

RAPORT STIINTIFIC SI TEHNIC (RST)

PROIECT

TERAPII INTELIGENTE PENTRU BOLI NON-COMUNICABILE, BAZATE PE ELIBERAREA CONTROLATA DE COMPUSI FARMACOLOGICI DIN CELULE INCAPSULATE DUPA MANIPULARE GENETICA SAU BIONANOPARTICULE VECTORIZATE

INTERA

PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0697

Contract nr. 13PCCDI/2018

FAZA I, An 2018

Rezumatul etapei

Rezultate stiintifice obtinute in aceasta faza in cadrul celor 4 proiecte componente INTERA au condus la indeplinirea obiectivelor propuse. In cadrul proiectului **INTERA-1** au fost obtinute plasmide codificatoare pentru IL-10 (proteina antiinflamatoare) si a celulelor transfectate stabil. De asemenea au fost selectate biomatrici (alginat, colagen, chitosan, dextran, etc.) si au fost optimizate conditiile de incapsulare si a fost realizat la un procedeu de obtinere a unor sisteme de tip micro și macrovezicule (capsule goale în interior) sau tuburi polimerice cu caracteristici prestabilite. Dintre caracteristicile prestabilite se pot menționa: diametrul interior și exterior; porozitatea peretelui, capacitatea de schimb a peretelui, etc. Aceste sisteme sunt produse din polimeri sau compozite (alginat, chitosan, colagen, etc) în amestec cu substanțe biologice active utilizând sisteme coaxiale de ace de diametre prestabilite. Tehnologia permite ca în cazul micro- și macroveziculelor încărcarea cu substanțe biologice active să se realizeze în interiorul cavității sau în peretele capsulelor. In cadrul proiectului **INTERA-2**, au fost obtinuti constructii 3D (dextran, celuloza, PMMA, gelatina si si colagen) prin electrofilare si criogenare si au fost obtinute primele matrici 3D care au fost populate cu diferite tipuri celulare; s-a testat compatibilitatea acestora cu matricile si a fost analizata viabilitatea si fenotipul celulelor din interiorul bio-matricei 3D. In cadrul proiectului **INTERA-3** au fost obtinute si caracterizate nanoparticule magnetice si nanoparticule lipidice care au fost funcționalizate adecvat pentru livrarea țintită a polifenolilor. Au fost utilizati polifenoli puri (acid cafeic, acid tanic, acid galic, acid protocatehuic, limonen, naringenina, hesperetina) și uleiuri esențiale bogate în polifenoli (ulei de mentă, fenicul și lavandă). De asemenea, s-a realizat la nivel de prototip, un separator magnetic vertical care să permită purificarea și separarea nanoparticulelor izomagnetice. In cadrul proiectului **INTERA-4** au fost obtinute si caracterizare nanoparticule magnetice si nanoconjugati cu PEI si plasmide codificatoare pentru apoAI si apoAII; au fost determinat raportul optim de complexare NMP-PEI/ ADN; au fost obtinute si caracterizate molecule „CORE” si cuplate cu PEI. Rezultatele au fost prezentate la manifestari stiintifice, publicate sau trimise spre publicare in reviste de specialitate si au fost trimise spre patentare doua brevete de inventie.

INTERA-1 (PROIECT nr. 1): Incapsularea celulelor eucariote manipulate genetic pentru eliberarea controlata a unor produse farmacologici activi

Etapa 2018 – Obținerea celulelor transfectate stabil și optimizarea condițiilor de incapsulare

Activitatea 1.1. Realizarea strategiei de clonare pentru construcția unor plasmide codificatoare pentru proteine reporter și peptide antiinflamatoare

Indeplinirea obiectivelor INTERA-1

Obiectivul etapei I al subproiectului **P1-INTERA** a fost îndeplinit în totalitate:

Indicatori de realizare au fost atinși:

- Au fost analizate secvențele IL-10 și a proteinelor reporter și au fost obținute plasmidele pentru IL-10 și proteine reporter secretate
- Au fost obținute biomatrici polimerice cu funcțiuni specifice
- Au fost obținute celule transfectate stabil
- A fost realizată o Tehnologie de formare a microcapsulelor polimerice cu proprietăți speciale
- A fost realizată pagina web INTERA, au fost efectuate participări la manifestări științifice, a fost realizat un brevet și o lucrare științifică a fost trimisă spre publicare
- au fost angajați doi noi cercetători (Alina-Gabriela Rusu – ICMPP și Laura Moise - IBPCNS), procedura de angajare a unui noi angajat la UPB fiind în desfășurare.
- Un serviciu a fost postat în platformă ERRIS, la adresa <https://erris.gov.ro/Department-gene-analysis> Plasmid design and cloning strategies
-

Activități de diseminare INTERA-1

1. participări la manifestări științifice :

- 4th International Conference on Chemical Engineering, ICCE 2018, 31.10-02.11.2018, Iași, România, Conferința plenară- Fundueanu G., Constantin M., Bucatariu S., Smart polymeric materials for controlled release of bioactive molecules.

-participarea la conferința „20th International Conference on Synthetic Polymer Chemistry, Nanoscience and Nanotechnology” Londra, UK, cu lucrarea „Synthesis and Characterization of Some Alginate Hollow Fibres Using Co-Axial Needles” Anton Ficăi, Ioana Lavinia Ardelean, Roxana Doina Trusca, Bogdan Stefan Vasile, Denisa Ficăi, Ecaterina Andronescu - a fost apreciată de juriul conferinței cu premiul „BEST PRESENTATION AWARD”.

2. s-a realizat un brevet de invenție: Vezicule și tuburi polimerice și tehnologie de obținere a acestora

Autori Denisa FICAI, Andreea ILIEV, Anton FICAI, Violeta Georgeta TRUSCA, Anca Violeta GAFENCU, Sanda-Maria BUCATARIU, FUNDUEANU-Constantin Gheorghe, Maya SIMIONESCU, Ecaterina ANDRONESCU

3. A fost trimisă o lucrare spre publicare la revista JoVE (cotată ISI) "An efficient method for adenovirus production" Madalina Dumitrescu, Violeta G. Trusca, and Anca V. Gafencu. care a primit manuscript number: JoVE59105 și este în proces de evaluare.

INTERA-2 (PROIECT nr. 2) Crearea unei platforme 3d concepute pentru testare pre-clinica de medicamente compusa din celule incorporate in bio-matrici tridimensionale

Etapa 2018 - Realizarea unor matrici 3D biocompatibile, functionalizate cu celule valvulare

Indeplinirea obiectivelor INTERA-2

Ca urmare a implementarii in totalitate a primei etape a proiectului P2-INTERA au fost obtinute urmatoarele *rezultate* si indepliniti *indicatorii de realizare* prevazuti:

- (i) Au fost selectate mai multe tipuri de polimeri naturali (dextran, gelatina, colagen, celuloza) si sintetici (polimetilmetacrilat-PMMA, alcool polivinilic), precursori in realizarea ulterioara a criogelurilor si membranelor electrofilate;
- (ii) Testele de viabilitate au demonstrat biocompatibilitatea hidrogelurilor obtinute cu celulele umane endoteliale, fibroblaste si interstitiale valvulare;
- (iii) S-au stabilit liste cu combinatiile optime de polimeri, atat pentru cazul hidrogelurilor pe baza de celuloza-dextran, cat si pentru membranele electrofilate;
- (iv) Criogelurile si membranele electrofilate obtinute au fost caracterizate prin stabilirea gradului de umflare, a morfologiei acestora (microscopie SEM) si a cristalinitatii probelor (difractie cu raze X).
- (v) S-a analizat morfologia celulelor care au populat matricile obtinute si s-a constatat ca membrana electrofilata favorizeaza dezvoltarea fenotipului specific celulelor cultivate in timp ce criogelurile nu permit o aderare totala si astfel un fenotip specific celulelor care il populeaza.
- (vi) angajarea unui tanar in IBPC "N. Simionescu" (Mihaila Andreea Cristina) si a doi tineri in INCDFM (Apostol Mariana Mihaela si Sandu Alexandra).

