sistemelor de vectori pentru impachetarea și transportul acizilor nucleici, care necesită un echilibru adecvat între raportul rezonabil N/P și solubilitatea în apă. Într-adevăr, un lanț PEG mai lung îmbunătățește solubilitatea în apă, dar duce și la o creștere a raportului N/P, ceea ce, la rândul său, duce la creșterea toxicității vectorului.

Studiul nostru evidențiază faptul că, în cazul vectorilor complecși, care includ blocuri componente multiple și chimic distincte, procesul de formare al polipeptidelor nu poate fi studiat prin modelarea separată a interacțiunilor dintre componente din cauza interacțiunilor inerente între toate blocurile componente, determinând în final mecanismul particular de legare.

Realizări semnificative pe etapele proiectului

Realizări ale I etape ale proiectului

- A fost propusă o serie de compuși cu grupări funcționale de interes, precursori cu rol de nucleu multifuncțional ce servesc la sinteza librărilor de PDC.
- Au fost stabilite procedee de sinteză a precursorilor.
- A fost stabilit un plan de activitate pentru membrii echipei.
- A fost stabilit și optimizat protocolul pentru obținerea derivatului de scuolenă PEG-ilat (Sq-PEG) care constituie o entitate de bază în sinteza librărilor de PDC.
- A fost sintetizată o librărie de PDC pe baza formării legăturilor cu caracter dinamic stabilite între constituenți pe baza nucleului de glutaraldehidă, a derivatului PEG-ilat de scuolenă și a polietileniminei (PEI).
- S-a studiat morfologia Sq-PEG și PDC-urilor pe baza Sq-PEG din librăria BF prin TEM.

Realizări ale etapei II ale proiectului

- În cadrul etapei II de implementare a proiectului au fost abordate trei direcții esențiale în dezvoltarea domeniului științific propus, îndeplinind activitățile urmărite.
 - *Obținerea precursorilor cu grupări funcționale (nuclei multifuncționali, entități moleculare, conectori*

- *Obținerea librăriilor de platforme dinamice constituționale. Caracterizarea fizico-chimică și morfologică (după caz) a platformelor dinamice constituționale și testarea lor in vitro*
- *Dezvoltarea unor strategii de livrare a medicamentului la țintă*
- Au fost publicate 4 articole științifice (ISI), din care 2 în zona roșie și 3 în zona galbenă
- Rezultatele au fost diseminate cu 5 participări la conferințe naționale și internaționale cu prezentări orale și postere
- Au fost efectuate 2 stagii de cercetare (prevăzute în propunerea de proiect) la Universitatea din Florența în grupul Prof. Supuran pentru stabilirea unei direcții complementare și de interes în dezvoltarea inhibitorilor pentru anhidraza carbonică
- Au fost desfășurate întâlniri de grup și prezentări de date în cadrul grupului format
- Saitul proiectului (<http://www.intelcentru.ro/DynaCoPlat/about-us>) a fost actualizat cu progresul echipei pe plan științific.

Realizări ale etapei III ale proiectului

- Optimizarea compoziției platformelor dinamice constituționale
- A fost extins conceptul de platformă dinamică funcțională prin introducerea unei componente fluorescente în compoziție, concepând funcționalitatea de **teranostic**
- Au fost abordate domenii complementare studiilor inițiate în etapele precedente ale proiectului
- S-au efectuat studii in vitro de țintire specifică celulară a vectorului NV10
- S-a efectuat studiul combinat in silico și experimental al formării poliplexului dintre dsADN și vectorii non-virali tip squalenă-PEG-PEI pentru a pune în evidență mecanisme de interacțiune a componentelor în sistemele dinamice constituționale
- Au fost publicate 3 articole științifice (ISI), din care 1 în zona roșie și 2 în zona galbenă și 1 trimis spre publicație
- Rezultatele au fost diseminate cu 3 participări la conferințe internaționale cu postere în regim online
- Au fost desfășurate întâlniri de grup și prezentări de date în cadrul grupului format
- Saitul proiectului (<http://www.intelcentru.ro/DynaCoPlat/about-us>) a fost actualizat odată cu progresul echipei pe plan științific.

