

# KETOCONAZOL: DE LA FUNDAMENTE LA FORMULĂRI ANTIFUNGICE NOI PE BAZĂ DE DENDRIMERI PAMAM CU BIODISPONIBILITATE ÎMBUNĂTĂȚITĂ

(KET-IN-PAMAM)

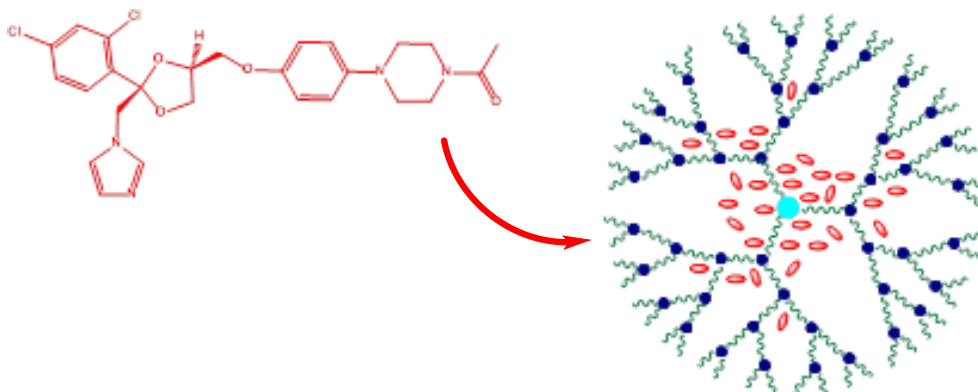
Nr. Contract TE122/2022

## RAPORT ȘTIINȚIFIC

### ETAPA NR. 1

#### FORMULAREA ȘI CARACTERIZAREA COMPLEXULUI KTZ-PAMAM ȘI A COCRISTALELOR KTZ-AA ȘI KTZ-SA

perioada de raportare: 15/05/2022 - 31/12/2022



**KTZ-PAMAM-G5-NH<sub>2</sub>**  
complex supramolecular

## **Rezumatul Etapei 1**

Proiectul propune evaluarea potențialului farmacologic pentru forme solide de Ketoconazol (KTZ): (i) complex de tip sistem transportor **KTZ-dendrimer PAMAM** pentru uz topic, (ii) două forme solide de tip co-cristal **KTZ-Acid Adipic (KTZ-AA)** și **KTZ-Acid Sorbic (KTZ-SA)**, obținute anterior desfășurării acestui proiect, cu solubilitate îmbunătățită față de KTZ comercial. KTZ este primul antifungic cu spectru larg aprobat de FDA utilizat în tratamentul micozelor superficiale și sistemice, aparținând clasei II (BCS), cu solubilitate apoasă redusă și permeabilitate ridicată, hidrofobicitate pronunțată și bazicitate slabă. Biodisponibilitatea scăzută la  $\text{pH} > 3$  reprezintă dezavantajul major al eficacității sale în cazul administrării orale, fiind eliminat din tractul gastrointestinal înainte de a fi complet dizolvat, reducând-i absorbția în circulația sanguină. Creșterea biodisponibilității are ca efect utilizarea unei concentrații mai mici de substanță activă pentru obținerea efectului terapeutic dorit, reducând în același timp și hepatotoxicitatea manifestată, cauzată în special de tratamentul de lungă durată în cazul infecțiilor profunde/infectării fanerelor. Rezultatele științifice ale **Etapei 1** pentru formele de KTZ menționate mai sus sunt prezentate în cadrul activităților prevazute.

### **Activitatea 1.1**

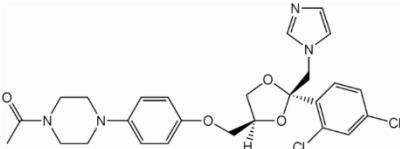
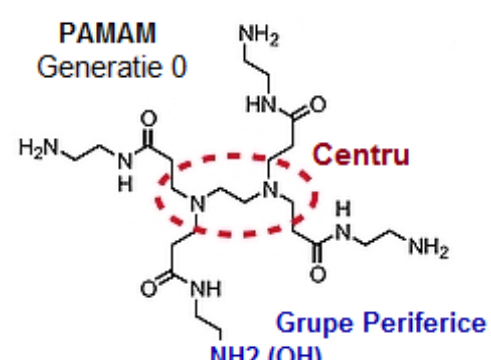
#### **Obținerea formulărilor KTZ-PAMAM**

