



## Etapa I:

Implementarea proiectului in perioada aprilie - decembrie 2011 s-a facut prin realizarea Etapei I, si anume: "Conceperea, prepararea si caracterizarea diferitelor tipuri de nanoparticule".

S-a predat un raport stiintific in care au fost prezentate rezultatele obtinute in cadrul activitatilor:

**Activitate I.1:** Organizarea workshopului de incepere a proiectului NANODIATER cu participarea reprezentanților întregului consorțiu

**Activitate I.2:** Realizarea site-ului Web al proiectului NANODIATER

**Activitatea I.3:** Prepararea liposomilor-țintă senzitivi (TSL), (P1:IBPC) luni: 1-36

**Activitatea I.5** Caracterizarea lipozomilor țintă-senzitivi (TSL) (P2: UPB), luni: 2-12

**Activitatea I.6:**Evaluarea stabilitatii lipozomilor țintă-senzitivi (TSL) (P1:IBPC), luni: 2-12

**Activitatea I.9** Optimizarea NP tintite (P1:IBPC, partener strain: Univ. Istanbul), luni: 6-18

**Activitatea I.10** Evaluarea expresiei VCAM-1 pe suprafata diferitelor linii de celule endoteliale (CE) (P1:IBPC, partener strain: Univ. Bonn), luni: 3-12

**Activitatea I.11** Evaluarea legarii NP tintite catre diferite CE, în condiții statice și dinamice (P1:IBPC, partener strain: Univ. Bonn), luni: 3-24

**Activitatea I.12** Eliberarea markerului incorporat in diferite tipuri de NP directionate după legarea la tinta moleculara de pe CE (P1:IBPC, partener strain: Univ. Bonn), luni: 3-9

**Activitatea I.14** Investigarea soartei TSL după legarea la țintă (P2: UPB), luni: 6-12

**Activitatea I.15** Încapsularea diferitelor inhibitori chemokinici (CA și CRA) în NP tintite (CA / CRA-NP) și detectarea eliberării lor după legarea la țintă (P1:IBPC, P2:UPB, partener strain: Univ. Bonn, partener strain: Univ. Istanbul), luni: 3-24

Concluzii Etapa I: Au fost preparati si caracterizati liposomi tinta-senzitivi cuplati cu peptide ce recunosc molecula de adeziune VCAM-1 (TSL-Vp), capabili sa se dezintegreze si sa elibereze continutul dupa legarea specifica la suprafata celulelor endoteliale activate si au fost efectuate experimente de incorporare a antagonistilor de receptori chemokinici in TSL-Vp si s-a urmarit efectul inhibitor al acestora asupra adeziunii si transmigrării monocitelor la/prin stratul de celule endoteliale.

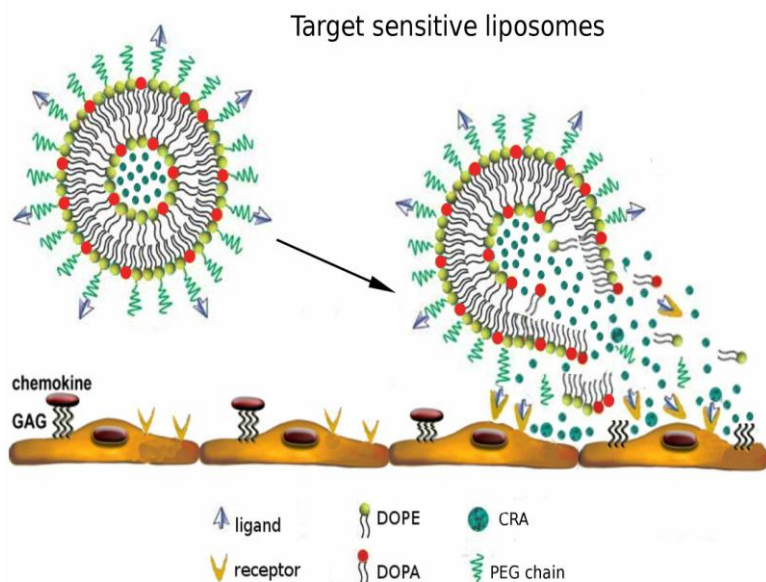


Figura 1. Reprezentarea schematica a liposomilor tinta-senzitivi conceputi sa se destabilizeze si sa elibereze medicamentul incorpora dupa legarea la suprafata celulei tinta

De asemenea, pe baza rezultatelor obtinute in prima etapa a proiectului se poate aprecia ca, printr-o selectiune atenta a modului de sinteza a nanoparticulelor de aur, acestea pot fi utilizate pentru cuantificarea indirecta a unor specii/biospecii analitice, pe baza efectului electrocatalitic manifestat fata de reactia catodica de descarcare a hidrogenului. Prin asamblarea nanoparticulelor de Au functionalizate cu anticorpi specifici, se poate construi un biosenzor electrochimic usor de manipulat si interpretat, la un cost competitiv.