CONCLUZII GENERALE

Prin implementarea proiectului DynaCoPlat s-au atins toate obiectivele urmărite. Au fost realizate toate activitățile propuse, mai mult, au fost extinse unele domenii și propuse metode alternative de soluționare a provocărilor apărute. Au fost proiectați, sintetizați, caracterizați structural și morfologic, testați *in vitro* și *in silico* o serie de precursori pentru platformele dinamice constituționale. Au fost proiectate, sintetizate, caracterizate structural și morfologic precum și testate *in vitro* și *in silico*, cinci libării de platforme dinamice constituționale, urmărind aspecte de interacțiuni sinergetice ale componentelor, pentru a înțelege mecanismele de funcționare ale acestor sisteme. Au fost abordate strategii moderne de actualitate de marcare a platformelor dinamice constituționale cu agenți specifici de țintire, demonstrând astfel conceptul propus. Au fost găsite strategii de a introduce marcheri fluorescenți în platformele dinamice constituționale, astfel propulsând materialele dezvoltate în cadrul proiectului în domeniul de teranostici. S-a creat pagina proiectului DynaCoPlat și a fost actualizată odată cu evoluția proiectului (<https://www.intelcentru.ro/DynaCoPlat/home>). În cadrul proiectului echipa de implementare și-a îndeplinit sarcinile și rezultatele obținute au fost diseminate prin 8 articole științifice ISI cu factor de impact, din zona roșie și galbenă, conform scorului de influență (<https://uefiscdi.gov.ro/scientometrie-reviste>). Membrii echipei au participat la 8 conferințe naționale și internaționale cu prezentări orale și postere. S-au efectuat două stagii de cercetare la Universitatea din Florența în grupul Prof. Supuran și în urma colaborării a fost publicat un articol (Clima L. Et al, *ChemMedChem*, 2020, DOI: 10.1002/cmdc.202000500). Au fost depuse 2 proiecte în cadrul competițiilor naționale pe domenii complementare.

Clima Lilia, Modular multifunctional carriers for drug and nucleic acids targeted delivery, competiția PCE 2020

Cojocaru Corneliu, Polymeric/Hybrid Materials and Advanced Methods for Investigation of Chemical Pollutants Removal from Contaminated Waters, competiția PCE 2020

Astfel, echipa de implementare a rămas ca și nucleu funcțional în cadrul Institutului de Chimie Macromoleculară P. Poni, Iași având competențe în domeniul materialelor avansate pentru aplicații biomedicale.

Publicații

1. Clima, L.; Craciun, B.F.; Angeli, A.; Petreni, A.; Bonardi, A.; Nocentini, A.; Carta, F.; Gratteri, P.; Pinteala, M. and Supuran, C.T.; Synthesis, Computational Studies and Assessment of in Vitro Activity of Squalene Derivatives as Carbonic Anhydrase Inhibitors; *ChemMedChem*, **2020**, DOI: 10.1002/cmdc.202000500
2. Cojocaru C. and Clima L.; Polymer assisted ultrafiltration of AO7 anionic dye from aqueous solutions: Experimental design, multivariate optimization, and molecular docking insights; *J. Membr. Sci.*, **2020**, 604, 118054. DOI: 10.1016/j.memsci.2020.118054
3. Sardaru, M.; Carp, O.E.; Ursu, E.L.; Craciun, A.M.; Cojocaru, C.; Sillion, M.; Kovalska, V.; Mangalagiu, I.I.; Danac, R. and Rotaru, A.; Cyclodextrin encapsulated pH sensitive dyes as fluorescent cellular probes: self-aggregation and in vitro assessments; *Molecules*, **2020**, *in press*
4. Vasiliu, T.; Craciun, B.F.; Neamtu, A.; Clima, L.; Isac, D.L.; Maier, S.S., Pinteala, M.; Mocci, F. And Laaksonen, A.; Combined in silico and experimental study of PEI-PEG-dsDNA polyplex formation. The importance of PEG size to vector-nucleic acid binding and biocompatibility, *submitted*.
5. Cojocaru C. and Clima L.; Binding assessment of methylene blue to human serum albumin and poly(acrylic acid): Experimental and computer-aided modeling studies; *J. Mol. Liq.*, **2019**, 285, 811-821. DOI: 10.1016/j.molliq.2019.04.144
6. Craciun, B.F.; Gavril, G.; Peptanariu, D.; Ursu, L.E.; Clima, L. and Pinteala, M.; Synergistic Effect of Low Molecular Weight Polyethylenimine and Polyethylene Glycol Components in Dynamic Nonviral Vector Structure, Toxicity, and Transfection Efficiency; *Molecules*, **2019**, 24(8), 1460. DOI: 10.3390/molecules24081460
7. Clima, L.; Craciun, B.F.; Gavril, G. and Pinteala, M.; Tunable Composition of Dynamic Non-Viral Vectors over the DNA Polyplex Formation and Nucleic Acid Transfection; *Polymers*, **2019**, 11, 1313. DOI: 10.3390/polym11081313
8. Sarbu, L. G; Shova, S.; Peptanariu, D.; Sandu I.A.; Birsa, L.M.; Bahrin, I. G. ;The Cytotoxic Properties of Some Tricyclic 1,3-Dithiolium Flavonoids; *Molecules*, **2019**, 24, 2459. DOI: 10.3390/molecules24132459

