

ACADEMIA ROMÂNĂ
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”
Domeniul CHIMIE

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**NOI ABORDĂRI PENTRU DEZVOLTAREA DE
NANOSISTEME POLIMERICE FUNCȚIONALIZATE CU
APLICAȚII ÎN NANOMEDICINĂ**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
C.S. I, Dr. Mariana PINTEALĂ

STUDENT-DOCTORAND:
Răzvan GHIARASIM

Academia Română
Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”

Doamnei/Domnului.....

Vă facem cunoscut faptul că în ziua de **9 aprilie 2024**, ora **11:00**, în **Sala de Conferințe a Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”**, Iași, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat *„Noi abordări pentru dezvoltarea de nanosisteme polimerice funcționalizate cu aplicații în nanomedicină”*, autor **Răzvan Ghiarasim**, în vederea conferirii titlului științific de doctor.

PREȘEDINTE:

CSI Dr. Valeria Harabagiu

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

CSI Dr. Mariana Pinteală

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași

REFERENȚI:

Prof. Dr. Adrian Covic

Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Iași

Prof. Dr. Ionel Mangalagiu

Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași

Dr. Habil. Marcela Mihai

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, Iași

În conformitate cu Regulamentul privind organizarea și desfășurarea doctoratului pentru acordarea titlurilor științifice în Academia Română, vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica aprecierile și observațiile dumneavoastră. Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

Director,

Dr. Valeria Harabagiu

Mulțumiri

Această teză de doctorat marchează încheierea unei etape semnificative în evoluția mea profesională, și cu această ocazie, doresc să exprim recunoștința mea sinceră față de persoanele care m-au călăuzit, sprijinit și îndrumat pe parcursul anilor de studii doctorale, contribuind astfel la elaborarea și finalizarea acestei teze de doctorat.

*Cele mai sincere și profunde mulțumiri doamnei **C.S. I Dr. Mariana Pinteală** pentru oportunitatea de a face parte dintr-un colectiv și laborator excepțional, care au reprezentat mediul propice pentru realizarea cercetării științifice și au contribuit în mod semnificativ la evoluția mea personală. Îi sunt recunoscător pentru îndrumarea și sprijinul constant acordat pe durata acestei perioade. Rezultatul acestei colaborări remarcabile se reflectă în prezenta teză de doctorat.*

*Aș dori să exprim recunoștințe deosebite domnului **C.S. II Dr. Alexandru Rotaru** pentru răbdarea și perseverența exemplare manifestate în îndrumarea mea ca tânăr cercetător, precum și pentru sprijinul generos acordat pe întreaga durată a elaborării și finalizării tezei de doctorat.*

*Mulțumiri deosebite colegilor din **IntelCentru** pentru contribuțiile lor directe la elaborarea acestei teze. De asemenea, doresc să exprim aprecierea mea colegilor din departamentele **Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”** care au avut contribuții semnificative în realizarea analizelor fizico-chimice necesare pe parcursul stagiului meu de doctorat.*

*Doresc să adresez sincere mulțumiri **Academiei Române și Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”** pentru oportunitatea de a desfășura stagiul de doctorat în cadrul institutului și pentru accesul la infrastructura sa, care au fost esențiale în atingerea cu succes a tuturor obiectivelor propuse.*

*Doresc să exprim recunoștința mea față de proiectele „**ModNanoMPol**” PN-III-P1-1.1-TE-2019-0922 și „**NanoHER2Restore**” EEA-RO-NO-2018-0246, pentru sprijinul financiar acordat în perioada studiilor doctorale.*

*Nu în ultimul rând, doresc să le mulțumesc **familiei mele** pentru tot sprijinul moral și financiar acordat în ultimii ani.*

Vă mulțumesc!

Student-doctorand Răzvan Ghiarasim

CUPRINS

LISTĂ DE ABREVIERI	1
INTRODUCERE	2
PARTEA I - Stadiul actual al cercetărilor - studiu de literatură	6
CAPITOLUL I - Nanoparticule folosite în terapia cancerului	6
I.1. Noțiuni generale despre nanoparticulele utilizate în terapia cancerului.....	7
I.2. Nanoparticule organice.....	8
I.2.1. Lipozomi.....	8
I.2.2. Micele.....	11
I.2.3. Dendrimeri.....	19
I.3. Nanoparticule anorganice.....	21
I.3.1. Nanoparticule de oxid de fier.....	21
I.3.2. Nanoparticule de aur.....	26
I.3.3. Nanoparticule de siliciu.....	29
I.3.4. Nanoparticule de tip Quantum dots.....	32
I.4. Nanoparticule pe bază de carbon.....	35
I.5. Concluzii.....	37
PARTEA a II-a - Contribuții personale	39
CAPITOLUL II - Nanoparticule magnetice decorate cu polimeri de tip metacrilat funcționalizați cu molecule bioactive	39
II.1. Motivarea și obiectivele studiului aferent capitolului II	39
II.1.1. Obiective științifice specifice.....	39
II.1.2. Motivarea alegerii nanoparticulelor magnetice și a polimerilor de tip metacrilat.....	40
II.2. Rezultate și discuții	42
II.2.1. Nanoparticule magnetice decorate cu lanțuri de PHEMA funcționalizate cu acid folic.....	42
II.2.1.1. Motivarea alegerii polimerului PHEMA și a acidului folic.....	42
II.2.1.2. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor magnetice decorate cu lanțuri de PHEMA funcționalizate cu acid folic.....	44
II.2.1.3. Teste <i>in vitro</i> de evaluare a citotoxicității nanoparticulelor pe liniile celulare NHDF, MCF-7, HeLa și, respectiv, HepG2 prin testul MTS.....	57
II.2.1.4. Absorbția celulară a nanoparticulelor.....	58
II.2.1.5. Concluzii.....	63
II.2.2. Nanoparticule magnetice decorate cu trei polimeri de tip metacrilat și funcționalizați cu metotrexat.....	64
II.2.2.1. Motivarea alegerii polimerilor de tip metacrilat și a metotrexatului.....	64
II.2.2.2. Sinteza prin mecanism de polimerizare SI-ATRP și caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor magnetice decorate cu PHEMA, PPEGMA6 și PPEGMA10 și funcționalizare post-polimerizare cu metotrexat (NPM-PHEMA-MTX, NPM-PPEGMA6-MTX și NPM-PPEGMA10-MTX).....	65
II.2.2.3. Testele <i>in vitro</i> de evaluare a citotoxicității nanoparticulelor pe liniile celulare HGF și MCF-7 prin testul CellTiter-Glo®.....	80
II.2.2.4. Concluzii.....	81

II.3. Materiale și metode.....	82
II.3.1. Materiale.....	82
II.3.2. Metode.....	84
II.3.2.1. Sinteza nanoparticulelor magnetice nefuncționalizate (NPM-OH).....	84
II.3.2.2. Sinteza inițiatorului de polimerizare de tip ATRP.....	84
II.3.2.3. Decorarea nanoparticulelor magnetice nemodificate cu inițiatorul de tip ATRP (NPM-I).....	85
II.3.2.4. Polimerizarea monomerilor HEMA, PEGMA6 și PEGMA10 prin SI-ATRP (NPM-PHEMA-OH, NPM-PPEGMA6-OH, NPM-PPEGMA10-OH).....	85
II.3.2.5. Funcționalizarea polimerilor crescuți de pe suprafața nanoparticulelor cu FA (NPM-PHEMA-FA1 și NPM-PHEMA-FA2) și MTX (NPM-PHEMA-MTX, NPM-PPEGMA6-MTX, NPM-PPEGMA10-MTX).....	86
II.3.2.6. Spectroscopia Raman.....	87
II.3.2.7. Difrakția cu raze X.....	87
II.3.2.8. Rezonanța magnetică nucleară (RMN).....	87
II.3.2.9. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR).....	87
II.3.2.10. Spectroscopia în domeniul ultraviolet-vizibil (UV-Vis).....	87
II.3.2.11. Analiza termogravimetrică (TGA).....	88
II.3.2.12. Calorimetria cu scanare diferențială (DSC).....	88
II.3.2.13. Măsurarea proprietăților magnetice (VSM).....	88
II.3.2.14. Diametrele hidrodinamice (Dh) și potențialele zeta (ζ).....	88
II.3.2.15. Analiza morfologică prin microscopie electronică (TEM și STEM).....	89
II.3.2.16. Determinarea viabilității celulare.....	90
II.3.2.17. Cuantificarea fierului intracelular.....	91
II.3.2.18. Analize statistice în cazul determinării viabilității celulare și a fierului intracelular.....	92
II.3.2.19. Studii de imagistică prin rezonanță magnetică.....	92
CAPITOLUL III - Micele pe bază de polimeri biocompatibili pentru dezvoltarea de noi abordări în tratamentul eficient al cancerului mamar.....	94
III.1. Motivarea și obiectivele studiului aferent capitolului III.....	94
III.1.1. Obiective științifice specifice.....	94
III.1.2. Motivarea pentru utilizarea copolimerilor dibloc polietilenglicol-polihistidină.....	95
III.2. Rezultate și discuții.....	97
III.2.1. Proiectarea, sinteza și asamblarea copolimerilor PEG-PHis în micle în absența sau prezența unui medicament antitumoral.....	97
III.2.1.1. Determinarea concentrațiilor critice micelare ale copolimerilor mPEG-2000-Mal-Cis-(His)20-Lis, mPEG-2000-Mal-Cis-(His)26-Lis și, respectiv, mPEG-2000-Mal-Cis-(His)32-Lis.....	99
III.2.1.2. Caracterizarea fizico-chimică a micelilor neîncărcate și a celor încărcate cu doxorubicină.....	102
III.2.1.3. Studiu de eliberare a doxorubicinei declanșată de variația pH-ului din miclele pe bază de PEG2K-PHis20+DOX, PEG2K-PHis26+DOX și PEG2K-PHis32+DOX.....	108
III.2.1.4. Studii <i>in vitro</i> pe linia celulară tumorală MDA-MB-231.....	111
III.2.1.5. Concluzii.....	116
III.2.2. Funcționalizarea micelilor de tip PEG-PHis cu trastuzumab.....	117

III.2.2.1. Motivarea pentru utilizarea anticorpului monoclonal trastuzumab.....	117
III.2.2.2. Obținerea și caracterizarea fizico-chimică a micelilor funcționalizate cu trastuzumab.....	119
III.2.2.3. Studii de stabilitate a micelilor în prezență de albumină serică bovină (BSA).....	125
III.2.2.4. Testul <i>in vitro</i> de evaluare a viabilității celulare a micelilor pe fibroblaste gingivale umane (HGF).....	127
III.2.2.5. Evaluarea activității biologice <i>in vitro</i> (72 de ore), pe celule tumorale specifice cancerului mamar în culturi de celule 2D.....	128
III.2.2.6. Evaluarea activității biologice <i>in vitro</i> la 72 de ore, pe celule tumorale specifice cancerului mamar în culturi de celule 3D.....	130
III.2.2.7. Concluzii.....	134
III.3. Materiale și metode.....	135
III.3.1. Materiale.....	135
III.3.2. Metode.....	136
III.3.2.1. Determinarea concentrațiilor critice micelare (CCM) ale copolimerilor (mPEG-2000-Mal-Cis-(His)20-Lis, mPEG-2000-Mal-Cis-(His)26-Lis, mPEG-2000-Mal-Cis-(His)32-Lis).....	136
III.3.2.2. Asamblarea copolimerilor (mPEG-2000-Mal-Cis-(His)20-Lis, mPEG-2000-Mal-Cis-(His)26-Lis, mPEG-2000-Mal-Cis-(His)32-Lis) în micelile neîncărcate și micelile încărcate cu DOX (doxorubicină).....	137
III.3.2.3. Eficiența de încapsulare (EE) și încărcarea medicamentului (DL).....	137
III.3.2.4. Studii de eliberare a doxorubicinei <i>in vitro</i> dependente de pH.....	138
III.3.2.5. Funcționalizarea copolimerului H2N-PEG-2000-Mal-Cis-(His)32 cu Sulfo-SMCC.....	138
III.3.2.6. Tiolarea trastuzumabului comercial (Tzm-NH ₂) cu reactivul Traut.....	139
III.3.2.7. Cuantificarea grupărilor tiol (-SH) din trastuzumabul tiolat (Tzm-SH) folosind agentul Ellman....	139
III.3.2.8. Asamblarea copolimerilor H2N-PEG-2000-Mal-Cis-(His)32 și Linker-PEG-2000-Mal-Cis-(His)32 în micelile și funcționalizarea cu trastuzumab.....	140
III.3.2.9. Studii de stabilitate ale micelilor în prezența albuminei serice bovine (BSA) la 37 °C.....	140
III.3.2.10. Titrarea potențiometrică.....	140
III.3.2.11. Diametrele hidrodinamice (D _h) și potențialele zeta (ζ).....	141
III.3.2.12. Nanoparticles tracking analysis (NTA).....	141
III.3.2.13. Spectroscopia de fluorescență.....	141
III.3.2.14. Spectroscopia în domeniul ultraviolet-vizibil (UV-Vis).....	142
III.3.2.15. Analiza morfologică prin microscopia electronică de transmisie cu baleiaj (STEM).....	142
III.3.2.16. Studiile <i>in vitro</i>	142
CONCLUZII GENERALE.....	144
DISEMINAREA REZULTATELOR.....	149
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE.....	153

INTRODUCERE

Potrivit Institutului pentru Măsurarea și Evaluarea Sănătății (IHME), cancerul în prezent reprezintă cea mai mare problemă de sănătate la nivel global, provocând unu din șase decese din întreaga lume. Tratamentele convenționale pentru cancer, precum intervenția chirurgicală, radioterapia și chimioterapia, au limitări în prezent, existând riscul de a provoca daune în țesuturile sănătoase sau de a nu asigura eradicarea completă a tumorilor (Arruebo et al., 2011). Cercetarea în domeniul terapiei cancerului cu ajutorul nanotehnologiei merge dincolo de simpla livrare a medicamentelor, fiind extinsă spre dezvoltarea unor noi tratamente doar prin intermediul caracteristicilor nanomaterialelor în sine. În primul rând, anumite proprietăți fizice ale nanoparticulelor, cum ar fi absorbția și re-emisia energiei, pot fi utilizate pentru a afecta țesuturile bolnave, așa cum se poate observa în aplicațiile ablației cu laser (Schena, Saccomandi and Fong, 2017) și hipertermia (Crezee, Franken and Oei, 2021). În al doilea rând, nanoparticulele prezintă dimensiuni suficient de mici (de ordinul zecilor de nanometri) pentru a se acumula în zonele tumorale, dar suficient de mari pentru a putea încărca în interiorul acestora numeroși compuși terapeutici, precum radionuclizi (Poletto et al., 2022) sau molecule biologice active (Jahangirian et al., 2019). În al treilea rând, suprafața generoasă a acestor nanoparticule poate fi funcționalizată cu liganzi, precum lanțuri de ADN (Singh et al., 2020), ARN, peptide (Sharma et al., 2022) sau anticorpi (Marega et al., 2012), care pot ghida activ nanoparticulele în organism. Aceste proprietăți ale nanoparticulelor facilitează livrarea eficientă a medicamentelor și duc la îmbunătățirea terapiilor multimodale și teranostice.

Pornind de la faptul că nanomedicina reprezintă o direcție promițătoare pentru inovare în domeniul medical, în special în tratamentul cancerului, teza de doctorat prezentă, intitulată „**Noi abordări pentru dezvoltarea de nanosisteme polimerice funcționalizate cu aplicații în nanomedicină**”, a urmărit obținerea, caracterizarea fizico-chimică și demonstrarea aplicabilității în tratamentul cancerului a două tipuri de nanosisteme chimice sintetice bazate pe polimeri biocompatibili, care ulterior au fost funcționalizați cu diferite molecule biologice active, atât compuși mici moleculari, cât și proteine.

Teza este împărțită în două părți bine formulate, fiecare evidențiind obiective specifice. **Prima parte** a tezei se axează pe **Capitolul I**, unde este prezentat un studiu de literatură referitor la nanoparticule utilizate în terapia cancerului, atât cele aprobate de Administrația pentru Alimente și Medicamente (FDA) și Agenția Europeană pentru Medicamente (EMA), cât și cele în stadii de aprobare.

Partea a doua a acestei teze (**Capitolul II** și **III**) se bazează pe contribuțiile personale rezultate prin dezvoltarea a două tipuri de nanosisteme (nanoparticule magnetice și miclele copolimerice) cu aplicații în terapia cancerului. Fiecare capitol începe cu prezentarea obiectivelor specifice, motivarea alegerii sistemelor studiate, caracterizarea fizico-chimică, aplicații *in vitro* și concluziile rezultate din datele experimentale proprii.

Capitolul II cuprinde două subcapitole care prezintă două studii bazate pe dezvoltarea de nanoparticule magnetice decorate cu polimeri de tip metacrilat și ulterior funcționalizate cu molecule biologice active cu masă moleculară mică (acid folic și metotrexat).

În **subcapitolul II.2** este descrisă sinteza nanoparticulelor magnetice prin metoda coprecipitării, urmată de funcționalizarea acestora cu un inițiator de polimerizare specific polimerizării radicalice cu transfer de atom (ATRP). Inițiatorul a permis polimerizarea monomerului 2-hidroxiethyl metacrilat (HEMA), prin mecanism de polimerizare radicalică cu transfer de atom inițiată de pe suprafață (SI-ATRP), rezultând lanțuri polimerice de poli(2-hidroxiethyl metacrilat) (PHEMA) grefate pe suprafața nanoparticulelor magnetice. După această etapă, lanțurile de PHEMA au fost funcționalizate cu acid folic (FA), care reprezintă unitatea de țintire a celulelor tumorale. Prin acest procedeu s-au obținut două tipuri de nanoparticule magnetice decorate cu lanțuri de PHEMA funcționalizate cu diferite concentrații de FA. Toate etapele de sinteză ale acestui studiu, inclusiv sinteza nanoparticulelor nefuncționalizate, a celor cu inițiator de polimerizare pe suprafață, a celor cu polimeri și a nanoparticulelor decorate ulterior cu polimeri funcționalizați cu FA, au fost caracterizate utilizând diferite tehnici fizico-chimice, cum ar fi FTIR, TGA/DTG, DSC, TEM, STEM și DLS. Concentrația de FA a fost cuantificată prin spectroscopia UV-Vis, utilizând metoda curbei de calibrare.

Viabilitatea celulară a nanoparticulelor a fost evaluată pe fibroblaste dermice umane normale (NHDF) și trei linii celulare tumorale (MCF-7, HeLa și HepG2). Rezultatele obținute au indicat că nanoparticulele sintetizate sunt biocompatibile pe toate cele patru linii celulare. Diferența notabilă între aceste linii celulare a constat în faptul că nanoparticulele funcționalizate cu FA au fost internalizate într-o concentrație mai mare de către celulele tumorale, datorită supraexprimării receptorilor de folat la suprafața acestora comparativ cu celulele normale. Acest rezultat a fost confirmat prin măsurarea concentrației de fier intracelular după incubarea celulelor cu nanoparticule, folosind metoda tiocianatului. De asemenea, s-a demonstrat că o creștere a concentrației de FA utilizat la funcționalizarea suprafețelor nanoparticulelor a dus la o mai mare internalizare a nanoparticulelor. Această

observație a fost confirmată și prin determinarea concentrației de fier intracelular prin spectrometria de absorbție atomică. În plus, în cadrul acestui studiu, s-a evidențiat utilizarea acestor nanoparticule în imagistica prin rezonanță magnetică.

Subcapitolul II.3 se concentrează pe studiul polimerizării, prin mecanism SI-ATRP, a trei monomeri de tip metacrilat (HEMA, PEGMA6, PEGMA10), utilizând același sistem de nanoparticule decorate cu inițiatorul ATRP din primul studiu al acestui capitol. Acest proces a fost urmat de funcționalizarea lanțurilor de polimeri cu un antimetabolit al acidului folic numit metotrexat (MTX). Ca și în cazul nanoparticulelor obținute în subcapitolul II.2 etapele de sinteză ale acestor nanoparticule au fost caracterizate utilizând diverse tehnici fizico-chimice. Cuantificarea MTX-ului a fost realizată prin spectroscopie UV-Vis, prin intermediul metodei curbei de calibrare. În acest studiu, am ales să utilizăm MTX-ul datorită proprietăților sale, cum ar fi capacitatea de a se lega specific de receptorii de folat și efectul terapeutic prin inhibarea unei enzime implicate în diviziunea celulară. Nanoparticulele funcționalizate cu MTX s-au dovedit a fi biocompatibile pe fibroblaste gingivale umane (HGF), și au prezentat o toxicitate mai crescută pe o linie specifică cancerului mamar (MCF-7), în comparație cu medicamentul liber la aceleași concentrații ale MTX.

