



ACADEMIA ROMÂNĂ
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biochimie al Academiei Române

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Dezvoltarea unui Affibody Citotoxic anti-B7-H3 cu potențial în
imunoterapia Leucemiei Acute Mieloide**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
CSI Prof. Dr. Ștefan-Eugen Szedlacsek

DOCTORAND:
Vasilescu Andrei-Mihai

CUPRINS

LISTĂ DE ABREVIERI.....	3
I. INTRODUCERE.....	4
Ipoteză.....	6
Obiective.....	6
II. PARTEA I. ASPECTE TEORETICE.....	7
1. CD276 (B7-H3).....	7
1.1. Structură și Izoforme.....	7
1.2. Implicare în Reglajul Sistemului Imun.....	8
1.3. Implicare în Cancer.....	9
1.4. B7-H3 ca Potențial Biomarker în Leucemia Mieloidă Acută.....	11
2. VEHICULE MOLECULARE MICI DIRECȚIONATE ÎMPOTRIVA BIOMARKERILOR CANCERULUI.....	13
2.1. INHIBITORI ADN.....	13
2.2. AFFIBODIES.....	14
2.2.1. Structură și Proprietăți.....	14
2.2.2. Funcție ca Liganzi pentru Antigene.....	15
2.2.3. Affibodies ca Vehicule de Livrare pentru Imagistică și Terapii.....	17
2.2.4. Affibodies Anti-B7-H3.....	21
3. PEPTIDE CITOTOXICE ÎMPOTRIVA CANCERULUI.....	22
3.1. Eficiență și Efecte Secundare.....	22
3.2. Magainin-2 ca Agent Anti-Tumoral Specific.....	23
PARTEA II. SECȚIUNE EXPERIMENTALĂ.....	26
1. INTRODUCERE.....	26
2. MATERIALE ȘI METODE.....	27
2.1. Plasmidă de Expresie.....	27
2.2. Clonarea Bacteriană a plasmidei de expresie pET-19b.....	28
2.3. Linii Celulare.....	28

2.4. Expresia și Purificarea 6xHis-SUMO-Aff-MAG2.....	29
2.5. Analiza NanoLC-MS/MS a constructului Aff-MAG2 purificat și evaluarea unui situs de clivare ipotetic.....	32
2.6. Testul MTS.....	33
2.7. Citometria în Flux.....	33
2.8. Western Blot.....	35
2.9. Analiza Datelor și Statistică.....	36
 3. REZULTATE.....	 37
3.1. Design-ul unui Nou Affibody Recombinat care Țintește B7-H3 Fuzionat cu Magainin-2.....	37
3.2. Design-ul și Clonarea Vectorului de Expresie pentru 6xHis-SUMO-Aff-MAG2.....	39
3.3. Aff-MAG2 a fost Exprimat și Purificat din E. coli cu randamente mari.....	41
3.4. Confirmarea Secvenței de Aminoacizi a Aff-MAG2 purificat prin Analiza NanoLC-MS/MS.....	46
3.5. Evaluarea Stabilității Aff-MAG2 și a potențialelor situsuri de Degradare.....	47
3.6. Efect Inhibitor Prezentat de Aff-MAG2 în celule de Leucemie Mieloidă Acută.....	50
3.7. Aff-MAG2 Cauzează Necroză și Apoptoză intense în celule AML.....	53
3.8. Celulele AML Suferă o Reducere a Proliferării în urma tratamentului cu Aff-MAG2.....	59
 4. DISCUȚII.....	 62
Limitări.....	65
Perspective.....	65
 III. CONCLUZII	 66
MULȚUMIRI.....	67
LISTĂ DE PUBLICAȚII.....	68
BIBLIOGRAFIE.....	69

I. INTRODUCERE

Leucemia Mieloidă Acută (AML) cuprinde un grup eterogen de afecțiuni hematologice maligne caracterizate prin proliferarea rapidă a precursorilor mieloizi anormali, metastaze, rezistență ridicată la chimioterapie și radioterapie și rate scăzute de supraviețuire pe termen lung (Fan et al., 2023). La aceste proprietăți periculoase se adaugă faptul că celulele AML pot evita stresul terapeutic prin rezidența în nișa măduvei osoase, ceea ce contribuie la rezistența la mai multe medicamente și crește riscul de recidivă la pacienți (Wittwer et al., 2017). Prin urmare, AML rămâne o boală care pune viața în pericol și care necesită strategii terapeutice noi și eficiente. Această teză de doctorat este compusă din două părți principale. **PARTEA I** prezintă contextul științific și descoperirile recente care au stat la baza și au justificat studiul experimental descris în **PARTEA II**, care reprezintă contribuțiile personale ale autorului tezei.

Ipoteză

Ipoteza acestei teze de doctorat este: Un construct recombinat, Affibody Anti-B7-H3-Magainin-2, proiectat prin design rațional, poate fi produs dintr-un sistem de expresie procariotic și provoacă necroză, apoptoză și inhibarea proliferării în celule reprezentative pentru leucemia mieloidă acută.

Obiective

Acest studiu are următoarele obiective:

- Proiectarea proteinei citotoxice Aff-MAG2 care țintește B7-H3
- Expresia în *E. coli*, purificarea proteinei recombinante proiectate și validarea secvenței de aminoacizi a conjugatului purificat
- Evaluarea stabilității constructului obținut
- Determinarea IC₅₀ a Aff-MAG2 împotriva unor celule reprezentative pentru AML
- Evaluarea efectelor necrotice și apoptotice ale Aff-MAG2 asupra celulelor model pentru AML
- Efectele conjugatului citotoxic asupra proliferării celulelor reprezentative pentru AML

II. PARTEA I. ASPECTE TEORETICE

1. CD276 (B7-H3)

B7-H3 ca Potențial Biomarker în Leucemia Mieloidă Acută

Deși ARNm-ul B7-H3 este exprimat aproape omniprezent în celulele umane adulte normale, datorită unei reglări stricte post-transcripționale și post-translaționale, proteina este aproape inexistentă în organismul adult sănătos (Guo et al., 2025). În schimb, așa cum s-a menționat anterior, B7-H3 este exprimat în cantități mari în celulele canceroase de diferite origini, inclusiv în celulele AML. Cu toate acestea, un aspect mult mai important este faptul că supraexpresia B7-H3 la pacienții cu AML corelează cu o scădere semnificativă a supraviețuirii globale în timp, așa cum se observă în datele din baza de date The Cancer Genome Atlas (TCGA) analizate în acest studiu (**Figura 1**). Având în vedere toate aceste date despre importanța crucială a supraexpresiei B7-H3 specifică celulelor AML, B7-H3 este un potențial biomarker puternic pentru diagnosticarea și răspunsul la tratament în AML. Importanța B7-H3 în AML a fost recunoscută și în studii anterioare (Fan et al., 2023; Tan & Zhao, 2024). Din aceste motive, autorul consideră că B7-H3 reprezintă o țintă excelentă pentru terapia personalizată direcționată în AML, fără efecte secundare grave. Această afirmație este susținută în continuare de o multitudine de studii preclinice privind AML, care au utilizat diferite strategii pentru a viza B7-H3 cu rate ridicate de succes (Stefańczyk et al., 2024; Tyagi et al., 2022; Zhang et al., 2020), precum și de studiile clinice promițătoare în curs de desfășurare în același context (Guo et al., 2025). Prin urmare, autorul a ales **B7-H3 în AML** ca țintă terapeutică pentru această teză de doctorat.

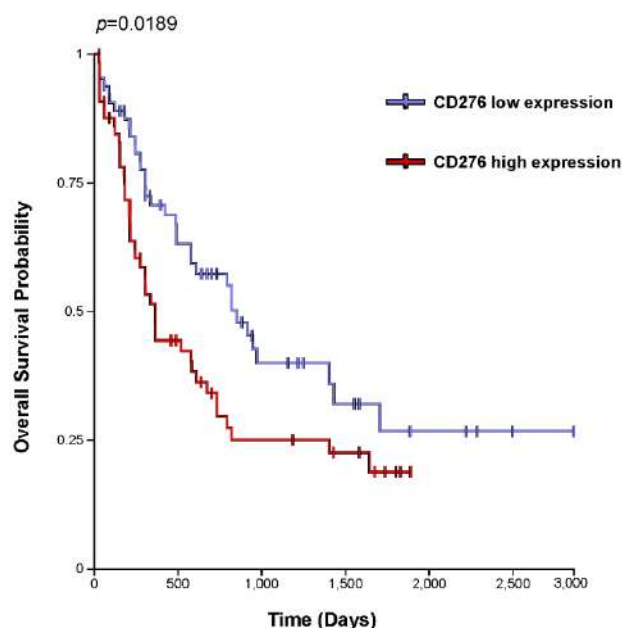


Figura 1. Probabilitatea de supraviețuire globală Kaplan-Meier pentru pacienții cu AML, pe parcursul a aproximativ 8 ani de la diagnostic. Comparație între supraviețuirea pacienților cu expresie genetică scăzută a B7-H3 (CD276) și cea a pacienților cu expresie genetică ridicată a B7-H3, analizată la nivel de ARNm prin secvențierea ARN-ului din probe clinice din baza de date TCGA. Testul log-rank a fost utilizat pentru a determina semnificația statistică. $p < 0.05$ este considerat statistic semnificativ.

2. VEHICULE MOLECULARE MICI DIRECȚIONATE ÎMPOTRIVA BIOMARKERILOR CANCERULUI

Affibodies Anti-B7-H3

Pentru această teză de doctorat, a fost utilizată secvența de aminoacizi a moleculei affibody **SYNT-179**, extrem de promițătoare, care a fost maturizată, caracterizată în detaliu și validată de Oroujeni et al. în 2023. Folosind o metodologie cuprinzătoare, ei au demonstrat specificitatea ridicată a acestui affibody față de B7-H3 *in vitro* (marcare radioactivă) și *in vivo* (șoareci cu xenotransplant de cancer ovarian vizualizați cu nanoSPECT/CT) și o afinitate excelentă a $K_{D1} = 0.028 \pm 0.001$ nM pentru epitopul cel mai rar al B7-H3 și $K_{D2} = 8.2 \pm 0.5$ nM pentru epitopul cel mai abundent, măsurat cu LigandTracer (Oroujeni et al.,

2023). Această metodologie mai robustă și determinările LigandTracer relevă faptul că SYNT-179 este cu mult superior față de molecula sa părinte, AC12, care, conform acestor măsurători mai precise, are un K_{D2} de numai 68.8 ± 7.4 nM. Același grup a demonstrat din nou în 2025, pe modele de șoareci cu xenotransplant de cancer ovarian uman, că SYNT-179 este un candidat formidabil pentru diagnosticarea imagistică a cancerelor care exprimă B7-H3 (Tolmachev et al., 2025). Luate împreună, aceste date fac din SYNT-179 cel mai bun affibody anti-B7-H3 de până acum și candidatul perfect pentru studiul prezent, al unui nou potențial tratament pentru AML B7-H3-pozitivă.

