



## **Rezumatul Etapei**

Formele de co-cristal reproduse KTZ-AA și KTZ-SA au fost evaluate din punct de vedere al comportamentului termic (A.2.1) iar stabilitatea complexului supramolecular KTZ-PAMAM-G5-NH<sub>2</sub> a fost investigată în soluție și în stare solidă în condiții accelerate, indicând instabilitatea acestuia în cazul din urmă (A.2.2). Eliberarea *in vitro* a KTZ încapsulat în dendrimer a fost testată prin metoda dializei, fiind un proces lent, continuu fără precipitare în soluția apoasă după 5 ore vs. eliberarea KTZ pur manifestată prin precipitare după 180 minute (A.2.3). Studiul de biocompatibilitate a formulărilor de KTZ pe culturi de fibroblaști dermici umani indică lipsa toxicității pe culturile respective, compușii fiind bine tolerați de celule cutanate umane, făcând posibilă utilizarea lor în condiții de siguranță, în tratamentul topic al micozelor cutanate și mucoase (A.2.4). Activitatea antifungică *in vitro* a formelor solide KTZ-AA, KTZ-SA și a complexului supramolecular KTZ-PAMAM-G5-NH<sub>2</sub> pe cinci tulpini de microorganisme s-a manifestat doar asupra tulpinilor de tip Candida (A.2.5). Studiul de toxicitate acută *in vivo* a KTZ-SA pe model animal a arătat lipsa toxicității hepatice și generale atât biochimice, cât și histologice, comparativ cu KTZ, indicând astfel o biocompatibilitate îmbunătățită. În cazul administrării KTZ-AA, testul a evidențiat o minimă toxicitate biochimică hepatică (A.2.6). Pentru formele solide de co-cristal au fost realizate studii de compatibilitate cu excipienți farmaceutici uzuali (A.2.7) și a fost evaluată zona de cristalizare metastabilă deosebit de importantă pentru scalarea procesului de cristalizare (A.2.8). În cazul co-cristalului KTZ-AA s-a efectuat un prim set de experimente de scalare a procesului de cocrystalizare, de ordinul sutelor de grame (A.2.9). În Etapa a 2-a a proiectului au fost realizate toate activitățile prevăzute în propunere, gradul de îndeplinire fiind de 100%.

### **Activitate 2.1**

#### **Reproducerea și identificarea a KTZ-AA și KTZ-SA (partea 2)**

**Rezultat: R.2.1. Raport științific privind protocolul experimental de reproducere a co-cristalelor KTZ-AA și KTZ-SA (partea 2)**

**Analiza termică Calorimetrie cu Scanare Diferențială (DSC).** Formele cristaline de co-cristal KTZ-AA și KTZ-SA obținute prin metoda *solvent drop grinding* și confirmate prin analiza de difracție de raze X pe pulberi (DRXP) (Etapa 1, Activitate 1.5) au fost în continuare analizate din punct de vedere al comportamentului termic prin tehnica DSC. Rezultatele arată că aceste forme sunt anhidre cu un comportament termic diferit față de compusul comercial KTZ, confirmând reproducerea co-cristalelor.

### **Activitate 2.2**

#### **Studii de stabilitate a complexului KTZ-PAMAM (partea 2)**

**Rezultat: R.2.2. Raport științific de evaluare a stabilității complexului KTZ-PAMAM (partea 2)**

##### ***B. Stabilitate în stare lichidă în condiții ambient prin UV-VIS***

Probele de complex supramolecular au fost preparate în amestecul de solvenți metanol:apă și evaluate UV-Vis înainte și după o lună de stocare în condiții ambiente. De asemenea, a fost testată și o soluție de KTZ în aceleași condiții, drept control. În plus, stabilitatea soluțiilor a fost urmărită și vizual, pentru posibila apariție a precipitatului, turbidității, cristalizării și schimbarea culorii. Rezultatul analizei UV-Vis a confirmat stabilitatea soluțiilor de complex supramolecular în condițiile de stocare aplicate.

