

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo galénico de nuevas formulaciones de anfotericina
B**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alicia López Sánchez

Directores

Santiago Torrado Durán
Susana Torrado Durán

Madrid
Ed. electrónica 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria



DESARROLLO GALÉNICO DE
NUEVAS FORMULACIONES DE
ANFOTERICINA B

TESIS DOCTORAL
ALICIA LÓPEZ SÁNCHEZ

Directores

Santiago Torrado Durán

Susana Torrado Durán

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado y han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

Al Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria y, en especial, a Santiago y Susana Torrado, por la dirección de este trabajo y por su ayuda y dedicación.

A mi familia, por su apoyo incondicional.

DEDICADO A:
Mis padres y Javi.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	11
SUMMARY	19
INTRODUCCIÓN	27
OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO	51
CAPÍTULO I: ESTUDIO FARMACOTÉCNICO	55
CAPÍTULO II: ESTUDIO DE ESTABILIDAD	93
CAPÍTULO III: ESTUDIO EN DOSIS ÚNICA	139
CAPÍTULO IV: ESTUDIOS EN DOSIS MÚLTIPLE	175
CONCLUSIONES	235
ANEXO I: PUBLICACIÓN	239

ÍNDICE CAPÍTULOS

INTRODUCCIÓN

1. INFECCIONES FÚNGICAS SEVERAS.	29
2. TRATAMIENTOS ANTIFÚNGICOS.....	31
3. ANFOTERICINA B	33
3.1. Características físico-químicas	33
3.2. Actividad antifúngica.....	34
3.3. Mecanismo de acción.....	35
3.4. Efectos adversos	35
3.5. Formulaciones comercializadas	36
3.6. Terapia inhalatoria de anfotericina B.....	39
3.7. Nuevas formulaciones.....	40
4. BIBLIOGRAFÍA.....	43

OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO

1. OBJETIVO.....	53
2. PLANTEAMIENTO	53

CAPÍTULO I: ESTUDIO FARMACOTÉCNICO

A. ESTADO DE AGREGACIÓN	57
1. INTRODUCCIÓN.....	59
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
2.1. Materiales	59
2.1.1. Formulaciones	60
2.1.2. Equipos.....	61
2.2. Métodos	61
2.2.1. Elaboración de las formulaciones.....	61
2.2.2. Puesta a punto del método analítico	61
3. RESULTADOS	65
4. DISCUSIÓN.....	69
B. TAMAÑO DE PARTÍCULA	71
1. INTRODUCCIÓN.....	73
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
2.1. Materiales	73
2.1.1. Formulaciones	74
2.1.2. Equipos.....	75
2.2. Métodos	75
2.2.1. Elaboración de las formulaciones.....	75
2.2.2. Puesta a punto del método analítico	76
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	80
4. RESULTADOS	81
5. DISCUSIÓN.....	86
C. BIBLIOGRAFÍA	91

CAPÍTULO II: ESTUDIO DE ESTABILIDAD

1. INTRODUCCIÓN.....	95
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	95
2.1. Materiales	95
2.1.1. Formulaciones.....	96
2.1.2. Equipos	97
2.2. Métodos	99
2.2.1. Elaboración de las formulaciones	99
2.2.2. Estado de agregación	99
2.2.3. Tamaño de partícula.....	100
2.2.4. Cuantificación de anfotericina B por HPLC	101
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	103
4. RESULTADOS	104
4.1. Estado de agregación	104
4.2. Tamaño de partícula.....	111
4.3. Cuantificación de anfotericina B por HPLC.....	125
5. DISCUSIÓN.....	135
6. BIBLIOGRAFÍA.....	137

CAPÍTULO III: ESTUDIO EN DOSIS ÚNICA

1. INTRODUCCIÓN.....	141
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	141
2.1. Materiales	141
2.1.1. Formulaciones	142
2.1.2. Animales de experimentación	143
2.1.3. Equipos.....	143
2.2. Métodos	144
2.2.1. Elaboración de las formulaciones	144
2.2.2. Puesta a punto del modelo animal.....	145
2.2.3. Puesta a punto del método analítico por HPLC	146
2.2.4. Administración de las formulaciones	150
2.2.5. Análisis de anfotericina B en muestras orgánicas.....	150
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	157
4. RESULTADOS	157
4.1. Muestras cardíacas	159
4.2. Muestras cerebrales.....	159
4.3. Muestras pulmonares	161
4.4. Muestras renales	163
4.5. Muestras hepáticas y esplénicas	165
4.6. Modelo lineal	167
5. DISCUSIÓN.....	170
6. BIBLIOGRAFÍA.....	172

CAPÍTULO IV: ESTUDIOS EN DOSIS MÚLTIPLE

A. ESTUDIO DE NEFROTOXICIDAD	177
1. INTRODUCCIÓN.....	179
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	179
2.1. Materiales	179
2.1.1. Formulaciones	180
2.1.2. Animales de experimentación	181
2.1.3. Equipos	181
2.2. Métodos	182
2.2.1. Elaboración de las formulaciones.....	182
2.2.2. Administración de las formulaciones	182
2.2.3. Análisis de parámetros bioquímicos y estudio histopatológico	183
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	183
4. RESULTADOS	184
5. DISCUSIÓN.....	189

B. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO	191
1. INTRODUCCIÓN.....	193
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	193
2.1. Materiales	193
2.1.1. Formulaciones	194
2.1.2. Animales de experimentación	194
2.1.3. Equipos.....	195
2.2. Métodos	196
2.2.1. Elaboración de las formulaciones.....	196
2.2.2. Puesta a punto del modelo de administración de dosis múltiple	196
2.2.3. Puesta a punto del método analítico por HPLC.....	199
2.2.4. Administración de las formulaciones	201
2.2.5. Análisis de anfotericina B en muestras orgánicas	201
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	204
4. RESULTADOS	205
4.1. Muestras pulmonares	206
4.2. Muestras renales	208
5. DISCUSIÓN.....	210

C. ESTUDIO DE EFICACIA	213
1. INTRODUCCIÓN.....	215
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	215
2.1. Materiales	215
2.1.1. Formulaciones	216
2.1.2. Animales de experimentación y material biológico	216
2.2. Métodos	217
2.2.1. Elaboración de las formulaciones.....	217
2.2.2. Modelo animal de aspergilosis pulmonar	217
2.2.3. Administración de las formulaciones	218
2.2.4. Análisis de CFUs.....	218
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	219
4. RESULTADOS	220
4.1. Curvas de supervivencia y cambio de peso	220
4.2. Determinación de la carga fúngica	222
5. DISCUSIÓN.....	227
D. BIBLIOGRAFÍA	229

RESUMEN

Título:

Desarrollo galénico de nuevas formulaciones de anfotericina B.

Introducción:

En los últimos años, las infecciones fúngicas invasivas (IFIs), en concreto las candidiasis, causan una elevada morbilidad y mortalidad tras la realización de trasplantes pulmonares. Por otro lado, diferentes especies de *Aspergillus* han emergido como una de las causas más importantes de mortalidad y morbilidad en pacientes inmunocomprometidos. El principal foco de infección de este tipo de infecciones fúngicas en humanos es el pulmón, con diseminación en otros órganos, a medida que la enfermedad progresa. Para un tratamiento eficaz de la aspergilosis pulmonar es necesario alcanzar elevadas concentraciones pulmonares de anfotericina B. Las bajas concentraciones pulmonares en las primeras 48 horas de la formulación liposomal de anfotericina B unido a sus altos costes, limitan su uso. Por otro lado, la formulación comercial dimérica de anfotericina B con desoxicolato sódico presenta menor eficacia y causa una elevada nefrotoxicidad. Debido a todo esto, es necesario encontrar nuevas formulaciones de anfotericina B, como son sistemas poliagregados de anfotericina B con desoxicolato sódico que garanticen mayor eficacia frente a agentes patógenos pulmonares.

Síntesis de la Tesis Doctoral:

En este trabajo se desarrollarán distintas formulaciones micelares poliagregadas que puedan ser una alternativa eficaz a la formulación liposomal de referencia en tratamientos de aspergilosis que requieran altas concentraciones pulmonares.

A continuación, se describen los objetivos presentados en esta Tesis Doctoral:

1. Elaborar formulaciones micelares poliagregadas de anfotericina B (AmB) con distintas proporciones de desoxicolato (DCH) (1:0, 1:0,8, 1:1,5 y 1:4) para estudiar el estado de agregación y el tamaño de partícula.
2. Seleccionar las dos formulaciones más adecuadas (AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5) para estudiar la estabilidad al cabo de 7 días, así como la distribución en distintos órganos a 3 dosis únicas (3, 5 y 10 mg/kg/día).
3. Seleccionar la formulación más adecuada (AmB:DCH 1:1,5) para estudiar la toxicidad, la eficacia y la distribución en riñón y pulmón tras 6 dosis (5 mg/kg/día).

En los apartados de resultados y discusión de los distintos capítulos se destacan los siguientes puntos:

Los valores de absorbancia de las formulaciones experimentales de anfotericina B mostraron espectros de absorción correspondientes a la forma poliagregada de anfotericina B con picos característicos a 424, 407, 393 y 370 nm.

La formulación de anfotericina B sin desoxicolato sódico (AmB:DCH 1:0) mostró tamaños de partícula próximos a 500 nm, mientras que a medida que se aumenta la proporción de desoxicolato sódico, disminuye el tamaño de partícula.

Las nuevas formulaciones de anfotericina B AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5 mostraron tamaños de partícula similares y mantuvieron el mismo estado de agregación durante los 7 días de estudio. Además, presentaron elevados porcentajes de anfotericina B con porcentajes de degradación de anfotericina B inferiores al 5%.

Tras una única dosis, la nueva formulación de anfotericina B AmB:DCH 1:1,5 se caracterizó por presentar a nivel pulmonar concentraciones de anfotericina B 2,4 veces mayores que con la formulación liposomal de referencia.

Tras 6 dosis de 5 mg/kg/día de anfotericina B, las concentraciones alcanzadas a nivel pulmonar fueron 2,8 veces mayores con la formulación poliagregada que con la formulación liposomal, al igual que ocurría a dosis única.

Finalmente, en un modelo animal de aspergilosis pulmonar, se observa una eficacia similar entre ambas formulaciones, destacando las elevadas concentraciones iniciales de anfotericina B a nivel pulmonar que se obtienen con la formulación desarrollada en esta investigación de micelas poliagregadas de anfotericina B con desoxicolato sódico (AmB:DCH 1:1,5), alcanzando con esta formulación valores similares de supervivencia y carga fúngica en el modelo animal estudiado.

Conclusiones:

1. Los espectros de absorción de las nuevas formulaciones con desoxicolato sódico corresponden a la forma poliagregada de la anfotericina B, en las que se forman sistemas micelares de tamaño nanométrico debido a la presencia de desoxicolato.
2. El desoxicolato sódico produce un efecto estabilizante en las formas poliagregadas de anfotericina B. Así, las formulaciones poliagregadas de anfotericina B y desoxicolato AmB:DCH [1:0,8] y [1:1,5], una vez reconstituidas, no presentan cambios en el tamaño de partícula, y son estables químicamente durante 7 días de almacenamiento a 25°C y protegidos de la luz.
3. Tras la administración de una dosis única de las formulaciones poliagregadas y de la formulación Ambisome[®], las nuevas formulaciones muestran concentraciones más elevadas a nivel pulmonar, mientras que la formulación Ambisome[®] alcanza mayores concentraciones en órganos del sistema retículo endotelial, como hígado y bazo.
4. Tras la administración de dosis múltiples en animales inmunodeprimidos, se confirma que la formulación poliagregada AmB:DCH 1:1,5 presenta concentraciones pulmonares tres veces superiores, y acumulaciones en tejido renal cuatro veces menores que la formulación de referencia Ambisome[®]. La nueva formulación presenta una leve mejora en los efectos nefrotóxicos comparada con la formulación de referencia.

5. Los estudios de eficacia en animales inmunodeprimidos tras infección con *Aspergillus fumigatus*, muestran un mayor descenso de la infección en tejido pulmonar con la administración de la formulación poliagregada AmB:DCH 1:1,5 en los primeros días de tratamiento, comparada con el tratamiento de referencia.
6. Los estudios de eficacia en animales inmunodeprimidos tras infección con *Aspergillus fumigatus*, muestran una eficacia similar en términos de supervivencia y reducción de carga fúngica al final del tratamiento, al comparar la formulación poliagregada y la formulación de referencia. Este resultado posiblemente esté relacionado con una eliminación más lenta de la formulación de liposomas en relación con la formulación micelar poliagregada.

SUMMARY

Title:

Galenic development of new amphotericin B formulations.

Introduction:

In recent years, invasive fungal infections (IFIs), especially candidiasis, cause high morbidity and mortality after lung-transplant. On the other hand, different *Aspergillus* species have emerged as one of the main cause of mortality and morbidity in immunosuppressed patients. The initial site of most fungal infections in humans is primarily the lungs, with dissemination to other organs as the disease progresses. So, it is important to reach high initial pulmonary concentrations of amphotericin B (AmB) in order to get an effective treatment. The high costs of commercial lipid formulations and the low pulmonary concentrations reached during the first 48 hours, limit their use. On the other hand, the less expensive commercial dimeric sodium deoxycholate amphotericin B formulation has lower antifungal efficacy and causes serious nephrotoxicity. Due to these reasons, it is necessary to find out new amphotericin B formulations, such as poly-aggregated systems of amphotericin B with sodium deoxycholate (DCH), that guarantee greater efficacy and lower toxicity than commercial formulations.

Synthesis of the Doctoral Thesis:

In this work, micelle poly-aggregated formulations will be developed in order to be a possible effective alternative of liposomal reference formulation used in the treatment of aspergillosis that required high pulmonary concentrations.

Consequently, the aims of this work are described as follows:

1. To develop amphotericin B formulations with different proportions of sodium deoxycholate (AmB:DCH 1:0, AmB:DCH 1:0.8, AmB:DCH 1:1.5 and AmB:DCH 1:4) in order to study the aggregation state and particle size of amphotericin B.
2. To select the two main adequate formulations (AmB:DCH 1:0.8 and AmB:DCH 1:1.5) in order to study their stability during 7 days and the distribution to different organs at 3 single doses (3, 5 and 10 mg/kg/day).
3. To select the best formulation (AmB:DCH 1:1.5) in order to study the toxicity, efficacy and distribution to kidneys and lungs after 6 daily doses of 5 mg/kg/day.

Related to the results and discussion of this work, the following points are noted:

The absorbance values of experimental amphotericin B formulations showed absorbance spectra corresponding to the poly-aggregated form of amphotericin B with 4 characteristic peaks at 424, 407, 393 and 370 nm.

The amphotericin B formulation with no proportion of sodium deoxycholate (AmB:DCH 1:0) showed particle sizes close to 500 nm, whilst a decreased in the particle size was observed when the proportion of sodium deoxycholate was increased.

New amphotericin B formulations (AmB:DCH 1:0.8 and AmB:DCH 1:1.5) showed similar particle size and maintained the same aggregation state during the 7 days of the stability study. Besides, these new formulations maintained high percentages of amphotericin B with AmB degradation percentages lower than 5%.

After a single dose, new AmB:DCH 1:1.5 formulation showed 2.4-fold higher pulmonary concentrations than the reference liposomal formulation.

After 6 doses of amphotericin B 5 mg/kg/day, pulmonary concentrations were 2.8 times higher with AmB:DCH 1:1.5 formulation than the ones observed with commercial liposomal formulation, as occurred when a single dose was administered.

Finally, with the murine model of pulmonary aspergillosis used during the study, a similar efficacy between both formulations was observed, with high initial pulmonary concentrations of amphotericin B with AmB:DCH 1:1.5 and long-term maintained concentrations with commercial liposomal formulation, reaching with the new micelle formulation similar values of surviving and fungal burden.

Conclusions:

1. The absorbance spectra of new amphotericin B formulations with sodium deoxycholate correspond to the poly-aggregated form of amphotericin B, with micelle systems of nanometric size created due to the presence of deoxycholate.
2. Sodium deoxycholate produces a stabilizing effect on poly-aggregated amphotericin B. So, poly-aggregated formulations of amphotericin B and sodium deoxycholate AmB:DCH [1:0.8] y [1:1.5], once reconstituted, do not present changes in their particle size and are chemically stable during the 7 days of the stability study at 25°C and darkness conditions.
3. After the administration of a single dose of new poly-aggregated formulations and Ambisome[®], new formulations show higher pulmonary concentrations, whilst Ambisome[®] formulation reached higher concentrations in organs of the reticulo-endothelial system, such as liver and spleen.
4. After the administration of multiple doses in immunosuppressed animals, it is confirmed that the new poly-aggregated formulation AmB:DCH 1:1.5 presents 3-fold higher pulmonary concentrations and 4-fold lower renal accumulations than the reference formulation Ambisome[®]. The new formulation also presents a slightly lower nephrotoxicity than the one observed with the reference formulation.

5. Efficacy studies in immunosuppressed and infected animals with *Aspergillus fumigatus*, show a great reduction of the infection in lung tissue with the administration of the poly-aggregated formulation AmB:DCH 1:1.5 in the first days of treatment, compared to the reference treatment.
6. Efficacy studies in immunosuppressed and infected animals with *Aspergillus fumigatus*, show a similar efficacy in terms of surviving and reduction of fungal burden at the end of the treatment, when new poly-aggregated formulation and Ambisome[®] are compared. This result may be related to a slower elimination of amphotericin B with liposomal formulation compared with micelle poly-aggregated formulation.

INTRODUCCIÓN

1. INFECCIONES FÚNGICAS SEVERAS

Las bacterias y hongos se encuentran normalmente en la piel, la boca, la garganta, el estómago, el colon, la vagina y el recto. Diferentes especies causan problemas de salud cuando hay un sobrecrecimiento fúngico en alguna de estas áreas del cuerpo (Butani y col., 2014). Las infecciones oportunistas causadas por hongos son una de los principales causas de muerte en individuos inmunocomprometidos (Lincopan y col., 2003). A su vez, la candidiasis invasiva es la micosis oportunista más frecuente que afecta mayoritariamente a estos pacientes (Salas y col., 2013).

Las infecciones fúngicas invasivas (IFIs) causan una elevada morbilidad y mortalidad tras la realización de trasplantes pulmonares (Thakuria y col., 2016). En concreto, las candidiasis invasivas representan el 53% de las infecciones fúngicas en pacientes trasplantados y el 79% en pacientes en cuidados intensivos (Ibrahim y col., 2012). Las especies de *Candida* representan la cuarta causa más común de infección sanguínea nosocomial en pacientes hospitalizados con una elevada incidencia de mortalidad del 30-50% (Ibrahim y col., 2012).

Por otro lado, diferentes especies de *aspergillus* han emergido como una de las causas más importantes de mortalidad y morbilidad en pacientes inmunocomprometidos, siendo del 53% y 76% en trasplantes de células madre hematopoyéticas autólogos y alogénicos, respectivamente; mientras que la mortalidad en trasplantes de distintos órganos varía del 20 al 66% (Geltner y col., 2014). Esta población se compone de pacientes con periodos de neutropenia prolongados, infección por VIH avanzada, inmunodeficiencia hereditaria, pacientes con desórdenes hematológicos, diabetes mellitus y pacientes que han sufrido trasplantes de células hematopoyéticas y/o de pulmón (Alsaadi y col., 2012; Mihara y col., 2014; Walsh y col., 2008; Zhao y col., 2014).

La aspergilosis invasiva complica del 3 al 15% los trasplantes de pulmón con un rango de mortalidad del 52 al 55% (Thakuria y col., 2016). El aumento de agentes inmunosupresivos y el elevado uso de corticosteroides en enfermedad pulmonar obstructiva crónica ha llevado a micosis invasivas como aspergilosis llegando a ser más prominente en los últimos años (Fortún y col., 2012; Voltan y col., 2016). Aunque el principal punto de infección fúngica de aspergilosis en humanos son los pulmonares, se disemina a bazo, riñones, hígado y cerebro a medida que avanza la infección. Por tanto, elevadas concentraciones pulmonares iniciales de fármaco son necesarias para evitar la diseminación del patógeno lo que haría la enfermedad más difícil de tratar. La mortalidad de la forma invasiva depende de las condiciones iniciales del huésped, aunque suele ser mayor del 50% (Segal, 2009).

2. TRATAMIENTOS ANTIFÚNGICOS

El tratamiento de distintas infecciones fúngicas invasivas depende del uso específico de los distintos agentes antifúngicos, los cuales son polienos (anfotericina B), azoles (fluconazol), triazoles (itraconazol, voriconazol, posaconazol), equinocandinas (caspofungina) y flucitosina (Ibrahim y col., 2012; Thakuria y col., 2016).

El uso de anfotericina B está relacionado con nefrotoxicidad, lo que puede ser un problema para pacientes que están recibiendo inhibidores de calcineurina. La terapia con caspofungina debe ser administrada por vía intravenosa haciendo difícil su uso a largo plazo. El tratamiento con itraconazol es complicado debido a la variabilidad en la absorción gastrointestinal, toxicidad y la emergente resistencia que presentan distintas cepas. El uso de voriconazol es a menudo limitado debido a reacciones adversas como toxicidad hepática, fotosensibilidad y riesgo de cáncer de piel a largo plazo. El posaconazol es un novedoso triazol con amplio espectro antifúngico y usado principalmente como tratamiento de segunda línea en pacientes trasplantados que son intolerantes a voriconazol, sobre el que aún no existen suficientes datos de eficacia (Chotirmall y col., 2014; Thakuria y col., 2016).

Las recomendaciones para la candidiasis invasiva en pacientes neutropénicos incluye el uso de equinocandinas como primera terapia y anfotericina B liposomal como tratamiento de segunda línea debido a los efectos adversos observados (Salas y col., 2013).

El tratamiento de murcomicosis requiere un diagnóstico rápido y preciso y una rápida administración del agente antifúngico para maximizar las opciones de una buena recuperación. Los polienos son los agentes terapéuticos de primera elección para el tratamiento de estas infecciones (Mihara y col., 2014).

Voriconazol y anfotericina B liposomal (Ambisome[®]) son los tratamientos de elección (gold standard) en la terapia frente a aspergilosis invasivas (Cornely y col., 2007; Fortún y col., 2012; Sanchis y col., 2015; Walsh y col., 2008). Sin embargo, Voriconazol no puede ser utilizado cuando hay daño hepático o en pacientes trasplantados tratados con ciclosporinas. En estos casos, la anfotericina B es el fármacos de primera elección para tratar infecciones sistémicas fúngicas severas (Sandoval-Denis y col., 2014; Voltan y col., 2016; Vyas y col., 2006).

El itraconazol y la terbinafina son los fármacos de elección para el tratamiento de infecciones cutáneas no complicadas (Batista-Duarte y col., 2016). El uso de itraconazol y voriconazol como profilaxis así como de anfotericina B inhalada, muestra una reducción en la colonización fúngica en diversas infecciones invasivas (Geltner y col., 2015).