Participări la conferințe naționale si internaționale

1. Clima, L.; Craciun, B.F.; Peptanariu, D.; Marangoci, N. and Carp, O.E.; Polymeric supramolecular systems for DNA transfection Materials, Methods & Technologies 2020, August 29 – September 01, 2020, Flora Expo Center, Burgas, Bulgaria.
2. Carp, O.E.; Craciun, B.F.; Clima, L. and Cojocaru, C.; In silico assessment of the interaction between human serum albumin and a cationic dye ligand: Autodock study, molecular dynamics and experimental validation; Materials, Methods & Technologies 2020, August 29 – September 01, 2020, Flora Expo Center, Burgas, Bulgaria.
3. Carp, O.E.; Sardaru, M.; Danac, R.; Cojocaru, C. and Rotaru, A.; Cyclodextrin inclusion complex of Indoliziny-pyridinium salt as fluorescent probes for cell components staining; Materials, Methods & Technologies 2020, August 29 – September 01, 2020, Flora Expo Center, Burgas, Bulgaria.
4. Bahrin, L. G.; Peptanariu, D; Shova, S.; Sarbu, L.G; Birsa L. M.; The cytotoxic properties of a halogenated 1,3-dithiolium flavonoid; Conferința Facultății de Chimie, IasiChem 2019, October 31 - November 01 2019, Iasi, Romania.
5. Clima, L.; Craciun, B. F.; Pinteala, M.; Supramolecular dynamic non-viral vectors: synergistic effect of low molecular weight polyethylenimine and polyethylene glycol on transfection efficiency and cytotoxicity; International Conference On Nanomedicine And Nanobiotechnology - ICONAN, October 16-19 2019, Munchen, Germany.
6. Clima, L.; Polymeric supramolecular nucleic acids delivery systems: Dynamic combinatorial libraries; International Conference "Achievements and perspectives of modern chemistry", October 09-11 2019, Chisinau, Republic of Moldova.
7. Cojocaru, C. and Clima, L.; Human serum albumine and poly(acrylic acid): Computational studies and experimental validation; International Conference "Achievements and perspectives of modern chemistry", October 09-11 2019, Chisinau, Republic of Moldova.
8. Craciun, B.F.; Clima, L.; Gavril, G.; Peptanariu, D. and Pinteala, M.; Squalene based polymeric nanocarriers for genes delivery: in vitro studies; International Conference "Achievements and perspectives of modern chemistry", October 09-11 2019, Chisinau, Republic of Moldova.

Stagii

1. Clima Lilia 9.06-9.07.2019 stagiul de cercetare, in grupul Prof. Supuran, Universitatea din Florenta, Italia
2. Dragos Peptanariu 1-9.09.2019 stagiul de cercetare, in grupul Prof. Supuran, Universitatea din Florenta, Italia

Bibliografie

- [1] C.E. Dunbar, K.A. High, J.K. Joung, D.B. Kohn, K. Ozawa, M. Sadelain, Gene therapy comes of age, *Science* 359(6372) (2018).
- [2] S.L. Ginn, A.K. Amaya, I.E. Alexander, M. Edelstein, M.R. Abedi, Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update, *The Journal of Gene Medicine* 20(5) (2018) e3015.
- [3] J.M. Lehn, Perspectives in Chemistry-Aspects of Adaptive Chemistry and Materials, *Angew Chem Int Edit* 54(11) (2015) 3276-3289.
- [4] N. Roy, B. Bruchmann, J.M. Lehn, DYNAMERS: dynamic polymers as self-healing materials, *Chemical Society reviews* 44(11) (2015) 3786-3807.
- [5] A.I. Dascalu, R. Ardeleanu, A. Neamtu, S.S. Maier, C.M. Uritu, A. Nicolescu, M. Sillion, D. Peptanariu, M. Calin, M. Pinteala, Transfection-capable polycationic nanovectors which include PEGylated-cyclodextrin structural units: a new synthesis pathway, *J Mater Chem B* 5(34) (2017) 7164-7174.
- [6] L. Clima, D. Peptanariu, M. Pinteala, A. Salic, M. Barboiu, DyNAVectors: dynamic constitutional vectors for adaptive DNA transfection, *Chem Commun (Camb)* 51(99) (2015) 17529-31.
- [7] R. Catana, M. Barboiu, I. Moleavin, L. Clima, A. Rotaru, E.L. Ursu, M. Pinteala, Dynamic constitutional frameworks for DNA biomimetic recognition, *Chemical communications (Cambridge, England)* 51(11) (2015) 2021-4.
- [8] D. Ailincăi, L. Tartau Mititelu, L. Marin, Drug delivery systems based on biocompatible imino-chitosan hydrogels for local anticancer therapy, *Drug Deliv* 25(1) (2018) 1080-1090.
- [9] P.J. O'Brien, A.G. Siraki, N. Shangari, Aldehyde Sources, Metabolism, Molecular Toxicity Mechanisms, and Possible Effects on Human Health, *Critical Reviews in Toxicology* 35(7) (2005) 609-662.
- [10] R.M. LoPachin, T. Gavin, Molecular mechanisms of aldehyde toxicity: a chemical perspective, *Chemical research in toxicology* 27(7) (2014) 1081-1091.
- [11] M. Ceruti, G. Balliano, F. Viola, L. Cattel, N. Gerst, F. Schuber, Synthesis and biological activity of azasqualenes, bis-azasqualenes and derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry* 22(3) (1987) 199-208.
- [12] A. Maksimenko, F. Dosio, J. Mougin, A. Ferrero, S. Wack, L.H. Reddy, A.-A. Weyn, E. Lepeltier, C. Bourgaux, B. Stella, L. Cattel, P. Couvreur, A unique squalenoylated and nonpegylated doxorubicin nanomedicine with systemic long-circulating properties and anticancer activity, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(2) (2014) E217-E226.

