

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra anorganické a organické chemie



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Polyenová antibiotika

Hradec Králové
květen 2006

Hana Vlčková

Děkuji vedoucí bakalářské práce PharmDr. Lence Kubicové, CSc. ^{PharmDr. Lence Kubicové}
za cenné rady a pomoc během celé bakalářské práce.

OBSAH

1. ÚVOD.....	4
2. CÍL PRÁCE.....	6
3. POLYENOVÁ ANTIBIOTIKA	7
3.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA	7
3.2. AMFOTERICIN B	9
3.2.1 Struktura a mechanismus účinku	9
3.2.2. Antifungální aktivita	10
3.2.3. Farmakokinetika a vedlejší účinky	12
3.2.4. Lipidové formy amfotericinu B	13
3.2.5. Konjugáty amfotericinu B s polymerními nosiči.....	15
3.2.6. Semisyntetické obměny amfotericinu B	17
3.2.7. Jiné biologické účinky amfotericinu B	18
3.3. NYSTATIN.....	19
4. DISKUSE A ZÁVĚR.....	21
5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	22

1. ÚVOD

Mykózy jsou infekční onemocnění vyvolaná houbami. Rozdělujeme je na lokální a systémové. Lokální mykózy jsou onemocnění poměrně často se vyskytující v populaci. Jejich léčba je dnes vcelku zvládnutá záležitost. Existuje poměrně široký výběr látek k lokálnímu použití. Naproti tomu systémové mykózy představují jeden z nevyřešených problémů dnešní medicíny. Tato onemocnění mohou být primární i sekundární. Primární systémové mykózy jsou způsobeny dimorfními houbami (např. rody *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma*) a v některých případech i kvasinkou *Cryptococcus neoformans*. Tyto patogenní houby mohou vyvolat onemocnění i u lidí s nenarušenou obranyschopností. Sekundární mykózy jsou způsobeny oportunními houbami, které nejsou pro zdravého člověka nebezpečné, a postihují zejména imunoalterované pacienty. Jsou vyvolány hlavně kandidami, aspergily, kryptokoky a zygomycetami¹.

Během posledních 30 let dochází ke stálému zvyšování počtu pacientů se systémovými mykózami a také vzrůstá počet úmrtí na tyto infekce. Příčiny tohoto trendu je třeba hledat nejen v rostoucím počtu pacientů s narušenou imunitou, např. u osob trpících maligním onemocněním nebo zasažených HIV infekcí. Přes 90 % HIV- pozitivních osob trpí fungálními infekcemi^{2,3}. Je zřejmá i zjevná souvislost s rozvojem medicíny. Útlum imunitního systému vyvolává protinádorová chemoterapie, podávání imunosupresiv v souvislosti s transplantací orgánů, užívání širokospektrých antibiotik. Systémové mykózy mohou také komplikovat stav po chirurgických zákrocích (poškození přirozených tělesných bariér např. katetrizací). V různých rizikových skupinách se nachází 2 – 40% pacientů s mykózami. Například u pacientů s akutní leukémií, léčených myelosupresivní chemoterapií, se invazivní mykózy vyskytují přibližně ve 14 % případů, u transplantovaných pacientů je výskyt systémových mykóz ještě vyšší³.

Kandidózy jsou onemocnění způsobené kvasinkami rodu *Candida*, nejčastěji se jedná o *Candida albicans* (60%), ale v posledních letech se rozšířily i non-albicans druhy, jako *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*⁴. Kandidy jsou součástí přirozené mikroflóry člověka. Většina onemocnění je endogenního původu. Jedná se o nejčastější nozokomiální infekci a čtvrtou nejčastější infekcí krevního oběhu pacientů na jednotkách intenzivní péče^{1,5,6}. Nejčastějšími rizikovými faktory

jsou léčba širokospektrými antibiotiky, imunosupresivními léky, popáleniny, imunodeficece pacienta, katetrizace aj. Klinické příznaky jsou velmi různorodé a nespecifické. Může se vyskytovat kandidúrie, kandidémie, sepse, aj.¹. Úmrtnost pacientů na kandidózy je 20 – 40 %³.

Aspergilózy jsou onemocnění způsobená vláknitými houbami rodu *Aspergillus*, hlavně *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*. Aspergily jsou původci alergických a infekčních onemocnění. Nejčastěji se jedná o nozokomiální infekce imunoalterovaných pacientů. Výrazně ohrožují život pacientů po transplantacích, po podávání imunosupresivních léků, po polytraumatech aj.^{1,2}. Rizikovým faktorem je zvýšená kontaminace vzduchu spórami, které se do těla dostávají inhalací nebo kontaktem v místě traumatu. Aspergily vyvolávají zejména onemocnění plic (pulmonální aspergilózu), vzácně aspergilom a někdy i endokarditidu¹. Úmrtnost pacientů na aspergilózy je 50 – 90 %³.

Zygomykózy (mukormykózy) jsou akutní, život ohrožující houbové infekce, které postihují především imunoalterované pacienty. Původci mukormykóz jsou běžně se vyskytující vláknité houby třídy Zygomycetes, řádu Mucorales, nejčastější rody *Rhizopus*, *Absidia*, *Mucor*, *Rhizomucor*. Nejčastější formy jsou rhino – orbito – cerebrální (nekrotizující ložiska v obličejových dutinách a na patře, šířící se do mozku), plicní, gastrointestinální, kožní a diseminovaná. Mukormykózy mají velmi špatnou prognózu. I přes intenzivní péči umírá téměř 100% pacientů, v závislosti na formě mukormykózy a na pacientově primární chorobě^{7,8,9}.

Kryptokokóza je závažné systémové onemocnění, které je způsobené kvasinkou *Cryptococcus neoformans*. Zdrojem je nejčastěji holubí trus. Onemocnění má často asymptomatický průběh, vyskytuje se hlavně u imunoalterovaných pacientů. Nejčastěji se setkáme s kryptokokovou meningitidou, méně často s kožní a plicní formou¹.

Farmakoterapie systémových mykóz představuje dosud nevyřešený problém. K dispozici jsou pouze některé azolové preparáty, polyenová antibiotika (amfotericin B a v poslední době i liposomální forma nystatinu), flucytosin a kaspofungin, zástupce nové skupiny echinokandinových antimykotik^{4,5,10,11,12,13,14,15,16}. Žádné z těchto léčiv ale nespĺňuje představy o ideálním antimykotiku, a proto se skupiny vědců snaží hledat nové strukturní typy antimykotik, nebo snížit toxicitu a zlepšit farmakokinetiku již známých léčiv.

2. CÍL PRÁCE

Předkládaná bakalářská práce je součástí výzkumu konjugátů antimykoticky aktivních látek s polymerními nosiči na bázi modifikovaných poly(ethyleglykolů), řešeného v rámci grantu GAČR 203/06/0583 a výzkumného záměru MŠMT č. MSM 0021620822. Práce tvoří významnou část teoretických podkladů grantového úkolu GAČR 203/06/0583 „Nové antimykoticky aktivní konjugáty poly(ethyleglykolů)“.

Cílem bakalářské práce bylo shromáždit a zpracovat novější informace o polyenových antibioticích, používaných v terapii systémových mykóz, tj. amfotericinu B a nystatinu. Pro účely bakalářské práce byly zpracovávány zejména údaje z posledních 10 let. Práce bude součástí souhrnného sdělení v odborném tisku.

3. POLYENOVÁ ANTIBIOTIKA

3.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA

Polyenové makrolidy způsobily převrat v léčbě mykóz. Až do roku 1950 neexistovala žádná bezpečná a kauzální terapie systémových a invazivních mykóz. Teprve objev nystatinu a amfotericinu B v 50. letech^{1,17} ukázal nové možnosti léčby houbových infekcí.

Polyenová antibiotika jsou přírodní látky produkované půdními aktinomycetami, zejména rodu *Streptomyces*. Jedná se o velmi rozsáhlou skupinu látek. Dosud bylo objeveno víc než 200 polyenových antibiotik⁴, ale do praktického použití v antifungální terapii se dostaly jen amfotericin B, nystatin, kandicidin a pimarinic.