***Rezultat: R.1.1. Raport științific privind protocolul experimental de obținere al complexului KTZ-PAMAM***

Obținerea de complecși dendrimer-medicament este o alternativă viabilă a creșterii eficienței terapeutice a substanțelor farmaceutice active. O proprietate intens investigată se referă la abilitatea dendrimerilor de a încapsula centre funcționale și crearea de micromedii specifice, modificându-se astfel proprietățile moleculare. O aplicație importantă, derivată din această proprietate de încapsulare, o reprezintă utilizarea dendrimerilor drept sisteme drug-delivery, pentru transportul de ingrediente farmaceutice active sau imunogeni. Încapsularea și conjugarea medicamentelor cu dendrimeri prezintă o serie de avantaje, printre care: creșterea biodisponibilității, stabilității și solubilității substanțelor active, reducerea toxicității acestora, îmbunătățirea metabolizării și a tranzitului medicamentului printre barierele biologice. Toate acestea conduc la îmbunătățirea eficienței terapeutice, atât în formulări orale, intravenoase, topice cât și transdermice.

Structurile dendritice propuse pentru elaborarea de sisteme supramoleculare medicament-transportoare sunt de tipul PAMAM, comerciali, de generație G4 și G5 cu grupări periferice de tip amino (abreviere: PAMAM-G4-NH<sub>2</sub> și PAMAM-G5-NH<sub>2</sub>), respectiv amidoetanol (abreviere: PAMAM-G4-OH și PAMAM-G5-OH) (Tabel 1). Conform studiilor de specialitate, dendrimerii PAMAM s-au dovedit a fi cei mai versatili privind transportul de substanțe bioactive, datorită solubilității lor crescute, toxicității reduse precum și abilității lor controlate de eliberare a medicamentului.

**Tabel 1.** Substanța farmaceutic activă Ketoconazol și Dendrimerii PAMAM

<p><b>KETOCONAZOL (KTZ)</b>  <math>C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4</math></p>  <p><b>Masa Moleculară</b>                      531.431 g/mol</p>			
	<b>Dendrimer / grupe periferice NH<sub>2</sub> sau OH</b>	<b>Masa Moleculară (g/mol)</b>	<b>Concentrația în metanol / Densitate (g/mol)</b>
	PAMAM-NH <sub>2</sub> -G4 / 64	14214.17	10 wt. % / 0.813
	PAMAM-NH <sub>2</sub> -G5 / 128	28824.81	5 wt. % / 0.797
	PAMAM-OH-G4 / 64	14277.19	10 wt. % / 0.947
PAMAM-OH-G5 / 128	28950.86	5 wt. % / 0.786	

Interațiunea dintre substanța activă KTZ și dendrimerii PAMAM selectați este de tipul non-covalent (e.g. interacțiuni electrostatice, legături de hidrogen) obținând astfel *complexi supramoleculari* KTZ-dendrimer PAMAM. Încapsularea KTZ în dendrimerii PAMAM selectați se bazează pe metoda liofilizării, o metodă des utilizată în literatura de specialitate pentru acest tip de formulare. În urma liofilizării au fost obținute doar materiale sub forma de pudră lipicioasă care au putut fi în continuare investigate prin difracție de raze X pe pulberi.

