



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00811

(22) Data de depozit: 17/10/2018

(41) Data publicării cererii:
30/01/2020 BOPI nr. 1/2020

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI
PATOLOGIE CELULARĂ "NICOLAE
SIMIONESCU" BUCUREȘTI,
STR. B.P. HAȘDEU NR. 8, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• CĂLIN MANUELA,
STR. GRIGORE MOISIL, NR.3, BL.7, SC.1,
ET.9, AP.55, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,
RO;
• REBLEANU DANIELA, STR.ACIVILEI
NR.16M/3, AP.3, SAT ROȘU,
COMUNA CHIAJNA, IF, RO;
• CONSTANTINESCU ANA CRISTINA,
STR.MIHAIL SEBASTIAN, NR.110, BL.V 86,
SC.2, AP.68, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;

• VOICU GEANINA,
STR.PLT.RADU GHEORGHE, NR.38,
BL.VN 8, SC.A, AP.28, ET.7, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• DELEANU MARIANA, ȘOS.PANTELIMON,
NR.354, BL.2, SC.4, ET.4, AP.135,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• MÂNDUȚEANU ILEANA,
STR.GEORGE CĂLINESCU, NR. 27,
BL.A17, SC.A, ET.3, AP.14, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO

(74) Mandatar:
CABINET DE PROPRIETATE
INDUSTRIALĂ "LAZĂR ELENA",
B-DUL UNIRII, BL. 16C, AP. 12, OP 1,
CP 52, BUZĂU, JUDEȚUL BUZĂU

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A NANOCĂRĂUȘILOR UTILIZAȚI
PENTRU VECTORIZAREA ACIDULUI RIBONUCLEIC (ARN)
DE INTERFERENȚĂ ȘI LIVRAREA ȚINTITĂ LA CELULELE
VALVEI AORTICE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor nanobioparticule utilizate pentru transportul țintit de acizi nucleici la celulele valvei aortice disfuncționale. Procedul, conform invenției, constă în combinarea componentelor de bază, și anume 50% molar o fosfolipidă încărcată pozitiv de tip 1,2-dioleil-3-trimetilamoniu-propan (DOTAP) cu 35% molar o fosfolipidă neutră, sensibilă la pH, de tip 1,2-dioleil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamină (DOPE), 1...14% molar palmitoil homocisteină (PHC) și 1% molar un derivat fosfolipidic de polietilenglicol funcționalizat cu maleimidă

(Mal-PEG-DSPE), amestecul se dizolvă în cloroform ca atare sau în amestec cu metanol în raport 9:1, filmul lipidic este hidratat până la o concentrație de 10 mM, urmat de extrudarea suspensiei, rezultând lipozomi cationici PEG-ilați având caracteristici de ancoră membranară pentru cuplarea liganzilor specifici în vederea transportului țintit către valva aortică disfuncțională.

Revendicări: 8
Figuri: 12

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



105

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. <u>a 2018 0811</u>
Data depozit <u>17-10-2018</u>

PROCEDEU DE OBTINERE A NANOCĂRĂUȘILOR UTILIZAȚI PENTRU VECTORIZAREA ACIDULUI RIBONUCLEIC (ARN) DE INTERFERENȚĂ ȘI LIVRAREA ȚINTITĂ LA CELULELE VALVEI AORTICE

Prezenta invenție se referă la câmpul de aplicații farmaceutice, în particular la transportul țintit de acizi nucleici la celulele valvei aortice disfuncțională. Invenția se referă la un procedeu de obținere a nanocărașilor concepuți pentru vectorizarea acidului ribonucleic de interferență (ARNi) la celule valvulare afectate.

Stadiul cunoscut

Bolile cardiovasculare (BCV), un grup de afecțiuni care afectează inima și vasele de sânge, reprezintă principala cauză a morbidității și a mortalității în lume. Conform statisticilor „Rețelei Europene a inimii” (European heart network; <http://www.ehnheart.org>), în raportul pe 2017, se arată că insuficiența cardiacă și accidentele vasculare cerebrale provoacă 45% din totalul deceselor din Europa.

În România, situația este chiar mai gravă, un procent de 52% din totalul deceselor fiind datorat BCV. La pacienții cu diabet zaharat (DZ) se constată o frecvență semnificativ mai mare a bolilor cardiovasculare, inclusiv a bolilor valvelor cardiace.

În prezent, nu există un tratament medicamentos pentru disfuncțiile valvelor cardiace, singura opțiune fiind înlocuirea acestora prin intervenție chirurgicală. DZ este un factor de predicție a degenerării structurale și funcționale a valvei aortice, factor de prognostic în boala valvulară cardiacă idiopatică și, de asemenea, un factor care accelerează degenerarea bioprotezelor de valvă aortică implantate [Lindman și colab., 2014].

Problema tehnică asigură rezolvarea problemelor menționate mai sus prin aceea că noutatea procedurii propus în această aplicație constă în folosirea nanobioparticulelor pentru vectorizarea ARNi la celulele valvei aortice pentru țintirea a două din procesele patologice principale ce au loc în boala valvei aortice: tranziția endotelial-mezenchimală (EndMT) și calcificarea ectopică. **Nanocărași conform invenției sunt** utilizați în blocarea procesului de transformare a celulelor endoteliale în celule mezenchimale (EndMT) și în blocarea procesului de transformarea a celulelor interstițiale valvulare în osteoblaste.

Procedul permite **obținerea unor formule de liposomi cationici țintiți**, direcționați specific către molecule țintă prin cuplarea la suprafața lor de liganzi de tipul, anticopi, fragmente de anticorp sau peptide, complexați cu secvențe siARN/shARN, care vor fi folosiți drept vectori non-virali pentru livrarea ARNi la celulele valvulare. **Într-o prima etapă se obțin liposomi cationici, într-o a doua etapă are loc cuplarea liganzilor la suprafața liposomilor cationici, într-o a treia etapă are loc formarea lipoplexelor, într-o a patra etapă caracterizarea**

liposomilor cationici și a lipoplexelor, o altă etapă presupune urmărirea viabilității celulelor valvulare incubate cu lipoplexe, o alta etapă presupune determinarea eficienței de transfecție a lipoplexelor, urmează evaluarea eficienței de direcționare a lipoplexelor la țintă.

Formulele de liposomi vor include următoarele componente de bază: **un fosfolipid încărcat pozitiv** de tipul, **DOTAP** : 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane; **DOTMA** : 1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethyl-ammonium propane; **MVL5** : N1-[2-((1S)-1-[(3-aminopropyl)amino]-4-[di(3-amino-propyl)amino] butylcarboxamido)ethyl]-3,4-di[olecyloxy] -benzamide; **DDAB**: dimethyl-dioctadecyl-ammonium; **DC-Chol**: 3β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbonyl] cholesterol hydrochloride, în proporție de 35-55 moli%, optim fiind în proporție de 50 moli%, **care va fi combinat cu un fosfolipid neutru**, senzitiv la pH de tipul (1,2-Dioleoyl-sn- Glycero-3-Phosphoethanolamine (**DOPE**) și palmitoyl homocysteine (**PHC**) în proporție de 7-14 moli %, optim fiind 14 moli% **și cu un derivat fosfolipidic cu polyeten glicol** (1, 2 - distearoyl - sn - glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide (polyethylene glycol)-2000], **Mal-PEG-DSPE**, în proporție de 0,5-5 moli%, optim fiind în proporție de 1 mol%.

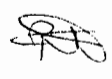
Aceste componente de bază sunt amestecate cu colesterol sau 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) sau 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), în proporție de 30-40 moli%, optim fiind în proporție de 35 moli %.

Derivații fosfolipidici de polietilenglicol (PEG) funcționalizați cu maleimida (Mal-PEG-DSPE) sunt utilizați pentru a putea fi folosiți ulterior drept ancoră membranară pentru cuplarea liganzilor specifici în vederea obținerii unui transport direcționat către valva aortică disfuncțională și pentru asigurarea unor timpi îndelungați de circulație în sânge a liposomilor după injectarea intravenoasă a acestora, fapt ce duce la creșterea capacității de direcționare a liposomilor la celula țintă.

Pentru realizarea unui transport direcționat către valva aortică bolnavă, liganzi specifici, cum ar fi peptide precum și anticorpi sau fragmente de anticorpi cu afinitate pentru anumite proteine membranare sunt conjugați la capătul terminal al derivaților Mal-PEG-DSPE, pe suprafața liposomilor cationici, pentru a recunoaște proteine țintă care sunt expuse pe suprafața celulelor endoteliale valvulare activate de tipul moleculelor de adeziune celulară VCAM-1 și P-selectina sau al componentelor matricei extracelulare identificate și validate ca fiind relevante pentru boala valvei aortice de tipul collagenului de tip I și IV.

Peptide cu afinitate pentru proteinele țintă vor fi utilizate pentru recunoașterea și pentru direcționarea liposomilor cationici cărași de siARN/shARN la valva aortică, peptide liniare care să conțină, de preferat, următoarele secvențe de aminoacizi VHPKQHR pentru recunoașterea VCAM-1 sau LSVVLDLEPLDAAWL pentru recunoașterea P-selectinei care sunt cuplate la suprafața liposomilor cationici.

Secvențe duplex siARN sau shARN, în care molecula de ARN artificial cu o buclă strânsă, care determină în celule sintetiza de ARN scurt de interferență (siARN) subsecvent transfecției celulelor cu un vector plasmidian shARN , vor fi proiectate pentru a scinda specific ARN-ul mesager al unor proteine relevante pentru apariția și dezvoltarea bolii valvei aortice și anume moleculele/căile implicate în

MGLM Jm X  2
Atasecu Jm Jm

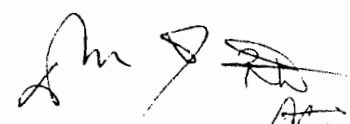
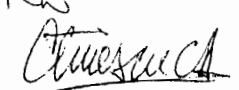
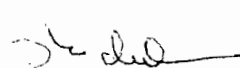
modificările fenotipice ale VEC și VIC, considerate relevante pentru stadiile incipiente și progresia bolii valvei precum Runx2, osteopontina, MMP-2, MMP-9, Smad2/3, Snail1, Twist 1, kinaza 1 asociată cu Rho (ROCK1), factorul de răspuns al serului (SRF), proteina 2 care conține domeniul de oligomerizare legat de nucleotide (NOD2), endotelina 1 (ET-1), p38 MAPK, ERK, Akt1.

Liposomii cationici și lipoplexele obținute prin complexarea acestora cu siARN sau shARN au fost caracterizați prin determinarea distribuției dimensiunilor și a potențialului Zeta (folosind metoda de împrăștiere dinamică a luminii laser, DLS), a morfologiei (cu ajutorul microscopiei electronice de transmisie, TEM), a capacității de complexare a acizilor nucleici de către liposomii cationici (prin analiza mobilității electroforetice) și prin investigarea citotoxicității și eficienței de transfecție a acizilor nucleici în VEC și VIC, a eficienței de silențiere a unei gene țintă în celule endoteliale și a capacității de direcționare către valva aortică.

Pentru prepararea liposomilor cationici, fosfolipidele au fost dizolvate în cloroform sau într-un amestec de cloroform: metanol (9:1) și au fost combinate în raporturile molare indicate, solventul organic a fost evaporat la presiune scăzută până când s-a obținut un film lipidic subțire, care a fost apoi hidratat cu apă pură de biologie moleculară (fără RNA-aze) astfel încât concentrația finală de lipid cationic să fie de 10 mM; prin vortexarea amestecului s-au obținut vezicule multilamelare; pentru obținerea liposomilor unilamelari, preparatul de vezicule multilamelare a fost apoi filtrat prin trecerea consecutivă de 10 ori prin fiecare membrană polycarbonat cu dimensiunea porilor de 200 nm, 100 nm și 50 nm, iar pentru etichetarea fluorescentă a bistraturilor lipidice ale liposomilor s-a adăugat 1 mol% 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine Rhodamine B sulfonyl) (ammonium salt) (Rhodamină-PE) ca soluție etanolică după prepararea liposomilor.

Nanocărbăușii pentru transportul țintit de ARN de interferență sunt: liposomi cationici complexați cu acizi nucleici care conțin o peptidă, un anticorp sau fragment de anticorp care recunoaște și se leagă în mod specific la ținte moleculare exprimate pe suprafața celulelor vizate și care conțin ARN de interferență.

