

# Innovative formuleringer i antimikrobiell PDT

## NADES og faste dispersjoner

Kristine Opsvik Wikene  
Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo  
E-post: [kristine.wikene@gmail.com](mailto:kristine.wikene@gmail.com)

### TITTEL

Investigation of supersaturated and solubilising preparations of poorly water-soluble photosensitizers intended for antimicrobial photodynamic therapy: Natural deep eutectic solvents and solid dispersions

[www.duo.uio.no/handle/10852/55655](http://www.duo.uio.no/handle/10852/55655)

### VEILEDERE

Hanne Hjorth Tønnesen, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo; Ellen Bruzell, Nordisk institutt for odontologiske materialer (NIOM) og Håkon Valen Rukke, NIOM.

**FORSVAR AV OPPGAVEN**  
2017, vår

### HOVEDBUDSKAP

Natural deep eutectic solvents (NADES) ble for første gang undersøkt som formulering for fotosensitiserere i antimikrobiell fotodynamisk terapi.

Basert på den additive eller synergetiske antibakterielle effekten som kan oppnås ved å bruke NADES som løsningsmiddel for en fotosensitiser, ble denne formuleringstypen regnet som høyst interessant i den videre utviklingen av nye antimikrobielle behandlinger.

### BAKGRUNN

Antimikrobiell fotodynamisk terapi (aPDT) er en antimikrobiell behandling som kombinerer et fargestoff (fotosensitiser), oksygen og synlig lys for å danne toksiske fotoprodukter etter at fotosensitiseren har blitt eksitert av det synlige lyset. Slike fotoprodukter kan være frie radikaler eller reaktive oksygenforbindelser som singlett oksygen og hydrogenperoksid, som er høyst reaktive. Ved å optimalisere kontakttiden til fotosensitiseren i et infisert område, konsentrasjonen og lysdosen, kan man oppnå selektivt drap av bakterier uten å skade de mammaleske cellene i området (1).

I aPDT tilstrebes det at fotosensitiseren er i nær kontakt med bakteriene man ønsker å drepe, slik at de toksiske fotoproduktene i størst mulig grad bombarderer bakteriene, med påfølgende celledød. Utfordringen med dette er at de fleste fotosensitiserere er lite vannløselige og har en tendens til å aggregere i kontakt med et vandig miljø. Aggregater av fotosensitiseren er mindre fototoksiske enn monomere, blant annet fordi de ikke lar seg eksitere i like stor grad av det synlige lyset. En optimal formulering bør derfor holde fotosensitiseren på monomer form også i kontakt med vandige media, forsinke aggregatdannelse, og sørge for tett kontakt mellom fotosensitiseren og bakteriene, for eksempel i en infeksjon i munnhulen eller på huden.

Fotosensitiserne curcumin, tetra-hydroksy-fenyl-porfin (THPP) og tetra-karboksyfenyl-porfin (TCPP) ble undersøkt i dette arbeidet. Formuleringstrategien for å øke deres fototoksiske effekt var å danne overmettede løsninger som skulle drive fotosensitiserne til å interagere med bakteriene. Overmettede løsninger av fotosensitiserere kan indusere en høyere fototoksiske effekt sammenliknet med konvensjonelle formuleringer (2, 3). Det ble derfor utviklet og karakterisert faste dispersjoner av curcumin, og oppløsninger av alle fotosensitiserne i eutektiske løsninger kalt natural deep eutectic solvents (NADES). Spesielt NADES, som er lett blandbare med vann, ble foreslått å være en lovende formuleringstype.

### MATERIALER OG METODER

Faste dispersjoner med curcumin ble laget ved kompleksdannelse med metyl-beta-syklodekstrin (M $\beta$ CD) i overmettede løsninger, etterfulgt av oppløsning av hyaluronsyre og/eller hydroksypropyl metylcellulose (HPMC) før løsningene ble frysetørket.

NADES ble laget ved å løse opp komponentene (tabell 1) i vann etterfulgt av avdamping av vannet på rotavapor. Fotosensitiserne (curcumin, THPP og TCPP) ble deretter løst i NADES til ønsket konsentrasjon.

Produktene ble karakterisert blant annet med hensyn til fysisk stabilitet av fotosensitiseren etter oppløsning (faste dispersjoner) eller fortykning (eutektiske løsninger) i vann og/eller fosfatbuffer, og fototoksisitet *in vitro* for ulike grampositive og gramnegative bakterier, blant annet *Escherichia coli*. Protokollen for eksponering av *E. coli* bestod av 60–90 min eksponering beskyttet mot lys og 30 min bestråling med blått lys (tilsvarende ~30 J/cm<sup>2</sup>).

