

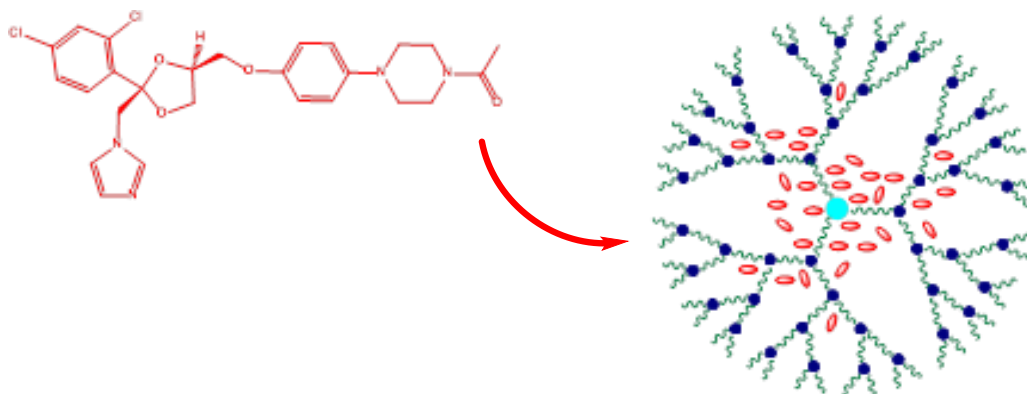
**KETOCONAZOL: DE LA FUNDAMENTE LA FORMULĂRI
ANTIFUNGICE NOI PE BAZĂ DE DENDRIMERI PAMAM
CU BIODISPONIBILITATE ÎMBUNĂTĂȚITĂ
(KET-IN-PAMAM)**

Nr. Contract TE122/2022

RAPORT ȘTIINȚIFIC
ETAPA NR. 3

SENSIBILITATEA EPICUTANATA *IN VIVO* A COMPLEXULUI KTZ-PAMAM

perioada de raportare: 1/01/2024 - 14/05/2024



KTZ-PAMAM-G5-NH₂
complex supramolecular

Rezumatul Etapei 3

Pentru formulările de tip co-cristal KTZ-AA și KTZ-SA au fost stabilite condițiile experimentale în vederea dezvoltării protoalelor de scale-up ale proceselor de cocristalizare de ordinul gramelor (A.3.1). Complexul supramolecular **KTZ-PAMAM-G5-NH₂** a fost evaluat pentru administrarea topică prin testul epicutanat de sensibilizare auriculară pe model animal (MEST-mouse ear sensitization test) (A.3.2). În Etapa a 3-a a proiectului au fost realizate toate activitățile prevăzute în propunere, gradul de îndeplinire fiind de 100%.

Activitate 3.1

Scale-up-ul procesului de cocristalizare pentru KTZ-AA, KTZ-SA (partea 2)

Rezultat: R.1.5. Raport științific privind scale-up-ul procesului de cocristalizare pentru KTZ-AA, KTZ-SA (partea 2)

Scalarea este o etapă esențială în ciclul de viață al unui medicament de succes. Realizarea acesteia presupune un proces meticulos care să asigure identitatea produsului obținut cu cel conceput inițial. În fiecare etapă de dezvoltare a unui medicament, începând cu studiile de laborator, trecând prin cele clinice și până la comercializare, mărimea lotului produs crește, de la loturi la scală de laborator, la loturile pilot care sunt utilizate în dezvoltarea procesului de obținere a medicamentului și, în final, la loturile la scală de producție pentru comercializare.

Protocol experimental de scale-up a procesului de cocristalizare pentru KTZ-AA de ordinul gramelor

A. Metoda experimentală de scale-up prin răcire

Experimentul de scale-up al procesului de cocristalizare prin răcire între KTZ și Acid Adipic s-a realizat utilizând echipamentul de cristalizare în paralel la scală mare de tip Eyela (Sintetizator Organic PPS-5511).