Nanocărbăușii sunt caracterizați prin aceea că au compoziții realizate din combinații de lipide: **DOTAP**: 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane; **DOTMA**: 1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane (DOTMA); **MVL5**: N1-[2-((1S)-1-[(3-aminopropyl)amino]-4-[di(3-amino-propyl)amino]butylcarboxamido)ethyl]-3,4-di[oleyloxy]-benzamide; **POPC**: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; **DDAB**: Dimethyldioctadecylammonium; **DC-Chol**: 3β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl] cholesterol hydrochloride; **DOPC**: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; **colesterol**; **DOPE**: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine; **PHC**: N-palmitoyl homocysteine (PHC); **Mal-PEG-DSPE**: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethylene glycol)-2000] (Mal-PEG-DSPE), **conțin fosfolipide funcționalizate cu polietilenglicol (PEG) și cuprind ARN de interferență** de tipul siRNA (ARN scurt de interferență) sau shRNA (ARN scurt "ac de păr").

Angela


3


Avantajele invenției constau în apariția unei terapii farmacologice, viabilă clinic, pentru tratarea bolii valvulare, singura alternativă existentă în prezent fiind înlocuirea chirurgicală a valvei, o tehnică invazivă și costisitoare.

Prin utilizarea nanobioparticulelor purtătoare de ARN de interferență direcționate către valvă, obținute folosind procedeul descris în această invenție, se intervine în procesele patologice ce conduc la progresia bolii valvei aortice (tranziția endotelial-mezenchimală și calcifierea valvei), oferindu-se astfel o soluție nouă pentru a trata pacienții cu afecțiuni cardiovasculare ce necesită valvuloplastie tisulară sau înlocuirea valvei.

Avantajele oferite de aplicarea prezentei invenții sunt: reducerea, pe cât posibil, a costurilor sociale de tratament și recuperatorii (operații și tratamente costisitoare, etc) prin introducerea de noi protocoale de tratament în sistemul sanitar, precum și îmbunătățirea calității vieții, creșterea speranței de viață și a perioadei active a persoanelor implicate în activități productive care vor duce fără îndoială la creșterea eficienței economice în toate sectoarele productive și la creșterea nivelului de trai și a bunăstării populației.

Prezentarea pe scurt a figurilor:

Figura 1. Grupările -SH ale aminoacidului cisteină din capătul carboxi-terminal al peptidei NH₂-VHPKQRGGSKGC-COOH cu afinitate pentru VCAM-1 sau din capătul amino-terminal al peptidei NH₂-CKKKKLVSVDLEPLDAAWL-COOH cu afinitate pentru P-selectina formează legături tioesterice cu grupările maleimide expuse pe suprafața liposomilor cationici.

Figura 2. Curbele standard obținute pentru diferite concentrații de peptidă cu afinitate pentru VCAM-1 (a) sau P-selectina (d) în domeniul 0-100 μg/ml cu coeficient de corelație peste 0.99. Cromatograme reprezentative obținute pentru concentrația de 100 μg/ml peptidă cu afinitate pentru VCAM-1 (b) sau P-selectina (e), după reducerea cu agentul reducător TCEP și pentru concentrația de peptidă cu afinitate pentru VCAM-1 (c) sau P-selectina (f) rămasă liberă după reacția de cuplare între peptidele reduse și liposomii cationici ce conțin ancorele fosfolipidice Mal-PEG-DSPE.

Figura 3. Diametrul mediu hidrodinamic al formulelor de liposomi cationici cu codurile C1÷C6 (compoziția prezentată în Tabelul 1) și al lipoplexelor formate de liposomi cu ARNi (plasmidul shARN) la diferite raporturi R de încărcare electrică +/-.

Figura 4. Valorile potentialului zeta (mV) determinate pentru formulele de liposomi cationici cu codurile C1÷C6 (compoziția prezentată în Tabelul 1) și pentru lipoplexele formate de liposomi cu ARNi (plasmidul shARN) la diferite raporturi R de încărcare electrică +/-.

Figura 5. Micrografii TEM prezentând în detaliu morfologia liposomilor cationici cu codurile C1÷C6 (compoziția prezentată în Tabelul 1) și pentru lipoplexele formate de liposomi cu ARNi (plasmidul shRNA) la R=4 (C1), R=8 (C2, C3, C4), R=14 (C5), R=10 (C6). Bara 200 nm.

Figura 6. Electroforeze în gel de agaroză ce arată migrarea plasmidului shARN control liber (primul godeu din fiecare imagine) sau complexat cu formulele de

Amela
Cristina

de la

liposomi C1, C2, C3 (A), C4 (B), C5 (C) și C6 (D) la diferite raporturi de sarcină +/- (între 0.25 și 14).

Figura 7. Viabilitatea celulelor endoteliale expuse timp de 48 ore la lipoplexe formate între diferite tipuri de liposomi cationici și plasmidul shARN, la diferite raporturi de încărcare electrică. Legenda : Ctrl- celule control; shRNA- plasmid shARN liber; C1÷C6 formule de liposomi cationici complexați cu plasmid shARN la diferite raporturi de sarcină +/-; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $p < 0.0001$ versus Ctrl.

Figura 8. Viabilitatea celulelor interstițiale valvulare (VIC) expuse timp de 48 ore la complexe shRNA-NP, la diferite raporturi de sarcină. Legenda : Ctrl- celule control; shRNA – plasmid shARN liber; C1÷C6 formule de liposomi cationici complexați cu plasmid shARN la diferite raporturi de încărcare electrică (+/-); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $p < 0.0001$ versus Ctrl.

Figura 9. (a) Histogramele dot-plot obținute cu ajutorul citometrului de flux în cazul transfecției VEC cu lipoplexe Lipo-C2/pEYFP la raporturile de încărcare electrică (+/-) R= 6, 8, 12, 12 și 14. În poarta R-1 se găsesc celulele care au fluorescență scăzută (MFI<100 u.a.f), indicând celule transfectate, dar în care nivelul de proteina fluorescentă este mai redus, iar în poarta R-2 pot fi observate celule cu semnal puternic fluorescent (MFI>1.000 u.a.f) dat de exprimarea la nivel ridicat al proteinei fluorescente codificată de plasmidul pEYFP. (b) Imaginile de microscopie de fluorescență corespunzătoare transfecției VEC cu lipoplexe la raporturile de încărcare electrică indicate. C: celule control. Scala: 200 μ m.

Figura 10. (a) Histogramele dot-plot obținute cu ajutorul citometrului de flux în cazul transfecției VIC cu lipoplexe Lipo-C2/pEYFP la raporturile de încărcare electrică (+/-) R= 6, 8, 12 și 12. În poarta R-1 se găsesc celulele care au fluorescență scăzută (MFI<100 u.a.f), indicând celule transfectate, dar în care nivelul de proteina fluorescentă este mai redus, iar în poarta R-2 pot fi observate celule cu semnal puternic fluorescent (MFI>1.000 u.a.f) dat de exprimarea la nivel ridicat al proteinei fluorescente codificată de plasmidul pEYFP. (b) Imaginile de microscopie de fluorescență corespunzătoare transfecției VIC cu lipoplexe la raporturile de încărcare electrică indicate. C: celule control. Scala: 200 μ m.

Figura 11. (A) Preluarea lipoplexelor Psel-lipo/siARN marcate cu Rhodamina B și a lipoplexelor Scr-lipo/siARN de către celulele bEnd.3 activate cu TNF- α în absența sau prezența excesului de peptidă de legare a P-selectinei (Psel_BP), observată prin microscopie de fluorescență, la diferite intervale de timp în condiții statice de incubare (lipoplexele (roșu) și nucleeele celulare (albastru); bara 50 μ m). (B) Cuantificarea preluării lipoplexelor de către celule în condiții statice, exprimată ca raport între procentul pixelilor roșii și procentul pixelilor albaștri pentru fiecare câmp de imagine (fiecare punct reprezintă media a 9 câmpuri). (C) Observarea în timp a interacțiunii dinamice dintre lipoplexele marcate cu Rhodamina B (Psel-lipo/siARN și Scr-lipo/siARN) și celule bEnd.3 în sistemul FCS2 folosind un microscop inversat de fluorescență. Este prezentată o suprapunere a imaginilor de contrast de fază și fluorescența lipoplexelor (roșu) (bara 200 μ m) și o suprapunere a imaginilor de fluorescență a lipoplexelor (Rhodamina B, roșu) și a nucleelor (DAPI, albastru) (bara 50 μ m).

Figura 12. (A) Acumularea lipoplexelor direcționate către P-selectină (Psel-lipo/shARN) (c) și a lipoplexelor ne-direcționate, cuplate cu peptida scrambled (Scr-

lipo/shARN) (b) în valva aortică a șoarecilor ApoE-deficienți la o oră după administrarea intravenoasă. Este prezentată și o aortă provenită de la un șoarece ApoE-deficient, căruia i s-a administrat PBS (a). (B) Imaginile obținute în urma separării spectrale care arată autofluorescența țesutului (verde) și acumularea specifică a lipoplexelor marcate cu Rhodamina B (roșu) în valva aortică a șoarecilor ApoE-deficienți cărora li s-au administrat lipoplexe țintite Psel-lipo/shARN.

Descrierea invenției

Procesele patologice care au loc în boala valvei aortice asociată cu diabetul evoluează din faza timpurie caracterizată prin activarea endoteliului valvular, inflamația, proliferarea, îngroșarea și reticularea membranei bazale [Simionescu M și colab., 1996] spre faza progresivă, când procesele proinflamatorii pot induce diferențierea osteogenică a celulelor interstițiale valvulare (VIC). Datele existente sugerează că inflamația este o componentă inițială a bolii valvei aortice [Hjortnaes J și colab., 2010] și poate induce transformarea unui subset de celule endoteliale valvulare (VEC) în celule mezenchimale (EndMT) [Mahler GJ, Farrar EJ și Butcher JT, 2013] și de asemenea, poate iniția un proces osteogenic care contribuie în mod activ la calcificarea valvei aortice [New S și Aikawa E, 2011].

Procesul inflamator care apare în foițele valvulare datorită activării celulelor endoteliale valvulare, infiltrării celulelor imune și producției subsecventă a citokinelor inflamatorii (de exemplu, IL-1 β , TNF- α , IL-6, TGF- β) inițiază procesul de tranziție fenotipică a unui subset de VEC în celule mezenchimale. EndMT este un proces biologic complex în care celulele endoteliale își pierd proprietățile endoteliale și dobândesc fenotip de celule mezenchimale care exprimă markeri specifici cum ar fi α -SMA (smooth muscle actin) și FSP-1 (fibroblast-specific protein 1). S-a sugerat că EndMT ar putea determina denudarea endotelială observată la valvele afectate, stabilind astfel legătura dintre activarea inflamatorie a endoteliului [New S și Aikawa E, 2011] și pierderea acestuia în timpul etapei de calcifiere.

Studiile recente au arătat că tranziția EndMT joacă un rol important în disfuncția cardiacă indusă de diabetul zaharat și că hiperglicemia cronică este un inductor important al EndMT.

S-a demonstrat că tranziția EndMT indusă de concentrații crescute de glucoză are loc prin proteine reglatoare, cum ar fi Smad2/3, Snail, kinaza 1 asociată cu Rho (ROCK1), factorul de răspuns al serului (SRF), proteina 2 care conține domeniul de oligomerizare legat de nucleotide (NOD2) și ERK în celule endoteliale glomerulare [Zhao L și colab., 2016, Ma Z și colab., 2017, Peng H și colab., 2016].

În celulele endoteliale aortice umane și în HUVEC, concentrații crescute de glucoză induc EndMT prin intermediul următoarelor proteine reglatoare: angiotensina II, poli (ADP-riboza) polimeraza 1 (PARP-1), endotelina 1 (ET-1), p38 MAPK și ERK [Yan F și colab., 2015, Yu CH și colab., 2017, Tang RN și colab., 2013, Widyantoro B și colab., 2010]. Pe de altă parte, procesul inflamator care apare în foițele valvulare datorită infiltrării celulelor imune și producției citokinelor inflamatorii declanșează procesul de tranziție fenotipică a celulelor valvulare interstițiale (VIC) din starea normală („quiescent”) la miofibroblast și fenotipul

osteoblast-like, determinând astfel calcifierea valvei aortice și rigidizarea acesteia [Galeone A și colab., 2013, Chakraborty S și colab., 2008].

Principalele căi legate de calcifierea valvei aortice sunt căile Smad și Wingless/Int (Wnt)/beta-catenina. Msx2, un factor de transcriere în calea Wnt/beta-catenina și Runx2, un factor de transcriere în calea Smad, au fost găsite în valvele aortice calcificate [Shao JS și colab., 2005, Yang X și colab., 2009] și joacă un rol important în diferențierea VIC în osteoblaste.

