

Valorificarea unor noi tinte terapeutice in boala Alzheimer si patologii neurodegenerative asociate ”

Contract Eureka nr. 63/ 2018

Director de proiect: Dr. Marin Gheorghe

Unitatea contractanta: Unitatea Executiva pentru Finantarea Invatamantului Superior, Cercetarii, Dezvoltarii si Inovarii

Durata proiectului: 2018-2021

Bugetul proiectului: 1.824.345,00 lei

De la bugetul de stat:1.108.800,00 lei

Cofinantare: 715.545,00 lei

Sumar:

- Obiective
- Plan de realizare
- Raport de activitate
- Articole & Conferinte
- Buget
- Echipamente
- Echipa de cercetare

Echipa de cercetare:

CO: NANOM MEMS srl

P1: Institutul de biochimie Bucuresti

Personal CO

| Numar | Nume | Titlu stiintific |
|-------|-----------------|------------------|
| 1. | Marin Gheorghe | Dr. |
| 2. | Ioan Gainar | Prof. Dr. |
| 3. | Simona Gheorghe | CS |

Personal P1

| Numar | Nume | Titlu stiintific |
|-------|----------------------------|------------------|
| 1. | Laurentiu Spiridon | Dr. |
| 2. | Spiridon Tacutu | Dr. |
| 3. | Surleac Marius | Dr. |
| 4. | Eliza Cristina Martin | Doctorand |
| 5. | Ionita Mihai | Doctorand |
| 6. | Draga Coleta Sorin Valeriu | Doctorand |

Sumar:

Boala Alzheimer este o boală neurodegenerativă severă, cronică și progresivă, asociată cu pierderi de memorie și tulburări ale cunoașterii, care în cele din urmă duc la moarte.

Descoperirea unei terapii îmbunătățite împotriva bolii Alzheimer este o provocare majoră a acestui secol. Procesul biochimic complet al acestei boli este încă parțial necunoscut, datorită complexității sale. În pofida importanței formării amiloidului proteic în procesul patologic, s-au înregistrat puține progrese în ceea ce privește cercetarea acestei boli, datorită numărului limitat de metode analitice eficiente și probabil datorită lipsei oricărei metode de analiză a fiziologiei agregării amiloidului. Pentru această boală nu există niciun remediu curent, existând numai tratamente pentru simptomele acesteia, existând o nevoie imperioasă de a continua activitatea de cercetare în acest domeniu. Agregarea beta-amiloidului este un proces central în boala Alzheimer. Această agregare produce mulți intermediari cu toxicitate celulară diferită. Aceștia se agregă în neuron formând structuri care provoacă moartea neuronală. În ciuda importanței sale, reacția nu este pe deplin înțeleasă, deoarece agregarea este dinamică și depinde de mai mulți parametri: ea este influențată de concentrația de ioni metalici, de pH, de temperatură, de potential redox etc. Astfel, este extrem de important să se dezvolte un sistem analitic cu ajutorul caruia să poată detecta concentrația de amiloid în etapa de formare a agregatului, care ar fi un indicator potrivit pentru a prezice boala Alzheimer. Deși este dificil să se elaboreze un sistem analitic utilizabil in-vivo, microreactorul in vitro cuplat cu un sistem de detectare adecvat poate analiza cu ușurință moleculele de proteine. Astfel de reactoare microfluidice pot fi miniaturizate sub formă de microcipuri folosind tehnici litografice (NANOM MEMS SRL are o considerabilă experiență în acest domeniu) și pot fi utilizate în punerea la punct a unor medicamente împotriva acestei boli.

Scopul:

Misiunea consorțiului este de a dezvolta o platformă inovatoare de tehnologii, strategii terapeutice și profilactice, inclusiv medicamente și /sau componente ale acestora, care să contribuie la prevenirea și / sau tratamentul bolii Alzheimer și tulburărilor neurodegenerative conexe.