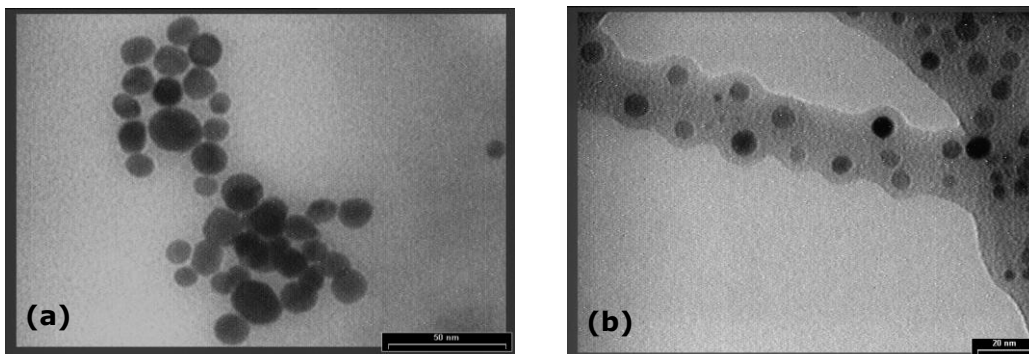


Figura 2. Micrografii obtinute cu ajutorul microscopului electronic de transmisie (TEM) (a) pentru AuNP-MS si (b) AuNP-MS conjugate cu anticorpi IgG

## Etapa II:

Implementarea proiectului in perioada ianuarie-decembrie 2012 s-a facut prin realizarea Etapei 2: "Evaluarea efectului terapeutic al inhibitorilor chemokinici transportati de catre nanoparticule directionate catre receptori specifici celulelor endoteliale activate".

Activitatile etapei II sunt prezentate mai jos:

**Activitate II.1:** Prepararea liposomilor-țintă senzitivi (TSL), (P1:IBPC), luni: 1-36

**Activitate II.2:** Prepararea de nanoparticule polimerice (PNP) directionate catre ținte specifice, (partener strain: Univ. Istanbul), luni: 1-32

**Activitate II.3:** Optimizarea NP tintite (P1:IBPC, partener strain: Univ. Istanbul), luni: 6-18

**Activitatea II.4:** Evaluarea legarii NP tintite la diferite CE, în condiții statice și dinamice, (P1:IBPC, partener strain: Univ. Bonn), luni: 3-24

**Activitatea II.5:** Încapsularea diferitelor inhibitori chemokinici (CA și CRA) în NP tintite (CA / CRA-NP) și detectarea eliberarii lor după legarea la țintă, (P1:IBPC, P2:UPB, partener strain: Univ. Bonn, partener strain: Univ. Istanbul), luni: 3-24

**Activitatea II.6:** Efectul CA/CRA-NP asupra inflamatiei celulelor endoteliale, studii in vitro în condiții statice de adeziune a leucocitelor la CE, (P1:IBPC), luni: 6-24

**Activitatea II.12:** Testarea nanoparticulelor tintite (CA/CRA-NP) folosind un model de soarece care dezvoltă ateroscleroza, (P1:IBPC), luni: 18-26

**Activitatea II.15:** Selectarea bioreceptorilor specifici pentru evitarea reacțiilor de interferență, (P1: IBPC, P2:UPB, P3: Optoelectronica), luni: 13-24

**Activitatea II.16:** Evaluarea și optimizarea componentelor biosenzorului, (P2:UPB, P3: Optoelectronica), luni: 19-24

**Activitatea II.17:** Dezvoltarea părții electronice și a pachetului de software pentru pentru cuantificarea NP metalice și detectarea celulelor specifice, (P2:UPB, P3: Optoelectronica), luni: 12-28

**Activitatea II.18:** Elaborarea specificațiilor tehnice de construcție a biosenzorului bazate pe studii de laborator in vitro și in vivo, (P2:UPB, P3: Optoelectronica, partener strain: EPO Berlin), luni: 20-24

**Activitate II.19:** Seminarii științifice cu participarea partenerilor români pentru a evalua stadiul proiectului și a lua decizii pentru etapele următoare

**Activitatea II.20:** Organizare/Participare workshopuri proiect cu participarea reprezentanților tuturor partenerilor pentru evaluarea stadiului proiectului și pentru a se lua decizii privind desfășurarea proiectului.