Polyenová antimykotika jsou jednou ze dvou podskupin makrolidových antibiotik. Jedná se o amfifilní molekuly obsahující rigidní lipofilní část a flexibilní hydrofilní část. Na rozdíl od antibakteriálních makrolidů, kam patří například erythromycin, jsou polyenové makrolidy tvořené podstatně větším laktonovým kruhem (o 26 až 40 atomech). Rigidní, planární část laktonového kruhu, nazývaná chromofor, je lipofilní a obsahuje několik konjugovaných dvojných vazeb (3–7). Podle jejich počtu se polyenová antibiotika dělí na trieny, tetraeny, pentaeny, hexaeny, heptaeny¹⁸.

tetraeny: amfotericin A, antimykoin A, endomycin A, chromin, nystatin,
rimocidin, tetrin A, tetrin B, natamycin

pentaeny: eurocidin, filipin, fungichromin, kapacidin

hexaeny: dermostatin, flavacid, kryptocidin

heptaeny: hachimycin, hamycin, kandicidin, kandidin, kandimycin, perimycin
amfotericin B

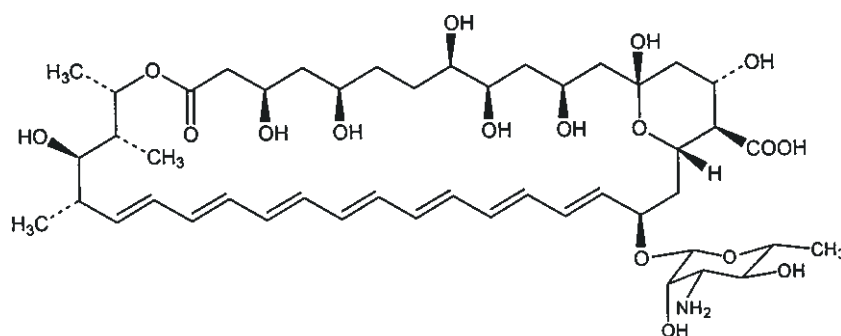
Přítomnost chromoforu má za následek typické absorpční spektrum v ultrafialové oblasti, které obsahuje tři charakteristická absorpční maxima, a také některé fyzikální a chemické vlastnosti, např. silnou absorpci záření, fotolabilitu a špatnou rozpustnost ve vodě. Druhá část laktonového kruhu je substituována polárními skupinami (hydroxyskupina, karboxylová skupina, epoxidová skupina). Na makrocyclický laktonový kruh je obvykle navázána jedna nebo více

sacharidových jednotek, připojených glykosidickou vazbou k uhlíku vedle chromoforu. Ve většině případů se jedná o mykosamin (3-amino-3,6-dideoxy-D-mannosa), pouze výjimečně o jeho izomer perosamin (4-amino-4,6-dideoxy-D-mannosa) nebo neutrální monosacharid 2,6-dideoxy-L-ribohexopyranosu. Důležitou funkční skupinou polyenových antibiotik je karboxylová skupina, obvykle navázaná na čtvrtý atom uhlíku od chromoforu. Tato karboxylová skupina i aminoskupina aminosacharidu jsou ionizovatelné a mohou se účastnit řady intra- nebo intermolekulárních interakcí². Epoxidový můstek, pokud jej molekula obsahuje, se nachází v blízkosti karboxylové skupiny. Některá polyenová antibiotika (např. kandicidin) obsahují ještě aromatickou část, situovanou na opačné straně laktonového kruhu než karboxylová skupina^{2,18,19,20}. Biosyntéza polyenových antibiotik je podrobně popsána v publikacích^{2,19}. Hlavním mechanismem antifungální aktivity i většiny toxických účinků polyenových antibiotik je interakce se steroly biologických membrán, která má za následek změny v permeabilitě membrán a následně smrt buňky (podrobněji viz kap. 3.2.1). Použitelnost polyenových antibiotik v antifungální terapii souvisí s jejich rozdílnou afinitou k ergosterolu, který se nachází v membránách hub, a cholesterolu, přítomnému v membránách živočišných buněk. Polyeny s menším makrolidovým kruhem (např. filipin) se vážou mnohem ochotněji k cholesterolu než k ergosterolu, zatímco u polyenů s velkým makrolidovým kruhem (např. amfotericin B) je mnohem vyšší afinita k ergosterolu než k cholesterolu²¹. Pouze takové látky mohou být terapeuticky využitelné. Polyenová antibiotika sice mají široké spektrum antifungálního účinku a malý výskyt rezistentních patogenů¹⁷, ale jsou značně toxická, s mnoha vážnými vedlejšími účinky, zejména při nitrožilním podání. Další problémy při terapeutickém použití těchto látek vyplývají z jejich nevýhodných fyzikálně-chemických a chemických vlastností, jako je velmi nízká rozpustnost ve vodě a malá stabilita, zejména na světle^{18,22,23}.

3. 2. AMFOTERICIN B

3.2.1 Struktura a mechanismus účinku

Amfotericin B (AmB), produkováný půdní aktinomycetou *Streptomyces nodosus*, byl donedávna jediným zástupcem polyenových antibiotik, použitelným v terapii systémových mykóz. Jedná se o heptaen s 38-členným laktonovým kruhem, na který je navázán aminosacharid mykosamin^{2,18,24}. Amfotericin B je sloučenina velmi špatně rozpustná ve vodném prostředí, kde tvoří micely nebo konjugáty. Dimery vznikají hydrofobními interakcemi polyenových oblastí v sousedních monomerech. Ve vodných roztocích se mohou vytvářet až oktamer^{25,26}.



Amfotericin B

Mechanismus účinku amfotericinu B je spojen s membránovými steroly. Molekuly polyenových antibiotik tvoří komplexy s membránovými steroly a tím vytvoří hydrofilní kanály, kterými uniká obsah buňky. Fungicidní účinek polyenů je způsoben změnami, které začínají prostupem draselných a dalších kationtů skrz kanály. Tím dochází k dramatickému snížení vnitrobuněčného pH, které má za následek řadu dalších změn (precipitace vnitrobuněčných struktur aj.) a nakonec buněčnou smrt^{2,11,20,26,27}. Mechanismus poškození buněčných membrán polyenovými antibiotiky byl podrobně studován na erythrocytech^{28,29,30}. Dalším mechanismem účinku amfotericinu B je peroxidace membránových struktur volnými radikály s následnou alterací jejich stability a fluidity, jak vyplynulo ze studií na membránách erythrocytů^{23,31}.

Studiem interakcí amfotericinu B s membránami v přítomnosti či nepřítomnosti sterolů se podrobně zabývala řada autorů^{32,33,34,35,36,37,38,39,40,41}. Milhaud a spolupracovníci zjistili, že v nepřítomnosti sterolů zůstávají agregáty amfotericinu B na povrchu fosfolipidové dvojvrstvy, zatímco teprve u membrán s obsahem ergosterolu dochází k proniknutí antibiotika dovnitř membrány a vytvoření kanálu. V případě amfotericinu B je kanál tvořen osmi molekulami, které směřují hydrofobními částmi směrem k membráně a hydrofilními částmi směrem dovnitř kanálu²⁶. Terapeutické využití amfotericinu B je založené na skutečnosti, že amfotericin B má vyšší afinitu k ergosterolu, který je hlavním zástupcem sterolů v buněčných membránách hub, než k cholesterolu, přítomnému v buněčných membránách savčích buněk. Pomocí molekulového modelování bylo zjištěno, že interakce mezi amfotericinem B a ergosterolem jsou specifitější a vzniklý kanál je širší, než při interakci AmB s cholesterolem³². Ještě vyšší afinitu má však AmB k 7-dehydrocholesterolu³³. Amfotericin B vykazuje také silnou afinitu k plazmatickým LDL-lipoproteinům³⁸. K bližšímu objasnění interakcí AmB s membránami byly syntetizovány kovalentní konjugáty AmB s fosfolipidy⁴⁰ a steroidy³⁴. Modelové konjugáty amfotericinu B s ergosterolem permeabilizovaly membrány daleko silněji než analogické konjugáty s cholesterolem³⁴. Ukázalo se však, že na únik draselných iontů má vliv také délka řetězce mastné kyseliny v použitém fosfolipidu⁴⁰.

3.2.2. Antifungální aktivita

Amfotericin B má široké spektrum antifungálního účinku (viz tab. 1), které zahrnuje prakticky všechny patogenní mikromycety, jako dimorfní houby, aspergily, kvasinky včetně kryptokoků, zygomycety aj.^{31,42}. Rezistence na amfotericin B může být primární nebo sekundární. K primárně rezistentním na AmB patří, například kvasinky *Trichosporon beigelii*, některé dermatofyty a vláknité houby, například rod *Fusarium* a jiné^{42,43,44}. Sekundární rezistence na amfotericin B se naštěstí vyskytují poměrně zřídka^{20,45,46,47}. Může jít o kombinaci různých mechanismů. U rezistentních kmenů byly prokázány kvantitativní i kvalitativní změny v zastoupení membránových sterolů (pokles koncentrace ergosterolu, maskování či změna orientace molekul již existujícího ergosterolu, nahrazení

biosyntézy ergosterolu bisyntézou jiných sterolů, ke kterým má amfotericin B mnohem menší afinitu než k ergosterolu)^{42,43}. Byla také prokázána alterace složení buněčné stěny, kdy peptidoglykany mutantního kmene *A. flavus* inhibovaly prostup AmB přes buněčnou stěnu⁴⁸. Agarwal a kol. podrobně popsali genovou expresi u *C. albicans* a *S. cerevisiae* po aplikaci amfotericinu B a dalších látek⁴⁹. Rezistence k amfotericinu B bývá také spojena s tvorbou biofilmů, například na zavedených katetech^{43,50}.

