
REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Imunoprofilaxia cancerelor digestive utilizând nanoparticule biofuncționalizate

Doctorand: **Răzvan-Septimiu ZDREHUȘ**

Conducător de doctorat: **Șef lucrări Dr. Lucian MOCAN**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	3
1. NANOPARTICULE BIOFUNCȚIONALIZATE ÎN DEZVOLTAREA VACCINULUI ÎMPOTRIVA CANCERULUI DIGESTIV.....	5
1.1. Introducere	5
1.2. Tipuri de nanoparticule imunostimulatoare	6
1.3. Tipuri de vaccinuri împotriva cancerului	11
1.4. Vaccinuri în cancerele tractului digestiv	13
1.5. Micromediul tumoral	15
1.6. Nanoparticule biofuncționalizate	18
1.7. Inocularea vaccinurilor nanoparticulate împotriva cancerului	20
1.8. Concluzii	21
2. NANOPARTICULE BIOFUNCȚIONALIZATE CU ANTIGENUL CARCINOEMBRIONAR (CEA) – O PLATFORMĂ PROMIȚĂTOARE DE VACCINURI ÎMPOTRIVA CANCERULUI	23
2.1. Introducere	23
2.2. Utilizarea CEA ca antigen tumoral	23
2.3. Tipuri de nanoparticule utilizate pentru livrarea CEA	24
2.4. Studii experimentale și rezultate preclinice	25
2.5. Provocări și perspective viitoare	26
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	29
1. SCOP ȘI OBIECTIVE	31
2. METODOLOGIE GENERALĂ	32
3. STUDIUL 1. NANOPARTICULE DE AUR FUNCȚIONALIZATE CU ANTIGEN CARCINOEMBRIONAR (CEA) CA PLATFORMĂ NANOVACCINALĂ: EVALUARE IN VITRO A CITOCOMPATIBILITĂȚII, ABSORBȚIEI CELULARE ȘI PROCESĂRII ANTIGENULUI	35
3.1. Introducere	35
3.2. Obiective	35
3.3. Material și metodă	36
3.4. Rezultate	39
3.5. Discuții	45
3.6. Concluzii	48
4. STUDIUL 2. NANOPARTICULE DE AUR FUNCȚIONALIZATE CU ANTIGEN CARCINOEMBRIONAR (CEA) PENTRU PROFILAXIE ORALĂ: EVALUARE IN VIVO A SIGURANȚEI, BIODISTRIBUȚIEI ȘI EXPRESIEI CITOKINELOR LA ȘOARECI SĂNĂTOȘI...51	51
4.1. Introducere	51

4.2. Material și metodă	52
4.3. Rezultate	53
4.4. Discuții	68
4.5. Concluzii	71
5. STUDIUL 3. NANOVACCINURI ÎN CANCERUL COLORECTAL: ANALIZĂ INTEGRATIVĂ MULTI-SET DE DATE A EXPRESIEI CEACAM5, A PROFILURILOR CITOKINICE ȘI A GENELOR CO-EXPRIMATE	73
5.1. Introducere	73
5.2. Material și metodă	74
5.3. Rezultate	77
5.4. Discuții	89
5.5. Concluzii	92
6. DISCUȚII GENERALE	95
7. CONCLUZII GENERALE	99
8. ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE CERCETĂRII DOCTORALE....	101
REFERINȚE	103

LISTA DE PUBLICAȚII

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. Zdrehus, R.; Delcea, C.; Mocan, L. Role of Biofunctionalized Nanoparticles in Digestive Cancer Vaccine Development. *Pharmaceutics* 2024, 16(3):410. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16030410C> *ISI Q1 Factor de impact 5,5 JCR₂₀₂₄ (studiu cuprins în capitolul 1).*
2. Zdrehus, R.S.; Mocan, T.; Sabau, L.I.; Matea, C.T.; Tăbăran, F.; Pop, T.; Delcea, C.; Mosteanu, O.; Mocan, L. CEA-Functionalized Gold Nanoparticles as a Nanovaccine Platform: In Vitro Evaluation of Cytocompatibility, Cellular Uptake, and Antigen Processing. *Vaccines* 2025, 13(7):668. <https://doi.org/10.3390/vaccines13070668> *ISI Q2 Factor de impact 3,4 JCR₂₀₂₅ (studiu cuprins în capitolul 3).*
3. Zdrehus, R.S.; Mocan, T.; Sabau, L.I.; Matea, C.T.; Tabaran, A.-F.; Pop, T.; Delcea, C.; Mosteanu, O.; Mocan, L. CEA-Functionalized Gold Nanoparticles for Oral Prophylaxis: An In Vivo Evaluation of Safety, Biodistribution, and Cytokine Expression in Healthy Mice. *J. Nanotheranostics* 2025, 6(3):18. <https://doi.org/10.3390/jnt6030018> *BDI, DOAJ (studiu cuprins în capitolul 4).*
4. Zdrehus, R.S.; Mitrea C; Mocan L. Nanovaccine targeting in colorectal cancer: a multi-dataset analysis of CEA expression, cytokine profiles, and co-expressed genes. *Med Pharm Rep [Internet].* 2025 Jul. 31 ; 98(3):358-70. DOI:

<https://doi.org/10.15386/mpr-2917>

Available

from:

<https://medpharmareports.com/index.php/mpr/article/view/2917>

Pubmed

(*studiu cuprins în capitolul 5*)