Concluzii Etapa II: au fost preparați și caracterizați liposomi tinta-senzitivi cuplați cu peptide ce recunosc molecula de adeziune VCAM-1 (TSL-Vp) în care au fost incorporați antagoniști de receptori chemokinici CCR2 care sunt eliberați în vecinătatea celulei după legarea TSL-Vp la tinta VCAM-1 de pe suprafața celulelor endoteliale activate. Efectul inhibitor al antagoniștilor de CCR2 transportați de TSL-Vp asupra adeziunii și transmigrării monocitelor la/prin stratul de celule endoteliale a fost determinat. Au fost efectuate studii pe modele animale pentru testarea acumulării liposomilor direcționați către VCAM-1 în zone cu endoteliu activat ale aortelor soarecilor ApoE<sup>-/-</sup>. De asemenea, a fost proiectată și executată partea electronică și pachetul software al biosenzorului care poate detecta concentrația de nanoparticule de aur cuplate cu anticorpi ce recunosc specific antigene libere sau antigene de pe suprafața celulelor tumorale metastatice sau a celulelor inflamatorii din sângele periferic. Nanoparticulele de aur sintetizate de tip Au-MS conjugate cu anticorpi furnizează un răspuns liniar față de mai mulți parametri electrochimici semnificativi, respectiv: curentul catodic de degajare al H<sub>2</sub> și sarcina electrică acumulată la un potențial catodic constant, rezistența de transfer de sarcină.

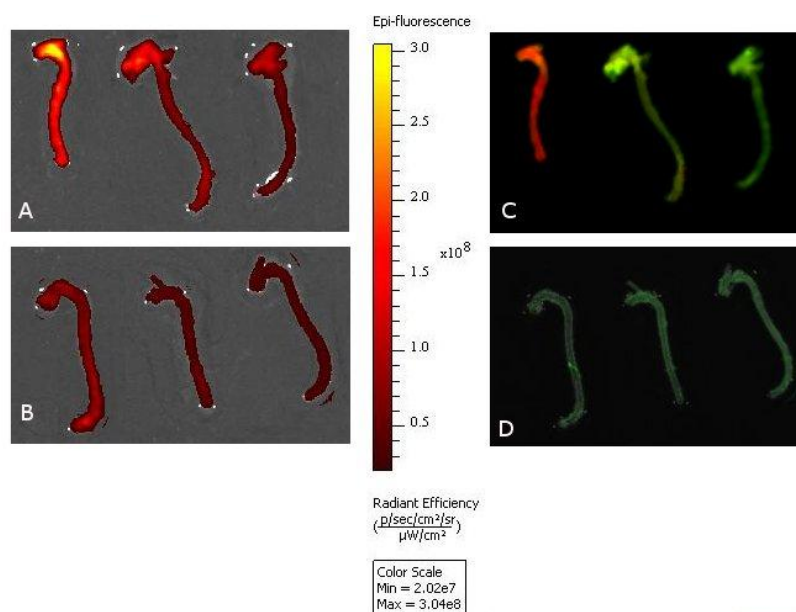


Figura 3. Imaginile de fluorescena suprapuse cu imaginile fotografice ale aortelor provenite de la soareci ApoE-deficienti sau C57 BL, incubate in situ cu liposomi directionati catre VCAM-1 (aorta din stanga imaginilor), liposomi ne-directionati (aorta din mijlocul imaginilor) sau cu PBS (aorta din dreapta imaginilor) obtinute cu ajutorul aparatului IVIS 200 Caliper folosind  $\lambda_{ex} = 535 \text{ nm}$  and  $\lambda_{em} = 620 \text{ nm}$ . Aorte provenite de la soareci ApoE-deficienti (A); Aorte provenite de la soareci C57BL (B) Separarea spectrala realizata cu ajutorul software "Living image software" pentru aortele provenite de la soareci ApoE-deficienti (C) sau C57BL (D) prezinta cu verde autofluorescena tesutului si cu rosu fluorecena specifica data de liposomii care se leaga de aorta.