Acești mediatori proteici ai tranziției endotelial-mezenchimala (EndMT) cât și cei care determină transformarea VIC în osteoblast pot fi folosiți drept ținte pentru abordări terapeutice bazate pe nanobioparticule (nanocărași).

Conform aplicației, nanobioparticulele sunt lipoplexe formate din liposomi cationici, direcționați selectiv la proteine exprimate de către celulele din valva aortică afectată în anumite condiții patologice sau de matricea extracelulară expusă ca urmare a lezării și denudării endoteliului, complexați cu ARN de interferență (ARNi) (și anume, siRNA sau shRNA). ARN de interferență poate fi conceput astfel încât să țintească specific moleculele/căile importante implicate în modificările fenotipice ale celulelor endoteliale valvulare (VEC) și ale celulelor interstițiale valvulare (VIC), relevante pentru progresia bolii valvei aortice.

Tehnologia ARNi a apărut în anul 1998 în urma studiilor efectuate pe viermele *Caenorhabditis elegans* care au stabilit că secvențe de ARN dublu catenar (dsRNA) interferează cu funcția genei prin legarea lor la ARN-ul mesager (ARNm), proces ce determină distrugerea acestuia, astfel încât proteina codificată nu se mai sintetizează [Fire A și colab., 1998].

Această descoperire, care a primit premiul Nobel pentru Fiziologie sau Medicină în anul 2006, a fost numită interferență ARN.

Interferența ARN este un mecanism natural de reglare a expresiei genice extrem de conservat evolutiv. De la descoperire, ARNi a evoluat rapid ca un instrument revoluționar pentru studierea funcției genetice, a căilor biologice și a fiziologiei bolii, dar și ca un instrument de terapie.

Se cunoaște în detaliu mecanismul de bază al căii endogene a ARNi și cum poate fi utilizat pentru silențierea anumitor gene de interes în diverse patologii.

Mecanismul ARNi are loc în citoplasma celulelor, la nivel post-transcripțional și este declanșat de secvențe scurte de ARN dublu catenar (dsARN), cunoscut sub numele de ARN scurt de interferență (small interfering ARN, siARN), care este procesat din dsARN lung de către enzima Dicer RNaza III sau poate fi introdus exogen într-o celulă pentru a se induce silențierea genei dorite. siARN este apoi asamblat în RNA-inducing silencing complex (RISC) care determină degradarea specifică a secvenței de ARN mesager (mARN) omoloage, astfel încât proteina codificată nu mai este translatată. Au fost dezvoltate criterii pentru utilizarea ARN-urilor scurte de interferență (siARN), mai mici de 30 de perechi de baze (bp), care permit utilizarea acestor dsRNA în celulele de mamifer fără a declanșa mecanismul de răspuns antiviral al celulei [Elbashir SM și colab., 2001].

Progrese ulterioare au arătat că și ARN pot fi exprimate în interiorul celulei gazdă după transfecția unui vector plasmidial ADN care conține o secvență shARN ("short hairpin ARN", o moleculă de ARN artificial cu o buclă strânsă), oferind pe lângă avantajul unei silențieri pe termen mai lung (comparativ cu siARN sintetic) și

Al. G. M. J. M. S. S.

7
Chiriacu CA

M. L. L.

posibilitatea ca AND-ul plasmidial să poate fi replicat pentru furnizarea nelimitată de siARN specific în celulă. Dezavantajul moleculelor ARNi este acela că ele sunt degradate rapid după administrarea *in vivo*. Prin urmare, a fost foarte dificil să se furnizeze molecule de ARNi în cantități suficiente pentru observarea unui efect terapeutic. Pentru a rezolva aceste neajunsuri, o varietate de metode de livrare a moleculelor ARNi au fost propuse.

De exemplu, există o metodă care descrie încorporarea ADN-ului care codifică o moleculă ARNi (și în particular o moleculă ARNi care are o structură de ac de păr scurt (shRNA)) într-un vector adecvat și administrarea vectorului direct în tumoră (patent US8592572B2: title "Liposome containing shRNA molecule targeting a thymidylate synthase and use thereof").

În prezent nu există o metodă de vectorizare a ARNi la celulele valvei aortice afectate cu ajutorul nanobioparticulelor țintite.

Procedeu descris în această invenție permite obținerea unor formule de liposomi cationici direcționați specific către molecule țintă prin cuplarea la suprafața lor de liganzi (de exemplu, anticopi, fragmente de anticorp sau peptide).

Liposomii sunt vezicule sferice închise, constând dintr-un bistrat lipidic format din fosfolipide care încapsulează un mediu apos. Atât în bistratul lipidic cât și în mediul apos pot fi stocați agenți terapeutici.

Liposomii cationici țintiți, complexați cu secvențe siARN/shARN, vor fi folosiți drept vectori non-virali pentru livrarea ARNi la celulele valvulare.

Formulele de liposomi vor include următoarele componente de bază: un fosfolipid încărcat pozitiv (de exemplu, DOTAP: 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane; DOTMA: 1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethyl-ammonium propane; MVL5 : N1-[2-((1S)-1-[(3-aminopropyl)amino]-4-[di(3-amino-propyl)amino] butylcarboxamido)ethyl]-3,4-di[oleyl]oxy]-benzamide; DDAB: Dimethyl-dioctadecyl-ammonium; DC-Chol: 3β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbonyl] cholesterol hydrochloride, de preferat în proporție de 50 moli%) care va fi combinat cu un fosfolipid neutru, sensibil la pH (de exemplu 1,2-Dioleoyl-sn- Glycero-3-Phosphoethanolamine (DOPE) și palmitoyl homocysteine (PHC) în proporție de 7-14 moli %, de preferat 14 moli%) și cu un derivat fosfolipidic cu polietilen glicol (1, 2 - distearoyl - sn - glycerol-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide (polyethylene glycol)-2000]; Mal-PEG-DSPE, de preferat în proporție de 1 mol%).

Aceste componente de bază sunt amestecate cu colesterol sau 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) sau 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) (de preferat, în proporție de 35 %).

Fosfolipidul neutru DOPE nu se assemblează în forma de bistrat lipidic atunci când este dispersat în tampon fiziologic ci formează micle inverse, astfel că singur, acesta nu poate forma vezicule. DOPE poate fi stabilizat în bistrat cu ajutorul unor fosfolipide încărcate electric cu o suprafață mare a capului polar. S-a arătat că liposomii cationici ce conțin DOPE în bistrat au capacitatea de a se destabiliza la pH scăzut ceea ce ajută la eliberarea liposomilor din endosomi [Farhood H, Serbina N și Huang L, 1995] și la obținerea unor eficiențe ridicate de transfecție.

Conform prezentei invenții, derivații fosfolipidici de polietilenglicol (PEG) funcționalizați cu maleimida (Mal-PEG-DSPE) sunt utilizați pentru a putea fi folosiți

Handwritten signature

Handwritten signature

Handwritten signature

ulterior drept ancoră membranară pentru cuplarea liganzilor specifici în vederea obținerii unui transport direcționat către valva aortică disfuncțională.

Prezența polimerului PEG este esențială pentru asigurarea unor timpi îndelungați de circulație în sânge a liposomilor după injectarea intravenoasă a acestora, fapt ce duce la creșterea capacității de direcționare a liposomilor la celula țintă. Această compoziție a liposomilor cationici, dezvăluită în prezenta invenție, garantează stabilitatea acestora în sânge până când ajung la ținta dorită.

Pentru realizarea unui transport direcționat către valva aortică bolnavă, liganzi specifici (de exemplu anticorpi, fragmente de anticorp, peptide cu afinitate pentru anumite proteine membranare) sunt conjugați la capătul terminal al derivaților Mal-PEG-DSPE, pe suprafața liposomilor cationici.

Proteine țintă care sunt expuse pe suprafața celulelor endoteliale valvulare activate (de exemplu, moleculele de adeziune celulară VCAM-1 și P-selectina) sau componente ale matricei extracelulare identificate și validate ca fiind relevante pentru boala valvei aortice (de exemplu colagenul de tip I și IV) și anticorpi/fragmente de anticorpi sau peptide cu afinitate pentru proteinele țintă vor fi utilizați pentru recunoașterea și pentru direcționarea liposomilor cationici cărași de siARN/shARN la valva aortică.

Astfel, peptide liniare care să conțină, de preferat, următoarele secvențe de aminoacizi (VHPKQHR pentru recunoașterea VCAM-1 sau LVSVDLEPLDAAWL pentru recunoașterea P-selectinei) au fost cuplate la suprafața liposomilor cationici. Evaluarea eficienței de cuplare a peptidelor a fost determinată cu ajutorul cromatografiei lichide de înaltă performanță (UHPLC).

Secvențe duplex siARN sau shARN, în care molecula de ARN artificial cu o buclă strânsă, care determină în celule sintetiza de ARN scurt de interferență (siARN) subsecvent transfecției celulelor cu un vector plasmidian shARN [Rao DD, Senzer N și Cleary MA, 2009] vor fi proiectate pentru a scinda specific ARN-ul mesager al unor proteine relevante pentru apariția și dezvoltarea bolii valvei aortice și anume moleculele/căile implicate în modificările fenotipice ale VEC și VIC, considerate relevante pentru stadiile incipiente și progresia bolii valvei (de exemplu Runx2, osteopontina, MMP-2, MMP-9, Smad2/3, Snail1, Twist 1, kinaza 1 asociată cu Rho (ROCK1), factorul de răspuns al serului (SRF), proteina 2 care conține domeniul de oligomerizare legat de nucleotide (NOD2), endotelina 1 (ET-1), p38 MAPK, ERK, Akt1).

Liposomii cationici și lipoplexele obținute prin complexarea acestora cu siARN sau shARN au fost caracterizați prin determinarea distribuției dimensiunilor și a potentialului Zeta (folosind metoda de împrăștiere dinamică a luminii laser, DLS), a morfologiei (cu ajutorul microscopiei electronice de transmisie, TEM), a capacității de complexare a acizilor nucleici de către liposomii cationici (prin analiza mobilității electroforetice) și prin investigarea citotoxicității și eficienței de transfecție a acizilor nucleici în VEC și VIC, a eficienței de silențiere a unei gene țintă în celule endoteliale și a capacității de direcționare către valva aortică (într-un model experimental de soarece).

Prin utilizarea nanobioparticulelor purtătoare de siARN sau shARN obținute folosind procedeul descris în această invenție se intervine în procesele patologice ce

Meli Lm ~~SD~~
Chirescu

conduc la progresia bolii valvei aortice, oferindu-se astfel o oportunitate terapeutică promițătoare.

EXEMPLE:

În cele ce urmează sunt date exemple concrete care arată cum poate fi realizată invenția.

1. Prepararea liposomilor cationici

Liposomi cationici PEGylați au fost preparați prin metoda hidratării peliculei lipidice în combinație cu extrudarea suspensiei așa cum s-a descris anterior [Paternostre M și colab., 1996]

Pentru prepararea liposomilor cationici, fosfolipide incarcate pozitiv (de exemplu, DOTAP: 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane; DOTMA: 1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane; MVL5: N1-[2-((1S)-1-[(3-aminopropyl)amino]-4-[di(3-amino-propyl)amino] butylcarboxamido)ethyl]-3,4-di[oleyloxy]-benzamide; DDAB: Dimethyldioctadecyl-ammonium; DC-Chol: 3β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbonyl] cholesterol hydrochloride), fosfolipide senzitive la pH [1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine (DOPE) sau palmitoyl homocysteine (PHC)], colesterolul sau 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) sau 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) și derivati fosfolipidici ai polimerului polytehylene glycol (PEG) modificați cu maleimida: 1, 2 - distearoyl - sn - glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide (polyethylene glycol)-2000] (maleimide-PEG-DSPE) au fost dizolvate în cloroform sau într-un amestec de cloroform:metanol (9:1) și au fost combinate în raporturile molare indicate în Tabelul 1.

Solventul organic a fost evaporat cu ajutorul unui evaporator rotativ la presiune scăzută până când s-a obținut un film lipidic subțire pe fundul unui vas rotund. Filmul lipidic a fost apoi hidratat cu apă pură de biologie moleculară (fără RNA-aze) astfel încât concentrația finală de lipid cationic să fie de 10 mM.

