

UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE INTEGRATIVĂ

TEZA DE DOCTORAT

Rezumat

Conducător științific:

Prof. Dr. Manuela BANCIU

Doctorand:

Saketh Reddy RANAMALLA

Conducător științific în cotutelă:

Prof. Dr. Ioan TOMUȚA

Universitatea de Medicină și Farmacie

"Iuliu Hațieganu"

Cluj-Napoca

2024

UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE INTEGRATIVĂ

TEZA DE DOCTORAT

Rezumat

**Abordări terapeutice ale osteoartritei bazate pe sisteme
farmaceutice de transport ale oligonucleotidelor**

Conducător științific:

Prof. Dr. Manuela BANCIU

Doctorand:

Saketh Reddy RANAMALLA

Conducător științific în cotutelă:

Prof. Dr. Ioan TOMUȚA

Universitatea de Medicină și Farmacie

"Iuliu Hațieganu"

Cluj-Napoca

2024

CUPRINS

PREFAȚĂ	1
LISTA DE ABREVIERI	3
SCHIȚA TEZEI.....	7
CAPITOLUL I.....	11
Introducere generală	
1. Fiziopatologia osteoartritei	12
1.1. Factorii de risc implicați în inducerea osteoartritei	13
1.2. Limitările tratamentelor actuale	14
2. O vedere de ansamblu asupra sistemelor supramoleculare de transport pentru material genetic si medicamente în medicina regenerativă	15
2.1. Tipuri de sisteme supramoleculare utilizate în medicina regenerativă	16
2.2. Sisteme supramoleculare de transport pentru material genetic si medicamente pentru regenerarea cartilajelor	27
2.3. Mecanismul de autoasamblare și forțele implicate	30
2.4. Considerații privind formularea și tehnicile de preparare	34
2.5. Caracterizarea sistemelor supramoleculare	40
2.6. Studii de biocompatibilitate <i>in vitro</i> și <i>in vivo</i>	45
2.7. Inovații și abordări viitoare pentru îmbunătățirea aplicabilității clinice	53
3. Abordarea de tip calitate prin design (QbD) în dezvoltarea sistemelor supramoleculare de transport pentru terapia genică	59
SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI.....	93
CAPITOLUL II	95
Abordarea de tip calitate prin design (QbD) pentru optimizarea hidrogelurilor pe bază de acid hialuronic (HA) legat disulfidic	
1. Introducere	96
2. Materiale și metode.....	99

2.1.	Materiale.....	99
2.2.	Aplicarea QbD.....	99
2.3.	Planul experimental.....	100
2.4.	Prepararea polimerilor pe baza de HA modificali cu grupări tiol.....	100
2.4.1.	<i>Sinteza de dihidrazidă utilizată pentru modificarea HA cu grupări cisteinice.....</i>	<i>100</i>
2.4.2.	<i>Modificarea HA cu dihidrazida cisteinei</i>	<i>101</i>
2.4.3.	<i>Studii de RMN privind determinarea gradului de modificare a polimerilor pe bază de HA.....</i>	<i>101</i>
2.5.	Prepararea hidrogelurilor.....	102
2.6.	Caracterizarea hidrogelurilor.....	102
2.6.1.	<i>Proprietăți reologice</i>	<i>102</i>
2.6.2.	<i>Studii de citotoxicitate</i>	<i>102</i>
3.	Resultate și discuții	104
3.1.	Profilul țintă de calitate al produsului	104
3.2.	Analiza modurilor de eșec și a efectelor	106
3.3.	Planuri experimentale.....	110
3.4.	Optimizarea	117
3.4.1.	<i>Diagrama zonei de optim și punctele de referință</i>	<i>117</i>
3.4.2.	<i>Experimente în zona de optim</i>	<i>118</i>
4.	Concluzii.....	121
CAPITOLUL III.....		127
Abordare de tip calitate prin design pentru optimizarea eficienței transfecției nanoparticulelor pe bază de poli(amidoamină) (PAA NP) încărcate cu ARNm		
1.	Introducere	128
2.	Materiale și metode.....	129
2.1.	Materiale.....	129
2.2.	Sinteza polimerilor PAA	130
2.3.	Aplicarea abordării calitate prin design	130
2.3.1.	<i>Plan experimental de screening</i>	<i>131</i>

2.3.2.	<i>Plan experimental de optimizare.....</i>	132
2.3.3.	<i>Prepararea și evaluarea nanoparticulelor de PAA</i>	133
2.4.	<i>Analiza datelor</i>	135
3.	<i>Resultate și discuții</i>	137
3.1.	<i>Abordarea calitate prin design.....</i>	137
3.1.1.	<i>Profilul țintă de calitate al produsului.....</i>	137
3.1.2.	<i>Diagrama Ishikawa</i>	139
3.1.3.	<i>Analiza modurilor de eșec și a efectelor</i>	140
3.2.	<i>Diagrama zonei de optim și punctele de referință.....</i>	152
4.	<i>Concluzii.....</i>	155
CAPITOLUL IV		161
Abordare de tip calitate prin design pentru dezvoltarea de lipoplecși co-încărcați cu curcumină și siARN pentru combaterea inflamație și stresului oxidativ asociate osteoartritei		
1.	<i>Introducere</i>	162
2.	<i>Materiale și metode</i>	165
2.1.	<i>Materiale.....</i>	165
2.2.	<i>Sinteza siARN luciferasei</i>	166
2.3.	<i>Prepararea și evaluarea lipozomilor cationici încărcăți cu curcumină.....</i>	166
2.3.1.	<i>Dezvoltarea lipozomilor cationici încărcăți cu curcumină bazată pe abordarea calitate prin design</i>	166
2.3.2.	<i>Prepararea lipozomilor cationici încărcăți cu curcumină și a lipoplecșilor.....</i>	168
2.3.3.	<i>Caracterizarea lipozomilor cationici încărcăți cu curcumină și a lipoplecșilor....</i>	168
2.3.4.	<i>Evaluarea in vitro a lipozomilor cationici</i>	170
2.4.	<i>Lipozomilor cationici încărcăți cu curcumină optimizați prin zona de optim</i>	171
2.4.1.	<i>Caracterizarea lipozomilor cationici încărcăți cu curcumină din zona de optim</i>	171
2.4.2.	<i>Evaluarea suplimentară a lipozomilor cationici încărcăți cu curcumină din zona de optim</i>	171