Aceste rezultate subliniază versatilitatea grefării de polimeri de tip metacrilat cu diferite mase molare ale unităților monomerice pe o suprafață sferică și impactul lungimii acestor unități asupra funcționalizării cu MTX și a creșterii citotoxicității pe linia celulară tumorală MCF-7.

Capitolul III prezintă două studii de preparare a entităților nanostructurate funcționale, unul bazat pe dezvoltarea unui sistem de tip micelă cu proprietatea de eliberare controlată de medicamente în mediul tumoral extracelular (**subcapitolul III.3**) și cel de al doilea (**subcapitolul III.4**) bazat pe funcționalizarea acestor miclele cu un anticorp monoclonal, care duce la creșterea efectului terapeutic pe linii celulare tumorale specifice cancerului mamar.

Astfel, în **subcapitolul III.3**, au fost obținuți trei copolimeri pe bază de polietilenglicol - polihistidină (PEG-PHis) cu masă moleculară de 2 kDa și trei lungimi diferite ale PHis-ului (20, 26 și 32 de unități monomerice de histidină), aplicând tehnica sinteza peptidelor pe suport solid (SPPS). Pentru acești trei copolimeri s-au determinat concentrațiile critice micelare, prin spectroscopie de fluorescență, utilizând pirenul ca și compus fluorescent model. În prima etapă, copolimerii au fost asamblați în miclele corespunzătoare neîncărcate și încărcate cu doxorubicină (DOX), compus model terapeutic, pentru a pune în evidență faptul că aceste miclele eliberează medicamentul în intervalul de pH al mediului tumoral

extracelular (6,5 - 7,2). Micelele obținute au fost caracterizate dimensional prin DLS și analiza morfologică a fost pusă în evidență prin STEM.

Eliberarea controlată a DOX-ului din micele a fost pusă în evidență prin studii de fluorescență realizate în PBS la trei valori diferite de pH. Testele de viabilitate celulară pe o linie specifică cancerului de sân (MDA-MB-231) au concluzionat faptul că DOX-ul a fost eliberat controlat pe parcursul a 72 de ore și a dus la o scădere controlată a viabilității celulare față de medicamentul liber. În plus, micelele dezvoltate pot elibera medicamentul într-un interval îngust de pH și anume între 7,2 și 6,5, care reprezintă pH-ul mediului tumoral extracelular. Dezvoltarea acestui tip de micele poate ajuta la transportarea și de alte principii active specifice către celulele tumorale și eliberarea acestora pe suprafața celulară unde în cele mai multe cazuri se găsesc receptorii specifici acestor principii.

În [subcapitolul III.4](#) micelele de tip PEG-PHis au fost funcționalizate controlat cu un anticorp monoclonal numit trastuzumab (Tzm), specific pentru inhibarea receptorului glicoproteic transmembranar HER2 implicat în creșterea celulară, supraexprimat în cazul unor celule tumorale specifice cancerului mamar. Astfel, micelele preparate nefuncționalizate și cele funcționalizate cu Tzm au fost analizate din punct de vedere fizico-chimic prin DLS, NTA și STEM. S-a determinat stabilitatea acestora prin expunerea lor la o concentrație de BSA care simulează concentrația totală de proteine din serul uman, astfel cele nefuncționalizate s-au destabilizat complet, pe când cele funcționalizate cu Tzm au rămas stabile pe o perioadă de 72 de ore. Micelele au fost biocompatibile pe linia celulară normală HGF, dar în cazul a trei linii celulare tumorale specifice cancerului de sân (MDA-MB-361, SK-BR-3, BT-474), când Tzm-ul a fost legat covalent de suprafața micelelor, viabilitatea celulară a scăzut semnificativ comparativ cu micelele nefuncționalizate și Tzm-ul liber. Această scădere a fost observată atât în cazul culturile celulare de tip 2D, cât și în cazul celor 3D (sferoizi).

Teza de doctorat se încheie cu o serie de concluzii generale din fiecare studiu realizat, diseminarea rezultatelor în perioada studiilor de doctorat și la final referințele bibliografice aferente tezei.

PARTEA a II-a - Contribuții personale

CAPITOLUL II - Nanoparticule magnetice decorate cu polimeri de tip metacrilat funcționalizați cu molecule bioactive

II.1. Motivarea și obiectivele studiului aferent capitolului II

II.1.1. Obiective științifice specifice:

I. Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor magnetice.

II. Sinteza și caracterizarea unui inițiator de polimerizare de tip ATRP și legarea covalentă a acestuia de suprafața nanoparticulelor magnetice sintetizate în etapa I.

III. Grefarea PHEMA, prin intermediul mecanismului de polimerizare SI-ATRP, utilizând nanoparticule magnetice funcționalizate cu inițiator de polimerizare specific mecanismului ATRP, sintetizate în etapa II.

IV. Funcționalizarea nanoparticulelor obținute în etapa III cu acid folic în diverse concentrații.

V. Realizarea unor studii *in vitro* ale nanoparticulelor magnetice funcționalizate obținute în etapa IV pe fibroblaste dermice normale (NHDF) și linii celulare tumorale (MCF-7, HeLa și HepG2). S-a urmărit evaluarea biocompatibilității, citotoxicității și capacitatea absorbției celulare în funcție de concentrația de acid folic a nanoparticulelor sintetizate. De asemenea, au fost prevăzute și studii de imagistică prin rezonanță magnetică nucleară.

VI. Grefarea a trei polimeri de tip metacrilat prin intermediul mecanismului de polimerizare SI-ATRP, utilizând nanoparticule magnetice funcționalizate cu inițiator de polimerizare specific mecanismului ATRP sintetizate în etapa II.

VII. Funcționalizarea cu metotrexat (MTX) a nanoparticulelor sintetizate în etapa VI.

VIII. Determinarea viabilității celulare a sistemelor obținute în etapa VII pe o linie celulară normală (HGF) și o linie celulară tumorală (MCF-7).

II.1.2. Motivarea alegerii nanoparticulelor magnetice și a polimerilor de tip metacrilat

O direcție potențial reală pentru aplicabilitate clinică și care este bine studiată în ultimele două decenii se bazează pe nanoparticulele magnetice (NPM), o clasă de oxizi metalici capabili să fie orientați și chiar acumulați în țesutul dorit printr-un câmp magnetic extern (Anghelache et al., 2021; Lungoci et al., 2019). Mai mult, NPM-urile pot fi acoperite, funcționalizate și încărcate cu substanțe terapeutice pentru a fi transportate și eliberate controlat la o țintă studiată. Sistemele amintite pot prezenta o bună stabilitate coloidală,

biocompatibilitate ridicată, citotoxicitate scăzută, non-imunogenitate, timp crescut de circulație în sânge și nu în ultimul rând pot prezenta o capacitate mare de încărcare, transport și livrare controlată la o țintă a medicamentelor în condiții fiziologice (Beagan et al., 2020). Mai mult, NPM-urile pot fi utilizate în screening-ul și diagnosticul cancerului ca agenți de contrast pentru imagistica prin rezonanță magnetică (IRM). Până în prezent, cei mai studiați agenți de contrast au fost cei pe bază de Fe^{3+} , în special nanoparticulele superparamagnetice de oxid de fier, care au prezentat o creștere a contrastului în relaxarea transversală (T2) (Israel et al., 2020).

NPM-urile au fost funcționalizate cu diferite tipuri de fragmente moleculare, cât și compuși macromoleculari, fără a afecta caracteristicile lor în procesul de funcționalizare. Deosebit de importantă este funcționalizarea lor cu polimeri care sunt capabili să ofere proprietăți specifice în funcție de natura acestora (Sung and Kim, 2020). În prezent sunt utilizate două strategii pentru a sintetiza materialelor hibride pe bază de nanoparticule acoperite cu polimeri: (I) adsorbția fizică a polimerilor pe suprafața NPM-urilor neacoperite (Bregoli et al., 2016) și (II) grefarea covalentă a polimerilor pe suprafața nanomaterialelor anorganice prin trei metode: (a) metoda „grafting-to”, (b) metoda „grafting-from” și (c) metoda „grafting through”. Polimerii utilizați la grefarea suprafeței nanoparticulelor pot fi obținuți cel mai frecvent prin polimerizare ATRP (polimerizare radicalică cu transfer atomic), unde cei mai folosiți monomeri sunt cei de tip acrilic, precum metacrilatul de N,N-dimetilaminoetil (Baek et al., 2015), metacrilatul de oligo(etilen glicol) metil eter și metacrilatul de poli(etilen glicol). Acești monomeri au fost cu succes utilizați la decorarea nanoparticulelor magnetice cu polimeri grefați cu diverse funcțiuni care sunt capabile să interacționeze cu diferite molecule biologice active (de exemplu: acid folic și metotrexat) pentru dezvoltarea unor nanotransportori capabili să interacționeze cu receptori specifici de pe suprafața celulelor vizate, asigurând livrarea de medicamente la celula țintă.

II.2. Rezultate și discuții

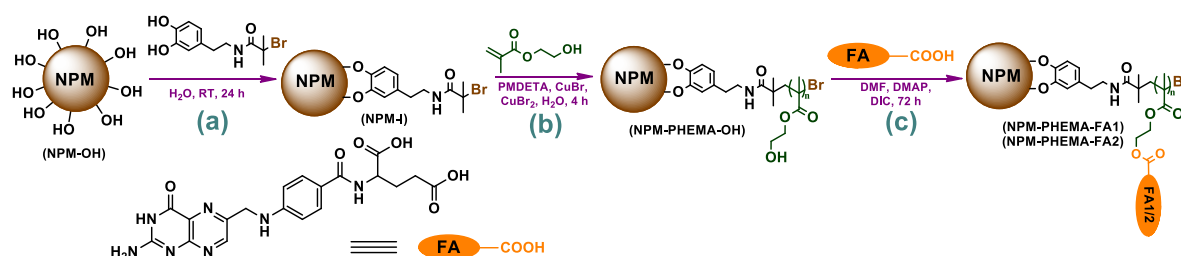
II.2.1. Nanoparticule magnetice decorate cu lanțuri de PHEMA funcționalizate cu acid folic

II.2.1.1. Motivarea alegerii polimerului PHEMA și a acidului folic

Polimerul poli(2-hidroxietil metacrilat) (PHEMA), obținut prin polimerizarea ATRP a monomerului 2-hidroxietil metacrilat (HEMA), a captat recent interesul datorită grupărilor hidroxilice (-OH) prezente pe fiecare unitate monomerică. Aceste grupări pot fi transformate

în grupări carboxilice (-COOH) și pot fi funcționalizate cu molecule specifice pentru a îmbunătăți bioactivitatea sau pentru a iniția polimerizarea radicalică cu deschidere de ciclu. PHEMA prezintă, de asemenea, proprietăți precum creșterea hidrofilității și biocompatibilitatea, fiind asemănător cu polietilenglicolul (PEG) în ceea ce privește proprietățile de "non-fouling" (Beers et al., 1999). Lanțurile de PHEMA păstrează proprietățile de "non-fouling" chiar și după funcționalizare cu molecule biologice active. Funcționalizarea nanoparticulelor cu unități de țintire, cum ar fi acidul folic (FA), poate permite legarea specifică de suprafața celulelor tumorale, deoarece FA interacționează cu receptorul de folat (FA α) supraexprimat pe aceste celule. FA a fost utilizat cu succes pentru funcționalizarea unei game variate de sisteme chimice, inclusiv nanoparticule magnetice acoperite cu polimeri, lipozomi și hidrogeluri. Aceste strategii de funcționalizare pot facilita livrarea specifică de medicamente și îmbunătățirea eficacității terapiei în tratamentul cancerului.

Scopul studiului din **subcapitolul II.2.1.** a fost de a dezvolta un nanosistem funcțional bazat pe nanoparticule magnetice, decorate cu lanțuri de PHEMA având proprietatea de „non-fouling” cu specificitate ridicată și proprietatea de a se internaliza în celulele tumorale prin funcționalizarea PHEMA cu acid folic (o prezentare a etapelor de sinteză pentru obținerea acestui nanosistem este prezentată în **schema II.2**).



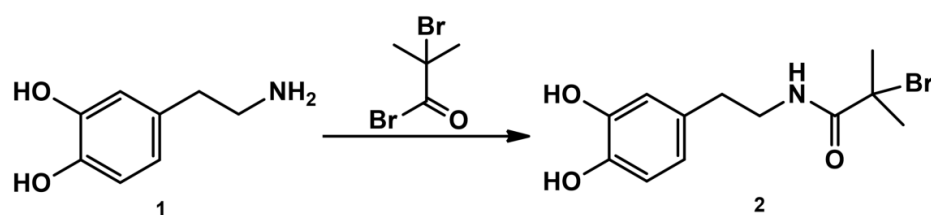
Schema II.2. Etapele de sinteză pentru obținerea nanosistemului: (a) grefarea inițiatorului de polimerizare de tip ATRP pe suprafața nanoparticulelor, (b) polimerizarea monomerului HEMA prin SI-ATRP și (c) funcționalizarea PHEMA cu FA (Ghiarasim et al., 2021).

În acest studiu, inițial s-a examinat capacitatea nanoparticulelor funcționalizate cu acid folic de a se internaliza într-o concentrație semnificativ mai mare în comparație cu celulele normale, simultan cu creșterea acestei internalizări odată cu creșterea concentrației de FA utilizată pentru funcționalizare. De asemenea, s-a demonstrat potențialul nanoparticulelor decorate cu lanțuri de PHEMA funcționalizate cu FA ca agenți de contrast în imagistica prin rezonanță magnetică.

II.2.1.2. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor magnetice decorate cu lanțuri de PHEMA funcționalizate cu acid folic

Nanoparticulele magnetice nefuncționalizate (NPM-OH, **Schema II.2.**) au fost sintetizate prin metoda coprecipitării clorurilor de fier (II și III) într-un mediu bazic, conducând în cele din urmă la obținerea de nanoparticule cu grupări hidroxilice libere pe suprafață. Pentru confirmarea structurii acestor nanoparticule s-au utilizat spectroscopia Raman și analiza XRD.

În paralel, inițiatorul de polimerizare specific polimerizării radicalice a unui monomer vinilic prin mecanism ATRP a fost sintetizat prin reacția dintre L-dopamină și bromură de α -bromobutiril conform **schemei de reacție II.3.**



Schema II.3.
Sinteza inițiatorului de polimerizare de tip ATRP (Ghiarasim et al., 2021).

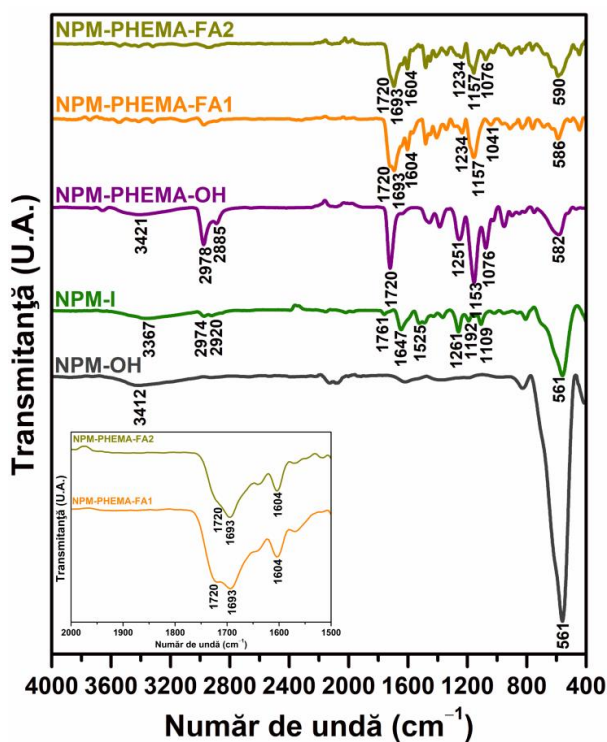


Figura II.3. Spectrele FTIR ale nanoparticulelor NPM-OH, NPM-I, NPM-PHEMA-OH, NPM-PHEMA-FA1 și NPM-PHEMA-FA2. Imaginea inserată reprezintă intervalul de lungimi de undă unde se află banda de vibrație specifică legăturii amidice din structura acidului folic utilizat la funcționalizarea PHEMA (NPM-PHEMA-FA1/2) (Ghiarasim et al., 2021).

Puritatea inițiatorului 2 a fost evaluată prin intermediul spectroscopiei de rezonanță magnetică nucleară de proton ($^1\text{H-RMN}$). Fiecare etapă de sinteză din **schema II.2.** a fost analizată din punct de vedere fizico-chimic prin tehnici precum spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR), analiză termogravimetrică (TGA), calorimetria cu scanare diferențială (DSC), determinarea proprietăților magnetice cu ajutorul unui magnetometru cu probă vibrată (VSM), difuzia dinamică a luminii (DLS). Cea mai importantă tehnică pentru punerea în evidență a obținerii nanoparticulelor funcționalizate a fost tehnica FTIR (**figura II.3.**). Spectrul FTIR al nanoparticulelor nefuncționalizate (NPM-OH) a prezentat benzi specifice,

precum legătura Fe-O la 561 cm^{-1} și grupările hidroxilice la 3412 cm^{-1} . Legarea inițiatorului de tip ATRP la suprafața nanoparticulelor (NPM-I) a fost confirmată prin apariția unor benzi caracteristice inițiatorului. Polimerizarea monomerului HEMA prin SI-ATRP (**figura II.3.**, NPM-PHEMA-OH), a dus la apariția în spectrul FTIR a benzilor de la 2978 și 2885 cm^{-1} caracteristice benzii de vibrație a legăturii C-H din grupările $-\text{CH}_3$ și, respectiv, $-\text{CH}_2-$, din lanțul polimeric principal (PHEMA), o bandă la 3421 cm^{-1} caracteristică benzii de vibrație a grupării OH din unitățile monomerice repetitive din structura PHEMA, o bandă intensă la 1720 cm^{-1} caracteristică legăturii C=O și benzile de vibrație de la 1251 , 1153 și 1076 cm^{-1} atribuite legăturilor C-C, C-O și C-O-C. Și în cazul acestei probe, se poate observa în spectrul FTIR păstrarea benzii de vibrație a legăturii Fe-O. Prezența polimerului pe suprafața nanoparticulelor a fost pusă în evidență și prin dispariția completă a benzii de vibrație C=C de la 1632 cm^{-1} , specifică monomerului vinilic HEMA (**figura II.3.**). Funcționalizarea cu FA a lanțurilor de PHEMA grefate pe suprafața nanoparticulelor (**figura II.3.**, NPM-PHEMA-FA1/2) este evidențiată prin apariția a două benzi caracteristice FA-ului, precum cea de la 1604 cm^{-1} atribuită benzii de vibrație a legăturii C=C a părții fenolice și cea de la 1653 cm^{-1} caracteristică legăturii amidice (spectrul FTIR inserat în **figura II.3.**) (Liu et al., 2020).

Cuantificarea acidului folic reacționat cu grupările hidroxilice din PHEMA (NPM-PHEMA-OH) a fost realizată prin metoda curbei de calibrarea utilizând spectroscopia ultraviolet-vizibilă (UV-Vis). Analizând spectrele UV-Vis din **figura II.4.a.**, se poate observa că probele NPM-OH și NPM-PHEMA-OH nu prezintă benzi de absorbție majore în domeniul ultraviolet-vizibil, în timp ce nanoparticulele magnetice decorate cu polimeri funcționalizați cu FA (NPM-PHEMA-FA1/2) au prezentat o bandă de absorbție la 282 nm , specifică acidului folic (FA liber).

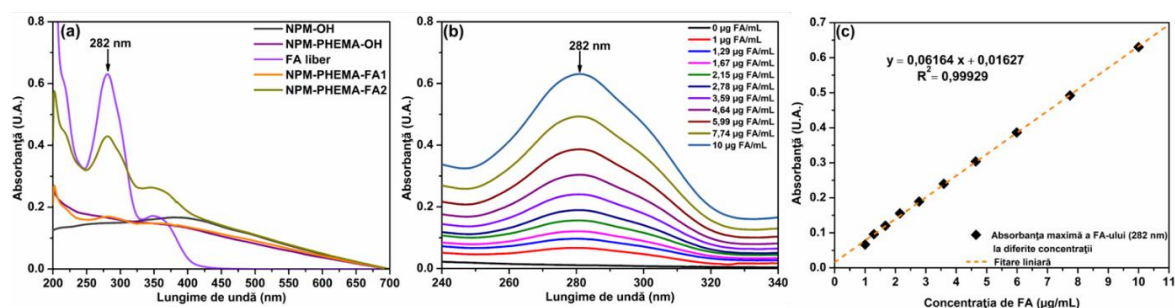


Figura II.4. (a) Spectrele de absorbție în domeniul ultraviolet-vizibil (UV-Vis) ale nanoparticulelor NPM-OH, NPM-PHEMA-OH, NPM-PHEMA-FA1 și, respectiv, NPM-PHEMA-FA2 și FA-ul liber; (b) spectrele de absorbție ale soluțiilor de FA la diferite concentrații (0 - 10 μg FA / mL); (c) curba de calibrare a FA. Spectrele UV-Vis au fost obținute prin măsurarea absorbanțelor soluțiilor sistemelor în PBS la $\text{pH} = 7,4$ (Ghilarasim et al., 2021).