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

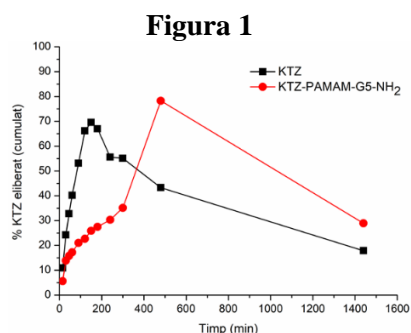
Măsurătoarea DRXP a indicat *transformarea* complexului KTZ-PAMAM-G5-NH<sub>2</sub> în forma de start KTZ după o săptămână de stocare în condiții accelerate de temperatură și umiditate ridicate, 40 °C/RH=75%. Astfel, formularea KTZ cu dendrimerul PAMAM-G5-NH<sub>2</sub> este instabilă în condițiile de stocare aplicate.

### **Activitatea 2.3**

#### **Studii de eliberare *in vitro* a KTZ încorporat în KTZ-PAMAM**

**Rezultat: R.3. Raport științific privind eliberarea *in vitro* a KTZ încorporat în KTZ-PAMAM**

Experimentul de dializă a KTZ pur a arătat că s-a eliberat în 150 minute în faza apoasă externă, ~70% (Figura 1). După acest interval, la 180 minute, s-a obținut o valoare mai mică, de 67%. Astfel se constată începutul procesului de precipitare a KTZ pur și saturarea în soluția apoasă externă.



Eliberarea substanței active KTZ din complexul supramolecular a fost un proces lent și continuu vs. KTZ pur. După un interval de 90 minute s-a determinat o eliberare de doar ~20%, iar după 5 ore de ~36%. Ca urmare, se constată că procesul de precipitare al KTZ eliberat din complexul KTZ-PAMAM-G5-NH<sub>2</sub> în soluția externă nu s-a manifestat în acest interval de timp. Profilul de eliberare al KTZ încapsulat demonstrează o eliberare controlată și stabilitatea complexului supramolecular KTZ-PAMAM-G5-NH<sub>2</sub> în soluție apoasă pe intervalul de timp investigat.

## **Activitate 2.4**

### **Studii de citotoxicitate in vitro a KTZ-PAMAM, KTZ-AA, KTZ-SA pe culturi de celule de fibroblast dermic uman**

**Rezultat: R.2.4. Raport științific privind citotoxicitatea in vitro a KTZ-PAMAM, KTZ-AA și KTZ-SA pe culturi de celule de fibroblast dermic uman**

Formele solide KTZ-AA și KTZ-SA au fost testate pe culturi de fibroblaști dermici umani (BJ, ATCC CRL-2522™, Gaitnesburg, USA) iar complexul supramolecular KTZ-PAMAM-G5-NH<sub>2</sub> pe culturi de fibroblaști dermici, respectiv celule hepatice umane (HepG2-HB-8065, ATCC). Comparativ s-au testat compușii puri: substanța activă KTZ, coformerii AA și SA și dendrimerul. Mediul de cultură a fost DMEM, high glucose, suplimentat cu 5% ser fetal bovin, gentamicină, amfotericină (Biochrom AG, Germania), cultivarea celulelor s-a făcut în condiții standard, iar mediul a fost schimbat de 2 x/săptămână. Metoda folosită pentru determinarea citotoxicității a fost colorimetrică, prin măsurarea compusului colorat formazan, generat de celulele viabile utilizând CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, Madison, USA). Celulele cultivate la o densitate de 10<sup>4</sup>/godeu pe plăci microtitratoare ELISA de 96 godeuri (TPP, Switzerland) au fost acomodată pentru 24h, apoi expuse la diferite concentrații (0-25μM) din fiecare substanță testată pentru 24h. Viabilitatea a fost măsurată colorimetric cu un cititor de plăci ELISA la 540nm (Tecan, Mannendorf, Austria). Toate experimentele au fost făcute în triplicat. Culturi de celule netratate au fost utilizate ca și martor. Rezultatele sunt exprimate ca și OD 540nm.

Compușii testați au realizat o scădere a viabilității celulare dependentă de concentrație dar la concentrația prezentă în plasmă în condiții clinice de tratament antimicotic cu KTZ, de 6.5μM, viabilitatea celulară a fost peste 70%, considerată limita de toxicitate, fără să existe diferențe între substanțele testate, KTZ-AA, KTZ-SA și KTZ în ceea ce privește scăderea viabilității celulare. Co-formerii AA și SA nu au determinat scăderi importante ale viabilității celulare la niciuna dintre concentrațiile utilizate.

Complexul supramolecular KTZ-PAMAM-G5-NH<sub>2</sub> a arătat o scădere marcată a viabilității celulare la concentrații de 100μg/ml în culturile de fibroblaști umani și la concentrații peste 100μg/ml în culturile de celule hepatice, fără diferențe semnificative vs. KTZ.