- [13] P. Couvreur, L.H. Reddy, S. Mangenot, J.H. Poupaert, D. Desmaële, S. Lepêtre-Mouelhi, B. Pili, C. Bourgaux, H. Amenitsch, M. Ollivon, Discovery of New Hexagonal Supramolecular Nanostructures Formed by Squalenoylation of an Anticancer Nucleoside Analogue, *Small* 4(2) (2008) 247-253.
- [14] P. Couvreur, B. Stella, L.H. Reddy, H. Hillaireau, C. Dubernet, D. Desmaële, S. Lepêtre-Mouelhi, F. Rocco, N. Dereuddre-Bosquet, P. Clayette, V. Rosilio, V. Marsaud, J.-M. Renoir, L. Cattel, Squalenoyl Nanomedicines as Potential Therapeutics, *Nano Letters* 6(11) (2006) 2544-2548.
- [15] A.A. D'souza, R. Shegokar, Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications, *Expert Opinion on Drug Delivery* 13(9) (2016) 1257-1275.
- [16] J.V. Jokerst, T. Lobovkina, R.N. Zare, S.S. Gambhir, Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy, *Nanomedicine* 6(4) (2011) 715-728.
- [17] C.T. Supuran, C. Capasso, An Overview of the Bacterial Carbonic Anhydrases, *Metabolites* 7(4) (2017) 56.
- [18] C.T. Supuran, Advances in structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors, *Expert Opinion on Drug Discovery* 12(1) (2017) 61-88.
- [19] C. Capasso, C.T. Supuran, An Overview of the Selectivity and Efficiency of the Bacterial Carbonic Anhydrase Inhibitors, *Current Medicinal Chemistry* 22(18) (2015) 2130-2139.
- [20] C. Capasso, C.T. Supuran, An overview of the α -, β - and γ -carbonic anhydrases from Bacteria: can bacterial carbonic anhydrases shed new light on evolution of bacteria?, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 30(2) (2015) 325-332.
- [21] A. Angeli, M. Pinteala, S.S. Maier, S. Del Prete, C. Capasso, B.C. Simionescu, C.T. Supuran, Inhibition of bacterial α -, β - and γ -class carbonic anhydrases with selenazoles incorporating benzenesulfonamide moieties, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 34(1) (2019) 244-249.
- [22] A. Angeli, M. Pinteala, S.S. Maier, S. Del Prete, C. Capasso, B.C. Simionescu, C.T. Supuran, Inhibition of α -, β -, γ -, δ -, ζ - and η -class carbonic anhydrases from bacteria, fungi, algae, diatoms and protozoans with famotidine, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 34(1) (2019) 644-650.
- [23] E.L. Jensen, R. Clement, A. Kosta, S.C. Maberly, B. Gontero, A new widespread subclass of carbonic anhydrase in marine phytoplankton, *The ISME Journal* 13(8) (2019) 2094-2106.
- [24] C.T. Supuran, Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators, *Nature Reviews Drug Discovery* 7(2) (2008) 168-181.
- [25] Claudiu T. Supuran, Structure and function of carbonic anhydrases, *Biochemical Journal* 473(14) (2016) 2023-2032.
- [26] C.T. Supuran, C. Capasso, Biomedical applications of prokaryotic carbonic anhydrases, *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 28(10) (2018) 745-754.
- [27] M. Bozdag, A.S.A. Altamimi, D. Vullo, C.T. Supuran, F. Carta, State of the Art on Carbonic Anhydrase Modulators for Biomedical Purposes, *Current Medicinal Chemistry* 26(15) (2019) 2558-2573.
- [28] J.-Y. Winum, M. Rami, A. Scozzafava, J.-L. Montero, C. Supuran, Carbonic anhydrase IX: A new druggable target for the design of antitumor agents, *Medicinal Research Reviews* 28(3) (2008) 445-463.