3. PEPTIDE CITOTOXICE ÎMPOTRIVA CANCERULUI

Magainin-2 ca Agent Anti-Tumoral Specific

Magainin-2 (MAG2) este o peptidă cationică simplă, cu 23 de aminoacizi, care nu prezintă modificări post-tranlaționale și adoptă structura 3D a unui alfa-helix (Zasloff, 1987). Această structură simplă îi conferă avantaje importante, precum stabilitatea și solubilitatea ridicată, dar cel mai important este faptul că permite exprimarea și producerea sa în bacterii în mod rapid și ieftin. De fapt, Ramos et al. (2013) au reușit să producă MAG2 în *E. coli* și au demonstrat că este solubil și funcțional. Există anumite tehnici care permit exprimarea procariotă a acestei peptide membranolitice, care au fost utilizate și în prezentul studiu, dar acestea sunt descrise mai târziu, în secțiunea DISCUȚII.

Pe lângă efectele sale letale asupra unei game largi de bacterii și chiar ciuperci și protozoare (Zasloff, 1987), MAG2 a demonstrat o activitate puternică împotriva celulelor canceroase provenite din multe tipuri diferite de tumori maligne (Cruciani et al., 1991; Ohsaki et al., 1992). De exemplu, MAG2 a fost eficient în uciderea selectivă a celulelor reprezentative ale cancerului de vezică urinară uman *in vitro*, provocând necroză și scăderea proliferării celulare (Lehmann et al., 2006). Mai mult, experimentele *in vivo* pe șoareci cu tumori ascite xenotransplantate din diverse linii celulare canceroase umane, inclusiv unele reprezentative pentru leucemie, au arătat o inhibare semnificativă a celulelor maligne și o durată medie de supraviețuire cu 50% mai lungă a șoarecilor tratați (Baker et al., 1993). Aceste puternice efecte antitumorale demonstrate anterior, atât *in vitro*, cât și *in vivo*, împreună cu proprietățile fizico-chimice favorabile ale MAG2, îl fac alegerea perfectă ca

încărcătură terapeutică a constructului dezvoltat în această teză de doctorat. Luând în considerare toate informațiile prezentate în această primă parte a lucrării, constructul recombinat citotoxic, care a fost utilizat în partea experimentală, a fost compus din **Affibody Anti-B7-H3 SYNT-179** fuzionat genetic cu **Magainin-2**, ceea ce a dus la constructul **Aff-MAG2**.

Inițial, studiile de simulare și microscopie electronică au condus la ideea că MAG2 ucide celulele prin formarea de pori mari în membrana lor plasmatică în modelul toroidal (Lehmann et al., 2006; Matsuzaki, 1998). Cu toate acestea, abia recent, Pandidan și Mechler (2025) au demonstrat într-un experiment fascinant de microscopie de forță atomică (AFM) că destabilizarea membranei cauzată de MAG2 este un proces gradual, în mai multe etape, în care porii au o durată de viață scurtă, făcând loc, cu concentrații mai mari de MAG2, unei structuri ondulate mai destabilizate sistemic, pe care au numit-o „corduroy”. Prin urmare, această descoperire recentă a fost integrată în mecanismul de acțiune ipotetic al Aff-MAG2 prezentat în **Figura 2**.

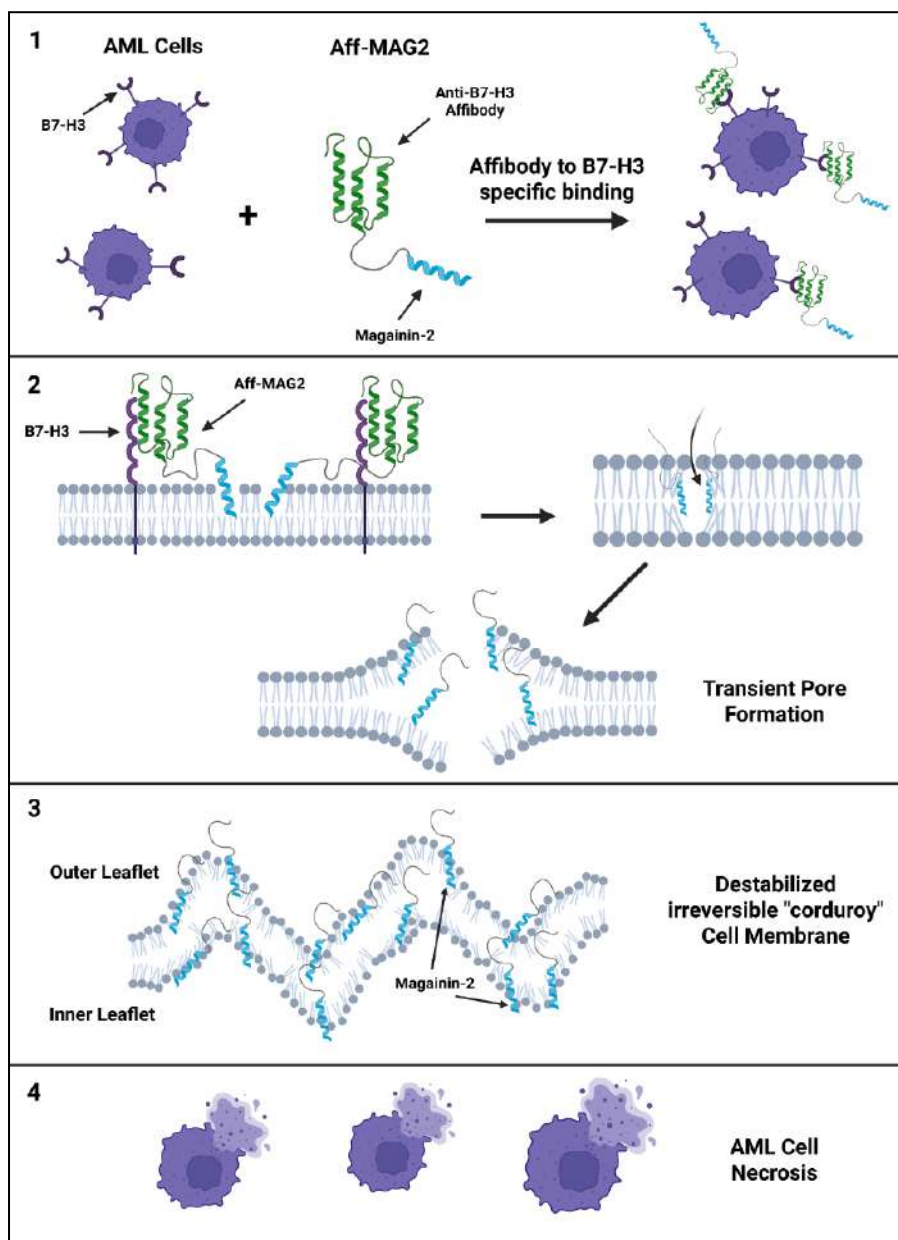


Figura 2. Mecanismul de acțiune propus pentru constructul citotoxic Aff-MAG2 dezvoltat în cadrul acestei lucrări. **1** - Legarea Aff-MAG2 de B7-H3 exprimat pe suprafața celulelor AML, **2** - Pătrunderea membranei celulare de către Magainin-2 după legarea B7-H3 de Affibody și formarea ulterioară a porilor tranzitorii, **3** - Etapa ireversibilă de destabilizare a membranei celulare după echilibrarea Magainin-2 pe ambele foliole și formarea structurilor „corduroy”, **4** - Necroza celulelor AML. Creat în <https://BioRender.com> de Andrei-Mihai Vasilescu.

Affibody este direcționat către și se leagă de B7-H3 situat pe suprafața celulelor AML prin afinitatea sa puternică față de țintă și aduce în mod eficient peptida toxică MAG2 în proximitatea membranei celulare. Aici, toxina pătrunde în folia exterioară a membranei plasmatică și, printr-un efect cumulativ creat de multiple molecule MAG2, se formează numeroși pori tranzitorii în membrană, urmați de inserarea moleculelor de peptidă în folia interioară, crescând destabilizarea și formând în cele din urmă structuri „corduroy”, o stare critică, nesustenabilă. Acest lucru duce la moartea celulelor AML prin necroză. În concluzie, se presupune că acest conjugat Affibody-medicament dezvoltat ucide celulele leucemiei mieloide acute B7-H3⁺ prin liza membranei plasmatică într-un mod specific și țintit.

PARTEA II. SECȚIUNE EXPERIMENTALĂ

1. MATERIALE ȘI METODE

Un vector plasmidial de expresie pET-19b a fost comandat de la GenScript cu secvența ADN a constructului 6xHis-SUMO-Aff-MAG2 inserată între două situsuri de restricție unice. Ca linie celulară reprezentativă pentru AML, s-au utilizat THP-1 (monocite de leucemie monocitară acută) din stocurile congelate ale institutului nostru și celule RAJI (limfocite B de limfom Burkitt) („ATCC: The Global Bioresource Center”, 2025), drept control negativ. Au fost utilizate teste funcționale bazate pe celule ale compusului, care au cuprins testul MTS pentru inhibarea viabilității celulare, citometria în flux pentru necroză și apoptoză și Western blot pentru nivelurile de expresie ale markerilor de apoptoză și proliferare.

Curbele de supraviețuire globală Kaplan-Meier au fost reprezentate grafic în platforma UCSC Xena, utilizând date clinice de expresie RNA-Seq B7-H3 din baza de date GDC TCGA Acute Myeloid Leukemia. Limita de urmărire a fost de aproximativ 8 ani. Pentru a determina semnificația statistică a curbelor de supraviețuire, s-a utilizat testul log-rank (Goldman et al., 2020). **Figura 2** a fost creată în <https://BioRender.com> (“Scientific Image and Illustration Software | BioRender”, 2025). Toate experimentele au fost efectuate independent de cel puțin două ori și au fost utilizate cel puțin două replici biologice. În plus, au fost utilizate trei replici tehnice acolo unde a fost necesar. Curbele inhibitoare doză-răspuns au fost ajustate și reprezentate grafic, iar IC_{50} al Aff-MAG2 a fost calculat în GraphPad Prism v9.3.0 (Dotmatics). Pentru a determina semnificația statistică, s-a utilizat un test t unpaired one-tailed, efectuat în GraphPad Prism v9.3.0. Pentru toate testele statistice utilizate, $p \geq 0.05$ a fost considerat nesemnificativ, în timp ce $p < 0.05$ a fost considerat semnificativ din punct de vedere statistic.