Lipsa toxicității pe culturile de fibroblaști dermici umani, pentru compușii testați KTZ-AA, KTZ-SA și KTZ-PAMAM-G5-NH<sub>2</sub>, arată că aceste substanțe sunt bine tolerate de celule cutanate umane, ceea ce face posibilă utilizarea lor în condiții de siguranță, pentru tratamentul topic al micozelor cutanate și mucoase.

## **Activitate 2.5**

### **Studiul activității antifungice in vitro pentru KTZ-AA, KTZ-SA, KTZ-PAMAM**

**Rezultat: R.1.5. Raport științific privind activitatea antifungică in vitro pentru KTZ-AA, KTZ-SA și KTZ-PAMAM**

Formele solide KTZ-AA, KTZ-SA și complexul supramolecular KTZ-PAMAM-G5-NH<sub>2</sub> au fost testate pe tulpinile de microorganisme: *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Aspergillus niger* ATCC 6275, *Actinomyces elegans* ATCC 22963, *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959, *Candida albicans* DSMZ 1386.

*Prepararea tulpinilor bacteriene.* Câteva colonii din fiecare microorganism cultivat pe mediile menționate mai sus au fost transferate în 9 ml soluție salină sterilă (8.5 g/L NaCl) și ajustate pentru a corespunde turbidității standardului McFarland 0.5 (10<sup>8</sup> UFC/mL). Apoi, s-a preparat o suspensie bacteriană de 10<sup>6</sup> UFC/spori/mL, adăugată în fiecare godeu de pe placă.

*Concentrația minimă inhibitorie* a fost determinată cu ajutorul testului antibacterian pe bază de plăci cu godeuri în prezența unei soluții de rezazurină.

Activitatea antifungică *in vitro* a formelor solide KTZ-AA, KTZ-SA și a complexului supramolecular KTZ-PAMAM-G5-NH<sub>2</sub> s-a manifestat doar asupra tulpinilor de tip *Candida*

## **Activitate 2.6**

### **Toxicitatea acută *in vivo* pentru KTZ-AA, KTZ-SA, KTZ-PAMAM**

#### ***Rezultat: R.1.5. Raport științific privind toxicitatea acută *in vivo* pentru KTZ-AA, KTZ-SA, KTZ-PAMAM***

Pentru studiul experimental *in vivo* a fost obținută autorizația de la Comisia de Etică a UMF, Cluj-Napoca și de proiect 329/17 08 2022 (ANSVSA).

Datorită instabilității complexului supramolecular KTZ-PAMAM-G5-NH<sub>2</sub> după testul de stocare în camera climatică la temperatura de 40 °C și umiditate RH=75%, considerăm că această formulare a KTZ cu dendrimerul este potrivită doar pentru uz antimicotic local, cutanat sau pe mucoase.

În prezentul studiu s-au folosit 57 animale Wistar, femele, cu greutate medie de 200 g, care au fost împărțite în 3 loturi: *control* - 3 animale -s-au administrat 100 μL apă distilată cu 0.5% PVP K30; *KTZ-SA* - 27 animale; *KTZ-AA* - 27 animale. Animalele au fost tratate cu 3 doze diferite din fiecare substanță: 0.8mg/kg corp, 1.5 mg/kg corp respectiv 3 mg/kg corp, cu administrare orală prin gavaj în apă distilată cu 0.5% PVP K30, 100 μL/animal, în doză unică. Pentru fiecare doză/interval de timp s-au utilizat 3 animale. La intervale de 1h, 24h și 7 zile după administrarea tratamentului, 3 animale din fiecare lot și de la fiecare concentrație au fost eutanasiate, cântărite și s-au recoltat probe de sânge pentru determinări biochimice (probe hepatice-ASAT/ALAT) și hemoleucograma. Determinările s-au făcut utilizând kiturile de biochimie de la Diagnosticum Rt (Ungaria) cu ajutorul analizatorului Sysmex XE 2100. La 7 zile după administrarea celor doi compusi, KTZ-AA și KTZ-SA, s-au recoltat în plus fragmente de ficat pentru urmărirea modificărilor histopatologice și pentru cuantificarea scorului Knodell de necroză hepatică.