Concentrațiile de FA specifice fiecărui sistem studiat (**figura II.4.a.**) au fost determinate folosind curba de calibrare pentru FA (**figura II.4.c.**). Curba de calibrare a fost construită prin reprezentarea grafică a maximului de absorbție de la 282 nm vs concentrație FA a datelor din **figura II.4.b.** Astfel, s-au determinat concentrațiile de FA în probele NPM-PHEMA-FA1 de 31,5 μg FA / mg probă și NPM-PHEMA-FA2 de 83,5 μg FA / mg probă.

În ceea ce privește diametrele hidrodinamice și informațiile despre stabilitatea coloidală în soluții apoase ale nanoparticulelor studiate, s-a utilizat tehnica numită difuzia dinamică a luminii (DLS). În **figura II.8.a.** sunt prezentate diametrele hidrodinamice medii în funcție de concentrația nanoparticulelor în soluție (1x PBS) a probelor NPM-OH, NPM-I, NPM-PHEMA-OH, NPM-PHEMA-FA1 și NPM-PHEMA-FA2. Analizând curbele diametrelor hidrodinamice medii din **figura II.8.a.**, se poate observa că o creștere a concentrațiilor de nanoparticule, duce la creșterea diametrelor hidrodinamice, fapt ce indică formarea de agregate. Probele au prezentat cele mai mici diametre hidrodinamice atunci când concentrația a fost mai mică de 50 μg / mL, nanoparticulele tind să fie dispersate în aceste condiții, un parametru important pentru utilizare eficientă în testele biologice.

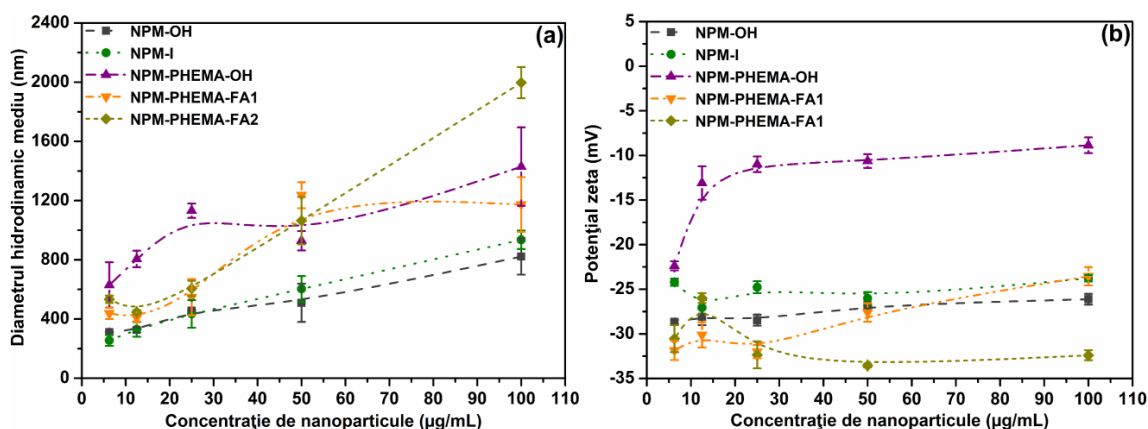


Figura II.8. Diametrele hidrodinamice medii (a) și valorile potențialului zeta medii ale probelor NPM-OH, NPM-I, NPM-PHEMA-OH, NPM-PHEMA-FA1, respectiv, NPM-PHEMA-FA2, dispersate în PBS la pH = 7,4 (Ghiarasim et al., 2021).

Analizând variațiile potențialelor zeta ale nanoparticulelor (**figura II.8.b.**) în funcție de concentrația lor se poate observa faptul că probele NPM-OH, NPM-I prezintă o stabilitate coloidală moderată pe tot intervalul de concentrații. Decorarea suprafeței nanoparticulelor cu PHEMA duce la o instabilitate coloidală ridicată, dar introducerea FA-ului crește stabilitatea coloidală a nanoparticulelor (creștere observată pentru ambele concentrații de FA).

Din punct de vedere morfologic, pentru a pune în evidență forma nanoparticulelor și măsurarea diametrelor acestora, s-a utilizat microscopia electronică de transmisie (TEM) pentru nanoparticulele nefuncționalizate (NPM-OH, 8,91 nm), funcționalizate cu inițiator

(NPM-I, 9,56), iar pentru probele NPM-PHEMA-OH, NPM-PHEMA-FA1 și NPM-PHEMA-FA2 s-a utilizat microscopia electronică de transmisie cu baleiaj (STEM). Imaginile STEM (**figura II.10.d-f**) indică o tendință de aglomerare în cazul probelor NPM-PHEMA-OH, NPM-PHEMA-FA1 și NPM-PHEMA-FA2, accentuată prin procesul de uscare aplicat la pregătirea grilelor TEM pe care au fost depuse probele înaintea măsurătorii STEM.

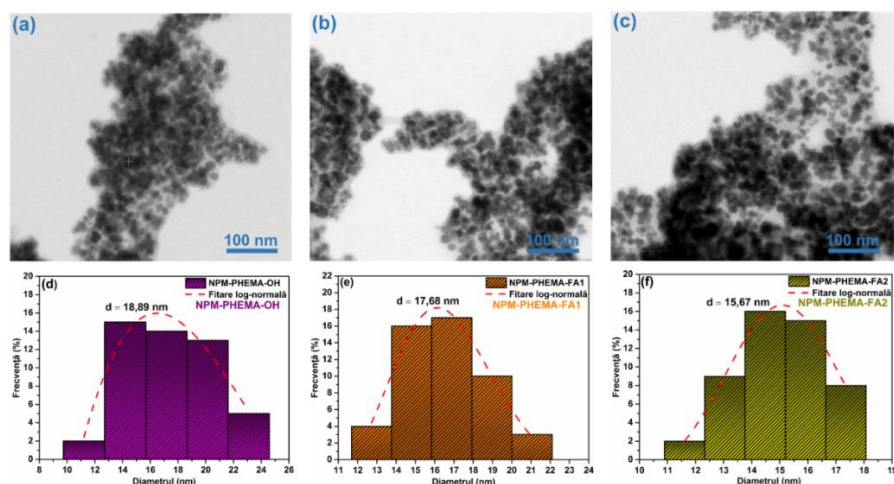


Figura II.10. Imaginile STEM și histogramele distribuției mărimii particulelor ale probelor NPM-PHEMA-OH (a și d), NPM-PHEMA-FA1 (b și e) și, respectiv, NPM-PHEMA-FA2 (c și f) (Ghiarasim et al., 2021).

Aceste nanoparticule au fost evidențiate ca fiind de tip „core-shell”, (**figura II.10.a-c**) cu diametrele medii de 18,89 nm (NPM-PHEMA-OH), 17,68 (NPM-PHEMA-FA1) și, respectiv, 15,67 nm (NPM-PHEMA-FA2) (**figura II.10.d-f**). Observațiile obținute, conduc la două concluzii principale în ceea ce privește morfologia probelor, în primul rând, prezența acidului folic în structura nanoparticulelor duce la o creștere a stabilității acestora, iar în al doilea rând, o creștere a concentrației FA-ului în structura nanoparticulelor duce la scăderea dimensiunilor nanoparticulelor de tip „core-shell”.

Din punct de vedere biologic nanoparticulele au fost biocompatibile, atât pe linia celulară NHDF, cât și pe trei linii celulare tumorale (MCF-7, HeLa și HepG2). Absorbția celulară a NPM-OH, NPM-PHEMA-OH și NPM-PHEMA-FA1 de către liniile celulare NHDF, MCF-7, HeLa și HepG2 a fost determinată prin cuantificarea fierului intracelular prin metoda tiocianatului (Gupta and Gupta, 2005). În cazul interacțiunii nanoparticulelor cu celulele normale (NHDF) s-a concluzionat faptul că în acest caz nanoparticulele studiate nu internalizează în celule, pe când în cazul celulelor tumorale se obține o internalizare semnificativ mai mare în comparație cu celulele normale (**figura II.12.**).

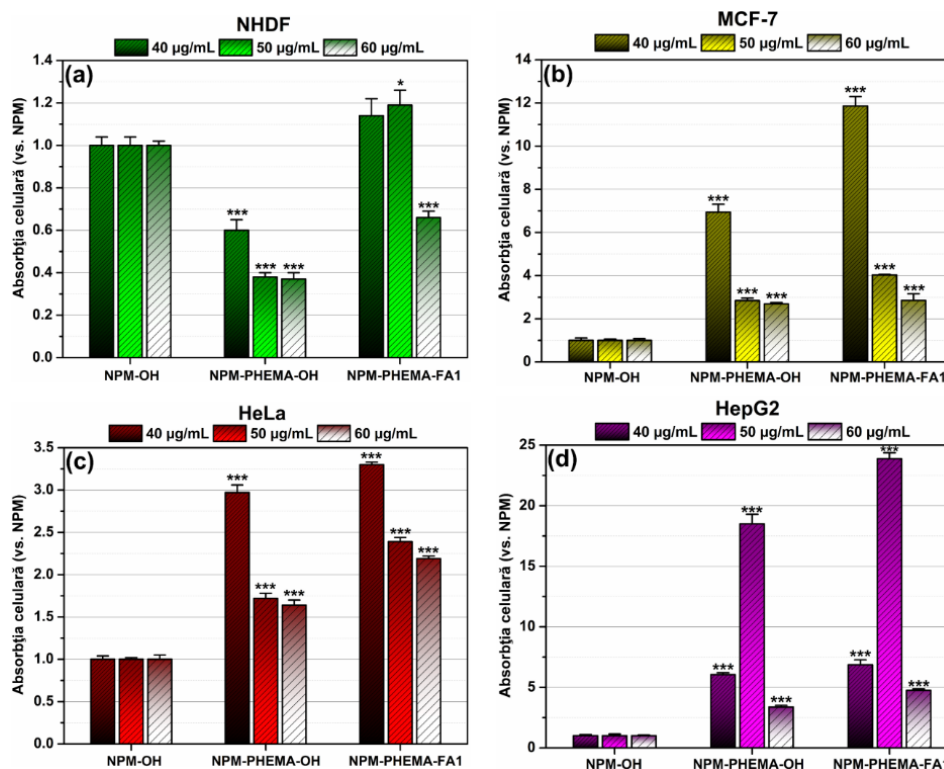


Figura II.12. Absorbția celulară a nanoparticulelor NPM-OH, NPM-PHEMA-OH și NPM-PHEMA-FA1 (la concentrații de 40, 50 și 60 µg / mL) în celulele normale NHDF și celulele tumorale MCF-7, HeLa, HepG2, după o incubare de 24 de ore. Experimentele au fost efectuate în triplicat. Conținutul de fier a fost determinat prin metoda tiocianatului, iar absorbția nanoparticulelor a fost raportată la nanoparticulele NPM-OH normalizate. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ față de NPM-OH (pentru fiecare concentrație, a fost aplicat testul t-Student) (Ghiarasim et al., 2021).

Prin spectrometria de absorbție atomică (folosirea acestei metode pentru determinarea conținutului de fier intracelular este mult mai sensibilă în comparație cu metoda tiocianatului, și care poate fi folosită pentru a detecta concentrații foarte scăzute de fier), s-a confirmat faptul că probele NPM-PHEMA-FA1/2 sunt internalizate mai bine în celulele MCF-7 comparativ cu celulele NHDF (**figura II.13.**). În plus, creșterea conținutului de FA în probe a determinat o creștere ușoară a absorbției celulare a NPM-PHEMA-FA2 comparativ cu proba NPM-PHEMA-FA1.

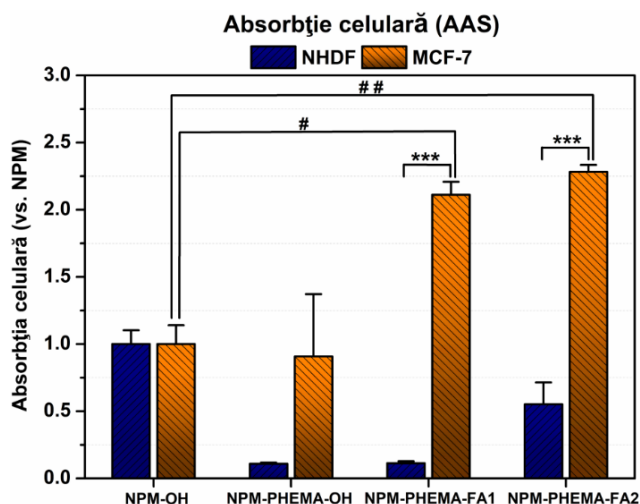


Figura II.13. Absorbția celulară a probelor NPM-OH, NPM-PHEMA-OH, NPM-PHEMA-FA1 și NPM-PHEMA-FA2 (40 µg / mL) în fibroblaste dermice umane normale (NHDF) și adenocarcinomul mamar (MCF-7) după 24 de ore. (Ghiarasim et al., 2021).

Tehnica RMN a fost utilizată pentru a evalua comportamentul magnetic al nanoparticulelor utilizate ca agent de contrast. Probele NPM-OH, NPM-PHEMA-OH, NPM-PHEMA-FA1 în PBS (pH = 7,4) la diferite concentrații au fost dispersate în gel de agar 1% și au fost utilizate pentru studii RMN de relaxivitate. În cadrul acestei analize, au fost obținute relaxivitățile r_1 și r_2 , care au dus la concluzia că o creștere a concentrației de Fe^{3+} duce la scăderea valorii T2, iar imaginile IRM devin mai întunecate (**figura II.15.**).

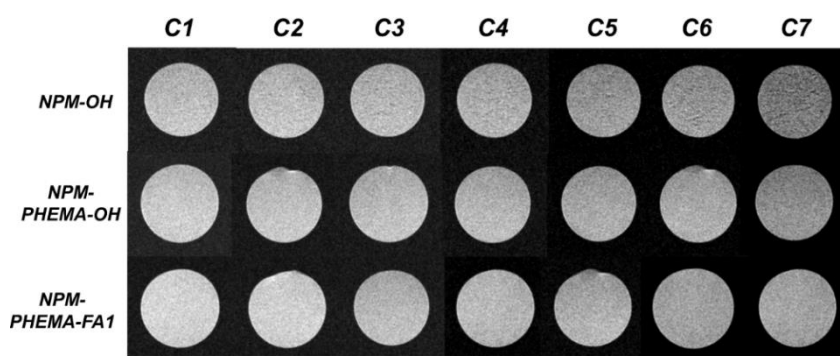


Figura II.15. Imaginile IRM ponderate T2 ale NPM-OH, NPM-PHEMA-OH și NPM-PHEMA-FA1 în intervalul de concentrație de Fe^{3+} între 0,1 și 0,8 mM (C1-C7) care prezintă un contrast negativ prin creșterea concentrației (Ghiarasim et al., 2021).

De menționat că cercetările anterioare din literatura de specialitate au relevat faptul că relaxivitatea este afectată de natura și grosimea stratului polimeric care acoperă nanoparticulele magnetice (Rowe et al., 2009). În studiul prezent, se obține o scădere ușoară a raportului r_2 / r_1 în proba NPM-PHEMA-FA1 în comparație cu cea a probei NPM-PHEMA-OH, scădere explicată prin diametrul hidrodinamic mai mare al nanoparticulelor NPM-PHEMA-OH, ceea ce este în concordanță cu studii publicate anterior (Najafian et al., 2015).

II.2.2. Nanoparticule magnetice decorate cu trei polimeri de tip metacrilat și funcționalizați cu metotrexat

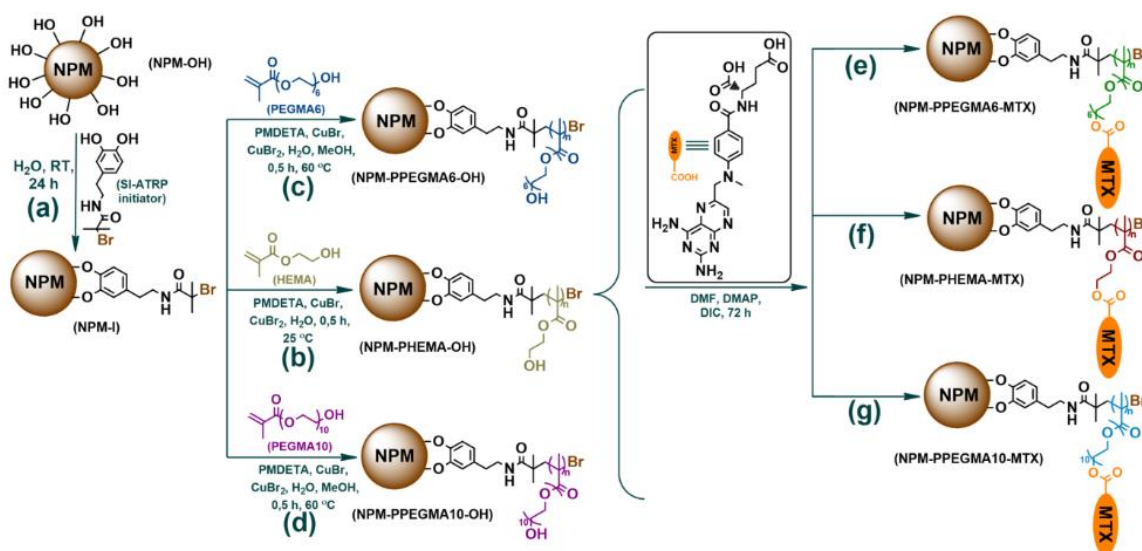
II.2.2.1. Motivarea alegerii polimerilor de tip metacrilat și a metotrexatului

Polimerii de tip metacrilat sunt larg utilizați în sisteme biomedicale datorită biocompatibilității și capacității lor de umflare, ceea ce permite interacțiuni nespecifice cu membranele celulare. Proprietățile specifice ale acestor polimeri i-au condus în diverse aplicații, inclusiv funcționalizarea nanoparticulelor magnetice, obținerea de micle copolimerice și dezvoltarea de hidrogeluri pe bază de polimeri. De asemenea, acești polimeri au fost funcționalizați cu molecule biologice active, cum ar fi metotrexatul și oligonucleotidele ADN (Marikovsky, 1974; Marasini et al., 2022). Metotrexatul (MTX) este un medicament cu spectru larg utilizat în tratamentul diverselor afecțiuni, începând de la

leucemia infantilă în 1948 și devenind standard în tratamentul artritei reumatoide și al cancerului de sân. Mecanismul său complex de acțiune implică inhibarea enzimei dihidrofolat reductaza, perturbând astfel sinteza ADN-ului și proliferarea celulară. Datorită acestei acțiuni, MTX a fost integrat în diverse sisteme chimice pentru administrare, cum ar fi nanoparticulele magnetice decorate cu polimeri (Li et al., 2013; Nosrati et al., 2018), lipozomi (Guimarães et al., 2020), miclele (Carrillo-Castillo et al., 2020) și „prodrug”-uri (Li et al., 2018).

II.2.2.2. Sinteza prin mecanism de polimerizare SI-ATRP și caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor magnetice decorate cu cei trei polimeri +/- MTX

În cadrul acestui studiu, au fost polimerizați prin SI-ATRP trei monomeri de tip metacrilat (HEMA, PEGMA6 și PEGMA10), care ulterior au fost funcționalizați cu metotrexat (schema II.2.).



Schema II.2. Etapele de sinteză pentru obținerea a trei nanoparticule pe bază de polimeri funcționalizați cu MTX.

O primă tehnică utilizată pentru monitorizarea etapelor de sinteză din **schema II.2.** a fost spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR). Polimerizarea monomerilor HEMA, PEGMA6 și PEGMA10 prin SI-ATRP (**figura II.16.a.**) a fost evidențiată prin dispariția benzilor din spectrele nanoparticulelor decorate cu polimer, a benzii de vibrație C=C specifice monomerilor.