Se urmărește:

- Dezvoltarea unui model funcțional de sistem microfluidic pentru analiza agregării proteinelor; - Realizarea de model funcțional care să analizeze volume de analit situate în domeniul microlitrilor;
- Teste de analiză a materialelor de fabricație;
- Integrarea în sistemul microfluidic a unor elemente sensibile care să permită măsurarea impedanței electrice și a potențialului redox asociate procesului de agregare proteică;
- Analiză bioinformatică a proteinelor implicate în patologii neurodegenerative;
- Modelare moleculară structurală a proteinelor țintă și localizarea zonelor cu diferite grade de conservare;
- Maparea structurală a patternului de variabilitate a secvențelor proteinelor țintă;
- Generare modele 3D ale proteinelor țintă și maparea patternului de variabilitate a secvențelor; - Analiză tendinței de agregare a proteinelor țintă prin simulări de dinamică moleculară, în solvent explicit și implicit, prin diferite metode de integrare de calcul;
- Extractii cu lichide supercritice de substanțe active;
- Dezvoltarea unui model funcțional de pilulă cu eliberare controlată de substanță activă; - Analiză *in silico* a interacției dintre receptori proteici și diferiți inhibitori ai procesului de agregare;

Plan de realizare:

| Nr. crt. | An | Denumire etapa | Data de finalizare a etapei |
|----------|------|--|-----------------------------|
| 1 | 2018 | Etapa 1 - Dezvoltarea unui model functional de sistem microfluidic pentru analiza agregarii proteinelor Analiza bioinformatica a proteinelor implicate in patologii neurodegenerative. Modelare moleculara structurala a proteinelor tinta si localizarea zonelor cu diferite grade de conservare | 31.12.2018 |
| 2 | 2019 | Etapa 2 - Extractii cu lichide supercritice de substante active. Analiza tendintei de agregare a proteinelor tinta prin simulari de dinamica moleculara, in solvent explicit si implicit, prin diferite metode de integrare de calcul | 05.12.2019 |
| 3 | 2020 | Etapa 3 - Dezvoltarea unui model functional de pilula cu eliberare controlata de substanta activa. Analiza in silico a interactiei dintre receptori proteici si diferiti inhibitori ai procesului de agregare. | 05.12.2020 |
| 4 | 2021 | Etapa 4 – Diseminarea rezultatelor | 01.06.2021 |
| 5 | 2022 | Etapa 5 - Raportare efecte economice pt. primul an | 01.06.2022 |
| 6 | 2023 | Etapa 6 - Raportare efecte economice pt. anul II | 01.06.2023 |
| 7 | 2024 | Etapa 7 - Raportare efecte economice pt. anul III | 01.06.2024 |

Buget: Deviz cadru

| VALOAREA CONTRACTULUI | | | | | | | | | | |
|-----------------------|------------------------|--|------------------------|--|------------------------|--|------------------------|--|------------------------|--|
| | 2018 | | 2019 | | 2020 | | 2021 | | Total | |
| | Valoarea buget de stat | Finantarea din alte surse atrase - Cofinantare | Valoarea buget de stat | Finantarea din alte surse atrase - Cofinantare | Valoarea buget de stat | Finantarea din alte surse atrase - Cofinantare | Valoarea buget de stat | Finantarea din alte surse atrase - Cofinantare | Valoarea buget de stat | Finantarea din alte surse atrase - Cofinantare |
| CO | 225000 | 275000 | 381600 | 163545 | 225000 | 275000 | 0 | 2000 | 811600 | 715545 |
| P1 | 93150 | 0 | 90000 | 0 | 90000 | 0 | 4050 | 0 | 277200 | 0 |
| Total | 318150 | 275000 | 471600 | 163545 | 315000 | 275000 | 4050 | 2000 | 1080800 | 735545 |

Raport de activitate: Anul

2018

- Au fost efectuate teste de analiza a materialelor de fabricatie (sticla conductoare electric si transparenta optic, polimeri conductori, microfibre din C, Ag, Au, Pt etc.).
- Au fost proiectate si prototipate structuri microfluidice cu ajutorul carora pot fi caracterizate cantitati minime de proba situate in domeniul microlitrilor:

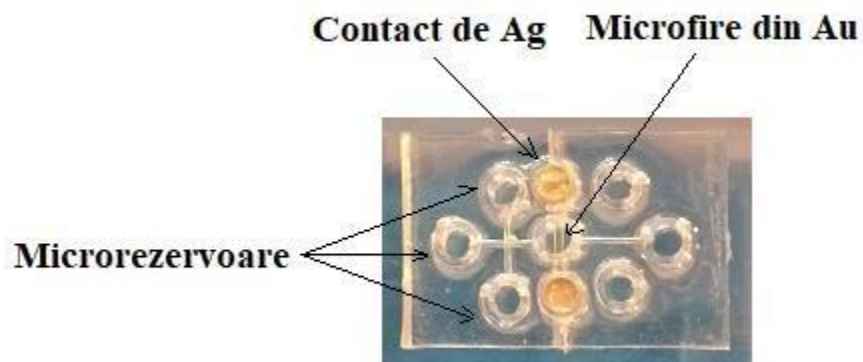
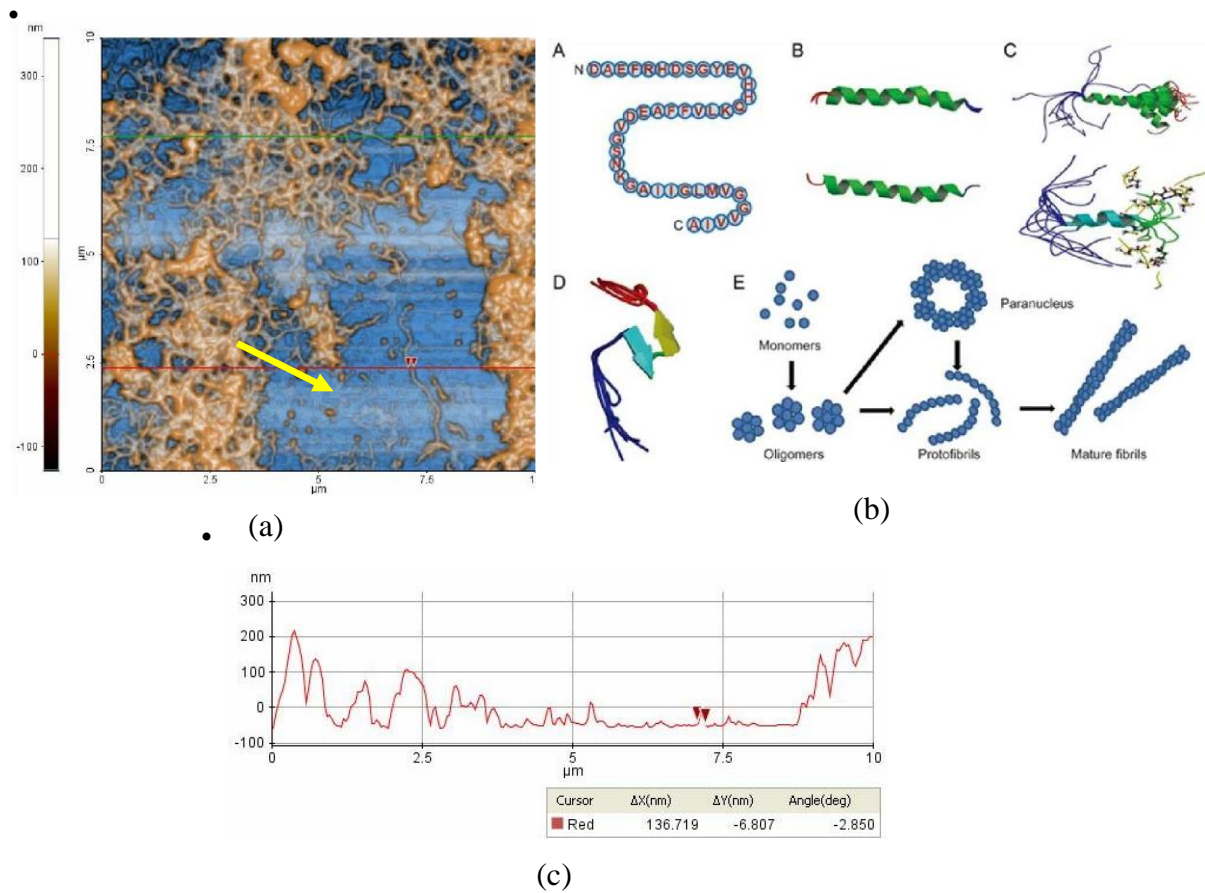