Procedura experimentală constă în următoarele etape:

1. Se cântăresc substanțele: 1000 mg KTZ și 275 mg Acid Adipic (raport stoichiometric KTZ:Acid Adipic = 1:1) și se plasează într-un reactor de sticlă de 20 ml al echipamentului Eyela.
2. Se adaugă 14 ml solvent de etanol:apa (4:6/v:v) la temperatura camerei și se amestecă magnetic timp de 30 minute. Se obține o suspensie de culoare albă la temperatura camerei.
3. Suspensia astfel obținută se încălzește până la 68°C sub agitare magnetică, cu o viteză de creștere a temperaturii de 2°C/min, cu dizolvarea suspensiei.
4. Se răcește soluția până la 5°C coborând temperatura cu viteza de 3°C/min. La temperatura de 12°C se produce nucleerea și se observă depunerea precipitatului. Se menține proba la temperatura de 5°C timp de 24 ore, apoi se decantează.
5. Solventul rezidual se elimină prin evaporare la temperatura camerei, până la uscarea completă a solidului, rezultând o pulbere de culoare albă.

B. Metoda experimentală de scale-up prin amestecare mecanică cu solvent

Experimentul de scale-up al procesului de cocristalizare prin amestecare mecanică cu solvent (solvent drop grinding – SDG) s-a realizat prin mojarare mecanică cu aparatul Mixer Mill MM 400 – Retsch (moara cu bile), prevazut cu containere din inox (1.5/5 ml) și bile de inox.

Procedura experimentală constă în următoarele etape:

1. Se cântăresc substanțele: 1000 mg KTZ și 275 mg Acid Adipic (raport stoichiometric KTZ:Acid Adipic = 1:1) și se plasează în container de inox de 5 mL.
2. Se adaugă o bilă metalică în container.
3. Peste probă se adaugă în container o cantitate 55 μ L de metanol.
4. Se setează parametri experimentali: frecvența de 30 Hz și timpul de lucru de 90 minute.
5. La sfârșitul experimentului proba obținută sub formă de pastă de culoare albă se plasează pe o hartie de filtru și se usucă în aer, la temperatura camerei timp de 24 ore, rezultând o pulbere de culoare albă.

Obținerea produsului KTZ-AA a fost verificată și confirmată prin analiza de difracție de raze X pe pulberi. În **Figura 1** sunt ilustrate difractogramele DRXP ale probelor: KTZ, AA, KTZ-AA, KTZ-AA-Mill 1 gr (experimentul de scale-up la moara cu bile), KTZ-AA-Eyela 1 gr (experimentul de scale-up la Eyela).

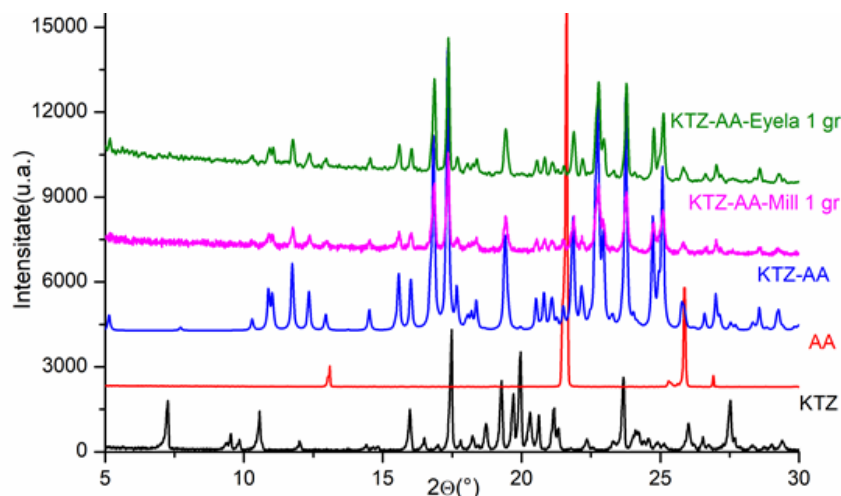


Figura 1. Difractogramele DRXP ale KTZ-AA a experimentelor de scale-up (ordinul gramelor)

Experimentul de scalare a procesului de cocristalizare pentru KTZ-SA de ordinul sutelor de miligrame

Prima etapă a experimentelor de scalare a constat în reproducerea experimentelor în urma cărora s-a obținut zona metastabilă cea mai îngustă (conform Etapa 2, A.2.8) și anume în etanol:apa (8:2/v:v). Experimentul de scalare *de ordinul sutelor de miligrame* s-a realizat în echipamentul de cristalizare la scală mare (marcă Eyela) respectând condițiile referitoare la concentrație, viteză de încălzire-răcire. Rezultatele obținute sunt sintetizate în **Tabelul 1**.