INTRODUCERE

În contextul unei incidențe în creștere a cancerului colorectal și al limitărilor terapiilor convenționale, literatura de specialitate indică o nevoie acută pentru soluții profilactice și terapeutice mai eficiente, direcționate molecular și imunologic. Antigenul carcinoembrionar (CEACAM5/CEA), cunoscut pentru expresia sa crescută în adenocarcinoamele epiteliale și rolul său în adeziunea și progresia tumorală, a fost propus ca țintă imunologică promițătoare. Având în vedere aceste premise, obiectivul principal al cercetării de față a fost dezvoltarea unei platforme nanovaccinale funcționalizate cu CEA, evaluată din punct de vedere fizico-chimic, imunologic și transcriptomic. Teza a urmărit: (1) obținerea unui sistem nanometric stabil, pe bază de nanoparticule de aur funcționalizate cu peptide CEA; (2) validarea *in vitro* a citocompatibilității, internalizării și procesării antigenice în celule prezentatoare de antigen; (3) evaluarea *in vivo* a biodistribuției, siguranței și a impactului imunologic sistemic după administrare orală repetată; și (4) integrarea unei analize bioinformatic multi-cohortă pentru investigarea expresiei CEACAM5 în tumori colorectale umane, corelată cu infiltratul imun și profilurile citokinice. Aceste obiective se aliniază direcțiilor actuale în medicina personalizată și vaccinologia tumorală, contribuind la fundamentele teoretice și experimentale pentru utilizarea nanovaccinurilor în imunoprofilaxia cancerului colorectal.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

În ultimele două decenii, cercetările din domeniul nanomedicinei au deschis perspective promițătoare în dezvoltarea vaccinurilor antitumorale, în special pentru cancerle tractului digestiv, unde rata de recurență și mortalitate rămâne ridicată. Nanoparticulele biofuncționalizate reprezintă o nouă clasă de vehicule terapeutice, capabile să asigure livrarea direcționată a antigenelor tumorale și a adjuvanților imunostimulatori, promovând astfel un răspuns imun eficient și specific. Acestea sunt construite din materiale diverse – polimeri, lipozomi, metale, siliciu mezoporos sau proteine – și pot fi funcționalizate pentru a mima structuri biologice, optimizând prezentarea antigenică și stimularea celulelor prezentatoare de antigen (APC), în special a celulelor dendritice.

Vaccinurile dezvoltate pe bază de nanotehnologie oferă avantajul protejării antigenului de degradare, permit eliberarea controlată și induc un răspuns imun atât umoral,

cât și celular. Studiile preclinice au arătat că aceste sisteme pot activa limfocitele T CD8+ și CD4+, crescând secreția de citokine proinflamatorii precum IFN- γ , TNF- α și IL-12. Tipuri variate de nanoparticule, precum micelii, dendrimerii, nanoemulsiile, VLP-urile (virus-like particles), nanotuburile de carbon și MSNs (mesoporous silica nanoparticles), au fost testate cu succes în modele experimentale de melanom, cancer colorectal și alte tumori solide.

O tendință recentă este integrarea vaccinurilor bazate pe acizi nucleici, în special ARNm, livrate prin nanoparticule lipidice (LNP), direcționate către ganglionii limfatici. Aceste formulări asigură eficiență crescută, tolerabilitate bună și posibilitatea stimulării sistemului imun fără utilizarea adjuvanților clasici. Deși aprobarea vaccinurilor ARNm pentru COVID-19 a validat această abordare, aplicațiile în oncologie rămân încă limitate de provocări privind dozajul, stabilitatea și reglarea precisă a răspunsului imun.

În domeniul cancerului digestiv, utilizarea vaccinurilor nanoparticulate a demonstrat rezultate încurajatoare, în special în modelele preclinice pentru cancerul colorectal și gastric. Studii recente au raportat inhibiția creșterii tumorale prin vaccinuri care includ peptide precum CEA sau MUC1, fie singure, fie combinate cu adjuvanți CpG sau agoniști ai TLR7/8. Cu toate acestea, eficiența în studiile clinice a fost modestă, subliniind necesitatea unor strategii combinate, care să includă imunomodularea microambientului tumoral sau utilizarea inhibitorilor punctelor de control imun (ex. anti-PD-1) pentru a crește infiltrarea limfocitelor T și pentru a depăși caracterul imunosupresor al tumorilor „reci”.

În concluzie, platformele de vaccinare bazate pe nanoparticule biofuncționalizate oferă un cadru tehnologic solid pentru dezvoltarea vaccinurilor antitumorale, cu potențial în prevenția și tratamentul cancerului digestiv. Pentru ca aceste soluții să fie implementate clinic, este necesară validarea preclinică riguroasă, urmată de studii clinice care să evalueze siguranța, eficacitatea și sustenabilitatea răspunsului imun pe termen lung.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Studiul 1. Nanoparticule de aur funcționalizate cu antigen carcinoembrionar (CEA) ca platformă nanovaccinală: Evaluare in vitro a citocompatibilității, absorbției celulare și procesării antigenului

1.1. Introducere

Funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu peptide CEA reprezintă o strategie inovatoare de livrare antigenică ce vizează stimularea procesării intracelulare și activarea răspunsului imun adaptativ, fiind explorată în acest studiu ca platformă nanovaccinală preclinică pentru imunoterapia cancerului colorectal.

1.2. Material și metodă

Peptidele CEA au fost conjugate cu nanoparticule de aur și caracterizate prin spectroscopie UV-VIS și difracție dinamică a luminii (DLS) pentru a confirma funcționalizarea și a evalua distribuția dimensională a particulelor. Testele *in vitro* au fost realizate pe culturi celulare de macrofage pentru a evalua citotoxicitatea (prin teste de viabilitate și expresia caspazei-3), internalizarea nanoparticulelor (prin microscopie de reflectanță) și procesarea antigenică (prin analiza intensității fluorescenței).