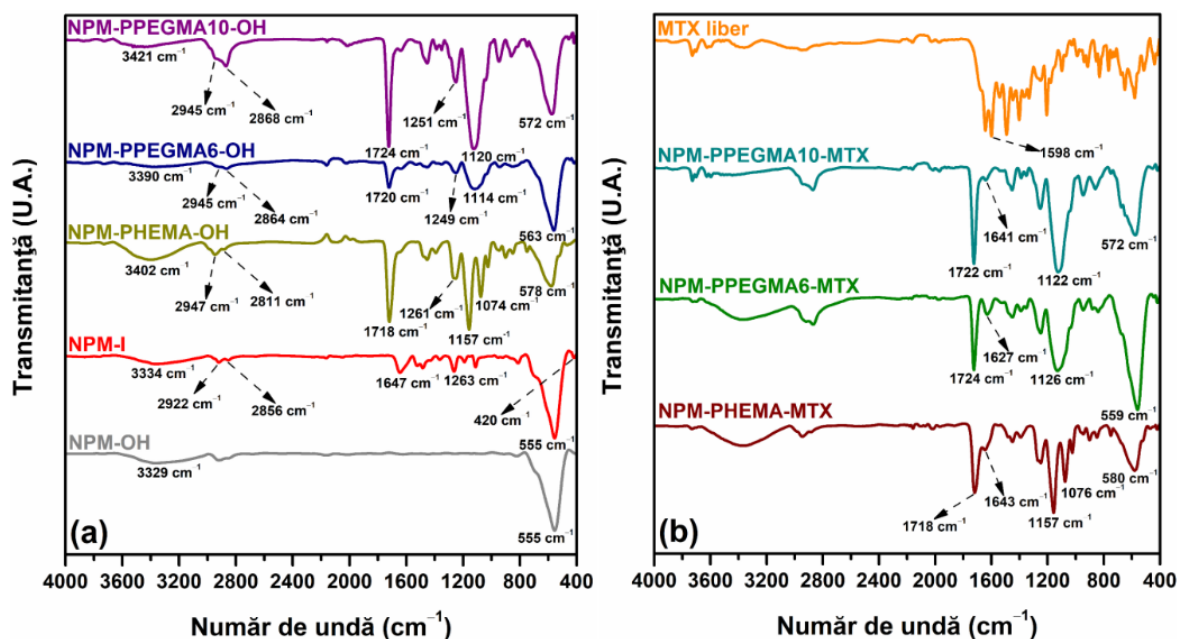


Figura II.16. (a) Spectrele FTIR ale nanoparticulelor magnetice nemonificate (NPM-OH), cu inițiatorul de tip ATRP (NPM-I) și cei trei polimeri obținuți prin SI-ATRP (NPM-PHEMA-OH, NPM-PPEGMA6-OH și NPM-PPEGMA10-OH), (b) spectrele FTIR ale nanoparticulelor magnetice decorate cu cei trei polimeri funcționalizați cu MTX (NPM-PHEMA-MTX, NPM-PPEGMA6-MTX și, respectiv, NPM-PPEGMA10-MTX) și MTX-ul liber.

Funcționalizarea polimerilor creșcuți pe suprafața nanoparticulelor magnetice cu MTX a condus la apariția benzilor vibraționale de întindere a legăturii amidice (**figura II.16.b.**) la 1598 cm^{-1} , 1643 cm^{-1} , 1627 cm^{-1} , 1641 cm^{-1} în spectrele FTIR corespunzătoare probelor MTX, NPM-PHEMA-MTX, NPM-PPEGMA6-OH și, respectiv, NPM-PPEGMA10-MTX.

Spectroscopia UV-Vis a fost utilizată pentru a cuantifica concentrația de MTX legat covalent de grupările hidroxilice pe fiecare tip de unitate structurală a polimerilor (s-a utilizat metoda curbei de calibrare). Astfel, concentrațiile determinate de MTX în nanoparticule au fost de $61,4\text{ }\mu\text{g MTX / mg NPM-PHEMA-MTX}$, $131\text{ }\mu\text{g MTX / mg NPM-PPEGMA6-MTX}$ și $58,4\text{ }\mu\text{g MTX / mg NPM-PPEGMA10-MTX}$. Aceste valori reprezintă cantitatea de MTX per miligram de nanoparticule magnetice funcționalizate corespunzătoare.

Pentru analiza fizico-chimică a acestor nanoparticule s-au utilizat și alte tehnici de caracterizare precum, analiza termogravimetrică, calorimetria cu scanare diferențială, s-a determinat comportamentul superparamagnetic prin măsurarea proprietăților magnetice.

Fiecare modificare a suprafeței nanoparticulelor magnetice sintetizate influențează diametrul hidrodinamic al nanoparticulelor. Astfel, cu ajutorul tehnicii DLS, au fost determinate diametrele hidrodinamice medii ale tuturor probelor care implică nanoparticule magnetice din **schema II.1** (**figura II.23.a.** și **II.23.b.**).

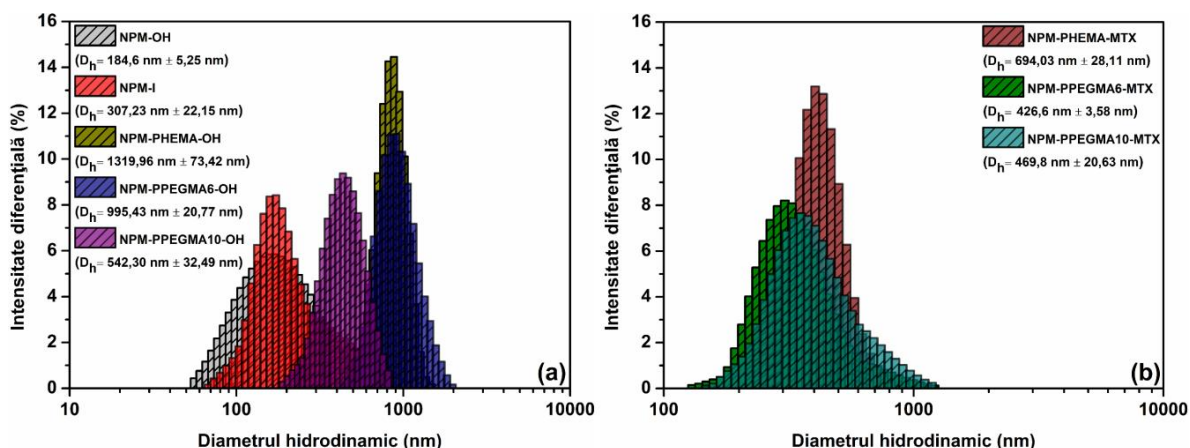


Figura II.23. (a) Diametrele hidro dinamice medii ale nanoparticulelor magnetice NPM-OH, NPM-I, NPM - PHEMA-OH, NPM-PPEGMA6-OH și NPM-PPEGMA10-OH și (b) NPM-PHEMA-MTX, NPM-PPEGMA6-MTX și NPM-PPEGMA10-MTX, dispersate în PBS la pH = 7,4.

Polimerizarea monomerilor a dus la o creștere a diametrelor hidro dinamice ale nanoparticulelor (**figura II.23.a.**), iar ulterior funcționarea acestora cu MTX la o scădere, comportament observat în cazul tuturor celor trei monomeri (**figura II.23.b.**).

Pentru a pune în evidență morfologia și dimensiunile nanoparticulelor, atât a celor nemodificate, cât și a celor modificate, a fost utilizată tehnica microscopia electronică de transmisie prin baleiaj (STEM). Analizând **figura II.25.**, se poate observa în cazul nanoparticulelor magnetice nemodificate (NPM-OH, **figurile II.25.a.** și **II.25.c.**) și a celor cu inițiator de tip ATRP grefat pe suprafața nanoparticulelor (NPM-I, **figurile II.25.b.** și **II.25.d.**), o tendință de aglomerare, prezentând forme sferice, cu un diametru mediu de $10,36 \text{ nm} \pm 2,01 \text{ nm}$ pentru proba NPM-OH și, respectiv, $13,16 \text{ nm} \pm 1,75 \text{ nm}$ în cazul probei NPM-

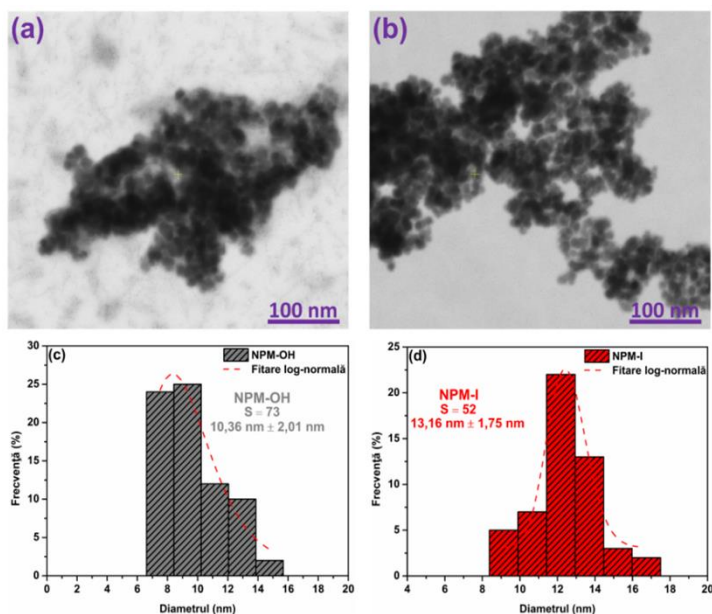


Figura II.25. Imaginile STEM și histogramele de distribuție ale diametrelor nanoparticulelor magnetice nemodificate (NPM-OH) (a) și (c) și a celor decorate cu inițiator ATRP (NPM-I), (b) și (d).

I.

După polimerizarea celor trei monomeri prin SI-ATRP, nanoparticulele se prezintă sub formă de tip miez-coajă („core-shell”) cu diametre medii mai mari decât diametrele probelor anterioare (NPM-OH și NPM-I), unde „core”-ul este dat de nanoparticulelor magnetice și „shell”-ul dat de învelișul polimeric. Aceste structuri se prezintă sub formă de agregate

obținute după evaporarea solventului. Astfel, proba NPM-PHEMA-OH (**figura II.26.a. și II.26.d.**) a prezentat un diametru mediu de $19,41 \text{ nm} \pm 5,05 \text{ nm}$, urmat de un diametru mediu de $19,17 \text{ nm} \pm 3,19 \text{ nm}$ în cazul probei NPM-PPEGMA6-OH și (**figura II.26.b. și II.26.e.**) și, respectiv, un diametru mediu de $22,99 \text{ nm} \pm 4,53 \text{ nm}$ pentru proba NPM-PPEGMA10-OH (**figura II.26.c. și II.26.f.**), indicând clar că dimensiunea nanoparticulei este influențată de lungimea lanțului macromolecular atașat pe suprafața aceleiași nanoparticule anorganice.

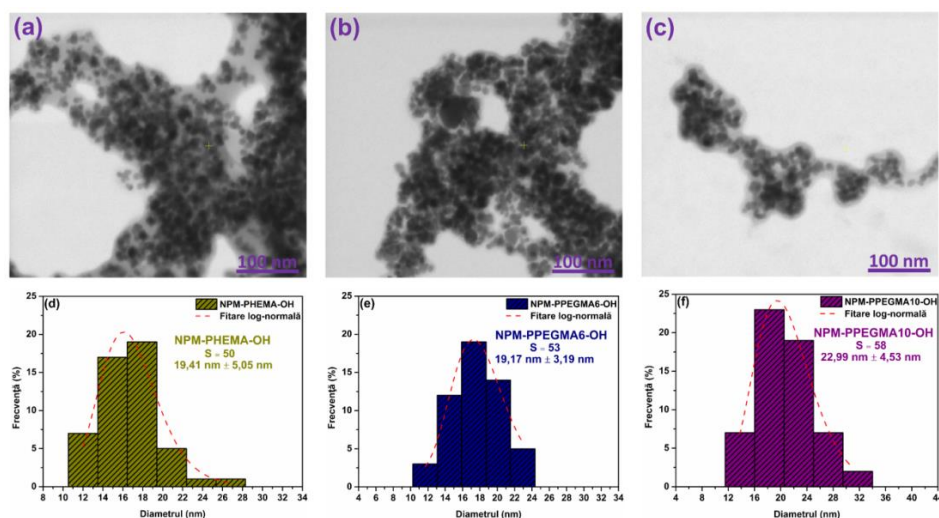


Figura II.26. Imaginile STEM și histogramele distribuției diametrelor nanoparticulelor : NPM-PHEMA-OH (a) și (d), NPM-PPEGMA6-OH (b) și (e) și NPM-PPEGMA10-OH (c) și (f).

Funcționalizarea polimerilor cu MTX a dus la scăderea diametrelor medii față de nanoparticulele cu polimeri, datorită reducerii proprietății de „non-fouling” a polimerilor, conducând la obținerea de nanoparticule cu diametre medii mai mici, fapt susținut și de rezultatele obținute prin DLS (Ghiarasim et al., 2021).

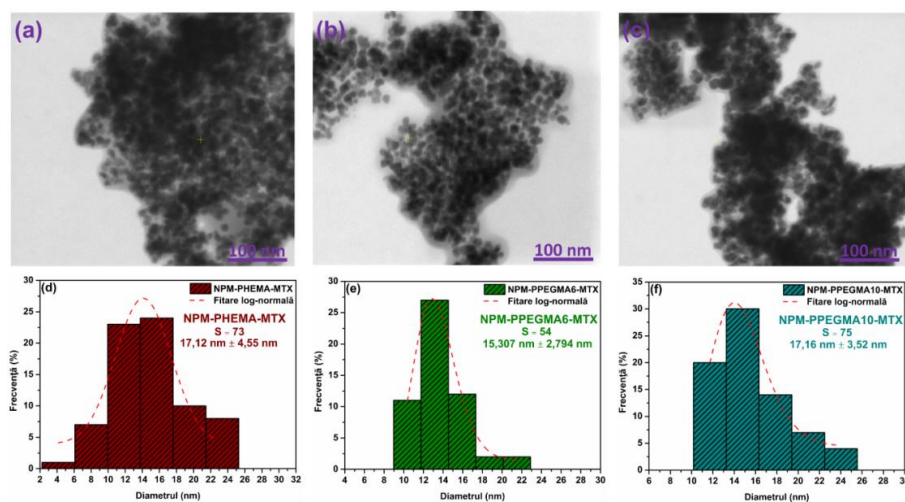


Figura II.27. Imaginile STEM și histogramele distribuției diametrelor nanoparticulelor magnetice decorate cu cei trei polimeri funcționalizați cu MTX (NPM-PHEMA-MTX (a) și (d), NPM-PPEGMA6-MTX (b) și (e) și NPM-PPEGMA10-MTX (c) și (f).

Astfel, proba NPM-PHEMA-MTX (**figurile II.27.a. și II.27.d.**) a prezentat un diametru mediu de $17,12 \text{ nm} \pm 4,55 \text{ nm}$, urmat de un diametru mediu de $15,30 \text{ nm} \pm 2,79 \text{ nm}$ măsurat pentru proba NPM-PPEGMA6-MTX (**figurile II.27.b. și II.27.e.**) și, respectiv, $17,16 \text{ nm} \pm 3,52 \text{ nm}$ atribuit probei NPM-PPEGMA10-MTX (**figurile II.27.c. și II.27.f.**).

Pentru a determina biocompatibilitatea nanoparticulelor de plecare și a celor funcționalizate cu MTX s-a utilizat testul CellTiter-Glo® pe fibroblaste gingivale umane (HGF) și citotoxicitatea acestora asupra celulelor de adenocarcinom mamar (MCF-7) după un timp de incubare de 72 de ore. Rezultatele au dus la concluzia că nanoparticulele magnetice cu cei trei polimeri decorați pe suprafața acestora (NPM-PHEMA-OH, NPM-PPEGMA6-OH și NPM-PPEGMA10-OH) au fost biocompatibili, neafectând viabilitatea celulelor HGF la concentrațiile testate. Funcționalizarea polimerilor cu MTX nu a modificat semnificativ viabilitatea fibroblastelor normale, dar a avut un efect pronunțat asupra celulelor MCF-7, reducând viabilitatea acestora cu până la 69% (figura II.29).

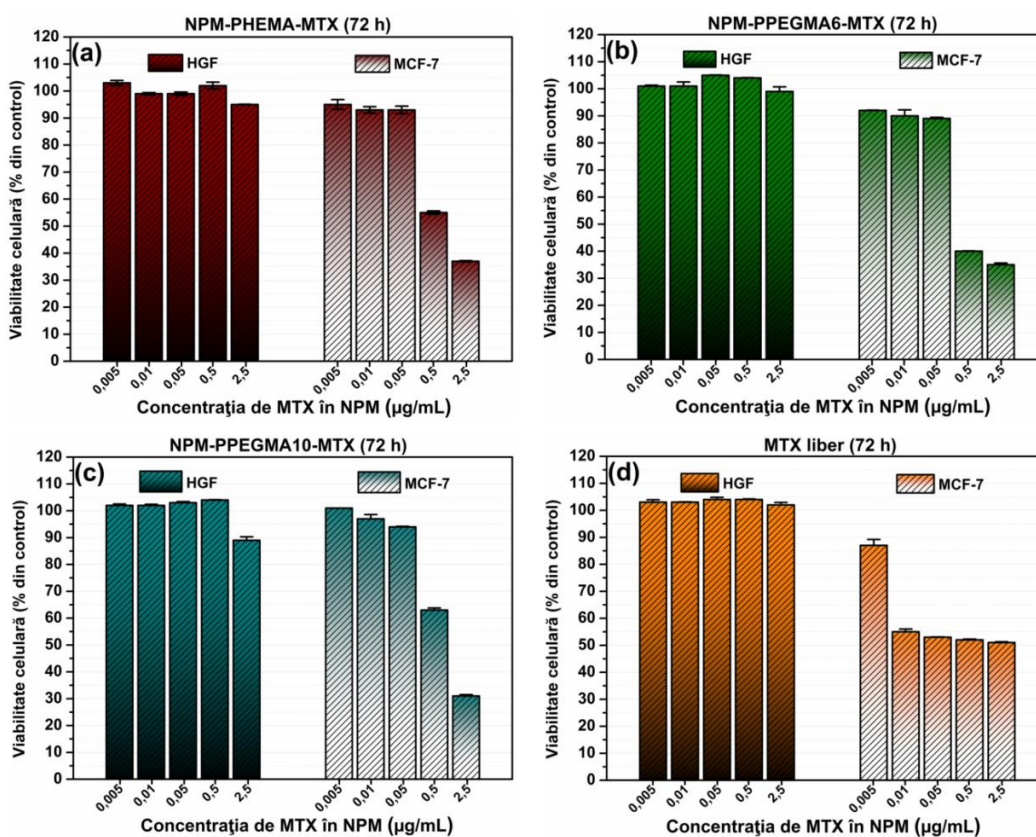


Figura II.29. Citotoxicitatea nanoparticulelor magnetice decorate cu cei trei polimeri funcționalizați cu MTX (NPM-PHEMA-MTX (a), NPM-PPEGMA6-MTX (b), NPM-PPEGMA10-MTX (c) și, respectiv, a MTX-ului liber (d) la diferite concentrații pe liniile celulare HGF și MCF-7.

Metotrexatul în stare nativă nu a modificat viabilitatea fibroblastelor normale la concentrații de până la 2,5 µg / mL, dar a indus moartea celulară până la 49% în celulele MCF-7 la aceeași concentrație. Nanoparticulele funcționalizate cu MTX au indus o citotoxicitate în celulele MCF-7 la concentrații mai mari de 0,05 µg / mL, în contrast cu MTX-ul liber care a indus un platou de aproximativ 55% a viabilității celulare.

CAPITOLUL III – Micele pe bază de polimeri biocompatibili pentru dezvoltarea de noi abordări în tratamentul eficient al cancerului mamar

III.1. Motivarea și obiectivele studiului aferent capitolului III

III.1.1. Obiective științifice specifice:

I. Proiectarea, obținerea și caracterizarea fizico-chimică a copolimerilor dibloc poli(etilen glicol)-co-polihistidină (PEG-PHis) cu secvența PHis cu lungime controlată pentru prepararea nanostructurilor auto-asamblate funcționale.

II. Studiul procesului de auto-asamblare al copolimerilor PEG-PHis în micle uniforme cu dimensiuni controlate, încărcarea micelor cu un medicament antitumoral și stabilirea lungimii optime a lanțului de polihistidină pentru eliberarea principiului activ la valori ale pH-ului specifice țesuturilor tumorale.

III. Testarea *in vitro* a copolimerilor și a micelor încărcate cu medicament pe linii celulare specifice cancerului mamar (MDA-MB-231).

IV. Funcționalizarea suprafeței micelor cu un anticorp monoclonal (trastuzumab) specific cancerului mamar și evaluarea *in vitro* a activității biologice a micelor decorate cu trastuzumab pe culturi celulare 2D și, respectiv, 3D.

III.1.2. Motivarea pentru utilizarea copolimerilor dibloc polietilenglicol-polihistidină

În ultimele decenii, interesul pentru materialele sensibile la pH, care rămân stabile la pH-ul fiziologic și se descompun la pH-uri mai scăzute întâlnite în mediile tumorale, a crescut semnificativ. Aceste materiale, încărcate cu medicamente sau funcționalizate cu diverse molecule, sunt esențiale pentru dezvoltarea nanosistemelor utilizate în transportul și livrarea țintită a medicamentelor, în special în tratarea cancerului. Sistemele chimice sensibile la pH, cum ar fi micellele „core-shell” și copolimerii peptidă-polimer, oferă soluții promițătoare pentru acest scop. Sinteza acestor materiale poate implica încorporarea grupărilor carboxilice, legarea covalentă a moleculelor de medicament sau utilizarea unor fragmente organice sensibile la pH, care determină dezamblarea structurilor la pH-uri specifice. Cu toate acestea, complexitatea sintezei copolimerilor dibloc poate reprezenta o limitare în aplicarea acestor sisteme. Sinteza peptidelor pe suport solid (SPPS) oferă o alternativă accesibilă și eficientă pentru obținerea copolimerilor, deschizând perspective noi

pentru dezvoltarea sistemelor inteligente de livrare a medicamentelor (Samaritoni et al., 2018).