Tabel 1. Parametrii experimentelor de obținere a KTZ-SA în echipamentul de cristalizare la scală mare Eyela (*ordin sute de miligrame*)

| Experiment | KTZ (mg) | SA (mg) | Solvent / (ml) | Conc. (mg/ml) | Tdizolvare (°C) | Tcristalizare (°C) | Obs. | η (%) |
|------------|----------|---------|----------------|---------------|-----------------|--------------------|---------|------------|
| KTZ-SA – 1 | 200 | 42.2 | etanol:apa | 40 | 55 | 14 | pp. alb | 85 |
| KTZ-SA – 2 | 300 | 63.3 | (8:2/v:v) 5 | 60 | 60 | 12 | pp. alb | 78 |

Prin încălzire cu viteză de 2°C/min până la temperatura de 65°C sub agitare magnetică s-a observat dizolvarea solidelor iar la răcire lentă (3°C/min) s-a produs nucleerea și s-a observat depunerea precipitatului (pp). După etapa de răcire lentă, soluția s-a decantat iar precipitatul alb depus a fost uscat la temperatura camerei și analizat prin DRXP pentru confirmarea obținerii formei dorite (**Figura 2**). S-a constatat formarea co-cristalului în cazul ambelor experimente, KTZ-SA-1 cu randament de 85%, respectiv KTZ-SA-2 cu randament de 78%.

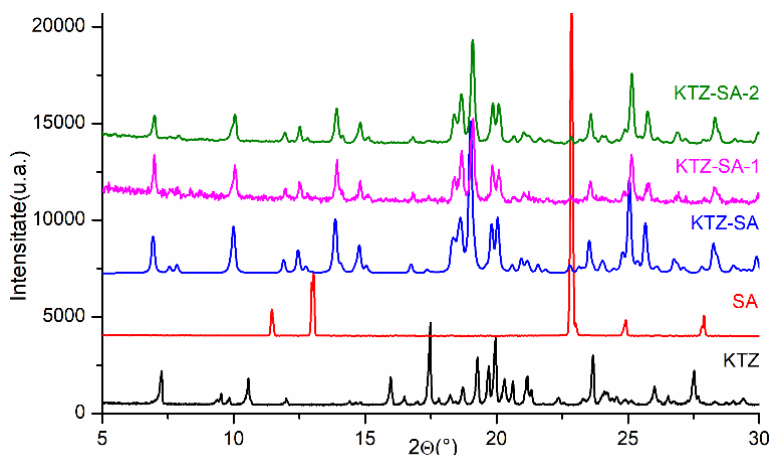


Figura 2. Difractogramele DRXP ale KTZ-SA a experimentelor realizate în echipamentul de cristalizare la scală mare Eyela (ordinul sute de miligrame)

Protocol experimental de scale-up a procesului de cocristalizare pentru KTZ-SA de ordinul gramelor

A. Metoda experimentală de scale-up prin răcire

Experimentul de scale-up al procesului de cocristalizare prin răcire între KTZ și Acid Sorbic s-a realizat utilizând echipamentul de cristalizare în paralel la scală mare de tip Eyela (Sintetizator Organic PPS-5511).

Procedura experimentală constă în următoarele etape:

1. Se cântăresc substanțele: 1000 mg KTZ și 211 mg Acid Sorbic (raport stoichiometric KTZ:Acid Sorbic = 1:1) și se plasează într-un reactor de sticlă de 20 ml al echipamentului Eyela.
2. Se adaugă 14 ml solvent de etanol:apa (8:2/v:v) la temperatura camerei și se amestecă magnetic timp de 30 minute. Se obține o suspensie de culoare albă la temperatura camerei.
3. Suspensia astfel obținută se încălzește până la 65°C sub agitare magnetică, cu o viteză de creștere a temperaturii de 2°C/min, cu dizolvarea suspensiei.