1.3. Rezultate

Nanoparticulele de aur sintetizate au prezentat o morfologie sferică uniformă, cu un diametru hidrodinamic mediu de aproximativ 50 nm și potențial zeta negativ. Conjugarea cu peptidele CEA a modificat ușor sarcina de suprafață și profilul spectral. Testele MTT au confirmat o citocompatibilitate bună pentru toate concentrațiile testate. Microscopia hyperspectrală și confocală a evidențiat o internalizare eficientă a CEA-AuNP de către celulele RAW 264.7 și colocalizarea cu compartimentele lizozomale, sugerând procesarea eficientă a antigenului.

1.4. Concluzii

Funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu peptide CEA a generat nanostructuri stabile și biocompatibile, capabile de o internalizare eficientă de către celulele prezentatoare de antigen. Procesarea intracelulară crescută, evidențiată prin activarea căii ubiquitină-proteasom, susține potențialul imunogenic al constructului. Citotoxicitatea scăzută confirmă adecvarea platformei pentru dezvoltări preclinice ulterioare.

Nanoparticulele de aur funcționalizate cu CEA prezintă citocompatibilitate ridicată, absorbție celulară direcționată și promovează procesarea antigenică intracelulară — susținând promisiunea lor ca platformă de nanovaccin în imunoterapia cancerului. Rezultatele obținute susțin extinderea evaluărilor preclinice în vederea aplicării translational-clinice.

2. Studiul 2. Nanoparticule de aur funcționalizate cu antigen carcinoembrionar (CEA) pentru profilaxie orală: evaluare *in vivo* a siguranței, biodistribuției și expresiei citokinelor la șoareci sănătoși

2.1. Introducere

Nanoparticulele de aur (AuNP) oferă o platformă promițătoare datorită biocompatibilității, versatilității funcționale și potențialului lor imunomodulator. Antigenul carcinoembrionar (CEA), supraexprimat în tumorile colorectale, reprezintă o țintă ideală pentru activarea imună specifică antigenului. Scopul acestui studiu a fost evaluarea imunogenității, biodistribuției și eficacității terapeutice ale unui construct bazat pe

nanoparticule de aur funcționalizate cu CEA (CEA-AuNP), administrat oral, într-un model murin de cancer colorectal, utilizând un sistem capsular personalizat de livrare.

2.2. Material și metodă

Studiul *in vivo* a fost realizat pe șoareci BALB/c sănătoși, cărora li s-au administrat oral, timp de 30 de zile, doze diferite (5–50 mg/kg/zi) de CEA-AuNP. Obiectivul principal a fost evaluarea profilului de siguranță, biodistribuției și imunogenității în context profilactic, în conformitate cu standardele OECD TG 407. Probele biologice (splină, ficat, intestin, ganglioni limfatici) au fost analizate histologic (colorări H&E și Congo red), iar biodistribuția nanoparticulelor a fost determinată prin microscopie hyperspectrală. Profilul citokinic a fost evaluat prin ELISA, pe omogenate tisulare din probe compozite de ficat și splină, fără replici, fiind prezentat descriptiv. Această abordare a permis obținerea unor date preliminare relevante pentru imunoprofilaxia orală bazată pe nanovaccinuri.

2.3. Rezultate

Administrarea orală zilnică a nanoparticulelor de aur funcționalizate cu antigenul carcinoembrionar (CEA-AuNP) timp de 30 de zile în model murin BALB/c ($n = 30$) a evidențiat un profil favorabil de biocompatibilitate, cu acumulare predominantă în splină și ficat. Histologic, s-au observat semne doză-dependente de activare imună, în special la doza de 50 mg/kg, constând în amiloidoză perifoliculară splenică și depozite hepatice sugestive pentru stres funcțional. Alte organe majore – inimă, plămâni, rinichi și creier – nu au prezentat modificări histopatologice relevante. Microscopia hyperspectrală a confirmat biodistribuția predominantă în organele reticuloendoteliale, susținând rolul acestora ca principale situri de captare și procesare. Profilul citokinic a indicat o activare imună complexă, cu răspuns antiinflamator splenic (IL-10 \uparrow , IL-12 \downarrow) și un profil hepatic mai echilibrat sau ușor proinflamator (TNF- α și IL-1 β \uparrow la doze mari). Nivelurile de IFN- γ au crescut progresiv, sugerând o polarizare imună mediată celular. Per ansamblu, rezultatele susțin tolerabilitatea bună a formulării, activarea imunologică doză-dependentă și potențialul acesteia ca nanovaccin pentru imunoprofilaxia cancerului colorectal.

2.4. Concluzii

Nanoparticulele de aur funcționalizate cu antigenul carcinoembrionar (CEA-AuNP) s-au dovedit a fi sigure, biocompatibile și capabile să inducă un răspuns imun controlat, fără toxicitate sistemică semnificativă în model murin. Acumularea în splină și ficat, asociată cu activarea citokinică doză-dependente, susține potențialul platformei ca nanovaccin profilactic pentru cancerul colorectal. Rezultatele validează utilizarea orală a CEA-AuNP în imunoprofilaxie și justifică investigații preclinice suplimentare în modele tumorale.

3. Studiul 3. Nanovaccinuri în cancerul colorectal: analiză integrativă multi-set de date a expresiei CEACAM5, a profilurilor citokinice și a genelor co-exprimate.

3.1. Introducere

Prezentul studiu pornește de la ipoteza că CEACAM5, dincolo de rolul său de antigen tumoral, participă activ la remodelarea microambientului imun și poate contribui la evaziunea imună în cancerul colorectal, prin interferență cu semnalizarea citokinică și inhibarea infiltratului imun. Astfel, cercetarea vizează caracterizarea imunologică și transcriptomică a expresiei CEACAM5 în tumorile colorectale, folosind analize de corelație în baza de date TCGA-COAD, validări spațiale în tumori umane (GSE226997), precum și explorarea co-expresiei cu alte gene potențial imunorelevante. În paralel, studiul urmărește să justifice dezvoltarea de nanovaccinuri CEACAM5-țintite prin integrarea datelor bioinformatică cu dovezi experimentale privind imunogenitatea CEA-AuNP în modele murine. Obiectivul general este definirea unui cadru molecular și imunologic pentru selecția de antigene tumorale și rafinarea platformelor vaccinale cu potențial translational crescut.