2. REZULTATE

Design-ul unui Nou Affibody Recombinat care Țintește B7-H3 Fuzionat cu Magainin-2

În primul rând, secvența de aminoacizi a constructului de fuziune a fost proiectată în conformitate cu liniile directoare stabilite pentru proiectarea rațională a proteinelor recombinante (Chen et al., 2013; Li, 2011; Zorko & Jerala, 2010). Proiectarea și strategia terapeutică a compusului s-au bazat, de asemenea, pe un studiu anterior la care a participat autorul tezei (Váradi et al., 2023). Așa cum este descris în publicația recentă a autorului tezei (Vasilescu et al., 2025), affibody **SYNT-179** a fost utilizat în construct, urmat de un triplu linker GGGGS și secvența toxinei Magainin-2 (MAG2) la capătul C-terminal. Pentru purificarea prin afinitate, s-a adăugat un tag 6xHis la capătul N-terminal, urmat de un tag Small Ubiquitin-related MOdifier (SUMO) (SMT3 din *S. cerevisiae*) pentru separarea tag-urilor de AffDC final după purificare (**Figura 3A**). Secvența de aminoacizi a affibody (SYNT-179), de la N-terminus la C-terminus, este: **AEAKFAKEKINALGEIHWLPNLTQDIKAFIAKLNDGPSQSSELLSEAKKLSES Q**, în timp ce pentru MAG2 este: **GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS**. Linkerul GGGGS a fost selectat datorită stabilității, flexibilității și rezistenței sale dovedite la proteoliză. Tripla sa repetiție asigură o lungime suficientă pentru a preveni obstrucția sterică și pentru a permite separarea spațială adecvată a domeniilor funcționale (Chen et al., 2013). Tag-ul SUMO joacă mai multe roluri esențiale în proiectare. În primul rând, permite clivajul fără a lăsa aminoacizi reziduali, deoarece proteaza SUMO Ulp1 (*S. cerevisiae*) recunoaște în mod specific structura terțiară a domeniului SUMO și clivează precis la capătul C-terminal, păstrând capătul N-terminal nativ al proteinei țintă (Li, 2011). Acest lucru este deosebit de important pentru moleculele utilizate pentru țintirea biomarkerilor, cum ar fi affibody. În al doilea rând, se presupune că eticheta SUMO protejează împotriva degradării proteazei și atenuează activitatea antibacteriană a Magainin-2, care altfel ar putea compromite viabilitatea bacteriană în timpul expresiei. Acest efect de protecție ar putea fi datorat interacțiunilor electrostatice dintre tag-ul SUMO încărcat negativ și Magainin-2 încărcată pozitiv la pH fiziologic (Bommarius et al., 2010). Acest aspect va fi discutat mai târziu. În cele din urmă, affibody, linkerul, peptida toxică și tag-ul SUMO sunt toate foarte solubile în apă, facilitând recuperarea ușoară a constructului exprimat în supernatantul lizatului

bacterian cu randamente ridicate (Chen et al., 2013; Li, 2011; Tolmachev et al., 2025; Zasloff, 1987).

Structura Aff-MAG2 a fost modelată în AlphaFold3 Server (Abramson et al., 2024), iar structurile alfa-helix stabile ale affibody anti-B7-H3 și MAG2 pot fi văzute în **Figura 3B**, prevăzute cu un grad ridicat de încredere. De asemenea, în acest model teoretic prevăzut, pare să existe o interacțiune între affibody și peptida toxică. Implicațiile acestei posibile interacțiuni sunt discutate mai târziu în această lucrare. Alte proprietăți fizico-chimice ale constructului necesare pentru optimizarea procedurii de purificare și a experimentelor ulterioare au fost calculate utilizând ProtParam de la Expasy (pI, greutate moleculară, situsuri de clivaj proteazic) (Gasteiger et al., 2005) și SCRATCH Protein Predictor (SOLpro - solubilitate la supraexpresie în *E. coli*) (Cheng et al., 2005).

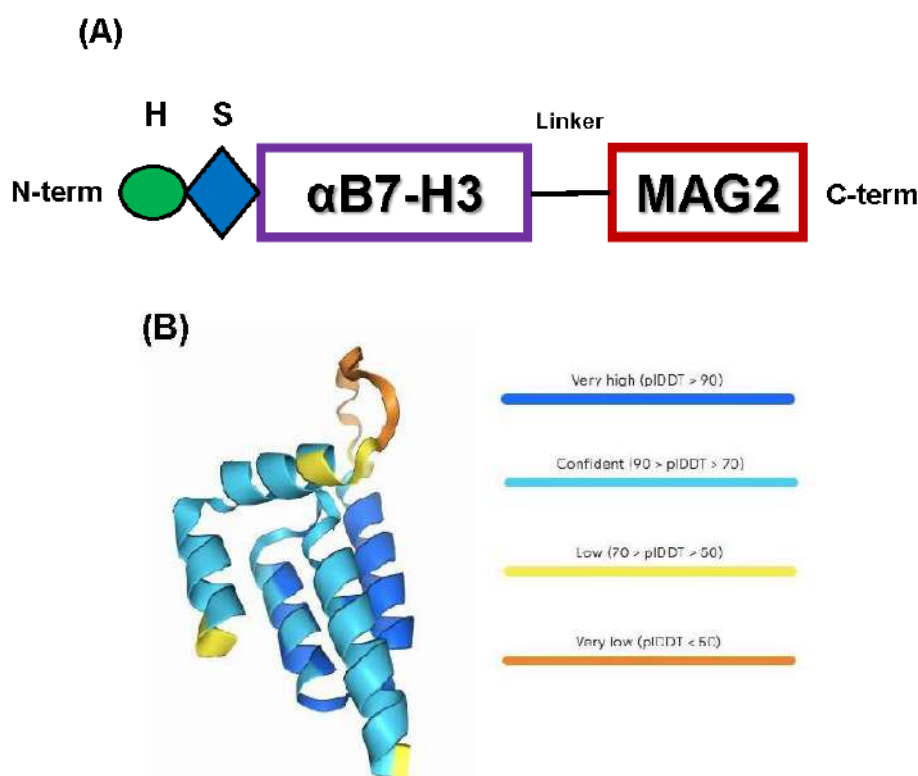


Figura 3. Proiectarea proteinei de fuziune recombinante. (A) Schema conjugatului proteic recombinat 6xHis-SUMO-Aff-MAG2. **H** – tag 6xHis, **S** – tag SUMO, **αB7-H3** – affibody anti-B7-H3, **MAG2** – Magainin-2. (B) Model structural AlphaFold 3 al compusului recombinant final. Întâmplător, capătul N-terminal și capătul C-terminal sunt regiunile galbene de la capătul a două alfa-helixuri. Proteina este cel mai probabil ordonată în 3 alfa-helixuri care se succed, cuprinzând affibody, urmată de regiunea de legătură dezordonată și

cu alfa-helixul Magainin-2 la capăt. pLDDT - testul de diferență de distanță locală prezisă, utilizat de AlphaFold pentru a măsura gradul de încredere al predicției modelului. Această figură este adaptată din (Vasilescu et al., 2025), utilizată în baza licenței CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Aff-MAG2 a fost Exprimat și Purificat din *E. coli* cu randamente mari

Datorită design-ului rațional eficient al constructului, proteina recombinată a fost exprimată cu succes în *E. coli* utilizând o rată de expresie mai lentă la 18 °C, pentru o pliere optimă a proteinei, în vectorul pET-19b descris și cu majoritatea produsului în formă solubilă (**Figura 4A**, coloana 5). Ulterior, utilizând cromatografia de afinitate cu metale imobilizate (IMAC), s-au obținut fracțiuni relativ pure ale proteinei (**Figura 4B**, coloanele 6-15) și, după cum se poate observa în **Figura 4B**, coloana 4 (fluxul coloanei), legarea la coloana Ni-Sepharose a fost foarte eficientă. După dializă, fracțiunile proteice combinate au fost supuse ultimei etape de purificare. Proteaza SUMO a fost utilizată pentru a scinda tag-urile, iar apoi compusul final Aff-MAG2 fără tag-uri a fost separat în supernatantul utilizând rășină Ni-Agarose. După cum se poate observa în **Figura 4C**, există dovezi clare că atât scindarea tag-urilor, cât și legarea rășinii au fost foarte eficiente. Mai mult, această ultimă etapă de separare a purificat și mai mult proteina, după cum se poate observa în coloana 3, unde rămân doar benzile finale ale constructului, în comparație cu coloana 1, unde impuritățile sunt evidente, și cu coloana 2, unde multe dintre aceste proteine impurificatoare sunt legate de rășină. Cu toate acestea, în procesul de purificare s-a produs o anumită degradare. Astfel, proteina citotoxică finală cu o puritate >95% este reprezentată de cele două benzi clare din supernatant (**Figura 4C**, coloana 3). Aproape toate proteinele impurificatoare au fost legate de rășină sau precipitate (coloana 2). Randamentul final de Aff-MAG2 cu puritate >95% obținut a fost de ~12 mg/L de cultură bacteriană, un randament foarte promițător, având în vedere faptul că proteina fără tag-uri rezultată are o greutate moleculară de 2.4 ori mai mică decât constructul complet exprimat (Vasilescu et al., 2025). Pentru clarificare, randamentul raportat a fost calculat determinând mai întâi concentrația proteinei Aff-MAG2 purificate în eluat, utilizând testul Pierce 660. Această concentrație a fost înmulțită cu volumul total de eluare pentru a obține cantitatea totală de proteină în miligrame. Randamentul final a fost apoi calculat prin împărțirea acestei cantități la volumul inițial al culturii de *E. coli* (în litri). Astfel, s-a obținut Aff-MAG2 pur pentru experimentele celulare din aval. Secvența sa de

aminoacizi a fost apoi validată prin nanoLC-MS/MS, iar degradarea observată a fost investigată în continuare.