4. Se răcește soluția până la 5°C coborând temperatura cu viteza de 3°C/min. La temperatura de 10°C se produce nucleerea și se observă depunerea precipitatului. Se menține proba la temperatura de 5°C timp de 24 ore, apoi se decantează.

5. Solventul rezidual se elimină prin evaporare la temperatura camerei, până la uscarea completă a solidului, rezultând o pulbere de culoare albă.

B. Metoda experimentală de scale-up prin amestecare mecanică cu solvent

Experimentul de scale-up al procesului de cocristalizare prin amestecare mecanică cu solvent (solvent drop grinding – SDG) s-a realizat prin mojarare mecanică cu aparatul Mixer Mill MM 400 – Retsch (moara cu bile), prevazut cu containere din inox (1.5/5 ml) și bile de inox.

Procedura experimentală constă în următoarele etape:

1. Se cântăresc substanțele: 1000 mg KTZ și 211 mg Acid Sorbic (raport stoechiometric KTZ: Acid Sorbic = 1:1) și se plasează în container de inox de 5 mL.
2. Se adaugă o bilă metalică în container.
3. Peste probă se adaugă în container o cantitate 50 μL de metanol.
4. Se setează parametri experimentali: frecvența de 30 Hz și timpul de lucru de 90 minute.
5. La sfârșitul experimentului proba obținută sub formă de pastă de culoare albă se plasează pe o hartie de filtru și se usucă în aer, la temperatura camerei timp de 24 ore, rezultând o pulbere de culoare albă.

Obținerea produsului KTZ-SA a fost verificată și confirmată prin analiza de difracție de raze X pe pulberi. În **Figura 3** sunt ilustrate difractogramele DRXP pentru probele KTZ, SA, KTZ-SA, și cele rezultate în urma experimentelor de scale-up pe cantitate de 1 gram, realizate cu echipamentul de cristalizare la scală mare Eyela, KTZ-SA-Eyela 1 gr și la moara cu bile, KTZ-SA-Mill 1 gr.

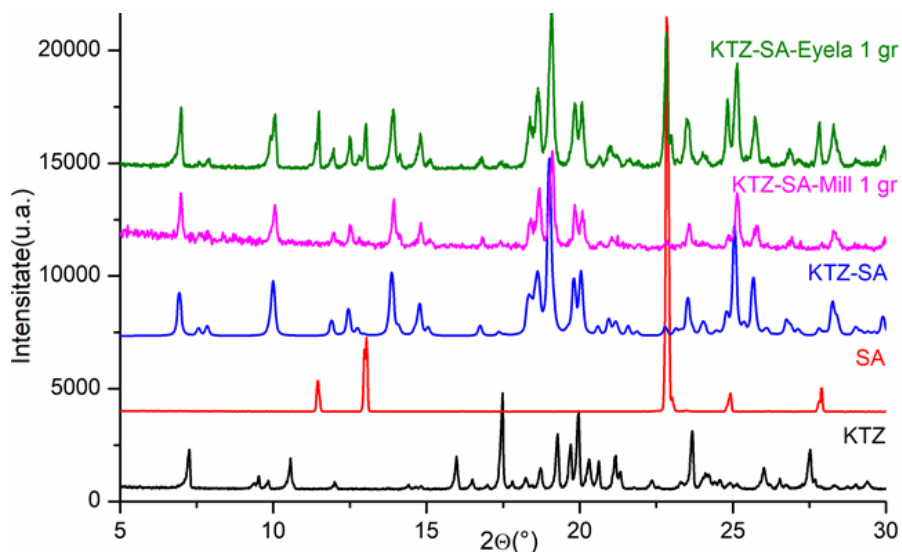


Figura 3. Difractogramele DRXP ale KTZ-SA a experimentelor de scale-up (ordinul gramelor)