Tabulka 1: Antifungální spektrum polyenových antibiotik amfotericinu B a nystatinu in vitro (převzato z lit.¹⁷)

Třída a rod	MIC90 (mg/l)					
	ABD	NYS	ABCD	ABLC	LAMB	LNYS
Klinicky důležité kvasinky						
<i>Candida albicans</i>	0.25-1	0.25-4	1	0.25-1	0.125-1	0.125-2
<i>Candida dubliniensis</i>	1		0.25	0.03-0.25	0.25	0.5
<i>Candida glabrata</i>	1-1.25	1-2.5	1-10	0.062-1.25	2-10	1.25-2
<i>Candida guilliermondii</i>	1-2	4	1	0.5-4	2	2
<i>Candida krusei</i>	2	4	2	>16	>16	4
<i>Candida lusitanae</i>	0.5	2	0.5	0.125-0.5	1	1
<i>Candida parapsilosis</i>	0.62-1	0.31-4	0.62-1	0.62-1	0.25-2	0.62-2
<i>Candida tropicalis</i>	0.62-1	1.25-4	1.25-1	0.62-4	1.25-1	1.25-2
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0.25	0.5	0.5	0.062-0.5	0.5	0.5
<i>Trichosporon</i> spp.	0.5-1	0.03-2	1	0.25-0.5	1	1
Klinicky důležité vláknité houby						
<i>Absidia</i> spp.	0.25	0.25-1	1	0.125	0.125-1	0.125
<i>Aspergillus flavus</i>	2	4	16	16	16	4
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	2	1	2	0.5-2	4
<i>Aspergillus niger</i>	1	4	1	1	0.5-1	4
<i>Aspergillus terreus</i>	1-4			1	2->16	
<i>Fusarium</i> spp.	0.5->16			>16	4->16	
<i>Mucor</i> spp.	0.5-2					
<i>Rhizomucor</i> spp.	0.5-2					
<i>Rhizopus</i> spp.	0.5-2			1-2	1-2	

Vysvětlivky:

ABD: Amfotericin B deoxycholát

NYS: Nystatin

ABCD: koloidní disperze amfotericinu B

ABLC: Lipidový komplex amfotericinu B

LAMB: Liposomální amfotericin B

LNYS: Liposomální nystatin

3.2.3. Farmakokinetika a vedlejší účinky

Samotný amfotericin B má natolik nevýhodné vlastnosti, že se nehodí pro systémovou terapii. Je prakticky nerozpustný ve vodě a nevstřebává se z trávicího traktu. Obvykle používanou, klasickou formou je deoxycholát, podávaný intravenózně pomalou infuzí. Velká část podaného AmB se deponuje ve tkáních, především v tukové tkáni, ze které se pomalu uvolňuje do krve. Pro kandidové infekce je většinou dostačující dávka 0,5 – 0,75 mg/kg / den. Pro infekce vláknitými houbami jsou nutné vyšší dávky 1 – 1,5 mg/ kg / den. Amfotericin B se pomalu vylučuje ledvinami a žlučí^{17,51}.

Amfotericin B je poměrně toxické léčivo vykazující akutní i chronickou toxicitu^{51,52}. Akutní toxicita (během infuze nebo do 60-180 minut po zahájení léčby) zahrnuje projevy jako je horečka, třesavka, rigor, nauzea a zvracení, bolesti hlavy, svalstva a kloubů, koliky, průjem. Mnohé z těchto nežádoucích účinků souvisejí s expresí několika genů kódujících syntézu cytokinů a chemokinů (PGE2, TNF a IL-1)^{53,54}. Riziko těchto reakcí je možné snížit zpomalením infuze nebo premedikací. Nejzávažnější chronickou toxicitou je nefrotoxicita (glomerulární i tubulární poškození) až selhání ledvin^{55,56}. Vážné komplikace po podání AmB, zejména nefrotoxicita, riziko poškození jater a CNS, limitují denní dávku na 1,5 mg./kg⁵¹. Rizikovými faktory nefrotoxicity jsou velikost denní dávky, trvání léčby, chronické renální onemocnění a současné užívání jiných nefrotoxických léků. Nefrotoxicita může být vratná nebo nevratná. Je-li celková dávka menší než 2 g, nastává jen minimální poškození ledvin. 2-4 g způsobují reverzibilní poškození u 50% pacientů, nad 5 g nastanou ireverzibilní změny u 80%. Vlivem poškození ledvin může sekundárně dojít k narušení minerálního metabolismu. Při aplikaci amfotericinu B může vzniknout tromboflebitida periferní žíly⁵¹. Vzácnější jsou poruchy jater⁵⁷, poškození pankreatu⁵⁸, kostní dřeně nebo hemolytická anémie. Příčinou normocytární normochromní anémie je inhibice tvorby erythropoetinu. Riziko poškození ledvin se dá snížit hydratací, suplementací minerálů, ale i pomalou či kontinuální infuzí místo obvyklého podání stejné dávky během 4–6h⁵⁹. U amfotericinu B byl popsán spermicidní efekt *in vitro* i *in vivo*⁶⁰.

3.2.4. Lipidové formy amfotericinu B

Vzhledem k závažným vedlejším účinkům, které doprovázejí terapii amfotericinem B, byly hledány cesty, jak snížit zejména nefrotoxicitu. Jako efektivní cesta se ukázalo použití tzv. lipidových formulací AmB. Jedná se o takové formy jako liposomální amfotericin B (AmBisome, LAMB), lipidový komplex amfotericinu B (Abelcet, ABLC), koloidní disperze amfotericinu B (Amphocil, ABCD). U lipidových formulací je změněná distribuce do tkání, např. liposomální amfotericin B má vyšší hladinu AmB v mozku. ABLC vytváří vyšší hladiny AmB v plicích. Pro dosažení stejného efektu je však potřeba podávat lipidové formy ve vyšších koncentracích než deoxycholát (4 – 6 mg/kg/den). Jejich nevýhodou je podstatně vyšší cena. Tyto formulace jsou však méně toxické než amfotericin B-deoxycholát (AMBD). Liposomální amfotericin B je ještě méně toxický než lipidový komplex amfotericinu B^{51,56,61,62,63,64,65,66,67,68}.

Lipidové formy významně snižují riziko mortality a nefrotoxicity, ale neovlivňují významně akutní toxicitu^{63,64}. Výběr vhodného přípravku závisí na typu infekčního agens, stadiu onemocnění a celkovém stavu pacienta. Kvůli vysoké ceně jsou indikovány až v případě selhání léčby pomocí AMBD nebo v případě nefrotoxické reakce. Porovnání antifungální aktivity různých forem amfotericinu B a nystatinu je uvedeno v tab. 1.

Amphocil (ABCD) je koloidní disperze amfotericinu B. Ve srovnání s konvenčním AmB-deoxycholátem je méně nefrotoxický, má vyšší terapeutický index. Jedná se o koloidní disperzi, tvořenou amfotericinem B v ekvimolárním poměru se sulfátem cholesterolu (tukovým nosičem), přirozeným metabolitem cholesterolu. Afinita Amphocilu k lipoproteinům je významně menší (váže se jen 3%), než AmB-deoxycholát (24%), a proto je ABCD méně toxický. Spektrum účinnosti je široké, odpovídá rozsahu AmB-deoxycholátu. Při podávání stejných dávek je ABCD proti AmB-deoxycholátu zhruba 2–5krát méně efektivní, současně však 5–8krát méně toxický. Vyšší terapeutický index ABCD tak umožní podat vyšší dávky, a proto je léčba účinnější. Po i.v. aplikaci se micely ABCD (na rozdíl od AmB-deoxycholátu) prakticky neváží na bílkoviny plazmy ani na membrány krevních buněk. Velká molekula ABCD je rychle vychytána v RES (distribuční

poločas je 2–5 minut) s nejvyšší kumulací zejména v játrech (75 %), slezině, kostní dřeni, ale i v kapilárách plic. Předpokládá se, že v RES je amfotericin B postupně uvolněn z vazby na sulfát cholesterolu a uplatňuje se jako volný AmB. Odkud amfotericin B po uvolnění z lipidového nosiče postupně přechází do plazmy, a proto je maximální koncentrace v plazmě oproti AmB-deoxycholátu nižší. Koncentrace v ledvinách je 4–7krát nižší, významně nižší koncentrace jsou také v plicích, v myokardu. Z jater se uvolňuje zpět do plazmy, odtud přechází do ostatních orgánů a RES, kde se koncentruje (slezina, kostní dřev). Vyšší distribuční objem (5–8 l) proti AmB-deoxycholátu odpovídá vyššímu vychytávání v RES. Močí se vylučuje jen 5–10% za 24 hodin. Amphocil je signifikantně méně nefrotoxický než deoxycholát amfotericinu B. Mohou se vyskytnout akutní nežádoucí reakce jako horečka (36 %) a třesavka (55%). Při podávání infuzí byly pozorovány reakce jako hypotenze (11%), tachykardie (9 %), bronchospasmus (2 %), dyspnoe (6 %), hypoxie (5 %), hyperventilace (4 %) a pulmonální edém. Většina akutních reakcí se úspěšně léčí snížením rychlosti infuze a podáním antihistaminik a adrenálních kortikosteroidů. Další nežádoucí účinky jsou trombocytopenie (5 %) a hypomagnezemie (5 %), dále nauzea (9 %), zvracení (7 %), hypertenze (7 %), bolesti hlavy (5 %), bolesti v zádech (3 %), průjem (3 %) a bolesti břicha (2 %). Anémie, která je častým nežádoucím účinkem při léčbě deoxycholátem amfotericinu B, se vyskytuje pouze u 1,8 % pacientů léčených Amphocilem. Cyklosporin A, aminoglykosidy, nefrotoxická cytostatika a jiné nefrotoxické léky zvyšují riziko poškození ledvin i při léčbě ABCD. Doporučená denní dávka je 3–4 mg/kg/den podávaná po dobu nejméně 14 dní^{51,61,62,69,70}.