III.2. Rezultate și discuții

III.2.1. Proiectarea, sinteza și asamblarea copolimerilor PEG-PHis în micelle în absența sau prezența unui medicament antitumoral

În cadrul acestui studiu, au fost proiectați trei copolimeri pe bază de PEG-PHis pentru a fi sintetizați folosind tehnica SPPS. Structura copolimerilor propuși pentru a fi sintetizați a inclus o unitate de PEG de masă moleculară de 2 kDa, care să fie legată covalent de un lanț de polihistidină cu o lungime a catenei de 20, 26 și 32 unități structurale de aminoacid (L-histidină). De asemenea, secvențele de polihistidină au fost gândite să includă o unitate de lizină la capătul lanțului pentru a permite legarea covalentă a fluoroforilor cu amina liberă din structura lizinei (Nanda and Lorsch, 2014). La celălalt capăt al lanțului de polihistidină s-a adăugat o unitate de cisteină, care să permită atașarea lanțului de PEG printr-o reacție specifică între gruparea tiol a cisteinei și gruparea maleimidică atașată la capătul lanțului de PEG (structurile chimice ale copolimerilor sunt reprezentate în **figura III.1.**).

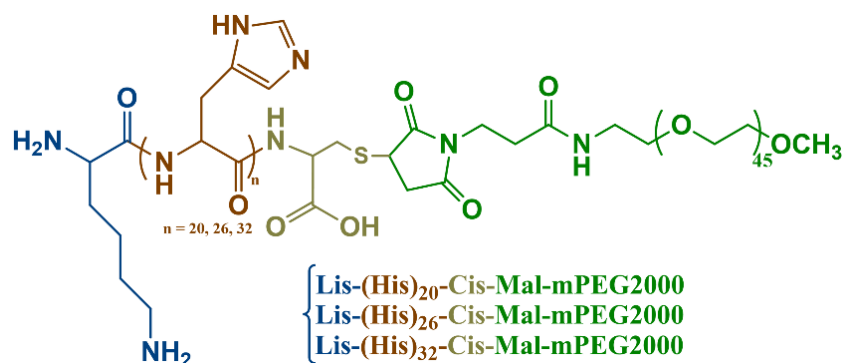
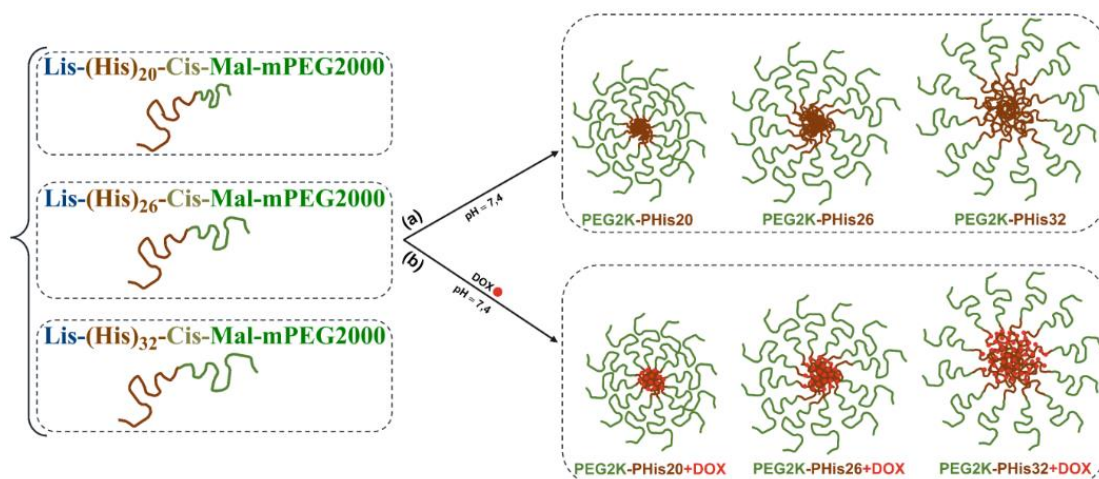


Figura III.1. Structura chimică generală a celor trei copolimeri sintetizați prin tehnica SPPS (albastru - lizina, roșu - histidina, galben - cisteina și, respectiv, verde - PEG).

Copolimerii proiectați au fost sintetizați în colaborare cu compania Chempeptide Ltd. (Shanghai, China) utilizând tehnica SPPS. Aceștia au fost analizați utilizând spectrometria de masă (MS) și cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) (Ghiarasim et al., 2022). Ulterior cei trei copolimeri au fost asamblați în micelle în absența / prezența unui medicament antitumoral, numit doxorubicină (DOX) folosită ca și compus model. Etapele de obținere ale micellelor neîncărcate și încărcate cu DOX sunt reprezentate în **schema III.1.**



Schema III.1. Asamblarea celor trei copolimeri în micelle neîncărcate (a) și, respectiv, micelle încărcate cu DOX (b).

Un prim parametru calculat pentru aceste micelle a fost concentrația critică micelară pentru fiecare copolimer (0,111 mg / mL pentru mPEG-2000-Mal-Cis-(His)20-Lis, 0,045 mg / mL pentru mPEG-2000-Mal-Cis-(His)26-Lis și 0,032 mg / mL în cazul copolimerului mPEG-2000-Mal-Cis-(His)32-Lis). Acest parametru a fost calculat utilizând o metodă standardizată, implicând pirenul ca și compus fluorescent și spectroscopia de fluorescență. Scăderea valorilor CCM de la 0,111 mg / mL la 0,032 mg / mL odată cu creșterea lungimii lanțului de polihistidină s-a datorat faptului că a crescut și hidrofobitatea sistemului care a contribuit la formarea micelilor la concentrații mai scăzute ale copolimerului la pH = 7,4 (Lee et al., 2003), iar valorile CCM obținute pentru copolimerii PEG2K-PHis20/26/32 au fost în acord cu valorile obținute în studii anterioare (Lee et al., 2003a).

Diametrele hidrodinamice obținute prin tehnica DLS, concluzionează faptul că o creștere a lungimii lanțului de PHis din structura copolimerilor duce la o creștere a diametrelor hidrodinamice, atât pentru cele neîncărcate cât și cele încărcate cu DOX.

Pentru a pune în evidență morfologia micelilor formate, atât a celor neîncărcate, cât și a celor încărcate cu DOX, s-a folosit microscopia electronică de transmisie cu baleiaj (STEM). În **figura III.7.** sunt prezentate imaginile STEM ale micelilor PEG2K-PHis20/26/32, evidențiindu-se asamblarea lor în formațiuni sferice de dimensiuni nanometrice. În cazul probei PEG2K-PHis20 (**figura III.7.a.**), se observă o structură de tip „core-shell”, cu un diametru mediu de 232 nm ± 33 nm (**figura III.7.d.**), cu un contrast puternic al părții hidrofobe („core”-ul) datorat lanțurilor de polihistidină, care prezintă o densitate de electroni mai mare în comparație cu „shell”-ul de PEG hidrofil. Proba PEG2K-PHis26 a prezentat un diametru mediu de 112 nm ± 26 nm (**figura III.7.e.**), în timp ce proba PEG2K-PHis32 a avut un diametru mediu de 89 nm ± 20 nm (**figura III.7.f.**).

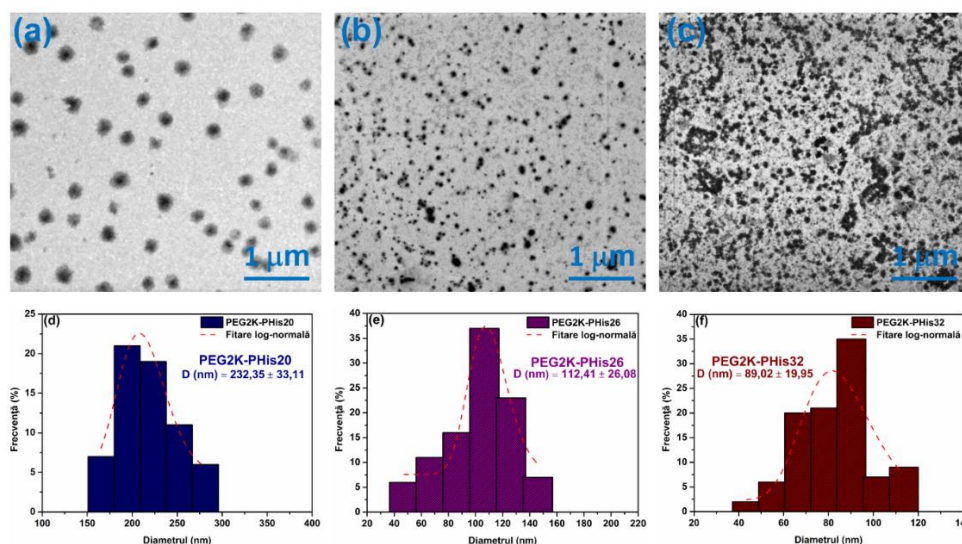


Figura III.7. Imaginile de microscopie electronică de transmisie cu baleiaj (STEM) ale micelor neîncărcate (a - c) și distribuția diametrelor (d - f) (Ghiarasim et al., 2022).

Analizând diametrele micelor neîncărcate, s-a observat că diametrul mediu a scăzut odată cu creșterea lungimii lanțului de polihistidină, rezultate care intră în contradicție cu datele de DLS. Acest lucru se poate datora stabilității mai mari a micelor cu lanțuri de polihistidină mai lungi, datorită interacțiunilor mai puternice implicate în formarea micelor. Asamblarea mai compactă a lanțurilor de polihistidină mai lungi s-a reflectat și în obținerea unui contrast mai intens a părții interioare al micelor, contrast observat în cazul imaginilor STEM din **figurile III.7.b - c** pentru probele PEG2K-PHis26 (b) și PEG2K-PHis32 (c).

În cazul micelor încărcate cu DOX, imaginile STEM au prezentat, de asemenea, ansambluri sferice uniforme cu un contrast mult mai mare datorită încărcării micelor cu molecule de DOX (**figura III.8.**).

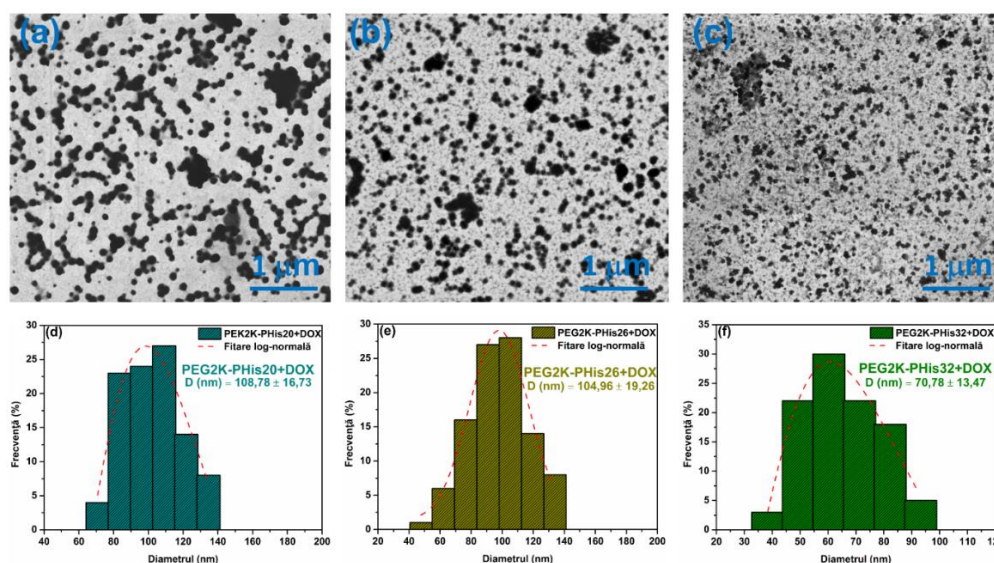


Figura III.8. Imaginile STEM ale micelor încărcate cu DOX (a - c) și distribuția diametrelor (d - f) (Ghiarasim et al., 2022).

Analizând în detaliu **figura III.8.a - c**, se poate observa faptul că toate probele din imaginile STEM au relevat o scădere treptată a diametrelor medii în comparație cu micellele neîncărcate (**figura III.8.d - f**), PEG2K-PHis20+ DOX cu un diametru mediu de 109 nm ± 17 nm, PEG2K-PHis26+DOX cu 105 nm ± 19 nm și PEG2K-PHis32+DOX cu un diametru mediu de 71 nm ± 13 nm), indicând interacțiuni hidrofobe nespecifice puternice ale lanțurilor de polihistidină cu moleculele de DOX. În plus, DOX-ul poate forma nanocristale compacte în interiorul micelilor, unde acest fenomen a fost observat în sisteme chimice similare (Cipolla et al., 2016), ducând la o mai bună compactare a „core”-ului micelilor. Compactarea micelilor cu molecule de DOX a generat, de asemenea, o stabilizare neașteptată în toate cele trei probe studiate (conform **figurii III.8.**).

Concentrația de DOX încărcată în micelle a fost determinată prin spectroscopie de fluorescență (**figura III.9.**), utilizând o curbă de calibrare (DOX liber) ca o funcție a intensității de fluorescență la 592 nm vs lungime de undă. Micellele neîncărcate nu au prezentat emisie în fluorescență, în timp ce micellele încărcate cu DOX au prezentat emisiile corespunzătoare DOX-ului, intensitățile fiind puternic dependente de concentrația de medicament încărcată în micelle. Din studiile efectuate s-au obținut următoarele valori ale concentrațiilor de DOX încărcate într-un mg din fiecare copolimer studiat: 73,8 μg de DOX pentru micellele PEG2K-PHis20+DOX, 128,4 μg DOX pentru PEG2K-PHis26+DOX și, respectiv, 181,2 μg în cazul micelilor PEG2K-PHis32+DOX. Concentrația de DOX în micelle a crescut treptat odată cu creșterea lungimii lanțului de PHis din structura copolimerilor. Această creștere este corelată cu datele STEM privind gradul mai mare de compactare al moleculelor de DOX încărcate în micelle.

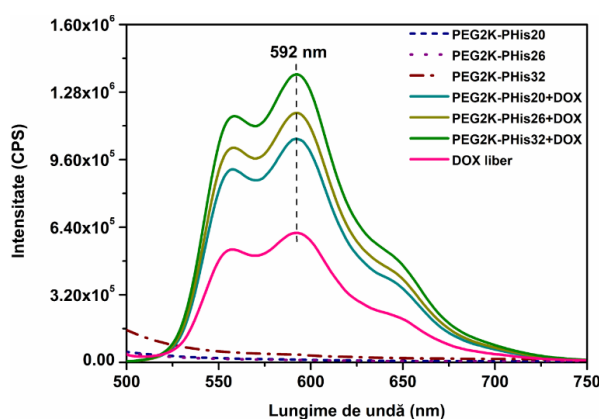


Figura III.10. Suprapunerea spectrelor de emisie a DOX nativ și ale micelilor neîncărcate și încărcate cu DOX, cu evidențierea maximului de emisie al DOX de la 592 nm, $\lambda_{excitare} = 480$ nm (Ghiarasim et al., 2022).

Tabelul III.2. Eficiența încapsulării (EE) și încărcarea medicamentului (DL) a DOX în micellele PEG2K-PHis20+DOX, PEG2K-PHis26+DOX și PEG2K-PHis32+DOX (Ghiarasim et al., 2022).

Proba	EE (%)	DL (%)
PEG2K-PHis20+DOX	52,98	8,11
PEG2K-PHis26+DOX	60,51	9,16
PEG2K-PHis32+DOX	71,31	10,62

În cadrul acestui subcapitol al tezei de doctorat s-a efectuat un studiu de eliberare a DOX-ului din micellele PEG2K-PHis20+DOX, PEG2K-PHis26+DOX, PEG2K-PHis32+DOX la o temperatură de 37 °C, prin modificarea pH-ului mediului, în intervalul 6,5 și 6,9 pentru a simula mediul extracelular al celulelor tumorale (Chen et al., 2017) (metoda dializei). Valorile de pH investigate în acest studiu au fost de 7,4 (valoarea la care au fost asamblate micellele încărcate cu DOX), 7,2 și 6,5 (specific mediului extracelular tumoral) în soluție apoasă de PBS cu ajustarea pH-ului corespunzător. Important de subliniat că valoarea de pH = 7,0 a fost exclusă din experiment deoarece la această valoare de pH, DOX formează dimeri care favorizează precipitarea acestuia din soluție (Yamada, 2020) și astfel duce la imposibilitatea de a cuantifica concentrația de medicament. În plus, timpul de eliberare al studiului a fost limitat la 10 de ore pentru a evita expunerea prelungită a DOX-ului într-o soluție apoasă, ceea ce poate duce, de asemenea, la formarea de precipitat și la obținerea de rezultate eronate.

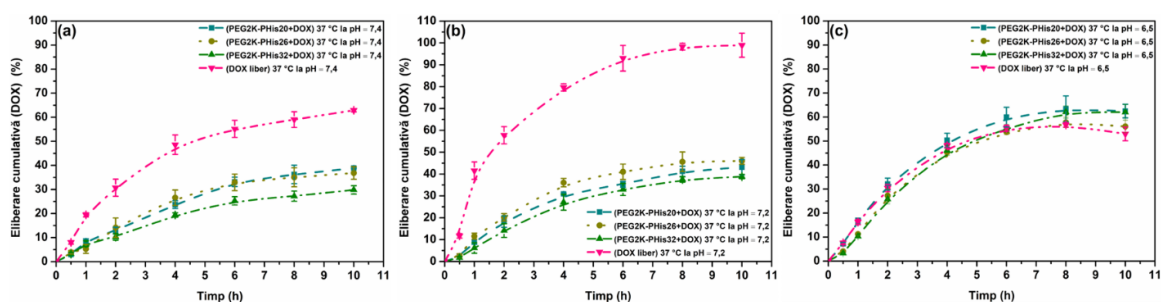


Figura III.11. Curbele de eliberare ale DOX-ului din micellele încărcate (PEG2K-PHis20+DOX, PEG2K-PHis26+DOX, PEG2K-PHis32+DOX) și DOX-ul liber în soluție de PBS la pH = 7,4 (a), pH = 7,2 (b) și pH = 6,5 (c) la temperatura de 37 °C (Ghiarasim et al., 2022).

Analizând curbele de eliberare din **figura III.11.**, după 10 ore, procentul eliberării cumulative a DOX-ului din micellele PEG2K-PHis32+DOX a fost de aproximativ 20 - 24% la pH = 7,4, cu o ușoară creștere a procentului de eliberare în cazul pH-ului de 7,2. Această diferență între procente de eliberare a condus la concluzia faptului că micellele din cadrul acestui studiu încărcate cu DOX sunt sensibile la variații mici ale pH-ului spre pH acid, pe de o parte, și pe de altă parte, odată ce lungimea lanțului de PHis a crescut, micellele au devenit mai stabile la pH-ul fiziologic de 7,4. La pH = 6,5, eliberarea cumulativă a DOX-ului din probele PEG2K-PHis20+DOX și PEG2K-PHis26+DOX a fost echivalentă cu cea a probei PEG2K-PHis32+DOX, dar a fost de cel puțin două ori mai mare decât la pH = 7,2 și pH = 7,4, unde a fost observat un platou de eliberare la 6 ore pentru toate probele. Când pH-ul a scăzut la valoarea de 6,5, PHis din toate probele a fost complet protonat, prin urmare, procentul de eliberare a medicamentului a crescut semnificativ în comparație cu procentele obținute la pH = 7,2 (**figura III.11.c.**). Acest ultim aspect prezintă un interes deosebit

deoarece, la pH = 6,5, care este limita inferioară a pH-ului extracelular în cazul celulelor tumorale (Chen et al., 2017), micelile au eliberat peste 50% DOX, demonstrând astfel potențialul micelilor studiate ca fiind eficiente pentru sisteme chimice cu proprietatea de eliberare a medicamentelor în mediu tumoral extracelular.

Pentru a evalua în continuare stabilitatea, citotoxicitatea și proprietățile de eliberare a medicamentului, a micelilor neîncărcate cât și a celor încărcate cu DOX, s-a efectuat o evaluare *in vitro* pe celule umane de tip triplu-negative (MDA-MB-231), pe o perioadă de 72 de ore (**figura III.14**), iar aceste rezultate au indicat eliberarea controlată a DOX-ului din micile.