- [29] F. Carta, C.T. Supuran, Diuretics with carbonic anhydrase inhibitory action: a patent and literature review (2005 – 2013), *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 23(6) (2013) 681-691.
- [30] C.T. Supuran, A.S.A. Altamimi, F. Carta, Carbonic anhydrase inhibition and the management of glaucoma: a literature and patent review 2013-2019, *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 29(10) (2019) 781-792.
- [31] A. Di Fiore, G. De Simone, V. Alterio, V. Riccio, J.-Y. Winum, F. Carta, C.T. Supuran, The anticonvulsant sulfamide JNJ-26990990 and its S,S-dioxide analog strongly inhibit carbonic anhydrases: solution and X-ray crystallographic studies, *Org Biomol Chem* 14(21) (2016) 4853-4858.
- [32] A. Scozzafava, C.T. Supuran, F. Carta, Antiobesity carbonic anhydrase inhibitors: a literature and patent review, *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 23(6) (2013) 725-735.
- [33] C.T. Supuran, Carbonic anhydrase inhibitors as emerging agents for the treatment and imaging of hypoxic tumors, *Expert Opinion on Investigational Drugs* 27(12) (2018) 963-970.
- [34] D. Tanini, L. Ricci, A. Capperucci, L. Di Cesare Mannelli, C. Ghelardini, T.S. Peat, F. Carta, A. Angeli, C.T. Supuran, Synthesis of novel tellurides bearing benzensulfonamide moiety as carbonic anhydrase inhibitors with antitumor activity, *European Journal of Medicinal Chemistry* 181 (2019) 111586.
- [35] A. Angeli, M. Ferraroni, A. Nocentini, S. Selleri, P. Gratteri, C.T. Supuran, F. Carta, Polypharmacology of epacadostat: a potent and selective inhibitor of the tumor associated carbonic anhydrases IX and XII, *Chem Commun* 55(40) (2019) 5720-5723.
- [36] R.G. Khalifah, The Carbon Dioxide Hydration Activity of Carbonic Anhydrase: I. STOP-FLOW KINETIC STUDIES ON THE NATIVE HUMAN ISOENZYMES B AND C, *Journal of Biological Chemistry* 246(8) (1971) 2561-2573.
- [37] L. Clima, B.F. Craciun, A. Angeli, A. Petreni, A. Bonardi, A. Nocentini, F. Carta, P. Gratteri, M. Pinteala, C.T. Supuran, Synthesis, computational studies and assessment of in vitro inhibitory activity of squalene derivatives as carbonic anhydrase inhibitors, *ChemMedChem Accepted Manuscript*(n/a) (2020).
- [38] Fungal Biofilm Resistance, *International Journal of Microbiology* 2012 (2012).
- [39] C.T. Supuran, F. Briganti, S. Tilli, W.R. Chegwidden, A. Scozzafava, Carbonic anhydrase inhibitors: Sulfonamides as antitumor agents?, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9(3) (2001) 703-714.
- [40] J. Leitans, A. Kazaks, A. Balode, J. Ivanova, R. Zalubovskis, C.T. Supuran, K. Tars, Efficient Expression and Crystallization System of Cancer-Associated Carbonic Anhydrase Isoform IX, *Journal of Medicinal Chemistry* 58(22) (2015) 9004-9009.
- [41] M. Thomas, A.M. Klibanov, Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery, *Applied Microbiology and Biotechnology* 62(1) (2003) 27-34.
- [42] H. Yin, R.L. Kanasty, A.A. Eltoukhy, A.J. Vegas, J.R. Dorkin, D.G. Anderson, Non-viral vectors for gene-based therapy, *Nat Rev Genet* 15(8) (2014) 541-555.
- [43] V. Kafil, Y. Omid, Cytotoxic impacts of linear and branched polyethylenimine nanostructures in a431 cells, *BioImpacts : BI* 1(1) (2011) 23-30.
- [44] S.K. Kim, F. Karadeniz, Biological importance and applications of squalene and squalane, *Advances in food and nutrition research* 65 (2012) 223-33.