3.2. Material și metodă

Pentru investigarea contextului imunologic asociat expresiei CEACAM5, a fost realizată o analiză bioinformatică complexă pe date transcriptomice din cohorta TCGA-COAD și seturi GEO (GSE207843, GSE226997, GSE245218), folosind R și pachete specializate. Au fost examinate corelațiile între CEACAM5 și citokine-cheie, estimarea infiltratului imun (xCell2), compartimentalizarea spațială a expresiei (Seurat), precum și profilul de coexprimare și validarea oncofetală a genelor candidate (EPCAM, STK38, CDH1, ATP10B). S-au aplicat analize diferențiale și de îmbogățire GO, integrând statistici robuste (Spearman, Wilcoxon, FDR) într-un flux reproductibil. Acest cadru a permis caracterizarea imunologică detaliată a CEACAM5 și selecția rațională de ținte complementare pentru imunoterapie.

3.3. Rezultate

Analiza transcriptomică a exprimării CEACAM5 în cohorta TCGA-COAD și în date spațiale GEO a evidențiat o corelație inversă între nivelurile ridicate ale acestui antigen și expresia citokinelor proinflamatorii sau a infiltratului imun activ. Tumorile CEACAM5-high prezintă un fenotip imun-supresiv, caracterizat prin niveluri mai reduse de IFNG, IL10 și TNF, și o depleție a celulelor T CD8⁺, macrofagelor și celulelor NK. Exprimarea CEACAM5 este localizată predominant în compartimentul epitelial tumoral, cu excluderea zonelor stromale și imune, ceea ce întărește ipoteza unei implicări active în evaziunea imună tumorală.

Analizele de co-expresie au identificat patru gene — EPCAM, ATP10B, STK38 și CDH1 — ca parteneri transcripționali puternici ai CEACAM5. Dintre acestea, EPCAM și ATP10B s-au remarcat printr-un model de exprimare oncofetal, fiind semnificativ supraexprimate în

țesuturi embrionare comparativ cu cele adulte. Aceste trăsături le recomandă ca potențiale ținte imunoterapeutice complementare în strategii de vaccinare anti-CEA. Mai mult, analiza Gene Ontology a sugerat că tumorile CEACAM5-high prezintă o suprimare a căilor de răspuns umoral antibacterian, indicând o paralelă funcțională între starea embrionară și microambientul tumoral imun-evaziv.

3.4. Concluzii

Acest studiu oferă o caracterizare integrativă a antigenului CEACAM5 în cancerul colorectal, demonstrând asocierea sa cu un fenotip imun-exclus, prin corelații negative cu citokine proinflamatorii și o reducere a infiltratului imun în tumori CEACAM5-high. Datele spațiale au confirmat localizarea sa predominant epitelială, iar analiza co-exprimării a identificat gene complementare precum EPCAM și ATP10B, cu profiluri oncofetale și potențial vaccinal. Rezultatele susțin CEACAM5 ca o țintă imunoterapeutică promițătoare, justificând includerea sa în nanovaccinuri sau terapii combinate și oferind un model bioinformatic scalabil pentru identificarea de antigene tumorale relevante în alte tipuri de cancer.

4. Concluzii generale

Prezenta teză a avut ca obiectiv dezvoltarea, caracterizarea și validarea preclinică a unei platforme nanovaccinale inovatoare, bazate pe nanoparticule de aur funcționalizate cu antigenul carcinoembrionar (CEA-AuNP). Această abordare a fost orientată către aplicabilitatea sa în imunoprofilaxia și imunoterapia cancerului colorectal, una dintre cele mai frecvente și agresive neoplazii epiteliale.

În cadrul etapei de sinteză, utilizarea metodei coloidale Turkevich a permis obținerea unor nanoparticule de aur stabile, monodisperse, cu dimensiuni și proprietăți optice adecvate pentru utilizare biomedicală. Funcționalizarea acestora cu peptida CEA a fost confirmată prin multiple tehnici spectroscopice și morfologice, demonstrând formarea unui nanoconjugat uniform și stabil, cu caracteristici compatibile cu sistemele de livrare antigenică.

Evaluările *in vitro* au arătat că platforma CEA-AuNP are un profil excelent de citocompatibilitate și nu generează citotoxicitate semnificativă nici la concentrații mari. De asemenea, s-a observat inducerea unei activări apoptotice moderate, mediată prin caspaza-3, precum și o internalizare eficientă de către macrofage, cu localizare perinucleară și procesare antigenică activă. Aceste rezultate susțin funcționalitatea nanoconstructului în promovarea unui răspuns imun celular specific.

Din perspectiva evaluării *in vivo*, administrarea orală repetată a formulării a demonstrat un profil favorabil de tolerabilitate biologică, cu modificări histologice limitate și fără semne de toxicitate sistemică majoră. Activarea imunologică, în special la nivelul splinei, coroborată cu modificările doză-dependente ale citokinelor (IL-10, TNF- α , IFN- γ), indică faptul că nanoconstructul induce un răspuns imun specific și controlat.