2.4.3. Evaluarea efectului antioxidant a lipozomilor cationici încărcăți cu curcumină	173
2.4.4. Evaluarea efectului antiinflamator a lipoplecșilor	174
2.5. Analiza statistică	177
3. Rezultate și discuții	178
3.1. Abordarea calitate prin design.....	178
3.1.1. Definirea profilului țintă de calitate a produsului și evaluarea riscurilor prin intermediul analizei modurilor de eșec și a efectelor	178
3.1.2. Planul experimental și caracterizarea lipozomilor cationici încărcăți cu curcumină și a lipoplecșilor	187
3.1.3. Diagrama zonei de optim	200
3.2. Lipozomi cationici încărcăți cu curcumină și lipoplecși optimizați	201
3.2.1. Caracterizarea lipozomilor cationici încărcăți cu curcumină optimizați.....	201
3.2.2. Evaluarea suplimentară a lipozomilor cationici încărcăți cu curcumină optimizați.....	201
3.2.2.1. Stabilitate	202
3.2.2.2. Captarea în celule in vitro	204
3.2.2.3. Profilul de cedare.....	205
3.2.3. Efectul anti-oxidant pe condrocite umane	207
3.2.4. Efectul anti-inflamatory pe condrocite umane.....	209
4. Concluzii.....	218
CAPITOLUL V.....	229
Concluzii generale	229
1. Concluzii.....	230
2. Originalitatea și noutatea rezultatelor	231
3. Perspective viitoare	232
LISTA PUBLICAȚIILOR INCLUSE ÎN TEZĂ	235
LISTA PUBLICAȚIILOR NEINCLUSE ÎN TEZĂ	235
PARTICIPĂRI LA CONFERINȚE INTERNAȚIONALE	236

PROGRAME DE FORMARE	237
IMPLICAREA ÎN PROIECTE DE CERCETARE	237
MULȚUMIRI	238

CUVINTE CHEIE

Osteoartrita, degenerarea cartilajului, inflamația, stresul oxidativ, sistemele supramoleculare, calitate prin design, planuri experimentale, hidrogeluri de acid hialuronic, nanoparticule de poli(amidoamină), *evaluare in vitro*, lipozomi cationici, lipoplecși.

SCHIȚA TEZEI

1. Fiziopatologia osteoartritei

Osteoartrita (OA) este o boală degenerativă a articulațiilor caracterizată prin degradarea cartilajului, proces manifestat prin durere, rigiditate și tulburări de mișcare. Tratamentele clasice urmăresc reducerea simptomelor nefiind eficiente în ceea ce privește, regenerarea leziunilor cartilajelor afectate. Progresele recente în ingineria biomedicală și medicina regenerativă oferă abordări promițătoare privind înlocuirea cartilajului deteriorat cu țesuturi sau biomateriale modificate. Acești înlocuitori pot oferi un mediu de susținere pentru condrocite, asigurând repararea și regenerarea cartilajelor afectate. Această abordare nu are ca scop doar restabilirea integrității structurale a cartilajului, ci și îmbunătățirea proprietăților sale funcționale, oferind o soluție mai eficientă pe termen lung pentru pacienții cu OA.

Pe lângă înlocuirea țesuturilor, aceste metode inovatoare pot facilita livrarea țintită a agenților terapeutici direct în cartilajul deteriorat. Utilizarea sistemelor avansate de livrare a medicamentelor, cum ar fi hidrogelurile și nanoparticulele, permite eliberarea controlată a medicamentelor pe o perioadă lungă de timp. Această abordare asigură o concentrație mai mare a agentului terapeutic la locul leziunii, minimizând în același timp efectele secundare sistemice. Astfel, hidrogelurile pe bază de acid hialuronic (HA) sunt utilizate nu numai pentru proprietățile lor lubrifiante, ci și ca transportori pentru celule, medicamente antiinflamatoare și factori de creștere. Această funcționalitate multiplă abordează atât simptomele, cât și cauzele care stau la baza OA, inducând atât atenuarea durerii cât și stimularea proceselor de reparare a articulațiilor.

În plus, introducerea posibilității de administrare a ARN-ului mesager (ARNm) și a ARN-ului de interferență cu moleculă mică (siARN) în aceste sisteme de livrare a crescut semnificativ potențialul de regenerare a cartilajelor în OA. Acest potențial depinde de mai multe proprietăți cheie ale materialului genetic și de stabilitatea lor, prin urmare este esențial să se prevină degradarea lor de către nucleaze, necesitând sisteme de livrare protectoare. Livrarea eficientă în țesutului cartilajului este esențială, necesitând sisteme capabile să pătrundă în matricea extracelulară. Specificitatea țintirii asigură că materialul genetic ajunge la celulele adecvate,

minimizând în același timp efectele în afara țintei. În plus, imunogenitatea scăzută este vitală pentru a evita răspunsurile imune nedorite. Mecanismele de eliberare controlată pot oferi efecte terapeutice susținute, iar materialul genetic trebuie să prezinte o suprimare sau expresie eficientă a genelor pentru a modula căile moleculare implicate în repararea cartilajului. Dintre toate sistemele de livrare a materialului genetic, nanoparticulele de poli(amidoamină) (PAA) și lipozomii sunt două vehicule avansate de livrare explorate în acest scop. Nanoparticulele PAA pot încapsula material genetic precum ARNm și pot asigura stabilitatea acestuia și eliberarea țintită în condrocite. Lipozomii cationici pot livra eficient material genetic, cum ar fi siARN, prin fuziunea cu membrana celulară și eliberarea încărcăturii lor utile în celulă. Prin livrarea acestor materiale genetice direct condrocitelor, este posibil să se moduleze comportamentul lor la nivel molecular, sporindu-le capacitatea de a repara și menține cartilajul sănătos. Această terapie genetică țintită reprezintă o abordare de ultimă oră, transformând potențial managementul OA și deschizând calea pentru tratamente personalizate și extrem de eficiente. Împreună, aceste metode noi oferă speranță pentru atenuarea simptomelor osteoartritei și modificarea fundamentală a progresiei bolii. Astfel, cercetarea propusă în această teză de doctorat a urmărit:

- i. Dezvoltarea și optimizarea diferitelor sisteme de livrare prin abordarea *Calitate prin design* (QbD), pentru a transporta eficient substanțe medicamentoase și materialul genetic în condrocite.
- ii. Evaluarea eficacității terapeutice și a biocompatibilității acestor sisteme de livrare în *modele experimentale in vitro*.