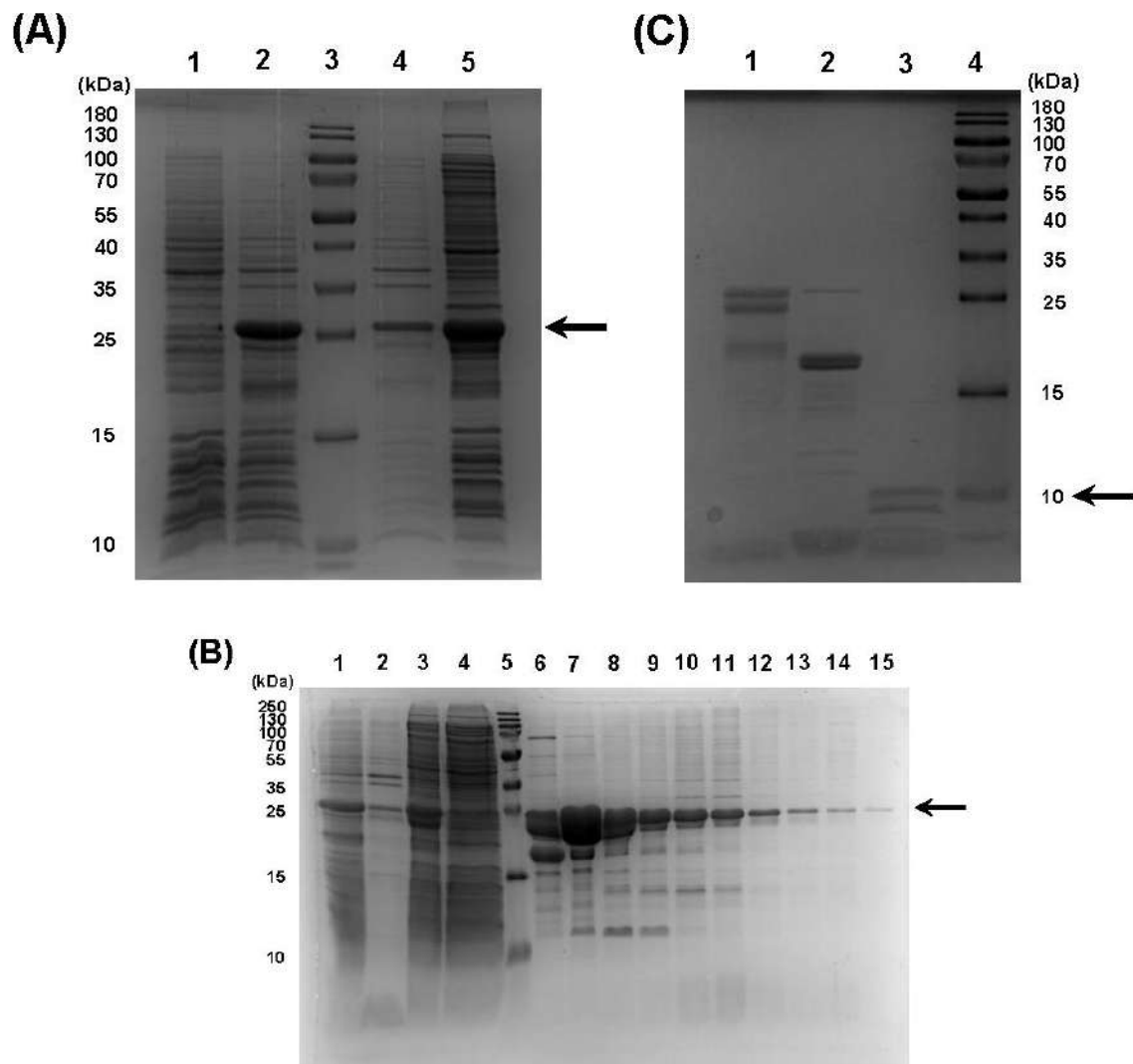


Figura 4. Expresia și purificarea AffDC recombinat. **(A)** Expresia și solubilitatea 6xHis-SUMO-Aff-MAG2. **1** - cultură bacteriană neindusă, **2** - cultură indusă, **3** - marker de greutate moleculară, **4** - fracție insolubilă din bacterii induse lizate, **5** - fracție solubilă din bacterii induse lizate. Săgeata neagră indică proteina de fuziune recombinată. **(B)** Purificarea 6xHis-SUMO-Aff-MAG2. **1** - cultură indusă, **2** - fracție insolubilă din lizat, **3** - supernatant din lizat, **4** - fluxul coloanei de purificare, **5** - marker de greutate moleculară, **6-15** - fracții eluate în intervalul 35-67, așa cum se vede pe cromatogramă. Săgeata neagră indică constructul recombinat. **(C)** Clivajul și separarea tag-ului proteinei recombinante. **1** - reacție de control negativ - construct recombinat purificat fără Ulp1, **2** - proteină legată de rășină, **3** -

supernatant cu proteină nelegată, 4 - marker de greutate moleculară. Săgeata neagră indică Aff-MAG2 fără tag-uri. Această figură este preluată din (Vasilescu et al., 2025), utilizată în baza licenței CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Evaluarea Stabilității Aff-MAG2 și a potențialelor situsuri de Degradare

După purificarea proteinei recombinante, s-a observat o anumită degradare, evidentă în **Figura 4C**. Cauza acestui fenomen și locația clivajului Aff-MAG2 nu erau clare. Pentru a determina dacă constructul s-a degradat în timp, s-a utilizat un test de stabilitate în condiții fiziologice simulate. S-a efectuat o analiză densitometrică a benzii pe imaginea SDS-PAGE prezentată în **Figura 5**, iar conversia cuantificată a benzii superioare în banda inferioară demonstrează că Aff-MAG2 are un timp de înjumătățire de ~24 de ore în mediu de cultură celulară suplimentat cu ser la 37 °C (coloana 3, conversie de 50%). Acest rezultat susține stabilitatea sa în condiții fiziologice simulate și indică faptul că degradarea observată anterior a fost probabil un eveniment unic, care a avut loc în timpul procedurii de purificare.

Prin urmare, ipoteza care a apărut a fost că, deoarece affibody și linkerul sunt cunoscute ca fiind foarte stabile, proteina a fost cel mai probabil scindată în regiunea MAG2 în timpul purificării. Având în vedere distanța de migrare în gel între cele două benzi rezultate (~2 kDa), s-ar părea că MAG2 a fost scindată chiar la capătul său N-terminal. NanoLC-MS/MS a fost utilizat pentru a confirma această ipoteză.

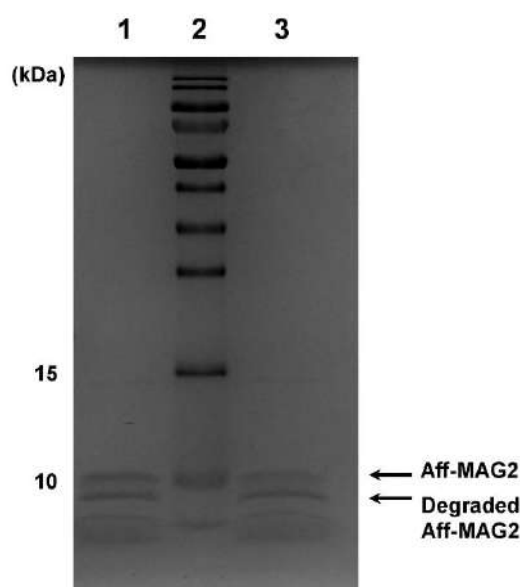


Figura 5. SDS-PAGE pentru stabilitatea Aff-MAG2 în timp la 37 °C. Aff-MAG2 purificat redizolvat în mediul de cultură celulară descris anterior cu FBS adăugat a fost incubat timp

de 24 de ore la 37 °C. **1** – stoc purificat Aff-MAG2, **2** – marker de greutate moleculară, **3** – Aff-MAG2 în mediu suplimentat cu ser după incubare. Săgețile indică Aff-MAG2 întreg și, respectiv, Aff-MAG2 degradat. Această figură este preluată din (Vasilescu et al., 2025), utilizată în baza licenței CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Efect Inhibitor Prezentat de Aff-MAG2 în celule de Leucemie Mieloidă Acută

După ce compusul recombinant a fost purificat, validat și i s-a caracterizat stabilitatea, următorul pas a fost să se testeze dacă acesta poate inhiba viabilitatea celulelor AML într-un mod specific și direcționat, având în vedere partea sa affibody cu afinitate ridicată pentru B7-H3. Linia celulară THP-1 a fost aleasă ca model clasic pentru AML. În acest scop, atât celulele THP-1, cât și cele RAJI au fost tratate cu o diluție în serie de Aff-MAG2, compusă din următoarele concentrații finale: 1.56 μ M, 3.12 μ M, 6.25 μ M, 12.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M și 100 μ M, respectiv. Toate tratamentele au fost efectuate timp de 6 ore, în triplicat tehnic, urmate de testul MTS. Celulele RAJI au reprezentat controlul negativ pentru specificitatea produsului citotoxic. Controalele negative tehnice pentru test au constatat din celule din ambele linii incubate numai cu mediul de creștere complet, fără antibiotice adăugate (celule netratate). Deoarece mecanismul de acțiune ipotetic al conjugatului testat este permeabilizarea membranei celulare, conducând în cele din urmă la formarea de pori, controlul pozitiv tehnic utilizat pentru test a fost un tratament de 15 minute cu Triton X-100 0.02%.

Așa cum se arată în **Figura 6A**, Aff-MAG2 a inhibat viabilitatea celulelor THP-1 într-o manieră dependentă de doză. În schimb, viabilitatea celulelor RAJI a rămas neafectată la toate concentrațiile testate. De exemplu, diferența dintre procentul mediu de viabilitate între tratamentele cu 25 μ M și 50 μ M în celulele RAJI nu a fost semnificativă din punct de vedere statistic ($p > 0.05$; **Figura 6B**). În contrast, Triton X-100 nespecific a provocat o inhibare puternică a celulelor RAJI ca agent general de permeabilizare, chiar și în comparație cu tratamentul cu 100 μ M Aff-MAG2 ($p < 0.001$, **Figura 6B**), întărind ipoteza că efectul compusului dezvoltat este specific celulelor B7-H3⁺. Diferența de inhibare între celulele RAJI și THP-1 a fost semnificativă din punct de vedere statistic la 25 μ M ($p < 0.01$) și foarte semnificativă la 50 μ M și 100 μ M ($p < 0.001$), așa cum se arată în **Figura 6B**. Concentrația inhibitorie maximă calculată (IC₅₀) a Aff-MAG2 împotriva celulelor THP-1 (B7-H3⁺) este de 26.35 μ M, în timp ce pentru celulele RAJI (B7-H3⁻), IC₅₀ este > 100 μ M, o diferență de 3

ori sau mai mare. În concluzie, aceste date sugerează cu tărie că Aff-MAG2 are un efect inhibitor puternic și foarte specific împotriva celulelor AML care exprimă B7-H3.