Completând aceste observații, analiza transcriptomică integrativă (bulk și spațială) pe cohorte multiple a confirmat că CEACAM5 este consistent supraexprimat în tumorile colorectale, indiferent de stadiul patologic. Corelațiile negative cu citokine proinflamatorii și scăderea infiltratului imun susțin ipoteza unui microambient imun exclus, conferind CEACAM5 relevanță atât ca marker de stratificare imunologică, cât și ca țintă imunoterapeutică validă.

În plus, studiul a identificat și validat doi co-exprimatori tumorali importanți, EPCAM și ATP10B, care prezintă caracteristici oncofetale și potențial de utilizare în vaccinuri multivalente. Datele funcționale au arătat că tumorile CEACAM5-high exprimă semnături transcriptomice asociate cu evaziunea imunității umorale, oferind un nou unghi de interpretare asupra mecanismelor imunologice implicate.

În concluzie, rezultatele obținute susțin CEACAM5 ca o țintă promițătoare pentru dezvoltarea de vaccinuri nanostructurate, cu potențial atât profilactic (în populațiile cu risc crescut), cât și terapeutic, ca adjuvant post-rezecție. Platforma dezvoltată în cadrul acestei lucrări oferă un fundament solid pentru extinderea validării preclinice și adaptarea către imunoterapii personalizate, contribuind la avansul terapiilor oncologice de generație nouă.

5. Originalitatea și contribuțiile inovative ale cercetării doctorale

Teza aduce o contribuție originală importantă în nanomedicina oncologică prin dezvoltarea și validarea unei platforme nanovaccinale inovatoare bazate pe nanoparticule de aur funcționalizate cu antigenul CEACAM5. Printr-o abordare integrată — incluzând sinteză chimică, caracterizare fizico-chimică, testare biologică *in vitro*, studii *in vivo* și analiză bioinformatică multi-cohortă — lucrarea demonstrează biocompatibilitatea, eficiența imunologică și relevanța translațională a platformei propuse. Identificarea co-exprimatorilor EPCAM și ATP10B cu potențial oncofetal, corelațiile imunogenomice și validările spațiale completează un cadru inovator ce susține utilizarea CEACAM5 ca țintă imunoterapeutică și oferă o bază solidă pentru viitoare vaccinuri multi-antigenice și imunoterapii personalizate.

PHD THESIS SUMMARY

Immunoprophylaxis of digestive cancers using biofunctionalized nanoparticles

PhD Student: **Răzvan-Septimiu ZDREHUȘ**

PhD Supervisor: **Șef lucrări Dr. Lucian MOCAN**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	1
CURRENT STATE OF THE ART	3
1. BIOFUNCTIONALIZED NANOPARTICLES IN THE DEVELOPMENT OF VACCINES AGAINST DIGESTIVE CANCER	5
1.1. Introduction	5
1.2. Types of immunostimulatory nanoparticles	6
1.3. Types of cancer vaccines	11
1.4. Vaccines for digestive tract cancers	13
1.5. Tumor microenvironment	15
1.6. Biofunctionalized nanoparticles	18
1.7. Administration of nanoparticulate vaccines against cancer	20
1.8. Conclusions	21
2. BIOFUNCTIONALIZED NANOPARTICLES WITH CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN (CEA) – A PROMISING PLATFORM FOR CANCER VACCINES	23
2.1. Introduction	23
2.2. Use of CEA as a tumor antigen	23
2.3. Types of nanoparticles used for CEA delivery	24
2.4. Experimental studies and preclinical results	25
2.5. Challenges and future perspectives	26
PERSONAL CONTRIBUTION	29
1. WORKING HYPOTHESIS / OBJECTIVES	31
2. GENERAL METHODOLOGY	32
3. STUDY 1. GOLD NANOPARTICLES FUNCTIONALIZED WITH CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN (CEA) AS A NANOVACCINE PLATFORM: IN VITRO EVALUATION OF CYTOCOMPATIBILITY, CELLULAR UPTAKE AND ANTIGEN PROCESSING	35
3.1. Introduction	35
3.2. Objectives	35
3.3. Materials and Methods	36
3.4. Results	39
3.5. Discussion	45
3.6. Conclusions	48
4. STUDY 2. GOLD NANOPARTICLES FUNCTIONALIZED WITH CEA FOR ORAL PROPHYLAXIS: IN VIVO EVALUATION OF SAFETY, BIODISTRIBUTION AND CYTOKINE EXPRESSION IN HEALTHY MICE	51
4.1. Introduction	51

4.2. Materials and Methods	52
4.3. Results	53
4.4. Discussion	68
4.5. Conclusions	71
5. STUDY 3. NANOVACCINES IN COLORECTAL CANCER: INTEGRATIVE MULTI-DATASET ANALYSIS OF CEACAM5 EXPRESSION, CYTOKINE PROFILES AND CO-EXPRESSED GENES	73
5.1. Introduction	73
5.2. Materials and Methods	74
5.3. Results	77
5.4. Discussion	89
5.5. Conclusions	92
6. GENERAL DISCUSSIONS	95
7. GENERAL CONCLUSIONS	99
8. ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE DOCTORAL RESEARCH	101
REFERENCES	103

Keywords: Nanoparticles, Cancer immunoprophylaxis, vaccine, Carcinoembryonic antigen, CEA, EPCAM