Teza de față este alcătuită din 5 capitole care sunt prezentate pe scurt în cele ce urmează.

Capitolul I: Introducere și prezentare generală

Acest capitol oferă o imagine de ansamblu a fiziopatologiei osteoartritei, a factorilor care induc osteoartrita, a limitărilor opțiunilor actuale de tratament și a potențialului sistemelor supramoleculare pentru livrarea de medicamente și gene în osteoartrită. Acesta pregătește terenul pentru capitolele următoare, subliniind importanța sistemelor inovatoare de administrare pentru un tratament eficient al OA.

Capitolul II: Dezvoltarea și optimizarea hidrogelurilor derivate din acid hialuronic ca supliment pentru cartilajul deteriorat

Acest capitol prezintă dezvoltarea și optimizarea hidrogelurilor derivate din acid hialuronic folosind abordarea QbD. Se concentrează pe îmbunătățirea proprietăților reologice ale hidrogelurilor pentru lubrifiere adecvată și absorbție a șocurilor, reducând astfel durerea și crescând funcția articulară. Sunt biocompatibile și ar putea fi utilizate pentru livrarea eficientă a medicamentelor sau genelor în articulație pentru un timp de ședere prelungit. Capitolul detaliază

materialele utilizate, procedura de reticulare, optimizarea și tehnicile de caracterizare utilizate pentru a obține proprietățile dorite ale hidrogelului potrivite pentru ingineria țesuturilor.

Capitolul III: Dezvoltarea și optimizarea nanoparticulelor pe bază de poli(amidoamină) pentru livrarea ARNm

Acest capitol prezintă formularea și optimizarea nanoparticulelor pe bază de poli(amidoamină) pentru livrarea eficientă a ARNm către liniile celulare de condrocite și Jurkat. Acesta pune accentul pe obținerea unei viabilități celulare mai bune și a eficienței de transfecție pentru nanoparticulele de poli(amidoamină) brevetate prin utilizarea abordării QbD. Capitolul acoperă selecția tipului de poli(amidoamină), raportul dintre polimer și material genetic, concentrația de nanoparticule și *evaluările in vitro* ale viabilității celulare și a nivelurilor de transfecție. Acest studiu arată utilizarea abordării QbD pentru screeningul eficient al variabilelor de formulare și maximizarea răspunsurilor terapeutice.

Capitolul IV: Dezvoltarea și optimizarea lipoplecșilor co-încărcați cu curcumină și siARN

Acest capitol explorează dezvoltarea și optimizarea lipoplecșilor co-încărcați cu molecule mici terapeutice precum curcumina împreună cu siRNA pentru repararea condrocitelor în afecțiuni osteoartrite prin abordarea QbD. Include abordarea QbD în detaliu, împreună cu metodele de preparare a lipozomilor și lipoplecșilor, caracterizarea lor fizico-chimică, testarea celulară *in vitro* și optimizarea lor. Formularea optimă a lipozomilor a fost caracterizată și a fost testată pentru stabilitate și profilul de eliberare.

Acest capitol evaluează eficacitatea terapeutică a lipoplecșilor co-încărcați în *modele in vitro* de condrocite aflate în condiții de inflamație și stres oxidativ. Ca urmare, sunt evaluate efectele antiinflamatorii și antioxidante ale formulărilor optime, precum și capacitatea lor de a asigura supraviețuirea și funcționarea condrocitelor în condiții patologice.

Capitolul V: Concluzii și direcții viitoare

Acest capitol rezumă principalele constatări ale tezei, evidențiind diferitele abordări explorate pentru a preveni progresia osteoartritei. Discută implicațiile cercetării pentru viitoarele strategii terapeutice și sugerează potențiale căi pentru investigații ulterioare.

CAPITOLUL I

INTRODUCERE

Osteoartrita (OA) este o tulburare articulară cronică și progresivă care are un impact semnificativ asupra calității vieții a peste 250 de milioane de oameni din întreaga lume. Afectează în primul rând adulții în vârstă, dar incidența sa este în creștere în rândul persoanelor mai tinere din cauza unor factori precum obezitatea, leziunile sportive și predispozițiile genetice. OA se caracterizează prin degradarea treptată a cartilajului articular, care acoperă capetele oaselor în articulații. Acest cartilaj este esențial pentru a oferi o suprafață netedă și lubrifiată pentru mișcarea articulațiilor și transmiterea sarcinii cu frecare minimă. În OA, acest echilibru este perturbat, ceea ce duce la degradarea crescută a componentelor matricei extracelulare (ECM), cum ar fi colagenul de tip II și proteoglicanii.

Fiziopatologia OA implică o interacțiune complexă de factori mecanici, biochimici și genetici. Din punct de vedere mecanic, încărcarea anormală a articulațiilor din cauza nealinerii sau a traumei poate iniția descompunerea cartilajului. Biochimic, condrocitele din cartilajul afectat de OA produc enzime precum metaloproteinazele matricei (MMP) care degradează colagenul și agrecanul, componente esențiale ale ECM. Citokinele inflamatorii precum interleukina-1 beta (IL-1 β) și factorul de necroză tumorală-alfa (TNF- α) exacerbează această degradare. Din punct de vedere genetic, polimorfismele specifice cresc susceptibilitatea la OA prin afectarea componentelor ECM și a căilor inflamatorii.

Mai mulți factori de risc contribuie la dezvoltarea OA. Vârsta este unul dintre cei mai importanți factori de risc, prevalența OA crescând pe măsură ce indivizii îmbătrânesc din cauza uzurii cumulative a articulațiilor și a scăderii capacității de regenerare a cartilajului. Predispoziția genetică joacă, de asemenea, un rol crucial în susceptibilitatea la OA, anumite gene afectând structura cartilajului și metabolismul, crescând riscul de OA. Stresul mecanic cauzat de leziunile articulare sau utilizarea repetitivă poate deteriora cartilajul, în timp ce obezitatea crește stresul asupra articulațiilor care susțin greutatea, cum ar fi genunchii și șoldurile. Anomaliile anatomice, cum ar fi alinierea articulară sau displazia, duc la distribuția inegală a stresului pe cartilaj, accelerând degenerarea. Factorii metabolici precum diabetul contribuie la inflamația sistemică care accelerează descompunerea cartilajului.