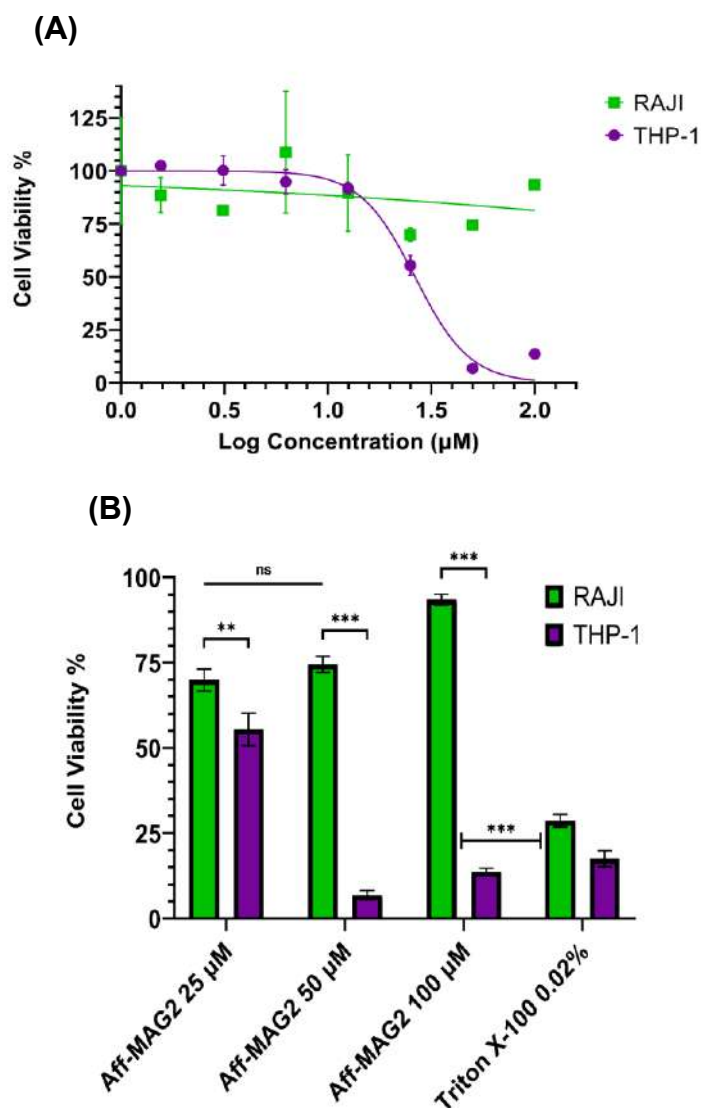


Figura 6. Testul MTS al celulelor AML tratate cu Aff-MAG2. Celulele **THP-1** (B7-H3⁺) și **RAJI** (B7-H3⁻) au fost tratate cu diferite concentrații de Aff-MAG2 timp de 6 ore. **(A)** Curbe de răspuns la doza inhibitoare. Punctele de pe ambele curbe reprezintă, în ordine de la stânga la dreapta, procentul mediu de viabilitate celulară, normalizat la celulele netratate, la următoarele concentrații ale compusului AffDC: 0 μM, 1.56 μM, 3.12 μM, 6.25 μM, 12.5 μM, 25 μM, 50 μM și 100 μM, respectiv. **(B)** Analiza comparativă pereche a datelor testului MTS între procentul mediu de viabilitate al celulelor RAJI și THP-1, respectiv, normalizat la celulele netratate, pentru tratamentul cu 25 μM, 50 μM și 100 μM de Aff-MAG2, respectiv. Triton X-100 0.02% - control pozitiv pentru permeabilizarea membranei. Barele

de eroare reprezintă $\pm$ SD, $n=3$ (replici tehnice) dintr-un experiment reprezentativ. Test t unpaired one-tailed, ns $p \geq 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Această figură este adaptată din (Vasilescu et al., 2025), utilizată în baza licenței CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Aff-MAG2 Cauzează Necroză și Apoptoză intense în celule AML

Pe baza rezultatelor încurajatoare ale testului MTS, autorul s-a aventurat să investigheze efectele specifice ale compusului citotoxic asupra funcției celulare prin citometrie în flux. În primul rând, liniile celulare au fost evaluate pentru expresia de suprafață a markerului B7-H3. **Figura 7**, panourile **A**, **B** și **C**, prezintă strategia de selectare utilizată pentru analiza expresiei B7-H3 în THP-1, ca exemplu reprezentativ. **Figura 7D** prezintă validarea prin citometrie în flux a modelelor celulare utilizate în acest studiu. După cum se arată, celulele RAJI nu au prezentat expresie de suprafață a B7-H3, confirmând utilitatea lor drept control negativ. Pe de altă parte, THP-1 a prezentat o expresie de suprafață ridicată a B7-H3, fiind astfel un model optim pentru validarea AffDC dezvoltat.

Pentru studiile funcționale, celulele THP-1 și RAJI au fost tratate cu 30 μ M de compus timp de 6 ore. **Figura 8** prezintă rezultatele unui experiment reprezentativ de apoptoză prin citometrie în flux. Celulele RAJI au servit ca martor negativ pentru specificitate, în timp ce celulele netratate din ambele linii au constituit martorii negativi tehnici. Controlul pozitiv tehnic pentru necroză a fost tratamentul timp de 15 minute cu Triton X-100 0.02%, în timp ce pentru apoptoză a fost un tratament de 18 ore cu 30 μ M Cisplatină. În **Figura 8**, panourile **A**, **B** și **C** reprezintă strategia de delimitare a populațiilor de interes.

Consolidând rezultatele MTS, celulele THP-1 au fost puternic afectate de tratamentul cu Aff-MAG2, prezentând o scădere a viabilității de aproximativ 60%, până la 36.18% (cadrantul din stânga jos, Anexină V⁻, PI⁻), cu 31.37% necrotice (cadrantul din dreapta sus, Anexină V⁺, PI⁺) și 32.13% celule apoptotice (cadrantul inferior drept, Anexină V⁺, PI⁻), comparativ cu celulele netratate (**Figura 8E**). În schimb, viabilitatea celulelor RAJI a rămas neafectată de tratament (**Figura 8D**). Astfel, citometria în flux demonstrează efectele necrotice și apoptotice foarte specifice pe care Aff-MAG2 le are asupra celulelor AML. Mai mult, proporția ridicată de celule necrotice dintre celulele THP-1 tratate sugerează un efect membranolic puternic, probabil atribuibil fragmentului Magainin-2 al constructului recombinat.

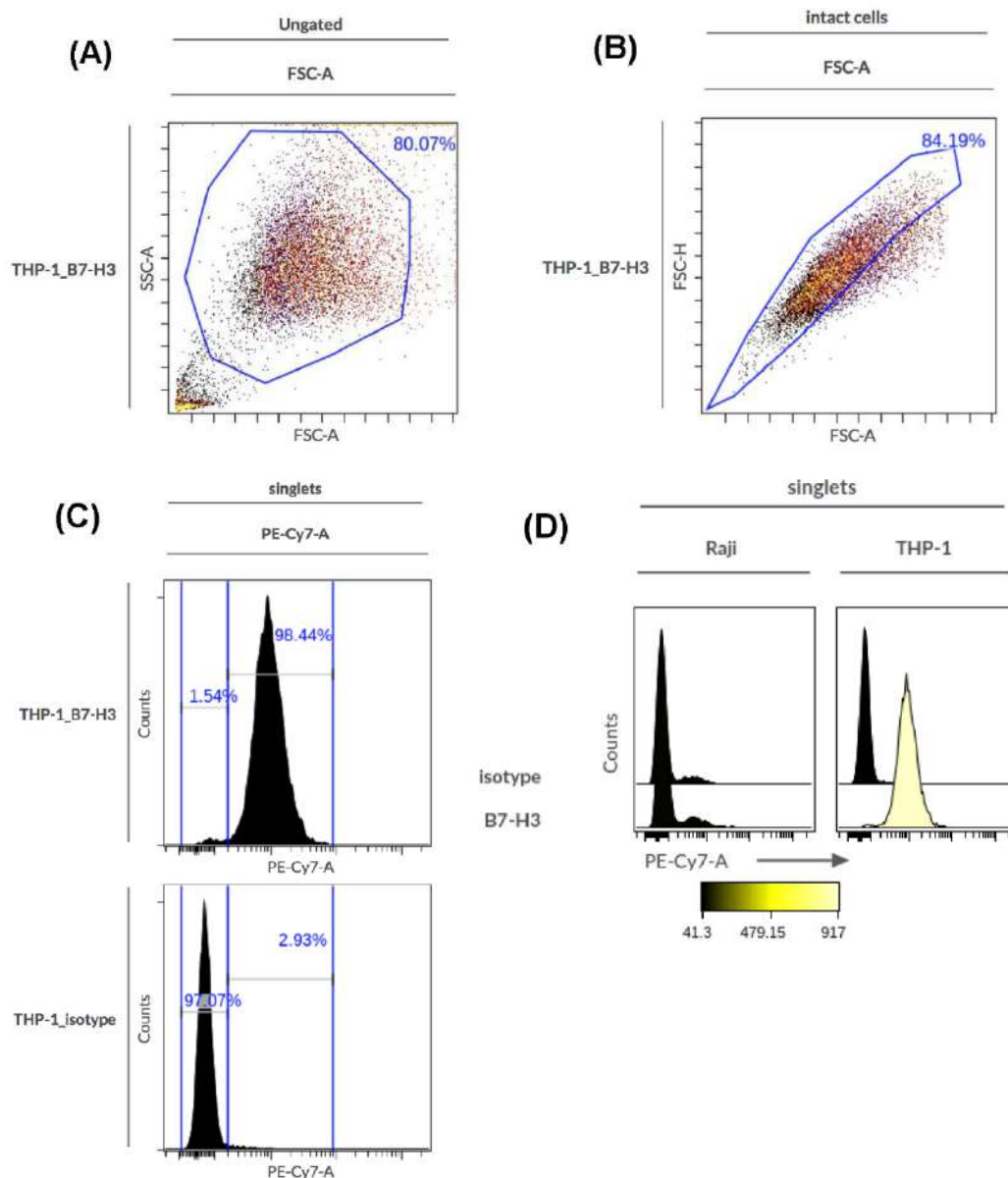


Figura 7. Exemple reprezentative ale strategiei de gating pentru celulele THP-1 și analiza citometriei în flux a expresiei de suprafață B7-H3 în celulele RAJI și THP-1. **(A)** Gating FSC-A vs. SSC-A pentru celule intacte. **(B)** Gating FSC-A vs. FSC-H singlets. **(C)** Histogramă de selectare pozitivă/negativă B7-H3 bazată pe fluorescența PE-Cy7, conținând anticorp anti-B7-H3 și celule marcate cu control izotipic, respectiv. **(D)** Expresia la suprafața celulară a ligandului B7-H3. Anticorpul corespunzător utilizat pentru marcarea este prezentat în partea stângă. Această figură este adaptată din (Vasilescu et al., 2025), utilizată în baza licenței CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