Abelcet (ABLC) je lipidový komplex amfotericinu B. Vykazuje vyšší selektivní afinitu k ergosterolu fungálních membrán a mnohonásobně menší k cholesterolu membrán savčích buněk. Větší částice ABLC jsou po nitrožilní aplikaci rychleji vychytány RES (kumulace v játrech, slezině, plicích) a odtud se po uvolnění z vazby na lipidový nosič postupně uvolňuje AmB do plazmy. Vysoká afinita k ergosterolu, rychlý odsun z plazmy a nižší maximální koncentrace v krvi jsou podstatou nižší nefrotoxicity^{71,72}. Ve stejných dávkách je 2–4krát méně účinný než konvenční AmB, nižší nefrotoxicita však umožňuje podání vyšších dávek ABLC, ve kterých je účinnější a má vyšší terapeutický index. Výskytem akutních projevů toxicity se od konvenčního amfotericinu B příliš neliší. Při dávce 5 mg/kg ABLC proti 0,6 mg/kg konvenčnímu AmB dosahuje nižší vrcholové plazmatické

koncentrace (1,7 vs 1,1 mikrogramu/ml). Distribuční objem je proti konvenčnímu AmB větší (průměrně 130 vs 5 l/kg), terminální poločas je delší (173 vs 91 hodin), do moči se dostává méně než 1 % podané dávky. Farmakokinetika je nelineární, konečné fáze farmakokinetiky se neliší od konvenčního amfotericinu B. Riziko nefrotoxicity je i při dávce 5 mg/kg menší (cca 28 %) než po AmB v dávce 0,7 mg/kg (47 %). Stupeň nefrotoxicity je závislý na podané dávce^{51,56,61,62,73}.

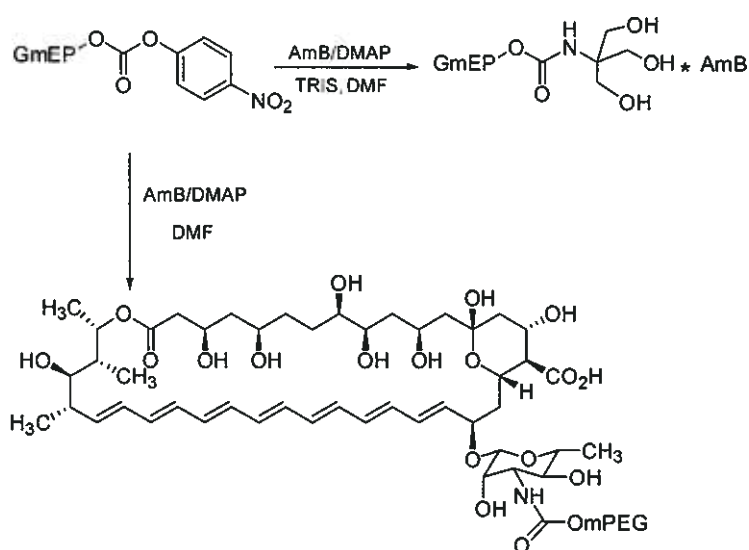
Jako perspektivní alternativa k těmto lipidovým formám AmB se jeví mikroemulze amfotericinu B (např. s lipidovými emulzemi používanými v parenterální výživě, jako je Intralipid aj.), které podobně jako výše uvedené lipidové formy také snižují toxicitu AmB^{74,75,76,77}. Výhodou je nižší cena v porovnání s komerčními lipidovými formami AmB. Nedávno byla vyvinuta nová lipidová forma amfotericinu B, nanodisky na bázi fosfolipidu a apolipoproteinu⁷⁸. Blokované kopolymery poly(ethylenglykolu) s aminokyselinami byly použity jako nosiče k tvorbě micel s amfotericinem B. Takové micely měly o něco nižší antifungální účinnost, ale podstatně menší hemolytickou aktivitu v porovnání s AmB-deoxycholátem^{79,80}. Existuje i řada speciálních lékových forem určených k aplikaci amfotericinu B do tělních dutin, k intrathekální aplikaci aj. Jejich přehled a použití shrnuli Arthur a kol.¹⁰.

Zahřátí roztoku amfotericinu B po dobu 20 minut na 70 °C a následné ochlazení na pokojovou teplotu vede ke změně agregace molekul, což má za následek změnu fyzikálně-chemických vlastností⁸¹. Tato finančně nenáročná úprava neovlivňuje antifungální aktivitu amfotericinu B, významně však snižuje jeho toxicitu vůči savčím buňkám⁸². Pokles toxicity je pravděpodobně způsoben nižší schopností upraveného amfotericinu B indukovat produkci cytokinů a chemokinů⁸³.

3.2.5. Konjugáty amfotericinu B s polymerními nosiči

Příprava konjugátů léčiv s přírodními nebo syntetickými polymery patří k progresivním směrům dnešní farmaceutické chemie. Vazbou na hydrofilní polymer lze řešit některé nedostatky, bránící využití biologicky aktivních látek, jako je např. vysoká toxicita, nevhodný farmakokinetický profil, problematické fyzikálně-chemické vlastnosti (např. špatná rozpustnost ve vodě). Polymerní nosiče léčiv musí splňovat některé požadavky (musí být netoxické, neimunogenní a schopné eliminace

z organismu). Vazba léčivo-polymer musí být degradabilní enzymaticky nebo hydrolyticky. Takovými vhodnými makromolekulami jsou např. poly(ethylenglykoly) (PEG), protože mají vlastnosti vhodné pro farmaceutické použití: minimální toxicita, příznivá farmakokinetika, snadná eliminace ledvinami. Navíc jsou neimunogenní, neantigenní a příznivě ovlivňují farmakodynamiku a farmakokinetiku léčiv na ně navázaných^{84,85}. Ve spolupráci Farmaceutické fakulty UK a Univerzity Pardubice jsou intenzivně studovány polymerní konjugáty amfotericinu B, které by mohly mít podobně jako lipidové formy pozměněnou farmakokinetiku a sníženou toxicitu. Jako první byl syntetizován konjugát amfotericinu B s methoxypoly(ethylenglykolem). V něm je AmB částečně (z 50 %) navázán prostřednictvím kovalentní karbamátové vazby a zbytek je vázán pomocí nekovalentních interakcí.

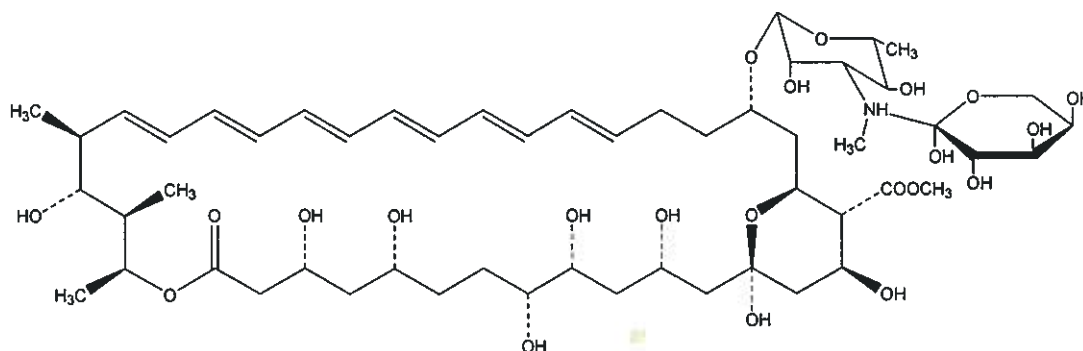


Tento konjugát je dobře rozpustný ve vodě, srovnatelně toxický jako AmB-deoxycholát používaný v terapii, ale *in vitro* je několikanásobně účinnější proti většině testovaných kmenů hub^{86,87}. Podobných výsledků bylo později dosaženo v zahraničí u konjugátů amfotericinu B s poly(ethylenglykoly), obsahujících v molekule spojovací články mezi léčivem a polymerem^{85,88}, a také u konjugátů amfotericinu B s polysacharidy^{89,90}. Na Farmaceutické fakultě UK jsou v současné době připravovány další konjugáty amfotericinu B s modifikovanými poly(ethylenglykoly), obsahující odbouratelné spojky mezi polymerem a léčivem.