Tratamentele actuale pentru OA se concentrează pe ameliorarea simptomelor, mai degrabă decât pe modificarea bolii. Medicamentele precum AINS oferă ameliorarea temporară a durerii, dar prezintă riscuri precum complicații gastrointestinale sau cardiovasculare. Kinetoterapia și controlul greutății ajută la menținerea funcției articulare, dar nu inversează pierderea cartilajului. Intervențiile chirurgicale, cum ar fi înlocuirea articulațiilor, pot oferi o ameliorare semnificativă a

durerii, dar implică riscuri precum infecția sau eșecul protezei. Aceste limitări evidențiază necesitatea unor tratamente care vizează cauzele care stau la baza OA.

Terapiile emergente urmăresc să abordeze aceste limitări concentrându-se pe medicina regenerativă și sistemele avansate de livrare a medicamentelor. Sistemele supramoleculare sunt în fruntea terapiei genice, oferind soluții potențiale pentru tratamentul OA, permițând livrarea țintită și eliberarea susținută a agenților terapeutici. Aceste sisteme, în special, nanoparticulele, lipozomii și hidrogelurile sunt concepute pentru livrarea precisă a materialului genetic sau a medicamentelor și oferă mai multe avantaje în terapia genică și repararea cartilajului. Ele protejează materialul genetic de degradare în medii biologice și pot fi funcționalizate cu liganzi țintiți pentru a spori specificitatea țesuturilor afectate. De asemenea, pot fi proiectate pentru eliberare controlată sau sensibilă la stimuli, asigurând livrarea ca răspuns la semnalele biologice.

Hidrogelurile imită proprietățile naturale ale cartilajului și pot livra medicamente sau celule stem direct în articulații, promovând regenerarea țesuturilor. Nanoparticulele polimerice livrează medicamente sau gene în țesuturi articulare specifice, reducând inflamația și stimulând repararea. Lipozomii oferă o platformă biocompatibilă pentru livrarea atât a medicamentelor, cât și a materialului genetic, sporind eficacitatea acestora și minimizând în același timp expunerea sistemică.

Principiile *Calitate prin design* (QbD) sunt aplicate pentru a se asigura că aceste sisteme îndeplinesc standardele de calitate predefinite prin proiectarea sistematică, optimizarea și controlul atributelor critice de calitate (CQA). Această abordare asigură că sistemele de livrare a terapiei genice sunt proiectate și produse pentru a îndeplini standarde înalte de eficacitate, siguranță și stabilitate.

În concluzie, integrarea sistemelor supramoleculare avansate în tratamentul OA reprezintă un progres semnificativ în depășirea limitărilor actuale ale terapiei. Aceste sisteme inovatoare facilitează livrarea țintită, eliberarea susținută și efectele regenerative îmbunătățite, oferind o abordare cuprinzătoare a managementului AD. Pe măsură ce cercetările continuă, aceste tehnologii au potențialul de a transforma tratamentul OA prin îmbunătățirea rezultatelor pacienților prin terapii mai eficiente care abordează cauzele care stau la baza bolii. Prin integrarea principiilor QbD în dezvoltarea lor, aceste terapii sunt pregătite să ofere soluții mai fiabile și mai eficiente, adaptate nevoilor individuale ale pacienților.

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI

SCOPUL TEZEI

Scopul principal al acestei teze a fost dezvoltarea și optimizarea sistemelor complementare de livrare supramoleculară pentru tratamentul osteoartritei (OA). Cercetarea se concentrează pe proiectarea, optimizarea și evaluarea sistematică a matricelor de hidrogel pe bază de acid hialuronic, a nanoparticulelor polimerice și a formulărilor lipozomale pentru a spori eficacitatea și siguranța agenților terapeutici pentru tratamentul OA.

OBIECTIVELE

1. Optimizarea sistemelor de livrare medicamentelor printr-o abordare de tip Calitate prin design (QbD):

Acest obiectiv implică optimizarea sistematică a hidrogelurilor, nanoparticulelor polimerice și formulărilor lipozomale folosind strategii QbD, asigurând siguranța și eficacitatea agenților terapeutici livrați.

2. Evaluarea eficienței biologice a sistemelor optimizate de livrare prin intermediul studiilor *in vitro*:

Acest obiectiv se concentrează pe testarea performanței biologice a hidrogelurilor, nanoparticulelor și lipozomilor optimizați *in vitro* pentru a evalua potențialul lor terapeutic pentru OA.

CAPITOLUL II

Abordarea de tip calitate prin design (QbD) pentru optimizarea hidrogelurilor pe bază de acid hialuronic (HA) legat disulfidic

Acest studiu explorează dezvoltarea hidrogelurilor de acid hialuronic (HA) legate disulfidic, cu scopul de a oferi o schelă inovatoare pentru ingineria țesuturilor, în special pentru tratamentul bolilor articulare, cum ar fi osteoartrita (OA). OA se caracterizează prin degradarea cartilajului și inflamația cronică, rămâne o provocare medicală semnificativă, terapiile actuale oferind beneficii regenerative limitate. În acest context, hidrogelurile HA sunt promițătoare datorită biocompatibilității, capacității de retenție a apei și capacității de a imita matricea extracelulară (ECM). Cu toate acestea, HA reticulat suferă de stabilitate mecanică slabă și este predispus la degradare enzimatică. Pentru a aborda aceste provocări, lucrarea de față a utilizat o abordare Calitate prin design (QbD) pentru a optimiza sistematic sinteza și proprietățile hidrogelurilor HA legate disulfidic. Concentrându-se pe factorii critici care influențează stabilitatea, performanța

mecanică și biocompatibilitatea gelului, studiul a demonstrat eficacitatea QbD în ingineria biomaterialelor cu proprietăți adaptate pentru aplicații biomedicale.