Activitate 3.2 / Sensibilitatea epicutanata in vivo a KTZ-PAMAM

Testul epicutanat de sensibilizare auriculară *in vivo* (MEST- mouse ear sensitization test) a fost efectuat pe modelul de șoareci Balc C, femele, în vârsta de 3 luni, greutate medie 21g±3g. 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, de la Autoritatea Națională Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor, condiție necesară pentru desfășurarea cercetării pe model animal. În timpul experimentelor, animalele au fost ținute în condiții de umiditate 65%, 21°C, cicluri zi/noapte de 12 ore, hrănite cu hrană standard și apă *ad libitum*. Hrana animalelor a fost suplimentată cu vitamina A (250UI/g) pentru a mări sensibilitatea testului de sensibilizare epicutanată. Șoricelii au fost împărțiți în 5 loturi (n=5/lot): KTZ - 100 μg/mL, dizolvat în etanol 70%, dendrimer -100 μg/mL, dizolvat în etanol 70%, produs KTZ-PAMAM-G5-NH₂ - 100 μg/mL, dizolvat în etanol 70%, control – vehicul etanol 70%, control pozitiv - 200 μg/mL dinitroclorbenzen (DNCB) dizolvat în etanol 70%. În prima zi s-a injectat adjuvant Freund (Sigma Aldrich) în flancul drept, pentru a stimula răspunsul alergic la substanțele testate [1]. S-a efectuat sensibilizarea cutanată pe pielea rasă abdominală prin aplicarea topică zilnică a 100 μl soluție, timp de 6 zile, urmate apoi de aplicarea a 50 μl soluție pe urechea dreaptă în ziua 8 (challenge=C) și ziua 15 (rechallenge=R). Grosimea urechilor a fost măsurată cu șubler digital înainte de aplicarea soluției (ziua 8 - grosimea inițială) și ulterior după fiecare aplicare la 24h (C 24h, respectiv R 24h) și 48h (C 48h, respectiv R 48h). Calculul a fost făcut după formula: % grosimea urechii = 100*(A-B)/B, A = grosimea urechii după tratament, B = grosimea inițială a urechii [2]. Interpretarea statistică a datelor obținute s-a făcut utilizând programul GraphPad Prism version 4.00 for Windows, Software, San Diego, CA, USA, testul ANOVA și Student TTEST, p<0.05 a fost considerat semnificativ (**Figura 4**).

În lotul control pozitiv-DNCB se observă la nivelul pielii pavilionului auricular - edem, eritem, indurare și desen vascular accentuat ceea ce confirmă validitatea modelului de testare (**Figura 5**). La restul loturilor, nu se observă nicio modificare, comparativ cu lotul martor-vehicul. Aceste rezultate indică lipsa de apariție a sensibilității cutanate de tip alergic la substanțele testate, KTZ, dendrimer KTZ-PAMAM-G5-NH₂, la niciunul dintre timpii la care s-au făcut măsurătorile.

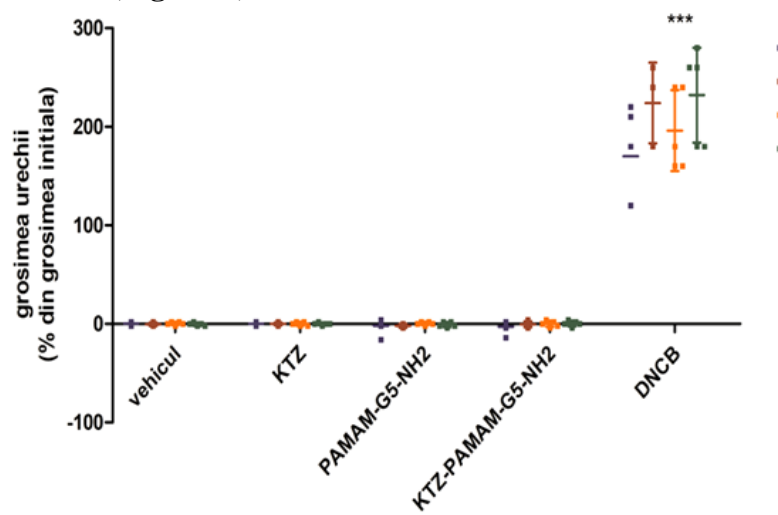


Figura 4. Testul epicutanat de sensibilizare auriculară pe model animal tratate cu KTZ, dendrimer, complex supramolecular, vehicul – control negativ, DNCB – control pozitiv (***)= p<0.0001)