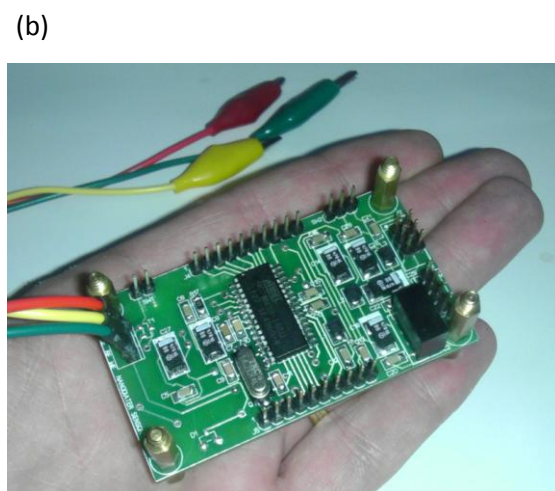
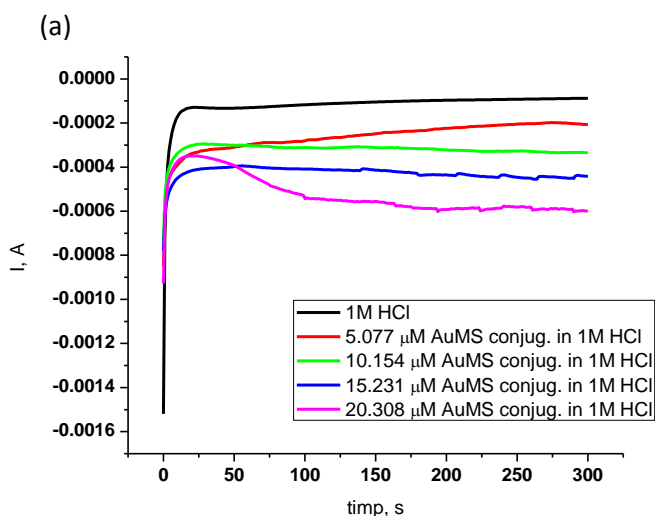


Figura 4. (a) Cronoamperograme inregistrate la  $E = -1.0V/ \text{Ag ref.}$  pentru solutii avand diferite concentratii de nanoparticule de Au conjugate, de tip Au-MS-anti-human IgG in 1M HCl pe SPE (dupa aplicarea unui pre-tratament constand in aplicarea unei polarizari la  $+1.35V/\text{Ag ref.}$  timp de 30 s); (b) placa de baza a biosenzorului Nanodiater

### **Etapa III:**

Implementarea proiectului in perioada ianuarie-decembrie 2013 s-a facut prin realizarea Etapei 3: "Dezvoltarea unui kit de diagnostic bazat pe biosenzor pentru cuantificarea nanoparticulelor metalice și detectarea specifica a celulelor inflamatorii sau tumorale".

S-a intocmit un raport stiintific in care au fost prezentate rezultatele obtinute in cadrul activitatilor:

**Activitate III.1:** Prepararea liposomilor-țintă senzitivi (TSL), (P1:IBPC), luni: 1-36

**Activitatea III.2:** Testarea nanoparticulelor tintite (CA/CRA-NP) folosind un model de soarece care dezvolta ateroscleroza, (P1:IBPC), luni: 18-26

**Activitatea III.3:** Evaluarea efectului administrarii CA/CRA-NP asupra dezvoltării plăcilor aterosclerotice la soareci ApoE-deficienti (P1: IBPC), luni: 24-36

**Activitatea III.4:** Investigarea raspunsului inflamator după tratarea soarecilor ApoE-deficienti cu CA/CRA-NP (P1: IBPC), luni: 24-36

**Activitatea III.5:** Dezvoltarea partii electronice și a pachetului de software pentru pentru cuantificarea NP metalice și detectarea celulelor specifice (P2: UPB-CSSNT, P5: Optoel), luni: 12-28

**Activitatea III.6:** Evaluarea "Sezorului celular" în condiții ex vivo (P1: IBPC, P2: UPB-CSSNT, P5: Optoel, partener strain: EPO GmbH Berlin, Germania), luni: 24-36

**Activitatea III.7:** Depunerea unei cereri de brevet pentru nanoparticule tintite

**Activitate III.8:** Seminarii stiintifice cu participarea partenerilor romani pentru a evalua stadiul proiectului si a lua decizii pentru etapele urmatoare

**Activitatea III.9:** Organizare/Participare workshopuri proiect cu participarea reprezentantilor tuturor partenerilor pentru evaluarea stadiului proiectului si pentru a se lua decizii privind desfasurarea proiectului