### Activitatea 1.2

#### Caracterizarea fizico-chimică a formulărilor KTZ-PAMAM prin XRPD, DSC, FTIR, RMN pe lichide și HPLC

##### **Rezultat: R.1.2. Raport științific de caracterizare fizico-chimică al complexului KTZ-PAMAM**

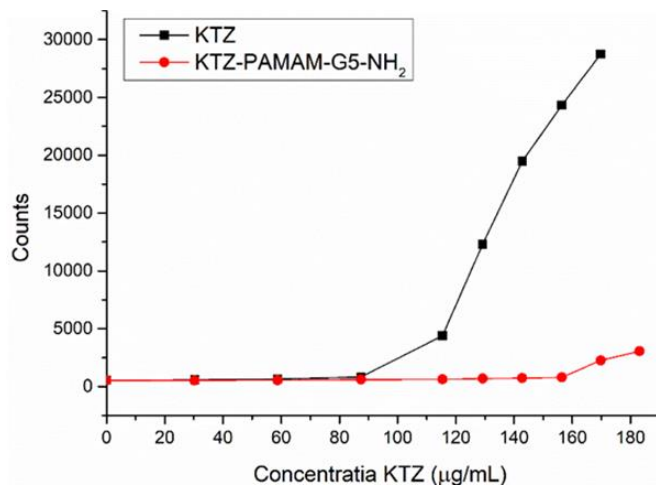
În Activitatea A1.2. au fost identificate formele de complex supramolecular dintre KTZ cu dendrimerii PAMAM prin analiza de difracție de raze X pe pulberi, XRPD. A fost astfel obținut complexul supramolecular KTZ-PAMAM-G5-NH<sub>2</sub>, caracterizat fizico-chimic prin analize specifice formelor solide: comportament termic prin DSC, spectroscopic prin FTIR și RMN pe lichide și puritatea prin HPLC. Rezultatul acestor analize a confirmat obținerea complexului supramolecular KTZ-PAMAM-G5-NH<sub>2</sub>.

### Activitatea 1.3

#### Solubilitatea și viteza de dizolvare a complexului KTZ-PAMAM

### **Rezultat: R.1.3. Raport științific privind solubilitatea și viteza de dizolvare a complexului KTZ-PAMAM**

Solubilitatea complexului a fost determinată prin metoda optică nefelometria, în soluție buffer pH 8.44, soluții stock ale compușilor KTZ, PAMAM-G5-NH<sub>2</sub> și a complexului fiind preparate în DMSO (0.6%).



**Figura 1.** Counts vs. concentrația de KTZ

În cazul KTZ comercial începutul procesului de apariție a particulelor (precipitarea) în soluția de buffer pH 8.44 este detectat la valoarea de 87.4 μg/mL și prezintă o creștere rapidă.

În cazul complexului KTZ-PAMAM-G5-NH<sub>2</sub> acest proces este detectat la o valoare de 156.5 μg/mL, dar procesul de precipitare este foarte lent. Astfel, moleculele de KTZ încapsulate în cavitatea dendrimerului și care interacționează cu acesta prin legături slabe non-colvalente sunt eliberate lent și începe formarea de particule solide care se vor acumula și în cele din urmă precipită.

### **Activitate 1.4**

#### **Studii de stabilitate a complexului KTZ-PAMAM (partea 1)**

##### ***Rezultat: R.1.4. Raport științific de evaluare a stabilității complexului KTZ-PAMAM (partea 1)***

Stabilitatea în timp reprezintă o caracteristică de importanță majoră a substanțelor farmaceutic active. Se cunoaște că influența temperaturii, umidității sau luminii sunt esențiale asupra stabilității unui medicament. Scopul testării de stabilitate este de a oferi dovezi cu privire la modul în care calitatea unei substanțe farmaceutic active sau a unui formulări/medicament variază în timp sub influența factorilor de mediu enumerați mai sus și de a stabili o perioadă de re-testare pentru medicament precum și condițiile de depozitare recomandate. Stabilitatea formulării KTZ cu dendrimerul PAMAM-G5-NH<sub>2</sub> se evaluează astfel:

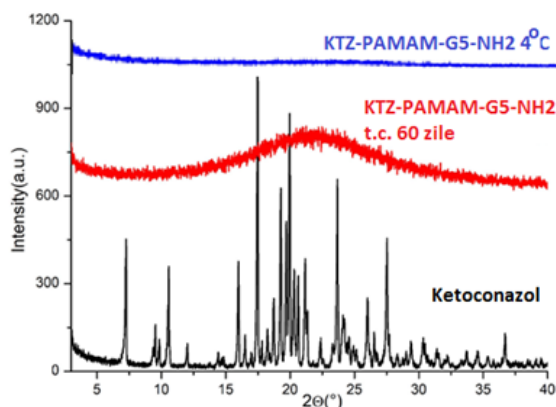
*Test A.* Stabilitate în stare solidă prin expunere la condiții ambiente (temperatură și umiditate) și la temperatură scăzută (4°C)

*Test B.* Stabilitate în stare lichidă în condiții ambiente prin UV-VIS

*Test C.* Stabilitate accelerată în stare solidă prin expunere în incinta camerei climatice în condiții controlate de temperatură și umiditate elevate (40 °C/RH=75%).