Activitati de diseminare INTERA-2

- **Articol ISI:** Macarie RD, Vadana M, Ciortan L, Tucureanu MM, Ciobanu A, Vinereanu D, Manduteanu I, Simionescu M, **Butoi E.** The expression of MMP-1 and MMP-9 is up-regulated by smooth muscle cells after their cross-talk with macrophages in high glucose conditions. *J Cell Mol Med.* 2018 Sep;22(9):4366-4376.
- **Capitol Carte:** 1. Petrovici A.R., Ciolacu D. - "Natural flavours obtained by microbiological pathway" in cartea OPEN ACCES "Generation of Aromas and Flavours", ISBN 978-953-51-6240-7.
- The 22th International Salon of Research, Innovation and Technological Transfer - Inventica 2018, **27-29.06.2018**, Iasi, Romania, **Poster** - Petrovici A. R., Ciolacu D., Procedure of dextran biosynthesis by *Weissella confusa* ICMPP29 and the composition of culture media.
- International Symposium of Chemical Engineering and Materials, SICHEM 2018, **6 – 7.09.2018**, Universitatea Politehnica Bucuresti, Romania, **Comunicare Orala** - Petrovici A. R., Silion M., Roșca I., Ciolacu D., The four different culture media influences on the polymer biosynthesis.
- 4th International Conference on Chemical Engineering, ICCE 2018, **31.10-02.11.2018**, Iasi, Romania, **Comunicare Orala** - Ciolacu D. E., Petrovici A. R., New hydrogels based on cellulose for biomedical application.
- Elena Butoi, Sergiu Cecoltan, Letitia Ciortan, Razvan D Macarie, Florin Iordache, Monica Tucureanu, Mihaela Vadana, Agneta Simionescu, Maya Simionescu, Ileana Manduteanu. Constructing of 3D gelatin scaffolds for aortic valve tissue engineering, - Al X-lea Congres Național de Biologie Celulară și Moleculară cu participare internațională a XXXVI-a Sesiune Anuală a Societății Române de Biologie Celulară” Craiova, Romania, 6-9 iunie - poster premiat.
- Mihaela Vadana, Razvan Daniel Macarie, Letitia Ciortan, Monica M Tucureanu, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu, Elena Butoi. Molecular and cellular alterations induced by macrophage-smooth muscle cells cross-talk accountable for atherosclerosis plaque vulnerability. 27th European Cardiology Conference” Rome, Italy, October 21-24, 2018 – poster

INTERA-3 (PROIECT nr. 3) Nanobioparticule inteligente concepute pentru vectorizarea compusilor bioactivi pentru terapia inflamatiei vasculare

Etapa 2018 – Conceperea, prepararea si caracterizarea a diferite tipuri de nanoparticule pentru a fi folosite ca vectori pentru transportul țintit de polifenoli

Diseminarea si valorificarea rezultatelor, consolidare institutionala Indicatori de realizare: Creare si actualizare pagina web a proiectului; Participari la manifestari stiintifice

● A fost depusă la OSIM aplicația de brevet cu titlul: „Separator (electro)magnetic vertical a nanoparticulelor izomagnetice”, Ficai Denisa, Ardelean Ioana, Ilie Cornelia, Calin Manuela, Fuior Elena-Valeria, Fifere Adrian, Pinteala Mariana, Fundueanu Gheorghe, Ficai Anton, Simionescu Maya, Andronescu Ecaterina, nr. inregistrare A/01055 din 5.12.2018.

● Participarea la manifestari stiintifice internationale:

1. „International Symposium of Chemical Engineering and Materials”, SICHEM 2018, 6-7.09.2018, Universitatea Politehnica Bucuresti, Romania, Comunicare Orala - Fifere A., Lungoci A.L., Turin-Moleavin I.A., Petrovici A.R., Antioxidant loaded dextran coated magnetic nanoparticles for biomedical application.

2. „4th International Conference on Chemical Engineering”, ICCE 2018, 31.10-02.11.2018, Iasi, Romania, Comunicare Orala –Lungoci A.L., Fifere A., Marangoci N., Corciova A., Ivanescu B., Tuchilus C., Mircea C., Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts.