- [45] S.M. Moghimi, P. Symonds, J.C. Murray, A.C. Hunter, G. Debska, A. Szewczyk, A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy, *Mol Ther* 11(6) (2005) 990-995.
- [46] Y. Wen, S. Pan, X. Luo, X. Zhang, W. Zhang, M. Feng, A Biodegradable Low Molecular Weight Polyethylenimine Derivative as Low Toxicity and Efficient Gene Vector, *Bioconjugate Chemistry* 20(2) (2009) 322-332.
- [47] T.V. Bogdan Florin CRĂCIUN, Narcisa MARANGOCI, Mariana PINTEALĂ and Lilia CLIMA, PEGylated squalene: a biocompatible polymer as precursor for drug delivery, *Rev. Roum. Chim.* 63((7-8)) (2018) 621-628.
- [48] A. Thomas, B.A. Teicher, R. Hassan, Antibody–drug conjugates for cancer therapy, *The Lancet Oncology* 17(6) (2016) e254-e262.
- [49] P.A. Trail, G.M. Dubowchik, T.B. Lowinger, Antibody drug conjugates for treatment of breast cancer: Novel targets and diverse approaches in ADC design, *Pharmacology & Therapeutics* 181 (2018) 126-142.
- [50] E.I. Vrettos, G. Mező, A.G. Tzakos, On the design principles of peptide–drug conjugates for targeted drug delivery to the malignant tumor site, *Beilstein journal of organic chemistry* 14(1) (2018) 930-954.
- [51] Y. Wang, A.G. Cheetham, G. Angacian, H. Su, L. Xie, H. Cui, Peptide–drug conjugates as effective prodrug strategies for targeted delivery, *Adv Drug Deliver Rev* 110-111 (2017) 112-126.
- [52] G.D. Lewis Phillips, G. Li, D.L. Dugger, L.M. Crocker, K.L. Parsons, E. Mai, W.A. Blättler, J.M. Lambert, R.V.J. Chari, R.J. Lutz, W.L.T. Wong, F.S. Jacobson, H. Koeppen, R.H. Schwall, S.R. Kenkare-Mitra, S.D. Spencer, M.X. Sliwkowski, Targeting HER2-Positive Breast Cancer with Trastuzumab-DM1, an Antibody–Cytotoxic Drug Conjugate, *Cancer Research* 68(22) (2008) 9280-9290.
- [53] A.F. Salem, S. Wang, S. Billet, J.-F. Chen, P. Udompholkul, L. Gambini, C. Baggio, H.-R. Tseng, E.M. Posadas, N.A. Bhowmick, M. Pellecchia, Reduction of Circulating Cancer Cells and Metastases in Breast-Cancer Models by a Potent EphA2-Agonistic Peptide–Drug Conjugate, *Journal of Medicinal Chemistry* 61(5) (2018) 2052-2061.
- [54] R. Soudy, C. Chen, K. Kaur, Novel Peptide–Doxorubicin Conjugates for Targeting Breast Cancer Cells Including the Multidrug Resistant Cells, *Journal of Medicinal Chemistry* 56(19) (2013) 7564-7573.
- [55] X. Sun, J.F. Ponte, N.C. Yoder, R. Laleau, J. Coccia, L. Lanieri, Q. Qiu, R. Wu, E. Hong, M. Bogalhas, L. Wang, L. Dong, Y. Setiady, E.K. Maloney, O. Ab, X. Zhang, J. Pinkas, T.A. Keating, R. Chari, H.K. Erickson, J.M. Lambert, Effects of Drug–Antibody Ratio on Pharmacokinetics, Biodistribution, Efficacy, and Tolerability of Antibody–Maytansinoid Conjugates, *Bioconjugate Chemistry* 28(5) (2017) 1371-1381.
- [56] W.J. Irvin, L.A. Carey, What is triple-negative breast cancer?, *European Journal of Cancer* 44(18) (2008) 2799-2805.
- [57] C. Parise, V. Caggiano, The influence of marital status and race/ethnicity on risk of mortality for triple negative breast cancer, *PLOS ONE* 13(4) (2018) e0196134.
- [58] W. Arap, R. Pasqualini, E. Ruoslahti, Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature in a Mouse Model, *Science* 279(5349) (1998) 377-380.
- [59] V. Askoxylakis, S. Zitzmann, W. Mier, K. Graham, S. Krämer, F. von Wegner, R.H.A. Fink, M. Schwab, M. Eisenhut, U. Haberkorn, Preclinical Evaluation of the Breast Cancer Cell-Binding Peptide, p160, *Clinical Cancer Research* 11(18) (2005) 6705-6712.