3.2.6. Semisyntetické obměny amfotericinu B

Během výzkumu polyenových antibiotik a jejich derivátů bylo zjištěno, že monomery amfotericinu B mají větší selektivitu k ergosterolu ve srovnání s rozpustnými agregáty^{21,36}. Dimery tedy snižují selektivitu ke sterolům. Z těchto poznatků vyplynulo, že chemické modifikace, které snižují schopnost dimerizace, by měly zlepšit selektivní toxicitu polyenových makrolidů.

Podrobné studie na derivátech polyenových antibiotik ukázaly, které strukturální prvky v molekule polyenových antibiotik jsou nezbytné pro antifungální aktivitu. Je nutná přítomnost aminoskupiny mykosaminu, aby byla zachována schopnost tvořit vodíkové můstky, které jsou důležité pro stabilizaci kanálu. Dále musí molekula nést optimální náboj, aby nedocházelo k tvorbě velkých shluků. Bylo zjištěno, že substitucí exocyklického karboxylu lze dospět k derivátům, které mají podstatně nižší afinitu k cholesterolu a vyšší rozpustnost ve vodě v porovnání s AmB, ale stejný nebo jen nepatrně menší antifungální účinek. Z těchto studií vyplynul jako nadějná látka methylester *N*-Methyl-*N*-D-fruktosylamfotericinu B (MFAME) který je dobře rozpustný ve vodě, srovnatelně účinný s AmB-deoxycholátem, ale méně toxický^{91,92,93, 94,95}.



methylester *N*-Methyl-*N*-D-fruktosylamfotericinu B

3.2.7. Jiné biologické účinky amfotericinu B

Kromě antifungální aktivity vykazuje amfotericin B i jiné účinky. V kombinaci s tetracyklinem se používá při léčbě chlorelózy, pseudofungální infekce způsobené řasou *Chlorella vulgaris*^{96,97}. Je účinný i u některých protozoálních infekcí, např. viscerální leishmaniázy (kala-azar, těžké onemocnění vyvolané prvoky rodu *Leishmania*). V této indikaci je však kvůli své toxicitě využíván jako léčivo 2. linie. Méně toxické lipidové formy AmB jsou sice lépe tolerovány, ale pro obyvatele rozvojových zemí jsou cenově nedostupné^{98,99}. Jisté řešení by mohlo přinést používání tepelně upraveného amfotericinu B¹⁰⁰. Nedávno byla vyvinuta nanosuspenze AmB, umožňující perorální podání amfotericinu B. Silná adheze ke gastrointestinální sliznici umožňuje vstřebání amfotericinu B¹⁰¹. Tento výsledek se jeví jako velmi zajímavý, protože naznačuje, že v budoucnu by mohla být nalezena perorální forma amfotericinu B i pro antifungální terapii.

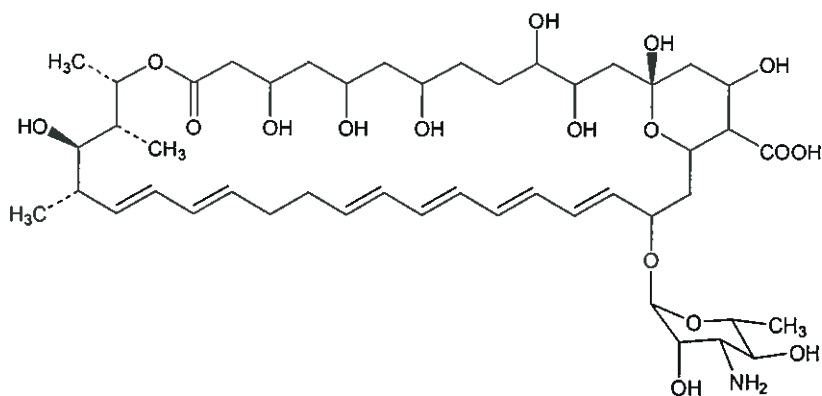
Již v 70. letech bylo zjištěno, že AmB a jeho deriváty (např. methylester) inhibují proliferaci virů s lipidovým obalem (např. herpesviry, viry způsobující vesikulární stomatitidy)². Po vypuknutí epidemie HIV/AIDS bylo potvrzeno, že AmB a jeho deriváty mohou inhibovat replikaci HIV virů *in vitro*. Polyenová antibiotika inhibují replikaci viru HIV v takových koncentracích, které ještě neovlivňují životaschopnost buněk, a proto by mohla přispět k novým možnostem terapie AIDS^{102,103,104}.

Bylo zjištěno, že podání AmB může prodloužit inkubační dobu prionových onemocnění tím, že zpomaluje replikaci prionů. Prionové nákazy se vyznačují hromaděním abnormálních zbytků isoform prionových proteinů PrPSc v mozku. Na rozdíl od normálního proteinu je tato isoforma rezistentní k proteinkináze K a je nerozpustná. Prionové nákazy mají za následek fatální neurodegenerativní poruchy, např. spongiformní encefalopatie (transmissible spongiform encephalopathies, TSE). Experimenty *in vitro* ukázaly, že AmB v nízkých koncentracích zlepšuje rozpustnost a snižuje proteázovou rezistenci PrPSc. I pozdní podání AmB může výrazně prodloužit přežití TSE-infikovaných zvířat. Toxicita AmB sice brání jeho používání v této indikaci, ale mohly by být využity některé méně toxické deriváty AmB^{2,105,106,107}.

V souvislosti s nálezem vysoké afinity amfotericinu B k 7-dehydrocholesterolu byla nedávno navržena možnost využití polyenových antibiotik v terapii hepatocelulárního karcinomu po předchozím podávání diety bohaté na cholesterol, která by měla zablockovat biosyntézu cholesterolu ve zdravých buňkách. Protože rakovinné buňky postrádají regulaci biosyntézy cholesterolu, mohou se v jejich membránách hromadit po podání vhodných inhibitorů biosyntézy cholesterolu jeho prekurzory (7-dehydrocholesterol), a následně podaná polyenová antibiotika by měla rakovinné buňky selektivně likvidovat³³.

3.3. NYSTATIN

Nystatin byl objeven v r. 1950 jako první z polyenových antibiotik¹⁰⁸. Řadí se mezi tetraeny. Působí stejným mechanismem účinku jako amfotericin B. Kvůli vyšší toxicitě (nefrotoxicita, hemolýza) bylo donedávna jeho použití omezené jen na lokální aplikaci^{2,66}.



Nystatin A₁

V poslední době byla však také u nystatinu vyvinuta liposomální forma pod názvem Nyotran. V ní je nystatin inkorporován do multilamelárních liposomů a v této formě je méně toxický pro obratlovce. Má široké spektrum účinku proti řadě hub (viz tab. 1), včetně kmenů rezistentních na amfotericin B nebo azoly. Proto může použití liposomálního nystatinu vést k úspěchu u pacientů, kteří nesnášejí terapii amfotericinem B nebo u kterých amfotericin B není účinný^{66,109,110,111,112,113,114,115,116}. V poslední době byly vyvinuty pH-senzitivní liposomy s obsahem nystatinu,

které cíleně uvolňují léčivo při nižším pH v lysosomech. Tímto způsobem bylo dosaženo vyšší účinnosti v modelu myší kryptokokózy *in vivo*¹¹⁷.

Nedávno byly připraveny micely nystatinu s blokovými kopolymery. Podobně jako u amfotericinu B, i zde byl zjištěn pokles hemolytické aktivity¹¹⁸.

Nystatin inhiboval replikaci viru HIV v koncentracích nižších než jsou cytotoxické, a to účinněji než amfotericin B či AZT¹¹⁹.

Nové možnosti v oblasti polyenových antibiotik se otevírají také díky genovým manipulacím. Nedávno byl takto připraven antifungálně aktivní hexaenový analog nystatinu¹²⁰.

4. DISKUSE A ZÁVĚR

V rámci předložené bakalářské práce jsem provedla rozsáhlou rešerši týkající se polyenových antibiotik. Shromáždila jsem velké množství dat týkajících se jejich izolace, struktury, fyzikálně-chemických vlastností, spektrálních dat, biologické aktivity, toxicity, strukturních modifikací aj. Vzhledem k omezenému rozsahu bakalářské práce jsem ze získaných literárních údajů vybrala a zpracovala zejména informace týkající se polyenových antibiotik používaných v současné době v terapii systémových mykóz, tj. amfotericinu B a nystatinu. Soustředila jsem se především na informace týkající se struktury, mechanismu účinku, antifungální aktivity, toxicity a jiných biologických aktivit s perspektivou využití v humánní terapii. I přes zařazení nových léčiv do terapie těžkých invazivních mykóz v poslední době (nové azoly, kaspofungin) si amfotericin B zachovává důležitou pozici při léčbě těchto onemocnění. Proto zůstává v centru zájmu výzkumných týmů v ČR i ve světě. Ke snížení jeho toxicity a zlepšení biologické dostupnosti byly zavedeny do terapie jeho lipidové formy. Jsou hledány jak nové micelární formy AmB, tak i další možnosti, jako např. syntéza kovalentních konjugátů amfotericinu B s poly(ethylenglykoly) nebo s polysacharidy. Byly připraveny polosyntetické obměny amfotericinu B s výhodnějšími vlastnostmi a nižší toxicitou. Jsou hledány možnosti využití AmB v terapii dalších onemocnění. Nedávno byla nalezena perorální léková forma AmB, která díky silné adhezi ke stěně GIT umožňuje vstřebávání AmB přes intestinální sliznici a redukuje napadení jater při leishmanióze. Není tedy vyloučeno, že bude časem dosaženo perorální lékové formy jak pro léčbu leishmaniózy, tak i pro léčbu systémových mykóz.