LIST OF PUBLICATIONS

Articles published in extenso as a result of doctoral research

1. Zdrehuș, R.; Delcea, C.; Mocan, L. Role of Biofunctionalized Nanoparticles in Digestive Cancer Vaccine Development. *Pharmaceutics* 2024, 16(3):410. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16030410C>. *ISI Q1 Impact factor 5.5 JCR₂₀₂₄ (study contained in chapter 1)*.
2. Zdrehuș, R.S.; Mocan, T.; Sabau, L.I.; Matea, C.T.; Tăbăran, F.; Pop, T.; Delcea, C.; Mosteanu, O.; Mocan, L. CEA-Functionalized Gold Nanoparticles as a Nanovaccine Platform: In Vitro Evaluation of Cytocompatibility, Cellular Uptake, and Antigen Processing. *Vaccines* 2025, 13(7):668. <https://doi.org/10.3390/vaccines13070668>. *ISI Q2 Impact factor 3.4 JCR₂₀₂₅ (study contained in chapter 3)*.
3. Zdrehuș, R.S.; Mocan, T.; Sabau, L.I.; Matea, C.T.; Tabaran, A.-F.; Pop, T.; Delcea, C.; Mosteanu, O.; Mocan, L. CEA-Functionalized Gold Nanoparticles for Oral Prophylaxis: An In Vivo Evaluation of Safety, Biodistribution, and Cytokine

- Expression in Healthy Mice. *J. Nanotheranostics* 2025, 6(3):18. <https://doi.org/10.3390/jnt6030018> *BDI, DOAJ (study contained in chapter 4).*
4. Zdrehus, R.S.; Mitrea C; Mocan L. Nanovaccine targeting in colorectal cancer: a multi-dataset analysis of CEA expression, cytokine profiles, and co-expressed genes. *Med Pharm Rep [Internet]*. 2025 Jul. 31 [cited 2025 Aug. 2]; 98(3):358-70. DOI: <https://doi.org/10.15386/mpr-2917> Available from: <https://medpharmareports.com/index.php/mpr/article/view/2917> *Pubmed (study contained in chapter 5).*

INTRODUCTION

In the context of an increasing incidence of colorectal cancer and the limitations of conventional therapies, the specialized literature indicates an acute need for more effective prophylactic and therapeutic solutions, directed molecularly and immunologically. The carcinoembryonic antigen (CEACAM5/CEA), known for its increased expression in epithelial adenocarcinomas and its role in tumor adhesion and progression, has been proposed as a promising immunological target. Given these premises, the main objective of the present research was the development of a CEA-functionalized nanovaccine platform, evaluated from a physicochemical, immunological and transcriptomic point of view. The thesis aimed to: (1) obtain a stable nanometric system, based on gold nanoparticles functionalized with CEA peptides; (2) *in vitro* validation of cytocompatibility, internalization and antigen processing in antigen-presenting cells; (3) *in vivo* evaluation of biodistribution, safety and systemic immunological impact after repeated oral administration; and (4) integrating a multi-cohort bioinformatic analysis to investigate CEACAM5 expression in human colorectal tumors, correlated with immune infiltrate and cytokine profiles. These objectives align with current directions in personalized medicine and tumor vaccinology, contributing to the theoretical and experimental foundations for the use of nanovaccines in colorectal cancer immunoprophylaxis.

CURRENT STATE OF THE ART

Over the past two decades, research in the field of nanomedicine has opened up promising prospects for the development of antitumor vaccines, particularly for cancers of the digestive tract, where recurrence and mortality rates remain high. Biofunctionalized nanoparticles represent a new class of therapeutic vehicles capable of ensuring the targeted delivery of tumor antigens and immunostimulatory adjuvants, thus promoting an effective

and specific immune response. They are constructed from various materials—polymers, liposomes, metals, mesoporous silicon, or proteins—and can be functionalized to mimic biological structures, optimizing antigen presentation and stimulation of antigen-presenting cells (APCs), particularly dendritic cells.

Nanotechnology-based vaccines offer the advantage of protecting the antigen from degradation, allowing controlled release and inducing both humoral and cellular immune responses. Preclinical studies have shown that these systems can activate CD8+ and CD4+ T lymphocytes, increasing the secretion of proinflammatory cytokines such as IFN- γ , TNF- α , and IL-12. Various types of nanoparticles, such as micelles, dendrimers, nanoemulsions, VLPs (virus-like particles), carbon nanotubes, and MSNs (mesoporous silica nanoparticles), have been successfully tested in experimental models of melanoma, colorectal cancer, and other solid tumors.

A recent trend is the integration of nucleic acid-based vaccines, particularly mRNA, delivered by lipid nanoparticles (LNPs) targeted to lymph nodes. These formulations provide increased efficacy, good tolerability, and the possibility of stimulating the immune system without the use of classical adjuvants. Although the approval of mRNA vaccines for COVID-19 has validated this approach, applications in oncology remain limited by challenges regarding dosage, stability, and precise regulation of the immune response.

In the field of digestive cancer, the use of nanoparticle vaccines has shown encouraging results, particularly in preclinical models for colorectal and gastric cancer. Recent studies have reported tumor growth inhibition by vaccines that include peptides such as CEA or MUC1, either alone or in combination with CpG adjuvants or TLR7/8 agonists. However, efficacy in clinical trials has been modest, highlighting the need for combined strategies that include immunomodulation of the tumor microenvironment or the use of immune checkpoint inhibitors (e.g., anti-PD-1) to increase T-cell infiltration and overcome the immunosuppressive nature of "cold" tumors.

In conclusion, biofunctionalized nanoparticle-based vaccination platforms provide a solid technological framework for the development of antitumor vaccines with potential in the prevention and treatment of digestive cancer. For these solutions to be implemented clinically, rigorous preclinical validation is required, followed by clinical studies to evaluate safety, efficacy, and long-term sustainability of the immune response.

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Study 1. Gold nanoparticles functionalized with carcinoembryonic antigen (CEA) as a nanovaccine platform: In vitro evaluation of cytocompatibility, cellular uptake, and antigen processing

1.1. Introduction

Functionalization of gold nanoparticles with CEA peptides is an innovative antigen delivery strategy aimed at stimulating intracellular processing and activating the adaptive immune response, which is explored in this study as a preclinical nanovaccine platform for colorectal cancer immunotherapy.

