



WROCLAW  
**MEDICAL UNIVERSITY**

**Katarzyna Malec**

**Interakcje lek-substancja powierzchniowo  
czynna w micelarnych nośnikach  
substancji aktywnych farmaceutycznie**

Drug-surfactant interactions in micellar carriers  
of active pharmaceutical ingredients

Doctoral dissertation based on a monothematic series  
of publications in medical and health sciences  
in the discipline of pharmaceutical sciences

Doctoral supervisor:

dr hab. Bożena Karolewicz, prof. uczelni

Doctoral assistant supervisor:

dr hab. Karol Nartowski

Department of Drug Form Technology

Wrocław 2023

## 1. List of publications constituting the dissertation

The results obtained from the carried out research are presented in two experimental papers constituting the publication series. The application aspect of the selected formulations comprised the basis of the patent application “The pharmaceutical composition with fluconazole with enhanced antifungal activity, the formulation of the pharmaceutical composition, and the use of the pharmaceutical composition” submitted to the Polish Patent Office on 9<sup>th</sup> February 2023 (No. P.443724).

I **Katarzyna Malec**, Serena Monaco, Ignacio Delso, Justyna Nestorowicz, Marta Kozakiewicz-Latała, Bożena Karolewicz, Yaroslav Z. Khimyak, Jesús Angulo, Karol P. Nartowski. *Unravelling the mechanisms of drugs partitioning phenomena in micellar systems via NMR spectroscopy*. Journal of Colloid and Interface Science, 2023, 638, 135-148.

doi: 10.1016/j.jcis.2023.01.063

IF<sub>2022</sub>: 9.9

Ministry of Education and Science points: 100

II **Katarzyna Malec**, Aleksandra Mikołajczyk, Dominik Marciniak, Agnieszka Gawin-Mikołajewicz, Agnieszka Matera-Witkiewicz, Bożena Karolewicz, Urszula Nawrot, Yaroslav Z. Khimyak, Karol P. Nartowski. *Pluronic® F-127 enhances antifungal activity of fluconazole against resistant Candida strains*. ACS Infectious Diseases (paper accepted on 21<sup>th</sup> November 2023)

doi: 10.1021/acsinfecdis.3c00536

IF<sub>2022</sub>: 5.3

Ministry of Education and Science points: 100

**Total IF value of the publication series: 15.2**

**Total Ministry of Education and Science points of the publication series: 200**

## 2. Abstract

Micelles are nanosize drug delivery systems characterized by many advantages, such as solubility increase of poorly soluble API, controlled drug release, targeted delivery, and ability to be applied in various routes of administration. Although the structure of these supramolecular aggregates seems to be simple, they form dynamic assemblies in which drug molecules undergo exchange between micelle and surrounding solvent. Thus, understanding the transient structure of micelles and their interactions with drug molecules at the atomistic level requires the application of comprehensive analytical techniques enabling to probe hierarchical supramolecular organization.

STD NMR was developed to evaluate transient interactions between protein and ligand. In this work this technique was translated to soft colloidal materials resembling the structure of macromolecules. The first application of multifrequency STD NMR (DEEP-STD NMR) to colloidal systems has been presented in the study. The approach relies on the fact that surfactant monomers building micelles possess hydrophilic and hydrophobic motifs, so a preferable conformation of drugs within model micelles could be established. *Via* a combination of different 1D and 2D NMR methods along with a novel application of multifrequency STD NMR suitable for probing biomolecules-ligand interactions, a novel method for establishing a map of contacts between drug molecules and a micellar system was proposed. The experimental data were supported by computational simulations.

The components of the investigated formulations included non-ionic block copolymer Pluronic<sup>®</sup> F-127, non-ionic Tween 20, Tween 80, ionic SLS, and two model drugs, namely fluconazole and indomethacin, differing in hydrophobic/hydrophilic properties. Compositions without the addition of the drug as well as those loaded with the drug were examined, resulting in twelve systems in total. Such selection of model systems covered a wide range of structural properties and micellization/solubilization behavior of the systems enabling to access the applicability of the method to different materials. Thus, the results might provide guidance on the application of the proposed NMR toolbox across other micellar systems.