- [60] D. Hu, O. Mezghrani, L. Zhang, Y. Chen, X. Ke, T. Ci, GE11 peptide modified and reduction-responsive hyaluronic acid-based nanoparticles induced higher efficacy of doxorubicin for breast carcinoma therapy, *Int J Nanomedicine* 11 (2016) 5125-5147.
- [61] Y. Raghuwanshi, H. Etayash, R. Soudy, I. Paiva, A. Lavasanifar, K. Kaur, Proteolytically Stable Cyclic Decapeptide for Breast Cancer Cell Targeting, *Journal of Medicinal Chemistry* 60(12) (2017) 4893-4903.
- [62] H. Hossein-Nejad-Ariani, E. Althagafi, K. Kaur, Small Peptide Ligands for Targeting EGFR in Triple Negative Breast Cancer Cells, *Scientific Reports* 9(1) (2019) 2723.
- [63] R. Soudy, H. Etayash, K. Bahadorani, A. Lavasanifar, K. Kaur, Breast Cancer Targeting Peptide Binds Keratin 1: A New Molecular Marker for Targeted Drug Delivery to Breast Cancer, *Mol Pharm* 14(3) (2017) 593-604.
- [64] X. Li, Z. Xie, C. Xie, W. Lu, C. Gao, H. Ren, M. Ying, X. Wei, J. Gao, B. Su, Y. Ren, M. Liu, D-SP5 Peptide-Modified Highly Branched Polyethylenimine for Gene Therapy of Gastric Adenocarcinoma, *Bioconjugate Chemistry* 26(8) (2015) 1494-1503.
- [65] T. Xia, N. Li, X. Fang, Single-Molecule Fluorescence Imaging in Living Cells, *Annual Review of Physical Chemistry* 64(1) (2013) 459-480.
- [66] E.M.S. Stennett, M.A. Ciuba, M. Levitus, Photophysical processes in single molecule organic fluorescent probes, *Chemical Society Reviews* 43(4) (2014) 1057-1075.
- [67] J.W. Lichtman, J.-A. Conchello, Fluorescence microscopy, *Nature Methods* 2(12) (2005) 910-919.
- [68] D.J. Stephens, V.J. Allan, Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging, *Science* 300(5616) (2003) 82-86.
- [69] M. Ruponen, S. Rönkkö, P. Honkakoski, J. Pelkonen, M. Tammi, A. Urti, Extracellular Glycosaminoglycans Modify Cellular Trafficking of Lipoplexes and Polyplexes, *Journal of Biological Chemistry* 276(36) (2001) 33875-33880.
- [70] I. Kopatz, J.-S. Remy, J.-P. Behr, A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin, *The Journal of Gene Medicine* 6(7) (2004) 769-776.
- [71] L. Clima, D. Peptanariu, M. Pinteala, A. Salic, M. Barboiu, DyNAVectors: dynamic constitutional vectors for adaptive DNA transfection, *Chem Commun (Camb)* 51(99) (2015) 17529-17531.
- [72] B.F. Craciun, G. Gavril, D. Peptanariu, L.E. Ursu, L. Clima, M. Pinteala, Synergistic Effect of Low Molecular Weight Polyethylenimine and Polyethylene Glycol Components in Dynamic Nonviral Vector Structure, Toxicity, and Transfection Efficiency, *Molecules* 24(8) (2019) 1460.
- [73] L. Clima, B.F. Craciun, G. Gavril, M. Pinteala, Tunable Composition of Dynamic Non-Viral Vectors over the DNA Polyplex Formation and Nucleic Acid Transfection, *Polymers* 11(8) (2019) 1313.
- [74] G. Pricope, M. Pinteala, L. Clima, Dynamic self-organizing systems for DNA delivery, *Rev Roum Chim* 63(7-8) (2018) 7.
- [75] J.C. Duff, E.J. Bills, 282. Reactions between hexamethylenetetramine and phenolic compounds. Part II. Formation of phenolic aldehydes. Distinctive behaviour of p-nitrophenol, *Journal of the Chemical Society (Resumed)* (0) (1934) 1305-1308.