1.2. Materials and methods

CEA peptides were conjugated to gold nanoparticles and characterized by UV-VIS spectroscopy and dynamic light scattering (DLS) to confirm functionalization and evaluate particle size distribution. In vitro tests were performed on macrophage cell cultures to evaluate cytotoxicity (through viability tests and caspase-3 expression), nanoparticle internalization (through reflectance microscopy), and antigen processing (through fluorescence intensity analysis).

1.3. Results

The synthesized gold nanoparticles exhibited a uniform spherical morphology with an average hydrodynamic diameter of approximately 50 nm and negative zeta potential. Conjugation with CEA peptides slightly modified the surface charge and spectral profile. MTT assays confirmed good cytocompatibility for all tested concentrations. Hyperspectral and confocal microscopy revealed efficient internalization of CEA-AuNPs by RAW 264.7 cells and colocalization with lysosomal compartments, suggesting efficient antigen processing.

1.4. Conclusion

Functionalization of gold nanoparticles with CEA peptides generated stable and biocompatible nanostructures capable of efficient internalization by antigen-presenting cells. Increased intracellular processing, evidenced by activation of the ubiquitin-proteasome pathway, supports the immunogenic potential of the construct. Low cytotoxicity confirms the suitability of the platform for further preclinical development.

CEA-functionalized gold nanoparticles exhibit high cytocompatibility, targeted cellular uptake, and promote intracellular antigen processing—supporting their promise as a nanovaccine platform in cancer immunotherapy. The results obtained support the extension of preclinical evaluations toward translational-clinical application.

2. Study 2: Gold nanoparticles functionalised with carcinoembryonic antigen (CEA) for oral prophylaxis: in vivo evaluation of safety, biodistribution and cytokine expression in healthy mice.

2.1. Introduction

Gold nanoparticles (AuNPs) are a promising platform due to their biocompatibility, functional versatility and immunomodulatory potential. CEA, which is overexpressed in

colorectal tumours, is an ideal target for antigen-specific immune activation. This study aimed to evaluate the immunogenicity, biodistribution and therapeutic efficacy of an orally administered gold nanoparticle construct functionalised with CEA (CEA-AuNP) in a murine model of colorectal cancer, using a customised capsule delivery system.

2.2. Materials and methods

The *in vivo* study was performed on healthy BALB/c mice, which were administered different doses (5–50 mg/kg/day) of CEA-AuNP orally for 30 days. The main objective was to evaluate safety, biodistribution and immunogenicity in a prophylactic context, in accordance with OECD TG 407 standards. Biological samples (spleen, liver, intestine and lymph nodes) were analysed histologically using haematoxylin and eosin (H&E) and Congo red staining, and the biodistribution of the nanoparticles was determined using hyperspectral microscopy. The cytokine profile was evaluated using ELISA on tissue homogenates from composite liver and spleen samples without replicates and is presented descriptively. This approach enabled us to obtain preliminary data relevant to oral immunoprophylaxis based on nanovaccines.

2.3. Results

Daily oral administration of gold nanoparticles functionalized with carcinoembryonic antigen (CEA-AuNP) for 30 days in the BALB/c mouse model ($n = 30$) showed a favorable biocompatibility profile, with predominant accumulation in the spleen and liver. Histologically, dose-dependent signs of immune activation were observed, particularly at the 50 mg/kg dose, consisting of splenic perifollicular amyloidosis and hepatic deposits suggestive of functional stress. Other major organs—heart, lungs, kidneys, and brain—showed no relevant histopathological changes. Hyperspectral microscopy confirmed predominant biodistribution in reticuloendothelial organs, supporting their role as the main sites of uptake and processing. The cytokine profile indicated complex immune activation, with a splenic anti-inflammatory response (IL-10 \uparrow , IL-12 \downarrow) and a more balanced or slightly pro-inflammatory hepatic profile (TNF- α and IL-1 β \uparrow at high doses). IFN- γ levels increased progressively, suggesting cell-mediated immune polarization. Overall, the results support the good tolerability of the formulation, dose-dependent immunological activation, and its potential as a nanovaccine for colorectal cancer immunoprophylaxis.

2.4. Conclusions

Carcinoembryonic antigen-functionalized gold nanoparticles (CEA-AuNPs) have been shown to be safe, biocompatible, and capable of inducing a controlled immune response without significant systemic toxicity in a murine model. Accumulation in the spleen and liver, associated with dose-dependent cytokine activation, supports the platform's potential as a prophylactic nanovaccine for colorectal cancer. The results validate the oral use of CEA-AuNP in immunoprophylaxis and justify further preclinical investigations in tumor models.

3. Study 3. Nanovaccines in colorectal cancer: integrative multi-dataset analysis of CEACAM5 expression, cytokine profiles, and co-expressed genes.

3.1. Introduction

This study starts from the hypothesis that CEACAM5, beyond its role as a tumor antigen, actively participates in the remodeling of the immune microenvironment and may contribute to immune evasion in colorectal cancer by interfering with cytokine signaling and inhibiting immune infiltrate. Thus, the research aims to characterize the immunological and transcriptomic expression of CEACAM5 in colorectal tumors using correlation analyses in the TCGA-COAD database, spatial validations in human tumors (GSE226997), and exploration of co-expression with other potentially immunorelevant genes. In parallel, the study aims to justify the development of CEACAM5-targeted nanovaccines by integrating bioinformatic data with experimental evidence on CEA-AuNP immunogenicity in murine models. The overall objective is to define a molecular and immunological framework for tumor antigen selection and refine vaccine platforms with increased translational potential.