Prin vortexarea amestecului s-au obținut vezicule multilamelare. Pentru obținerea liposomilor unilamelari, preparatul de vezicule multilamelare a fost apoi filtrat prin trecerea consecutivă de 10 ori prin fiecare membrană polycarbonat cu dimensiunea porilor de 200 nm, 100 nm și 50 nm folosind un aparat mini-extruder (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL/USA).

Pentru etichetarea fluorescentă a bistraturilor lipidice ale liposomilor s-a adăugat 1 mol% 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine Rhodamine B sulfonil) (ammonium salt) (Rhodamină-PE) ca soluție etanolică după prepararea liposomilor.

2. Cuplarea liganzilor la suprafața liposomilor cationici

În vederea direcționării specifice a liposomilor cationici către endoteliul activat al valvei aortice, s-a realizat cuplarea unor peptide liniare cu secvența NH₂-VHPKQRGGSKGC-COOH și NH₂-CKKKKLVSVDLEPLDAAWL-COOH, care prezintă afinitate pentru moleculele de adeziune celulară VCAM-1 [Kelly KA și colab., 2006] și pentru P-selectină [Molenaar și colab., 2003] la suprafața liposomilor.

AmBla *Im* *J* *RA*

C. Ionescu et al.

De Deel

Peptidele de recunoaștere a moleculelor de adeziune au fost cuplate la gruparea maleimidică a porțiunii distale a PEG (Mal-PEG-DSPE) prin interacțiuni sulfhidril-maleimidă, cum a fost descris anterior [Călin M și colab., 2015] (**Figura 1**).

Înainte de cuplare, peptidele au fost reduse prin adăugarea tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) timp de 2 ore pentru desfacerea legăturilor disulfidice formate între peptide și pentru activarea grupării sulfhidril (-SH). Excesul de TCEP a fost îndepărtat prin dializă peste noapte, la 4°C, într-un sac de dializă cu cut-off de 500-1000 Da în tamponul de cuplare (10 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄, 2 mM EDTA, 30 mM NaCl, pH = 6,7). Peptidele (în raport molar 2:1, peptidă: Mal-PEG-DSPE) au fost apoi adăugate suspensiilor de liposomi cationici, incubarea făcându-se sub agitare timp de 18 ore la temperatura camerei. Pentru a satura grupările maleimidice rămase libere, s-a adăugat aminoacidul L-cisteină (1 mM), timp de 30 de minute. Un pas final de purificare a fost realizat prin centrifugarea probelor folosind tuburi cu membrane de ultra-filtrare cu dimensiunea porilor de 100 kDa, pentru separarea peptidului necuplat de liposomi.

Cantitatea de peptidă cuplată la suprafața liposomilor a fost cuantificată cu ajutorul cromatografiei lichide de înaltă performanță (UHPLC) cu detecție UV-VIS folosind un echipament UHPLC-Agilent 1290 Infinity, care include o pompa binară cu patru canale, un detector DAD (Diode Array Detector) și softul specializat Agilent ChemStation. Separarea s-a făcut pe o coloana Zorbax Eclipse Plus C18 150 x 2.1 mm, 3.5 μm la temperatura de 25°C. Faza mobilă a fost formată dintr-un gradient de 0.1% acid trifluoroacetic în apă (eluant A) și 0.1% acid trifluoroacetic în acetonitril (eluant B). Inițial faza mobilă a constat dintr-un amestec de 60% A și 40% B până la minutul 7 când proporția s-a inversat 40% A și 60% B, revenind apoi la 60% A și 40% B la minutul 9. S-a lucrat la debit de 0.25 ml/min, iar detecția peptidului s-a realizat la 220 nm. Toți reactivii au fost de calitate HPLC. S-a realizat o curbă standard din diverse concentrații de peptidă redus care a fost folosită pentru determinarea concentrației de peptidă liberă, rămasă ne-cuplată la suprafața liposomilor (metodă descrisă anterior de Kang MJ și colab., 2011) (**Figura 2**). În aceste condiții, eficiența de cuplare a fost de 10 μg de peptidă/μmol fosfolipid total.

3. Formarea lipoplexelor

S-au format lipoplexe la diferite raporturi de încărcare electrică (+/-) (între 0,25 și 30) prin amestecarea secvențelor de acizilor nucleici siRNA sau shRNA cu cantități corespunzătoare de liposomi cationici țintiți sau ne-țintiți, la temperatura camerei, timp de 30 de minute. Secvențele siRNA sau plasmidul ce conține shRNA au fost suspendate în 150 mM NaCl și amestecate la concentrații adecvate cu un volum egal de suspensie de liposomi (în 150 mM NaCl). Raporturile de încărcare electrică au fost calculate luând în considerare numărul de sarcini pozitive per moleculă de lipid cationic (1 nmol fosfolipide DOTAP, DOTMA, DDAB, DC-chol conține 1 nmol de sarcini pozitive iar 1 nmol lipid multivalent MVL5 conține 5 nmoli de sarcini pozitive) și faptul că 1 μg de acid nucleic conține 3 nmoli de sarcini negative [Khoury și colab., 2006].

Amalia

11

De la

4. Caracterizarea liposomilor cationici și a lipoplexelor

Liposomii cationici și lipoplexele preparați așa cum s-a descris mai sus au fost caracterizați în ceea ce privește proprietățile fizice (dimensiune, potențial zeta) și funcționalitate (capacitatea de complexare a ARNi, directionare specifică la tinta moleculară dorită, eficiența de transfecție intracelulară a ARNi, citotoxicitate).

4.1. Dimensiunea: Distribuția în dimensiuni a liposomilor și a lipoplexelor formate prin complexarea acestora cu siRNA sau plasmid shRNA la diferite rapoarte de încărcare electrică +/- au fost determinate folosind metoda de împrăștiere dinamică a luminii laser (DLS) cu ajutorul unui dispozitiv Zetasizer Nano ZS (ZEN 3600) (Malvern Instruments, Marea Britanie). Metoda standard de operare (SOP) a măsurat intensitățile luminii împrăștiată la un unghi de 173° . Diametrul hidrodinamic mediu al liposomilor cationici a fost de aproximativ 200 nm cu o distribuție de dimensiuni unimodală, așa cum arată indicii de polidispersie, care a fost întotdeauna mai mic decât 0,2. Diametrul hidrodinamic mediu al lipoplexelor a variat în funcție de raportul de încărcare electrică folosit la formarea acestora având valori cuprinse între 200 nm și 1.600 nm (**Figura 3**).

4.2. Potențialul zeta: Ulterior, în cuveta de măsurare, după determinarea dimensiunilor, s-a scufundat un electrod (ZEN1002) pentru măsurătorile de potențial zeta (ζ). Acesta a fost determinat folosind dispersia luminii electroforetice (ELS), prin efectuarea a cinci măsurători consecutive la 5 V cu o întârziere de 300 secunde între măsurători, la 25°C utilizând modelul Smoluchowski. Rezultatele au fost analizate folosind software-ul Zetasizer Software 7.12 (Malvern Instruments). Liposomii au potențial zeta pozitiv de aproximativ +40 mV iar în cazul lipoplexelor acesta variaza în funcție de raportul de încărcare electrică folosit la formarea lipoplexelor de la -20 mV la +40 mV (**Figura 4**).

4.3. Microscopia electronică de transmisie: Liposomii și lipoplexele au fost vizualizați prin microscopie cu transmisie electronică (TEM) cu ajutorul unui microscop electronic de transmisie STEM TALOS F200C, folosind tehnica de colorare negativă a probelor cu substanța de contrast uranil acetat (1%). Micrografiile de microscopie electronică au fost obținute la o tensiune de accelerare de 200 kV. Probele de liposomi sau lipoplexe obținute la raporturi de încărcare electrică pentru care s-a obținut o complexare totală a plasmidului shRNA au fost depuse pe grile de cupru acoperite cu film polimeric. (**Figura 5**).

4.4. Migrarea lipoplexelor în gel de agaroză: Eficiența complexării acizilor nucleici de către liposomii cationici la diferite raporturi de încărcare electrică a fost evaluată prin analiza mobilității electroforetice. Lipoplexe formate între liposomi cationici și ARNi la diferite raporturi de sarcină (+/-) au fost încărcate (utilizând 6x tampon de încărcare (0,05% Orange G, 30% glicerol) și migrați în electroforeză în gel de agaroză, în tampon Tris-Acetate-EDTA (TAE) (40 mM Tris-HCl, 1% acid acetic, 1 mM EDTA). Gelul de agaroză conține colorantul pentru acizi nucleici Midori Green. Electroforeza s-a efectuat la tensiunea de 70V timp de 20 minute iar benzile corespunzătoare acizilor nucleici folosiți au fost vizualizate cu un transiluminator UV. Imaginea gelului indică valoarea raportului de încărcare electrică pentru care formulele de liposomi realizează o complexare completă a ARNi, fapt ce împiedică migrarea acizilor nucleici în gelul de agaroză. (**Figura 6**).

5. Viabilitatea celulelor valvulare incubate cu lipoplexe

Pentru exemplificare, s-au utilizat VEC și VIC care au fost izolate din valve umane recoltate în urma intervențiilor chirurgicale de înlocuire de valvă. Separarea VEC de VIC s-a efectuat în câmp magnetic cu ajutorul unor bile magnetice cuplate cu anticorp anti-CD31 (molecula exprimată pe suprafața VEC), folosind coloane de separare. VEC au aderat la pereții coloanei de separare în timp ce VIC au rămas în mediul de suspensie. Celulele au fost multiplicat și menținute în cultură, în mediu DMEM 1% glucoză suplimentat cu 10% ser fetal bovin și 1% antibiotice (penicilina 100 U/ml, streptomicina 100 $\mu\text{g/ml}$ și neomicina 50 $\mu\text{g/ml}$), într-un incubator în atmosferă umedă la 37°C și 5% CO_2 și au fost utilizate în experimente în faza logaritmică de creștere.

5.1. Tehnica XTT. Citotoxicitatea lipoplexelor formate de liposomii cationici cu plasmidul shARN a fost evaluată prin determinarea viabilității VEC și VIC, după incubarea acestora cu mediu de cultură ce conține lipoplexele la diferite raporturi de încărcare electrică +/- . Raporturile +/- au fost alese pe baza rezultatelor obținute în urma analizei mobilității electroforetice a lipoplexelor în gel de agaroză pentru a se stabili capacitatea liposomilor cationici de a proteja plasmidul shARN. Viabilitatea celulară a fost determinată folosind reducerea sării de tetrazolium XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt), sub acțiunea dehidrogenazelor din celulele active metabolic, care determină formarea formazanului ce poate fi măsurat spectrofotometric. VIC, au fost însămânțate în placa de 24 godeuri la densitatea de 1×10^4 celule/godeu, cu 24 ore înainte de a adăuga lipoplexele. După adăugarea lipoplexelor Lipo/shARN formate la diferite raporturi de sarcină (+/-), folosind concentrația de 1 μg plasmid shARN/godeu, celulele au fost menținute în incubator în atmosferă umedă la 37°C și 5% CO_2 , timp de 48 de ore. La sfârșitul incubării, mediul de cultură a fost schimbat cu mediu DMEM incolor ce conține 1 mg/ml XTT/ Phenazine methosulfate (PMS). Celulele au fost menținute în incubator la 37°C timp de 2 ore pentru formarea particulelor de formazan solubil. Absorbanța a fost detectată folosind un cititor de plăci TECAN, la lungimea de undă de 450 nm. Rezultatele au fost calculate ca procent din control (celule control incubate în mediu de cultură) și sunt prezentate ca medii $\pm$ SEM ("standard error of the mean", eroarea standard a mediei).

Viabilitatea VEC și a VIC după incubarea cu lipoplexele Lipo/shARN la raporturi +/- cuprinse între 6 și 14 este redată în **Figura 7**, respectiv **Figura 8**.