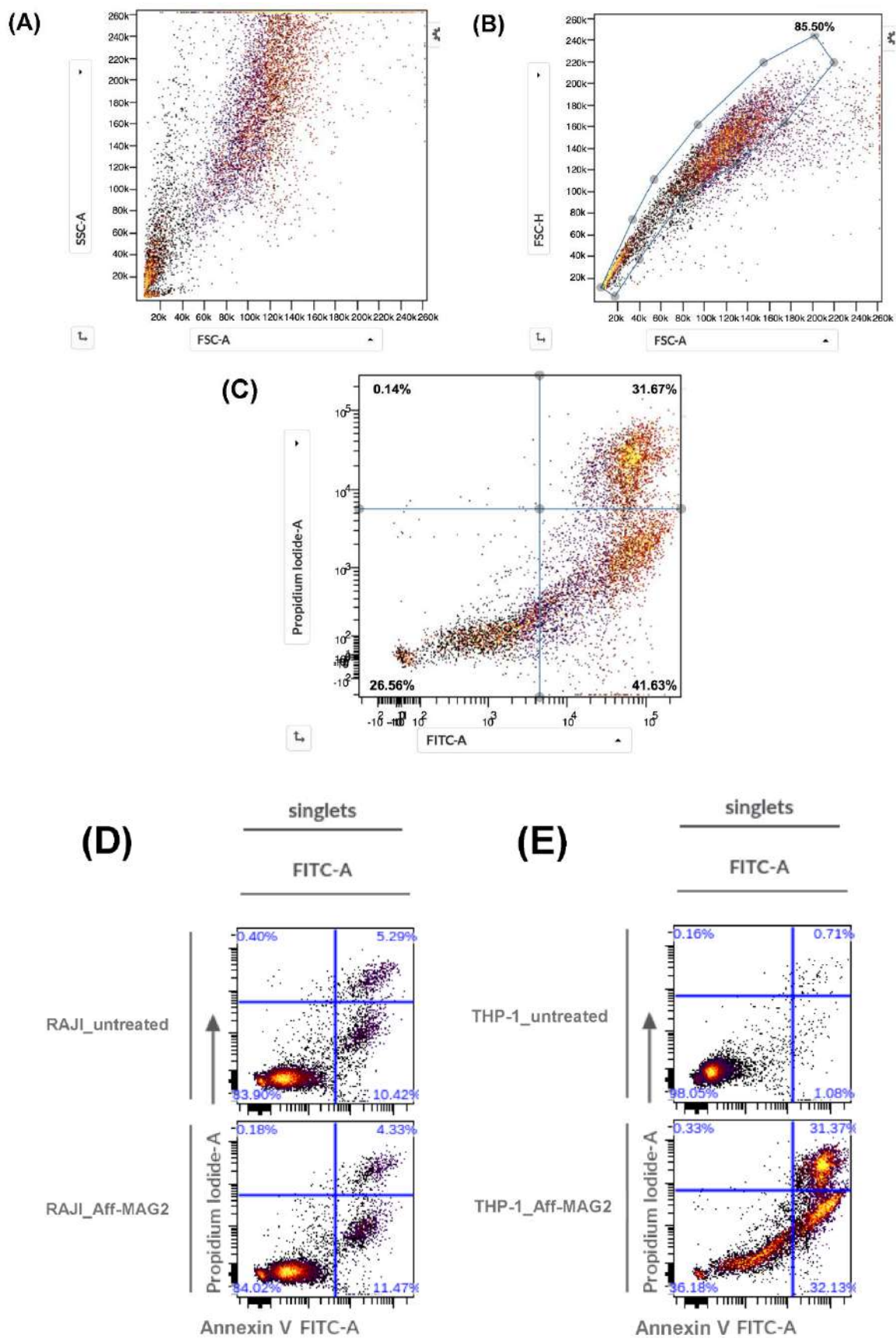


Figura 8. Evaluarea prin citometrie în flux a necrozei și apoptozei în celulele AML tratate cu Aff-MAG2. Panourile (A), (B) și (C) cuprind strategia de selectare utilizată, exemplificată în cazul celulelor THP-1 tratate cu AffDC. În panourile (D) și (E), tratament cu **Aff-MAG2** - cu 30 μ M proteină citotoxică timp de 6 ore. (A) Celule nefiltrate. (B) Poartă singlet. (C) Viabilitatea celulară, necroza și apoptoza pe celule singlet. (D) Necroza și apoptoza celulelor RAJI tratate vs. netratate. (E) Necroza și apoptoza celulelor THP-1 tratate vs. netratate. Datele prezentate provin dintr-un experiment reprezentativ. Această figură este adaptată din (Vasilescu et al., 2025), utilizată în baza licenței CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Celulele AML Suferă o Reducere a Proliferării în urma tratamentului cu Aff-MAG2

În final, autorul a testat dacă citotoxina țintită dezvoltată a avut vreun efect asupra proliferării celulare. Într-un experiment similar cu cele descrise anterior în această lucrare, celulele THP-1 și RAJI (control negativ experimental) au fost tratate cu 15 μ M de conjugat purificat timp de 6 ore, urmat de recoltarea celulelor pentru analiza Western blot. Ca și anterior, controalele negative tehnice au fost liniile celulare respective incubate numai cu mediu complet fără antibiotice. După cum arată **Figura 9**, Aff-MAG2 a redus în mod semnificativ și specific proliferarea celulelor THP-1 tratate, deoarece numai în acest grup nu a fost detectat markerul de proliferare Ki-67 (Bading et al., 1989) (coloana 3), în comparație cu celulele netratate și grupul de control, RAJI. Opusul este valabil pentru Caspaza 3 Clivată, care este un biomarker recunoscut care inițiază atât căile de apoptoză extrinsecă, cât și intrinsecă (Nicholson et al., 1995). Acest marker nu a fost detectat în nicio condiție experimentală, cu excepția celulelor THP-1 tratate (coloana 3), ceea ce subliniază faptul că majoritatea acestor celule au suferit apoptoză. Pe de altă parte, RAJI nu au fost afectate de tratament. Aceste rezultate susțin datele MTS și citometriei în flux, subliniind potența și specificitatea compusului dezvoltat.

De asemenea, modelele de expresie B7-H3 au fost validate din nou prin Western blot (**Figura 9**), deoarece numai în celulele THP-1 tratate (coloana 3) și netratate (coloana 1) a existat o bandă pentru această proteină, în comparație cu RAJI, care nu a afișat niciun semnal (coloanele 5 și 7). Deși se poate observa din controlul de încărcare α -Tubulină că toate probele au fost încărcate în cantități egale, controlul de încărcare nu a putut fi detectat în celulele THP-1 tratate (coloana 3). Acest lucru se datorează probabil faptului că aceste celule au suferit leziuni extinse ale membranei și, prin urmare, au pierdut cea mai mare parte a

conținutului citosolic din mediul celular, care nu poate fi recuperat în mod fezabil. Același lucru este valabil și pentru alte controale de încărcare standard, cum ar fi GAPDH, care a fost, de asemenea, pierdut din probă și nu a putut fi detectat. Cu toate acestea, coloana 3 conține aceeași cantitate de proteină totală, după cum se dovedește prin prezența Caspazei 3 Clivate, dar și B7-H3, care este o proteină de membrană și ar putea fi recuperată prin centrifugare. În ansamblu, aceste date demonstrează că Aff-MAG2 reduce proliferarea și crește apoptoza numai a celulelor AML THP-1 (B7-H3⁺), adăugându-se la efectele cumulative observate ale acestei construcții proteice duale puternice, specifice și noi (Vasilescu et al., 2025).

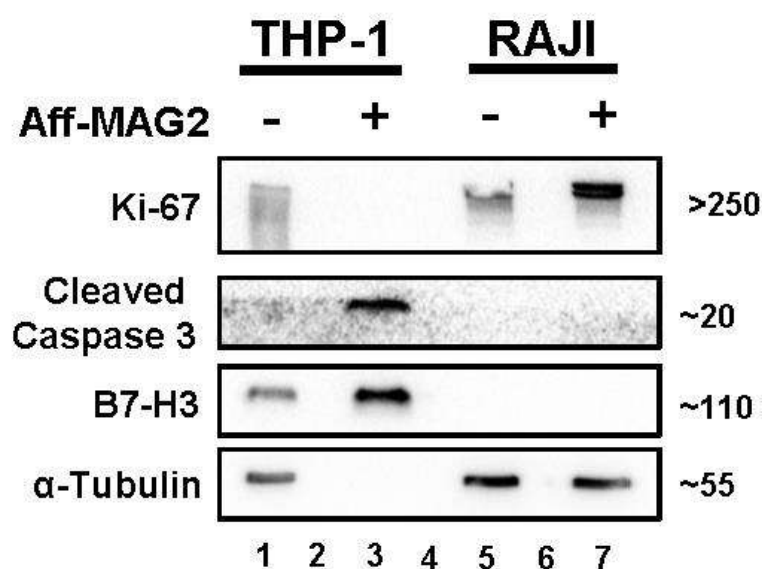


Figura 9. Western blot care arată nivelurile de proliferare și apoptoză în celulele AML tratate cu Aff-MAG2. Toate probele erau lizate celulare totale, încărcate în cantități egale. **Aff-MAG2** - tratament cu 15 μM AffDC timp de 6 ore, - celule netratate, + celule tratate. Numerele din partea dreaptă a imaginii arată masa aproximativă în kDa la care au migrat proteinele corespunzătoare. Coloanele 2 și 6 - goale, coloana 4 - marker de greutate moleculară. α-Tubulina, controlul de încărcare, nu a fost detectată în coloana 3 (celule THP-1 tratate). **Ki-67** - marker stabilit pentru proliferarea celulară, **Caspaza 3 Clivată** - biomarker pentru toate căile de apoptoză. Date dintr-un experiment reprezentativ. Această figură este adaptată din (Vasilescu et al., 2025), utilizată sub licența CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

3. DISCUȚII

Această lucrare a avut ca scop proiectarea, dezvoltarea și evaluarea *in vitro* a unei proteine recombinante inovatoare Affibody-Citotoxină cu proprietăți citotoxice specifice împotriva celulelor AML care supraexprimă B7-H3. Astfel, constructul dezvoltat în acest studiu este conceput pentru a răspunde nevoii urgente de terapie personalizată pentru pacienții cu AML (a se vedea și **PARTEA I, secțiunea 1.**). Această AffDC este compusă dintr-un Affibody cu afinitate ridicată împotriva B7-H3, care a fost demonstrat anterior (Oroujeni et al., 2023) (a se vedea și **PARTEA I, secțiunea 2.**), cuplat cu Magainin-2, o peptidă citotoxică membranolitică puternică cu letalitate dovedită împotriva celulelor tumorale (Lehmann et al., 2006) (a se vedea și **PARTEA I, secțiunea 3.**). Proteina de fuziune a fost proiectată pentru o expresie solubilă la nivel ridicat în *E. coli* și ulterior purificată prin IMAC. Datorită acestei strategii detaliate, s-a obținut Aff-MAG2 pur în cantități mari, iar secvența sa de aminoacizi a fost confirmată ulterior prin nanoLC-MS/MS. În plus, AffDC s-a dovedit stabil în condiții fiziologice simulate.