Based on the initial screening, among developed compositions loaded with antifungal fluconazole, formulations comprising Pluronic® F-127 turned out to be effective against resistant yeasts. Fluconazole was chosen as a model drug due to the worldwide clinical challenge of treating systemic and topical fungal infections. The limited number of chemical classes of antifungal drugs available for treatment results in the fungi becoming more resistant to those drugs. Moreover, there are only few marketed products with fluconazole for the topical route of administration. Considering the above, the search for the substances enhancing antifungal activity or the development of new antifungal formulations is essential. Especially novel topically applied drug forms might aid in reducing systemic toxicity and be beneficial for patients exposed to recurrent fungal infections.

Over 20 formulations, including micellar solutions and gels with fluconazole added, were tested on 30 clinical *Candida* isolates (*C. glabrata*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*) that might be divided into resistant, susceptible upon exposure, and naturally resistant to fluconazole. The enhanced antifungal efficacy of Pluronic® F-127-based formulations with incorporated fluconazole manifested through the statistically significant decrease of the yeast growth measured in broth microdilution assay and by cup plate method. Kinetics studies of antifungal activity showed a steady inhibitory effect on the fungal growth of the examined formulations. The considerations of the mechanism of the observed effect were also included in the study. Such approach is extremely rare in papers examining the efficacy of the applied formulation when tested on microbes. Firstly, the evaluation of the mechanism of resistance of the studied yeasts was carried out. It was performed by a study of efflux pumps and by the investigation of the genes expression level. Both the decrease in MIC values upon verapamil addition and the upregulation of the CDR1/CDR2 genes measured by real-time PCR experiments performed on 15 resistant *C. glabrata* strains indicated the efflux of the drug from the fungal cell through membrane proteins as the main resistance mechanism. Then, the impact of Pluronic® F-127 on cellular efflux and the permeability of the fungal membranes in yeasts was assessed by fluorescence microscopy. The staining pattern of the cells in comparison to the respective reference substances pointed that both the modified integrity of the fungal membrane and the altered transporters'

function were induced upon incubation with the tested colloidal formulations. Such a mixed mode of action led to an enhanced activity of fluconazole due to more permeable cell membranes and a limited rinse from the cell interior. Hence, the studied formulations might evolve further into semi-solid and liquid forms such as gels, sprays, eye drops administered onto the skin, mucous membranes, or into the eye.

### 3. Streszczenie

Micele to nanosystemy dostarczania leków charakteryzujące się wieloma zaletami, takimi jak zwiększenie rozpuszczalności słabo rozpuszczalnych substancji aktywnych farmaceutycznie, kontrolowane uwalnianie leku, celowane jego dostarczenie i możliwość zastosowania w różnych drogach podania. Chociaż struktura tych supramolekularnych agregatów sprawia wrażenie prostej, tworzą one dynamiczne układy, w których cząsteczki leku podlegają wymianie między micelami a otaczającym je rozpuszczalnikiem. W konsekwencji tego zrozumienie struktury miceli i ich interakcji z cząsteczkami leku na poziomie molekularnym wymaga zastosowania kompleksowych technik analitycznych umożliwiających badanie hierarchicznej organizacji supramolekularnej.

STD NMR (spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego z wykorzystaniem różnic w przeniesieniu nasycenia) została opracowana w celu oceny przejściowych oddziaływań między białkiem a ligandem. W niniejszej rozprawie technika ta została rozszerzona na materiały koloidalne przypominające strukturę makrocząsteczki. W pracy przedstawiono pierwsze zastosowanie wieloczęstotliwościowego STD NMR (DEEP-STD NMR) w opisie układów koloidalnych. W podejściu tym wykorzystuje się fakt, że cząsteczki substancji powierzchniowo czynnych budujących micelle posiadają domeny hydrofilowe i hydrofobowe, dzięki czemu można ustalić preferowaną konformację leków w modelowych micelach. Poprzez połączenie różnych metod jedno- i dwuwymiarowych NMR wraz z nowatorskim zastosowaniem wieloczęstotliwościowego STD NMR odpowiedniego do badania interakcji biomolekuła-ligand, w pracy zaproponowano metodę tworzenia mapy oddziaływań między cząsteczkami leku a układem micelarnym. Przedstawione dane eksperymentalne zostały poparte symulacjami obliczeniowymi.