3. “The 36th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology and the 10th National Congress with International Participation”, 6-10 iunie 2018, Craiova, Romania, poster- Fuior EV, Deleanu M, Voicu G, Rebleanu D, Constantinescu CA, Safciuc F, Simionescu M, Calin M. Preparation and characterization of endothelium-targeted flavonoid-loaded lipid nanoemulsions -**premiul I la sectiunea POSTERE.**

4. “International Conference on Nanotechnology and Bioscience”, 23-29 septembrie 2018, Heraklion, Grecia – poster– Fuior EV, Voicu G, Deleanu M, Rebleanu D, Constantinescu CA, Safciuc F, Simionescu M, Calin M VCAM-1 targeted naringenin-loaded lipid nanoemulsions reduce monocyte adhesion to activated endothelial cells.

5. “Advances in proteomics and progress in precision medicine” 24-26 octombrie 2018, Bucuresti, Romania – poster, Fuior E.V., Voicu G., Deleanu M., Rebleanu D., Constantinescu C.A., Safciuc F., Simionescu M., Calin M, VCAM-1 targeted naringenin-loaded lipid nanoemulsions reduce monocyte adhesion to activated endothelial cells.

● Participarea la manifestari stiintifice nationale:

1. „A XXXV-a Conferinta Naționala de Chimie”, 02-06 octombrie 2018, Calimanesti-Caciulata, România, Deleanu M, Fuior E, Carnuta M, Stancu C, Toma L, Popa M, Sima A, Preparation and characterization of nanoemulsions encapsulating allicin extract from garlic.

● Lucrari ISI:

1. Manuscris in preparare, ce urmează a fi trimis spre publicare la revista „Current Pharmaceutical Design” având ca topic principal polifenolii și modalități de administrare inteligentă.

Concluzii:

Obiectivul etapei I a proiectului P3-INTERA a fost indeplinit in totalitate. Au fost realizate mai multe tipuri de nanoparticule magnetice cu capacitate de vectorizare (țintire) atât pe bază de magnetită sau magnetită acoperită cu polimeri (dextran și chitosan) și încărcate cu polifenoli sau uleiuri esențiale bogate în polifenoli. De asemenea, au fost obtinute si caracterizate nanoparticule lipidice carausi de polifenoli directionate catre molecule de adeziune exprimate pe suprafata endoteliului vascular activat. Au fost realizati următorii indicatori: **1** tehnologie de obtinere a nanoparticulelor de magnetita (NPM), **1** raport de caracterizare al acestora; **1 raport** de obtinere si caracterizare a nanoparticulelor lipidice, **1** tehnologie de obtinere a nanoparticulelor magnetice acoperite cu dextran, **1** raport de caracterizare al acestora; **1** tehnologie de obtinere a nanoparticulelor magnetice functionalizate cu polifenoli, **1** raport de sinteza; realizarea unui **model experimental functional** de separator (electro)magnetic vertical a nanoparticulelor izomagnetice; diseminarea rezultatelor prin participarea cu lucrari (poster sau prezentari orale) la **5 Conferinte Internationale**; angajarea unui tanar in IBPC “N. Simionescu” (Anghelache Maria) si organizarea concursului pentru ocuparea unui post de catre UPB (procedură in desfășurare).

INTERA-4 (PROIECT nr. 4) Conjugati polimerici pentru inducerea eficienta a expresiei unor gene de interes cu aplicabilitate in terapia celulara

Etapa 2018 – Obținerea și caracterizarea nanoparticulelor magnetice și conjugati polimerici cu invelis policationic de PEI pentru a fi folositi ca agenti de transfectie

Obiectivul etapei I a subproiectului **INTERA-4** a fost indeplinit in totalitate:

- S-a realizat documentatia pentru sinteza conjugatilor polimerici de tipul C60-PEI, siloxan-PEI, conjugati pe bază de scuolenă și ciclodextrina precum și sinteza și funcționalizarea nanoparticulelor magnetice.
- Au fost obtinute plasmide folosite in studiile de transfectie cu conjugatii polimerici și nanoparticule magnetice: apoAI și apoAII in pcDNA 3.1 simplu, cu DYK și cu EGFP
- S-a realizat o Tehnologie de laborator cu privire la sinteza și caracterizarea structurala a nanoparticulelor magnetice NMP-PEI
- S-a realizat un Protocol de laborator cu privire la Caracterizarea morfologica și dimensionala a NMP-PEI, determinarea stabilitatii termice și a proprietatilor magnetice ale nanoparticulelor.
- Au fost formati poliplecsi NPM-PEI/ADN la rapoarte N/P crescatoare: 1, 10, 50, 100 și 200. Pentru caracterizarea poliplecsilor obtinuti, dimensiunea și potentialul zeta al poliplecsi NPM-PEI/ADN au fost determinate utilizand aparatul Nanosizer (Malvern).
- S-a testat citotoxicitatea NMP-PEI
- S-a intocmit un Raport experimental cu privire la functionalizarea scuolenii PEGilate cu glutaraldehidă, in vederea conjugarii cu PEI și caracterizare structurala a acestora.
- S-a finalizat o metoda de cuplare covalenta a unor sisteme dinamice pe bază de scuolenă PEGilată, glutaraldehidă și PEI 25kDa,
- S-a intocmit un Raport de caracterizare a sistemelor dinamice BF pe bază de scuolenă, PEG și PEI

Diseminare:

- First Balkan Conference on Medical Mycology and Mycotoxicology Balkan Fungus 2018, 13-15.09.2018, Timișoara – Romania (Comunicare Orala), Pinteala M., *Strategies in designing polymers for transfection*,
- The 12th Central and Eastern European Proteomic Conference, Bucuresti, Romania, 24 - 26 Octombrie, 2018 Bisphenol A down-regulates apolipoprotein A1 expression and exerts pro-atherogenic effects, Violeta Georgeta Trusca, Madalina Dumitrescu, Ioana Madalina Fenyo, Irina Florina Tudorache, Anca Violeta Gafencu
- First Balkan Conference on Medical Mycology and Mycotoxicology Balkan Fungus 2018, **13-15.09.2018**, Timișoara – Romania, Comunicare Orala – Peptanariu D., Uritu C.M., Ardeleanu R., Dascalu A.I., Clima L., Moleavin Turin I., Neamtu A., Pinteala M., *Strategies in designing polymers for transfection*

❖ Diseminare: Activitatile de diseminare din aceasta faza a proiectului sunt mentionate la finalul raportarii fiecarui proiect component

❖ Prezentarea structurii ofertei de servicii de cercetare și tehnologice cu indicarea link -ului din platforma Erris;

- Prin achizitionarea softului de Biologie Moleculara SnapGene, infrastructura IBPC s-a imbogatit astfel incat suntem acum capabili de a realiza servicii de design molecular și clonare. Acest serviciu a fost postat pe platforma ERRIS <https://erris.gov.ro/Department-gene-analysis> : Plasmid design and cloning strategies

❖ Locuri de munca sustinute prin program, inclusiv resursa umana nou angajata;

In cadrul proiectului INTERA au fost angajati urmasorii noi cercetatori:

- In **IBPCNS** (CO) toti cei 3 noi cercetatori propusi de angajat au fost angajati:

- Laura Moise – INTERA-1
- Mihaila Andreea Cristina – INTERA-2
- Anghelache Maria – INTERA-3

-In **INCDFM (P1)** au fost angajati cei doi noi cercetatori propusi: Apostol Mariana Mihaela și Sandu Alexandra in INTERA-2

-In **UPB** este in desfasurare procedura de angajare.

-In **ICMPP** au fost angajate doi din cei 3 tineri cercetatori propusi: Natalia Simionescu (INTERA-4) și Rusu Alina Gabriela (INTERA-1). Este de mentionat faptul ca Rusu Alina Gabriela, a fost nevoita sa demisioneze din proiectul INTERA deoarece a castigat un proiect PD, iar legea nu ii permite remunerarea din proiecte mai mult de 8 ore pe zi, norma cu care era remunerata din proiectul INTERA.