**Activitate III.10:** Diseminarea rezultatelor: participari la conferinte nationale si internationale; publicare in reviste cotate ISI

Concluzii Etapa III: au fost preparati si caracterizati liposomi tinta-senzitivi cuplati cu peptide ce recunosc molecula de adeziune VCAM-1 (TSL-Vp) in care au fost incorporati antagonisti de receptori chemokinici CCR2 care sunt eliberati in vecinatatea endoteliului activat, dupa legarea TSL-Vp la tinta moleculara VCAM-1. Au fost efectuate studii pe modele animale pentru testarea acumularii liposomilor si a nanoparticulelor polimerice directionati catre VCAM-1 in zone cu endoteliu activat ale aortelor soarecilor ApoE-/- . S-a urmarit efectul terapeutic al administrarii liposomilor tinta-senzitivi directionati catre VCAM-1 si incarcati cu antagonistul CCR2, Teijin in soareci ApoE-deficienti asupra leziunilor aterosclerotice si s-a aratat ca acest tratament determina scaderea leziunilor aterosclerotice.

De asemenea, s-a executat un echipament functional de biosenzor care poate detecta concentratia de nanoparticule de aur cuplate cu anticorpi ce recunosc specific antigene libere sau antigene de pe suprafata celulelor tumorale metastatice sau a celulelor inflamatorii din sângele periferic si care permite inregistrarea masuratorilor de curenti catodici cu valori comparabile celor achizitionate utilizand aparatura electrochimica consacrata (potentiostatul) iar portabilitatea sa (dimensiuni:130mm x 67mm x 25mm) reprezinta un avantaj semnificativ pentru aplicarea sa in diagnosticarea rapida. A fost

dezvoltat si pachetul software al biosenzorului care este conceput intr-un mod flexibil permitand atat functionarea in regim de voltametrie-ciclica cat si in regim de cronoamperometrie.

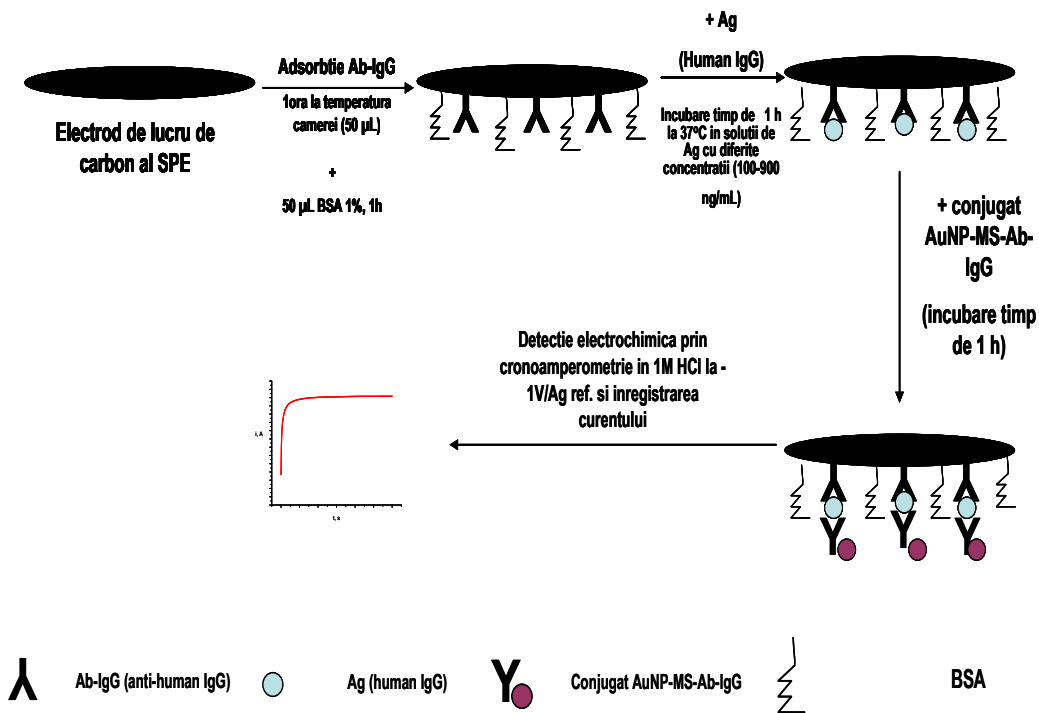


Figura 5. Schema procedurii de detectie electrochimica utilizand asamblarea sandwich pe suprafata electrodului



Figura 6. Biosenzorul "NANODIATER"