***Interpretare statistică.*** Datele au fost interpretate statistic utilizând programul Graph Prism Software, versiunea 5.00.288 (GraphPad Software Inc. USA San Diego, California, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Semnificația statistică a diferenței între grupul tratat și grupul martor a fost evaluată prin teste: student TTEST, testul nonparametric Kruskal Wallis urmat de Dunn post test respectiv Wilcoxon Signed rank test. Valoarea p <0.05 a fost considerată semnificativă.

***Starea generală și supraviețuire.*** Toate animalele au manifestat o stare generală bună, imediat după administrarea substanțelor, cu un comportament normal, tegumente și mucoase normale colorate, ritm cardiac și respirator normal. Supraviețuirea a fost de 100% pentru ambele substanțe administrate, la toate dozele.

Datele obținute în urma testării KTZ-SA pe model animal arată lipsa toxicității hepatice și generale atât biochimice, cât și histologice. Comparativ cu KTZ, datele arată o biocompatibilitate îmbunătățită. Aceste rezultate sunt promițătoare pentru o posibilă utilizare a compusului în ameliorarea tratamentului antimicotic pe cale orală, la pacienți.

În cazul tratamentului cu KTZ-AA s-a observat o ușoară creștere a ASAT la 24h (doza de 1.5 și 3 mg/kg corp) și 72h (toate 3 dozele). În cazul ALAT nu s-au înregistrat modificări, comparativ cu lotul martor. Raportul ASAT/ALAT arată modificări similare ASAT. Datele confirmă o creștere ușoară a transaminazelor începând cu 24h pentru doza de 3 mg/kg corp, dar persistentă la 7 zile de la administrarea unei doze unice de KTZ-AA. Chiar dacă ALAT nu a fost modificată, creșterea ASAT confirmă o toxicitate biochimică ușoară hepatică, dar nu și pe alte organe, care pot constitui o sursă de ALAT seric.

## **Activitate 2.7**

### **Studii de compatibilitate cu excipienți pentru KTZ-AA, KTZ-SA**

**Rezultat: R.2.7. Raport științific privind compatibilitatea cu excipienți pentru KTZ-AA, KTZ-SA**

Studiul efectuat pe co-cristalul KTZ-AA a demonstrat *compatibilitatea* în amestecurile fizice binare cu excipienții celuloza, polivinil-pirolidona K90, lactoza, stearatul de magneziu, dioxidul de siliciu, amidonul de porumb și talc prin analizele DRXP, DSC și FT-IR. De asemenea, amestecurile fizice binare sunt stabile după 3 luni de stocare la temperatură și umiditate ridicate (40°C/75%RH) în cameră climatică, dovedind astfel potențialul său pentru dezvoltarea ca alternativă la medicamentul comercial.

În cazul co-cristalului KTZ-SA, testul de compatibilitate a fost investigat cu seria de excipienți hidroxipropil metilceluloza, eudragit-L100, polietilen glicol 6000 și polivinil-pirolidona K30, dovedindu-se compatibilitatea prin DRXP și DSC. Însă testul de stabilitate accelerată a indicat transformarea probelor în substanța activă KTZ după expunerea amestecurilor fizice binare în cameră climatică 30 zile.

## **Activitate 2.8**

### **Solubilitatea, determinarea curbei de super-solubilitate și identificarea lărgimii zonei meta-stabile pentru KTZ-AA, KTZ-SA**

**Rezultat: R.2.8. Raport științific privind determinarea curbei de super-solubilitate și identificarea lărgimii zonei metastabile pentru KTZ-AA, KTZ-SA**

Pentru fiecare formă solidă KTZ-SA și KTZ-AA au fost realizate 9 experimente de cristalizare la scală mică. În cazul fiecărui set de experimente a fost verificată obținerea formei prin DRXP, iar pentru experimentele în care a fost confirmată proba s-a construit graficul lărgimii zonei metastabile.

În urma analizei rezultatelor experimentale, în cazul co-cristalului KTZ-SA s-a putut determina o singură zonă metastabilă în etanol:apa (8:2). În cazul formei solide KTZ-AA s-a obținut zona metastabilă cea mai îngustă în experimentul cu etanol:apa (4:6). Randamentul de obținere a formei solide urmărite este mai mare de 80%. Aceste date sunt esențiale la dezvoltarea procesului de reproducere la scală mare.