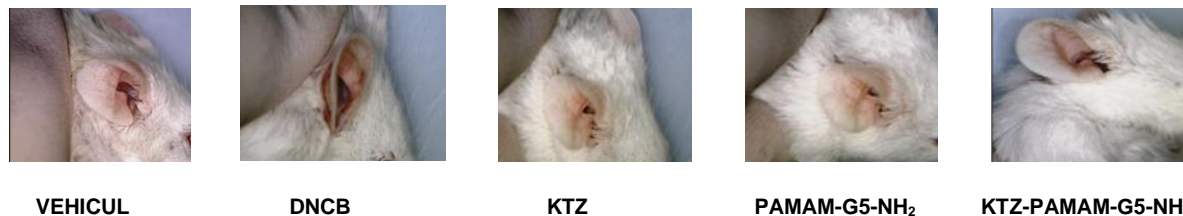


Figura 5. Imagini comparative ale urechilor șoricelilor BALB c tratate cu vehicul – control negativ, DNCB – control pozitiv, KTZ, dendrimer și complex supramolecular

- [1] J.-L. Garrigue, J.-F. Nicolas, R. Fragnals, C. Benezra, H. Bour, D. Schmitt, Contact Dermatitis., 1994, 30(4), 231-237; P.S. Thorne, C. Hawk, S.D. Kaliszewski, P.D. Guiney, Fundam. Appl. Tox., 1991, 17, 807-820
- [2] L. Tordesillas, R. Goswami, S. Benedé, G. Grishina, D. Dunkin, K.M. Järvinen, S.J. Maleki, H.A. Sampson, J. Clin. Invest. 2014, 124, 4965; S. Danescu, G. Filip, R. Moldovan, D. Olteanu, A. Nagy, X. Filip, F. Martin, I. Kacso, I. Baldea, Inflammopharmacology, 2021, 29, 721-733

Activitate 3.3 / Diseminarea rezultatelor cercetării (partea 3)

1. ***“Ketoconazol: noi formulări antifungice de tip sare/cocrystal cu biodisponibilitate îmbunătățită prin inginerie cristalină”***, F. Martin, I. Kacso, I. Grosu, M. Miclăuș, X. Filip, G. Borodi, D. Vodnar, I. Bâldea – *comunicare orală* prezentată la Întâlnirea Anuală a Universității de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu” Cluj, 7 Dec 2023, Romania
2. ***Ketoconazole-Adipic Acid cocrystal and pharmaceutical excipients: study of compatibility and stability***, F. Martin, M. Miclăuș, I. Grosu, M. Dan, X. Filip, I. Kacso, Articol ISI submitted: Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 2024
3. **Fișă CDI de produs Nr. 1610/12.04.2024 “Complex supramolecular Ketoconazol-PAMAM-G5-NH₂”**
4. **Fișă CDI de produs Nr. 1616/18.04.2024 “Ketoconazole-sorbat, forma cristalină nouă a Ketoconazolului - testarea biocompatibilității in vivo”**
5. **Fișă CDI de metodă Nr. 1623/24.04.2024 “Metoda experimentală de scale-up a procesului de cocrystalizare pentru Ketoconazol-Acid Adipic”**
6. **Fișă CDI de metodă Nr. 1624/24.04.2024 “Metoda experimentală de scale-up a procesului de cocrystalizare pentru Ketoconazol-Acid Sorbic”**
7. **Fișă CDI de studiu Nr. 1626/29.04.2024 “Studiul de compatibilitate dintre co-cristalul Ketoconazol-Acid Adipic cu excipienți farmaceutici”**
8. Actualizare site proiect: <https://www.itim-cj.ro/PNCIDI/ket-in-pamam/>

Director Proiect,
Dr. Ing. Martin Flavia-Adina

Martin