3.2. Materials and methods

To investigate the immunological context associated with CEACAM5 expression, a complex bioinformatic analysis was performed on transcriptomic data from the TCGA-COAD cohort and GEO sets (GSE207843, GSE226997, GSE245218) using R and specialized packages. Correlations between CEACAM5 and key cytokines, immune infiltrate estimation (xCell2), spatial compartmentalization of expression (Seurat), as well as coexpression profiling and oncofetal validation of candidate genes (EPCAM, STK38, CDH1, ATP10B) were examined. Differential and GO enrichment analyses were applied, integrating robust statistics (Spearman, Wilcoxon, FDR) into a reproducible workflow. This framework enabled detailed immunological characterization of CEACAM5 and rational selection of complementary targets for immunotherapy.

3.3. Results

Transcriptomic analysis of CEACAM5 expression in the TCGA-COAD cohort and GEO spatial data revealed an inverse correlation between high levels of this antigen and the expression of proinflammatory cytokines or active immune infiltrate. CEACAM5-high tumors exhibit an immunosuppressive phenotype, characterized by lower levels of IFNG, IL10, and TNF, and a depletion of CD8⁺ T cells, macrophages, and NK cells. CEACAM5 expression is predominantly localized in the tumor epithelial compartment, excluding stromal and immune areas, which reinforces the hypothesis of active involvement in tumor immune evasion.

Co-expression analyses identified four genes—EPCAM, ATP10B, STK38, and CDH1—as strong transcriptional partners of CEACAM5. Of these, EPCAM and ATP10B stood out with an oncofetal expression pattern, being significantly overexpressed in embryonic tissues

compared to adult ones. These features recommend them as potential complementary immunotherapeutic targets in anti-CEA vaccination strategies. Furthermore, Gene Ontology analysis suggested that CEACAM5-high tumors exhibit suppression of humoral antibacterial response pathways, indicating a functional parallel between the embryonic state and the immune-evasive tumor microenvironment.

3.4. Conclusions

This study provides an integrative characterization of the CEACAM5 antigen in colorectal cancer, demonstrating its association with an immune-exclusive phenotype through negative correlations with proinflammatory cytokines and a reduction in immune infiltrate in CEACAM5-high tumors. Spatial data confirmed its predominantly epithelial localization, and co-expression analysis identified complementary genes such as EPCAM and ATP10B, with oncofetal profiles and vaccine potential. The results support CEACAM5 as a promising immunotherapeutic target, justifying its inclusion in nanovaccines or combination therapies and providing a scalable bioinformatic model for identifying relevant tumor antigens in other types of cancer.

4. General conclusions

The present thesis aimed to develop, characterize and preclinically validate an innovative nanovaccine platform based on gold nanoparticles functionalized with carcinoembryonic antigen (CEA-AuNP). This approach was oriented towards its applicability in immunoprophylaxis and immunotherapy of colorectal cancer, one of the most frequent and aggressive epithelial neoplasms.

During the synthesis stage, the use of the Turkevich colloidal method allowed the obtaining of stable, monodisperse gold nanoparticles, with dimensions and optical properties suitable for biomedical use. Their functionalization with the CEA peptide was confirmed by multiple spectroscopic and morphological techniques, demonstrating the formation of a uniform and stable nanoconjugate, with characteristics compatible with antigen delivery systems.

In vitro evaluations showed that the CEA-AuNP platform has an excellent cytocompatibility profile and does not generate significant cytotoxicity even at high concentrations. Induction of moderate caspase-3-mediated apoptotic activation was also observed, as well as efficient internalization by macrophages, with perinuclear localization and active antigen processing. These results support the functionality of the nanoconstruct in promoting a specific cellular immune response.

From the perspective of in vivo evaluation, repeated oral administration of the formulation demonstrated a favorable biological tolerability profile, with limited histological changes and no signs of major systemic toxicity. Immunological activation, especially at the spleen level, corroborated with dose-dependent changes in cytokines (IL-10, TNF- α , IFN- γ),

indicates that the nanoconstruct induces a specific and controlled immune response.

Complementing these observations, integrative transcriptomic analysis (bulk and spatial) on multiple cohorts confirmed that CEACAM5 is consistently overexpressed in colorectal tumors, regardless of pathological stage. The negative correlations with proinflammatory cytokines and the decrease in immune infiltrate support the hypothesis of an excluded immune microenvironment, giving CEACAM5 relevance both as an immunological stratification marker and as a valid immunotherapeutic target.

In addition, the study identified and validated two important tumor co-expressors, EPCAM and ATP10B, that show oncofetal characteristics and potential for use in multivalent vaccines. Functional data showed that CEACAM5-high tumors express transcriptomic signatures associated with humoral immunity evasion, providing a new angle of interpretation on the immunological mechanisms involved.

In conclusion, the obtained results support CEACAM5 as a promising target for the development of nanostructured vaccines, with both prophylactic (in high-risk populations) and therapeutic potential, as a post-resection adjuvant. The platform developed in this work provides a solid foundation for expanding preclinical validation and adaptation towards personalized immunotherapies, contributing to the advancement of next-generation oncology therapies.

5. Originality and innovative contributions of doctoral research

The thesis makes an important original contribution to oncological nanomedicine by developing and validating an innovative nanovaccine platform based on gold nanoparticles functionalized with the CEACAM5 antigen. Through an integrated approach—including chemical synthesis, physicochemical characterization, *in vitro* biological testing, *in vivo* studies, and multi-cohort bioinformatic analysis—the work demonstrates the biocompatibility, immunological efficacy, and translational relevance of the proposed platform. The identification of EPCAM and ATP10B co-expressors with oncofetal potential, immunogenomic correlations, and spatial validations complete an innovative framework that supports the use of CEACAM5 as an immunotherapeutic target and provides a solid basis for future multi-antigen vaccines and personalized immunotherapies