Prezentul studiu raportează că IC_{50} a compusului de 26.35 μM împotriva celulelor THP-1 este de aproximativ 3 ori mai mic decât 75.2 μM observat împotriva celulelor de cancer al vezicii urinare pentru Magainin-2 simplu (Lehmann et al., 2006) și de peste 2 ori mai mic decât >60 μM raportat de un alt grup în 1991 (Cruciani et al.) pe mai multe linii celulare tumorale din linia hematopoietică, folosind din nou peptida simplă. După cunoștințele autorului, singurul studiu care a raportat valori IC_{50} mai mici decât cel actual (~8 μM), realizat pe linii celulare de cancer pulmonar de Ohsaki et al. (1992), a utilizat analogi sintetici ai MAG2 într-un tratament care a durat 4 zile, comparativ cu tratamentul de 6 ore din acest studiu. Astfel, este posibil ca efectul toxic crescut asupra celulelor tratate să fi fost cauzat de timpul de incubare mai lung. Mai important, acești analogi au prezentat un IC_{50} pe fibroblaste umane normale în intervalul aproximativ 21-29 μM . Acest lucru relevă efecte colaterale mult mai agresive asupra celulelor normale, cu o diferență mai mică față de pragul de activitate asupra celulelor maligne, decât în cazul IC_{50} Aff-MAG2 împotriva RAJI (>100 μM). Prin urmare, în comparație cu datele raportate anterior privind toxicitatea în afara țintei a analogilor MAG2 asupra fibroblastelor, acest studiu prezintă o fereastră de selectivitate favorabilă pentru celulele AML care sunt B7-H3-pozitive, așa cum demonstrează rezistența la Aff-MAG2 a celulelor RAJI. Această rezistență se manifestă în ciuda faptului că celulele RAJI sunt tumorale. Astfel, molecula citotoxică țintită dezvoltată are o specificitate mult mai mare pentru celulele AML B7-H3⁺ și are efecte în afara țintei

considerabil mai reduse decât toxina singură sau derivații acesteia. De asemenea, după cunoștințele autorului, acest studiu este unul dintre foarte puținele care evaluează toxina Magainin-2 asupra celulelor AML, aducând noutate și în abordarea bolii (Vasilescu et al., 2025).

Cu promisiunea unor studii clinice promițătoare împotriva cancerelor B7-H3-pozitive, cum ar fi cel privind anticorpul monoclonal radioactiv (mAb) ^{131}I -omburtamab pe pacienți cu neuroblastom (Kramer et al., 2022) sau celulele T cu receptor antigenic chimeric (CAR) cu fragmente variabile cu lanț unic (scFvs) direcționate împotriva B7-H3 într-o multitudine de afecțiuni maligne solide și lichide care depășesc semnificativ performanța mAbs (Guo et al., 2025), este din ce în ce mai convingător faptul că acest antigen este o țintă de mare importanță pentru medicina personalizată. Din acest motiv, în această lucrare, autorul a dezvoltat un nou vehicul citotoxic direcționat către B7-H3, care poate fi produs în *E. coli* cu randament ridicat și eficiență din punct de vedere al costurilor, utilizând inginerie genetică simplă, fără a fi necesare modificări chimice complicate. Este foarte mic, foarte solubil și nu necesită un sistem de livrare către celulele canceroase. Mai mult, Aff-MAG2 vizează selectiv celulele AML care exprimă B7-H3, cu efecte letale puternice și daune minime sau inexistente în afara zonei țintă, ceea ce îl face un candidat foarte promițător pentru terapia personalizată a AML în viitor.

Limitări

Principalele limitări ale acestui studiu includ degradarea parțială a proteinei recombinante în timpul purificării și provocarea identificării unui control de încărcare adecvat pentru Western blot, care să fie reținut în mod constant de celulele tratate care exprimă B7-H3. În plus, nu au existat teste *in vivo* ale stabilității și efectelor Aff-MAG2, pentru a evalua corect potențialul său într-un mediu mai apropiat de cel clinic.

Perspective

Pentru a adresa aceste limitări, studiile viitoare se vor concentra pe stabilizarea Aff-MAG2 pentru a preveni degradarea și pe utilizarea unor linii celulare B7-H3-negative mai rezistente pentru testarea comparativă. De asemenea, vor fi utilizate alte tehnici biochimice și *in cellulo*, inclusiv microscopia, pentru a caracteriza proprietățile farmacocinetice și mecanismul de acțiune al compusului. În viitor, va fi utilizat un studiu preclinic *in vivo* pentru a testa eficiența acestui compus antitumoral nou în modele de xenotransplanturi derivate de la pacienți cu AML.

III. CONCLUZII

În ansamblu, rezultatele obținute utilizând celule THP-1 B7-H3-pozitive și RAJI B7-H3-negative reprezentative pentru AML demonstrează că molecula citotoxică Aff-MAG2 dezvoltată prezintă o puternică activitate necrotică, apoptotică și antiproliferativă, foarte specifică celulelor AML B7-H3-pozitive, fără aproape niciun efect colateral. Mai mult, această activitate observată este semnificativ mai puternică decât efectele raportate anterior ale Magainin-2 singure. În concluzie, autorul a proiectat, produs și evaluat un nou Affibody citotoxic Anti-B7-H3 care, din datele *in vitro*, demonstrează un potențial ridicat pentru studii preclinice și *in vivo* suplimentare și, în cele din urmă, pentru transpunerea în terapia personalizată a AML.

MULȚUMIRI

Această lucrare a fost susținută de Academia Română prin Școala Doctorală de Studii Avansate. Această cercetare nu a beneficiat de sprijin financiar dedicat pentru achiziționarea de reactivi de la agenții de finanțare comerciale, publice sau non-profit. O bursă Fulbright Visiting Scholar (nr. 779/14.06.2022) acordată Prof. Dr. Ștefan-Eugen Szedlacsek a susținut parțial dezvoltarea conceptuală a studiului. În plus, analiza nanoLC-MS/MS a fost susținută parțial de grantul Ministerului Cercetării, Inovării și Digitalizării, CNCS - UEFISCDI, numărul proiectului PN-IV-P8-8.3-ROMD-2023-0100, Contract 25ROMD/2024. De asemenea, colaborarea bilaterală între Academia Română și Academia Maghiară, cu numărul de proiect 2286/15.09.2021, între 2022-2024, intitulat „Radiolabelling of affibody for tumor diagnostic and theranostic application in the nuclear medicine” a susținut colaborarea pentru articolul secundar deja menționat care stă la baza acestei teze (Váradi et al., 2023). Mulțumesc călduros Dr. Adrian Bogdan Țigu de la Centrul de Cercetare pentru Medicină Avansată – MEDFUTURE de la Universitatea de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu din Cluj-Napoca, România, pentru că a furnizat cu amabilitate celulele RAJI, precum și Departamentului de Glicoproteine Virale al Institutului de Biochimie al Academiei Române pentru furnizarea anticorpului anti- α -Tubulină. Finanțatorii nu au avut nicio implicare în conceptualizarea sau planificarea experimentală a acestei teze.

LISTĂ DE PUBLICAȚII

1. **Vasilescu, A.-M.**, Vasilescu, A.-G., Sima, L. E., Munteanu, C. V. A., Baran, N. & Szedlacsek, Ș.-E. 2025. A novel cytotoxic anti-B7-H3 affibody with therapeutic potential in acute myeloid leukemia. *Front. Pharmacol.* 16:1684226. DOI: 10.3389/fphar.2025.1684226.
2. Váradi, B., Brezovcsik, K., Garda, Z., Madarasi, E., Szedlacsek, H., Badea, R.-A., **Vasilescu, A.-M.**, Puiu, A.-G., Ionescu, A. E., Sima, L.-E., Munteanu, C. V. A., Călăraș, S., Vágner, A., Szikra, D., Toàn, N. M., Nagy, T., Szűcs, Z., Szedlacsek, S., Nagy, G. & Tirsó, G. 2023. Synthesis and characterization of a novel [^{52}Mn]Mn-labelled affibody based radiotracer for HER2+ targeting. *Inorg. Chem. Front.* 10. 4734–4745. DOI: 10.1039/D3QI00356F.
3. Vasilescu, A.-G., **Vasilescu, A.-M.**, Sima, L. E., Baran, N. & Szedlacsek, Ș.-E. 2025. Breaking the cancer code: a novel DNA minicircle to disable STAT3 in ovarian cancer cells SKOV3. *Front. Pharmacol.* 16:1673427. DOI: 10.3389/fphar.2025.1673427.
4. **Vasilescu, A.**, Puiu, A., Szedlacsek, S. 2025. A novel cytotoxic fusion protein targeting B7-H3 for acute myeloid leukemia therapy. *FEBS Open Bio.* 15:P-32-103. DOI: 10.1002/2211-5463.70071. - Poster presented during *The 49th FEBS Congress, Istanbul, 2025*.
5. Puiu, A., **Vasilescu, A.**, Szedlacsek, S. 2025. Development of a novel small circular DNA decoy inhibitor targeting STAT3 for cancer therapy. *FEBS Open Bio.* 15:P-32-102. DOI: 10.1002/2211-5463.70071. - Poster presented during *The 49th FEBS Congress, Istanbul, 2025*.
6. Váradi, B., Garda, Z., Madarasi, E., Brezovcsik, K., Vágner, A., Nagy, T., Garai, I. M., Puiu, A. G., **Vasilescu, A. M.**, Szűcs, Z., Szedlacsek, S. E., Nagy, G., Tirfél, Gy. 2022. Labeling of anti-HER2-affibodies with ^{52}Mn via pyclyen-based bifunctional ligands: from ligand design to in vivo PET/MR experiments. - Poster presented during *The 35th Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, Barcelona, 2022*.