Faza inițială a cercetării a implicat modificarea HA prin integrarea fracțiunilor de cisteină în coloana vertebrală moleculară. Această modificare a permis formarea legăturilor încrucișate disulfidice la pH fiziologic, asigurând gelificarea in situ în condiții minim invazive. Includerea acestor grupări tiol a abordat limitările inerente ale HA nereticulate, sporind integritatea structurală a hidrogelului și rezistența la degradarea enzimatică. A fost implementat un cadru QbD pentru a obține un control precis asupra proprietăților hidrogelului. Procesul de dezvoltare a început cu definirea unui profil țintă de calitate a produsului (QTPP), care a subliniat parametrii cheie de performanță, cum ar fi timpul de gelificare, proprietățile mecanice și citocompatibilitatea. Pentru aplicațiile intra-articulare, atributele țintă au inclus un modul de stocare (G') peste 2000 Pa, asigurând o elasticitate suficientă pentru a amortiza articulațiile și viabilitatea celulară care depășește 80%, reflectând biocompatibilitatea esențială pentru regenerarea țesuturilor.

Au fost identificate atribute critice de calitate (CQA) pentru a asigura performanța optimă a hidrogelului. Acestea au inclus gradul de modificare (DM), care a influențat direct densitatea de reticulare și proprietățile reologice, cum ar fi modulele de stocare și pierdere (G' și G''). De asemenea, au fost luate în considerare atributele critice ale materialelor (CMA), cum ar fi greutatea moleculară a HA și parametrii critici de proces (CPP), inclusiv raportul molar al reactivilor de cuplare. O analiză a modurilor de eșec și a efectelor (FMEA) a fost utilizată pentru a evalua riscurile în timpul sintezei, identificând variabilele cu cel mai mare potențial de a afecta calitatea hidrogelului. Această evaluare sistematică a ghidat optimizarea condițiilor de sinteză, asigurând reproductibilitatea și robustețea produsului final. Pentru a rafina aceste variabile, a fost adoptată o abordare de proiectare a experimentelor (DoE), concentrându-se pe interacțiunea dintre greutatea moleculară HA, concentrația reactivului de cuplare și efectele lor combinate asupra CQA-urilor hidrogelului.

Procesul de optimizare a arătat că HA cu greutate moleculară mai mare (200 kDa) și un raport de reactiv de cuplare controlat (0,2 mmol echivalent cu HA) au fost esențiale pentru obținerea caracteristicilor dorite ale hidrogelului. Formularea finală a prezentat un grad de modificare de 12%, un modul de stocare de 2321 Pa și un modul de pierdere de 15 Pa. Aceste proprietăți mecanice sunt cruciale pentru aplicațiile portante, deoarece asigură elasticitatea fără a compromite stabilitatea structurală. Testele reologice au evidențiat, de asemenea, capacitatea hidrogelului de a rezista la stresul fiziologic, menținând în același timp integritatea sa funcțională. În special, hidrogelul a prezentat gelificare in situ în condiții fiziologice în 50-60 de minute, facilitată de legăturile dinamice covalente disulfidice. Această caracteristică face ca hidrogelul să fie deosebit

de potrivit pentru aplicații minim invazive, deoarece permite gelificarea localizată după injecția interarticulară.

Biocompatibilitatea hidrogelului a fost evaluată amănunțit folosind o linie celulară de condrocite (C28/I2), care a servit drept model pentru regenerarea cartilajului. Încapsulând aceste celule în matricea de hidrogel, studiul a fost realizat prin colorare vie / moartă și teste de lactat dehidrogenază (LDH) pentru a evalua viabilitatea celulară timp de șapte zile. Rezultatele au demonstrat o viabilitate de peste 85%, confirmând natura non-toxică a hidrogelului și compatibilitatea sa cu țesuturile vii. Acest nivel de biocompatibilitate evidențiază potențialul hidrogelului ca suport pentru livrarea celulelor și promovarea reparării țesuturilor. În plus, studiul a subliniat adaptabilitatea hidrogelului în menținerea integrității structurale în diferite condiții fiziologice, sporind adecvarea acestuia pentru aplicații terapeutice pe termen lung. Studiile ulterioare de degradare au demonstrat puterea hidrogelului, cu rate de degradare controlate în prezența enzimelor sau a mediilor reducătoare, făcându-l ideal pentru livrarea susținută a agenților terapeutici.

Cercetarea oferă o înțelegere cuprinzătoare a modului în care principiile QbD pot fi aplicate pentru a proiecta biomateriale cu proprietăți specifice, reducând variabilitatea și îmbunătățind reproductibilitatea. Utilizarea unui plan experimental a asigurat că formula optimizată a îndeplinit toate criteriile de performanță vizate. Capacitatea hidrogelului de a combina rezistența mecanică, biocompatibilitatea și ușurința de administrare îl poziționează ca un candidat promițător pentru ingineria tisulară și medicina regenerativă. Descoperirile nu numai că avansează dezvoltarea hidrogelurilor pe bază de HA, dar stabilesc și o metodologie scalabilă pentru ingineria biomaterialelor, deschizând calea pentru traducerea lor clinică. Acest studiu reprezintă un pas semnificativ către abordarea nevoilor nesatisfăcute în tratamentul osteoartritei, oferind o nouă schelă care poate sprijini repararea și regenerarea cartilajului.

CAPITOLUL III

Abordare de tip calitate prin design pentru optimizarea eficienței transfecției nanoparticulelor pe bază de poli(amidoamină) (PAA NP) încărcate cu ARNm

Studiul explorează optimizarea nanoparticulelor pe bază de poli(amidoamină) (PAA-NP) pentru livrarea ARNm folosind principiile Calitate prin design (QbD), un cadru care vizează îmbunătățirea proceselor farmaceutice și asigurarea calității produselor. Aceste nanoparticule sunt remarcate pentru proprietățile lor cationice și bioeductibile, care le permit să protejeze materialul

genetic în timpul livrării și să-l elibereze eficient în celule în condiții fiziologice. Studiul se concentrează pe optimizarea parametrilor cheie, cum ar fi raportul polimer-material genetic (raportul P:G) și dozajul ARN pentru a obține eficiența maximă a transfecției, menținând în același timp viabilitatea celulară (CV), un aspect critic al aplicabilității lor în terapia genică.