În stadiul actual al acestei etape a fost efectuat testul de stabilitate A, urmând ca testele B și C să fie realizate ulterior conform Proiectului (Activitatea 2.2, partea 2).

**A. Stabilitate în stare solidă prin expunere la condiții ambiante (temperatură și umiditate) și condiții de temperatură scăzută (4°C)**



**Figura 2.** Difractograme XRPD ale complexului după stocare la t.c. / t. 4°C

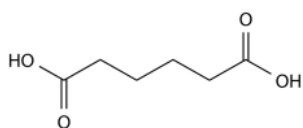
Evaluarea stabilității complexului fost determinată pe baza analizei XRPD. Măsurătorile au arătat că difractogramele sunt similare (Figura 2), ceea ce indică ca această nouă formulare a KTZ cu dendrimerul PAMAM-G5-NH<sub>2</sub> este stabilă în condițiile de stocare aplicate.

**Activitate 1.5**

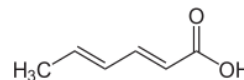
**Reproducerea și identificarea a KTZ-AA și KTZ-SA (partea 1)**

**Rezultat: R.1.5. Raport științific privind protocolul experimental de reproducere a cocristalelor KTZ-AA și KTZ-SA (partea 1)**

Formele solide de tip co-cristal de Ketoconazol cu Acidul Adipic (**KTZ-AA**) și Acidul Sorbic (**KTZ-SA**) obținute anterior prezentului proiectului se vor testa pentru studii de preformulare, activitate antifungică și studii de biocompatibilitate, în vederea administrării lor orale.



**Acid Adipic (AA)**



**Acid Sorbic (SA)**

Primul pas al acestei activități a constat în reproducerea formelor cristaline de co-cristal prin metoda solvent drop grinding (SDG) (mojarare cu adădire de solvent) la moara cu bile, în metanol și în raport stoechiometric KTZ-AA/AS=1 :1. Identificarea co-cristalelor a fost realizată prin XRPD iar puritatea, prin HPLC.

**Activitate 1.6**

**Diseminarea rezultatelor cercetării (partea 1)**

**R.1.6. Raport de activitate privind diseminarea rezultatelor științifice (partea 1)**

Rezultatele obținute în Etapa 1 sunt reflectate de următorii indicatori de rezultat:

1. Conferința Internațională “12th International Advances in Applied Physics & Materials Science Congress & Exhibition (APMAS)” 13-19 Oct, 2022 Turcia / poster “PAMAM

- dendrimer-encapsulated Ketoconazole for bioavailability enhancement*”, I. Grosu, M. Miclăuș, I. Kacso, A. Pîrnău, O. Opreș, F. Martin, INCDTIM Cluj, România
2. Worksop-ul “*Medicinal chemistry in drug discovery, new therapeutical approaches*” din cadrul proiectului EU-OPENSREEN DRIVE, 19 Oct 2022, Institutul de Chimie "Coriolan Dragulescu", Timișoara, România / *prezentarea orală “Ketoconazole: from fundamentals to new antifungal formulations based on PAMAM dendrimers with improved biodisponibility”*, F. Martin,<sup>1</sup> I. Kacso,<sup>1</sup> I. Grosu,<sup>1</sup> M. Miclaus,<sup>1</sup> X. Filip,<sup>1</sup> O. Opris,<sup>1</sup> I. Bâldea,<sup>2</sup> S. Dănescu,<sup>2</sup> D. Vodnar,<sup>3</sup> M. Pop<sup>4</sup>, <sup>1</sup>INCNTIM-Cluj, România, <sup>2</sup>UMF Cluj, România, <sup>3</sup>USAMV Cluj, România, <sup>4</sup>TeraCrystal, Cluj, România
  3. Elaborare de site pentru proiect: <https://www.itim-cj.ro/PNCIDI/ket-in-pamam/>

Director Proiect,  
Dr. Ing. Martin Flavia-Adina