Fig. 1 Sistem microfluidic pentru analiza agregarii proteinelor realizat in PDMS

- A fost efectuata analiza structurii primare a peptidei preproapelina, a fost generat profilul de conservare al secventei ei, fost analizat gradul sau de dezordine structurala si s-a facut predictia structurii sale secundare Anul 2019

- Au fost extrasi (utilizand fluide in stare supercritica) compusi cu actiune potentiala inhibitorie a procesului de agregare proteica asociata patologiei de tipul Alzheimer.
- Au fost identificati parametrii optimi ai procesului de extractie si s-a efectuat analiza compozitionala a uleiurilor.
- Au fost efectuate studii de analiza AFM (modul de lucru noncontact) ale β amiloizilor din fragmentul proteic sintetic βA_{1-42} , inregistrandu-se imagini de topografie, eroare, contrast de faza si amplitudine :



F(a) Imagine AFM bidimensionala, prezentata in mod “contrast imbunatatit”, scanata pe o suprafata de $(10 \times 10) \mu m^2$; **(b)** Structuri ale monomerului βA , fibrilelor și oligomerilor; **(c)** Detalii la scala nanometrica a liniei de profil indicate printr-o linie rosie in Fig. 8(a)

- A fost continuata caracterizarea peptidei apelina13 din punct de vedere farmaco-chimic.
- Au fost realizate experimente repetate de simulari de dinamica moleculara ale complexului apelina13 - receptor, si a apelinei13 si receptorului izolate, in conditii diferite (modele de solvent implicit/explicit) in vederea identificarii elementelor cheie in

interactia dintre apelina si receptor. Aceste pozitii vor fi ulterior vizate in identificarea de potentiale molecule menite sa mimeze situsul de recunoastere al apelinei.

- Au fost preparate sistemele ce urmeaza a fi supuse experimentelor de simulare de dinamica moleculara a agregatelor de amiloid beta utilizand diferite metode, in vederea identificarii a factorilor fizico-chimici implicati in procesul de agregare.
- Au fost realizate simulari de dinamica moleculara in diferite conditii ale receptorului APJR si a complexelor APRJ + apelina17 si APRJ + apelina13, prin care au fost indentificate regiunile cheie de pe suprafata receptorului ce sunt necesare pentru recunoasterea apelinei13 sau apelinei17.

Articole & Conferinte:

2018 Lucrari prezentate oral

- M. Gheorghe, S. Gheorghe, I. Gainar, “Sensitive elements based on carbon microfibres applied to microdevices fabricated with polydimethylsiloxane”, The Annual International Conference of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology, Bucharest, 5-7th Sept. 2018
- “Theoretical approaches disclose the importance of structural dynamics for protein function and interactions”, Milac AL, oral presentation at the Annual International Conference of the Romanian Society of Pure and Applied Biophysics, Bucharest, September 7-10, 2018
- “Dynamics-driven functionality as revealed by molecular simulations of soluble and membranebound proteins”, Milac AL, oral presentation at the Annual International Conference of the RSBMB, Bucharest, Romania, September 5-7th, 2018

2018 Postere

1. “Structural modeling of the human tropomyosin receptor kinase and its interaction with N-acetylserotonin”, Draga S, Milac AL, Petrescu A-J, The Annual International Conference of the RSBMB, Bucharest, Romania, 5-7th September, 2018
2. “Games with a scientific purpose: improved efficiency of manual data extraction from scientific literature”, Ionita M, Milac AL, The Annual International Conference of the RSBMB, Bucharest, Romania, 5-7th September, 2018
3. “Novel computational approaches for preclinical models in Alzheimer’s Disease”, Manoliu L, Avram S, Milac AL, The Annual International Conference of the RSBMB, Bucharest, Romania, 5-7th September, 2018.