Nanoparticulele PAA sunt foarte reglabile, permițând un control precis asupra dimensiunii, încărcăturii și stabilității. Legăturile disulfidice sensibile la redox asigură livrarea țintită și eliberarea intracelulară a ARNm, îmbunătățind rezultatele terapeutice. În ciuda acestor avantaje, provocări precum toxicitatea la doze mai mari și livrarea inefficientă către celulele greu de transfectat, cum ar fi celulele Jurkat, au necesitat o abordare sistematică de optimizare. Pentru a rezolva acest lucru, am folosit o metodologie QbD care cuprinde analiza modului de eșec și a efectelor (FMEA) și planuri experimentele (DoE) pentru a evalua și rafina sistematic atributele critice de calitate (CQA). Abordarea QbD a oferit o alternativă mai eficientă la metodele tradiționale "*o variabilă o dată*", reducând variabilitatea experimentală și permițând o înțelegere mai profundă a factorilor interdependenți.

Studiul a început prin definirea profilului țintă de calitate a produsului (QTPP), specificând atributele nanoparticulelor dorite, cum ar fi dimensiunea particulelor, indicele de polidispersie (PDI), potențialul zeta, eficiența transfecției și viabilitatea celulară. Dimensiunea particulelor, ideal între 10-100 nm, a fost esențială pentru absorbția celulară și pătrunderea țesuturilor, în timp ce un PDI îngust ($<0,2$) a asigurat omogenitatea. Un potențial zeta peste +30 mV a fost critic pentru stabilitatea coloidală și interacțiunea cu membranele celulare. Eficiența ridicată a transfecției ($>75\%$) și CV ($>80\%$) au fost prioritizate pentru a obține eficacitate terapeutică, asigurând în același timp siguranță.

Trei polimeri PAA (A, B și C) au fost examinați pentru performanță în diferite rapoarte P:G și doze de ARN. Polimerul B a apărut ca candidat optim, obținând o eficiență și stabilitate superioară a transfecției. Folosind împrăștierea dinamică a luminii (DLS), nanoparticulele au fost caracterizate, prezentând o dimensiune a particulelor sub 100 nm, un $PDI < 0,2$ și un potențial zeta cuprins între +24 și +33 mV, care a îndeplinit criteriile QTPP. Important, polimerul B a prezentat cel mai bun echilibru între viabilitatea celulară și transfecția celulară, având în același timp o dimensiune compactă a particulelor și o densitate de sarcină suficientă pentru a permite încapsularea și livrarea eficientă a materialului genetic.

Pentru a evalua performanța nanoparticulelor, au fost selectate trei linii celulare, HEK293, C28/I2 și Jurkat, fiecare reprezentând medii celulare distincte. Celulele HEK293, utilizate în mod obișnuit pentru studiile de expresie genetică tranzitorie, au servit drept punct de referință datorită ușurinței lor de transfecție. Celulele C28/I2, un model de condrocite relevant pentru terapia osteoartritei, au oferit informații despre transfecție în tipuri de celule specializate. Celulele Jurkat,

cunoscute pentru permeabilitatea lor scăzută la membrană, au reprezentat o provocare semnificativă, făcându-le un model ideal pentru testarea robusteții nanoparticulelor.

Rezultatele au evidențiat rolul critic al raportului P:G și al dozei de ARN în determinarea rezultatelor transfecției. Pentru celulele HEK293, condițiile optimizate au atins o eficiență de transfecție de până la 5541,59 μ unități/ μ g de ARNm β -galactozidază, cu CV peste 90%. În celulele C28/I2, eficiența transfecției a atins 2961,94 μ unități/ μ g, demonstrând potențialul nanoparticulelor pentru aplicații terapeutice în bolile articulare. Celulele Jurkat, în ciuda naturii lor provocatoare, au atins o eficiență de transfecție de 74,98 μ unități/ μ g în condiții optime. Aceste descoperiri evidențiază flexibilitatea polimerului B în adaptarea la diferite medii celulare.

Procesul de optimizare a dezvăluit mai multe informații cheie. Dimensiunile mai mici ale particulelor rezultate din rapoartele P:G adecvate au îmbunătățit absorbția celulară și au redus citotoxicitatea legată de agregare. Natura sensibilă la redox a nanoparticulelor a facilitat eliberarea intracelulară a ARNm, sporind eficacitatea terapeutică. Cu toate acestea, concentrațiile excesive de polimeri sau rapoartele ridicate P:G au dus la reducerea CV, probabil din cauza perturbării membranei induse de nanoparticule și a stresului mitocondrial. Graficele suprafeței de răspuns și ecuațiile de regresie au oferit o înțelegere clară a interacțiunii dintre raportul P:G, dozajul ARN și răspunsurile celulare, permițând o optimizare precisă.

Zona de optim stabilită prin QbD a definit raportul optim P:G (10:1 până la 18:1) și doza ARN (408-480 ng) pentru a obține o eficiență ridicată a transfecției cu toxicitate minimă. Experimentele de validare au confirmat acuratețea modelelor predictive, valorile observate aliniindu-se strâns cu predicțiile. Pentru celulele HEK293 și C28/I2, eficiența transfecției a depășit predicțiile, validând robustețea nanoparticulelor. Deși celulele Jurkat au prezentat CV redus împreună cu o transfecție îmbunătățită, rezultatele au evidențiat potențialul nanoparticulelor de a depăși barierele din liniile celulare greu de transfectat.

În concluzie, studiul demonstrează eficacitatea principiilor QbD în optimizarea nanoparticulelor PAA pentru livrarea ARNm. Integrarea instrumentelor statistice și a testelor bioanalitice a permis identificarea parametrilor critici și a intervalelor optime ale acestora, rezultând o formulare scalabilă și reproductibilă. Aceste descoperiri contribuie la dezvoltarea unor sisteme de livrare a genelor mai sigure și mai eficiente, avansând domeniul nanomedicinei și oferind noi posibilități pentru terapii personalizate. Studiul evidențiază potențialul transformator al QbD în abordarea provocărilor din terapiile bazate pe nanoparticule, deschizând calea pentru traducerea lor clinică.