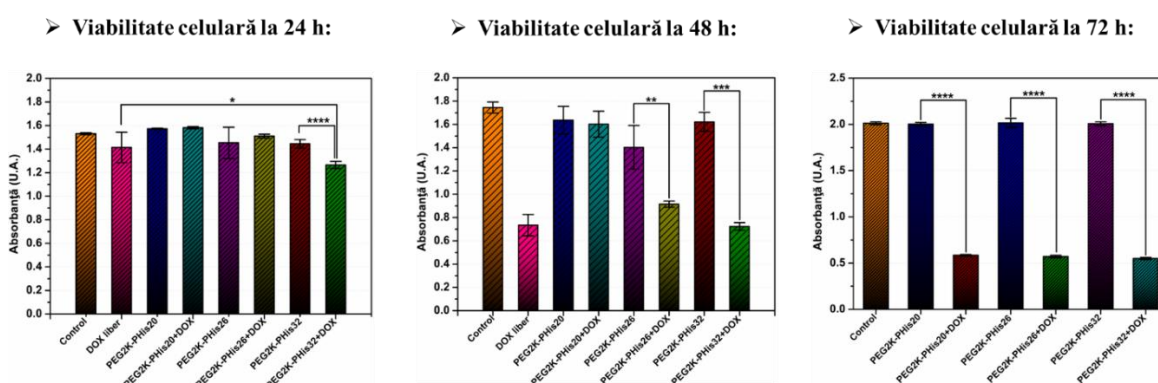


Figura III.14. Efectele DOX-ului, micelilor neîncărcate și cele încărcate cu DOX asupra celulelor MDA-MB-231, specifice cancerului de sân. Viabilitatea celulară a fost determinată la 24, 48 și 72 de ore, exprimată ca absorbantă. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.00005$.

III.2.2. Funcționalizarea micelilor de tip PEG-PHis cu trastuzumab

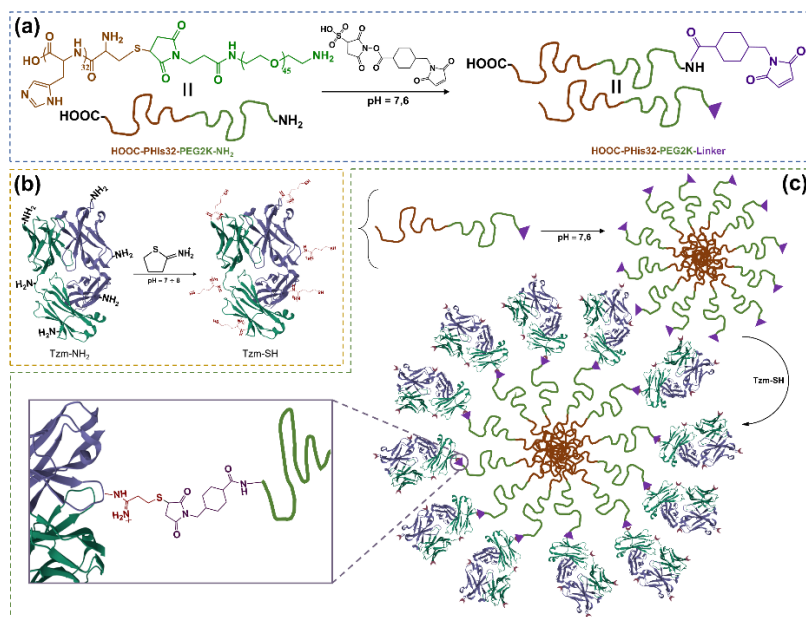
III.2.2.1. Motivarea pentru utilizarea anticorpului monoclonal trastuzumab

Tratamentul standard pentru cancerul de sân HER2-pozitiv constă în administrarea anticorpului monoclonal anti-HER2 numit trastuzumab (Tzm, cu denumirea comercială de Herceptin) (Adam-Artigues et al., 2022). Acest tratament a fost eficient atât pentru stadiile incipiente, cât și pentru cele avansate ale cancerului mamar, datorită legării trastuzumabului de receptorul transmembranar glicoproteic p185 HER2 și determinând apoptoza celulelor tumorale sau prevenind creșterea acestora (Valabrega, Montemurro and Aglietta, 2007). Deși un număr semnificativ de pacienți cu cancer de sân HER2+ beneficiază de terapia anti-HER2, o subgrupă de pacienți dezvoltă rezistență, ceea ce duce în cele din urmă la avansarea bolii (Nahta et al., 2006).

S-a constatat anterior că legarea Tzm-ului de diferite tipuri de nanoparticule nu afectează capacitatea sa de a se lega în mod specific de receptorii transmembranari HER2 supraexprimați în celulele tumorale specifice cancerului mamar (Nguyen et al., 2017). Acest fapt este consolidat și mai mult de apariția unor conjugate chimice pe bază de Tzm aprobate de Administrația pentru Alimente și Medicamente din SUA (FDA) de tip anticorp monoclonal chimeric precum margetuximab (Gradishar et al., 2023) și sisteme de tip anticorp - medicament precum trastuzumab-DM1 (von Minckwitz et al., 2019) sau trastuzumab deruxtecan (Modi et al., 2022). În studiul prezent, s-a utilizat copolimerul dibloc PHis-PEG pentru a obține miclele care au fost ulterior funcționalizate pe suprafață cu Tzm într-un mod controlabil, obținând un sistem nano-asamblat funcționalizat, ducând la rezultate excepționale și neașteptate asupra celulelor HER2+ *in vitro* pe culturi de celule 2D și 3D.

III.2.2.2. Obținerea și caracterizarea fizico-chimică a miclelor funcționalizate cu trastuzumab

Copolimerul dibloc (H_2N -PEG-2000-Mal-Cis-(His)₃₂) sintetizat prin SPPS este format dintr-un lanț polimeric de PEG (2kDa) și un lanț polimeric de PHis cu 32 de unități monomerice repetitive de L-histidină. Secvența de PEG utilizată în sinteza SPPS conține o grupare aminică terminală liberă, care are rol în legarea covalentă a Tzm-ului de suprafața miclelor obținute (**Schema III.2.**). Copolimerul H_2N -PEG-2000-Mal-Cis-(His)₃₂ a fost reacționat cu sarea sodică a 3-sulfo-N-succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilat (sulfo-SMCC, linker de tip maleimidic) în soluție de PBS într-un raport molar de 1:5, în scopul introducerii unei grupări maleimidice terminale pe capătul PEG-ului din structura copolimerului. Excesul de molecule de sulfo-SMCC nereacționate a fost îndepărtat prin spălări repetate pentru a obține copolimerul funcționalizat cu maleimidă (Linker-PEG-2000-Mal-Cis-(His)₃₂), adecvat pentru reacția cu Tzm. Ulterior acest copolimer a fost asamblat în miclele (Linker-PEG2K-PHis₃₂) în jurul valorii pH-ului fiziologic (pH = 7,6), datorită hidrofobicității polimerului PHis și hidrofilicității polimerului PEG (Hu et al., 2013; Kim, Bae and Jo, 2005; Lee et al., 2003b).



Schema III.2. Etapele de asamblare a copolimerilor în micle funcționalizate cu anticorp monoclonal: a) legarea covalentă a unui derivat de maleimidă de gruparea aminică terminală din structura PEG-ului, b) transformarea grupărilor amino libere din Tzm-ul nemodificat (Tzm-NH₂) în grupări tiol (Tzm-SH) folosind reactivul Traut și, respectiv, c) autoasamblarea moleculelor de copolimer funcționalizat cu linker de tip maleimidic în micle bine definite, urmată de atașarea covalentă a Tzm-SH de suprafața micelilor.

Pentru a funcționaliza miclele Linker-PEG2K-PHis32 cu trastuzumab, Tzm-NH₂ (trastuzumab comercial) a fost reacționat cu reactivul Traut (clorhidrat de 2-iminotiolan) pentru a produce Tzm-SH corespunzător, conform protocolului raportat anterior în literatură (Kulhari et al., 2016). Cuantificarea numărului de grupări tiolice obținute pe fiecare moleculă de Tzm-SH s-a efectuat prin testul Ellman (Ellman, 1959) folosind spectroscopia UV-Vis (figura III.16.), rezultând 3,36 grupări tiol per moleculă de Tzm-SH.

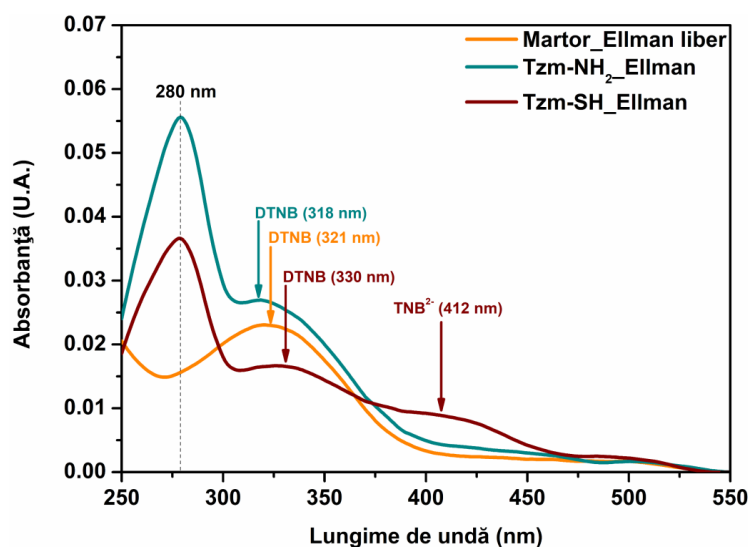


Figura III.16. Spectrele de absorbție UV-Vis ale reactivului Ellman (Martor_Ellman liber), trastuzumabului nemodificat după reacția cu reactivul Ellman (Tzm-NH₂_Ellman) și, respectiv, trastuzumabului modificat după reacția cu reactivul Ellman (Tzm-SH_Ellman).

Variațiile dimensiunilor și modificările de pe suprafața micelilor au fost monitorizate prin măsurarea diametrelor hidrodinamice (figura III.17.), iar legarea covalentă cu succes a Tzm-ului de suprafața micelilor a fost pusă în evidență prin schimbarea valorii potențialului zeta al micelilor (tabelul III.4.).

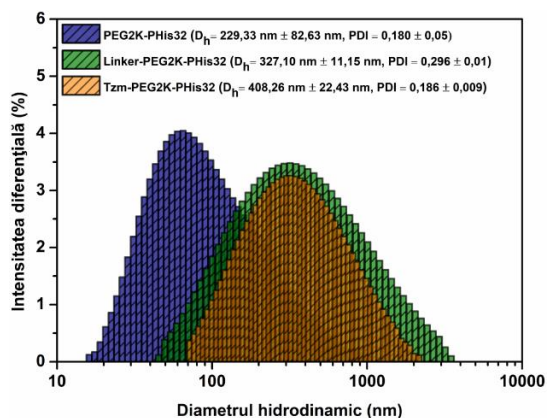


Figura III.17. Diametrele hidrodinamice (D_h) și indicii de polidispersitate (PDI) medii ale micelilor PEG2K-PHis32, Linker-PEG2K-PHis32, Tzm-PEG2K-PHis32 măsurate prin tehnica difuzia dinamică a luminii (DLS), dispersate în PBS la pH = 7,6.

Din punct de vedere morfologic, micellele au fost analizate suplimentar folosind microscopia electronică de transmisie cu baleiaj (STEM) (**figura III.18.**). Diametrele măsurate folosind această tehnică au fost semnificativ mai mici în comparație cu diametrele hidrodinamice determinate prin DLS ((a) micellele PEG2K-PHis cu un diametru de $59,49 \text{ nm} \pm 9,71 \text{ nm}$, (b) Linker-PEG2K-PHis32 cu $78,56 \text{ nm} \pm 7,42 \text{ nm}$ și, respectiv, (c) micellele Tzm-PEG2K-PHis32 care au prezentat un diametru de $104,05 \text{ nm} \pm 11,98 \text{ nm}$). Această reducere a dimensiunii poate fi atribuită deshidratării micelilor care apare în timpul procesului de pregătire a probelor pentru analiza STEM (Peng et al., 2019).

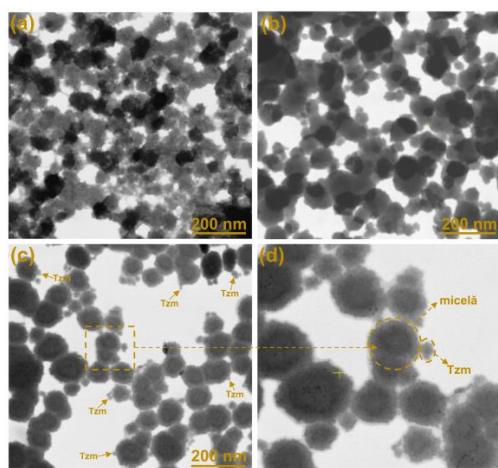


Figura III.18. Imaginile STEM ale micelilor PEG2K-PHis32 (a), Linker-PEG2K-PHis32 (b), Tzm-PEG2K-PHis32 (c) cu mărirea zonei din imaginea (c) unde se pune în evidență atașarea Tzm-ului la suprafața micelilor (d).

Tabel III.4. Valorile medii ale potențialelor zeta (ζ) măsurate prin tehnica difuzia dinamică de lumină (DLS) pentru micellele PEG2K-PHis32, Linker-PEG2K-PHis32 și, respectiv, Tzm-PEG2K-PHis32, dispersate în PBS la pH = 7,6.

Proba	$\zeta^* \text{ (mV)} \pm \text{SD}^*$
PEG2K-PHis32	$7,96 \pm 0,17$
Linker-PEG2K-PHis32	$-3,82 \pm 0,78$
Tzm-PEG2K-PHis32	$-5,53 \pm 0,53$

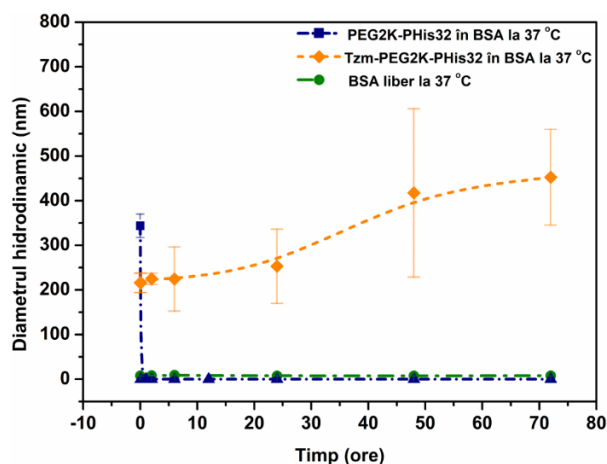


Figura III.20. Variații ale diametrelor hidrodinamice medii pentru micellele PEG2K-PHis32, Tzm-PEG2K-PHis32 și BSA-ul liber măsurate prin DLS în prezență de BSA (70 mg / mL) la 37 °C pe o perioadă de 72 de ore.

Stabilitatea micelilor în prezență de albumină serică bovină (BSA) a fost stabilită prin monitorizarea variațiilor diametrelor hidrodinamice în urma interacțiunii acestora cu moleculele de BSA (Leeman et al., 2018). Studiul de stabilitate a fost realizat la o temperatură de 37 °C (**figura III.20.**) pe parcursul a 72 de ore, utilizând o concentrație a

micelelor peste concentrația critică micelară (CCM) obținută în primul studiu al acestui capitol de teză. Micelele nefuncționalizate după 5 minute de interacțiune cu moleculele de BSA, s-au destabilizat complet. În cazul micелеlor Tzm-PEG2K-PHis32 (**figura III.20.**), în urma interacțiunii cu moleculele de BSA, acestea au prezentat comportamente diferite față de proba anterioară. După 5 minute de interacțiune cu BSA-ul, diametrul hidrodinamic mediu al micелеlor a înregistrat o creștere pe toată perioada de 72 de ore. Această creștere a fost atribuită afinității pronunțate a moleculelor de BSA pentru a forma agregate la suprafața micелеlor (Peng et al., 2019).

Micelele (cele nefuncționalizate cât și cele funcționalizate) au fost biocompatibile pe celule HGF, viabilitate testată la 72 de ore. Pentru a evidenția eficacitatea micелеlor funcționalizate cu Tzm, s-au preparat trei tipuri de micеле PEG2K-PHis32 cu diferite concentrații de Tzm (2, 4 și 8 μg Tzm / mL de micеле). Aceste micеле, precum și Tzm-ul liber (trastuzumab nemodificat, Tzm-NH₂) la cele trei concentrații utilizate pentru funcționalizare, au fost testate pe trei linii celulare specifice cancerului mamar care exprimă receptorul HER2 pe suprafața celulelor, în culturi celulare de tip 2D: SK-BR-3 (linie celulară cu răspuns la Tzm), BT-474 (care prezintă, de asemenea, răspuns la Tzm) și MDA-MB-361 (cu un răspuns intermediar la Tzm) (**figura III.23.**).

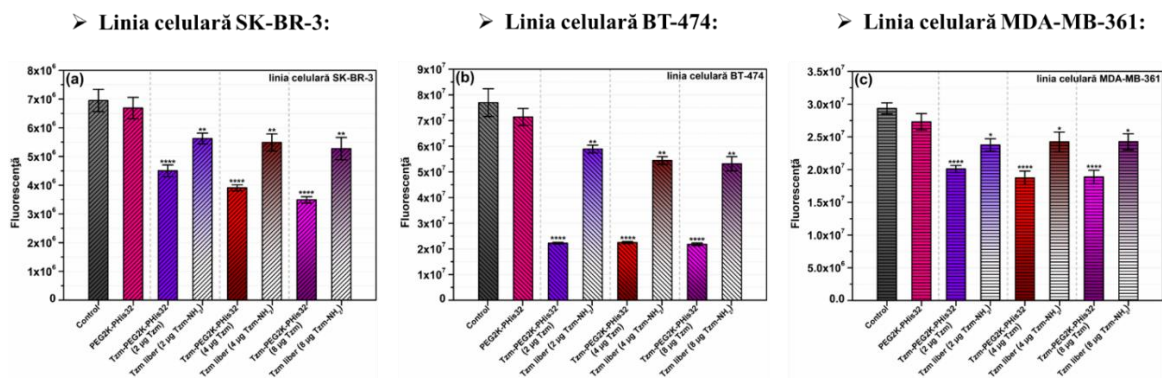


Figura III.23. Citotoxicitatea micелеlor nefuncționalizate, celor funcționalizate cu trei concentrații diferite de Tzm și Tzm liber la trei concentrații egale cu cele folosite la funcționalizare, pe trei linii celulare tumorale specifice cancerului mamar cu răspuns la Tzm (SK-BR-3, BT-474, ANOVA unidirecțională, ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$) și răspuns intermediar (MDA-MB-361, ANOVA unidirecțională, * $p < 0,5$; **** $p < 0,0001$).

Adăugarea Tzm-ului pe suprafața micелеlor (Tzm-PEG2K-PHis32) a avut ca rezultat o diminuare semnificativă a viabilității celulare în toate cele trei tipuri de celule, cu o viabilitate semnificativ mai mică decât cea obținută cu Tzm-ul liber, la toate cele trei concentrații testate (conform **figurii III.23.**).

Acest efect asupra viabilității celulare dat de legarea covalentă a Tzm-ului de suprafața micелеlor a fost obținut și pe culturi celulare 3D (sferoizi) (**figura III.24.**).

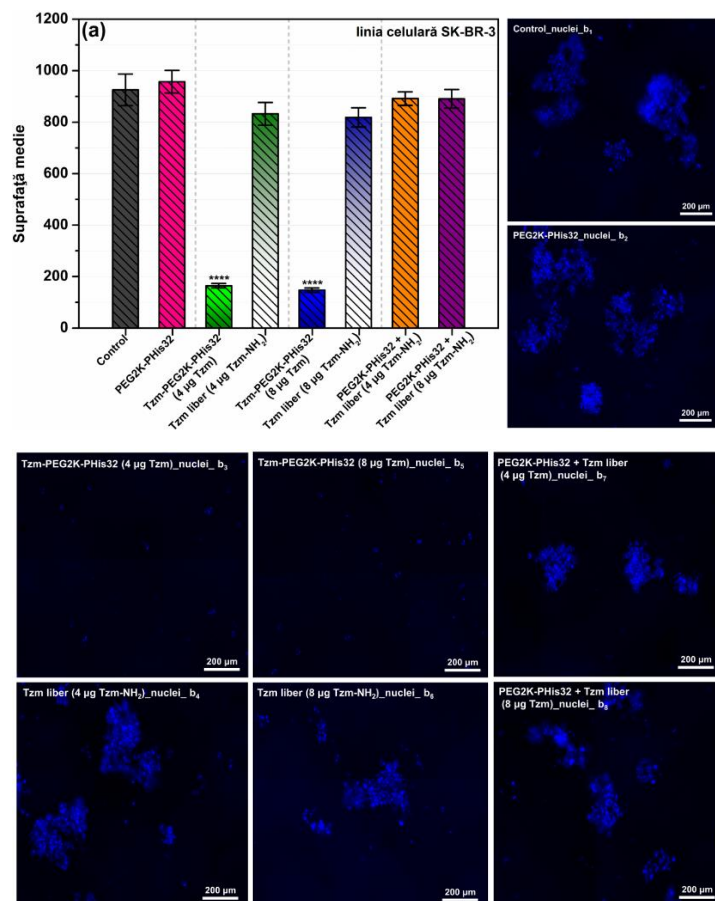


Figura III.24. Eficacitatea miceloror (nefuncționalizate și funcționalizate cu Tzm), Tzm-ului liber și tratamentul mixt (micle nefuncționalizate + Tzm liber) pe culturi de celule SK-BR-3 de tip 3D: a) variația suprafețelor medii ale sferoizilor după 72 de ore de tratament; (b₁₋₈) imagini de fluorescență reprezentative pentru a pune în evidență dezamblarea sferoizilor la interacțiunea cu micellele funcționalizate cu Tzm comparativ cu probe de control (ANOVA unidirecțională, ***p < 0,0001).