3. ANFOTERICINA B

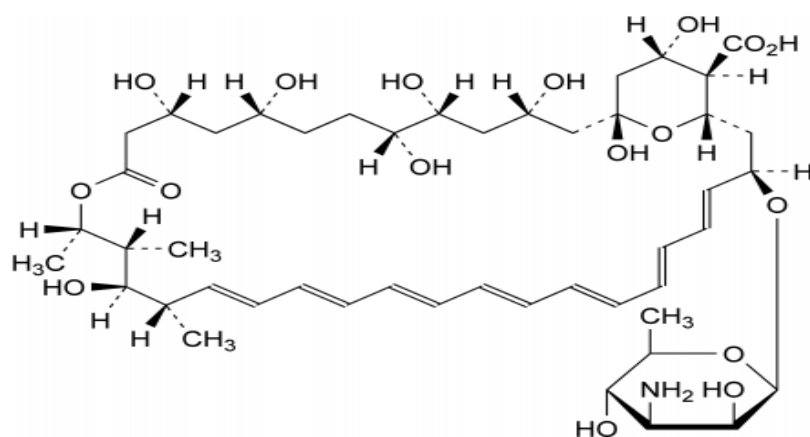


Figura 1. Estructura de la anfotericina B.

La anfotericina B es el ácido (1*R*, 3*S*, 5*R*, 6*R*, 9*R*, 11*R*, 15*S*, 16*R*, 17*R*, 18*S*, 19*E*, 21*E*, 23*E*, 25*E*, 27*E*, 29*E*, 31*E*, 33*R*, 35*S*, 36*R*, 37*S*)-33-[(3-amino-3,6-dideoxi-β-D-manopiranosil)oxi]-1, 3,5,6,9,11,17,37-octahidroxi-15,16,18-trimetil-13-oxo-14,39-dioxabicyclo[33.3.1]nonatriaconta-19, 21, 23, 25, 27, 29, 31-hepta eno-36-carboxílico) y su fórmula molecular es C₄₇H₇₃NO₁₇.

3.1. Características físico-químicas

La anfotericina B es una mezcla de polienos antifúngicos producidos por el crecimiento de ciertas cepas de *Streptomyces nodosu* u obtenidos por cualquier otro medio. Presenta un aspecto de polvo amarillo o anaranjado, higroscópico (Real Farmacopea Española 2015).

Posee un dominio hidrofóbico (la cadena de hidrocarburo poliénico) y un dominio hidrofílico (la cadena de polihidroxil). Su naturaleza anfótera es la responsable de su baja solubilidad tanto en medio acuoso, como en numerosos disolventes orgánicos (Jain y col., 2010).

Es prácticamente insoluble en agua, soluble en dimetilsulfóxido y en propilenglicol, poco soluble en dimetilformamida, muy poco soluble en metanol y prácticamente insoluble en etanol al 96%. Es sensible a la luz en disoluciones diluidas. Por lo tanto, se conserva protegida de la luz, a una temperatura de 2 °C a 8 °C en envase hermético. Si la sustancia es estéril, en envase estéril, con cierre de seguridad (Real Farmacopea Española 2015).

3.2. Actividad antifúngica

La anfotericina B es un antibiótico macrólido poliénico con membrana activa que presenta un amplio espectro de actividad antifúngica frente a numerosas cepas sin presentar grandes problemas de resistencia (Brime y col., 2004; Jain y col., 2010; Lincopan y col., 2003,).

Es el tratamiento de elección para infecciones sistémicas invasivas fungicidas causadas por *Candida*, *Aspergillus* y *Fusarium* (Leon y col., 2005; Morand y col., 2007). Es el fármaco de elección (gold standard) para el tratamiento de micosis diseminadas en pacientes inmunocomprometidos (Butani y col., 2014).

Formulada como una suspensión coloidal aparece como uno de los agentes más efectivo y asequible en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas (Kwong y col., 2002). El valor de corte epidemiológico (ECV) se establece en 1 µg/ml (Salas y col., 2013).

3.3. Mecanismo de acción

Ejerce su acción en las células fúngicas formando complejos con los esteroides de las membranas que actúan como canales transmembrana (Lincopan y col., 2003). De esta manera, se aumenta su permeabilidad permitiendo el paso de iones y otros componentes esenciales de las membranas provocando la destrucción del parásito (Butani y col., 2014).

3.4. Efectos adversos

La anfotericina B presenta biodisponibilidad oral limitada debido a su baja solubilidad en medio acuoso y permeabilidad (Ibrahim y col., 2012). Es normalmente administrada por vía intravenosa para conseguir los efectos terapéuticos requeridos. Sin embargo, la administración parenteral presenta efectos adversos agudos como infección del catéter, hemólisis, fiebre, dolor óseo, tromboflebitis y nefrotoxicidad (Ibrahim y col., 2012; Morand y col., 2007).

La nefrotoxicidad es la mayor complicación asociada al uso de anfotericina B, lo que está relacionado con una acumulación de dosis elevada (Kwong y col., 2002) y con tamaños de partícula elevados (Clemons y col., 2012; Moreno y col., 2015; Olson y col., 2008; Wang y col., 2016.).

3.5. Formulaciones comercializadas

La anfotericina B es el fármaco de elección para el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas y micosis diseminadas en pacientes inmunocomprometidos (Leon y col., 2005). Su baja solubilidad es un problema difícil de resolver (Lincopan y col., 2003). Por este motivo, se formula utilizando un agente solubilizante, como es el desoxicolato sódico. Sin embargo, su utilidad clínica está limitada por los efectos adversos tóxicos de la preparación con desoxicolato causando fallo renal, hipocalemia, azotemia y daño tubular renal (Brime y col., 2004; Jain y col., 2010; Watanabe y col., 2010.).

La formulación Fungizona[®] consiste en una dispersión coloidal de anfotericina B y desoxicolato sódico que forma un complejo micelar inestable con una elevada toxicidad (Lincopan y col., 2003). Debido a su estado de agregación dimérico, es la que presenta mayores efectos adversos y cuya dosis administrada se ha limitado a 1 mg/kg debido a su toxicidad renal crónica.

Presenta un elevado porcentaje de pequeñas partículas ($56,2 \pm 4,3$ nm) y un pequeño porcentaje de partículas de mayor tamaño (alrededor de $4 \mu\text{m}$) (Moreno-Rodríguez y col., 2015), siendo esta última población la que está relacionada con la toxicidad (Clemons y col., 2012; Moreno-Rodríguez y col., 2015; Olson y col., 2008; Wang y col., 2016;).

Con el fin de reducir los efectos adversos de la Fungizona[®] y, por tanto, mejorar su eficacia, se han desarrollado diferentes formulaciones lipídicas, actualmente comercializadas: Amphotec[®], Abelcet[®] y Ambisome[®] (Olson y col., 2008).

La formulación Amphotec[®] consiste en un complejo de anfotericina B y colesterol sulfato en una proporción 1:1 molar de manera que se forma una estructura coloidal estable con diámetros inferiores a 100 ± 22 nm (Clark y col., 1991; Olson y col., 2008).

La formulación Abelcet[®] está compuesta por anfotericina B, dimiristoil fofatidilcolina y dimiristol fosfatidilglicerol en una proporción fármaco-lípido 1:1 molar formando complejos con tamaños de partícula de $1,6 - 11 \mu\text{m}$, con el 90% de las partículas por debajo de $6 \mu\text{m}$ (Olson y col., 2008).

La formulación Ambisome[®] está constituida por anfotericina B, colesterol, fosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilglicerol en una proporción 0,4:1:2:0,4 molar (Olson y col., 2008). Presenta un pequeño tamaño de partícula (próximo a 100 nm) que mejora la eficacia antifúngica y disminuye los efectos adversos (Nahar y col., 2008). Sin embargo, la administración intravenosa de anfotericina B liposomal sigue causando toxicidad sistémica y renal e hipocalcemia (Mihara y col., 2014).

Además, el uso de estas formulaciones (Amphotec[®], Abelcet[®] y Ambisome[®]) está limitado no sólo por los efectos adversos sino también por los elevados costes que supone su elaboración (Butani y col., 2014). Por tanto, su uso se restringe a pacientes con un elevado riesgo de desarrollar toxicidad renal (Leon y col., 2005).

Las diferentes formulaciones comercializadas administradas por vía intravenosa, presentan diferentes estados de agregación (monomérico, dimérico y poliagregado) y diferentes tamaños de partícula; lo que influirá en sus perfiles farmacocinéticos y su distribución en diferentes órganos (Risovic y col., 2007; Serrano y col., 2013).

3.6. Terapia inhalatoria de anfotericina B

Una estrategia para minimizar el potencial de sus efectos adversos es desarrollar sistemas que permitan un contacto directo de la anfotericina B con las zonas del cuerpo que se ven más afectadas por la infección fúngica, como puede ser la administración de anfotericina B en forma de aerosol. La anfotericina B nebulizada ha sido usada en humanos desde 1959.

Sin embargo, su uso no está del todo establecido debido a varias razones. i) Poco se conoce sobre la dosis óptima, frecuencia de administración y duración del tratamiento, así como la farmacocinética de la anfotericina B inhalada en humanos (Kuiper y col., 2009). ii) La administración pulmonar del fármaco muestra una elevada variabilidad inter-paciente debido a que la fracción inhalada depende del estado clínico del paciente y su capacidad inhalatoria, el tipo de inhalador y las propiedades del flujo de la formulación y además menos del 25% de la dosis teórica administrada alcanza el lugar de absorción (Kaialy y col., 2012). iii) La anfotericina B libre debe ser encapsulada para prevenir la toxicidad en los macrófagos de las células alveolares (Chuealee y col., 2011). iv) Los liposomas de anfotericina B así como las formulaciones de fosfolípidos pueden ser inestables durante el proceso de nebulización (Nasr y col., 2012). v) Se han observado efectos adversos tras la administración de anfotericina B nebulizada en forma dimérica y liposomal (Lowry y col., 2007; Monforte y col., 2010). vi) Existe una elevada incidencia de contaminación en los nebulizadores cuando se utilizan para administrar anfotericina B en pacientes trasplantados de pulmón (Monforte y col., 2005).

Todas estas desventajas hacen necesaria la elaboración de nuevas formulaciones intravenosas de anfotericina B que permitan aumentar las concentraciones obtenidas en pulmón para el tratamiento de diferentes infecciones fúngicas, como es el caso de la aspergilosis.

3.7. Nuevas formulaciones

Los elevados costes de las formulaciones lipídicas comerciales limitan su utilización. Por otro lado, la formulación dimérica comercializada de anfotericina B y desoxicolato sódico presenta menos costes, pero también menor eficacia y causa mayor nefrotoxicidad (Ishida y col., 2017). Por lo tanto, están siendo desarrolladas diversas formulaciones de anfotericina B como emulsiones, liposomas y microsferas, con el fin de aumentar la eficacia y disminuir los efectos adversos (Mariné y col., 2009).

Una posible alternativa que supone menos costes y menor toxicidad renal es la forma poliagregada de anfotericina B (Leon y col., 2005). Concretamente, se ha observado que sistemas poliagregados de anfotericina B con desoxicolato sódico son una forma más segura y menos tóxica que la forma dimérica de anfotericina B, cuando se administra por vía intravenosa con la misma proporción de desoxicolato sódico (Moreno-Rodríguez y col., 2015; Serrano y col., 2013).

La solubilización de fármacos poco solubles ha sido un parámetro importante a tener en cuenta a la hora de desarrollar nuevas formulaciones. Así, se busca la combinación con otras técnicas de solubilización, como es el caso del uso de surfactantes, especialmente en preparados inyectables (Kawakami y col., 2006).

El estado de agregación, el tamaño de partícula y las propiedades de la superficie pueden ser modificados mediante el uso de surfactantes en sistemas micelares para mejorar las propiedades de manera que puedan alcanzar su objetivo en el tratamiento de infecciones fúngicas localizadas (Espada y col., 2008; Serrano y col., 2013).

Tras la administración parenteral de diferentes formulaciones liposomales de anfotericina B, las mayores concentraciones aparecen en órganos del sistema retículo-endotelial, mientras que las menores concentraciones se alcanzan en órganos como corazón, pulmones y riñones (Zhao y col., 2014). De esta manera, Lewis y col., 2010, obtuvo concentraciones pulmonares de anfotericina B de 1,44 $\mu\text{g/g}$ 24 horas después de la administración de dosis de 5 mg/kg de la formulación comercial Ambisome[®].

Estas bajas concentraciones pulmonares hacen necesaria la búsqueda de nuevas formulaciones de anfotericina B que garanticen una mayor eficacia frente a patógenos pulmonares como *Aspergillus*, que dan lugar a enfermedades fúngicas severas con una elevada mortalidad.

El objetivo de este proyecto es desarrollar sistemas micelares de anfotericina B que liberen selectivamente el fármaco en el pulmón con una baja nefrotoxicidad y una elevada distribución pulmonar.

4. BIBLIOGRAFÍA

- Alsaadi, M., Italia, J.L., Mullen, A.B., Ravi Kumar, M.N., Candlish, A.A., Williams, R.A., Shaw, C.D., Al Gawhari, F., Coombs, G.H., Wiese, M., Thomson, A.H., Puig-Sellart, M., Wallace, J., Sharp, A., Wheeler, L., Warn, P., Carter, K.C. The efficacy of aerosol treatment with non-ionic surfactant vesicles containing amphotericin B in rodent models of leishmaniasis pulmonary aspergillosis infection. *J Control Release*. 2012; 160(3):685-691.
- Batista-Duharte, A., Lastre, M., Romeu, B., Portuondo, D.L., Téllez-Martínez, D., Manente, F.A., Pérez, O., Carlos, I.Z.. Antifungal and immunomodulatory activity of a novel cochleate for amphotericin B delivery against *Sporothrix schenckii*. *Int Immunopharmacol*. 2016; 40:277-287.
- Brime, B., Molero, G., Frutos, P., Frutos, G. Comparative therapeutic efficacy of a novel lyophilized amphotericin B lecithin-based oil-water microemulsion and deoxycholate-amphotericin B in immunocompetent and neutropenic mice infected with *Candida albicans*. *Eur J Pharm Sci*. 2004; 22(5):451-458.
- Butani, D., Yewale, C., Misra, A. Amphotericin B topical microemulsion: formulation, characterization and evaluation. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014; 116:351-358.
- Chotirmall, S.H., McElvaney, N.G. Fungi in the cystic fibrosis lung: bystanders or pathogens? *Int J Biochem Cell Biol*. 2014; 52:161-173.

- Clemons, K.V., Schwartz, J.A., Stevens, D.A. Experimental central nervous system aspergillosis therapy: efficacy, drug levels and localization, immunohistopathology, and toxicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(8):4439-4449.
- Chuealee, R., Aramwit, P., Noipha, K., Srichana, T. Bioactivity and toxicity studies of amphotericin B incorporated in liquid crystals. *Europ J Pharm Sci.* 2011; 43(4):308-317.
- Cornely, O.A., Maertens, J., Bresnik, M., Ebrahimi, R., Ullmann, A.J., Bouza, E., Heussel, C.P., Lortholary, O., Rieger, C., Boehme, A., Aoun, M., Horst, H.A., Thiebaut, A., Ruhnke, M., Reichert, D., Vianelli, N., Krause, S.W., Olavarria, E., Herbrecht, R. Liposomal amphotericin B as initial therapy for invasive mold infection: a randomized trial comparing a high-loading dose regimen with standard dosing (AmBiLoad trial). *Clin Infect Dis.* 2007; 44(10):1289-1297.
- Espada, R., Valdespina, S., Alfonso, C., Rivas, G., Ballesteros, M.P., Torrado, J.J. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *Int J Pharm.* 2008; 36(1-2):64-69.
- Fortún, J., Meije, Y., Fresco, G., Moreno, S. Aspergillosis. Clinical forms and treatment. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012; 30(4):201-208.
- Geltner, C., Lass-Flörl, C. Invasive pulmonary Aspergillosis in organ transplants--Focus on lung transplants. *Respir Investig.* 2016; 54(2):76-84.
- Ibrahim, F., Gershkovich, P., Sivak, O., Wasan, E.K., Wasan, K.M. Pharmacokinetics and tissue distribution of amphotericin B following oral administration of three lipid-based formulations to rats. *Drug Dev Ind Pharm.* 2013; 39(9):1277-1283.

- Ishida, K., Alves Castro, R., Torrado, J.J., Serrado, D.R., Pereira Borba-Santos, L., Pereira Quintella, L., de Souza, W., Rozental, S., Lopes-Bezerra, L.M. Efficacy of a poly-aggregated formulation of amphotericin B in treating systemic sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. *Med Mycol.* 2017; 0:1-9.
- Jain, J.P., Kumar, N. Development of amphotericin B loaded polymersomes based on (PEG)(3)-PLA co-polymers: Factors affecting size and in vitro evaluation. *Eur J Pharm Sci.* 2010; 40(5):456-465.
- Kaialy, W., Larhrib, H., Martin, G.P., Nokhodchi, A. The Effect of Engineered Mannitol-Lactose Mixture on Dry Powder Inhaler Performance. *Pharm Res.* 2012; 29(8):2139–2156.
- Kawakami, K., Oda, N., Miyoshi, K., Funaki, T., Ida, Y. Solubilization behavior of a poorly soluble drug under combined use of surfactants and cosolvents. *Eur J Pharm Sci.* 2006; 28(1-2):7-14.
- Kuiper, L., Ruijgrok, E.J. A Review on the Clinical Use of Inhaled Amphotericin B. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2009; 22(3):213-227.
- Kwong, M., Wasan, K.M. Cholesteryl ester transfer protein facilitates the movement of water-insoluble drugs between lipoproteins: a novel biological function for a well-characterized lipid transfer protein. *Biochem Pharmacol.* 2002; 64(12):1669-1675. Review.
- Leon, C., Taylor, R., Bartlett, K.H., Wasan, K.M. Effect of heat-treatment and the role of phospholipases on Fungizone-induced cytotoxicity within human kidney proximal tubular (HK-2) cells and *Aspergillus fumigatus*. *Int J Pharm.* 2005; 298(1):211-218.

- Lincopan, N., Mamizuka, E.M., Carmona-Ribeiro, A.M. In vivo activity of a novel amphotericin B formulation with synthetic cationic bilayer fragments. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 52(3):412-418.
- Lowry, C.M., Marty, F.M., Vargas, S.O., Lee, J.T., Fiumara, K., Deykin, A., Baden, L.R. Safety of aerosolized liposomal versus deoxycholate amphotericin B formulations for prevention of invasive fungal infections following lung transplantation: a retrospective study. *Transpl Infect Dis.* 2007; 9(2):121-125.
- Mariné, M., Espada, R., Torrado, J.J., Pastor, F.J., Guarro, J. Efficacy of a new formulation of amphotericin B in murine disseminated infections by *Candida glabrata* or *Candida tropicalis*. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 34(6):566-569.
- Mihara, T., Kakeya, H., Izumikawa, K., Obata, Y., Nishino, T., Takazono, T., Kosai, K., Morinaga, Y., Kurihara, S., Nakamura, S., Imamura, Y., Miyazaki, T., Tsukamoto, M., Yamamoto, Y., Yanagihara, K., Tashiro, T., Kohno, S. Efficacy of aerosolized liposomal amphotericin B against murine invasive pulmonary mucormycosis. *J Infect Chemother.* 2014; 20(2):104-108.
- Monforte, V., Román, A., Gavalda, J., Bravo, C., Rodriguez, V., Ferrer, A., Pahissa, A., Morell, F. Contamination of the Nebulization Systems used in the prophylaxis with amphotericin B nebulized in lung transplantation. *Transpl Proc.* 2005; 37(9):4056-4058.
- Monforte, V., Ussetti, P., Gavalda, J., Bravo, C., Laporta, R., Len, O., García-Gallo, C.L., Tenorio, L., Solé, J., Román, A. Feasibility, tolerability and outcomes of nebulized liposomal amphotericin B for *Aspergillus* infection in lung transplantation. *J Heart Lung Transpl.* 2010; 29(5):523-530.

- Morand, K., Bartoletti, A.C., Bochot, A., Barratt, G., Brandely, M.L., Chast, F. Liposomal amphotericin B eye drops to treat fungal keratitis: physico-chemical and formulation stability. *Int J Pharm.* 2007; 344(1-2):150-153.
- Moreno-Rodríguez, A.C., Torrado-Durán, S., Molero, G., García-Rodríguez, J.J., Torrado-Santiago, S. Efficacy and toxicity evaluations of new amphotericin B micelle systems for brain fungal infections. *Int J Pharm.* 2015; 494(1):17-22.
- Nahar, M., Mishra, D., Dubey, V., Jain, N.K. Development, characterization and toxicity evaluation of amphotericin B-loaded gelatin nanoparticles. *Nanomed Nanotechnol Biol Med.* 2008; 4(3):252-261.
- Nasr, M., Nawaz, S., Elhissi, A. Amphotericin B lipid nanoemulsion aerosols for targeting peripheral respiratory airways via nebulization. *Int J Pharm.* 2012; 436(1-2):611-616.
- Olson, J.A., Adler-Moore, J.P., Jensen, G.M., Schwartz, J., Dignani, M.C., Proffitt, R.T. Comparison of the physicochemical, antifungal, and toxic properties of two liposomal amphotericin B products. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(1):259-268.
- Real Farmacopea Española. 2015. 5ª Edición.
- Risovic, V., Rosland, M., Sivak, O., Wasan, K.M., Bartlett, K. Assessing the antifungal activity of a new oral lipid-based amphotericin B formulation following administration to rats infected with *Aspergillus fumigatus*. *Drug Dev Ind Pharm.* 2007; 33(7):703-707.

- Salas, V., Pastor, J., Calvo, E., Álvarez, E., Sutton, D.A., Mayayo, E., Fothergill, A.W., Rinaldj, M.G., Guarro, J. *In Vitro* and *In Vivo* Activities of Posaconazole and Amphotericin B in a Murine Invasive Infection by *Mucor circinelloides*: Poor Efficacy of Posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(5):2246-2250.
- Sanchis, M., Sutton, D.A., Wiederhold, N.P., Guarro, J., Capilla, J. Efficacy of echinocandins against murine infections by *Diutina (Candida) rugosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016; 86(1):61-65.
- Sandoval-Denis, M., Pastor, F.J., Capilla, J., Sutton, D.A., Fothergill, A.W., Guarro, J. In vitro pharmacodynamics and in vivo efficacy of fluconazole, amphotericin B and caspofungin in a murine infection by *Candida lusitaniae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2014; 43(2):161-164.
- Segal BH. Aspergillosis. *N Engl J Med.* 2009; 360(18):1870–1884.
- Serrano, D.R., Hernández, L., Fleire, L., González-Alvarez, I., Montoya, A., Ballesteros, M.P., Dea-Ayuela, M.A., Miró, G., Bolás-Fernández, F., Torrado, J.J.. Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations. *Int J Pharm.* 2013; 447(1-2):38-46.
- Thakuria, L., Packwood, K., Firouzi, A., Rogers, P., Soresi, S., Habibi-Parker, K., Lyster, H., Zych, B., Garcia-Saez, D., Mohite, P., Patil, N., Sabashnikov, A., Capoccia, M., Chibvuri, M., Lamba, H., Tate, H., Carby, M., Simon, A., Leaver, N., Reed, A. A pharmacokinetic analysis of posaconazole oral suspension in the serum and alveolar compartment of lung transplant recipients. *Int J Antimicrob Agents.* 2016; 47(1):69-76.