2019 Lucrare prezentata oral:

Marin Gheorghe, Simona Gheorghe, Ioan Gainar, "Characterization by Impedance Spectroscopy of the Supercritical Fluid Extraction Process of Peppermint Volatile Oil", lucrare acceptata pentru prezentare orala la RICCCE2019 21 st Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering 4-7 September 2019, Constanta, Romania

Teza de licenta:

"Rolul terapeutic al apelinei in patologii cardiovasculare si patologii asociate.", sustinuta de Laura Manoliu la Universitatea din Bucuresti, Facultatea de Biologie, 2019
Indrumator stiintific: Adina Milac

Cerere Brevet de inventie:

depusa la OSIM cu nr. A/00843/03.12.2019 cu titlul:

Electrozi din fibra de carbon si procedeu de realizare al acestora.

Autor Marin Gheorghe

Anul 2020

- A fost proiectat si realizat experimental un microdispozitiv care permite eliberarea controlata de substante active.
- Au fost proiectate si realizate structure electrodice pe support flexibil pentru determinari electroanalitice:



Figura 1. Structura electrodice cu 3 electrozi depusa pe support flexibil utilizata pentru determinarea concentratiei de dopamina si acid uric [1,2].

- Au fost identificați factorii structurali esențiali pentru interacția între proteinele țintă și inhibitorii procesului de agregare (IBAR).

Articole publicate:

1. C.Varodi, F. Pogacean, M. Gheorghe, V. Mirel, M. Coros, L. Barbu-Tudoran, R. I. Stefan-van Staden and S. Pruneanu,

“Stone Paper as a New Substrate to Fabricate Flexible Screen-Printed Electrodes for the Electrochemical Detection of Dopamine” *Sensors* 2020, 20(12), 3609; <https://doi.org/10.3390/s20123609>

2. C. Varodi, F. Pogacean, M. Gheorghe, L.Barbu-Tudoran, S. Pruneanu,

“Screen-Printed Electrodes Made on Stone Paper Substrate for Uric Acid Electrochemical Detection”

Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia, LXV, 2, 2020 (p. 233-242) doi:10.24193/subbchem.2020.2.19

Anul 2021

NANOM MEMS:

- A fost pus la punct un procedeu electrochimic de realizare a unor microarii de polimeri conductori dopați cu specii chimice adecvate tratamentului proceselor neurodegenerative (Fig. 1).

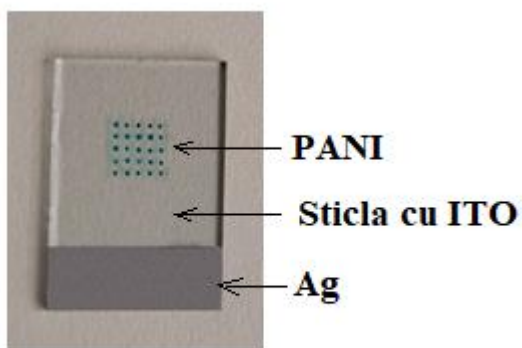


Figura 1. Microarie din polianilina dopata cu specii chimice adecvate tratamentului proceselor neurodegenerative, depusa pe substrat din sticla conductoare si transparenta.

- A fost depusa la OSIM o cerere Brevet de inventie cu nr. A/00300/31.05.2021 avand titlul:

"Procedeu pentru realizarea unei capsule polimerice de medicament conductoare electric"

Autor Marin Gheorghe

IBAR:

- Metodele dezvoltate in etapele anterioare au fost rafinate mai departe si au dus la constituirea unor protocoale eficiente de screening virtual de noi potentiale medicamente.

- Articol publicat:

Maria Mernea, Eliza.C. Martin, Andrei-José Petrescu, and Speranta Avram1,

"Deep learning in the quest for compound nomination for fighting COVID-19"

Current Medicinal Chemistry, 2021, **28**, 1-32

DOI: 10.2174/0929867328666210113170222

- Articol in curs de publicare:

Laura C.E. Manoliu, Adina L. Milac, Eliza C. Martin and Laurentiu Spiridon

"Effective Use of Empirical Data for Virtual Screening Against 2 APJR GPCR Receptor"

MDPI Molecules 2021