6. Eficiența de transfecție a lipoplexelor

Pentru exemplificare, s-au utilizat VEC și VIC în care s-a urmărit eficiența de transfecție a lipoplexelor formate între liposomii cationici cod C2 (DOTMA: colesterol: DOPE: Mal-PEG-DSPE-DSPE; 50: 35: 14: 1 mol %) plasmidul pEYFP-C1, de la Clontech Laboratories Inc. Plasmidul pEYFP-C1 codifică o proteină fluorescentă (lungimile de undă de excitație/emisie: 513/527 nm) ce poate fi vizualizată cu ajutorul microscopului de fluorescență folosind filtrul pentru FITC. De asemenea, fluorescența a fost cuantificată cu ajutorul citometrului de flux în canalul

FL1 folosind excitația laserului de argon de 488 nm. VEC sau VIC au fost înșămânțate în placi de 24 godeuri, la o densitate inițială de 100.000 celule/godeu, timp de 24 de ore înainte de incubarea cu lipoplexele. Lipoplexele Lipo-C2/pEYFP, obținute la diferite raporturi de sarcină +/- folosind o concentrație de ADN plasmidial de 0.5 $\mu\text{g/godeu/ml}$, au fost adăugate în mediu de cultură fără ser, timp de 4 ore, după care a fost adăugat ser (10%) în mediul de incubare. Drept control pozitiv au fost folosiți vectori comerciali de transfecție SuperFect® de la Qiagen (ce constă din molecule de dendrimer cu arhitectura sferică ce prezintă terminații cu grupări amino), folosindu-se indicațiile oferite de producător. Exprimarea proteinei fluorescente galbenă YFP a fost analizată după 48 de ore cu ajutorul microscopului de fluorescență (Olympus IX81) și a citometrului de flux (Gallios, Becton Dickinson). Eficiența de transfecție a fost determinată ca procent de celule care exprimă proteina fluorescentă YFP per probă în raport cu numărul total de celule care sunt investigate de citometru de flux (10.000 evenimente numărate pentru fiecare probă transfectată).

Rezultate reprezentative obținute în VEC sau VIC sunt prezentate în **Figura 9** (a și b), respectiv **Figura 10** (a și b). În Figura 9a și Figura 10a se observă două populații de celule care prezintă fluorescență în canalul FL1 al citometrului de flux: o populație cu fluorescență scăzută ($\text{MFI} < 100$, detectată în poarta R-1) și o populație cu fluorescență ridicată ($\text{MFI} > 1000$, detectată în poarta R-2). Imaginile preluate cu ajutorul microscopului de fluorescență sunt prezentate în Figura 9b și Figura 10b. Datele obținute arată faptul că, atât în cazul VEC cât și în cazul VIC, folosirea lipoplexelor Lipo-C2/pEYFP determină exprimarea la nivel ridicat a proteinei fluorescente măsurată în poarta R-2 și vizualizată cu ajutorul microscopului de fluorescență.

7. Eficiența de direcționare a lipoplexelor la țintă

7.1. In vitro. Pentru exemplificare, s-a utilizat linia de celule endoteliale b.End3 achiziționate de la Colecția Europeană de Culturi Celulare Autentificate (ECACC, număr de catalog 96091929). Au fost folosiți liposomi cationici cod C2 (obținuți și caracterizați ca în exemplul 1) care au fost cuplați (folosind metoda descrisă în exemplul 2) cu peptida de recunoaștere a moleculei de adeziune P-selectina ($\text{NH}_2\text{-CKKKKLVSVDLEPLDAAWL-COOH}$) (Psel-lipo) sau cuplați cu o peptidă ce conține aceeași amioacizi ca și peptida de legare la P-selectină, dar într-o secvență aleatorie sau "scrambled" ($\text{NH}_2\text{-CKKKKLLSAVLWDELVDPLA-COOH}$), denumite Scr-lipo. Liposomii au fost etichetați cu fosfolipidul fluorescent Rhodamină-PE (folosit în procent de 1 mol %). Lipoplexele au fost obținute prin complexarea liposomilor cationici și ARNi de tip siARN (Psel-lipo/siARN și Scr-lipo/siARN). Pentru a evalua interacțiunea globală (legare + internalizare) a lipoplexelor (Psel-lipo/siARN și Scr-lipo/siRNA) cu celule endoteliale activate, celulele bEnd.3 au fost înșămânțate pe lamele de sticlă în plăci de cultură cu 24 de godeuri (5×10^4 celule/godeu). După atingerea confluenței, celulele au fost activate cu $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/ml) timp de 4 ore (pentru creșterea expresiei de P-selectină pe suprafață) și apoi incubate cu lipoplexe, marcate cu Rhodamină-PE, timp de 10, 30, 60 și 240 minute la 37°C , într-un incubator. Pentru a investiga specificitatea interacțiunii Psel-lipo/siARN cu celulele bEnd.3 activate, s-au efectuat studii în care celulele au fost preincubate timp de 1 oră cu un exces de peptidă de recunoaștere a P-selectinei (concentrație de

aproximativ 25 ori mai mare a peptidei comparativ cu peptida cuplată la suprafața Psel-lipo) înainte de incubarea cu lipoplexele Psel-lipo/siARN. La sfârșitul perioadei de incubare, după spălarea cu PBS, lamelele de sticlă au fost montate pe lame de microscop cu Roti®-Mount FluorCare DAPI, iar celulele au fost ulterior investigate prin microscopie de fluorescență (Olympus IX81) (**Figura 11 A**). Pentru a cuantifica semnalul fluorescent dat de lipoplexele marcate cu Rhodamină B, imaginile preluate cu filtru roșu sau albastru au fost prelucrate utilizând histogramele generate pentru fiecare semnal fluorescent (roșu pentru Rhodamine-PE și albastru pentru DAPI) în programul de prelucrare imagini Corel®Photo-Paint™ X8. Pentru fiecare imagine capturată, datele pentru histograma în roșu (lipoplexele marcate cu Rhodamine-PE) au fost normalizate la histograma obținută pentru albastru (nuclei colorați DAPI) (**Figura 11 B**). Pentru o mai bună simulare a condițiilor *in vivo* de interacțiune între lipoplexe țintite către P- selectină și endoteliu activat, s-au efectuat experimente în condiții dinamice de curgere, utilizând sistemul de cameră Focht 2 (FCS2®, Bioptechs, Butler, PA, USA). Sistemul permite observarea la microscop în timp real a interacțiunii dintre lipoplexe și celule în perfuzie cu flux laminar și cu un control precis al temperaturii. Celulele bEnd.3 au fost cultivate pe lamele de sticlă de 40 mm și după 24 de ore acestea au fost plasate în camera de curgere a sistemului FCS2 la 37°C, folosind o garnitură dreptunghică din silicon cu grosimea de 0,5 mm și cu dimensiuni de 14 x 24 mm decupată în centru (pentru a se putea expune celulele la fluxul de mediu de cultură ce conține lipoplexe). Camera de curgere a fost plasată în câmpul de observație al unui microscop fluorescent (Olympus IX81). Mediul de curgere (4 ml de mediu de cultură celulară ce conține lipoplexe marcate cu Rhodamină-PE a fost recirculat timp de 60 minute la o viteză de curgere de $\sim 3,8 \text{ s}^{-1}$ (stresul de curgere de $\sim 3,4 \text{ dynes/cm}^2$) folosind o pompă de perfuzare. După 10, 30 și 60 de minute de perfuzare cu lipoplexe, imaginile de contrast de fază și fluorescență (roșu) au fost obținute utilizând software CellSense Dimensions 1.5 software© Olympus Corporation. După 60 de minute, lamelele au fost îndepărtate din sistemul FCS2 și celulele au fost montate cu Roti®-Mount FluorCare DAPI. Au fost captate imagini fluorescente utilizând filtrul TRITC (roșu) și DAPI (albastru) (**Figura 11 C**). Imaginile fluorescente obținute demonstrează că atât în condiții statice de incubare cât și în condiții dinamice, ce simulează curgerea sângelui, legarea și preluarea lipoplexelor Psel-lipo/siARN de către celulele bEnd.3 activate cu TNF- α este semnificativ mai mare în comparație cu cea a lipoplexelor Scr-lipo/siARN la toate intervalele de timp investigate (**Figura 11 A, B, C**).

7.2. In vivo. Pentru exemplificare, s-au folosit șoareci ApoE-deficienți, un model de șoarece care dezvoltă leziuni aterosclerotice. S-a arătat că P-selectina este o glicoproteină exprimată pe suprafața endoteliului vascular activat și joacă un rol important în formarea plăcilor aterosclerotice [Molenaar și colab., 2003] și de aceea poate fi folosită ca o țintă moleculară pentru direcționarea specifică a nanoparticulelor. În vederea testării eficienței de țintire *in vivo* a lipoplexelor către endoteliul activat al valvelor aortice, pentru prepararea lipoplexelor au fost folosiți liposomi cationici cod C2 (DOTMA: colesterol: DOPE: Mal-PEG-DSPE-DSPE; 50: 35: 14: 1 mol %) ale căror membrane au fost marcate fluorescent cu ajutorul fosfolipidului 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine Rhodamine B sulfonyl) (ammonium

salt) (Rhodamină-PE) în concentrație de 1 mol%. În vederea direcționării specifice a liposomilor cationici către endoteliul activat al valvei aortice, s-a realizat cuplarea peptidei liniare cu secvența NH₂-CKKKKLVSVLDLEPLDAAWL-COOH, care prezintă afinitate pentru P-selectina (Psel-Lipo) la suprafața liposomilor folosind procedul descris în exemplul 2. Drept control, pentru a se evidenția specificitatea legării, s-au folosit liposomi cationici care prezintă pe suprafață o peptidă ce conține aceeași amioacizi ca și peptida de legare la P-selectină, dar într-o secvență aleatorie sau "scrambled" (NH₂-CKKKKLLSAVLWDELVDPLA-COOH), denumite Scr-Lipo. Ulterior, au fost formate lipoplexe prin complexarea liposomilor cationici cu un plasmid shRNA control. Șoarecii ApoE-deficienți aflați sub dieta hiperlipidemică (care cuprinde 1% colesterol și 10% unt) timp de 4 săptămâni au fost anesteziați cu ketamină/xilazină (100 mg/kg ketamină, 10 mg/kg xilazină diluate în 0,9 % NaCl, administrată intraperitoneal), iar lipoplexe marcate fluorescent cu Rhodamină-PE, direcționate către P-selectină (Psel-Lipo/shARN sau ne-direcționate (Scr-Lipo/shARN) au fost injectate intravenos (retro-orbital) și lăsate să circule în sânge timp de o oră, înaintea investigării imagistice. Apoi, șoarecii au fost anesteziați din nou, și vasculatura a fost spălată folosind o pompa peristaltică (rata de infuzie 2.5 ml/min), prin injectarea 5% EDTA/PBS în ventriculul stâng. Valvele aortice au fost apoi excizate și a fost citită fluorescența cu ajutorul unui aparat IVIS Imaging System 200 (Caliper Life Sciences), folosind lungimile de undă $\lambda_{ex}=535$ nm/ $\lambda_{em}=620$ nm. Pentru realizarea separării spectrale și a discrimina între autofluorescența țesutului și fluorescența dată de fluoroforul Rhodamina B a fost realizată citirea probelor la mai multe lungimi de undă de emisie în jurul maximului de emisie de 620nm, respectiv la 640 nm, 660 nm și 680 nm. În Figura 12 A sunt redată valve aortice reprezentative provenite de la șoareci ApoE-deficienți cărora li s-au administrat tampon fosfat salin (a), lipoplexe ne-țintite Scr-lipo/shRNA (b) sau lipoplexe țintite Psel-Lipo/shRNA (c), marcate fluorescent cu Rhodamină-PE. Se poate observa o fluorescență crescută (de aproximativ 2.5 ori) în cazul administrării lipoplexelor direcționate către P-selectina (Psel-lipo/shRNA) (c) comparativ cu lipoplexele ne-direcționate (Scr-lipo/shRNA) (b). Efectuând separarea spectrală se poate discrimina între autofluorescența țesutului (verde) și fluorescența dată de Rhodamina B (roșu) (Figura 12 B). Această analiză indică foarte clar o acumulare specifică a lipoplexelor Psel-Lipo/shARN (c) în valva aortică a șoarecilor ApoE-deficienți comparativ cu lipoplexele ne-direcționate Scr-Lipo/shARN (b).

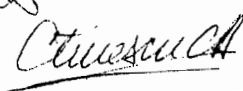
Am GCU An X ~~800~~
Chiriacu
In clu

Tabel 1. Compoziția în fosfolipide a celor 6 formule de liposomi cationici:

<i>Cod</i>	<i>Compoziție liposomi</i>
C1	DOTAP: colesterol: DOPE: Mal-PEG-DSPE (50: 35: 14: 1 mol %)
C2	DOTMA: colesterol: DOPE: Mal-PEG-DSPE -DSPE (50: 35: 14: 1 mol %)
C3	MVL5: POPC: DOPE: Mal-PEG-DSPE (50: 35: 14: 1 mol %)
C4	DDAB: DOPC: DOPE: Mal-PEG-DSPE (50: 35: 14: 1 mol %)
C5	DC-chol: DOPC: DOPE: Mal-PEG-DSPE (50: 35: 14: 1 mol %)
C6	DOTAP: DOPC: DOPE: PHC: Mal-PEG-DSPE (50: 35: 7: 7 : 1 mol %)

Notații:**DOTAP:** 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane;**DOTMA:** 1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane (DOTMA);**MVL5:** N1-[2-((1S)-1-[(3-aminopropyl)amino]-4-[di(3-amino-propyl)amino]butylcarboxamido)ethyl]-3,4-di[oleyloxy]-benzamide;**POPC:** 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine;**DDAB:** Dimethyldioctadecylammonium;**DC-Chol:** 3β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbonyl] cholesterol hydrochloride;**DOPC:** 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine;**DOPE:** 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine;**PHC:** N-palmitoyl homocysteine (PHC);**Mal-PEG-DSPE:** 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethylene glycol)-2000] (Mal-PEG-DSPE).