CAPITOLUL IV

Abordarea de tip calitate prin design pentru dezvoltarea de lipoplecși co-încărcați cu curcumină și siARN pentru combaterea inflamației și stresului oxidativ asociate osteoartritei

Inflamația și stresul oxidativ sunt procese esențiale pentru patogeneza OA, fiind determinate de citokine precum IL-6, IL-8 și IL-1 β , care modulează activitatea enzimelor care degradează matricea extracelulară (cum ar fi metaloproteinazele MMP). Aceste procese duc la degradarea cartilajelor, compromițând funcția articulațiilor. În plus, stresul oxidativ exacerbează daunele prin producerea de specii reactive de oxigen (ROS) care activează căile de semnalizare celulară, inclusiv NF- κ B și MAPK. Acest studiu prezintă o strategie terapeutică inovatoare pentru combaterea OA folosind lipoplecși co-încărcați cu curcumină și siARN pentru suprimarea exprimării IL-6 și IL-8. Curcumina, cunoscută pentru proprietățile sale antiinflamatorii și antioxidante, inhibă NF- κ B și daunele celulare provocate de ROS, în timp ce siRNA suprimă exprimarea citokinelor inflamatorii cu rol important în patogeneza OA.

Această cercetare a utilizat, de asemenea, o abordare Calitate prin design (QbD) pentru a dezvolta și optimiza lipozomii cationici încărcăți cu curcumină (CLCL) pentru livrarea siARN. Lipozomii au fost selectați ca nanopurtători datorită capacității lor de a asigura stabilitatea siARN și de a facilita absorbția celulară. Principiile QbD au asigurat formulări robuste și reproductibile prin optimizarea sistematică a atributelor critice de calitate (CQA), inclusiv dimensiunea particulelor, potențialul zeta, eficiența încapsulării și capacitatea de complexare a siARN. A fost stabilit un profil de produs țintă de calitate (QTPP), specificând cerințele pentru livrarea intra-articulară, inclusiv dimensiunile particulelor de 100-200 nm pentru o penetrare eficientă a cartilajului, un potențial zeta pozitiv (~ 30 mV) pentru a îmbunătăți absorbția celulară și o eficiență ridicată de încapsulare ($>80\%$) pentru curcumină. Evaluarea riscurilor prin diagramele Ishikawa și analiza modului și efectelor de eșec (FMEA) a identificat attributele critice ale materialelor (CMA) și parametrii procesului (CPP), cum ar fi compoziția lipidelor și condițiile de hidratare, influențând proprietățile lipozomilor.

Planurile experimentale (DoE) au fost utilizate pentru a evalua impactul diverșilor factori, inclusiv alegerea fosfolipidelor (DOPE, DOPC, DPPC), concentrația de lipide cationice, conținutul de colesterol și fosfolipide pegilate, asupra caracteristicilor lipozomilor. Ca urmare, DOPE a reprezentat fosfolipidul optim, producând formulări cu dimensiuni mai mici ale

particulelor (139-184 nm), distribuție uniformă ($PDI < 0,2$) și un potențial zeta de +33 până la +52 mV. Lipozomii au demonstrat o eficiență de încapsulare de peste 85% pentru capacitatea de complexare a curcuminei și peste 90% pentru siARN, ceea ce asigură un potențial terapeutic ridicat. De asemenea, s-a stabilit formularea optimă cu o compoziție lipidică de 8 mM DOPE, 2 mM MPEG-DSPE, 5 mM DOTAP și 5 mM colesterol fiind preparată și evaluată în continuare. Atributele calitative ale formulării optime, cum ar fi dimensiunea particulelor (< 200 nm), $PDI (< 0,2)$, potențialul zeta (+30 mV), eficiența încapsulării ($> 80\%$), viabilitatea celulară și transfecția s-au dovedit a fi apropiate de valorile prezise și au îndeplinit cerințele QTPP. Studiile de transfecție folosind siARN pentru exprimarea luciferazei ca sistem model au arătat o eficiență de peste 70% în suprimarea exprimării genei respective, validând eficacitatea lipoplecșilor în livrarea siARN funcțional în condrocite.

De asemenea, au fost efectuate evaluări pentru stabilitatea, absorbția celulară *in vitro* și profilul de cedare din formularea optimă. Studiile de stabilitate au confirmat că lipozomii optimizați (Opt-CLCL) și-au păstrat proprietățile fizico-chimice în timpul celor șase luni de depozitare la 4°C. Liofilizarea cu crioprotectori le-a păstrat integritatea și eficacitatea terapeutică, asigurând depozitarea și transportul pe termen lung. În completare, microscopia confocală a confirmat că după marcarea cu Cy5 formularea optimă de lipozomi a fost internalizată eficient în celule. Studiile de cedare *in vitro*, în condiții care imită articulațiile inflamate, au arătat că agentul curcumina a fost eliberat din lipozomi într-o manieră susținută, profilul de eliberare fiind influențat de pH-ul mediului și de compoziția lipozomală. Această eliberare susținută poate asigura efecte terapeutice prelungite, care sunt esențiale pentru abordarea naturii cronice a OA.

Evaluarea biologică a lipoplecșilor a fost efectuată folosind linia celulară de condrocite umane C28/I2 și condrocite primare izolate de la pacienții cu OA. În condiții inflamatorii induse de IL-1 β , lipoplecșii co-încărcați cu cei doi agenți activi, au redus eficient concentrațiile de citokine (IL-6 și IL-8) atât la nivelul ARNm, cât și la nivelul proteinelor. Efectele antiinflamatorii ale curcuminei au fost atribuite capacității sale de a inhiba activarea NF- κ B și de a reduce producția de ROS, în timp ce suprimarea exprimării genelor mediată de siARN a amplificat efectele terapeutice prin țintirea citokinelor la nivel transcripțional.

În ceea ce privește efectul lipoplecșilor asupra stresului oxidativ intracelular s-au evaluat statusul oxidant total (TOS), capacitatea antioxidantă totală (TAC) și producția de malondialdehidă (MDA) în condrocite tratate cu peroxid de hidrogen. Tratamentul studiat a redus semnificativ markerii de stres oxidativ. Astfel, curcumina a stimulat activitatea enzimatică antioxidantă endogenă iar moleculele de siRNA au determinat reducerea daunelor oxidative prin suprimarea căilor inflamatorii.