- Voltan, A.R., Quindós, G., Medina, K.P., Fusco-Almeida, A.M., Soares, M.J., Chorilli, M. Fungal diseases: could nanostructured drug delivery systems be a novel paradigm for therapy? *Int J Nanomedicine*. 2016; 11:3715-3730.
- Vyas, S.P., Gupta, S. Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. *Int J Nanomed*. 2006; 1(4):417-432.
- Walsh, T.J., Anaissie, E.J., Denning, D.W., Herbrecht, R., Kontoyiannis, D.P., Marr, K.A., Morrison, V.A., Segal, B.H., Steinbach, W.J., Stevens, D.A., van Burik, J.A., Wingard, J.R., Patterson, T.F. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2008; 70(3):327-360.
- Wang, Y., Ke, X., Voo, Z.X., Yap, S.S.L., Yang, C., Gao, S., Liu, S., Venkataraman, S., Obuobi, S.A.O., Khara, J.S., Yang, Y.Y., Ee, P.L.R. Biodegradable functional polycarbonate micelles for controlled release of amphotericin B. *Acta Biomater*. 2016; 46:211-220.
- Watanabe, A., Matsumoto, K., Igari, H., Uesato, M., Yoshida, S., Nakamura, Y., Morita, K., Shibuya, K., Matsubara, H., Yoshino, I., Kamei, K. Comparison between concentrations of amphotericin B in infected lung lesion and in uninfected lung tissue in a patient treated with liposomal amphotericin B (AmBisome). *Int J Infect Dis*. 2010; 14(3):220-223.
- Zhao, M., Hu, J., Zhang, L., Zhang, L., Sun, Y., Ma, N., Chen, X., Gao, Z. Study of amphotericin B magnetic liposomes for brain targeting. *Int J Pharm*. 2014; 475(1-2):9-15.

OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO

1. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es desarrollar una formulación micelar poliagregada que pueda ser una alternativa para el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas, estudiando la influencia de la incorporación de proporciones crecientes de tensioactivo (desoxicolato sódico) en las características farmacotécnicas, farmacocinéticas y de eficacia de la anfotericina B, cuya solubilidad es muy baja.

2. PLANTEAMIENTO

1. Elaboración de formulaciones de anfotericina B con distintas proporciones de tensioactivo.
2. Estudio del estado de agregación y del tamaño de partícula de las formulaciones en función de la concentración de anfotericina B y de las proporciones de tensioactivo.
3. Estudio de la estabilidad de las formulaciones al cabo de 7 días.
4. Evaluación de la influencia de las distintas proporciones de tensioactivo en la concentración del fármaco alcanzada en distintos órganos tras una única dosis de antifúngico.
5. Estudio de la toxicidad renal de las distintas formulaciones.
6. Selección de la formulación y de la dosis con mejor relación beneficio/riesgo mediante estudios de biodistribución y eficacia a dosis múltiple.

**CAPÍTULO I:
ESTUDIO
FARMACOTÉCNICO**

A. ESTADO DE AGREGACIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los estudios de caracterización que es necesario realizar con las nuevas formulaciones de los antibacterianos de elevado peso molecular y baja solubilidad es analizar el estado de agregación de la anfotericina B presente en cada formulación. El estado de agregación puede estar relacionado con la toxicidad que presenta la anfotericina B en el organismo. Así, la forma dimérica se caracteriza por presentar mayores efectos adversos, mientras que la forma poliagregada presenta una menor toxicidad permitiendo mayores dosis y una mayor eficacia. Para llevar a cabo el análisis del estado de agregación se realiza un barrido espectrofotométrico de cada una de las formulaciones, ya que estos presentan distintos valores de absorción a diferentes longitudes de onda.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

En este estudio se utilizan los siguientes productos y reactivos:

- La anfotericina B (AmB) y la fórmula comercial Fungizona[®] (constituida por anfotericina B y desoxicolato) fueron suministradas por Bristol Myers Squibb (Barcelona, España).
- El desoxicolato de sodio (DCH) fue suministrado por Fluka Chemierl A.G. (Buchs, Suiza).
- La fórmula comercial Ambisome[®] (constituida por anfotericina B, colesterol fosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilglicerol) fué suministrada por UCB-Pharma (Bruselas, Bélgica).

- El metanol se obtuvo de Labscan (Dublín, Irlanda).
- El agua purificada fue obtenida mediante un sistema Milli-Q (Millipore, Estados Unidos).

2.1.1. Formulaciones

Las nuevas formulaciones que van a ser estudiadas a lo largo de este trabajo presentan en su composición anfotericina B y desoxicolato de sodio. Mientras que se mantiene constante la proporción de anfotericina B, la proporción de desoxicolato sódico es variable, oscilando entre 0 y 4 (p/p) (Moreno-Rodríguez y col., 2015). De tal forma, las formulaciones elaboradas presentan unas proporciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio de 1:0; 1:0,8; 1:1,5 y 1:4 (p/p) a una concentración de 500 µg/ml.

❖ Formulaciones:

- Formulación AmB:DCH 1:0: se pesaron 10 mg de anfotericina B y se suspendieron en 20 ml de agua Mili Q.
- Formulación AmB:DCH 1:0,8: se pesaron 10 mg de anfotericina B y 8 mg de desoxicolato sódico y se suspendieron en 20 ml de agua Mili Q.
- Formulación AmB:DCH 1:1,5: se pesaron 10 mg de anfotericina B y 15 mg de desoxicolato sódico y se suspendieron en 20 ml de agua Mili Q.
- Formulación AmB:DCH 1:4: se pesaron 10 mg de anfotericina B y 40 mg de desoxicolato sódico y se suspendieron en 20 ml de agua Mili Q.

Como formulaciones de referencia se utilizan las formulaciones comercializadas Fungizona[®] y Ambisome[®].

2.1.2. Equipos

Para la preparación de las formulaciones, se utiliza un agitador tipo Vortex[®]. Para llevar a cabo el estudio del estado de agregación es necesario suspender las formulaciones en agua purificada y realizar su posterior análisis en un espectrofotómetro Shimadzu[®] UV-1700 (USA) en un rango de longitudes de onda de 300 a 450 nm (Espada y col., 2008; Faustino y col., 2015).

2.2. Métodos

2.2.1. Elaboración de las formulaciones

El método de preparación seguido fue la disolución de desoxicolato sódico en agua purificada y la posterior adición de la cantidad correspondiente de anfotericina B. Se mantiene bajo agitación durante 4 minutos en un agitador tipo Vórtex[®] a una velocidad de 2400 rpm. Los preparados se conservan en estufa a 25°C y protegidos de la luz hasta su utilización.

2.2.2. Puesta a punto del método analítico

La capacidad que tiene la anfotericina B para auto-agregarse hace imprescindible el uso de agentes estabilizantes como el desoxicolato sódico que permitan una desagregación de las partículas para disminuir la toxicidad de las formulaciones.

La actividad y toxicidad de la anfotericina B va a estar determinada por el estado de agregación que presente el fármaco en las distintas formulaciones con distintas proporciones de tensioactivo, así como en las dos formulaciones comercializadas Fungizona[®] y Ambisome[®].

Para estudiar el estado de agregación de la anfotericina B presente en cada formulación, se tienen en cuenta los siguientes parámetros:

- Rango de longitud de onda: 300 – 450 nm.
- Número de medidas por muestra: 1.
- Velocidad de lectura: media.

La técnica de medida requiere un rango de concentraciones determinado para ser detectado por el equipo, lo que implica un proceso de diluciones hasta obtener la concentración adecuada, no sólo para las nuevas formulaciones con desoxicolato (AmB:DCH), sino también para las formulaciones comercializadas Ambisome[®] y Fungizona[®].

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, el estado de agregación se determina, en un primer momento, en las formulaciones comercializadas Fungizona[®] y Ambisome[®]. Cuando se analiza el estado de agregación de estas formulaciones, cuya concentración de anfotericina B inicial es de 5 mg/ml, se realizan dos diluciones iniciales en agua. En las dos formulaciones, se obtienen valores de absorbancia muy elevados imposibilitando la lectura de los picos de manera clara y precisa.

Al realizar otra dilución, los valores de absorbancia obtenidos son inferiores a 1, lo que permiten observar los distintos picos característicos de cada formulación, tal y como aparecen recogidos en la tabla 1. Por tanto, es posible determinar el estado de agregación que presenta la anfotericina B en cada caso.

Formulación	Concentración	Máximos (nm)
Fungizona[®]	5 mg/ml	-
	7,41 µg/ml	329, 386, 409
Ambisome[®]	5 mg/ml	-
	0,56 µg/ml	323, 388. 416

Tabla 1. Comparativa de los máximos observados según la concentración de anfotericina B en las formulaciones comercializadas Fungizona[®] y Ambisome[®].

En cuanto a las formulaciones de anfotericina B, se determina el estado de agregación de la formulación con mayor proporción de desoxicolato (AmB:DCH 1:4) y como referencia, se utiliza la formulación AmB:DCH 1:0.

Al realizar dos diluciones en medio acuoso, los valores de absorbancia obtenidos en la formulación AmB:DCH 1:0 siguen siendo muy elevados (superiores a 2), lo que no permite la lectura correcta de los picos de absorbancia, al encontrarse la muestra muy concentrada.

Sin embargo, en la formulación con mayor proporción de tensioactivo (AmB:DCH 1:4) se obtienen valores de absorbancia que permiten determinar los máximos de anfotericina B en esta formulación, al contrario de lo que ocurre con la formulación de referencia sin desoxicolato (AmB:DCH 1:0), en la que son necesarias otras dos diluciones en agua para poder determinar el estado de agregación de la anfotericina B en esta formulación. Los datos obtenidos correspondientes a estas dos muestras aparecen recogidos en la tabla 2.

Formulación	Concentración	Máximos (nm)
AmB:DCH 1:0	6 mg/ml	-
	107 µg/ml	-
	3,8 µg/ml	338, 362, 384, 409
AmB:DCH 1:4	6 mg/ml	-
	107 µg/ml	336, 361, 385, 408

Tabla 2. Comparativa de los máximos observados según la concentración de anfotericina B en las formulaciones AmB:DCH 1:0 y AmB:DCH 1:4.

3. RESULTADOS

Se determina, el estado de agregación de las dos formulaciones comercializadas Fungizona[®] y Ambisome[®], así como de las distintas formulaciones con proporciones crecientes de tensioactivo (AmB:DCH 1:0, AmB:DCH 1:0,8: AmB:DCH 1:1,5 y AmB:DCH 1:4).

Las dos formulaciones comerciales Fungizona[®] y Ambisome[®], así como las formulaciones con distintas proporciones de tensioactivo presentaron un aspecto de suspensión de color amarillo opaco.

Los resultados correspondientes a los barridos de absorción de todas las formulaciones aparecen recogidos en la figura 2.

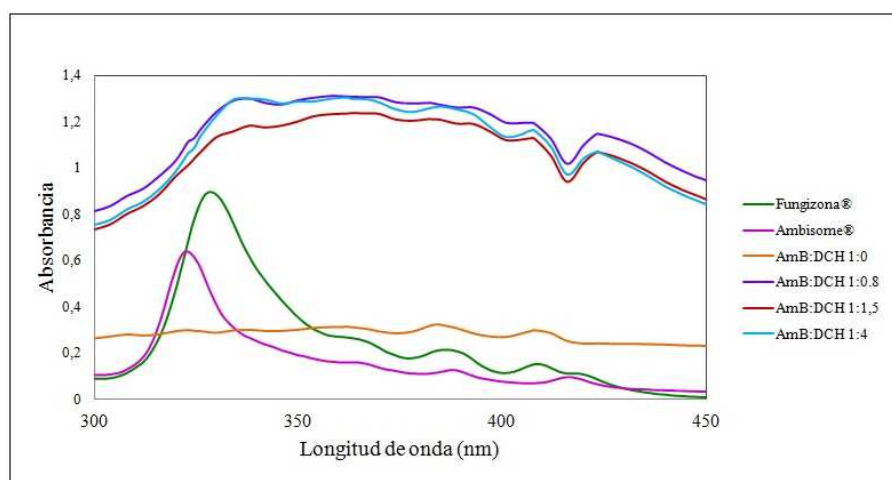


Figura 2. Espectros de absorción de las dos formulaciones comercializadas Fungizona[®] y Ambisome[®] y de las distintas formulaciones AmB:DCH.

En el caso de la Fungizona[®], tal y como se indica en la figura 3, se observa un pico de absorbancia a 329 nm, correspondiente al estado de agregación mayoritario de la anfotericina B en esta formulación, que indica que el fármaco se encuentra en estado dimérico (Espada y col., 2008).

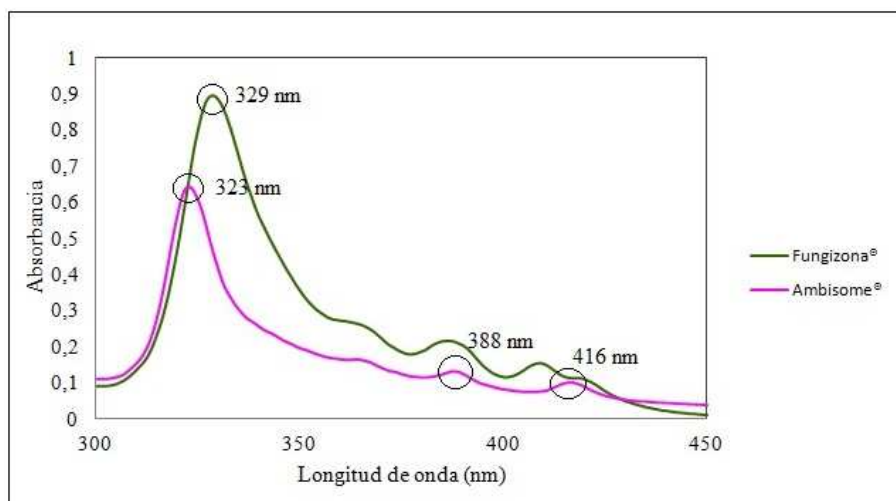


Figura 3. Espectros de absorción de las formulaciones Fungizona[®] y Ambisome[®].

A su vez, el espectro de absorción del Ambisome[®] (figura 3), muestra picos correspondientes a los 3 estados de agregación. El pico a 416 nm indica una elevada presencia de poliagregados. Al igual que ocurría con la Fungizona[®], aparece también un pico a 323, lo que indica presencia de dímeros de anfotericina B. El pico observado a 388 nm, corresponde a la forma monomérica. Estos resultados confirman la existencia de distintos estados de agregación de la anfotericina B en esta formulación.

Las formulaciones de anfotericina B obtenidas en agua, con distintas proporciones de tensioactivo, mostraron un espectro de absorción claramente diferente al obtenido con la forma dimérica de Fungizona[®], así como las formas monomérica, dimérica y poliagregada de la formulación comercial Ambisome[®] (Moreno-Rodríguez y col., 2015).

Los espectros correspondientes a las nuevas formulaciones de anfotericina B con desoxicolato aparecen recogidos en la figura 4.

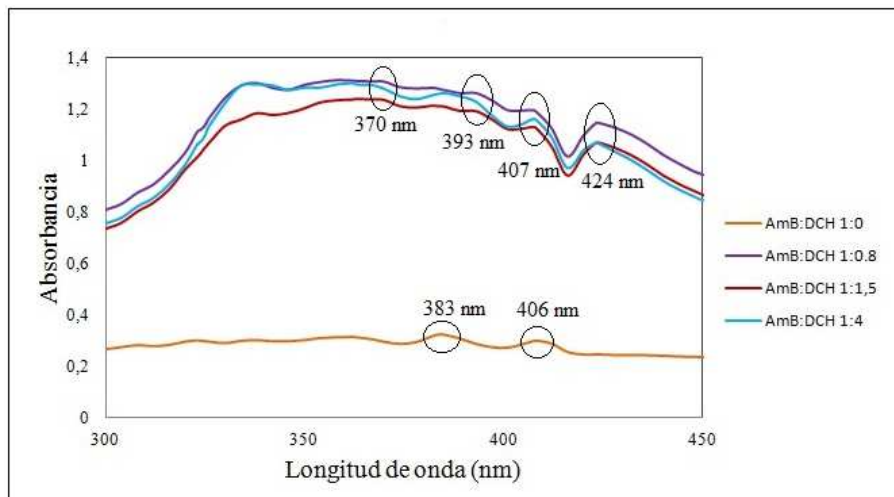


Figura 4. Espectros de absorción de las formulaciones poliagregadas con distintas proporciones de tensioactivo AmB:DCH 1:0, AmB:DCH 1:0,8, AmB:DCH 1:1,5 y AmB:DCH 1:4.

La formulación de referencia AmB:DCH 1:0 presenta una meseta a longitudes de onda en torno a 330 – 350 nm y 2 picos poco pronunciados a 383 y 406 nm, lo que se corresponde con formas poliagregadas de anfotericina B (Serrano y col., 2013).

El resto de formulaciones con proporciones crecientes de DCH (AmB:DCH 1:0,8, AmB:DCH 1:1,5 y AmB:DCH 1:4) presentan también una meseta en torno a 330 – 350 nm y 4 picos de absorbancia más pronunciados a 370, 393, 407 y 424 nm, correspondientes a agregados de anfotericina B (Moreno-Rodríguez y col., 2015).

4. DISCUSIÓN

El análisis UV-Visible permite determinar el estado de agregación mayoritario presente en cada una de las formulaciones. Los espectros de absorción de las formulaciones poliagregadas con desoxicolato son claramente diferentes a los observados con las formulaciones comercializadas Ambisome[®] y Fungizona[®]. No presentan el pico característico de la forma dimérica de anfotericina B presente en la Fungizona[®] (Espada y col., 2008) y sí los picos característicos del estado poliagregado de anfotericina B, presentes en la formulación comercial Ambisome[®], ya que dicha formulación presenta una combinación de distintos estados de agregación de anfotericina B.

Estas formas poliagregadas son menos tóxicas que la dimérica (Ishida y col., 2017), lo que supone una ventaja de las formulaciones experimentales desarrolladas en este trabajo. La formulación poliagregada sin desoxicolato (AmB:DCH 1:0) presenta valores de absorbancia mucho menores que los observados con las distintas formulaciones poliagregadas, debido a la presencia de desoxicolato, que impide la agregación de las partículas de anfotericina B formando sistemas micelares de menor tamaño (Faustino y col., 2015; Zu y col., 2014), lo que podrá influir también en el tamaño de partícula.

B. TAMAÑO DE PARTÍCULA

1. INTRODUCCIÓN

Conocer el tamaño de partícula de la anfotericina B es fundamental debido a su administración principalmente intravenosa y a la influencia del tamaño de partícula en la distribución a los distintos órganos. Para este tipo de formulaciones, el tamaño de partícula debe ser inferior a 1 μm .

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

En este estudio se utilizan los siguientes productos y reactivos:

- La anfotericina B (AmB) y la fórmula comercial Fungizona[®] (constituida por anfotericina B y desoxicolato) fueron suministradas por Bristol Myers Squibb (Barcelona, España).
- El desoxicolato de sodio (DCH) fue suministrado por Fluka Chemierl A.G. (Buchs, Suiza).
- La fórmula comercial Ambisome[®] (constituida por anfotericina B, colesterol fosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilglicerol) fue suministrada por UCB-Pharma (Bruselas, Bélgica).
- El metanol se obtuvo de Labscan (Dublín, Irlanda).
- El agua purificada fue obtenida mediante un sistema Milli-Q (Millipore, Estados Unidos).

2.1.1. Formulaciones

Para la caracterización del tamaño de partícula de la anfotericina B, las formulaciones que van a ser estudiadas son las mismas que las utilizadas en el apartado del estado de agregación. Por tanto, las formulaciones elaboradas presentan una proporción de anfotericina B y desoxicolato de sodio de 1:0; 1:0,8; 1:1,5 y 1:4 (p/p) a una concentración de 500 µg/ml.

❖ **Formulaciones:**

- Formulación AmB:DCH 1:0: se pesaron 10 mg de anfotericina B y se suspendieron en 20 ml de agua Mili Q.
- Formulación AmB:DCH 1:0,8: se pesaron 10 mg de anfotericina B y 8 mg de desoxicolato sódico y se suspendieron en 20 ml de agua Mili Q.
- Formulación AmB:DCH 1:1,5: se pesaron 10 mg de anfotericina B y 15 mg de desoxicolato sódico y se suspendieron en 20 ml de agua Mili Q.
- Formulación AmB:DCH 1:4: se pesaron 10 mg de anfotericina B y 40 mg de desoxicolato sódico y se suspendieron en 20 ml de agua Mili Q.

Como formulaciones de referencia se utilizan también las formulaciones comercializadas Fungizona[®] y Ambisome[®].

2.1.2. Equipos

Para la preparación de las formulaciones, se utiliza un agitador tipo Vortex[®] y para realizar la medición del tamaño de partícula se utilizó un equipo de espectrofotometría de difracción de luz láser (Dynamic Light Scattering) denominado Microtrac[®] S-3500 (USA), tras la suspensión de las formulaciones en agua purificada. Sus dimensiones se expresan como el diámetro medio basado en una distribución en número, cuyo rango es 0,086 – 1408 μm (Rodrigues y col., 2015; Serrano y col., 2013).

A la hora de obtener unos resultados de acuerdo con el objetivo perseguido, es imprescindible conocer bien la técnica que se lleva a cabo con el analizador de partículas Microtrac[®] S-3500. Para que la medida sea buena, se agita la muestra a analizar y se añade únicamente una gota de nuestra disolución en la celda, ya que se diluirá en el agua y la cantidad de partículas reconocidas será más exacta. En caso de que el programa no reconozca la existencia de partículas en la celda, se irá añadiendo la disolución gota a gota.

2.2. Métodos

2.2.1. Elaboración de las formulaciones

El método de preparación seguido fue la disolución de desoxicolato sódico en agua purificada y la posterior adición de la cantidad correspondiente de anfotericina B. Se mantiene bajo agitación durante 4 minutos en un agitador tipo Vórtex[®] a una velocidad de 2400 rpm. Los preparados se conservan en estufa a 25°C y protegidos de la luz hasta su utilización.

Las formulaciones comercializadas Fungizona® y Ambisome® se elaboran de acuerdo a las concentraciones necesarias para su análisis.

2.2.2. Puesta a punto del método analítico

A la hora de elaborar formulaciones parenterales es importante tener en cuenta el tamaño de partícula de las formulaciones. Por tanto, la determinación del tamaño de partícula requiere gran precisión y fiabilidad del equipo utilizado.