BIBLIOGRAFIE

1. Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A. J., Bambrick, J., Bodenstein, S. W., Evans, D. A., Hung, C. C., O'Neill, M., Reiman, D., Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Žemgulytė, A., Arvaniti, E., ... Jumper, J. M. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, 630(8016), 493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>
2. ATCC: The Global Bioresource Center. (n.d.). Retrieved July 1, 2025, from <https://www.atcc.org/>
3. Bading, H., Rauterberg, E. W., & Moelling, K. (1989). Distribution of c-myc, c-myb, and Ki-67 Antigens in Interphase and Mitotic Human Cells Evidenced by Immunofluorescence Staining Technique. In *Experimental Cell Research* (Vol. 185).
4. Baker, M. A., Maloy, W. L., Zasloff, M., & Jacob, L. S. (1993). Anticancer Efficacy of Magainin2 and Analogue Peptides. *Cancer Research*, 53, 3052–3057. <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/53/13/3052/2450843/cr0530133052.pdf>
5. Bommarius, B., Jenssen, H., Elliott, M., Kindrachuk, J., Pasupuleti, M., Gieren, H., Jaeger, K. E., Hancock, R. E. W., & Kalman, D. (2010). Cost-effective expression and purification of antimicrobial and host defense peptides in Escherichia coli. *Peptides*, 31(11), 1957–1965. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.08.008>
6. Chen, X., Zaro, J. L., & Shen, W. C. (2013). Fusion protein linkers: Property, design and functionality. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 65, Issue 10, pp. 1357–1369). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.039>
7. Cheng, J., Randall, A. Z., Sweredoski, M. J., & Baldi, P. (2005). SCRATCH: A protein structure and structural feature prediction server. *Nucleic Acids Research*, 33(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1093/nar/gki396>
8. Cruciani, R. A., Barker, J. L., Zasloff, M., Chen, Hao.-C., & Colamonici, O. (1991). Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 88, 3792–3796.
9. Fan, S., Wang, T., You, F., Zhang, T., Li, Y., Ji, C., Han, Z., Sheng, B., Zhai, X., An, G., Meng, H., & Yang, L. (2023). B7-H3 chimeric antigen receptor-modified T cell shows potential for targeted treatment of acute myeloid leukaemia. *European Journal of Medical Research*, 28(1). <https://doi.org/10.1186/s40001-023-01049-y>

10. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In J. M. Walker (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571–607). Humana Press. <http://www.expasy.org/tools/>.
11. Goldman, M. J., Craft, B., Hastie, M., Repečka, K., McDade, F., Kamath, A., Banerjee, A., Luo, Y., Rogers, D., Brooks, A. N., Zhu, J., & Haussler, D. (2020). Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. In *Nature Biotechnology* (Vol. 38, Issue 6, pp. 675–678). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0546-8>
12. Guo, Y., Wang, X., Zhang, C., Chen, W., Fu, Y., Yu, Y., Chen, Y., Shao, T., Zhang, J., & Ding, G. (2025). Tumor Immunotherapy Targeting B7-H3: From Mechanisms to Clinical Applications. In *ImmunoTargets and Therapy* (Vol. 14, pp. 291–320). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/ITT.S507522>
13. Kramer, K., Pandit-Taskar, N., Kushner, B. H., Zanzonico, P., Humm, J. L., Tomlinson, U., Donzelli, M., Wolden, S. L., Haque, S., Dunkel, I., Souweidane, M. M., Greenfield, J. P., Tickoo, S., Lewis, J. S., Lyashchenko, S. K., Carrasquillo, J. A., Chu, B., Horan, C., Larson, S. M., ... Modak, S. (2022). Phase 1 study of intraventricular ¹³¹I-omburtamab targeting B7H3 (CD276)-expressing CNS malignancies. *Journal of Hematology and Oncology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01383-4>
14. Lehmann, J., Retz, M., Sidhu, S. S., Suttman, H., Sell, M., Paulsen, F., Harder, J., Unteregger, G., & Stöckle, M. (2006). Antitumor Activity of the Antimicrobial Peptide Magainin II against Bladder Cancer Cell Lines. *European Urology*, 50(1), 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2005.12.043>
15. Li, Y. (2011). Recombinant production of antimicrobial peptides in Escherichia coli: A review. *Protein Expression and Purification*, 80(2), 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.08.001>
16. Matsuzaki, K. (1998). Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1376(3), 391–400. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(98\)00014-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(98)00014-8)
17. Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A., Munday, N. A., Raju, S. M., Smulson, M. E., Yamin, T. T., Yu, V. L., & Miller, D. K. (1995).

- Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 376(6535), 37–43. <https://doi.org/10.1038/376037A0>
18. Ohsaki, Y., Gazdar, A. F., Chen, H.-C., & Johnson, B. E. (1992). Antitumor Activity of Magainin Analogues against Human Lung Cancer Cell Lines. *Cancer Research*, 52, 3534–3538. <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/52/13/3534/2448103/cr0520133534.pdf>
 19. Oroujeni, M., Bezverkhniaia, E. A., Xu, T., Liu, Y., Plotnikov, E. V., Klint, S., Ryer, E., Karlberg, I., Orlova, A., Frejd, F. Y., & Tolmachev, V. (2023). Evaluation of affinity matured Affibody molecules for imaging of the immune checkpoint protein B7-H3. *Nuclear Medicine and Biology*, 124–125. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2023.108384>
 20. Pandidan, S., & Mechler, A. (2025). Nano-viscosimetry analysis of membrane disrupting peptide magainin2 interactions with model membranes. *Biophysical Chemistry*, 318, 107390. <https://doi.org/10.1016/J.BPC.2025.107390>
 21. Ramos, R., Moreira, S., Rodrigues, A., Gama, M., & Domingues, L. (2013). Recombinant expression and purification of the antimicrobial peptide magainin-2. *Biotechnology Progress*, 29(1), 17–22. <https://doi.org/10.1002/BTPR.1650>
 22. *Scientific Image and Illustration Software | BioRender*. (n.d.). Retrieved October 2, 2025, from <https://www.biorender.com/>
 23. Stefańczyk, S. A., Hagelstein, I., Lutz, M. S., Müller, S., Holzmayer, S. J., Jarjour, G., Zekri, L., Heitmann, J. S., Salih, H. R., & Märklin, M. (2024). Induction of NK cell reactivity against acute myeloid leukemia by Fc-optimized CD276 (B7-H3) antibody. *Blood Cancer Journal*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41408-024-01050-6>
 24. Tan, X., & Zhao, X. (2024). B7-H3 in acute myeloid leukemia: From prognostic biomarker to immunotherapeutic target. In *Chinese Medical Journal* (Vol. 137, Issue 21, pp. 2540–2551). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000003099>
 25. Tolmachev, V., Papalannis, E., Bezverkhniaia, E. A., Rosly, A. H., Vorobyeva, A., Orlova, A., Carlqvist, M., Frejd, F. Y., & Oroujeni, M. (2025). Impact of Radiometal Chelates on In Vivo Visualization of Immune Checkpoint Protein Using Radiolabeled Affibody Molecules. *ACS Pharmacology and Translational Science*. <https://doi.org/10.1021/acsptsci.4c00539>

26. Tyagi, A., Ly, S., El-Dana, F., Yuan, B., Jaggupilli, A., Grimm, S., Konopleva, M., Bühring, H. J., & Battula, V. L. (2022). Evidence supporting a role for the immune checkpoint protein B7-H3 in NK cell-mediated cytotoxicity against AML. *Blood*, *139*(18), 2782–2796. <https://doi.org/10.1182/blood.2021014671>
27. Váradi, B., Brezovcsik, K., Garda, Z., Madarasi, E., Szedlacsek, H., Badea, R. A., Vasilescu, A. M., Puiu, A. G., Ionescu, A. E., Sima, L. E., Munteanu, C. V. A., Călăraș, S., Vágner, A., Szikra, D., Toàn, N. M., Nagy, T., Szűcs, Z., Szedlacsek, S., Nagy, G., & Tircsó, G. (2023). Synthesis and characterization of a novel [⁵²Mn]Mn-labelled affibody based radiotracer for HER2⁺ targeting. *Inorganic Chemistry Frontiers*, *10*(16), 4734–4745. <https://doi.org/10.1039/d3qi00356f>
28. Vasilescu, A.-M., Vasilescu, A.-G., Sima, L. E., Munteanu, C. V. A., Baran, N., & Szedlacsek, Ș.-E. (2025). A novel cytotoxic anti-B7-H3 affibody with therapeutic potential in acute myeloid leukemia. *Frontiers in Pharmacology*, *16*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1684226>
29. Wittwer, N. L., Brumatti, G., Marchant, C., Sandow, J. J., Pudney, M. K., Dottore, M., D’Andrea, R. J., Lopez, A. F., Ekert, P. G., & Ramshaw, H. S. (2017). High CD123 levels enhance proliferation in response to IL-3, but reduce chemotaxis by downregulating CXCR4 expression. *Blood Advances*, *1*(15), 1067–1079. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2016002931>
30. Zasloff, M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*(15), 5449–5453. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.15.5449>
31. Zhang, Z., Jiang, C., Liu, Z., Yang, M., Tang, X., Wang, Y., Zheng, M., Huang, J., Zhong, K., Zhao, S., Tang, M., Zhou, T., Yang, H., Guo, G., Zhou, L., Xu, J., & Tong, A. (2020). B7-H3-Targeted CAR-T Cells Exhibit Potent Antitumor Effects on Hematologic and Solid Tumors. *Molecular Therapy Oncolytics*, *17*, 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.03.019>
32. Zorko, M., & Jerala, R. (2010). Production of Recombinant Antimicrobial Peptides in Bacteria. In A. Giuliani & A. C. Rinaldi (Eds.), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 618, pp. 61–75). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-594-1>