V poslední době byla zavedena do terapie také lipozomální forma nystatinu. Nystatin může být vzhledem k poněkud odlišnému spektru účinku využíván při léčbě systémových mykóz vyvolaných kmeny rezistentními na amfotericin B nebo u pacientů, kteří nesnášejí terapii amfotericinem B. Také u nystatinu jsou vyvíjeny nové lékové formy a konjugáty s makromolekulárními nosiči.

5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1 Buchta V., Jílek P., Horáček J., Horák V.: Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty. 1.vydání, Praha, Karolinum, 1998.
- 2 Zotchev S. B.: Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy. *Curr. Med. Chem.*, 2003, 10, 211–223.
- 3 Glasmacher A., Prentice A. G.: Evidence - based review of antifungal prophylaxis in neutropenic patients with haematological malignancies. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2005, 56 (suppl. S1), i23–i32. ✓
- 4 Blot S., Vandewoude K.: Management of invasive candidiasis in critically ill patients. *Drugs*, 2004, 64, 2159–2175. ✓
- 5 Wong-Beringer A., Kriengkauykiat J.: Systemic antifungal therapy: new options, new challenges. *Pharmacotherapy*, 2003, 23, 1441–1462.
- 6 Edmond M. B., Wallace S. E., McClish D. K., et al.: Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin. Infect. Dis.*, 1999, 29, 239–244. ✓
- 7 Prabhu R. M., Patel R.: Mucormycosis and entomophthoromycosis: a review of the clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2004, 10 (Suppl. 1), 31. 47
- 8 Eucker J., Sezer O., Graf B., Possinger K.: Mucormycoses. *Mycoses*, 2001, 44, 253. -260
- 9 Kerr O. A., Bong C., Wallis C., Tidman M. J.: Primary cutaneous mucormycosis masquerading as pyoderma gangrenosum. *Brit. J. Dermatol.*, 2004, 150, 1212. -213
- 10 Arthur R. R., Drew R. H., Perfect J. R.: Novel modes of antifungal drugs administration. *Exp. Opin. Investig. Drugs*, 2004, 13, 903–932.
- 11 Wingard J. R., Leather H.: A new era of antifungal therapy. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2004, 10, 73–90. ✓
- 12 Baddley J. W., Pappas P. G.: Antifungal combination Therapy. *Drugs*, 2005, 65, 1461–1480. ✓ - clinical potential
- 13 Boucher H. W., Groll A. H., Chiou Ch. C., Walsh T. J.: Newer systemic antifungal agents. Pharmacokinetics, safety and efficacy. *Drugs*, 2004, 64, 1997–2020. ✓

- 14 McCormack P. L., Perry C. M.: Caspofungin. A review of its use in the treatment of fungal infections. *Drugs*, 2005, 65, 2049–2068.
- 15 Girois S. B., Chapuis F., Decullier E., Revol B. G. P.: Adverse effects of antifungal therapies in invasive fungal infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2005, 24, 119–130.
- 16 Mandell G. L.; Petri W. A., Jr.: In: Goodman and Gilman's. *The Pharmacological basis of therapeutics*; Hardman J. G., Limbird L. E. (Eds.) McGraw-Hill, New York, 1996, s. 1175- 1190.
- 17 Carillo-Munoz A. J., Quindós G., Lopez-Ribot J. L.: Current development in Anti-fungal agents. *Curr. Med. Chem. – Anti-infec. Agents*, 2004, 3, 297–323.
- 18 Melichar B. et al.: *Chemická léčiva. 3. přepracované vydání*, Avicenum, Praha 1987.
- 19 Gill J. A., Martín J. F.: Polyene Antibiotics. In: Strohl WR (ed) *Biotechnology of antibiotics*, 2. vyd. Marcel Dekker, New York, 551–575.
- 20 Georgiev V. S.: Membrane transporters and antifungal drug resistance. *Curr. Drug Targets*, 2000, 1, 261–284.
- 21 Cybulska B., Mazerski J., Borowski E., Gary-Bobo C. M.: Structure-activity relationships in aromatic heptaenes – a group of polyene macrolide antifungal antibiotics. *Tag.-Ber. Akad. Landwirtsch. Wiss. DDR*, 1984, 222, 299–307.
- 22 Thoma K., Kübler N.: New results in the photoinstability of antimycotics. In: *Drugs: Photochemistry and Photostability*. Albini A., Fasani E. (Eds.), RSC, Cambridge, 1998, s. 116-133.
- 23 Gutteridge J. M. C., Thomas A. H., Cuthbert A.: Free radical damage to polyene antifungal antibiotics: Changes in biological activity and thiobarbituric acid reactivity. *J. Appl. Biochem.*, 1983, 5, 53–58.
- 24 Abu-Salah K. M.: Amphotericin B: an update. *Brit. J. Biomed. Sci.*, 1996, 53, 122–133.
- 25 Gruszecki W. I., Gagos M., Herec M.: Dimers of polyene antibiotic amphotericin B detected by means of fluorescence spectroscopy: molecular organization in solution and in lipid membranes. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2003, 69, 49–57.

- 26 Milhaud J., Ponsinet V., Takashi M., Michels B.: Interactions of the drug amphotericin B with phospholipid membranes containing or not ergosterol: new insight into the role of ergosterol. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes*, 2002, 1558, 95–108.
- 27 Zhao X., Calderone R. A.: Antifungals currently used in the treatment of invasive fungal diseases. In: *Fungal pathogenesis - Principles and clinical applications*. Calderone, R. A., Cihlar, R. L. (Eds.) Marcel Dekker, New York, 2002, s. 559–577.
- 28 Fischer P. B., Bryson V., Schaffner C. P.: Polyene macrolide antibiotik cytotoxicity and membrane permeability alterations. *J. Cell. Physiol.*, 1979, 100, 335–342.
- 29 Knopik-Skrocka A., Bielawski J.: The mechanism of the hemolytic activity of polyene antibiotics. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2002, 7, 31–48.
- 30 Siegel E. B.: Measurement of polyene antibiotic-mediated erythrocyte damage by release of hemoglobin and radioactive chromium. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1977, 11, 675–678.
- 31 Ellis D.: Amphotericin B: spektrum and resistance. *J. Antomicrob. Chemother.*, 2002, 49 (Suppl. S1), 7–10.
- 32 Baginski A., Resat H., Borowski E.: Comparative molecular-dynamics simulations of amphotericin B-cholesterol/ergosterol membrane channels. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, 1567, 63–78.
- 33 Charbonneau C., Fournier I., Dufresne S., Barwicz J., Tancrede P.: The interactions of amphotericin B with various sterols in relation to its possible use in anticancer therapy. *Biophys. Chem.*, 2001, 91, 125–133.
- 34 Matsumori N., Eiraku N., Matsuoka S., Oishi T., Murata M., Aoiki T., Ide T.: An amfotericin B-ergosterol covalent conjugate with powerful membrane permeabilizing activity. *Chem. Biol.*, 2004, 11, 673–679.
- 35 Paquet M.-J., Fournier I., Barwicz J., Pierre T., Auger M.: The effects of amphotericin B on pure and ergosterol- or cholesterol-containing dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers as viewed by ^2H NMR. *Chem. Phys. Lipids*, 2002, 119, 1–11.

- 36 Bolard J., Legrand P., Heitz F., Cybulska B.: One-sided action of Amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium. *Biochemistry*, 1991, 30, 5707–5715.
- 37 Volpon L., Lancelin J. M.: Solution NMR structure of five representative glycosylated polyene macrolide antibiotics with a sterol-dependent antifungal activity. *Eur. J. Biochem.*, 2002, 269, 4533–4541.
- 38 Ridente Y., Aubard J., Bolard J.: Absence in amphotericin B-spiked human plasma of the free monomeric drug, as detected by SERS. *FEBS Lett.*, 1999, 446, 283–286.
- 39 Barwicz J., Christian S., Gruda I.: Effects of the aggregation state of amphotericin B on its toxicity to mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1992, 36, 2310–2315.
- 40 Matsuoka S., Matsumori N., Murata M.: Amphotericin B-phospholipid covalent conjugates: dependence of membrane permeabilizing activity on acyl-chain length. *Org. Biomol. Chem.*, 2003, 1, 3882–3884.
- 41 Kerridge D., Fasoli M., Wayman F. J.: Drug resistance in *Candida albicans* and *candida glabrata*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1988, 544, 245–259.
- 42 Nivoix Y., Zamfir A., Lutun P., Kara F., Remy V., Lioure B., Rigolot J.C., Entz-Werlé N., Letscher-Bru V., Waller J., Levêque D., Koffel J.C., Beretz L., Herbrecht R.: Combination of caspofungin and an azole or an amphotericin B formulation in invasive fungal infections. *J. Infect.*, 52, 67-74.
- 43 Canuto M. M., Rodero F. G.: Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Lacent Infect. Dis.*, 2002, 2, 500-563.
- 44 Mukherjee M., Chakravarty A. K., Sengupta S.: Natural resistance of the mycelia culture of the mushroom, *Panaeolus papillonaceus*, towards growth inhibition by polyene antibiotics. *Curr. Mikrobiol.*, 1993, 27, 1–4.
- 45 Whyte B. S., Peterson R. P., Hartsel S. C.: Amphotericin B and Nystatin show different activities on sterol-free vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, 164, 609–614.
- 46 Broughton M. Ch., Bard M., Lees N. D.: Polyene resistance in ergosterol producing strains of *Candida albicans*. *Mycoses*, 1991, 34, 75–83.