El analizador de partículas utilizado para las formulaciones poliagregadas AmB:DCH (Microtrac® S-3500) permite realizar cada medida por triplicado, mostrando la media de los 3 resultados.

Para estudiar el tamaño de partícula de las micelas obtenidas, se tienen en cuenta los siguientes parámetros:

- Tiempo: 30-60 segundos.
- Número de medidas por muestra: 3.
- Rango de tamaño: 0,086 μm – 1408 μm .
- Distribución de la muestra: en número.

Es importante seguir un mismo procedimiento de manera que cada muestra analizada esté en las mismas condiciones, proporcionando un resultado fiable y repetible.

Lo primero es mantener la celda del equipo con la misma cantidad de agua en todos los casos. Es necesario asegurar que no hay restos de la muestra anterior en el circuito. A continuación, se añade una gota de nuestra muestra (previamente agitada en agitador tipo Vortex[®] durante 1 minuto a 2400 rpm) y se procede a realizar la lectura. En muchos casos, si la muestra está diluida previamente, una gota de muestra no es suficiente para que sea detectada por el equipo. En estos casos, se añadirán un total de 4 gotas. Si el equipo continúa sin detectar suficiente cantidad de muestra, se irá añadiendo poco a poco la preparación.

La técnica de medida requiere un rango de concentraciones determinado para ser detectado por el equipo, lo que implica un proceso de diluciones hasta obtener la concentración adecuada.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, el tamaño de partícula se determina, en un primer momento, en las formulaciones comercializadas Ambisome[®] y Fungizona[®]. Cuando se analiza el tamaño de partícula de estas formulaciones, cuya concentración de anfotericina B es de 5 mg/ml, se obtienen valores superiores a 5000 nm, lo que no permite una lectura correcta de los datos, debido a que la concentración analizada satura el sistema de lectura del analizador.

En el caso del Ambisome[®], tras la realización de dos diluciones, se observa un tamaño de partícula con valores inferior a 200 nm (tabla 3).

Concentración (µg/ml)	Tamaño de partícula ± desviación estándar (nm)
133	112,0 ± 0,012

Tabla 3. Tamaños de partícula de anfotericina B observados en la formulación comercializada Ambisome[®].

En el caso de la Fungizona[®], presenta diámetros medios superiores a 1000 nm al realizar el mismo número de diluciones que en el caso del Ambisome[®], lo que hace necesaria una tercera dilución de manera que se obtengan tamaños de partícula similares a los encontrados en bibliografía (Jung y col., 2009). Estos tamaños están relacionados con el estado de agregación dimérico, mayoritario en la formulación Fungizona[®]. Cuando se realiza una tercera dilución, se obtienen valores inferiores a 100 nm, mostrados en la tabla 4.

Concentración (µg/ml)	Tamaño de partícula ± desviación estándar (nm)
66,67	3063,3 ± 0,277
6,667	94,0

Tabla 4. Comparativa de los tamaños de partícula observados según la concentración de anfotericina B en la formulación comercializada Fungizona[®].

En el caso de las formulaciones poliagregadas, se analizan los tamaños de partícula de las formulaciones con menor y mayor proporción de tensiactivo (AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:4 p/p), de manera que se obtenga el rango de concentraciones que permita determinar los distintos tamaños de partícula de las micelas obtenidas en cada una de las formulaciones de estudio.

Los datos del tamaño de partícula de las distintas diluciones realizadas en cada una de las formulaciones aparecen recogidos en la tabla 5.

Formulación	Concentración	Tamaño de partícula \pm desviación estándar (nm)
AmB:DCH 1:0,8	6 mg/ml	31525,3 \pm 0,035
	666,67 μ g/ml	26110,0 \pm 3,092
	66,67 μ g/ml	459,0 \pm 0,001
AmB:DCH 1:4	6 mg/ml	13063,3 \pm 2,050
	666,67 μ g/ml	28156,7 \pm 3,309
	66,67 μ g/ml	128,3 \pm 0,002

Tabla 5. Comparativa de los tamaños de partícula observados según la concentración de anfotericina B en las formulaciones AmB:DCH 1:0.8 y AmB:DCH 1:4.

Las formulaciones sin diluir, cuya concentración de anfotericina B (6 mg/ml) es similar a la que presentaban las formulaciones de Ambisome[®] y Fungizona[®] (5 mg/ml), presentan diámetros medios muy elevados.

Esto supone la presencia de poliagregados concentrados, que se aprecian en una gota de la formulación añadida a la celda del analizador y por tanto, provoca una saturación el sistema de lectura del equipo.

Al realizar una primera dilución de las formulaciones poliagregadas citadas anteriormente (AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:4) hay un concentrado de micelas, obteniéndose valores de tamaño de partícula todavía muy elevados. No se realiza una dispersión de las partículas que permita realizar una lectura del tamaño medio de partícula de dichas formulaciones.

Al realizar una segunda dilución en las formulaciones AmB:DCH anteriormente citadas y teniendo la misma concentración de anfotericina B en todos los casos, se procede a la lectura del tamaño de partícula de manera que las micelas obtenidas se encuentran en un rango de tamaños de 100-500 nm, con resultados similares a los observados en bibliografía (Moreno-Rodríguez y col., 2015).

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados correspondientes al tamaño de partícula son expresados como valor medio \pm desviación estándar (nm) de 3 medidas y analizados estadísticamente mediante el test de la T de Student. Un valor de P menor a 0,05 es considerado como diferencia significativa.

4. RESULTADOS

Una vez realizada la puesta a punto del método para determinar el tamaño de partícula, se lleva a cabo en un primer momento el análisis de las dos formulaciones comercializadas Ambisome[®] y Fungizona[®]. A continuación, se realiza el análisis de todas las formulaciones de AmB:DCH con distintas proporciones de tensioactivo (AmB:DCH 1:0, AmB:DCH 1:0,8, AmB:DCH 1:1,5 y AmB:DCH 1:4).

El ensayo se lleva a cabo realizando el análisis de una única muestra por formulación, teniendo en cuenta que el analizador de partículas Microtrac[®] S-3500 realiza por cada muestra 3 medidas. La media de estos resultados aparece recogida en la tabla 6. En todos los casos, el índice de polidispersabilidad (PDI) fue inferior a 0,6.

Formulaciones	Diámetro medio \pm desviación estándar (nm)
Fungizona[®]	94,0 \pm 0,001
Ambisome[®]	112,0 \pm 0,012
AmB:DCH 1:0	550,7 \pm 0,008
AmB:DCH 1:0,8	459,0 \pm 0,001
AmB:DCH 1:1,5	403,3 \pm 0,002
AmB:DCH 1:4	128,3 \pm 0,002

Tabla 6. Tamaño medio de partícula de las distintas formulaciones AmB:DCH y las dos formulaciones comercializadas Fungizona[®] y Ambisome[®].

Tal y como se muestra en la tabla 6, los valores del tamaño de partícula de la formulación comercial Fungizona® son muy pequeños, de acuerdo a lo observado por diferentes autores (Espada y col., 2008).

Sin embargo, en esta formulación, el estado de agregación de la anfotericina B es dimérico, lo que supone una elevada toxicidad renal y por tanto, aunque presenta tamaños pequeños, es necesario buscar alternativas a esta formulación para el tratamiento de infecciones fúngicas.

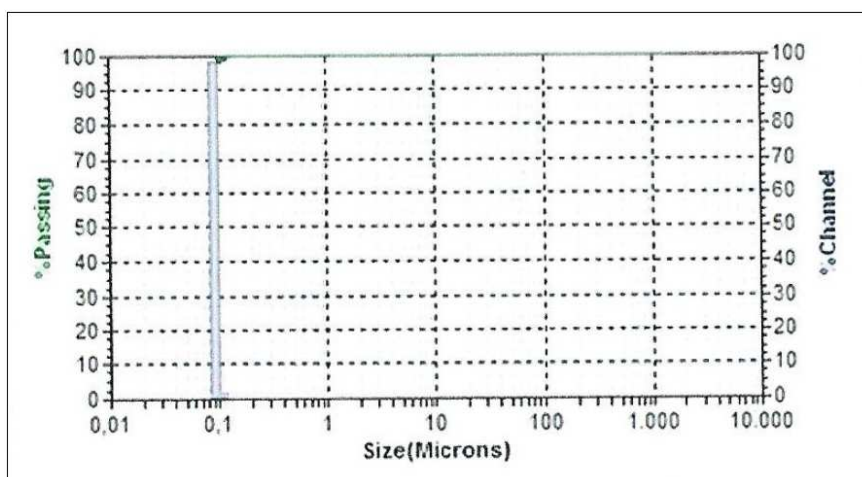


Figura 5. Gráfica del Microtrac® S-3500, correspondiente a la media del tamaño de partícula de la formulación comercial Fungizona®.

Por otro lado, en la fórmula comercial de Ambisome® el tamaño de partícula es de $112 \pm 0,012$ nm, adecuado para acceder a los órganos que son principalmente afectados por las infecciones fúngicas severas y constituye el gold standard en cuanto a tratamiento antifúngico con una elevada eficacia y menor toxicidad que la Fungizona®.

En cuanto a las formulaciones poliagregadas AmB:DCH, a medida que aumentamos la cantidad de desoxicolato sódico en la formulación, disminuye el tamaño de partícula y por tanto, mejora las características de nuestra formulación parenteral, tal y como se explicaba anteriormente, debido a la importancia de tamaños de partícula pequeños en formulaciones para esta vía de administración.

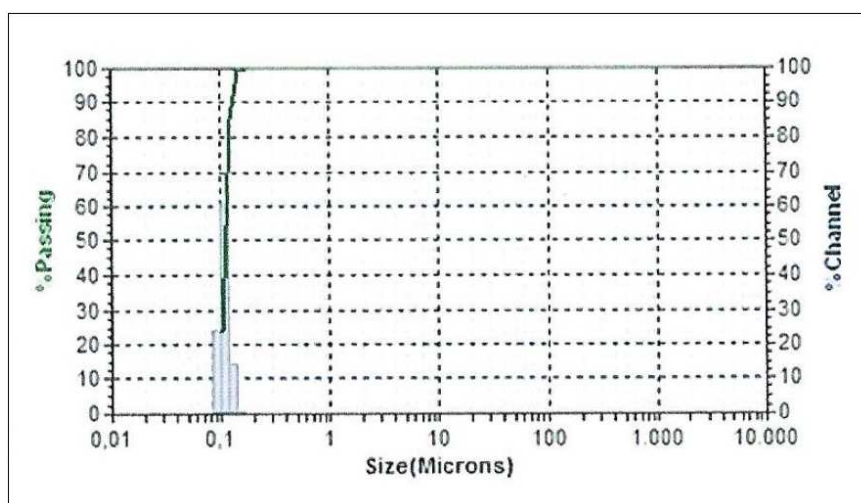


Figura 6. Gráfica del Microtrac[®] S-3500, correspondiente a la medida del tamaño de partícula de la formulación comercial Ambisome[®].

La incorporación de desoxicolato sódico en las formulaciones de anfotericina B induce la formación de estructuras poliagregadas de menor tamaño debido al efecto que tienen los tensioactivos impidiendo la aglomeración de las partículas (Faustino y col., 2015; Zu y col., 2014). El tamaño medio de partícula en estas formulaciones se encuentra en torno a los 400 – 500 nm, exceptuando la formulación AmB:DCH 1:4, que presenta tamaños menores.

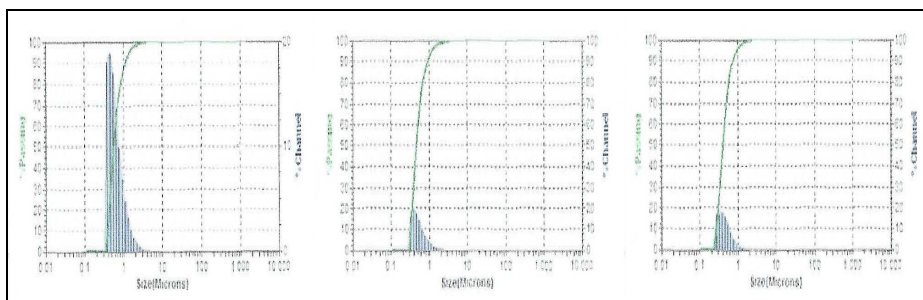


Figura 7. Comparativa de las gráficas del Microtrac[®] S-3500, correspondientes a las medias de los tamaños de partícula de las formulaciones con distintas proporciones de tensioactivo AmB:DCH 1:0, AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5.

La formulación con mayor proporción de desoxicolato sódico (AmB:DCH 1:4) es la que presenta tamaños de partícula más bajos ($128,3 \pm 0,002$), siendo estos valores muy similares al obtenido en la medida de la formulación comercial Ambisome[®] ($112,0 \pm 0,012$ nm).

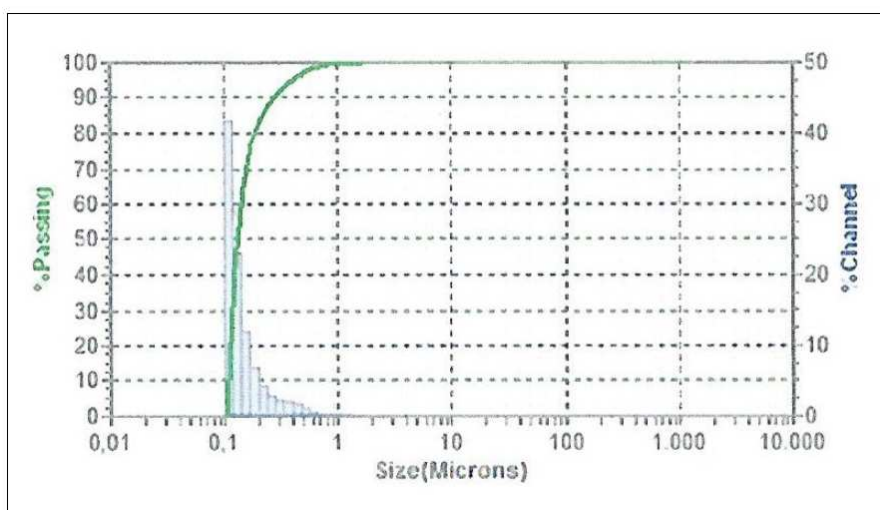


Figura 8. Gráfica del Microtrac[®] S-3500, correspondiente a la media del tamaño de partícula de la formulación AmB:DCH 1:4.

Los tamaños de partícula que se buscan en este tipo de formulaciones para administración parenteral son tamaños inferiores a 1 μm . A medida que aumentamos la cantidad de desoxicolato sódico en la formulación, disminuye el tamaño de partícula y por tanto, mejora las características físicas de nuestra formulación de manera que hace posible la administración intravenosa de las mismas en los animales de experimentación.

5. DISCUSIÓN

Los tamaños de partícula observados con las formulaciones comercializadas son similares a los obtenidos por otros autores en estudios previos de formulaciones de anfotericina B (Espada y col., 2008; Jung y col., 2009).

El tamaño de partícula de la anfotericina B observado en las formulaciones demuestra la influencia que tiene la presencia del tensioactivo en el estado poliagregado de la anfotericina B. En estudios previos con sistemas de anfotericina B similares (Moreno-Rodríguez y col., 2015), la formulación poliagregada AMB:DCH 1:0 presentó tamaños de partícula muy elevados ($1280 \pm 216,0$ nm) con tiempos de agitación cortos (2 minutos) en comparación con los obtenidos en este trabajo ($550 \pm 0,008$ nm) con tiempos de agitación mayores (4 minutos). Esto demuestra la importancia de las condiciones de agitación a la hora de obtener sistemas micelares de pequeño tamaño, tal y como han expuesto otros autores (Zu y col., 2014).

A medida que la proporción de tensioactivo aumenta, disminuye el tamaño de partícula. Además, los bajos valores de desviación estándar de las formulaciones poliagregadas con desoxicolato sódico pueden atribuirse al efecto estabilizante que ejerce el desoxicolato sódico mediante interacciones iónicas con la anfotericina B (Wang y col., 2016).

De esta manera, el desoxicolato sódico actúa como un agente estabilizante de estas formulaciones poliagregadas inhibiendo el crecimiento de las partículas, siendo un factor fundamental a la hora de elaborar sistemas nanoparticulares (Faustino y col., 2015; Zu y col., 2014). Diferentes autores han demostrado el uso de surfactantes como agentes estabilizantes de distintas formulaciones (Moreno-Rodríguez y col., 2015; Tan y col., 2010).

C. BIBLIOGRAFÍA

- Espada, R., Valdespina, S., Alfonso, C., Rivas, G., Ballesteros, M.P., Torrado, J.J. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *Int J Pharm.* 2008; 36(1-2):64-69.

- Faustino, C., Serafim, C., Ferreira, I., Pinheiro, L., Calado, A. Solubilization power of amino acid-based gemini surfactant towards the hydrophobic drug amphotericin B. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2015; 480:426-432.

- Ishida, K., Alves Castro, R., Torrado, J.J., Serrado, D.R., Pereira Borba-Santos, L., Pereira Quintella, L., de Souza, W., Rozental, S., Lopes-Bezerra, L.M. Efficacy of a poly-aggregated formulation of amphotericin B in treating systemic sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. *Med Mycol.* 2017; 0:1-9.

- Jung, S.H., Lim, D.H., Jung, S.H., Lee, J.E., Jeong, K.S., Seong, H., Shin, B.C. Amphotericin B-entrapping lipid nanoparticles and their *in vitro* and *in vivo* characteristics. *Eur J Pharm Sci.* 2009; 37(3-4):313-320.

- Moreno-Rodríguez, A.C., Torrado-Durán, S., Molero, G., García-Rodríguez, J.J., Torrado-Santiago, S. Efficacy and toxicity evaluations of new amphotericin B micelle systems for brain fungal infections. *Int J Pharm.* 2015; 494(1):17-22.

- Rodrigues, L., Ribeiro, F., Ferreira, D., Frézard, F., Crocco, L.C., Miranda, L.A. Nanoemulsions loaded with amphotericin B: A new approach for the treatment of leishmaniasis. *Europ J Pharm Sci.* 2015; 70:125-131.

- Serrano, D.R., Hernández, L., Fleire, L., González-Alvarez, I., Montoya, A., Ballesteros, M.P., Dea-Ayuela, M.A., Miró, G., Bolás-Fernández, F., Torrado, J.J.. Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations. *Int J Pharm.* 2013; 447(1-2):38-46.

- Tan, S.W., Billa, N., Roberts, C.R., Burley, J.C. Surfactant effects on the physical characteristics of amphotericin B-containing nanostructured lipid carriers. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2010; 372:73-79.

- Wang, Y., Ke, X., Voo, Z.X., Yap, S.S.L., Yang, C., Gao, S., Liu, S., Venkataraman, S., Obuobi, S.A.O., Khara, J.S., Yang, Y.Y., Ee, P.L.R. Biodegradable functional polycarbonate micelles for controlled release of amphotericin B. *Acta Biomater.* 2016; 46:211-220.

- Zu, Y., Sun, W., Zhao, X., Wang, W., Li, Y., Ge, Y., Liu, Y., Wang, K. Preparation and characterization of amorphous amphotericin B nanoparticles for oral administration through liquid antisolvent precipitation. *Eur J Pharm Sci.* 2014; 53:109-117.

CAPÍTULO II: ESTUDIO DE ESTABILIDAD

1. INTRODUCCIÓN

Se realiza un estudio de estabilidad de las formulaciones de anfotericina B y desoxicolato sódico que serán utilizadas en el ensayo *in vivo* de dosis única.

Para llevar a cabo el estudio de la estabilidad de las formulaciones reconstituidas de anfotericina B con distintas proporciones de desoxicolato sódico han sido estudiadas sus características farmacotécnicas a lo largo de 7 días, mediante 3 análisis: un análisis espectrofotométrico para determinar el estado de agregación, la caracterización del tamaño de partícula, mediante dos analizadores de partícula y un análisis cromatográfico para determinar la existencia o no de posibles productos de degradación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

En todos los ensayos llevados a cabo durante este estudio, se utilizan los siguientes productos y reactivos:

- La anfotericina B (AmB) fue suministrada por Bristol Myers Squibb (Barcelona, España).
- El desoxicolato de sodio (DCH) fue suministrado por Fluka Chemierl A.G. (Buchs, Suiza).
- El ácido acético glacial se obtuvo de Panreac S.A. (Barcelona, España).
- El acetonitrilo y el metanol para HPLC se obtuvieron de Labscan (Dublín, Irlanda).

- El agua purificada fue obtenida mediante un sistema Milli-Q (Millipore, Estados Unidos).

2.1.1. Formulaciones

Las formulaciones cuya estabilidad va a ser estudiada presentan en su composición anfotericina B y desoxicolato de sodio en 2 proporciones 1:0,8 y 1:1,5 (p/p) a una concentración de 500 µg/ml. Se estudia la estabilidad de estas formulaciones dado que son las que serán administradas durante el ensayo *in vivo* para conocer las concentraciones de fármaco alcanzadas en distintos órganos. El tiempo de muestreo para cada formulación es a tiempo 0, 24 horas y 7 días.

Como formulaciones de referencia se utilizan la formulación de anfotericina B y desoxicolato en proporción 1:0 (sin la presencia de tensiactivo) y una formulación patrón de anfotericina B en metanol (M-AmB).

❖ Formulaciones:

- Formulación AmB:DCH 1:0: se pesaron 10 mg de anfotericina B y se suspendieron en 20 ml de agua Mili Q.
- Formulación AmB:DCH 1:0,8: se pesaron 10 mg de anfotericina B y 8 mg de desoxicolato sódico y se suspendieron en 20 ml de agua Mili Q.
- Formulación AmB:DCH 1:1,5: se pesaron 10 mg de anfotericina B y 15 mg de desoxicolato sódico y se suspendieron en 20 ml de agua Mili Q.

- Formulación patrón de anfotericina B: se pesaron 10 mg de anfotericina B y se suspendieron en 50 ml de metanol, para su análisis del estado de agregación y el tamaño de partícula. Para su análisis en el equipo de HPLC, se pesaron 10 mg de anfotericina B y se suspendieron en 500 ml de metanol.

2.1.2. Equipos

Para la preparación de las formulaciones, se utiliza un agitador tipo Vortex[®] y para llevar a cabo el estudio del estado de agregación de la anfotericina B, se utiliza el espectrofotómetro Shimadzu[®] UV-1700 (USA), en un rango de longitudes de onda de 300 a 450 nm, al igual que ocurría en el Capítulo I para la caracterización del estado de agregación.

El tamaño de partícula fue analizado mediante dispersión de luz láser (dispersión dinámica de luz o DLS), expresando el diámetro medio de partícula en nm, basado en una distribución en número. En este caso, se utilizaron dos analizadores de partícula: el Microtrac[®] S-3500 para las formulaciones poliagregadas en agua (al igual que ocurría durante el estudio del tamaño de partícula en el Capítulo I) y el Zetatrac[®] Ultra (USA) para la formulación patrón de anfotericina B en metanol. Esto es debido a que la anfotericina B en metanol es más soluble que en medio acuoso y el Microtrac[®] S-3500 se emplea en suspensiones en las que no todo el fármaco está disuelto.