În concluzie, acest studiu demonstrează potențialul lipoplecșilor co-încărcați cu siRNA pentru IL-6 și IL-8 și curcumină, ca o nouă strategie terapeutică pentru OA prin abordarea patogenezei sale multifactoriale.

Optimizarea bazată pe QbD asigură reproductibilitatea și scalabilitatea, făcând formularea potrivită pentru dezvoltarea preclinică și clinică ulterioară. Nu în ultimul rând, această tehnologie ar putea fi adaptată pentru producerea de formulări pentru tratarea altor boli inflamatorii și degenerative, asigurând un progres semnificativ în nanomedicină și terapie personalizată. Cercetările viitoare ar trebui să se concentreze pe validarea *in vivo*, explorând farmacocinetica, biodistribuția și eficacitatea pe termen lung în modelele animale pentru a deschide calea pentru aplicații clinice.

CAPITOLUL V

Concluzii generale

Osteoartrita (OA) este o afecțiune debilitantă care continuă să afecteze milioane de oameni la nivel global, tratamentele actuale oferind doar ameliorarea simptomatică, mai degrabă decât abordarea mecanismelor de bază ale bolii. Această teză de doctorat s-a concentrat pe dezvoltarea și optimizarea sistemelor de livrare bazate pe molecule mici care vizează îmbunătățirea tratamentului OA. Mai exact, cercetarea a explorat utilizarea sistemelor supramoleculare, inclusiv hidrogeluri derivate din acid hialuronic (HA), nanoparticule pe bază de poli(amidoamină) (PAA) și lipoplecși, folosind o abordare Calitate prin design (QbD) pentru a îmbunătăți repararea și regenerarea cartilajului prin livrarea eficientă a medicamentelor terapeutice și a materialului genetic condrocitelor.

Primul obiectiv a fost optimizarea hidrogelurilor derivate din HA pentru livrarea intra-articulară a agenților medicamentoși, concentrându-se pe proprietățile reologice, rezistența mecanică și biocompatibilitatea lor. Abordarea QbD a permis un control precis asupra parametrilor formulării, rezultând hidrogeluri care au susținut repararea cartilajului, permițând în același timp livrarea eficientă a medicamentelor și a celulelor. În mod similar, nanoparticulele pe bază de PAA au fost optimizate pentru livrarea ARNm către condrocite, demonstrând o eficiență ridicată a transfecției și citotoxicitate minimă, făcându-le o platformă promițătoare pentru terapia genică în tratamentul OA. În plus, lipozomii încărcăți cu curcumină au fost co-încărcați cu siRNA pentru a viza inflamația și stresul oxidativ, oferind o abordare terapeutică dublă pentru fiziopatologia complexă a OA.

Eficacitatea terapeutică și biocompatibilitatea au fost evaluate în *modele in vitro* de condrocite cultivate în condiții de inflamație și stres oxidativ. Hidrogelurile HA au prezentat o biocompatibilitate excelentă și o livrare eficientă a celulelor, în timp ce nanoparticulele pe bază de PAA au demonstrat o eficiență ridicată de transfecție și livrarea sigură a ARNm. Lipoplecșii co-încărcați au prezentat efecte antiinflamatorii și antioxidante remarcabile, reducând semnificativ markerii de stres oxidativ și asigurând supraviețuirea condrocitelor în condiții de OA.

Cercetarea prezintă mai multe contribuții noi, inclusiv aplicarea QbD pentru a optimiza hidrogelurile derivate din HA, dezvoltarea de nanoparticule pe bază de PAA pentru livrarea de ARNm și formularea lipoplecșilor co-încărcați pentru efecte antiinflamatorii și regenerative combinate. Aceste progrese oferă noi perspective asupra potențialului nanomedicinei pentru tratamentul OA și a altor afecțiuni inflamatorii.

Privind în perspectivă, aceste sisteme de livrare au un potențial larg pentru tratarea altor boli și țesuturi, inclusiv regenerarea osoasă și alte boli degenerative. Vor fi necesare studii suplimentare de optimizare și preclinice pentru a traduce aceste descoperiri în aplicații clinice. Această cercetare pune o bază solidă pentru progresele viitoare în tratamentul OA și medicina regenerativă prin livrarea țintită a medicamentelor și strategii de regenerare a țesuturilor.

LISTA PUBLICAȚIILOR INCLUSE ÎN TEZĂ

Capitolul I

Ranamalla, S.R., Porfire, A.S., Tomuța, I. and Banciu, M., (2022). An Overview of the Supramolecular Systems for Gene and Drug Delivery in Tissue Regeneration. *Pharmaceutics*, 14(8), p.1733.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081733>

Capitolul II

Ranamalla, S.R., Tavakoli, S., Porfire, A.S., Tefas, L.R., Banciu, M., Tomuța, I. and Varghese, O.P., (2024). A quality-by-design approach to optimize disulfide-linked hyaluronic acid hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 339, p.122251.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122251>

Capitolul III

Ranamalla, S.R., Porfire, A.S., Banciu, M. And Tomuța, I., (2024). A Quality-by-design Approach To Optimise The Transfection Efficiency Of Poly (Amidoamine)-Based Nanoparticles With mRNA. *Farmacia*, 72 (3).

<https://doi.org/10.31925/farmacia.2024.3.14>

Capitolul IV

Ranamalla, S.R., Porfire, A.S., Licarete, E., Tefas, L., Parvathaneni, R.P., Varghese, O.P., Sesarman, A., Focsan, M., Tudoran, L.B., Tomuța, I., Banciu, M., (2024). Curcumin and siRNA co-loaded lipoplexes: A QbD strategy to combat osteoarthritis-related inflammation and oxidative stress. *BioRxiv*.

<https://doi.org/10.1101/2024.11.25.625050>

LISTA PUBLICAȚIILOR NEINCLUSE ÎN TEZĂ

Pontes, A.P., van der Wal, S., Ranamalla, S.R., Roelofs, K., Tomuta, I., Creemers, L.B. and Rip, J., 2023. Cell uptake and intracellular trafficking of bio-reducible poly (amidoamine) nanoparticles for efficient mRNA translation in chondrocytes. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 11, p.1290871.

<https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1290871>