Revendicări:

1. **Procedeu de obținere a nanocărmășilor utilizați pentru vectorizarea acidului ribonucleic (ARN) de interferență și livrarea țintită la celulele valvei aortice, caracterizat prin aceea că permite obținerea unor formule de liposomi cationici țintiți, direcționați specific către molecule țintă prin cuplarea la suprafața lor de liganzi de tipul, anticopi, fragmente de anticorp sau peptide, complexați cu secvențe siARN/shARN, care vor fi folosiți drept vectori non-virali pentru livrarea ARNi la celulele valvulare. Într-o prima etapă se obțin liposomi cationici, într-o a doua etapă are loc cuplarea liganzilor la suprafața liposomilor cationici, într-o a treia etapă are loc formarea lipoplexelor, într-o a patra etapă caracterizarea liposomilor cationici și a lipoplexelor, o altă etapă presupune urmărirea viabilității celulelor valvulare incubate cu lipoplexe, o alta etapă presupune determinarea eficienței de transfecție a lipoplexelor, urmează evaluarea eficienței de direcționare a lipoplexelor la țintă.**
2. **Procedeu de obținere a nanocărmășilor utilizați pentru vectorizarea acidului ribonucleic (ARN) de interferență și livrarea țintită la celulele valvei aortice, conform cu revendicarea 1, caracterizat prin aceea că formulele de liposomi vor include următoarele componente de bază: un fosfolipid încărcat pozitiv de tipul, DOTAP : 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane; DOTMA : 1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane; MVL5 : N1-[2-((1S)-1-[(3-aminopropyl)amino]-4-[di(3-amino-propyl)amino] butylcarboxamido)ethyl]-3,4-di[oleyloxy] -benzamide; DDAB: dimethyl-dioctadecyl-ammonium; DC-Chol: 3β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl] cholesterol hydrochloride, în proporție de 35-55 moli%, optim fiind în proporție de 50 moli%, care va fi combinat cu un fosfolipid neutru, sensibil la pH de tipul (1,2-Dioleoyl-sn- Glycero-3-Phosphoethanolamine (DOPE) și palmitoyl homocysteine (PHC) în proporție de 7-14 moli %, optim fiind 14 moli%, combinat cu colesterol sau POPC: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine sau DOPC: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine în proporție de 30-40 moli%, optim fiind în proporție de 35 moli% și combinat cu un derivat fosfolipidic cu polietilen glicol (1, 2 - distearoyl - sn - glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide (polyethylene glycol)-2000]; Mal-PEG-DSPE, în proporție de 0,5-5 moli%, optim fiind în proporție de 1 mol%.**
3. **Procedeu de obținere a nanocărmășilor utilizați pentru vectorizarea acidului ribonucleic (ARN) de interferență și livrarea țintită la celulele valvei aortice, conform cu revendicările 1-3, caracterizat prin aceea că derivații fosfolipidici de polietilenglicol (PEG) funcționalizați cu maleimida (Mal-PEG-DSPE) sunt utilizați pentru a putea fi folosiți ulterior drept ancoră membranară pentru cuplarea liganzilor specifici în vederea obținerii unui transport direcționat către valva aortică disfuncțională și pentru asigurarea unor timpi îndelungați de circulație în sânge a liposomilor după injectarea**

intravenoasă a acestora, fapt ce duce la creșterea capacității de direcționare a liposomilor la celula țintă.

4. **Procedeu de obținere a nanocărbușilor utilizați pentru vectorizarea acidului ribonucleic (ARN) de interferență și livrarea țintită la celulele valvei aortice, conform cu revendicările 1-3, caracterizat prin aceea că** pentru realizarea unui transport direcționat către valva aortică bolnavă, liganzi specifici, cum ar fi peptide precum și anticorpi sau fragmente de anticorpi cu afinitate pentru anumite proteine membranare sunt conjugați la capătul terminal al derivaților Mal-PEG-DSPE, pe suprafața liposomilor cationici, pentru a recunoaște proteine țintă care sunt expuse pe suprafața celulelor endoteliale valvulare activate, de tipul moleculelor de adeziune celulară VCAM-1 și P-selectina sau al componentelor matricei extracelulare identificate și validate ca fiind relevante pentru boala valvei aortice de tipul colagenului de tip I și IV.
5. **Procedeu de obținere a nanocărbușilor utilizați pentru vectorizarea acidului ribonucleic (ARN) de interferență și livrarea țintită la celulele valvei aortice, conform cu revendicările 1-4, caracterizat prin aceea că,** peptide cu afinitate pentru proteinele țintă vor fi cuplate la suprafața liposomilor cationici pentru recunoașterea și pentru direcționarea liposomilor cationici, cărbuși de siARN/shARN la valva aortică; peptide liniare care să conțină, de preferat, următoarele secvențe de aminoacizi VHPKQHR pentru recunoașterea VCAM-1 sau LVSVDLEPLDAAWL pentru recunoașterea P-selectinei.
6. **Procedeu de obținere a nanocărbușilor utilizați pentru vectorizarea acidului ribonucleic (ARN) de interferență și livrarea țintită la celulele valvei aortice, conform cu revendicările 1-5, caracterizat prin aceea că,** secvențe duplex siARN sau shARN, în care molecula de ARN artificial cu o buclă strânsă, care determină în celule sintetiza de ARN scurt de interferență (siARN) subsecvent transfecției celulelor cu un vector plasmidian shARN, vor fi proiectate pentru a scinda specific ARN-ul mesager al unor proteine relevante pentru apariția și dezvoltarea bolii valvei aortice și anume moleculele/căile implicate în modificările fenotipice ale VEC și VIC, considerate relevante pentru stadiile incipiente și progresia bolii valvei precum Runx2, osteopontina, MMP-2, MMP-9, Smad2/3, Snail1, Twist 1, kinaza 1 asociată cu Rho (ROCK1), factorul de răspuns al serului (SRF), proteina 2 care conține domeniul de oligomerizare legat de nucleotide (NOD2), endotelina 1 (ET-1), p38 MAPK, ERK, Akt1.
7. **Procedeu de obținere a nanocărbușilor utilizați pentru vectorizarea acidului ribonucleic (ARN) de interferență și livrarea țintită la celulele valvei aortice, conform cu revendicările 1-6, caracterizat prin aceea că,** liposomii cationici și lipoplexele obținute prin complexarea acestora cu siARN sau shARN au fost caracterizați prin determinarea distribuției dimensiunilor și a potențialului Zeta (folosind metoda de împrăștiere dinamică a luminii laser, DLS), a morfologiei (cu ajutorul microscopiei electronice de transmisie, TEM), a capacității de complexare a acizilor nucleici de către liposomii cationici (prin analiza mobilității electroforetice) și prin investigarea citotoxicității și eficienței de transfecție a acizilor nucleici în VEC și VIC, a eficienței de silențiere a unei

gene țintă în celule endoteliale și a capacității de direcționare către valva aortică.

8. **Procedeu de obținere a nanocărmășilor utilizați pentru vectorizarea acidului ribonucleic (ARN) de interferență și livrarea țintită la celulele valvei aortice, conform cu revendicările 1-7, caracterizat prin aceea că** pentru prepararea liposomilor cationici, fosfolipidele au fost dizolvate în cloroform sau într-un amestec de cloroform: metanol (9:1) și au fost combinate în raporturile molare indicate, solventul organic a fost evaporat la presiune scăzută până când s-a obținut un film lipidic subțire, care a fost apoi hidratat cu apă pură de biologie moleculară (fără RNA-aze) astfel încât concentrația finală de lipid cationic să fie de 10 mM; prin vortexarea amestecului s-au obținut vezicule multilamelare; pentru obținerea liposomilor unilamelari, preparatul de vezicule multilamelare a fost apoi filtrat prin trecerea consecutivă de 10 ori prin fiecare membrană polycarbonat cu dimensiunea porilor de 200 nm, 100 nm și 50 nm, iar pentru etichetarea fluorescentă a bistraturilor lipidice ale liposomilor s-a adăugat 1 mol% 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine Rhodamine B sulfonyl) (ammonium salt) (Rhodamină-PE) ca soluție etanolică după prepararea liposomilor.

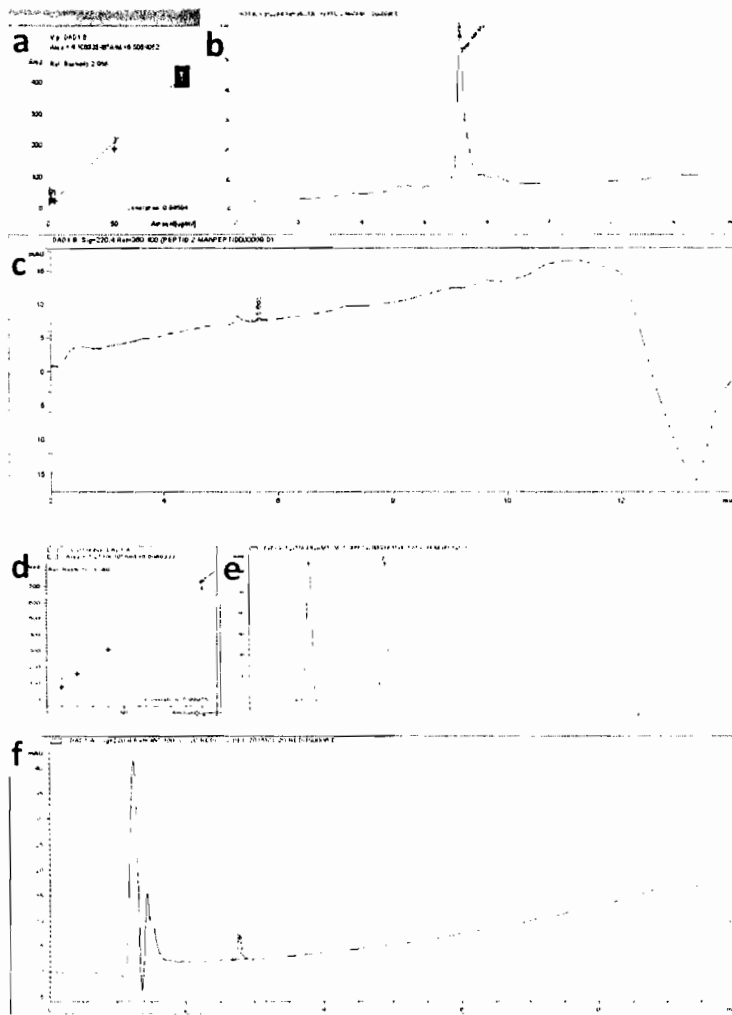


Figura 2.

Anbu 24/8/2018
Chandrasekhar
25
S. S. S.