La anfotericina B presente en las distintas formulaciones de estudio fue cuantificada usando el método de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), utilizando un sistema modular Jasco[®] (Japón), que consta de los siguientes módulos:

- Un inyector automático A5-2050.
- Una bomba PU-1580.
- Un detector UV-1575.
- Un estabilizador de tensión Salicru[®].
- Unidad de gradiente ternaria LG-2080-02, trabajando en este caso de manera isocrática, con una única fase móvil.
- Columna: BDS C₁₈ 5 µm de diámetro interno y 250 x 4,6 nm.
- Ordenador, interfase y programa de integración de datos modelo Borwin 1.5 (JMBS Developments[®], Francia).

Para filtrar la fase móvil y la fase de lavado empleadas en el equipo de HPLC se utiliza un filtro Millipore de 0,45 µm conectado a bomba de vacío y para desgasificar dichas fases, se utiliza un desgasificador de ultrasonidos.

2.2. Métodos

2.2.1. Elaboración de las formulaciones

El método de preparación seguido fue la disolución de desoxicolato en agua purificada y la posterior adición de la cantidad correspondiente de anfotericina B. Se mantiene bajo agitación durante 4 minutos en un agitador tipo Vórtex[®] a una velocidad de 2400 rpm. Los preparados se conservan en estufa a 25°C y protegidos de la luz hasta su utilización.

2.2.2. Estado de agregación

El método seguido para la determinación del estado de agregación de la anfotericina B en las distintas formulaciones durante el estudio de estabilidad es el mismo que el descrito en el Capítulo I. En este caso, se han realizado una serie de modificaciones en las concentraciones analizadas, así como el medio de disolución y se ha añadido una nueva formulación:

- Se parte de una concentración inicial de anfotericina B de 0,5 mg/ml en las distintas formulaciones AmB:DCH y se realiza una única dilución en metanol, obteniendo una concentración de 50 µg/ml y valores de absorbancia inferiores a 1.
- Se cambia el medio de disolución de manera que esté en las mismas condiciones que las formulaciones utilizadas durante el estudio de concentración en órganos.

- En el caso de la formulación patrón de anfotericina B en metanol, se parte de una concentración inicial de anfotericina B de 0,02 mg/ml. Al ser una concentración muy pequeña, se elabora una nueva fórmula patrón, con una concentración de 0,2 mg/ml, de manera que se obtengan valores fiables dentro del rango de detección del equipo.

Estas modificaciones en las condiciones del ensayo se realizan de manera que las formulaciones estudiadas estén en las mismas condiciones que las formulaciones empleadas en el estudio *in vivo*.

2.2.3. Tamaño de partícula

El método seguido para la determinación del tamaño de partícula de la anfotericina B en las distintas formulaciones durante el estudio de estabilidad es el mismo que el descrito en el Capítulo I. En este caso, se han realizado una serie de modificaciones en las concentraciones analizadas, así como el medio de disolución y se ha añadido una nueva formulación:

- Cada muestra se analiza por triplicado y se calcula el valor medio de los resultados obtenidos. En este caso, se realiza la media de las 9 medidas realizadas por el analizador de partículas.
- En el caso de la formulación patrón utilizada como referente para evaluar la estabilidad de la anfotericina B en medio acuoso con y sin tensioactivo, se utiliza como analizador de partículas el Zetatrac® Ultra. Esto es debido a que la anfotericina B en metanol es más soluble que en medio acuoso y el

Microtrac® S-3500 se emplea en suspensiones en las que no todo el fármaco está disuelto.

- La anfotericina B en la formulación patrón con metanol está muy diluida, con una concentración inicial de 0,02 mg/ml. Al ser una concentración muy pequeña, se elabora una nueva fórmula patrón, con una concentración de 0,2 mg/ml, de manera que se obtengan valores fiables dentro del rango de detección del equipo.

Al igual que ocurre con la estabilidad del estado de agregación, estas modificaciones en las condiciones del ensayo se realizan de manera que las formulaciones estudiadas estén en las mismas condiciones que las formulaciones empleadas en el estudio *in vivo*.

2.2.4. Cuantificación de anfotericina B por HPLC

El método seguido para la cuantificación de anfotericina B en las distintas formulaciones durante el estudio de estabilidad se realiza utilizando una cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) de manera que se conozca la cantidad de anfotericina B presente en cada formulación y se observen los posibles productos de degradación, así como la pérdida de anfotericina B durante los días del estudio.

Durante este ensayo, se tienen en cuenta los siguientes parámetros:

- Cada muestra se analiza por triplicado y se calcula el valor medio de los resultados obtenidos.
- Para la cuantificación de anfotericina B, cada muestra se mide a una concentración de 20 µg/ml para la formulación patrón y 125 µg/ml para las formulaciones AmB:DCH, durante 20 minutos en el equipo de HPLC.
- Entre una medida y otra se lava con agua, para evitar posible acumulación de fármaco en la columna que pueda dificultar la lectura correcta de las concentraciones de anfotericina B.
- Los valores obtenidos a tiempo 0 se expresaron como 100% de anfotericina B inicial.
- Las siguientes concentraciones de anfotericina B obtenidas son expresadas como porcentajes de la concentración inicial de fármaco, así como los posibles productos de degradación que se expresan como picos relativos de anfotericina B.

De acuerdo a lo observado en bibliografía (Groeschke y col., 2006; Moreno-Rodríguez y col., 2015; Zhao y col., 2014), se realizan una serie de modificaciones del método para adecuar las condiciones cromatográficas al objetivo de dicho estudio. En este caso, las proporciones de los distintos componentes de la fase móvil, permiten que el tiempo de retención de la anfotericina B sea de 14 minutos, de manera que puedan observarse los posibles productos de degradación que tengan tiempos de retención diferentes al del fármaco de estudio:

- Columna BDS C₁₈ 5 µm de diámetro interno y 250 x 4,6 nm.
- Fase móvil: acetonitrilo: ácido acético glacial: agua (40:4,3:55,7) (v/v/v).
- Temperatura de la columna: 25°C
- Flujo de la fase móvil: 1 ml/min.
- Volumen de inyección: 100 µl.
- Longitud de onda empleada en el detector: 406 nm.
- Tiempo de análisis: 20 minutos.
- Fase de lavado: acetonitrilo: agua (50:50) (v/v).

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados correspondientes al tamaño de partícula y a la cuantificación de anfotericina B por HPLC se expresan como valor medio \pm desviación estándar de 3 medidas y son analizados estadísticamente mediante el test de la T de Student. Un valor de P menor a 0,05 es considerado como diferencia significativa.

4. RESULTADOS

4.1. Estado de agregación

En el estudio de estabilidad, se utilizaron 2 formulaciones de anfotericina B como referencia: una formulación patrón utilizando metanol como solvente (M-AmB) y una formulación con anfotericina B sin tensioactivo usando agua como solvente (AmB:DCH 1:0). Ambos preparados fueron comparados con las dos formulaciones con distintas proporciones de tensioactivo (AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5), seleccionadas para los ensayos *in vivo* que se verán en capítulos posteriores. Los ensayos espectrofotométricos fueron realizados a tiempo 0, 24 horas y 7 días, almacenando las formulaciones en estufa a 25° C y en ausencia de luz.

Al contrario del aspecto de suspensión observado en las formulaciones poliagregadas, la formulación patrón de anfotericina B en metanol (M-AmB) presentó el aspecto de solución clara de color amarillo, fácilmente dispersable en metanol, a una concentración de 0,2 mg/ml. La concentración inicial de las formulaciones con distintas proporciones de tensioactivo (AmB:DCH 1:0, AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5) fue de 0,5 mg/ml.

La figura 9 muestra el espectro de absorción de la fórmula patrón de anfotericina B en metanol (M-AmB).

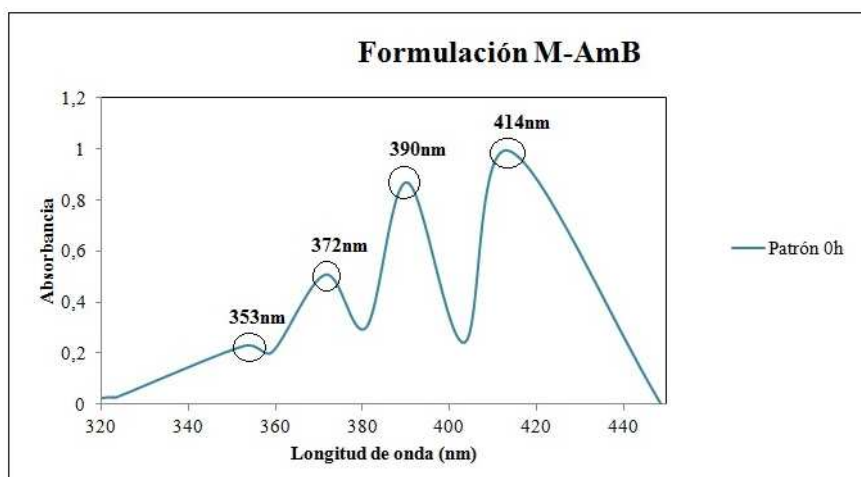


Figura 9. Espectros de absorción de la formulación M-AmB a tiempo 0.

Esta formulación utilizada como referencia presenta tres picos muy pronunciados a 372, 390 y 414 nm, y uno menos pronunciado a 353 nm. Dichos picos son característicos de la forma monomérica de anfotericina B (Espada y col., 2008; Faustino y col., 2015, Rodrigues y col., 2015).

Como se observa en la figura 10, pasadas 24 horas, se produce un desplazamiento de los picos característicos de la forma monomérica a menores longitudes de onda (344, 363, 382 y 406 nm). Estos cambios en el espectro de la anfotericina B monomérica pueden estar relacionados con un cambio físico o químico del fármaco. Los valores de absorbancia al cabo de 7 días fueron similares a los obtenidos a las 24 horas tras la elaboración de las formulaciones, con cuatro máximos a 345, 363, 373 y 405 nm.

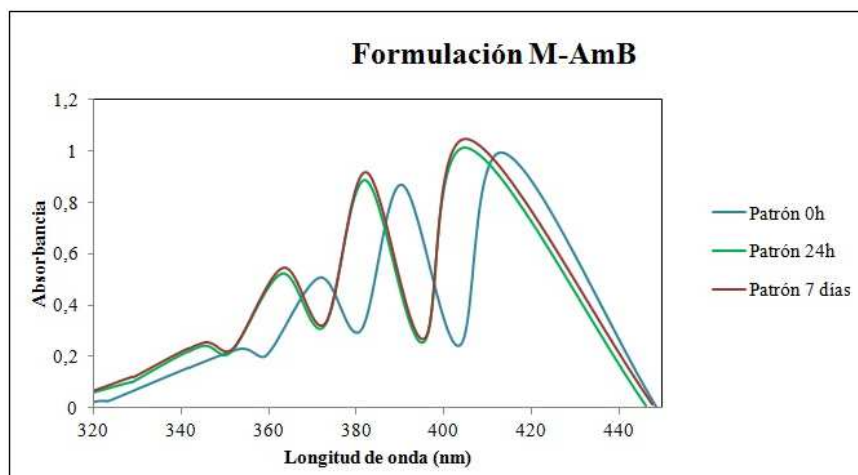


Figura 10. Espectros de absorción de la formulación M-AmB a tiempo 0, 24 horas y 7 días.

Los espectros de absorción de las formulaciones con distintas proporciones de desoxicolato (AmB:DCH 1:0, AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5) a tiempo 0, 24 horas y 7 días, aparecen recogidos en la figura 11.

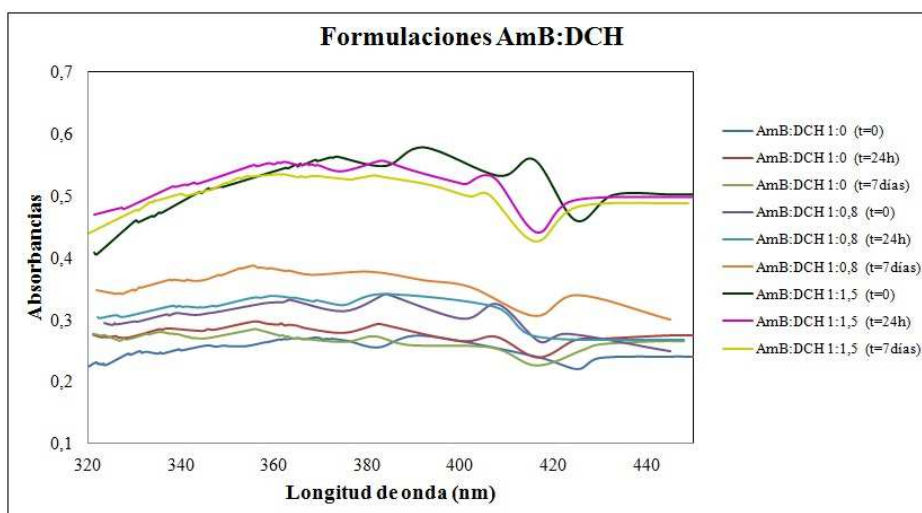


Figura 11. Espectros de absorción de las formulaciones poliagregadas AmB:DCH 1:0, AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5, a tiempo 0, 24 horas y 7 días.

Como se determinó en la caracterización del estado de agregación de estas formulaciones, a tiempo 0 estos espectros son característicos de las formas poliagregadas de anfotericina B, tal y como se observa en la figura 11, con espectros de absorción similares a los obtenidos en el Capítulo I, siendo en este caso las longitudes de onda ligeramente menores que las observadas en la caracterización inicial de dichas formulaciones. . En este caso, los valores de absorbancia son inferiores a 1, lo que permite observar si se producen cambios en el estado de agregación durante los 7 días de estudio.

La figura 12 muestra el espectro de absorción de la formulación poliagregada AmB:DCH 1:0 a tiempo 0, 24 horas y 7 días.

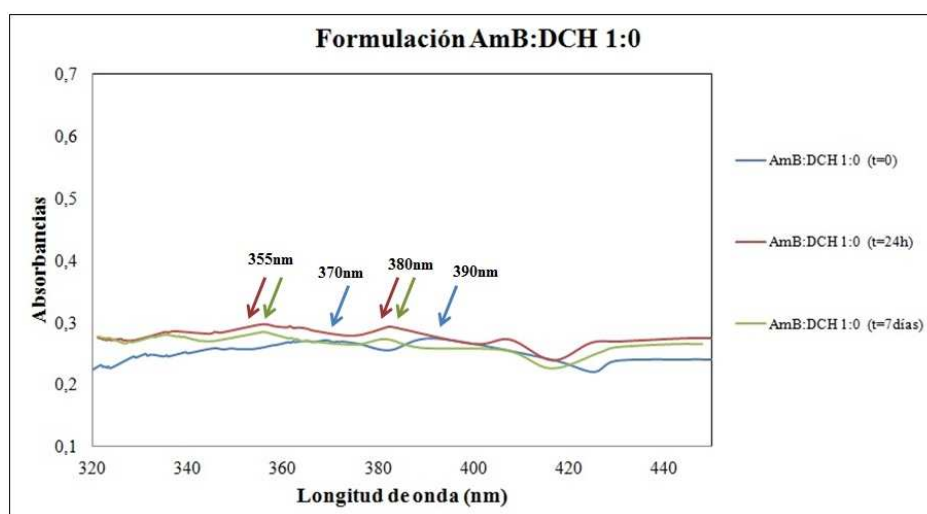


Figura 12. Espectros de absorción de la formulación poliagregada AmB:DCH 1:0 a tiempo 0, 24 horas y 7 días.

Al cabo de 24 horas, se observa un ligero desplazamiento en los valores de absorbancia de dos de los picos característicos de esta formulación poliagregada (370 y 390 nm) hacia menores longitudes de onda (355 y 380 nm, respectivamente). Estos cambios se mantienen durante los 7 días de estudio.

Los espectros de absorción de la formulación poliagregada con menor proporción de tensioactivo (AmB:DCH 1:0,8) a tiempo 0, 24 horas y 7 días aparecen en la figura 13.

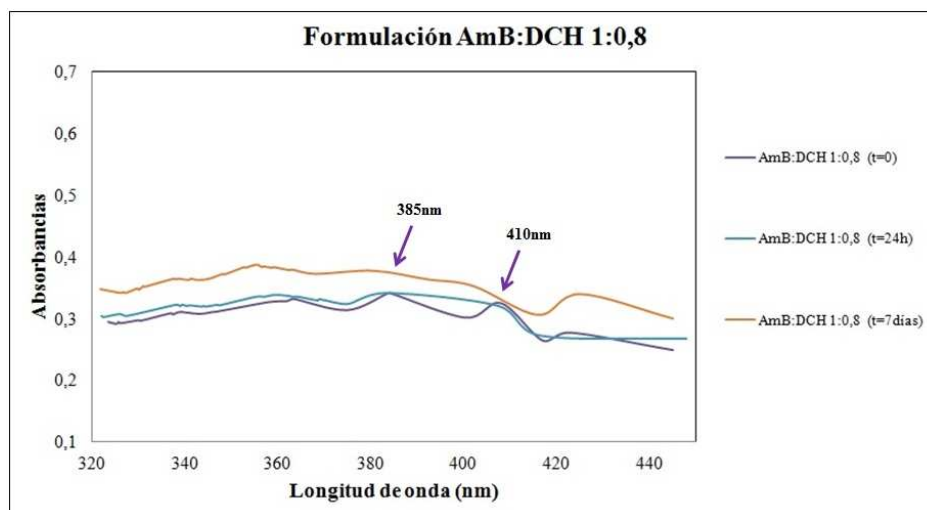


Figura 13. Espectros de absorción de la formulación poliagregada AmB:DCH 1:0.8 a tiempo 0, 24 horas y 7 días.

Esta formulación presentó mayor inestabilidad debido a los menores valores de absorbancia que se observan a tiempo 0 cuando se compara con los valores obtenidos al cabo de 24 horas, en particular a longitudes de onda por debajo de 375 nm.

En este corto intervalo de tiempo (24 horas), el espectro muestra picos poco claros en comparación con los observados a tiempo 0. Los desplazamientos producidos al cabo de 24 horas en el espectro de absorción de la formulación AmB:DCH 1:0,8, se mantienen durante todo el estudio de estabilidad, al igual que ocurría en la formulación poliagregada de referencia AmB:DCH 1:0

La figura 14 muestra el espectro de absorción de la formulación poliagregada AmB:DCH 1:1.5 a tiempo 0, 24 horas y 7 días.



Figura 14. Espectro de absorción de la formulación poliagregada AmB:DCH 1:1.5 a tiempo 0, 24 horas y 7 días.

La formulación AmB:DCH 1:1,5 mostró mayores valores de absorbancia durante todo el ensayo de estabilidad, comparado con el resto de las formulaciones AmB:DCH. Estos mayores valores de absorbancia podrían estar relacionados con un proceso de desagregación inducido por la acción del surfactante (Faustino y col., 2015; Selvan y col., 2009; Zu y col., 2014).

Los desplazamientos observados en esta formulación (al igual que ocurría con la fórmula patrón de anfotericina B en metanol) son más apreciables comparado con el resto de formulaciones poliagregadas, dado que los picos son más marcados que en el resto de formulaciones.

En esta formulación, el pico a 415 nm a tiempo 0 se desplaza a 405 nm a las 24 horas, el pico a 392 nm a tiempo 0 se desplaza a valores de longitud de onda de 382 nm a las 24 horas y lo mismo ocurre con el pico a 374 nm a tiempo 0 que se desplaza a 355 nm a las 24 horas (figura 14). Aunque se mantiene el desplazamiento durante todo el estudio de estabilidad, los valores de absorbancia observados a los 7 días son más bajos.

Estos cambios en los espectros de las formas poliagregadas de anfotericina B podrían estar relacionados con un cambio físico o químico del fármaco, que se va a ver modificado por la presencia o no de desoxicolato sódico, debido a su acción desagregante, tal y como se ha explicado anteriormente.

Debido a estos resultados, es necesario realizar un estudio del tamaño de partícula y de la cuantificación de anfotericina B, así como de los posibles productos de degradación, de manera que se pueda confirmar la existencia o no de un cambio físico o químico de la anfotericina B en estas formulaciones poliagregadas.

4.2. Tamaño de partícula

Debido a la variabilidad observada durante el estudio del tamaño de partícula de las formulaciones en el Capítulo I, en este ensayo del estudio de estabilidad, las medidas del tamaño de partícula se realizaron por triplicado, de manera que los resultados se expresan como la media de 9 medidas, a tiempo 0, a las 24 horas y a los 7 días.

En este caso, se analiza el tamaño de partícula de las 4 formulaciones empleadas en el estudio del estado de agregación, correspondiente a este ensayo de estabilidad.

- La formulación patrón de anfotericina B en metanol (M-AmB), que se utilizará en los ensayos *in vivo*.
- La formulaciones AmB:DCH 1:0, que se utilizará como referencia.
- La formulación AmB:DCH 1:0,8, que se utilizará en los ensayos *in vivo*.
- La formulación AmB:DCH 1:1,5, que se utilizará en los ensayos *in vivo*.

La tabla 7 reúne los tamaños medios de las diferentes formulaciones de anfotericina B analizadas. En todos los casos, el índice de polidispersibilidad (PDI) fue inferior a 0,6.

Formulación	Diámetro medio \pm desviación estándar (nm)		
	0 horas	24 horas	7 días
M-AmB	295,6 \pm 91,9 (95,8%)	229,2 \pm 125,7 (44,4%)	217,1 \pm 66,3 (62,3%)
	553,0 (2,7%) *	651,3 \pm 89,0 (25,5%)	660,8 \pm 164,5 (15,5%)
	1205,0 \pm 67,9 (1,5%)	1708,8 \pm 545,5 (27,1%)	1566,4 \pm 546,8 (22,2%)
AmB:DCH 1:0	514,8 \pm 35,5 (100%)	481,0 \pm 32,0 (100%)	480,0 \pm 31,3 (100%)
AmB:DCH 1:0,8	456,3 \pm 2,7 (100%)	459,8 \pm 4,5 (100%)	453,6 \pm 2,2 (100%)
AmB:DCH 1:1,5	404,9 \pm 1,7 (100%)	406,4 \pm 2,9 (100%)	405,7 \pm 5,7 (100%)

Tabla 7. Tamaño medio de partícula de la formulación patrón de AmB y formulaciones AmB:DCH (1:0), (1:0,8) y (1:1,5) a tiempo 0, 24 horas y 7 días. *Esta población corresponde a una única muestra.

Los valores obtenidos son similares a los observados en el Capítulo I, correspondiente al estudio del tamaño de partícula de las distintas formulaciones experimentales de anfotericina B y desoxicolato sódico. En este caso, el número de valores que se emplean es de 9 medidas, mientras que en el caso anteriormente comentado se utilizaba un total de 3 medidas por formulación.