-
- 47 Mukhtar H., Hakkou A., Bonaly R.: Studies on activity of *Kluyveromyces lactis* s-adenosylmethionine: 24-sterol methyltransferase in presence of polyenic antifungal agents. *Mycopathologia*, 1994, 126, 75–83.
 - 48 Seo K., Akiyoshi H., Ohnishi Y., Alteration of cell wall composition leads to amphotericin B resistance in *Aspergillus flavus*. *Microbiol. Immunol.*, 1999, 43(11), 1017–1025.
 - 49 Agarwal A. K., Rogers P. D., Baerson S. R., Jakob M. R., Barker K. S., Cleary J. D., Walker L. A., Nagle D. G., Clark A. M.: Genome-wide expression profiling of the response to polyene, pyrimidine, azole, and echinocandin antifungal agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 34998–35015.
 - 50 Kerridge D., Nicholas R. O.: Drug resistance in the opportunistic pathogens *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1986, 18 (Suppl. B), 39–49.
 - 51 Mikro - verze AISLP ČR, 18.2.2005.
 - 52 Girois S. B., Chapuis F., Decullier E., Revol B. G. P.: Adverse effects of antifungal therapies in invasive fungal infections: review and meta-analysis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2005, 24, 119–130.
 - 53 Rogers P. D., Pearson M. M., Cleary J. D., Sullivan D. C., Chapman S. W.: Differential expression of genes encoding immunomodulatory proteins in response to amphotericin B in human mononuclear cells identified by cDNA microarray analysis. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2002, 50, 811–817.
 - 54 Cleary J. D., Rogers P. D., Chapman S. W.: Variability in polyene content and cellular toxicity among deoxycholate amphotericin B formulations. *Pharmacotherapy*, 2003, 23 (5), 572–578.
 - 55 Harbarth S., Pestotnik S. L., Lloyd J. F., Burke J. P., Samore M. H.: The epidemiology of nephrotoxicity associated with conventional amphotericin B therapy. *Am. J. Med.*, 2001, 111, 528–534.
 - 56 Wali R. K., Henrich W. L.: Recent developments in toxic nephropathy. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 2002, 11, 155–163.
 - 57 Inselmann, G., Inselmann, U., Heidemann, H. T.: Amphotericin B and liver function. *Eur. J. Int. Med.*, 13, 2002, 288–292.

- 58 Stuecklin-Utsch, A., Hasan, C., Bode, U., Fleischhack, G.: Pancreatic toxicity after liposomal amphotericin B. *Mycoses*, 45, 2002, 170–173.
- 59 Imhof A., Walter R. B., Schaffner A.: Continuous infusion of escalated doses of amphotericin B deoxycholate: An open-label observation study. *Clin. Infect. Dis.*, 2003, 36, 943–951.
- 60 Foote, R. H.: Spermicidal effects of amphotericin B and nystatin on bull and rabbit sperm and contraceptive effects in rabbits. *Contraception*, 2002, 66, 193–197.
- 61 Agatha W. K. Ng, Wasan K. M.: Development of liposomal polyene antibiotics: an historical perspective. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 2003, 6, 67–83.
- 62 Adler-Moore J. P., Proffitt R. T.: Novel drug delivery systems for antifungal agents. In: *The Mycota 12*, Dömer J. E., Kobayashi G. S. (Eds.). Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, SRN, 2004. *XII Human Fungal Pathogenesis* p. 339
- 63 Barrett J. P., Vardulaki K. A., Conlon C., Cooke J., Daza-Ramirez P., Evans E. G. V., Hawkey P. M., Herbrecht R., Marks D. I., Moraleda J. M., Park G. R., Senn S. J., Viscoli C.: A systematic review of the antifungal effectiveness and tolerability of amphotericin B formulations. *Clin. Therap.*, 2003, 25, 1295–1320. ISBN 3540 42629 9
- 64 Arian S., Rex J. H.: New agents for the treatment of systemic fungal infections – current status. *Expert Opin. Emerg. Drugs*, 2002, 7, 3–32.
- 65 Dupont B.: Overview of the lipid formulations of amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2002, 49 (Suppl. S1), 31–36.
- 66 Maesaki S.: Drug delivery system of Anti-fungal and parasitic agents. *Curr. Pharm. Des.*, 2002, 8, 433–440.
- 67 Ritter J.: Amphotericin B and its lipid formulations. *Mycoses*, 2002, 45 (Suppl.3), 34–38.
- 68 Tomii Y.: Lipid formulation as a drug carrier for drug delivery. *Curr. Pharm. Des.*, 2002, 8, 467–474.
- 69 Bowden R., Chandrasekar P., White M. H., Li X., Pietrelli L., Gurwith M., J.-A. van Burik, Laverdiere M., safrin S., Wingard j. R.: A double-blind, randomized, controlled trial of amphotericin B colloidal dispersion versus

-
- amphotericin B for treatment of invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Clin. Infect. Dis.*, 2002, 35, 359–366.
- 70 Adams M. L., Andres D. R., Kwon G. S.: Amphotericin B encapsulated in micelles based poly(ethylene oxide)-block-poly(L-amino acid)derivatives exerts reduced in vitro hemolysis but maintains potent in vivo antifungal activity. *Biomacromolecules*, 2003, 4, 750–757.
- 71 Slain D., Miller K., Khakoo R., Fischer M., Wierman T., Jozefczyk K.: Infrequent occurrence of amphotericin B lipid komplex-associated nephrotoxicity in various clinical settings at a university hospital: a retrospective study. *Clin. Ther.*, 2002, 24, 1636–1642.
- 72 Guo L. S. S.: Amphotericin B colloidal dispersion: an improved antifungal therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, 47, 149–163.
- 73 Trouet A.: The amphotericin B lipid komplex or abelcet: its Belgian connection, its mode of action and specificity: a review. *Acta Clin. Belg.*, 2002, 53–57.
- 74 Egito E. S. T., Araújo I. B., Price J. C.: Amphotericin B/emulsion admixture interactions: An approach concerning the reduction of amphotericin B toxicity. *J. Pharm. Sci.*, 2002, 91, 2354–2366.
- 75 Esposito E., Bortolotti F., Menegatti E., Cortesi R.: Amphiphilic association systemes for amphotericin B delivery. *Int. J. Pharm.*, 2003, 260, 249–260.
- 76 Brime B., Molero G., Frutos P., Frutos G.: Comparative therapeutic efficacy of a novel lyophilized amphotericin B lecitin-based-oil-water microemulsion and deoxycholate-amphotericin B on immunocompetent and neutropenic mice infected with *Candida albicans*. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2004, 22, 451–458.
- 77 Fukui H., Koike T., Sonoke S., Seki J.: A novel delivery system for amphotericin B with lipid nano-sphere (LNS). *Int. J. Pharm.*, 2003, 265, 37–45.
- 78 Hargreaves P. L., Nguyen T.-S., Ryan R. O.: Spectroscopic studies of amphotericin B solubilized in nanoscale bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, 1758, 38–44.
- 79 Adams M. L., Kwon G. S.: Relative aggregation state and hemolytic activity of amphotericin B encapsulated by poly(ethylene oxide)-block-poly(N-hexyl-L-