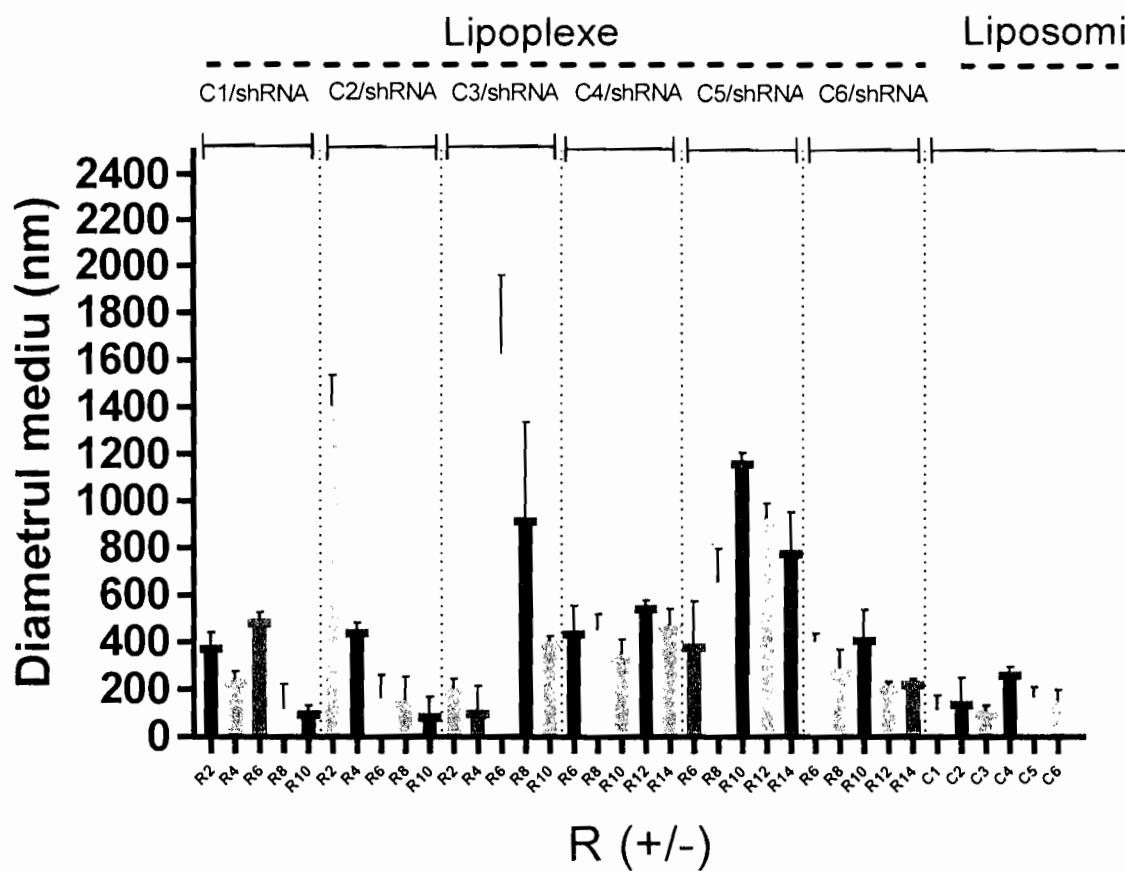


Figura 3.

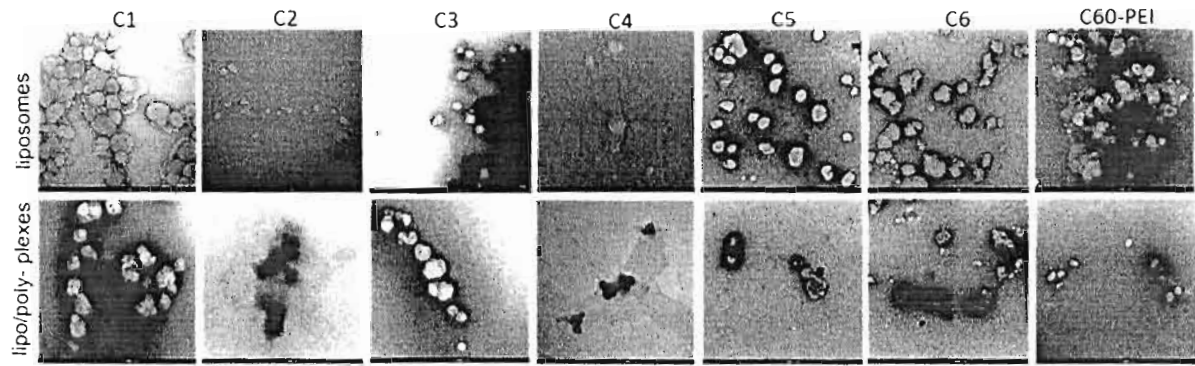


Figura 5.

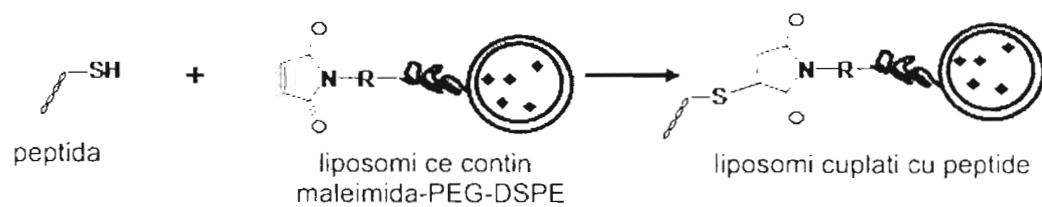


Figura 1.

26/10/2018

Chiriac

Stela

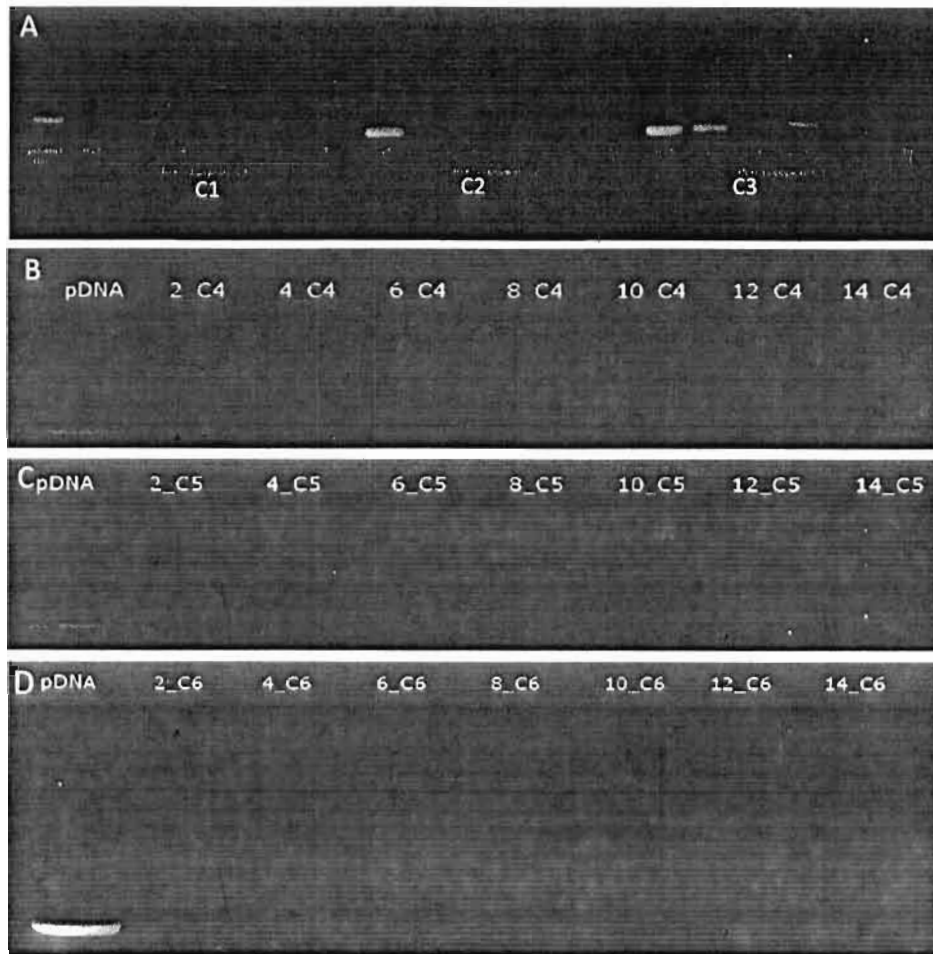


Figura 6.

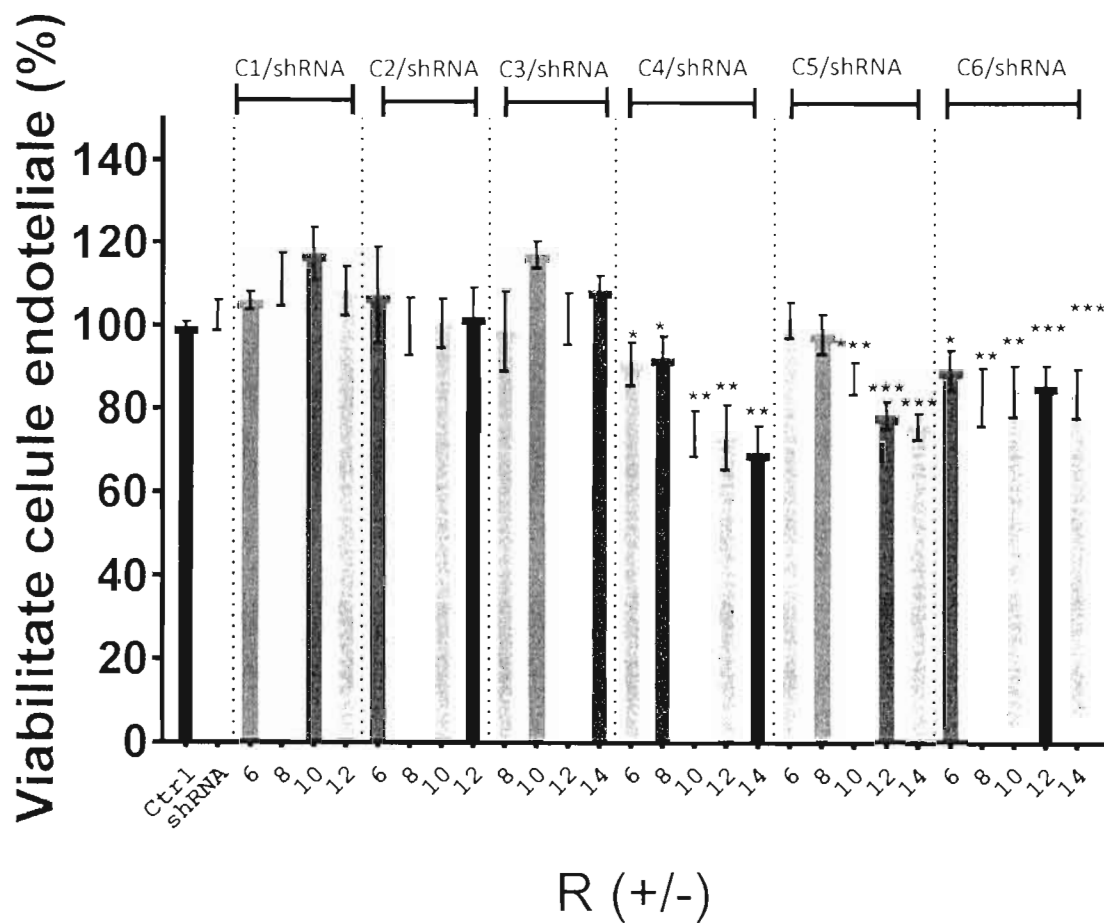


Figura 7.

M. G. B.

L. M.

D.

C. H. B.

C. H. B.

C. H. B.

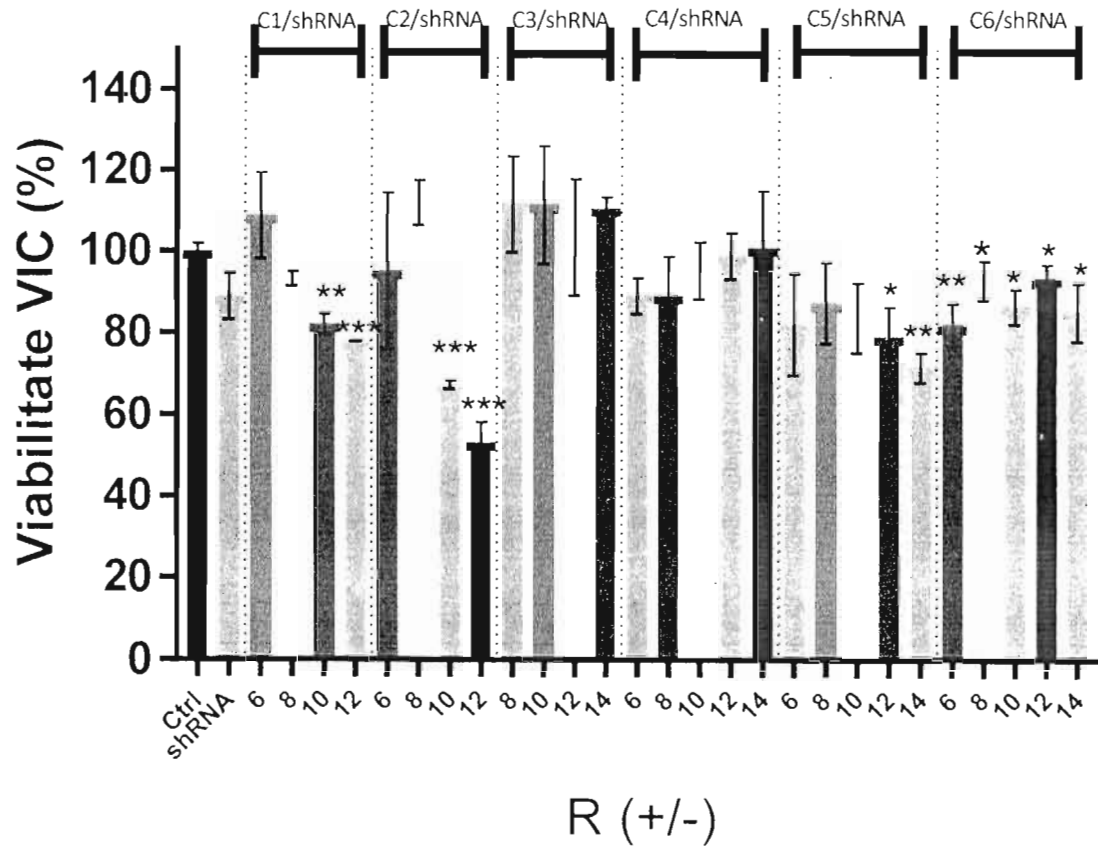


Figura 8.