En relación a la fórmula patrón de anfotericina B en metanol (M-AmB), se establecen 3 poblaciones que aparecen recogidas en la tabla 8. Una primera población con tamaños de partícula inferiores a 500 nm, otra segunda población con tamaños de partícula intermedios (500-1000 nm) y una tercera población con tamaños de partícula por encima de 1000 nm.

Formulación	Diámetro medio \pm desviación estándar (nm)		
	0 horas	24 horas	7 días
M-Amb	295,6 \pm 91,9 (95,8%)	229,2 \pm 125,7 (44,4%)	217,1 \pm 66,3 (62,3%)
	553,0 (2,7%) *	651,3 \pm 89,0 (25,5%)	660,8 \pm 164,5 (15,5%)
	1205,0 \pm 67,9 (1,5%)	1708,8 \pm 545,5 (27,1%)	1566,4 \pm 546,8 (22,2%)

Tabla 8. Tamaño medio de partícula de la formulación patrón de anfotericina B a tiempo 0, 24 horas y 7 días. *Esta población corresponde a una única muestra

A tiempo 0, las poblaciones que se observan son las correspondientes a los tamaños más pequeños y más grandes. La proporción de menores tamaños de partícula es muy superior (95,8%), mientras que la población con mayores tamaños de partícula se encuentra en un porcentaje muy bajo (1,5%). Además, únicamente, uno de los valores correspondientes a una de las 9 medidas corresponde a la población intermedia con un tamaño de partícula de 553,0 nm (2,7%).

En la figura 15, se observan las gráficas del tamaño de partícula de la formula patrón de anfotericina B a tiempo 0.

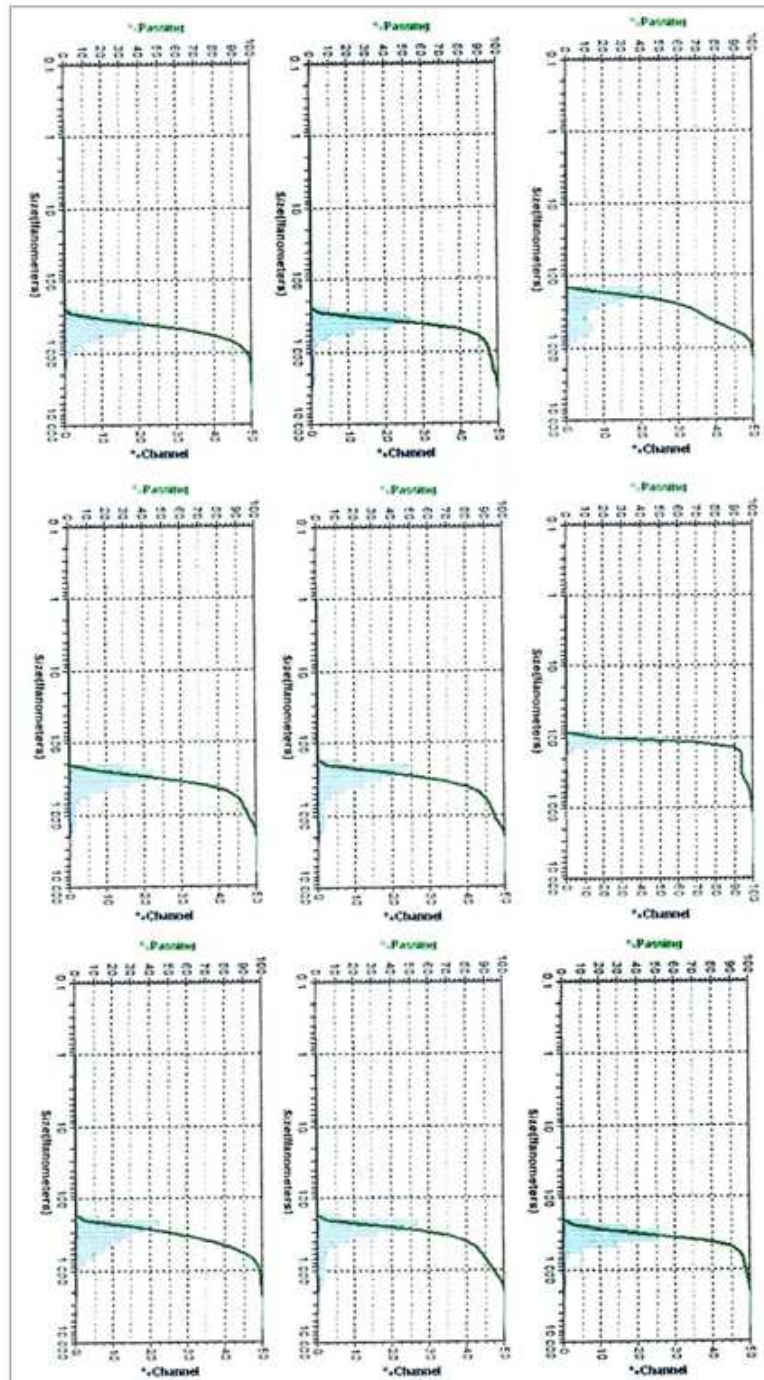


Figura 15. Gráficas del Zetrac® Ultra, correspondientes a los tamaños de partícula de la formulación M-Amb a tiempo 0.

En las figuras 16 y 17 se muestran las gráficas correspondientes a los valores de las poblaciones obtenidas a las 24 horas.

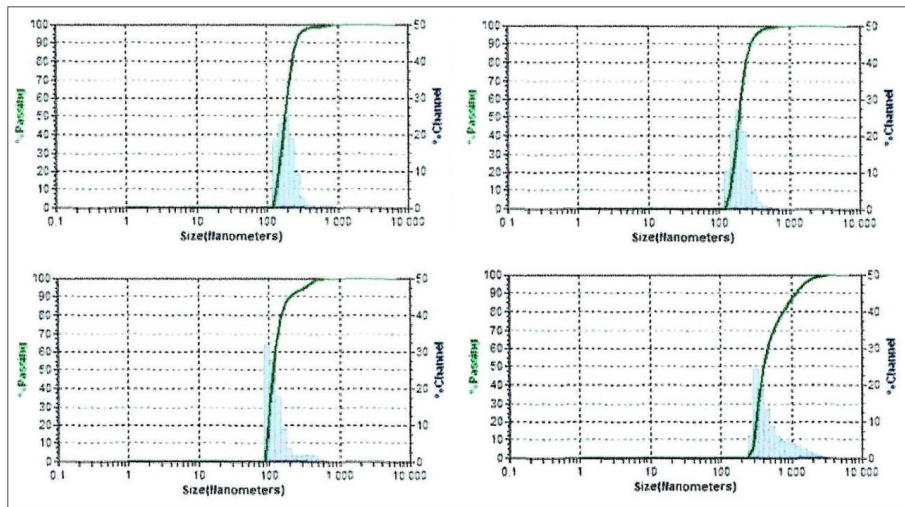


Figura 16. Gráficas del Zetatrak[®] Ultra, correspondientes a la población con tamaños de partícula inferiores a 1000 nm de la formulación M-AmB a las 24 horas.

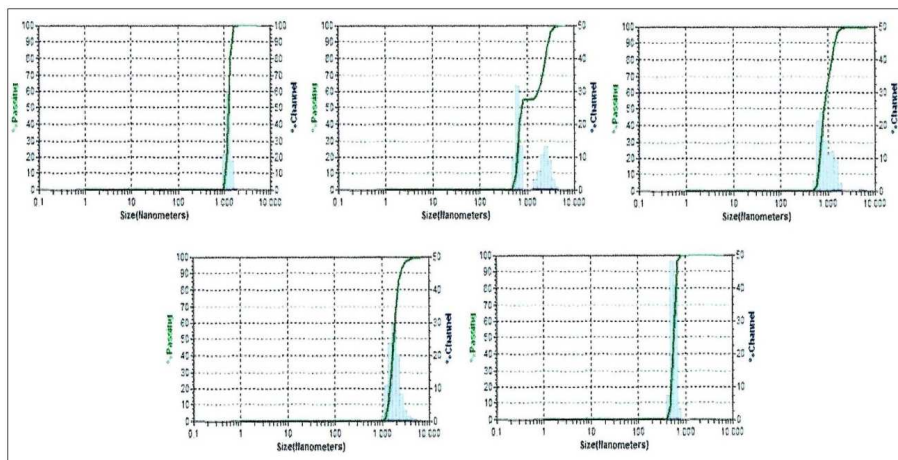


Figura 17. Gráficas del Zetatrak[®] Ultra, de las poblaciones con tamaños de partícula superiores a 1000 nm de la formulación M-AmB a las 24 horas.

Tras 24 horas de almacenamiento y agitación en Vortex® antes del análisis, se observa un aumento en la dispersión del tamaño de partícula. La población con menores tamaños de partícula disminuyó hasta el 44,4% ($229,2 \pm 125,7$ nm) y el porcentaje de la población más grande ($1708,8 \pm 545,5$ nm) mostró un acusado incremento (27,1%). Además, en este corto intervalo de tiempo (24 horas desde la elaboración de las formulaciones), se observa la aparición de una nueva población con un tamaño de partícula intermedio ($651,3 \pm 89,0$ nm) en un porcentaje considerable (25,5%).

Al cabo de 7 días, se observa un cambio en la dispersión de los tamaños de partícula de la formulación M-AmB, con respecto a los valores obtenidos a tiempo 0, tal y como aparece recogido la tabla 7 y en la figura 18.

Otros autores, como Zu y col., 2014, han obtenido similares resultados en estudios con anfotericina B. Estos datos indican claramente una mayor inestabilidad física de la anfotericina B en metanol, debido a los cambios en el tamaño de partícula de la forma monomérica durante las primeras 24 horas de almacenamiento.

Estos cambios en un periodo de tiempo tan corto deberían ser tenidos en cuenta y evaluados a la hora de elaborar nuevas formulaciones de anfotericina B debido al hecho de que el aumento del tamaño de partícula del fármaco produce cambios en la distribución a distintos órganos.

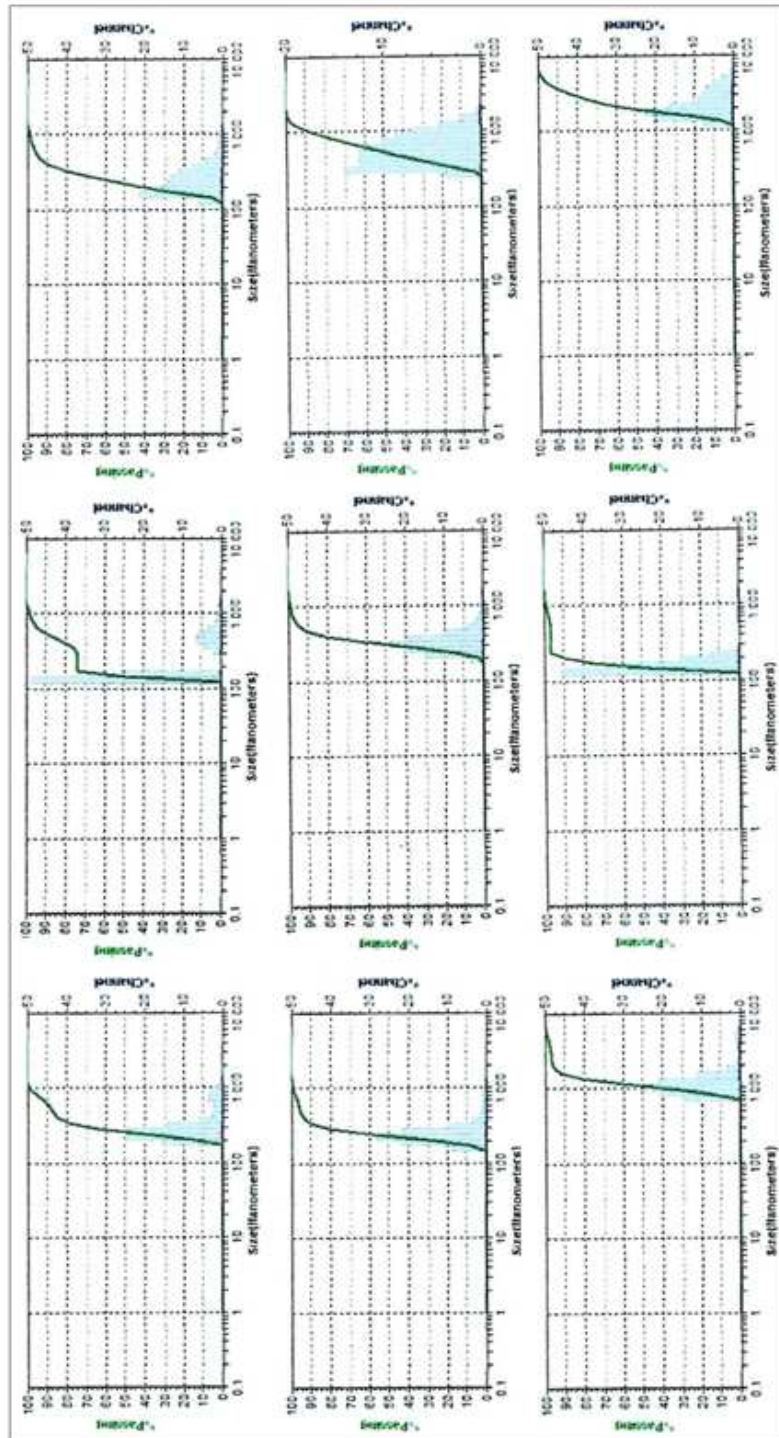


Figura 18. Gráficas del Zetatrac® Ultra, correspondientes a los tamaños de partícula de la formulación M-AmB a los 7 días.

En relación a las formulaciones poliagregadas AmB:DCH, se establece una sola población con tamaños de partícula entre 400-500 nm, cuyos datos aparecen recogidos en la tabla 9.

Formulación	Diámetro medio \pm desviación estándar (nm)		
	0 horas	24 horas	7 días
AmB:DCH 1:0	514,8 \pm 35,5	481,0 \pm 32,0	480,0 \pm 31,3
AmB:DCH 1:0,8	456,3 \pm 2,7	459,8 \pm 4,5	453,6 \pm 2,2
AmB:DCH 1:1,5	404,9 \pm 1,7	406,4 \pm 2,9	405,7 \pm 5,7

Tabla 9. Tamaño medio de partícula de las formulaciones poliagregadas AmB:DCH 1:0, AmB:DCH 1:0.8 y AmB:DCH 1:1.5 a tiempo 0, 24 horas y 7 días.

Como se ha expuesto anteriormente y tal y como se observa en la tabla 9, la formulación de referencia sin desoxicolato AmB:DCH 1:0 presenta un tamaño de partícula próximo a 500 nm a tiempo 0, lo que coincide con los datos obtenidos en el Capítulo I, durante el estudio de las características farmacotécnicas de las formulaciones. Otros autores, como Moreno-Rodríguez y col., 2015, utilizando formulaciones de referencia similares obtuvieron tamaños de partícula muy superiores (1800 nm frente a 514,8 nm) con tiempos de agitación más cortos (2 minutos frente a 4 minutos) y menor velocidad de agitación (2200 rpm frente a 2400 rpm). Esto indica la importancia del método seguido a la hora de elaborar las formulaciones así como los distintos análisis.

Ha sido demostrado que las condiciones de agitación son una herramienta fundamental a la hora de obtener sistemas poliagregados de anfotericina B de pequeño tamaño, tal y como exponen otros autores (Zu y col., 2014). Tamaños de partícula superiores a 1 μm no son considerados sistemas nanoparticulares. Por lo tanto, como se ha indicado anteriormente, el tamaño de partícula que se busca en este tipo de formulaciones parenterales es no superando los 1000 nm.

Como se observa en la figura 19, las gráficas correspondientes a los resultados del tamaño de partícula obtenidos en la formulación AmB:DCH 1:0, con las 3 medias que realiza el equipo por cada muestra analizada, confirman la fiabilidad y repetibilidad del método seguido para determinar el tamaño de partícula de la formulación, dado que las 3 medias reflejan resultados similares.

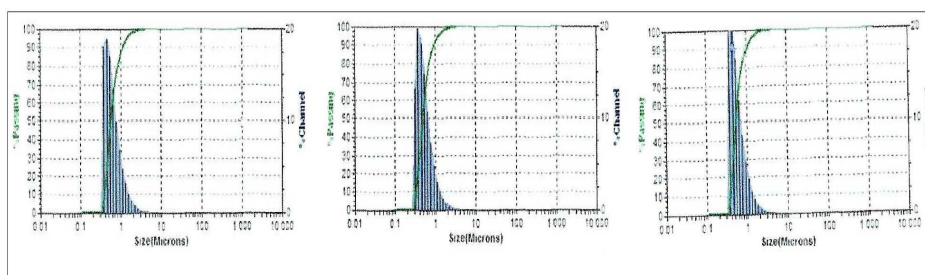


Figura 19. Gráficas del Microtrac[®] S-3500, correspondientes a las 3 medias de las medidas realizadas del tamaño de partícula de la formulación poliagregada AmB:DCH 1:0 a tiempo 0.

Al cabo de 24 horas, se observa un descenso significativo ($P < 0,05$) en el tamaño de partícula de la formulación sin desoxicolato (AmB:DCH 1:0) obteniéndose un valor de $481,1 \pm 32,0$ nm.

Sin embargo, se obtuvieron desviaciones estándar muy elevadas lo que supone una cierta inestabilidad tras 24 horas de almacenamiento de la anfotericina B en medio acuoso.

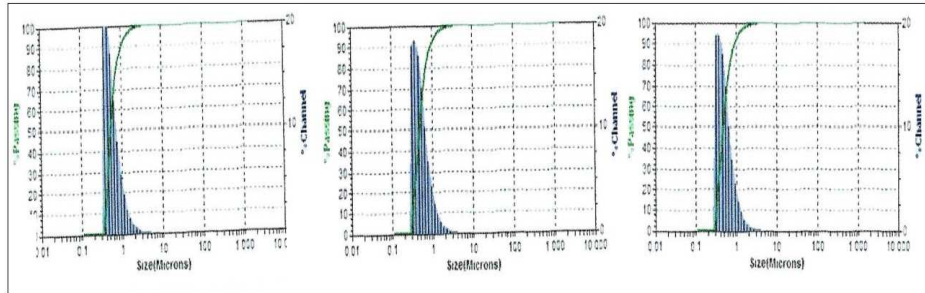


Figura 20. Gráficas del Microtrac® S-3500, correspondientes a las 3 medias de las medidas realizadas del tamaño de partícula de la formulación poliagregada AmB:DCH 1:0 a las 24 horas.

A los 7 días, se mantuvo el descenso en el tamaño de partícula de la formulación de referencia (tabla 8), así como una elevada desviación estándar. En este caso, pasados los 7 días, el porcentaje de partículas de ese tamaño que pasan a través del filtro del equipo es muy pequeño (20 %).

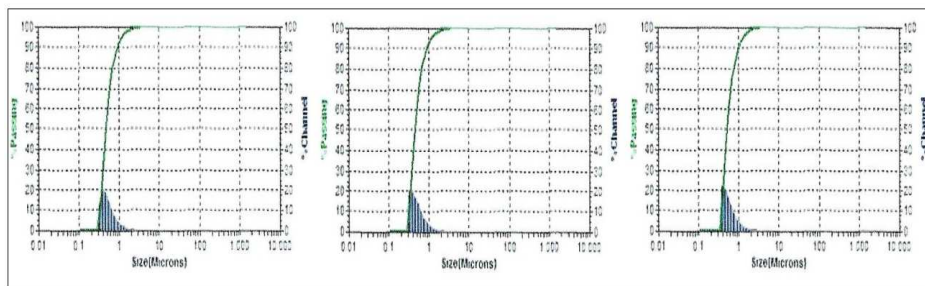


Figura 21. Gráficas del Microtrac® S-3500, correspondientes a las 3 medias de las medidas realizadas del tamaño de partícula de la formulación poliagregada AmB:DCH 1:0 a los 7 días.

Como se observa en la figura 22, en la que se compara el tamaño de partícula de la formulación AmB:DCH 1:0 a tiempo 0, 24 horas y 7 días, se produce un descenso en el tamaño de partícula a las 24 horas que permanece constante a los 7 días. Sin embargo, cabe destacar que disminuye de manera drástica el porcentaje de partículas de tamaño medio próximo a 500 nm que pasan por el canal del equipo al cabo de 7 días (inferior al 20%).

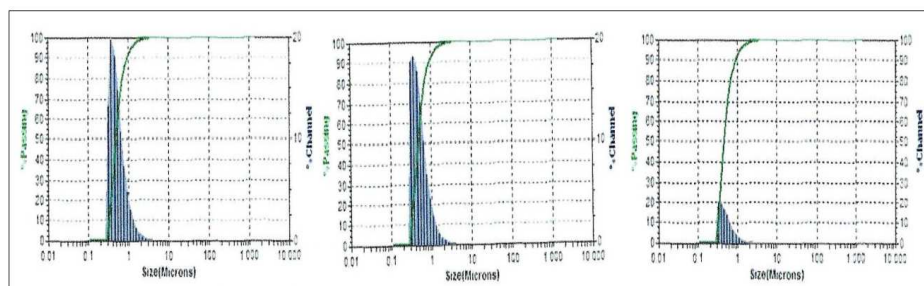


Figura 22. Comparativa de las gráficas del Microtrac[®] S-3500, correspondientes a las medias de los tamaños de partícula de la formulación AmB:DCH 1:0 a tiempo 0, 24 horas y 7 días.

En relación a las formulaciones poliagregadas AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5, tal y como se exponía al inicio de este apartado, a tiempo 0 observamos que el tamaño de partícula se va a ver afectado por la presencia de desoxicolato sódico, confirmando lo que observábamos en el estudio de las características farmacotécnicas de estas formulaciones.

Si comparamos el tamaño de partícula de estas dos formulaciones ($456,3 \pm 2,7$ nm, para AmB:DCH 1:0,8 y $404,9 \pm 1,7$ nm, para AmB:DCH 1:1,5) con el tamaño de partícula de la formulación de referencia AmB:DCH 1:0 ($514,8 \pm 34,2$ nm), se observa que la presencia de desoxicolato sódico disminuye el tamaño de manera significativa ($P < 0,05$ y $P < 0,001$, respectivamente). A su vez, existen también diferencias significativas ($P < 0,001$) entre los tamaños obtenidos con las dos formulaciones poliagregadas con distinta proporción de desoxicolato AmB:DCH 1:0,8 and AmB:DCH 1:1,5.

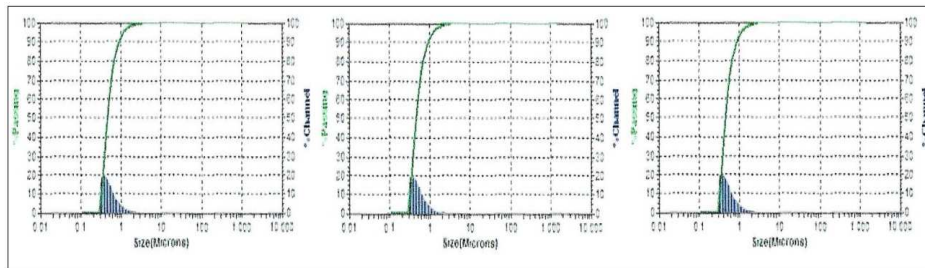


Figura 23. Gráficas del Microtrac[®] S-3500, correspondientes a las 3 medias de las medidas realizadas del tamaño de partícula de la formulación poliagregada AmB:DCH 1:0,8 a tiempo 0.