-
- aspartamide)))-acyl conjugate micelles. Effects of acyl Chin length. *J. Controll. Rel.*, 2002, 87, 23–32.
- 80 Vandermeulen G., Rouxhet L., Arien A., Brewster M. E., Pr at V.: Encapsulation of amphotericin B in poly(ethylene glykol-block-poly(ϵ -caprolactone-co-trimethylenecarbonate)) polymeric micelles. *Int. J. Pharm.*, 2006, 309, 234–240.
- 81 Gaboriau F., Cheron M., Leroy L., Bolard J.: Physico-chemical properties of the heat-induced „superaggregates“ of amfotericin B. *Biophys. Chem.*, 1997, 66, 1–12.
- 82 Dannaoui E., Meis J. F. G. M., Mouton J. W., Verweij P. E., Network E.: In vitro susceptibilities of Zygomycetes to polyenes. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2002, 49, 741–744.
- 83 Rogers P. D., Barker K. S., Herring V., Jacob M.: Heat-induced superaggregation of amphotericin B attenuates its ability to induce cytokine and chemokine production in the human monocytic cell line THP-1. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2003, 51, 405–408.
- 84 Greenwald, R. B.: PEG drugs: an overview. *J. Controlled Release*, 2001, 74, 159–171.
- 85 Greenwald R. B., Choe Y. H., McGuire J., Conover Ch. D.: Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2003, 55, 217–250.
- 86 Sedl ak M., Buchta V., Kubicov a L., ˇSimunek P., Hol apek M., Kašparov a P.: Synthesis and characterisation of a new amphotericin B-methoxypoly(ethylene glycol) conjugate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, 11, 2833–2835.
- 87 Kubicov a L.:  stn  sd len .
- 88 Conover Ch. D., Zhao H., Longley C. B., Shum K. L., Greenwald R. B.: Utility of poly(ethylene glycol)conjugation to create prodrugs of amphotericin B. *Bioconj. Chem.*, 2003, 14, 661–666.
- 89 Ehrenfreund-Kleinman T., Azzam T., Falk R., Polacheck I., Golenser J., Domb A. J.: Synthesis and characterization of novel water soluble amphotericin B-arabinogalactan conjugates. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2003, 55, 217–250.

- 90 Ehrenfreund – Kleinman T., Golenser J., Domb A. J.: Conjugation of amino-containing drugs to polysaccharides by tosylation: amphotericin B – arabinogalactan conjugates. *Biomaterials*, 2004, 25, 3049–3057.
- 91 Cybulska B., Kupczyk K., Szlinder-Richert J., Borowski E.: Comparative *in vitro* studies on liposomal formulations of amphotericin B and its derivative, *N*-methyl-*N*-D-fructosyl amphotericin B methyl ester (MFAME). *Acta Biochim. Pol.*, 2002, 49, 66–75.
- 92 Szlinder-Richert J., Cybulska B., Grzybowska J., Bolard J., Borowski E. : Interaction of amphotericin B and its low toxic derivative, *N*-methyl-*N*-D - fructosyl amphotericin B methyl ester, with fungal, mammalian and bacterial cells measured by the energy transfer method. *Farmacologia*, 2004, 59, 289–296.
- 93 Szlinder-Richert J., Mazerski J., Cybulska B., Grzybowska J., Borowski E.: MFAME, *N*-methyl-*N*-D-fructosyl amphotericin B methyl ester, a new amphotericin B derivative of low toxicity: relationship between self-association and effects on red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, 1528, 15–24.
- 94 Bruzzese T., Cambieri m., Recusani F.: Synthesis and biological properties of alkyl esters of polyene antibiotics. *J. Pharm. Sci.*, 1975, 64, 164–463.
- 95 Schaffner C. P., Borowski E.: Biologically active *N*-acyl derivatives of polyene macrolide antifungal antibiotics. *Antibiot. Chemother.*, 1961, 11, 724–726
- 96 Malewicz B.: The effect of the chemical structure of polyene macrolides on the permeability of the *Chlorella vulgaris* plasma membrane. *Oceanology*, 1975, 19–33.
- 97 Pfaller M. A., Diekema D. J.: Unusual fungal and pseudofungal infections of humans. *J. Clin. Mikrobiol.*, 2005, 43, 1495–1504.
- 98 Guerin P. J., Olliaro P., Sundar S., Boelaert M., Croft S. L., Desjeux P., Wasunna M. K., Bryceson A. D. M.: Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect. Dis.*, 2002, 2, 494–501.
- 99 Dilber E., Erduran e., Isik Y.: Visceral leishmaniasis and Coomb's positive hemolytic anemia: a rare association in an infant treated with liposomal amphotericin B. *Turk. J. Pediatrics*, 2002, 44, 354–356.
- 100 Bau P., Bolard J., Dupouy-Camet J.: Heated amphotericin to treat leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.*, 2003, 3, 188.

-
- 101 Kayser O., Olbrich C., Yardley V., Kiderlen A. F., Croft S. L.: Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration. *Int. J. Pharm.*, 2003, 254, 73–75.
 - 102 Konopka K., Guo L. S. S.: Anti-HIV activity of amphotericin B-cholesteryl sulfate colloidal dispersion in vitro. *Antivir. Res.*, 1999, 42, 197–209.
 - 103 Malewicz B., Momsen m., Jenkin H. M., Borowski E.: Potentiation of antiviral activity of acyclovir by polyene macrolide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1984, 25, 772–774.
 - 104 Magierowska-Jung M., Cefai D., Marrakchi H., Chieze F., Agut H., Huraux J.-M., Seman M.: In vitro of antiviral activity of MS8209, a new amphotericin B derivative, against primary isolates of HIV1. *Res. Virol. Paris*, 1996, 147, 313–318.
 - 105 Grigoriev V. B., Adjou K., Sales N., Simoneau S., Deslys J.-P., Seman M., Dormont D., Fournier J.-G.: Effects of polyene antibiotic derivative MS-8209 on the astrocyte lysosomal system of scrapie-infected hamsters. *J. Mol. Neurosci.*, 2002, 18, 271–281.
 - 106 Adjou K. T., Demaimay R., Lasmezas C., Deslys J.-P., Seman M., Dormont D.: MS-8209, a new amphotericin B derivative, provides enhancer efficacy in delaying hamster scrapie. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1995, 39, 2810–2812.
 - 107 Xi Y. G., Ingrosso L., Ladogana A., Masullo C., Pocchiari M.: Amphotericin B treatment dissociated in vivo replication of the scrapie agent from PrP accumulation. *Nature*, 1992, 386, 598–601.
 - 108 Hazen E. L., Brown R.: Two antifungal agents produced by a soil actinomycete. *Science*, 1950, 112, 423.
 - 109 Moribe K., Maruyama K., Iwatsuru M.: Encapsulation characteristics of nystatin in liposomes: effects of cholesterol and polyethylene glycol derivatives. *Int. J. Pharm.*, 188, 1999, 193–202.
 - 110 Coutinho A., Prieto M.: Cooperative partition model of nystatin interaction with phospholipid vesicles. *Biophys. J.*, 2003, 84, 3061–3078.

-
- 111 Milhaud J., Berrehar J., Lancelin J. M., Michels B., Raffard G., Dufourc E.J.: Association of polyene antibiotics with cholesterol free-membranes II. Hydrophobic binding of nystatin to dilauroylphosphatidylcholine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1997, 1326, 54–66.
- 112 Moribe K., Maruyama K., Iwatsuru M.: Spectroscopic investigation of the molecular state of nystatin encapsulated in liposomes. *Int. J. Pharm.*, 2000, 201, 37–49.
- 113 Quindós G., Carillo-Munoz A. J., Ruesga M. T., Alonso-Vargas R., Miranda Y., Tur-Tur C., Rubio M., Wallace T. L., Cossum P. A., Martín-Mazuelos E., Cisterna R., Pontón J.: In vitro activity of a new liposomal nystatin formulation against opportunistic fungal pathogens. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2000, 19, 645–648.
- 114 Hossain M. A., Reyes G. H., Ghannoum M. A.: Newer antifungals agents and treatment strategies. *Rev. Med. Microbiol.*, 2001, 12 (Suppl1), S3–S12.
- 115 Wang M. M., Sugar I. P., Chong P. L.: Role of the sterol superlattice in the partitioning of the antifungal drug nystatin into lipid membranes. *Biochemistry*, 1998, 37, 11797–11805.
- 116 Offner F., Krcmery V., Boogaerts M., Doyen Ch., Engelhard D., Ribaud P., Cordonnier C., Pauw B., Durrant S., Marie J.-P., Moreau P., Guiot H., Samonis G., Sylvester R., Herbrecht R., and the EORTC Invasive Fungal Infections Group†: Liposomal nystatin in patients with invasive aspergillosis refractory to or intolerant of amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 4808–4812.
- 117 Nasti T. H., Khan M. A., Owais M.: Enhanced efficacy of pH-sensitive nystatin liposomes against *Cryptococcus neoformans* in murine model. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2006, 57, 349–352.
- 118 Bong G. Yu.: The aggregation state and hemolytic activity of nystatin. *J. Kor. Pharm. Sci.* 2001, 31, 1–5.
- 119 Selvam M. P., Blay R. A., Geyer S., Buck S. M., Pollock L., Mayner R. E., Epstein J. S.: Inhibition of HIV-1 replication in H9 cells by nystatin-A compared with other antiviral agents. *AIDS REs. Human Retrovir.*, 1993, 9, 475–481.

-
- 120 Brautaset T., Bruheim P., Sletta H., Hagen L., Ellingsen T. E., Strøm A. R., Valla S., Zotchev S. B.: Hexaene derivatives of nystatin produced as a result of an induced rearrangement within the NysC polyketide synthase gene in *S. noursei* ATCC 11455. Chem. Biol., 2002, 9, 367–373.