Eficacitatea miceloror s-a determinat prin analiza morfologică a sferoizilor (nucleelele celulelor au fost colorate cu un compus fluorescent, care în momentul în care se leagă specific de ADN-ul nuclear duce la o colorație albastră) după tratament prin măsurarea suprafeței acestora. Astfel, analizând **figura III.24. (a, b₃, b₅)**, se poate observa faptul că în cazul liniei celulare SK-BR-3, sferoizii au fost afectați de micellele funcționalizate cu Tzm (Tzm-PEG2K-PHis32 (4 μg Tzm) și Tzm-PEG2K-PHis32 (8 μg Tzm)), cu reducerea semnificativă a suprafeței medii a lor față de Tzm-ul liber testat la cele două concentrații (**figura III.24.b₃, b₅**). Micellele nefuncționalizate, Tzm liber (4 μg și 8 μg) și tratamentul mixt nu au avut niciun efect semnificativ asupra sferoizilor după incubare timp de 72 de ore. Rezultatele obținute pe linia celulară SK-BR-3 s-au obținut și pe linia celulară MDA-MB-361 (care prezintă răspuns intermediar la Tzm).

CONCLUZII GENERALE

Rezultatele obținute în cadrul tezei de doctorat intitulată „**Noi abordări pentru dezvoltarea de nanosisteme polimerice funcționalizate cu aplicații în nanomedicină**” au dus la o serie de concluzii generale aferente fiecărui capitol din a doua parte a acestei teze cuprinzând rezultatele personale, astfel:

Capitolul II:

➤ S-au sintetizat nanoparticule magnetice (NPM) cu diametrul mediu de aproximativ 9 nm obținut prin TEM, folosind pentru sinteză metoda coprecipitării a sărurilor de fier (II) și (III) în mediu bazic.

➤ S-a sintetizat un inițiator de polimerizare de tip ATRP pe bază de L-dopamină, iar structura acestuia a fost pusă în evidență prin spectroscopie de rezonanță magnetică. Inițiatorul a fost atașat prin legături covalente pe suprafața nanoparticulelor magnetice.

➤ Polimerizarea monomerului HEMA pe suprafața nanoparticulelor magnetice sintetizate s-a realizat prin mecanism de polimerizare SI-ATRP. Polimerizarea HEMA a fost inițiată de prezența inițiatorului adecvat în prealabil greșat pe suprafața NPM.

➤ S-a legat covalent acidul folic (implicând două concentrații diferite) de grupările hidroxilice libere de pe catena laterală a fiecărei unități structurale monomerică (HEMA) în prezență de catalizator de tip carbodiimidă.

➤ Toate structurile chimice obținute au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic prin metode specifice caracterizării în stare solidă (FTIR, Raman, XRD, TGA/DTG, DSC, VSM, TEM, STEM) sau lichidă cum ar fi DLS-ul și potențialul zeta. În urma analizei morfologice ale nanoparticulelor obținută prin STEM, se poate concluziona că diametrul mediu al nanoparticulelor acoperite cu PHEMA a fost de 18,9 nm, cele funcționalizate cu prima concentrație de FA a fost de 17,7 nm, pe când cea de a doua concentrație de FA a prezentat un diametru mediu de 15,7nm.

➤ Cuantificarea acidului folic s-a realizat prin spectroscopie UV-Vis, utilizând metoda curbei de calibrare (31,5 μg FA / mg NPM-PHEMA-FA1 și 83,5 μg FA / mg NPM-PHEMA-FA2).

➤ Nanoparticulele magnetice acoperite cu lanțuri de PHEMA funcționalizate cu acid folic au fost biocompatibile pe linia celulară normală NHDF, implicit nu a afectat nici viabilitatea liniilor celulare tumorale MCF-7, HeLa și, respectiv, HepG2.

➤ Cunoscând faptul că liniile celulare tumorale (MCF-7, HeLa, HepG2) supraexprimă receptori de folat pe suprafața membranei lor față de celulele normale (NHDF), s-a demonstrat faptul că absorbția celulară a nanotransportorului funcționalizat cu acid folic a fost semnificativ mai mare față nanoparticulele nefuncționalizate, demonstrată prin valorile mai mari în absorbantă pe liniile celulare tumorale comparativ cu cea normală. Această absorbție a fost demonstrată prin cuantificarea fierului intracelular utilizând metoda tiocianatului.

➤ Spectroscopia de absorbție atomică, a dus la concluzia că odată cu creșterea concentrației de acid folic utilizată la funcționalizarea nanoparticulelor magnetice decorate cu lanțuri de PHEMA, duce la o creștere a absorbției celulare în cazul celulelor tumorale (MCF-7), față de celulele normale (NHDF).

➤ Datorită faptului că magnetizarea de saturație a nanoparticulelor decorate cu lanțuri de PHEMA funcționalizate cu FA au avut o valoare de peste 7 emu / g (valoare minimă acceptată pentru utilizarea unui sistem ca și contrast de imagistică RMN), s-a pus în evidență posibilitatea acestor nanoparticule de a fi folosite ca și agenți de contrast în imagistica RMN.

➤ Pentru demonstrarea versatilității polimerizării de tip ATRP, folosind aceleași nanoparticule magnetice decorate cu inițiatorul sintetizat și atașat la suprafața NPM-urilor, s-au polimerizat trei monomeri de tip metacrilat (HEMA, PEGMA6 și PEGMA10), având lungimi diferite ale lanțului lateral al unităților monomerice, prin mecanism de polimerizare SI-ATRP.

➤ Cei trei polimeri grefați pe suprafața NPM-urilor (PHEMA, PPEGMA6 și PPEGMA10) au fost funcționalizați cu un antimetabolit al acidului folic, metotrexat (MTX), care prezintă dublă funcționalitate, atât de țintire a receptorilor de folat, cât și efect terapeutic prin inhibarea unei enzime implicate în diviziunea celulelor tumorale.

➤ Toate etapele de sinteză pentru obținerea celor trei nanoparticule magnetice decorate cu cei trei polimeri funcționalizați cu MTX au fost caracterizate fizico-chimic prin diferite metode (FTIR, TGA/DTG, DSC, VSM, DLS). Prin microscopie de transmisie cu baleiaj (STEM) s-au obținut nanoparticule sferice cu diametre medii de 17,12 nm, 15,30 nm, 17,16 nm corespunzătoare probelor NPM-PHEMA-MTX, NPM-PPEGMA6-MTX și, respectiv, NPM-PPEGMA10-MTX.

➤ Cuantificarea MTX-ului s-a realizat prin spectroscopie UV-Vis folosind metoda curbei de calibrare.

➤ Nanoparticulele magnetice decorate cu polimeri și cu MTX au fost biocompatibile pe linia celulară normală HGF.

➤ NPM-urile acoperite cu cei trei polimeri funcționalizați cu MTX (NPM-PHEMA-MTX, NPM-PPEGMA6-MTX, NPM-PPEGMA10-MTX) au prezentat un efect toxic pe linia celulară MCF-7 (adenocarcinom mamar), efect demonstrat prin scăderea viabilității celulare sub pragul de 70% , scădere semnificativ mai mare față de medicamentul liber (MTX liber).

În urma concluziilor obținute în Capitolul II, se conturează recomandarea de utilizare a nanoparticulelor magnetice decorate cu polimeri de tip metacrilat ca nanoplatforme teranostice. Această perspectivă promițătoare este susținută de prezența unui nucleu magnetic, ce facilitează aplicarea lor în imagistică, și de dimensiunile lor sub 30 de nm, ceea ce adaugă un aspect crucial. De asemenea, aceste nanoplatforme demonstrează capacitatea de a transporta medicamente. Un avantaj semnificativ al utilizării polimerizării de tip ATRP constă în posibilitatea obținerii de straturi duble de polimeri, deschizând calea pentru funcționalizarea primului strat cu un medicament și a celui de-al doilea cu o moleculă de țintire. Aceste caracteristici esențiale subliniază potențialul considerabil al nanoparticulelor în terapia cancerului. Cu toate acestea, este imperativ să se continue cercetările pentru a evidenția eficacitatea acestui nanotransportor în teste in vivo, reprezentând o etapă crucială înainte de a avansa la testele clinice pe subiecți umani.

Capitolul III:

➤ S-au sintetizat prin tehnica SPPS trei copolimeri pe bază de polietilenglicol - polihistidină (PEG - PHis) cu lungimea lanțului de PEG de 2 kDa și lungimi diferite ale lanțului de PHis (20, 26 și 32 de unități monomerice repetitive de histidină).

➤ S-a determinat concentrația critică micelară a celor trei copolimeri și s-a concluzionat faptul că o creștere a lanțului de PHis duce la o scădere a valorii CCM-ului.

➤ Copolimerii au fost asamblați în miclele neîncărcate și încărcate cu DOX (utilizat ca și compus model datorită fluorescenței sale care duce la o metodă de cuantificare ușoară) de tip „core-shell” în soluții apoase cu PBS la pH fiziologic.

➤ Miclele neîncărcate au fost analizate din punct de vedere morfologic prin DLS în soluții apoase la pH fiziologic, rezultând faptul că o creștere a lungimii lanțului de polihistidină duce la creșterea diametrului hidrodinamic al miclelor, creștere observată și în cazul miclelor încărcate cu DOX.

➤ Prin tehnica STEM s-au pus în evidență structurile de tip core-shell, și influența lungimii secvenței PHis în formarea sistemelor micelare. Creșterea lungimii lanțului de PHis duce la scăderea diametrului miclelor (neîncărcate și încărcate), scădere atribuită compactării lanțurilor de PHis (cu cât crește lungimea lanțului de PHis, cu atât compactarea este mai mare).

➤ Cuantificarea DOX-ului încărcat în miclele s-a efectuat prin fluorescență, folosind metoda curbei de calibrare, eficiența încapsulării și încărcarea medicamentului au crescut odată cu creșterea lanțului de PHis.

➤ În urma studiilor de eliberare controlată a DOX-ului din miclele la pH fiziologic s-a observat că acesta este eliberat din miclele într-un procent mic, ceea ce conduce la faptul că la acest pH miclele sunt stabile și țin încărcat DOX-ul, dar odată cu scăderea pH-ului, concentrația de DOX eliberată crește, ajungând la 50% la un pH = 6,5 într-un interval de 10 ore.

➤ Viabilitatea celulelor MDA-MB-231 specifice cancerului de sân tratate cu soluții micelare neîncărcate nu a scăzut semnificativ față de control (celule netratate) după 72 ore, pe când cele încărcate cu DOX au dus la o scădere a viabilității celulare, dar nu suficient de mare în comparație cu administrarea DOX liber, ceea ce duce la ideea că miclele încărcate cu DOX eliberează medicamentul lent odată cu scăderea valorilor de pH.

Concluziile primului studiu din capitolul III, demonstrează versatilitatea variației lungimii lanțului de polihistidină cu influențarea proprietăților fizico-chimice ale miclelor formate, asigurând transportul și eliberarea unui medicament în mediu extracelular tumoral. Coroborând rezultatele studiului se poate concluziona că miclele pe bază de copolimeri dibloc PEG-PHis pot fi recomandate pentru transportul de medicamente cu eliberare în mediul extracelular tumoral.

Concluziile celui de-al doilea studiu aferent capitolului III:

➤ În prima etapă s-a funcționalizat copolimerul H₂N-PEG-2000-Mal-Cis-(His)₃₂ cu 32 unități de histidină cu un linker de tip maleimidic (Linker-PEG-2000-Mal-Cis-(His)₃₂) și trastuzumabul comercial (Tzm-NH₂) cu grupări tiol, cu ajutorul agentului Traut (transformarea grupărilor aminice libere în grupări tiolice libere). Grupările tiol din structura Tzm-ului tiolat (Tzm-SH) au fost cuantificate prin utilizarea agentului Ellman, implicând spectroscopia UV-Vis.

➤ În etapa următoare, grupările maleimidice din miclele Linker-PEG2K-PHis₃₂ au fost reacționate cu grupările SH din Tzm-SH, rezultând un sistem micelar Tzm-PEG2K-PHis₃₂ greșat cu molecule de Tzm.

➤ Legarea Tzm-SH de miclele Linker-PEG2K-PHis₃₂ s-a pus în evidență prin modificarea potențialului zeta al miclelor rezultate.

➤ Din punct de vedere morfologic, miclele au fost analizate prin STEM, unde s-a pus în evidență suprafața miclelor încărcată cu molecule de Tzm.

➤ Asamblarea în micle la pH = 7,4 și dezasamblarea a fost pusă în evidență prin tehnica NTA (mișcarea Browniană a miclelor).

➤ Studiile de stabilitate în prezență de BSA au indicat faptul că micellele nefuncționalizate s-au dezamblat complet, pe când cele funcționalizate cu Tzm au rămas stabile pe o perioadă de timp de 72 de ore.

➤ Micellele au fost biocompatibile pe linia celulară normală HGF.

➤ În cazul testelor *in vitro* pe trei linii celulare tumorale specifice cancerului de sân (culturi de celule 2D și 3D) micellele funcționalizate cu Tzm au dus la o scădere a viabilității celulare comparativ cu Tzm-ul liber, efect accentuat prin afectarea sferoizilor în culturile 3D (Tzm-ul liber nu a afectat sferoizii).

Rezultatele acestui studiu concluzionează faptul că legarea Tzm-ului de micelle duce la un efect toxic semnificativ mai mare decât Tzm-ul liber, dar în același timp prezintă și o perspectivă legată de mecanismul de acțiune al micellelor funcționalizate cu anticorp monoclonal asupra celulelor tumorale specifice cancerului mamar.

DISEMINAREA REZULTATELOR

Articole publicate în jurnale științifice indexate ISI, ale căror rezultate au făcut conținutul tezei de doctorat:

1. **Ghiarasim, R.**, Simionescu, N., Coroaba, A., Uritu, C. M., Marangoci, N. L., Ibanescu, S. A., & Pinteala, M. (2022). SI-ATRP Decoration of Magnetic Nanoparticles with PHEMA and Post-Polymerization Modification with Folic Acid for Tumor Cells' Specific Targeting. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 155 (IF = 6,2);

2. **Ghiarasim, R.**, Tiron, C. E., Tiron, A., Dimofte, M. G., Pinteala, M., & Rotaru, A. (2022). Solid-Phase Synthesized Copolymers for the Assembly of pH-Sensitive Micelles Suitable for Drug Delivery Applications. *Nanomaterials*, 12(11), 1798 (IF = 5,4);

3. Morarasu, S., Morarasu, B. C., **Ghiarasim, R.**, Coroaba, A., Tiron, C., Iliescu, R., & Dimofte, G. M. (2022). Targeted cancer therapy Via ph-functionalized nanoparticles: A scoping review of methods and outcomes. *Gels*, 8(4), 232 (IF = 5,2);

4. **Ghiarasim, R.**, Varganici, C.D., Simionescu, N., & Pinteala, M.(2024). Synthesis of magnetic nanoparticles coated with three methacrylate-type polymers obtained by SI-ATRP functionalized with methotrexate for antineoplastic activity on MCF-7 cells. *ACS Polymers Au*, în curs de publicare (IF = 3,9).

Articole publicate în jurnale științifice indexate ISI, ale căror rezultate au fost conexe cu subiectul tezei de doctorat (aceste rezultate nu au fost incluse în conținutul tezei):

1. Sardaru, M. C., Rosca, I., Morariu, S., Ursu, E. L., **Ghiarasim, R.**, & Rotaru, A. (2021). Injectable Thixotropic β -Cyclodextrin-Functionalized Hydrogels Based on Guanosine Quartet Assembly. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9179 (IF = 6,2).

În perioada studiilor doctorale, studentul-doctorand Răzvan Ghiarasim a fost membru din echipa de implementare a următoarelor proiecte:

1. „Modular approach to nanoparticle synthesis processes coated with multifunctional polymers for nanomedical applications (**ModNanoMPol**)”, PN-III-P1-1.1-TE-2019-0922;
2. „Restore HER2 dependent sensibility using AXL inhibitors packed in pH dependent nanostructures (**NanoHER2Restore**)”, EEA-RO-NO-2018-0246.

Stagii de cercetare / mobilități realizate în perioada studiilor doctorale:

1. Stagiu de cercetare la Scientific Services Company Otava Ltd., Kiev, Ucraina, în perioada 19.09.2021 - 18.10.2021 (o lună) în cadrul proiectului H2020-MSCA-RISE-2019, *NoBiasFluors* No 872331;
2. Stagiu de cercetare la Naukovo Vyrobnichyj Kooperatyv Lectinotest, Liiov, Ucraina, în perioada 30.06.2023 - 29.08.2023 (două luni) în cadrul proiectului H2020-MSCA-RISE-2019, *NoBiasFluors* No 872331;
3. Stagiu de cercetare la Estonian University of Life Sciences, în perioada 01.10.2023 - 31.10.2023 (o luni) în cadrul proiectului HORIZON-MSCA-2021-SE-01, *VOLATEVS*No 101086360;
4. Mobilitate pentru transportarea unor serii de probe și realizarea unor experimente (24.10.2022 - 29.10.2022, 10.09.2023 - 16.09.2023, 03.03.2024 - 11.03.2024) la un partener din cadrul proiectului *Restore HER2 dependent sensibility using axl inhibitors packed in pH dependent nanostructures* - EEA-RO-NO-2018-0246(NANOHER2RESTORE) din Oslo, Norvegia.

Participări la conferințe științifice naționale / internaționale:

Comunicări orale:

1. Răzvan Ghiarasim, Sorin-Alexandru Ibănescu, Narcisa-Laura Marangoci, Adina Coroabă, Natalia Simionescu, Mariana Pinteală. „Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles coated with a double layer of polymer obtained by SI-ATRP functionalized with the targeting molecule and drug with the property of cleavage in acid pH”. Online communication at the 2nd International Conference on Polymer Science and Composite Materials, Barcelona, Spain, July 05th - 07th, 2021;

2. Răzvan Ghiarasim, Sorin-Alexandru Ibănescu, Cristian-Dragos Varganici, Natalia Simionescu and Mariana Pinteală. „Synthesis of magnetic nanoparticles coated with three methacrylate-type polymers obtained by SI-ATRP functionalized with methotrexate for antineoplastic activity on HeLa cells”. Oral communication at the 5th Autumn School on Physics of Advanced Materials (PAMS-5) September 8 - 15, 2022, in Dubrovnik, Croatia;

3. Răzvan Ghiarasim, Crina Elena Tiron, Adrian Tiron, Mihail-Gabriel Dimofte, Mariana Pinteală and Alexandru Rotaru. „Solif-phase synthesis copolymers for the assembly of pH-sensitive micelles suitable for drug delivery applications”. Comunicare orală la Conferința Națională de Chimie, CNChim-2022, ediția a XXXVI-a, 04 - 07 octombrie 2022, Călimănești - Căciulata, județul Vâlcea, România;

4. Răzvan Ghiarasim, oral presentation „Poly(ethylene glycol)-polyhistidine copolymers synthesized by solid-phase peptide synthesis: self-assembly into pH-responsive micelles for targeted drug delivery applications”, 12th International Symposium “Polyimides & High-Performance Materials” stePI12, 4 - 7 june, 2023, Montpellier Sud de France, France.