- [76] L.F. Lindoy, G.V. Meehan, N. Svenstrup, Mono-and diformylation of 4-substituted phenols: a new application of the duff reaction, *Synthesis* 1998(07) (1998) 1029-1032.
- [77] B.F. Craciun, T. Vasiliu, N. Marangoci, M. Pinteala, L. Clima, PEGYLATED SQUALENE: A BIOCOMPATIBLE POLYMER AS PRECURSOR FOR DRUG DELIVERY, *Revue Roumaine de Chimie* 63(7-8) (2018) 621-628.
- [78] M. Neu, D. Fischer, T. Kissel, Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives, *The Journal of Gene Medicine* 7(8) (2005) 992-1009.
- [79] S.-J. Sung, S.H. Min, K.Y. Cho, S. Lee, Y.-J. Min, Y.I. Yeom, J.-K. Park, Effect of Polyethylene Glycol on Gene Delivery of Polyethylenimine, *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 26(4) (2003) 492-500.
- [80] M. Glodde, S.R. Sirsi, G.J. Lutz, Physicochemical Properties of Low and High Molecular Weight Poly(ethylene glycol)-Grafted Poly(ethylene imine) Copolymers and Their Complexes with Oligonucleotides, *Biomacromolecules* 7(1) (2006) 347-356.
- [81] S. Mao, M. Neu, O. Germershaus, O. Merkel, J. Sitterberg, U. Bakowsky, T. Kissel, Influence of Polyethylene Glycol Chain Length on the Physicochemical and Biological Properties of Poly(ethylene imine)-graft-Poly(ethylene glycol) Block Copolymer/SiRNA Polyplexes, *Bioconjugate Chemistry* 17(5) (2006) 1209-1218.
- [82] S. Bhattacharjee, DLS and zeta potential – What they are and what they are not?, *J Control Release* 235 (2016) 337-351.
- [83] R. Roy, S. Mitra, R. Das, S. Mukherjee, Absorption and emission spectra of 4-methyl-2, 6-diformyl phenol in protic solvents: Interaction with amine bases, *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Chemical Sciences*, Springer, 1996, pp. 79-87.
- [84] M. Mukhopadhyay, D. Banerjee, S. Mukherjee, Proton-Transfer Reaction of 4-Methyl 2,6-Diformyl Phenol in Cyclodextrin Nanocage, *The Journal of Physical Chemistry A* 110(47) (2006) 12743-12751.
- [85] S. Banerjee, A.K. Both, M. Sarkar, Probing the Aggregation and Signaling Behavior of Some Twisted 9,9'-Bianthryl Derivatives: Observation of Aggregation-Induced Blue-Shifted Emission, *ACS Omega* 3(11) (2018) 15709-15724.
- [86] S. Satpathi, K. Gavvala, P. Hazra, Fluorescence switching of sanguinarine in micellar environments, *Physical Chemistry Chemical Physics* 17(32) (2015) 20725-20732.
- [87] J.A. Barltrop, T.C. Owen, A.H. Cory, J.G. Cory, 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans As cell-viability indicators, *Bioorg Med Chem Lett* 1(11) (1991) 611-614.
- [88] J.C. Stockert, A. Blázquez-Castro, M. Cañete, R.W. Horobin, Á. Villanueva, MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets, *Acta Histochem* 114(8) (2012) 785-796.
- [89] L. Clima, E.L. Ursu, C. Cojocar, A. Rotaru, M. Barboiu, M. Pinteala, Experimental design, modeling and optimization of polyplex formation between DNA oligonucleotides and branched polyethylenimine, *Organic & Biomolecular Chemistry* 13(36) (2015) 9445-9456.

- [90] A. Malek, F. Czubyko, A. Aigner, PEG grafting of polyethylenimine (PEI) exerts different effects on DNA transfection and siRNA-induced gene targeting efficacy, *Journal of Drug Targeting* 16(2) (2008) 124-139.
- [91] K. Kunath, A. von Harpe, H. Petersen, D. Fischer, K. Voigt, T. Kissel, U. Bickel, The structure of PEG-modified poly(ethylene imines) influences biodistribution and pharmacokinetics of their complexes with NF-kappaB decoy in mice, *Pharmaceutical research* 19(6) (2002) 810-7.
- [92] C. Yang, S. Gao, F. Dagnæs-Hansen, M. Jakobsen, J. Kjems, Impact of PEG Chain Length on the Physical Properties and Bioactivity of PEGylated Chitosan/siRNA Nanoparticles in Vitro and in Vivo, *ACS applied materials & interfaces* 9(14) (2017) 12203-12216.
- [93] L. Clima, B.F. Craciun, G. Gavril, M. Pinteala, Tunable Composition of Dynamic Non-Viral Vectors over the DNA Polyplex Formation and Nucleic Acid Transfection, *Polymers (Basel)* 11(8) (2019).
- [94] Y. Wang, M. Zheng, F. Meng, J. Zhang, R. Peng, Z. Zhong, Branched Polyethylenimine Derivatives with Reductively Cleavable Periphery for Safe and Efficient In Vitro Gene Transfer, *Biomacromolecules* 12(4) (2011) 1032-1040.
- [95] P. Davoodi, L.Y. Lee, Q. Xu, V. Sunil, Y. Sun, S. Soh, C.-H. Wang, Drug delivery systems for programmed and on-demand release, *Advanced Drug Delivery Reviews* 132 (2018) 104-138.
- [96] A. Cincinelli, T. Martellini, A. Innocenti, A. Scozzafava, C.T. Supuran, Purification and inhibition studies with anions and sulfonamides of an alpha-carbonic anhydrase from the Antarctic seal *Leptonychotes weddellii*, *Bioorgan Med Chem* 19(6) (2011) 1847-1851.
- [97] W.A. Banks, Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier, *BMC Neurology* 9(1) (2009) S3.
- [98] D. Ekinici, S.B. Ceyhun, M. Senturk, D. Erdem, O.I. Kufrevioglu, C.T. Supuran, Characterization and anions inhibition studies of an alpha-carbonic anhydrase from the teleost fish *Dicentrarchus labrax*, *Bioorgan Med Chem* 19(2) (2011) 744-748.
- [99] A.M. Funhoff, C.F. van Nostrum, G.A. Koning, N.M.E. Schuurmans-Nieuwenbroek, D.J.A. Crommelin, W.E. Hennink, Endosomal Escape of Polymeric Gene Delivery Complexes Is Not Always Enhanced by Polymers Buffering at Low pH, *Biomacromolecules* 5(1) (2004) 32-39.