An. G. B. L. *[Signature]* *[Signature]* 31
[Signature] *[Signature]*

74

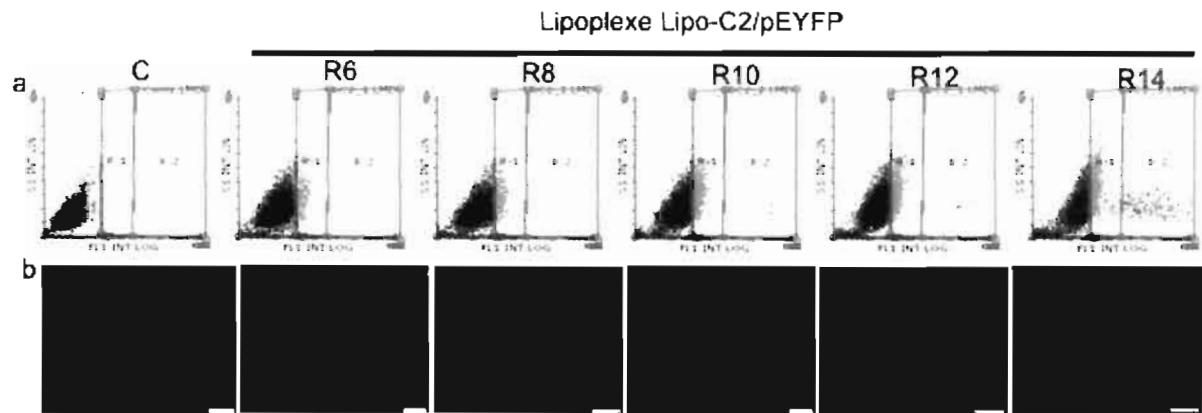


Figura 9.

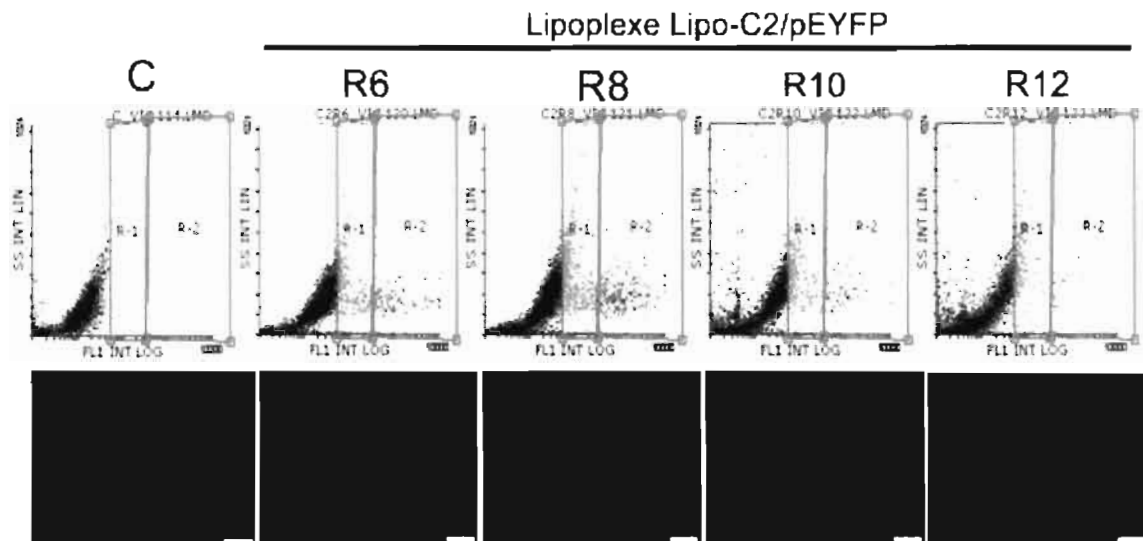


Figura 10.

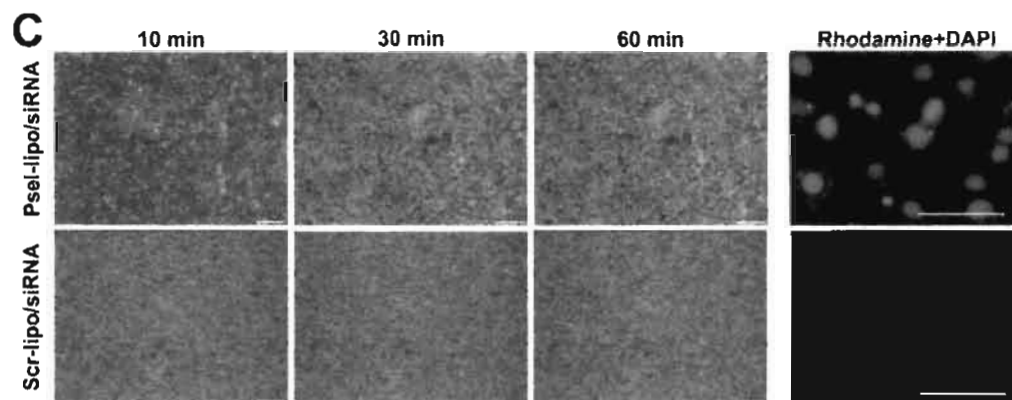
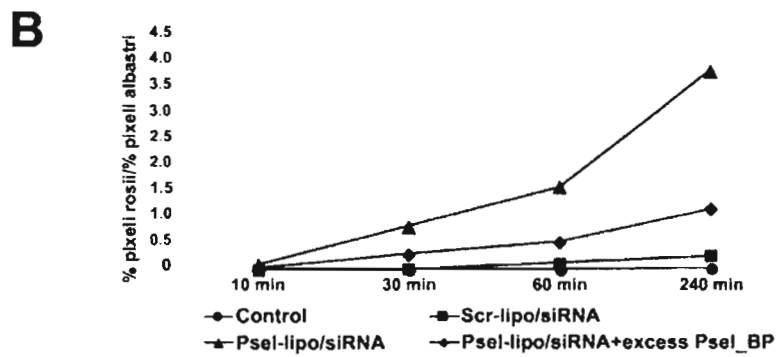
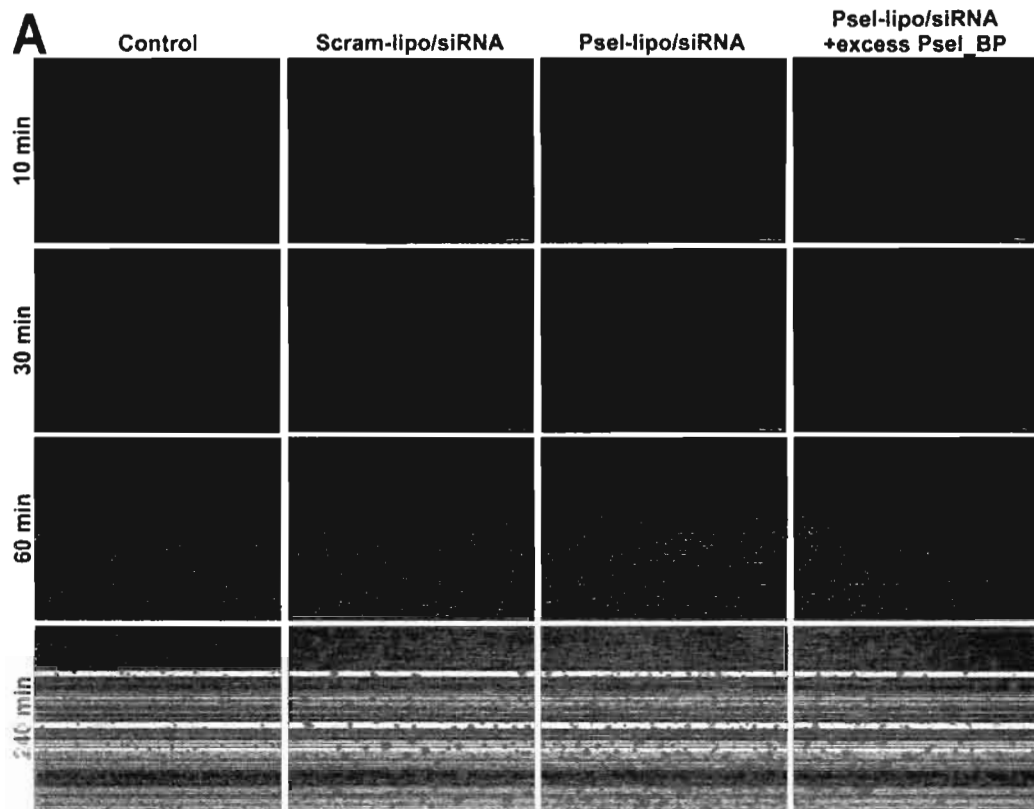


Figura 11.

74

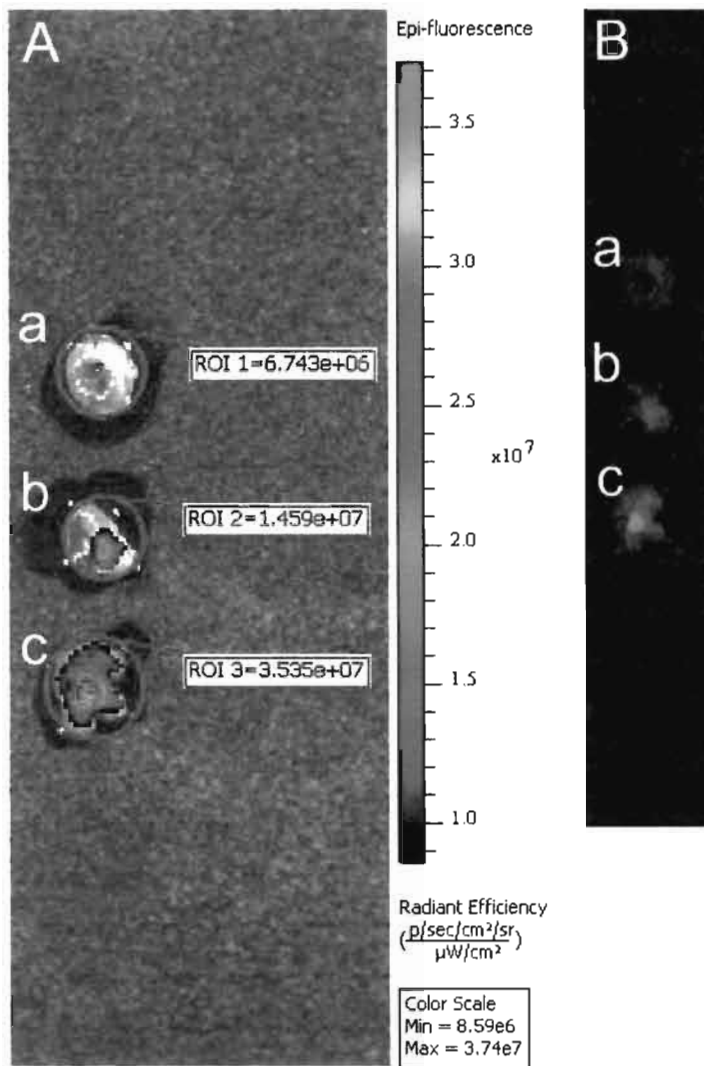


Figura 12.