Postere:

1. Răzvan Ghiarasim, Sorin-Alexandru Ibănescu, Narcisa-Laura Marangoci, Adina Coroabă, Natalia Simionescu, Mariana Pinteală. „Synthesis of magnetic nanoparticles coated with pHEMA functionalized with doxorubicin and folic acid for cancer therapy”. Poster at the 23rd International Conference 19 - 22 August 2021 Burgas, Bulgaria, Materials, Methods & Technologies;

2. Răzvan Ghiarasim, Lucian Bahrin, Bogdan Crăciun, Crina Tiron, Gabriel Dimofte and Mariana Pinteală. „Synthesis, characterization and preliminary testing of doxorubicin loaded poly(L-histidine)-PEG copolymer micelles as pH sensitive drug delivery

systems”. Poster at the 23rd International Conference 19 - 22 August 2021 Burgas, Bulgaria, Materials, Methods & Technologies;

3. Răzvan Ghiarasim, Sorin-Alexandru Ibănescu, Narcisa-Laura Marangoci, Adina Coroabă, Natalia Simionescu and Mariana Pinteală. „Nanoparticule magnetice decorate cu poli(2-hidroxiethyl metacrilat) funcționalizate cu acid folic ca nanopurtător de țintire inteligent prin supraexprimarea receptorului de folat pe suprafața celulelor tumorale”. Sesiunea de comunicări științifice a studenților, masteranzilor și doctoranzilor ”Chimia – Frontieră deschisă spre cunoaștere”, ediția a XII-a, Iași, 11 - 12 noiembrie 2021, Organizator: Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, Facultatea de Chimie;

4. Răzvan Ghiarasim, Crina Elena Tiron, Gabriel Dimofte, Mariana Pinteală and Alexandru Rotaru. „Solid phase synthesized polyhistidine-based copolymers for the assembly of pH-sensitive micelles suitable for drug delivery in cancer extracellular environment”. Poster la Conferința Internațională 7th International Congress on Biomaterials and Biosensors (BIOMATSEN), 22-28 April 2022, Mugla, Turcia;

5. Răzvan Ghiarasim, Crina Elena Tiron, Adrian Tiron, Mihail-Gabriel Dimofte, Mariana Pinteală. „Copolymers-based micelles obtained by solid-phase synthesis with controlled disassembly property triggered by pH variation for drug delivery applications”. Poster at 14th International Conference on Physics of Advanced Materials (IPCAM-14), 8 - 15 September 2022, Dubrovnik, Croatia;

6. Răzvan Ghiarasim, Crina Elena Tiron, Adrian Tiron, Mihail-Gabriel Dimofte, Alexandru Rotaru and Mariana Pinteală, poster, „Studies of polyhistidine-polyethylene glycol copolymers for the assembly of pH-sensitive micelles able to covalently attach trastuzumab for efficient breast cancer treatment.”, Frontiers in Polymer Science 2023 (POLY2023), 29 may - 1 june 2023, Gothenburg, Sweden;

7. Răzvan Ghiarasim, Cristian-Dragoș Varganici, Natalia Simionescu, Sorin-Alexandru Ibănescu and Mariana Pinteală, poster, “ Three examples of polymers obtained by SI-ATRP on magnetic nanoparticles surface with post-polymerization modification with methotrexate as efficient drug carriers for antineoplastic activity on MCF-7 cell line.”, Frontiers in Polymer Science 2023 (POLY2023), 29 may - 1 june 2023, Gothenburg, Sweden.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Adam-Artigues, A., Arenas, E.J., Martínez-Sabadell, A., Brasó-Maristany, F., Cervera, R., Tormo, E., Hernando, C., Martínez, M.T., Carbonell-Asins, J., Simón, S., Poveda, J., Moragón, S., Zazo, S., Martínez, D., Rovira, A., Burgués, O., Rojo, F., Albanell, J., Bermejo, B., Lluch, A., Prat, A., Arribas, J., Eroles, P. and Cejalvo, J.M. (2022) 'Targeting HER2-AXL heterodimerization to overcome resistance to HER2 blockade in breast cancer', *Science Advances*, 8(20).
- Anghelache, M., Turtoi, M., Petrovici, A.R., Fifere, A., Pinteala, M. and Calin, M. (2021) 'Development of Dextran-Coated Magnetic Nanoparticles Loaded with Protocatechuic Acid for Vascular Inflammation Therapy', *Pharmaceutics*, 13(9), p. 1414.
- Arruebo, M., Vilaboa, N., Sáez-Gutierrez, B., Lambea, J., Tres, A., Valladares, M. and González-Fernández, Á. (2011) 'Assessment of the Evolution of Cancer Treatment Therapies', *Cancers*, 3(3), pp. 3279–3330.
- Baek, S., Singh, R.K., Khanal, D., Patel, K.D., Lee, E.-J., Leong, K.W., Chrzanowski, W. and Kim, H.-W. (2015) 'Smart multifunctional drug delivery towards anticancer therapy harmonized in mesoporous nanoparticles', *Nanoscale*, 7(34), pp. 14191–14216.
- Barbey, R., Lavanant, L., Paripovic, D., Schüwer, N., Sugnaux, C., Tugulu, S. and Klok, H.-A. (2009) 'Polymer Brushes via Surface-Initiated Controlled Radical Polymerization: Synthesis, Characterization, Properties, and Applications', *Chemical Reviews*, 109(11), pp. 5437–5527.
- Beagan, A.M., Alghamdi, A.A., Lahmadi, S.S., Halwani, M.A., Almeataq, M.S., Alhazaa, A.N., Alotaibi, K.M. and Alswieleh, A.M. (2020) 'Folic Acid-Terminated Poly(2-Diethyl Amino Ethyl Methacrylate) Brush-Gated Magnetic Mesoporous Nanoparticles as a Smart Drug Delivery System', *Polymers*, 13(1), p. 59.
- Beers, K.L., Boo, S., Gaynor, S.G. and Matyjaszewski, K. (1999) 'Atom Transfer Radical Polymerization of 2-Hydroxyethyl Methacrylate', *Macromolecules*, 32(18), pp. 5772–5776.
- Behrendt, R., White, P. and Offer, J. (2016) 'Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis', *Journal of Peptide Science*, 22(1), pp. 4–27.
- Bondalapati, S., Jbara, M. and Brik, A. (2016) 'Expanding the chemical toolbox for the synthesis of large and uniquely modified proteins', *Nature Chemistry*, 8(5), pp. 407–418.
- Carrillo-Castillo, T.D., Castro-Carmona, J.S., Luna-Velasco, A. and Zaragoza-Contreras, E.A. (2020) 'pH-responsive polymer micelles for methotrexate delivery at tumor microenvironments', *e-Polymers*, 20(1), pp. 624–635.
- Chen, M., Chen, C., Shen, Z., Zhang, X., Chen, Y., Lin, F., Ma, X., Zhuang, C., Mao, Y., Gan, H., Chen, P., Zong, X. and Wu, R. (2017) 'Extracellular pH is a biomarker enabling detection of breast cancer and liver cancer using CEST MRI', *Oncotarget*, 8(28), pp. 45759–45767.

- Cipolla, D., Wu, H., Salentinig, S., Boyd, B., Rades, T., Vanhecke, D., Petri-Fink, A., Rothin-Rutishauser, B., Eastman, S., Redelmeier, T., Gonda, I. and Chan, H.K. (2016) 'Formation of drug nanocrystals under nanoconfinement afforded by liposomes', *RSC Advances*, 6(8), pp. 6223–6233.
- Crezee, J., Franken, N.A.P. and Oei, A.L. (2021) 'Hyperthermia-Based Anti-Cancer Treatments', *Cancers*, 13(6), p. 1240.
- El-Faham, A. and Albericio, F. (2011) 'Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup', *Chemical Reviews*, 111(11), pp. 6557–6602.
- Ellman, G.L. (1959) 'Tissue sulfhydryl groups', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), pp. 70–77.
- Ghiarasim, R., Simionescu, N., Coroaba, A., Uritu, C.M., Marangoci, N.L., Ibanescu, S.-A. and Pinteala, M. (2021) 'SI-ATRP Decoration of Magnetic Nanoparticles with PHEMA and Post-Polymerization Modification with Folic Acid for Tumor Cells' Specific Targeting', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), p. 155.
- Ghiarasim, R., Tiron, C.E., Tiron, A., Dimofte, M.-G., Pinteala, M. and Rotaru, A. (2022) 'Solid-Phase Synthesized Copolymers for the Assembly of pH-Sensitive Micelles Suitable for Drug Delivery Applications', *Nanomaterials*, 12(11), p. 1798.
- Gradishar, W.J., O'Regan, R., Rimawi, M.F., Nordstrom, J.L., Rosales, M.K. and Rugo, H.S. (2023) 'Margetuximab in HER2-positive metastatic breast cancer', *Future Oncology*, 19(16), pp. 1099–1112.
- Guimarães, D., Lager, F., Renault, G., Guezguez, J., Burnet, M., Cunha, J., Cavaco-Paulo, A. and Nogueira, E. (2022) 'Folate-Targeted Liposomal Formulations Improve Effects of Methotrexate in Murine Collagen-Induced Arthritis', *Biomedicines*, 10(2), p. 229.
- Guimarães, D., Noro, J., Loureiro, A., Lager, F., Renault, G., Cavaco-Paulo, A. and Nogueira, E. (2020) 'Increased Encapsulation Efficiency of Methotrexate in Liposomes for Rheumatoid Arthritis Therapy', *Biomedicines*, 8(12), p. 630.
- Gul, S., Khan, S.B., Rehman, I.U., Khan, M.A. and Khan, M.I. (2019) 'A Comprehensive Review of Magnetic Nanomaterials Modern Day Theranostics', *Frontiers in Materials*, 6 Frontiers Media S.A., p. 179. Available at: 10.3389/FMATS.2019.00179/BIBTEX (Accessed: 4 December 2021).
- Gupta, A.K. and Gupta, M. (2005) 'Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles', *Biomaterials*, 26(13), pp. 1565–1573.
- Gupta, J., Bhargava, P. and Bahadur, D. (2014) 'Methotrexate conjugated magnetic nanoparticle for targeted drug delivery and thermal therapy', *Journal of Applied Physics*, 115(17).

- Hu, J., Miura, S., Na, K. and Bae, Y.H. (2013) 'pH-responsive and charge shielded cationic micelle of poly(1-histidine)- block -short branched PEI for acidic cancer treatment', *Journal of Controlled Release*, 172(1), pp. 69–76.
- Israel, L.L., Galstyan, A., Holler, E. and Ljubimova, J.Y. (2020) 'Magnetic iron oxide nanoparticles for imaging, targeting and treatment of primary and metastatic tumors of the brain', *Journal of Controlled Release*, 320 Elsevier, pp. 45–62. Available at: 10.1016/j.jconrel.2020.01.009 (Accessed: 4 December 2021).
- Jahangirian, H., Kalantari, K., Izadiyan, Z., Rafiee-Moghaddam, R., Shameli, K. and Webster, T.J. (2019) 'A review of small molecules and drug delivery applications using gold and iron nanoparticles', *International Journal of Nanomedicine*, Volume 14, pp. 1633–1657.
- Jain, N., Smith, S.W., Ghone, S. and Tomczuk, B. (2015) 'Current ADC Linker Chemistry', *Pharmaceutical Research*, 32(11), pp. 3526–3540.
- Kim, G.M., Bae, Y.H. and Jo, W.H. (2005) 'pH-induced Micelle Formation of Poly(histidine-co -phenylalanine)- block -Poly(ethylene glycol) in Aqueous Media', *Macromolecular Bioscience*, 5(11), pp. 1118–1124.
- Kohler, N., Sun, C., Fichtenholtz, A., Gunn, J., Fang, C. and Zhang, M. (2006) 'Methotrexate-Immobilized Poly(ethylene glycol) Magnetic Nanoparticles for MR Imaging and Drug Delivery', *Small*, 2(6), pp. 785–792.
- Kohler, N., Sun, C., Wang, J. and Zhang, M. (2005) 'Methotrexate-Modified Superparamagnetic Nanoparticles and Their Intracellular Uptake into Human Cancer Cells', *Langmuir*, 21(19), pp. 8858–8864.
- Kulhari, H., Pooja, D., Shrivastava, S., Kuncha, M., Naidu, V.G.M., Bansal, V., Sistla, R. and Adams, D.J. (2016) 'Trastuzumab-grafted PAMAM dendrimers for the selective delivery of anticancer drugs to HER2-positive breast cancer', *Scientific Reports*, 6(1), p. 23179.
- Lee, E.S., Shin, H.J., Na, K. and Bae, Y.H. (2003a) 'Poly(1-histidine)–PEG block copolymer micelles and pH-induced destabilization', *Journal of Controlled Release*, 90(3), pp. 363–374.
- Lee, E.S., Shin, H.J., Na, K. and Bae, Y.H. (2003b) 'Poly(1-histidine)–PEG block copolymer micelles and pH-induced destabilization', *Journal of Controlled Release*, 90(3), pp. 363–374.
- Leeman, M., Choi, J., Hansson, S., Storm, M.U. and Nilsson, L. (2018) 'Proteins and antibodies in serum, plasma, and whole blood—size characterization using asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4)', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(20), pp. 4867–4873.
- Li, M., Neoh, K.-G., Wang, R., Zong, B.-Y., Tan, J.Y. and Kang, E.-T. (2013) 'Methotrexate-conjugated and hyperbranched polyglycerol-grafted Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for

targeted anticancer effects', *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(1–2), pp. 111–120.

Li, S., Sun, Z., Meng, X., Deng, G., Zhang, J., Zhou, K., Li, W., Zhou, L., Gong, P. and Cai, L. (2018) 'Targeted Methotrexate Prodrug Conjugated With Heptamethine Cyanine Dye Improving Chemotherapy and Monitoring Itself Activating by Dual-Modal Imaging', *Frontiers in Materials*, 5.

Lungoci, A.-L., Turin-Moleavin, I.-A., Corciova, A., Mircea, C., Arvinte, A., Fifere, A., Marangoci, N.L. and Pinteala, M. (2019) 'Multifunctional magnetic cargo-complexes with radical scavenging properties', *Materials Science and Engineering: C*, 94, pp. 608–618.

Marega, R., Karmani, L., Flamant, L., Nageswaran, P.G., Valembos, V., Masereel, B., Feron, O., Borght, T. Vander, Lucas, S., Michiels, C., Gallez, B. and Bonifazi, D. (2012) 'Antibody-functionalized polymer-coated gold nanoparticles targeting cancer cells: an in vitro and in vivo study', *Journal of Materials Chemistry*, 22(39), p. 21305.

von Minckwitz, G., Huang, C.-S., Mano, M.S., Loibl, S., Mamounas, E.P., Untch, M., Wolmark, N., Rastogi, P., Schneeweiss, A., Redondo, A., Fischer, H.H., Jacot, W., Conlin, A.K., Arce-Salinas, C., Wapnir, I.L., Jackisch, C., DiGiovanna, M.P., Fasching, P.A., Crown, J.P., Wülfing, P., Shao, Z., Rota Caremoli, E., Wu, H., Lam, L.H., Tesarowski, D., Smitt, M., Douthwaite, H., Singel, S.M. and Geyer, C.E. (2019) 'Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer', *New England Journal of Medicine*, 380(7), pp. 617–628.

Modi, S., Jacot, W., Yamashita, T., Sohn, J., Vidal, M., Tokunaga, E., Tsurutani, J., Ueno, N.T., Prat, A., Chae, Y.S., Lee, K.S., Niikura, N., Park, Y.H., Xu, B., Wang, X., Gil-Gil, M., Li, W., Pierga, J.-Y., Im, S.-A., Moore, H.C.F., Rugo, H.S., Yerushalmi, R., Zagouri, F., Gombos, A., Kim, S.-B., Liu, Q., Luo, T., Saura, C., Schmid, P., Sun, T., Gambhire, D., Yung, L., Wang, Y., Singh, J., Vitazka, P., Meinhardt, G., Harbeck, N. and Cameron, D.A. (2022) 'Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer', *New England Journal of Medicine*, 387(1), pp. 9–20.

Mohammed, M.O., Alkubaisi, H.M.M. and Haj, N.Q. (2020) 'A new prodrug and bioactivity evaluation of methotrexate based on Chitosan', *Heliyon*, 6(6), p. e04223.

Nahta, R., Yu, D., Hung, M.-C., Hortobagyi, G.N. and Esteva, F.J. (2006) 'Mechanisms of Disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer', *Nature Clinical Practice Oncology*, 3(5), pp. 269–280.

Najafian, N., Shanehsazzadeh, S., Hajesmaeelzadeh, F., Lahooti, A., Gruettner, C. and Oghabian, M.A. (2015) 'Effect of Functional Group and Surface Charge of PEG and Dextran-Coated USPIO as a Contrast Agent in MRI on Relaxivity Constant', *Applied Magnetic Resonance*, 46(6), pp. 685–692.

Nanda, J.S. and Lorsch, J.R. (2014) 'Labeling a Protein with Fluorophores Using NHS Ester Derivatization', in *Methods in Enzymology*, pp. 87–94.

- Nguyen, H.T., Tran, T.H., Thapa, R.K., Phung, C.D., Shin, B.S., Jeong, J.-H., Choi, H.-G., Yong, C.S. and Kim, J.O. (2017) 'Targeted co-delivery of polypyrrole and rapamycin by trastuzumab-conjugated liposomes for combined chemo-photothermal therapy', *International Journal of Pharmaceutics*, 527(1–2), pp. 61–71.
- Nosrati, H., Salehiabar, M., Davaran, S., Danafar, H. and Manjili, H.K. (2018) 'Methotrexate-conjugated L-lysine coated iron oxide magnetic nanoparticles for inhibition of MCF-7 breast cancer cells', *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44(6), pp. 886–894.
- Peng, J., Chen, J., Xie, F., Bao, W., Xu, H., Wang, H., Xu, Y. and Du, Z. (2019) 'Herceptin-conjugated paclitaxel loaded PCL-PEG worm-like nanocrystal micelles for the combinatorial treatment of HER2-positive breast cancer', *Biomaterials*, 222, p. 119420.
- Poletto, G., Evangelista, L., Venturini, F., Gramegna, F., Seno, F., Moro, S., Vettor, R., Realdon, N. and Cecchin, D. (2022) 'Nanoparticles and Radioisotopes: A Long Story in a Nutshell', *Pharmaceutics*, 14(10), p. 2024.
- Rowe, M.D., Chang, C.-C., Thamm, D.H., Kraft, S.L., Harmon, J.F., Vogt, A.P., Sumerlin, B.S. and Boyes, S.G. (2009) 'Tuning the Magnetic Resonance Imaging Properties of Positive Contrast Agent Nanoparticles by Surface Modification with RAFT Polymers', *Langmuir*, 25(16), pp. 9487–9499.
- Samaritoni, J., Martynow, J., O'Donnell, M. and Scott, W. (2018) 'Preparation and Use of a General Solid-Phase Intermediate to Biomimetic Scaffolds and Peptide Condensations', *Molecules*, 23(7), p. 1762.
- Schena, E., Saccomandi, P. and Fong, Y. (2017) 'Laser Ablation for Cancer: Past, Present and Future', *Journal of Functional Biomaterials*, 8(2), p. 19.
- Sharma, R., Borah, S.J., Bhawna, Kumar, S., Gupta, A., Singh, P., Goel, V.K., Kumar, R. and Kumar, V. (2022) 'Functionalized Peptide-Based Nanoparticles for Targeted Cancer Nanotherapeutics: A State-of-the-Art Review', *ACS Omega*, 7(41), pp. 36092–36107.
- Singh, U., Morya, V., Rajwar, A., Chandrasekaran, A.R., Datta, B., Ghoroi, C. and Bhatia, D. (2020) 'DNA-Functionalized Nanoparticles for Targeted Biosensing and Biological Applications', *ACS Omega*, 5(48), pp. 30767–30774.
- Steinhauser, I., Spänkuch, B., Strebhardt, K. and Langer, K. (2006) 'Trastuzumab-modified nanoparticles: Optimisation of preparation and uptake in cancer cells', *Biomaterials*, 27(28), pp. 4975–4983.
- Sung, Y.K. and Kim, S.W. (2020) 'Recent advances in polymeric drug delivery systems', *Biomaterials Research*, 24(1), p. 12.
- Valabrega, G., Montemurro, F. and Aglietta, M. (2007) 'Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer', *Annals of Oncology*, 18(6), pp. 977–984.

Xie, W., Guo, Z., Gao, F., Gao, Q., Wang, D., Liaw, B., Cai, Q., Sun, X., Wang, X. and Zhao, L. (2018) 'Shape-, size- and structure-controlled synthesis and biocompatibility of iron oxide nanoparticles for magnetic theranostics', *Theranostics*, 8(12), pp. 3284–3307.

Yamada, Y. (2020) 'Dimerization of Doxorubicin Causes Its Precipitation', *ACS Omega*, 5(51), pp. 33235–33241.

Zhao, Y., Zheng, H., Wang, X., Zheng, X., Chen, Y., Fei, W., Zheng, Y., Wang, W. and Zheng, C. (2020) '<p>Enhanced Percutaneous Delivery of Methotrexate Using Micelles Prepared with Novel Cationic Amphipathic Material</p>', *International Journal of Nanomedicine*, Volume 15, pp. 3539–3550.