## **Activitate 2.9**

### **Scale-up-ul procesului de cocristalizare pentru KTZ-AA, KTZ-SA (partea 1)**

**Rezultat: R.1.5. Raport științific privind scale-up-ul procesului de cocristalizare pentru KTZ-AA, KTZ-SA (partea 1)**

**Experimente de scalare pentru co-cristalul KTZ-AA.** S-a efectuat primul set de experimente de scalare, constând în reproducerea experimentelor în urma cărora s-a obținut zona metastabilă cea mai îngustă. Experimentul de scalare **de ordinul sutelor de grame** s-a realizat în echipamentul de cristalizare la scală mare (marcă Eyela), rezultatele obținute sunt sintetizate în **Tabelul** de mai jos.

Experiment	KTZ (mg)	AA (mg)	Solvent / (ml)	Conc. (mg/ml)	Tdizolvare (°C)	Tcristalizare (°C)	Obs.	η (%)
KTZ-AA – 1	200	55	etanol:apa	40	58	15	pp. alb	89
KTZ-AA – 2	300	82.5	(4:6) / 5	60	63	12	pp. brun	-

Experimentele de scalare la cantitate de 1 gram pentru co-cristalul KTZ-AA, respectiv experimentele de scalare corespunzătoare formei solide de co-cristal KTZ-SA vor fi efectuate conform planului Proiectului, Etapa 3, activitatea A.3.1, 2024.

## **Activitate 2.10**

### **Diseminarea rezultatelor cercetării (partea 2)**

**R.2.10. Raport de activitate privind diseminarea rezultatelor științifice (partea 2)**

1.Cerere de Brevet național de invenție, OSIM A/00385, 2.07.2023: “**Complex supramolecular Ketoconazol-PAMAM-G5-NH<sub>2</sub> pentru administrare topică**”, F. A. Martin<sup>1</sup>, I. Bâldea<sup>1,2</sup>, M. O. Miclăuș<sup>1</sup>, I. G. Grosu<sup>1</sup>, I. E. Kacso<sup>1</sup>, A. C. Moț<sup>1,2</sup> / <sup>1</sup>INC DTIM Cluj, Romania, <sup>2</sup>UBB Chimie și Inginerie Chimică Cluj, Romania

2. Conferința “14th International Processes in Isotopes and Molecules, PIM” 19-22 Sept 2023, Cluj, Romania - **poster “Ketoconazole-PAMAM dendrimer carrier system for topical use”**, F. Martin<sup>1</sup>, I. Kacso<sup>1</sup>, I. Bâldea<sup>1,2</sup>, M. Miclăuș<sup>1</sup>, I. Grosu<sup>1</sup>, S. Dănescu<sup>1,2</sup> / <sup>1</sup>INCDTIM Cluj, <sup>2</sup>UMF Cluj, Romania
3. Conferința “13th International Advances in Applied Physics & Materials Science Congress & Exhibition, APMAS” 11-17 Oct, 2023 Turcia / **poster “Solid-state interactions between Ketoconazole-Adipic acid co-crystal and excipients in formulation development”**, F. Martin<sup>1</sup>, I. Kacso<sup>1</sup>, M. Miclăuș<sup>1</sup>, I. Grosu<sup>1</sup>, M. Dan<sup>1</sup>, D. Ungur<sup>2</sup>, <sup>1</sup>INCDTIM Cluj, <sup>2</sup>SC TeraCrystal SRL Cluj, Romania
4. Articol ISI submitted: Studia Chemia, 2023: **Ketoconazole-PAMAM dendrimer supramolecular complex for prolonged delivery by in vitro and in vivo studies**, I. Kacso<sup>a</sup>, I. Bâldea<sup>b</sup>, M. Miclăuș<sup>a</sup>, A. Moț<sup>a,c</sup>, R. Moldovan<sup>b</sup>, F. Martin<sup>a</sup>, <sup>a</sup>INCDTIM Romania, <sup>b</sup>UMF Cluj, România, <sup>c</sup>UBB Chimie Cluj, Romania
5. Articol ISI submitted: Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 2023: **Ketoconazole-Adipic Acid cocrystal and pharmaceutical excipients: study of stability and drug-excipient compatibility**, F. Martin<sup>1</sup>, M. Miclăuș<sup>1</sup>, I. Grosu<sup>1</sup>, M. Dan<sup>1</sup>, X. Filip<sup>1</sup>, I. Kacso<sup>1</sup> <sup>1</sup>INCDTIM, Romania
6. Actualizare site proiect: <https://www.itim-cj.ro/PNCDI/ket-in-pamam/>

Director Proiect,  
Dr. Ing. Martin Flavia Adina