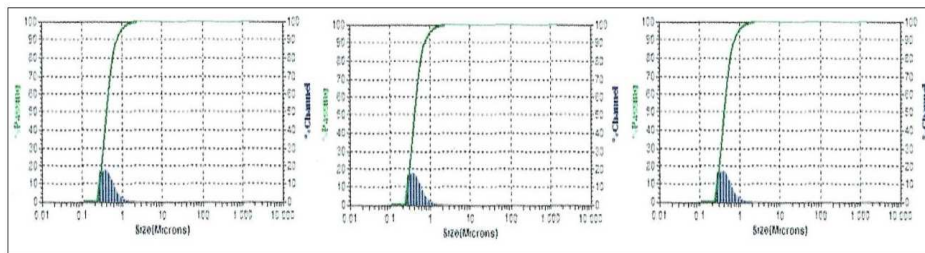


Figura 24. Gráficas del Microtrac[®] S-3500, correspondientes a las 3 medias de las medidas realizadas del tamaño de partícula de la formulación poliagregada AmB:DCH 1:1,5 a tiempo 0.

Al cabo de 24 horas y durante todo el estudio de estabilidad (7 días), el tamaño de partícula permanece estable sin cambios significativos ($P>0,05$), tanto en el tamaño como en los valores de desviación estándar. Las figuras 25 y 26 muestran las gráficas correspondientes a los tamaños de partícula de cada una de las formulaciones a tiempo 0, 24 horas y 7 días.

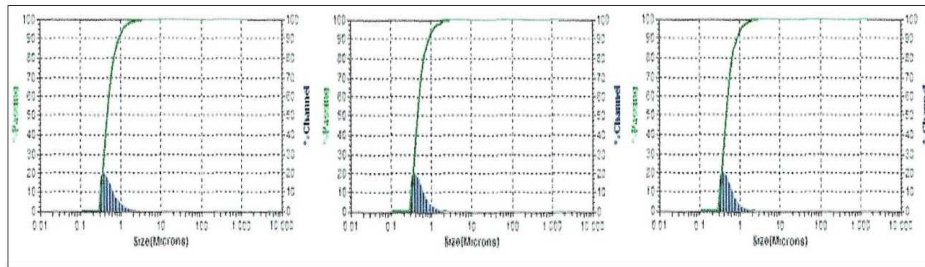


Figura 25. Comparativa de las gráficas del Microtrac® S-3500, correspondientes a las medias de los tamaños de partícula de la formulación AmB:DCH 1:0,8 a tiempo 0, 24 horas y 7 días.

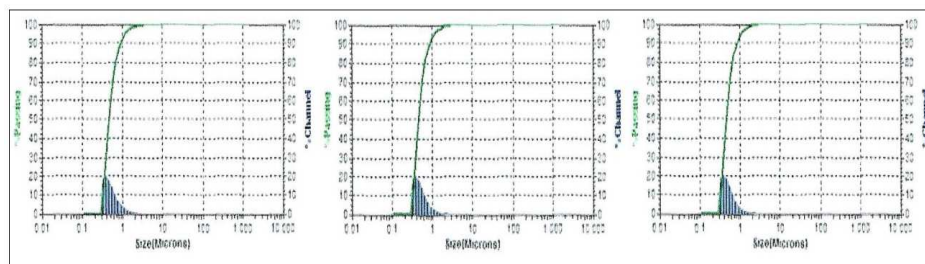


Figura 26. Comparativa de las gráficas del Microtrac® S-3500, correspondientes a las medias de los tamaños de partícula de la formulación AmB:DCH 1:1,5 a tiempo 0, 24 horas y 7 días.

Es importante remarcar que estas formulaciones presentan no sólo tamaños de partícula pequeños, sino que también tienen valores de desviación estándar muy bajos. Esta baja variabilidad se atribuye al efecto estabilizante del desoxicolato sódico mediante interacciones iónicas con la anfotericina B, tal y como exponen distintos autores (Wang y col., 2016), dando lugar a sistemas micelares más homogéneos. En estas formulaciones de anfotericina B, el desoxicolato sódico actúa inhibiendo la agregación de las partículas, por lo que el efecto del surfactante será un factor crucial en los sistemas nanoparticulares de anfotericina B (Faustino y col., 2015; Zu y col., 2014).

El uso de surfactantes como agentes estabilizantes ha sido previamente expuesto por diferentes autores (Khannanov y col., 2016; Moreno-Rodríguez y col., 2015). Al igual que la variación en la proporción de desoxicolato sódico varía el tamaño de partícula obtenido en los sistemas micelares poliagregados de anfotericina B, otros autores, como Tan y col., 2010, han observado cómo la inclusión de surfactantes tanto iónicos como no iónicos en diferentes proporciones modificaba el tamaño de partícula de nanosistemas de anfotericina B.

Por último, cabe destacar que los distintos tamaños de partícula observados en las formulaciones poliagregadas de anfotericina B (400-500 nm) y la formulación comercial Ambisome[®] (100 nm) influirán en la distribución del fármaco en los distintos órganos que se estudiarán en capítulos posteriores.

4.3. Cuantificación de anfotericina B por HPLC

En este ensayo, se utilizan las mismas formulaciones de referencia que en los otros dos estudios correspondientes al ensayo de estabilidad: la formulación patrón utilizando metanol como solvente (M-AmB) y la formulación con anfotericina B sin tensioactivo, usando agua como solvente (AmB:DCH 1:0). Ambos preparados fueron comparados con las dos formulaciones con distintas proporciones de tensioactivo (AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5).

La cuantificación de anfotericina B de cada formulación citada anteriormente se realizó mediante una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), previamente publicado por otros autores (Groeschke y col., 2006) en el estudio de la estabilidad de formulaciones líquidas de anfotericina B utilizadas en enjuagues bucales. Este método ha sido adaptado para el propósito de este trabajo, de manera que permita conocer la estabilidad de las formulaciones poliagregadas de estudio.

Para determinar la degradación de anfotericina B y la aparición o no de posibles productos de degradación, se considera como 100% a las concentraciones iniciales de anfotericina B a tiempo 0. Las concentraciones de anfotericina B obtenidas a las 24 horas y a los 7 días son expresadas como porcentajes de la concentración inicial de fármaco, indicándose los porcentajes de los posibles productos de degradación que se expresan referidos como porcentaje de anfotericina B.

La tabla 10 muestra los porcentajes correspondientes a las concentraciones de anfotericina B \pm desviación estándar (SD), obtenidas durante el estudio de estabilidad (a tiempo 0, 24 horas y 7 días) de cada una de las formulaciones estudiadas.

Formulación	0 horas		24 horas		7 días	
	TR (min)	% AmB	TR (min)	% AmB \pm SD	TR (min)	% AmB \pm SD
M-AmB	16,14	100	16,80	98,56 \pm 1,05	16,27	91,15 \pm 1,25
AmB:DCH 1:0	15,81	100	15,73	89,31 \pm 2,37	15,94	81,01 \pm 1,56
AmB:DCH 1:0,8	16,68	100	15,59	98,77 \pm 2,69	15,97	96,14 \pm 5,25
AmB:DCH 1:1,5	15,82	100	15,51	101,41 \pm 1,25	15,85	95,85 \pm 4,47

Tabla 10. Tiempos de retención (TR) y porcentajes de anfotericina B (AmB) a tiempo 0, 24 horas y 7 días en las formulaciones estudiadas.

A tiempo 0, ninguna de las formulaciones presenta picos de degradación, tal y como se observa en la tabla 10. Esto es debido al corto intervalo de tiempo que pasa entre la elaboración de la formulación y la lectura inmediata en el cromatógrafo.

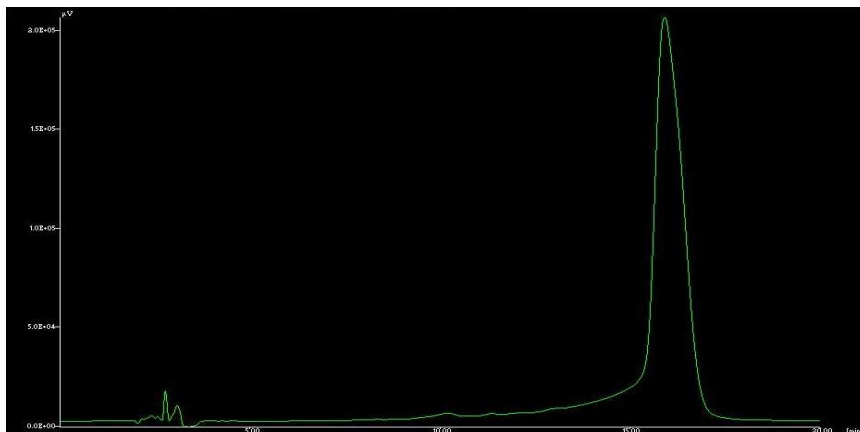


Figura 27. Pico de anfotericina B en la formulación M-AmB a tiempo 0.

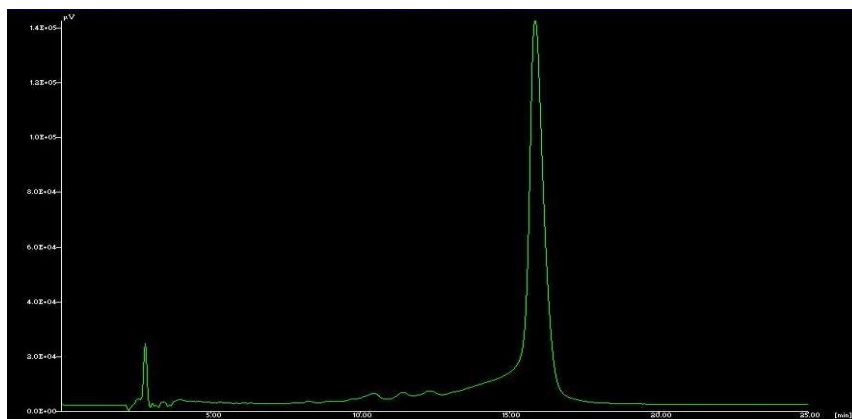


Figura 28. Pico de anfotericina B en la AmB:DCH 1:0 a tiempo 0.

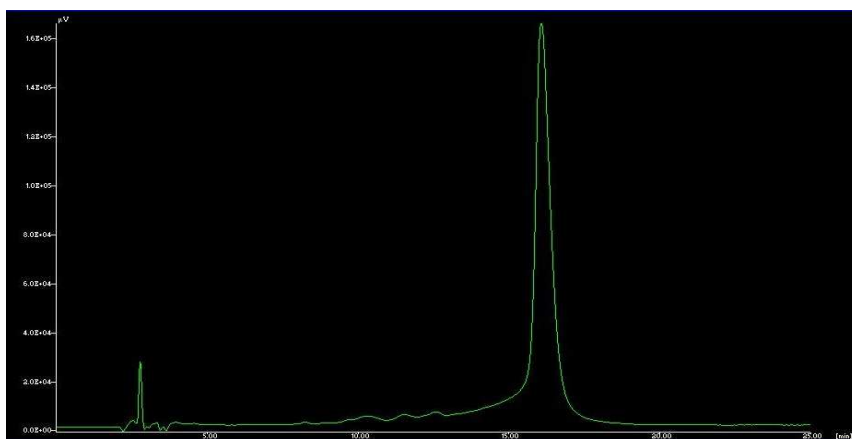


Figura 29. Pico de anfotericina B en la AmB:DCH 1:0,8 a tiempo 0.

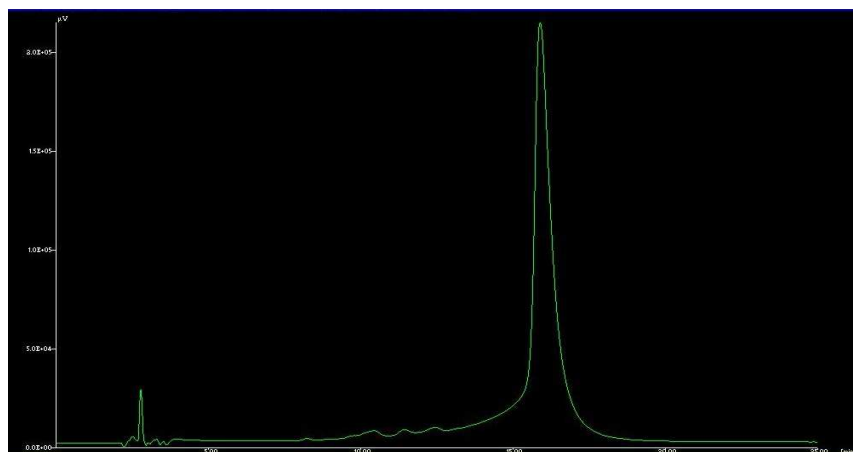


Figura 30. Pico de anfotericina B en la AmB:DCH 1:1,5 a tiempo 0.

La tabla 11 recoge los resultados obtenidos correspondientes a los posibles productos de degradación de la anfotericina B durante el estudio de estabilidad (a tiempo 0, 24 horas y 7 días) de cada una de las formulaciones estudiadas.

Formulación	0 horas		24 horas		7 días	
	TR (min)	% producto \pm SD	TR (min)	% producto \pm SD	TR (min)	% producto \pm SD
M-AmB	-	-	-	-	6,81	0,38 \pm 0,03
	-	-	8,75	1,77 \pm 0,02	8,77	12,21 \pm 0,41
AmB:DCH 1:0	-	-	8,22	0,12 \pm 0,01	8,24	0,15 \pm 0,01
AmB:DCH 1:0,8	-	-	8,16	0,10 \pm 0,01	8,22	0,13 \pm 0,01
AmB:DCH 1:1,5	-	-	8,19	0,08 \pm 0,01	8,22	0,09 \pm 0,01

Tabla 11. Tiempos de retención (TR) y porcentajes de productos de degradación de anfotericina B a tiempo 0, 24 horas y 7 días en las formulaciones estudiadas

Al cabo de 24 h, el porcentaje de anfotericina B de la formulación patrón en metanol (M-AmB) sufre un ligero descenso ($98,56 \pm 1,05\%$). Es necesario recordar que en el espectro de esta formulación, se observaba un desplazamiento de los picos característicos de esta forma monomérica de anfotericina B. Por lo tanto, en este caso, al no haber grandes cambios en el porcentaje de anfotericina B, los cambios previamente observados en la figura 10, se atribuyen principalmente a cambios físicos en el estado de agregación.

Sin embargo, transcurrido este intervalo de tiempo (24 horas), se observa un pico con un tiempo de retención menor al correspondiente de la anfotericina B para esta fase móvil, lo que indica un posible producto de degradación del fármaco, que puede estar relacionado con las diferentes poblaciones que encontrábamos en el tamaño de partícula, recogidos en la tabla 7. En este caso, se observaba como la población de menor tamaño disminuía a la vez que aumentaba la población con mayores tamaños de partícula.

Al cabo de 7 días, esta formulación mostró un descenso significativo ($P < 0,001$) en el porcentaje de anfotericina B presente en la formulación ($91,15 \pm 1,25\%$), tal y como se observa en la tabla 9. A su vez, el pico correspondiente a un posible producto de degradación observado a las 24 horas (tabla 10), aumenta hasta un porcentaje de anfotericina B de $12,21 \pm 0,41\%$, lo que demuestra la especificidad del método.

Transcurridos 7 días, aparece un nuevo pico con un tiempo de retención mucho más bajo, lo que concuerda con lo expuesto en el apartado del tamaño de partícula, relativo a la dispersión de las tres poblaciones (tabla 7).

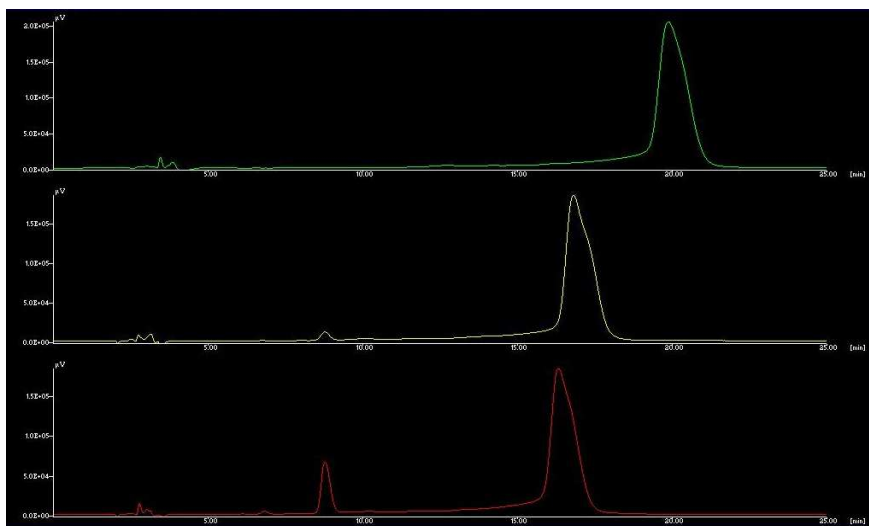


Figura 31. Cromatograma de anfotericina B en la formulación M-AmB a tiempo 0, 24 horas y 7 días.

La otra formulación de referencia utilizada es la correspondiente a la anfotericina B en agua sin presencia de tensioactivo (AmB:DCH 1:0). En este caso, dicha formulación sufre un importante descenso del porcentaje de anfotericina B presente en la formulación al cabo de 24 horas ($P < 0,001$).

Esto puede ser debido a que la anfotericina B en agua es menos estable, tal y como exponen distintos autores (Gangadhar y col., 2014), lo que dificulta la redispersión y por tanto la homogeneidad de la formulación a la hora de cuantificar la cantidad de anfotericina B presente durante el estudio de estabilidad.

Por otro lado, la ausencia de desoxicolato en la formulación favorece la auto-agregación de anfotericina B en medio acuoso (Zu y col., 2014).

Durante este intervalo de tiempo, tal y como se observa en la tabla 9, aparece un nuevo pico en el cromatograma con un tiempo de retención similar al observado en la formulación M-AmB, lo que indica una posible degradación de anfotericina B.

Al cabo de 7 días, al contrario de lo que ocurría con la formulación patrón de anfotericina B, cuyo pico iba aumentando, en este caso el pico permanece estable. Sin embargo, el porcentaje de anfotericina B presente en la formulación disminuye drásticamente hasta un $81,01 \pm 1,56\%$, lo que confirmaría un auto-agregación de anfotericina B en agua, imposibilitando la dispersión total de las partículas, tal y como se explicaba anteriormente.

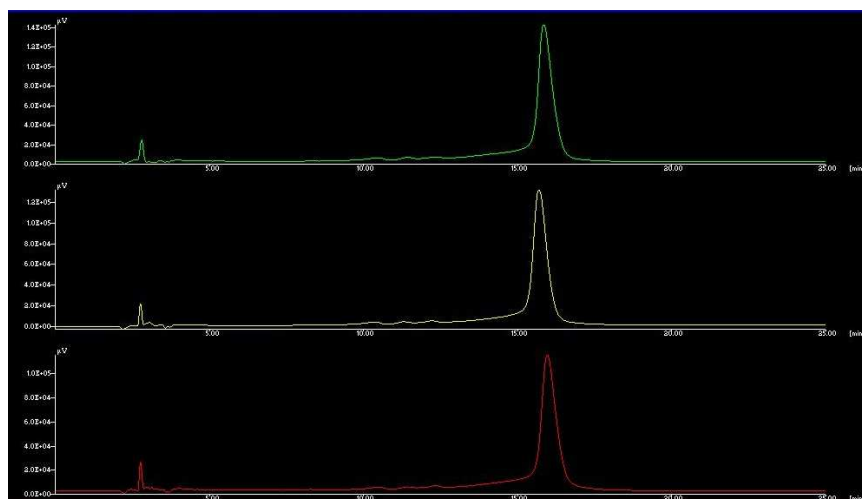


Figura 32. Cromatogramas de anfotericina B en la formulación AmB:DCH 1:0 a tiempo 0, 24 horas y 7 días.

Las dos formulaciones con distintas proporciones de tensioactivo (AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5) presentan un cromatograma muy parecido, sin cambios significativos ($P>0,05$) con valores elevados de anfotericina B al cabo de 24 horas y 7 días (tabla 9). Cabe destacar la formulación AmB:DCH 1:1,5, ya que a las 24 horas apenas se observa degradación de anfotericina B.

Cuando se analizó el tamaño de partícula de estas formulaciones al cabo de 24 horas, no se producían cambios en el tamaño de partícula (tabla 8). Sin embargo, en los espectros correspondientes (figuras 13 y 14), se observaba un desplazamiento de los picos lo que podría atribuirse, al igual que ocurría con la formulación patrón, a cambios físicos de la anfotericina B.

Al cabo de 7 días, el porcentaje de anfotericina B sigue siendo muy elevado (próximo al 95% en ambas formulaciones), lo que indica que la presencia de desoxicolato estabiliza la formulación, impidiendo la auto-agregación de anfotericina B y facilitando la redispersión de las formulaciones con tensioactivo (Wang y col., 2016).

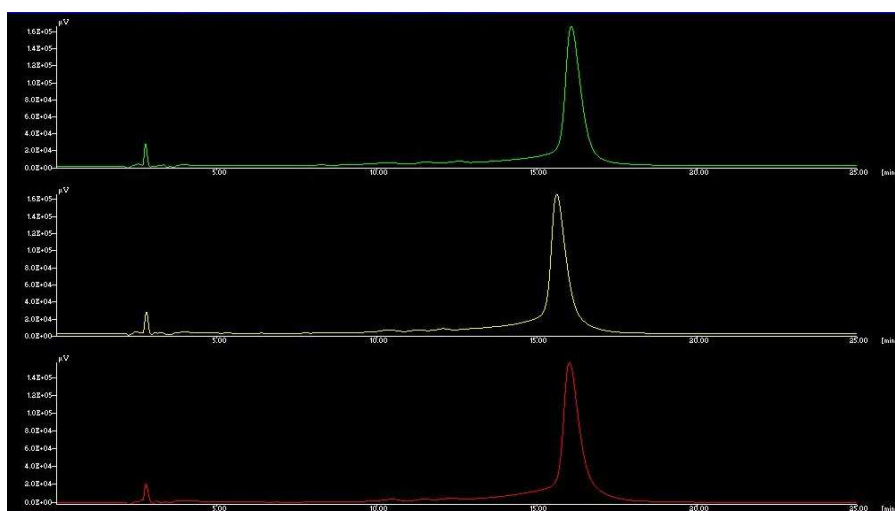


Figura 33. Cromatogramas de anfotericina B en la formulación AmB:DCH 1:0,8 a tiempo 0, 24 horas y 7 días.