### RESULTATER

M $\beta$ CD (3 % (v/v)) økte løseligheten til curcumin i vann minst 8500 ganger, fra  $< 3 \times 10^{-8}$  M (4). De frysetørkede produktene av curcumin, M $\beta$ CD, hyaluronsyre og/eller HPMC løste seg innen 1 min i vandig medium og dannet overmettede løsninger av curcumin med stabil curcuminkonsentrasjon i inntil 4 t etter oppløsning (4).

De eutektiske løsningene MC3, CS og MFG var mer polare enn vann (5–7). MC3 var den av de undersøkte eutektiske løsningene som løste curcumin best (i omtrent like stor grad som 3 % (v/v) M $\beta$ CD), og resulterte i oransje løsninger. Etter fortykning i vandig medium derimot, sank curcuminkonsentrasjonen i den overmettede løsningen raskere enn for de oppløste lyofilisatene med curcumin (6).

Oppløsning av THPP og TCPP i NADES listet i tabell 1 resulterte i grønne løsninger. Fortyning av THPP-CS 1:100 med vann resulterte i overmettede løsninger som ikke begynte å felle ut før etter >7 d (5). Ved fortykning 1:100 i fosfatbuffer derimot, ble utfelling observert etter 20 t (5). Fortyninger av TCPP i CS eller MFG i vandig medium resulterte i noe mindre stabile overmettede løsninger enn THPP i NADES (7).

Eksponering for uforynnet MC3, CS eller MFG resulterte i fullstendig drap av *E. coli*. Løsningene med fotosensitiser løst i NADES ble derfor fortynnet med fosfatbuffer i bakterieforsøkene for å observere den fototoksiske effekten til fotosensitiseren. Fortynt curcumin-MC3 fremsto som like mye eller mer fototoksiske enn de oppløste lyofilisatene, med fullstendig drap av *E. coli* med henholdsvis 1.25  $\mu$ M og 2.5  $\mu$ M curcumin kombinert med ~30 J/cm<sup>2</sup> blått lys (4, 6).

Nanomolare konsentrasjoner (0.25–40 nM) av

**Tabell 1.** Et utvalg av de studerte NADES, komponentene de består av og deres mol-forhold, samt akronymet brukt for disse. PS = fotosensitiser studert i den aktuelle NADES.

Komponent 1	Komponent 2	Komponent 3	Mol-forhold	Akronym	PS
Sitronsyre	Sukrose		1:1	CS	THPP, TCPP
Kolin klorid	Maleinsyre		3:1	MC3	Curcumin
Eplesyre	Fruktose	Glukose	1:1:1	MFG	TCPP

THPP eller TCPP i de NADES som inneholdt en organisk syre, fortynnet 1:200-1:400 med fosfatbuffer, kombinert med ~30 J/cm<sup>2</sup> blått lys, induserte >99.99 % reduksjon av grampositive og gramnegative bakterier (5, 7). Til sammenlikning kunne ikke overmettede løsninger av 1 µM THPP eller TCPP i fosfatbuffer og etanol (0.5 %) redusere antall kolonidannende enheter *E. coli* med mer enn 57 % kombinert med den samme lysdosen (5, 7).

## DISKUSJON

Etter oppløsning var de faste dispersjonene med curcumin mer fototoksiske enn enkle overmettede løsninger av curcumin med kun MβCD (2, 4). Dette skyldtes sannsynligvis polymerenes stabiliserende egenskaper på curcuminkonsentrasjonen i overmettet løsning (2, 4). De faste dispersjonene var også mer fototoksiske enn liknende faste dispersjoner der et annet syklodekstrin var benyttet (3). Ulempen med de faste dispersjonene var at teoretisk konsentrasjon av curcumin ikke ble oppnådd ved reløsning og filtrering av lyofilisatene, hvilket kan bety at en viss mengde curcumin aggregerte momentant (4). Raskt inntreffende aggregering av curcumin etter fortykning av curcumin-NADES løsningene var også en ulempe ved bruk av disse preparasjonene (6).