Składniki badanych formułacji obejmowały niejonowy kopolimer blokowy Pluronic® F-127, niejonowy Tween 20, Tween 80, jonowy SLS oraz dwa modelowe leki, a mianowicie flukonazol i indometacynę, różniące się właściwościami hydrofobowymi/hydrofilowymi. Zbadano zarówno kompozycje bez dodatku leku, jak i te z inkorporowanym lekiem, uzyskując łącznie dwanaście systemów. Taki dobór układów modelowych charakteryzujących się szerokim

zakresem właściwości strukturalnych i zróżnicowanymi procesami micelizacji/solubilizacji, umożliwił sprawdzenie potencjalnego zastosowania metody w wielu materiałach. W związku z tym wyniki mogą dostarczyć wskazówek dotyczących zastosowania proponowanego zestawu technik NMR w innych układach micelarnych.

W oparciu o badania wstępne, spośród przeanalizowanych formułacji z przeciwgrzybiczym flukonazolem, preparaty zawierające Pluronic® F-127 okazały się skuteczne przeciwko opornym drożdżakom. Flukonazol wybrano jako lek modelowy ze względu na ogólnoświatowe wyzwanie kliniczne związane z leczeniem ogólnoustrojowych i miejscowych zakażeń grzybiczych. Ograniczona liczba grup chemicznych leków przeciwgrzybiczych dostępnych do prowadzenia terapii powoduje, że grzyby stają się coraz bardziej odporne na stosowane leki. Co więcej, na rynku dostępnych jest tylko kilka produktów zawierających flukonazol do stosowania miejscowego. Biorąc pod uwagę powyższe, niezbędne jest poszukiwanie substancji zwiększających aktywność przeciwgrzybiczą lub opracowywanie nowych preparatów przeciwgrzybiczych. Zwłaszcza nowe formy leków stosowane miejscowo mogą pomóc w zmniejszeniu toksyczności ogólnoustrojowej i mogą być korzystne dla pacjentów narażonych na nawracające infekcje grzybicze.

Ponad 20 formułacji, w tym roztwory micelarne i żele z dodatkiem flukonazolu, przetestowano na 30 klinicznych szczepach *Candida* (*C. glabrata*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*), z grupy opornych, wrażliwych po ekspozycji i naturalnie opornych na flukonazol. Zwiększona skuteczność przeciwgrzybicza preparatów na bazie Pluronic® F-127 z inkorporowanym flukonazolem przejawiała się statystycznie istotnym spadkiem wzrostu drożdżaków mierzonym w teście mikrorozcieńczeń i metodą dyfuzyjną na płytkach agarowych. Badania kinetyki aktywności przeciwgrzybiczej wykazały stały hamujący wpływ badanych formułacji na wzrost grzybów. W pracy uwzględniono również rozważania dotyczące mechanizmu obserwowanego efektu. Takie podejście jest niezwykle rzadkie w piśmiennictwie opisującym skuteczność opracowanych preparatów przeciw drobnoustrojom. W tym celu przeprowadzono ocenę mechanizmu oporności badanych drożdżaków. Dokonano tego poprzez badanie potencjalnej inhibicji pomp efflux przez znaną substancję referencyjną oraz badanie poziomu ekspresji genów drożdżaków. Zarówno spadek wartości MIC po dodaniu

werapamilu, jak i nadekspresja genów CDR1/CDR2 wyznaczona za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w eksperymencie przeprowadzonym na 15 opornych szczepach *C. glabrata* wykazały, że wypływ leku z komórki grzyba przez białka błonowe był głównym mechanizmem ich oporności. Następnie za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej oceniono wpływ Pluronic® F-127 na transportery błonowe i przepuszczalność błon grzybiczych drożdżaków. Schemat barwienia komórek w porównaniu z określonymi substancjami referencyjnymi wykazał, że inkubacja z testowanymi preparatami koloidalnymi spowodowała zarówno zmodyfikowaną integralność błony grzybiczej, jak i ograniczone funkcjonowanie transporterów błonowych. Taki mieszany mechanizm działania prowadził do zwiększonej aktywności flukonazolu ze względu na wzrost przepuszczalności błony komórkowej i ograniczone wypłukiwanie leku z wnętrza komórki. W związku z tym badane preparaty mogą być rozwijane do postaci półstałych i płynnych, takich jak żele, aerozole, krople do oczu podawane na skórę, błony śluzowe lub do oka.