THPP eller TCPP i NADES dannet mer stabile overmettede løsninger ved fortykning enn curcumin-NADES. Dermed ble bakteriene i fototoksisitetsforsøkene eksponert for en høy effektiv mengde fotosensitiser (det vil si monomere) til tross for en lav konsentrasjon. At NADES-preparasjonene var like mye eller mer fototoksiske enn enkle overmettede løsninger av porfyrinene i fosfatbuffer pH 7.4 (med 0.5 % etanol), viste at NADES kan være et anvendelig formuleringsprinsipp for lite vannløselige porfyriner i aPDT.

Protonering av porfyrinene ved pH under 7 kan indusere tettere interaksjoner med en negativ bakterieoverflate, og dermed høyere fototoksiske effekt. At fortynt TCPP-MFG (pH ~5.5) var mer fototoksiske for *E. coli* enn i referanseløsninger med 6.8 mM sitronsyre (pH ~4.0), indikerte at pH ikke var (den eneste) grunnen til at porfyrin-NADES løsningene fremsto som mer fototoksiske enn porfyrinene i fosfatbuffer (7). Ulike mekanismer bak CS og MFG sine antibakterielle og aPDT-potenserende egenskaper ble studert, som enkeltkomponentenes påvirkning eller chelatering av kationer i bakteriens cellevegg, men det kunne ikke konkluderes med noen spesifikk mekanisme basert på de studiene som ble gjennomført (8).

## KONKLUSJON

Ingen av formuleringene av curcumin var optimale på grunn av aggregering av curcumin i vandig, overmettet løsning. Løsningene av porfyrinene i NADES var bedre egnet for videre fototoksisitetsstudier. Ved fortykning av NADESene kunne disse danne overmettede løsninger av porfyrinene med en tilfredsstillende grad av metastabilitet og høy fototoksisitet.

De unike egenskapene NADES har som løsningsmiddel for hydrofile og hydrofobe stoffer, og deres antibakterielle egenskaper, gjør disse løsningene interessante som løsningsmidler for fotosensitisere i aPDT. De NADESene som er antibakterielle i seg selv kan muligens brukes som en antibakteriell behandling uten å bli kombinert med en fotosensitiser og synlig lys. For alvorlige, topikale infeksjoner kan en kombinert antibakteriell effekt av NADES og en løst fotosensitiser være spesielt fordelaktig.

## REFERANSER

- Jori G, Fabris C, Soncin M et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med* 2006; 38: 468–81.
- Hegge AB, Nielsen TT, Larsen KL et al. Impact of curcumin supersaturation in antibacterial photodynamic therapy – effect of cyclodextrin type and amounts: studies on curcumin and curcuminoids XLV. *J Pharm Sci* 2012; 101: 1524–37.

- Hegge AB, Vukicevic M, Bruzell E et al. Solid dispersions for preparation of phototoxic supersaturated solutions for antimicrobial photodynamic therapy (aPDT): studies on curcumin and curcuminoids L. *Eur J Pharm Biopharm* 2013; 83: 95–105.
- Wikene KO, Hegge AB, Bruzell E et al. Formulation and characterization of lyophilized curcumin solid dispersions for antimicrobial photodynamic therapy (aPDT): studies on curcumin and curcuminoids LII. *Drug Dev Ind Pharm* 2015; 41: 969–77.
- Wikene KO, Bruzell E, Tønnesen HH. Improved antibacterial phototoxicity of a neutral porphyrin in natural deep eutectic solvents. *J Photochem Photobiol B* 2015; 148: 188–96.
- Wikene KO, Bruzell E, Tønnesen HH. Characterization and antimicrobial phototoxicity of curcumin dissolved in natural deep eutectic solvents. *Eur J Pharm Sci* 2015; 80: 26–32.
- Wikene KO, Rukke HV, Bruzell E et al. Physicochemical characterisation and antimicrobial phototoxicity of an anionic porphyrin in natural deep eutectic solvents. *Eur J Pharm Biopharm* 2016; 105: 75–84.
- Wikene KO, Rukke HV, Bruzell E et al. Investigation of the antimicrobial effect of natural deep eutectic solvents (NADES) as solvents in antimicrobial photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2017; 171: 27–33.

**Last ned vår App**  
Få nye fordeler hver måned

**Få en god strømavtale**

Som medlem av Norges Farmaceutiske Forening får du spesialavtale på strøm fra Fjordkraft.

Les mer på [fjordkraft.no/farmaceutene](http://fjordkraft.no/farmaceutene) eller ring **230 06100**.

**Fjordkraft**  
Mer for pengene