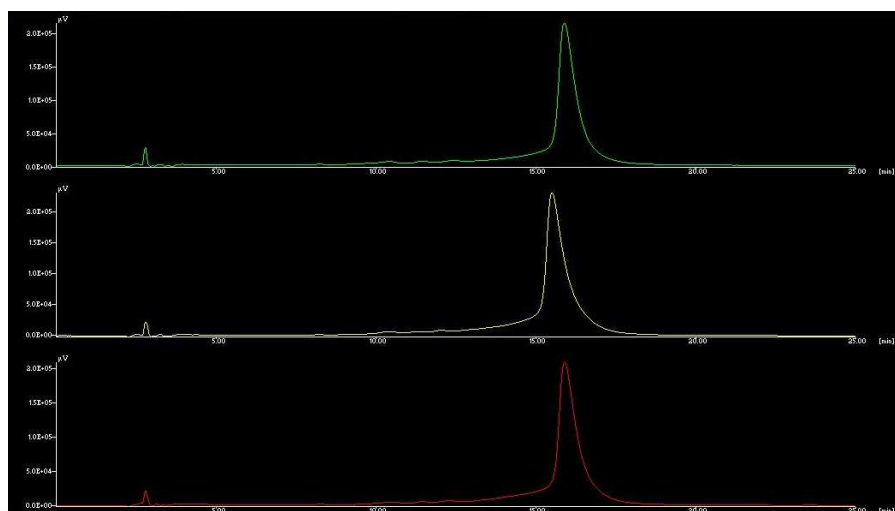


Figura 34. Cromatogramas de anfotericina B en la formulación AmB:DCH 1:1,5 a tiempo 0, 24 horas y 7 días.

Tal y como se observa en las figuras 33 y 34, a pesar de los elevados porcentajes de anfotericina B en estas formulaciones, también aparece un pico con un tiempo de retención similar a los correspondientes a las dos formulaciones de referencia (patrón y AmB:DCH 1:0) a las 24 horas. Este pico, como hemos indicado anteriormente, no se corresponde con la anfotericina B y podría hacer referencia a un producto de degradación del fármaco o algún tipo de reacción producida en la formulación.

Al cabo de 7 días, dichos picos permanecen estables, siendo en ambos casos inferiores a los obtenidos en las dos formulaciones de referencia (M-AmB y AmB:DCH 1:0). Estos resultados confirmarían que la estabilidad del fármaco va a depender del estado de agregación (Gangadhar y col., 2014).

5. DISCUSIÓN

Los cambios observados en los espectros de las formulaciones poliagregadas al cabo de 24 horas y 7 días podrían estar relacionados con ligeros cambios en las interacciones moleculares de las formas poliagregadas. Otros autores, como Lincopan y col., 2003, han expuesto previamente que los cambios conformacionales de los polienos debido a diferentes interacciones moleculares como la agregación de las partículas podría afectar a los espectros de absorción, lo que confirmaría las variaciones observadas en todos los casos, hacia menores longitudes de onda.

Tal y como se expuso en el Capítulo I, para obtener nanosistemas poliagregados de anfotericina B, es fundamental mantener unas condiciones de agitación que permitan obtener sistemas micelares más homogéneos (Zu y col., 2014), así como el uso de surfactantes como agentes estabilizantes de la formulación inhibiendo la agregación de las partículas (Dangi y col., 1998; Zu y col., 2014). Al cabo de los 7 días de estudio, se observa como la presencia de desoxicolato mejora las características de las formulaciones manteniendo el tamaño de partícula.

Otros autores, como Tan y col., 2010, han observado cómo la inclusión de surfactantes tanto iónicos como no iónicos en diferentes proporciones modifican el tamaño de partícula de nanosistemas de anfotericina B.

La especificidad del método de HPLC para la cuantificación de anfotericina B durante el estudio de estabilidad, se observa con la aparición de nuevos picos a los 6 y 8 minutos mientras que el pico de anfotericina B aparece a los 16 minutos. De esta manera, los nuevos picos de las muestras que aparecen al cabo de 24 horas y 7 días pueden ser atribuidos a posibles productos de degradación.

Dado que las nuevas formulaciones no presentan cambios significativos en el contenido de anfotericina B durante el estudio de estabilidad, podría confirmarse que los cambios observados en los espectros de estas formulaciones poliagregadas al cabo de 24 horas, deberían ser principalmente atribuidos a un cambio físico del estado de agregación. Además, las nuevas formulaciones poliagregadas son más estables que la formulación monomérica, mostrando menores porcentajes de degradación. Estos resultados confirman que la estabilidad de la anfotericina B depende del estado de agregación del fármaco (Gangadhar y col., 2014).

6. BIBLIOGRAFÍA

- Dangi, J.S., Vyas, S.P., Dixit, V.K. The role of mixed micelles in drug delivery. I. Solubilization. *Drug Dev Ind Pharm.* 1998; 24(7):681-684.
- Espada, R., Valdespina, S., Alfonso, C., Rivas, G., Ballesteros, M.P., Torrado, J.J. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *Int J Pharm.* 2008; 36(1-2):64-69.
- Faustino, C., Serafim, C., Ferreira, I., Pinheiro, L., Calado, A. Solubilization power of amino acid-based gemini surfactant towards the hydrophobic drug amphotericin B. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2015; 480:426-432.
- Gangadhar, K.N., Adhikari, K., Srichana, T. Synthesis and evaluation of sodium deoxycholate sulfate as a lipid drug carrier to enhance the solubility, stability and safety of an amphotericin B inhalation formulation. *Int J Pharm.* 2014; 471(1-2):430-438.
- Groeschke, J., Solassol, I., Bressolle, F., Pinguet, F. Stability of amphotericin B and nystatin in antifungal mouthrinses containing sodium hydrogen carbonate. *J Pharm Biomed Agents.* 2006; 42(3):362-366.
- Khannanov, A.A., Kutyreva, M.P., Ulakhovich, N.A., Gataulina, A.R., Bondar, O.V., Zakharova, L.Y., Kutyrev, G.A. Hyperbranched polyester polyacids and their binary systems with surfactants for doxorubicin encapsulation. *Fluid Pha Equi.* 2016; 411:93-100.
- Lincopan, N., Mamizuka, E.M., Carmona-Ribeiro, A.M. In vivo activity of a novel amphotericin B formulation with synthetic cationic bilayer fragments. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 52(3):412-418.

- Moreno-Rodríguez, A.C., Torrado-Durán, S., Molero, G., García-Rodríguez, J.J., Torrado-Santiago, S. Efficacy and toxicity evaluations of new amphotericin B micelle systems for brain fungal infections. *Int J Pharm.* 2015; 494(1):17-22.
- Rodrigues, L., Ribeiro, F., Ferreira, D., Frézard, F., Crocco, L.C., Miranda, L.A. Nanoemulsions loaded with amphotericin B: A new approach for the treatment of leishmaniasis. *Europ J Pharm Sci.* 2015; 70:125-131.
- Selvam, S., Andrews, M.E., Mishra, A.K. A photophysical study on the role of bite salt hydrophobicity in solubilizing amphotericin B aggregates. *J Pharm Sci.* 2009; 98(11):4153-4160.
- Tan, S.W., Billa, N., Roberts, C.R., Burley, J.C. Surfactant effects on the physical characteristics of amphotericin B-containing nanostructured lipid carriers. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2010; 372:73-79.
- Wang, Y., Ke, X., Voo, Z.X., Yap, S.S.L., Yang, C., Gao, S., Liu, S., Venkataraman, S., Obuobi, S.A.O., Khara, J.S., Yang, Y.Y., Ee, P.L.R. Biodegradable functional polycarbonate micelles for controlled release of amphotericin B. *Acta Biomater.* 2016; 46:211-220.
- Zhao, M., Hu, J., Zhang, L., Zhang, L., Sun, Y., Ma, N., Chen, X., Gao, Z. Study of amphotericin B magnetic liposomes for brain targeting. *Int J Pharm.* 2014; 475(1-2):9-15.
- Zu, Y., Sun, W., Zhao, X., Wang, W., Li, Y., Ge, Y., Liu, Y., Wang, K. Preparation and characterization of amorphous amphotericin B nanoparticles for oral administration through liquid antisolvent precipitation. *Eur J Pharm Sci.* 2014; 53:109-117.

**CAPÍTULO III:
ESTUDIO EN
DOSIS ÚNICA**

1. INTRODUCCIÓN

En este ensayo, se busca conocer las concentraciones de anfotericina B alcanzadas en distintos órganos 24 horas tras la administración de una dosis única intravenosa de las formulaciones seleccionadas de anfotericina B en animales inmunocompetentes.

En este caso, hay que tener en cuenta la diferente distribución a los distintos tejidos que presenta la anfotericina B en función del tamaño de partícula así como las características de cada formulación (micelar o liposomal).

Debido a razones éticas, este primer estudio in vivo se realiza en animales inmunocompetentes de manera que se contribuya al bienestar de los animales de experimentación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

En este estudio se utilizan los siguientes productos y reactivos:

- La anfotericina B fue suministrada por Bristol Myers Squibb (Barcelona, España).
- El desoxicolato de sodio (DCH) fue suministrado por Fluka Chemierl A.G. (Buchs, Suiza).

- La fórmula comercial Ambisome[®] (constituida por anfotericina B, colesterol fosfatidilcolina y diestearylfosfatidilglicerol) fue suministrada por UCB-Pharma (Bruselas, Bélgica).
- El ácido acético glacial se obtuvo de Panreac S.A. (Barcelona, España).
- El acetonitrilo y el metanol se obtuvieron de Labscan (Dublín, Irlanda).
- El agua purificada fue obtenida mediante un sistema Milli-Q (Millipore, Estados Unidos).

2.1.1. Formulaciones

Las formulaciones de anfotericina B con distintas proporciones de tensiactivo seleccionadas para el ensayo *in vivo* son las que presentan proporciones intermedias de desoxicolato sódico (AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5), a las dosis de 3,5 y 10 mg/kg.

❖ Formulaciones:

- Formulación AmB:DCH 1:0,8: se pesaron 10 mg de anfotericina B y 8 mg de desoxicolato sódico y se suspendieron en 20 ml de agua Mili Q.
- Formulación AmB:DCH 1:1,5: se pesaron 10 mg de anfotericina B y 15 mg de desoxicolato sódico y se suspendieron en 20 ml de agua Mili Q.
- Formulación M-AmB: se pesaron 10 mg de anfotericina B y se suspendieron en 500 ml de metanol.

Como formulación de referencia se utiliza la formulación comercializada Ambisome[®] a dosis de 5 y 10 mg/kg.

La formulación patrón de anfotericina B en metanol (M-AmB), a una concentración de 20 µg/ml, se utiliza para elaborar las rectas de calibración del método.

2.1.2. Animales de experimentación

El estudio de las concentraciones alcanzadas en órganos tras dosis única se llevó a cabo en ratones CD-1 (20 g), de 6 a 8 semanas de vida. Los animales permanecieron, a temperatura y humedad controladas, en el laboratorio de experimentación animal de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, de acuerdo con los principios de protección de animales de la directiva de la legislación de la Unión Europea (86/609/CE, RD 53/2013).

2.1.3. Equipos

Para la preparación de las formulaciones, se utiliza un agitador tipo Vortex® y para el tratamiento de las muestras se utiliza una centrífuga Universal 32 (Hettich Zentrifugen).

Para el análisis de las concentraciones alcanzadas a las 24 horas tras la administración única de diferentes dosis de anfotericina B con las 3 formulaciones empleadas se siguió la técnica de HPLC.

El equipo HPLC utilizado fue el mismo sistema modular Jasco[®] (Japón) utilizado para el estudio de estabilidad, con diferentes condiciones cromatográficas, de manera que el método se adapte a la finalidad de este ensayo *in vivo*:

- Columna BDS C₁₈ 5 µm de diámetro interno y 250 x 4,6 nm.
- Fase móvil: acetonitrilo: ácido acético glacial: agua (48:4,3:47,7) (v/v/v)
- Temperatura de la columna: 25°C
- Flujo de la fase móvil: 1 ml/min.
- Volumen de inyección: 100 µl.
- Longitud de onda empleada en el detector: 406 nm.
- Tiempo de análisis: 20 minutos.
- Fase de lavado: acetonitrilo: agua (50:50) (v/v).

Para filtrar la fase móvil y la fase de lavado empleadas en el equipo de HPLC se utiliza un filtro Millipore de 0,45 µm conectado a bomba de vacío y para desgasificar dichas fases, se utiliza un desgasificador de ultrasonidos.

2.2. Métodos

2.2.1. Elaboración de las formulaciones

El método de preparación seguido fue la disolución de desoxicolato sódico en agua purificada y la posterior adición de la cantidad correspondiente de anfotericina B. Se mantiene bajo agitación durante 4 minutos en un agitador tipo Vórtex[®] a una velocidad de 2400 rpm antes de su administración.

2.2.2. Puesta a punto del modelo animal

A la hora de llevar a cabo un ensayo *in vivo* es necesario conocer las características físicas de los animales y los posibles efectos adversos que pueda presentar la formulación a administrar tanto a nivel sistémico como en el lugar de la inyección.

La administración intravenosa de dosis elevadas de anfotericina B y desoxicolato sódico da lugar a procesos de flebitis y trombosis en el lugar de administración, siendo en este caso, las venas laterales de la cola del ratón. Para evitar que se produzca esta reacción, se utilizan lámparas de calor durante el proceso de administración de manera que se dilaten los capilares facilitando el proceso de inyección de las dosis.

❖ Procedimiento:

1. Inmovilización del animal por medio de un cepo específico, de manera que se puede acceder a la cola para proceder a la administración de la dosis correspondiente.
2. Presionar levemente la zona superior de la cola para mejorar la exposición de la vena. Como se ha mencionado anteriormente, las lámparas de calor favorecen la vasodilatación de las venas evitando posibles reacciones adversas en la zona de administración.
3. Cargar la jeringa con un volumen de 0,2 ml de la formulación a administrar. La aguja debe introducirse unos milímetros dado que las venas laterales de la cola suelen ser bastante superficiales.

4. Una vez introducida la jeringa, se procede a la administración de la formulación de manera continua y pausada para evitar posibles trombos o reacciones no deseadas en el lugar de administración.
5. Cuando se ha administrado todo el volumen cargado en la jeringa, debe ser retirada haciendo una leve presión en la zona para evitar sangrado.

Para estudios posteriores de dosis múltiple, es necesario desarrollar un método de administración que permita asegurar la realización de diferentes inyecciones durante días consecutivos sin que se produzcan cuadros de flebitis o necrosis de la zona de administración.

2.2.3. Puesta a punto del método analítico por HPLC

De manera que se pueda conocer la concentración de anfotericina B alcanzada en los distintos órganos a las 24 horas tras una única dosis de fármaco, es necesario seleccionar la técnica más adecuada utilizando una cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

❖ Preparación de las muestras patrón

Se pesan 10 mg de anfotericina B y se llevan a un matraz aforado de 500 ml. Se añaden 250 ml de metanol y se lleva a agitación en un agitador tipo Vortex[®], durante 2 minutos a 2400 rpm. A continuación, se enrasa con metanol hasta alcanzar los 500 ml y se lleva de nuevo a agitación en un agitador tipo Vortex[®], durante 2 minutos a 2400 rpm, hasta su completa disolución.

De la solución madre obtenida (20 µg/ml) se preparan y analizan distintas diluciones en las siguientes concentraciones 0,005, 0,015, 0,025, 0,05, 0,1, 0,5, 0,75, 0,95, 1,5, 2, 4,75, 7,5, 9,5, 12,5 µg/ml. Para su análisis en HPLC, todas las muestras se filtran con un filtro Millipore HVLP de 0,45 µm.

La figura 35 muestra el cromatograma representativo de la anfotericina B con la solución madre (formulación patrón). En estas condiciones cromatográficas, el tiempo de retención de la anfotericina B es de 5 minutos.

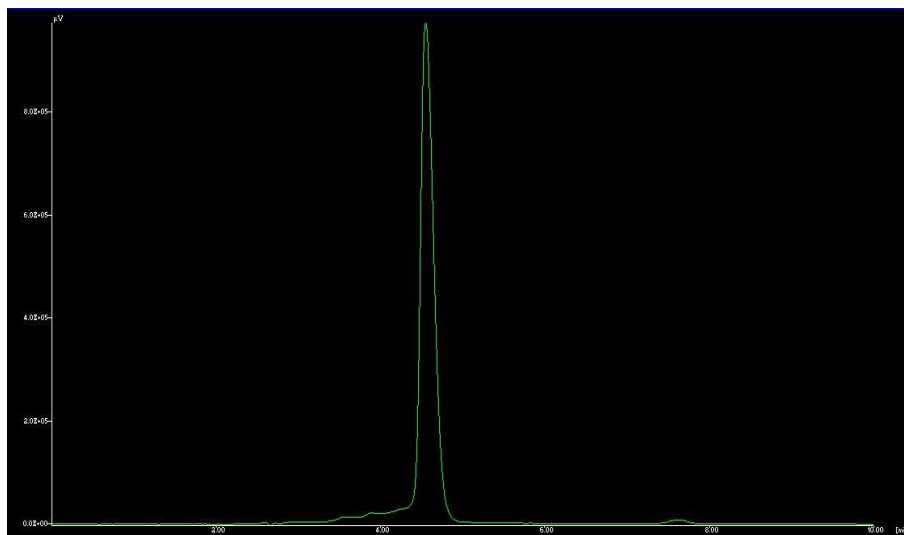


Figura 35. Cromatograma de la anfotericina B en la formulación patrón.

La recta de calibrado cumple la ley de Lambert-Beer:

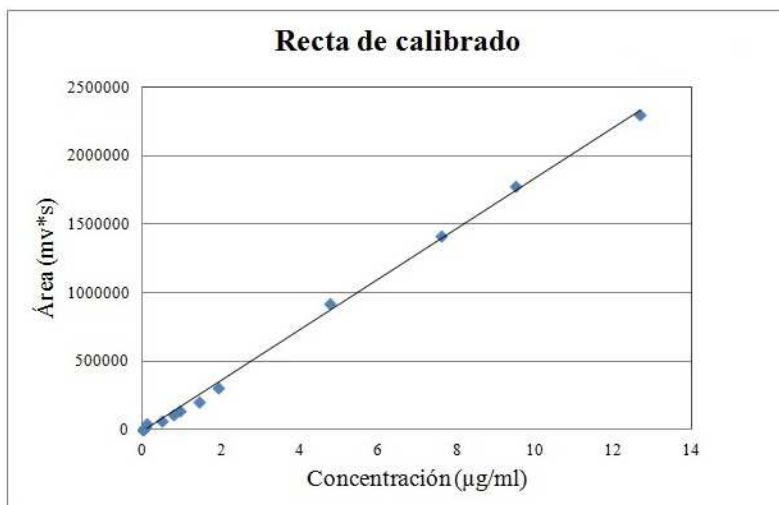


Figura 36. Recta de calibrado de las muestras patrón.

Dicha recta se ajusta a la siguiente ecuación:

$$\text{Área} = 184456 \times C - 3464 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$R^2 = 0,9982$$

$$n = 14$$

$$\text{Rango} = 0,005 - 12,5 \mu\text{g/ml}$$

A pesar de que el rango de concentraciones es muy amplio, como se espera una gran variabilidad en las concentraciones alcanzadas en los distintos órganos, se elabora una recta de calibrado con las concentraciones más elevadas y otra recta de calibrado con las concentraciones más bajas, obteniendo valores de R^2 muy similares al obtenido en la recta de calibrado inicial.

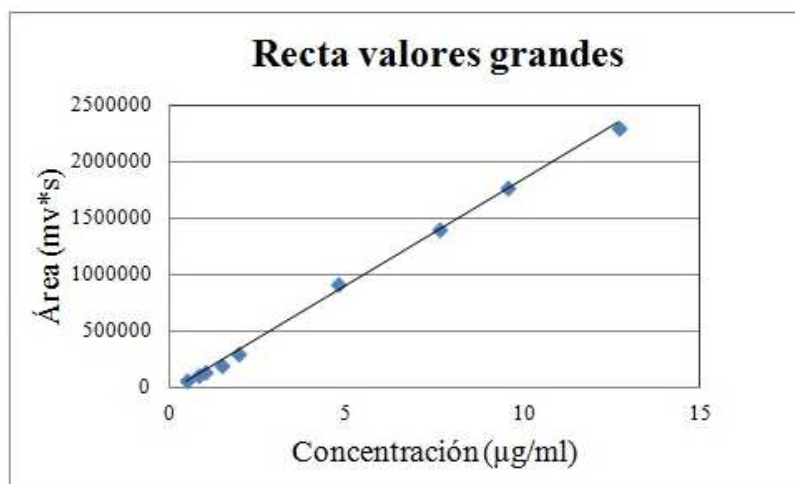


Figura 37. Recta de calibrado de las muestras patrón con concentraciones altas.

La ecuación correspondiente a la recta de calibrado con las concentraciones más altas es la siguiente:

$$\text{Área} = 187382 \times C - 28340 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$R^2 = 0,9984$$

$$n = 9$$

$$\text{Rango} = 0,5 - 12,5 \mu\text{g/ml}$$

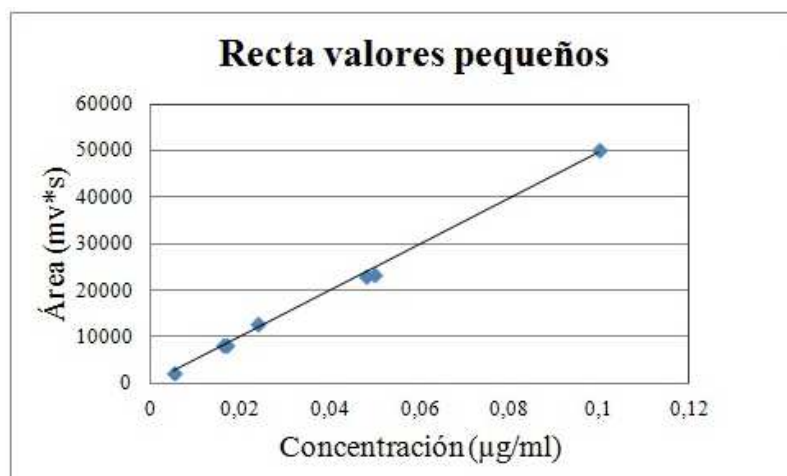


Figura 38. Recta de calibrado de las muestras patrón con concentraciones altas

La ecuación correspondiente a la recta de calibrado con las concentraciones más bajas es la siguiente:

$$\text{Área} = 494273 \times C - 285.29 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$R^2 = 0,9977$$

$$n = 5$$

$$\text{Rango} = 0,005 - 0,1 \mu\text{g/ml}$$

2.2.4. Administración de las formulaciones

Los ratones fueron divididos en 3 grupos de 6 animales cada uno. Cada grupo de ratones recibió una única administración intravenosa de las formulaciones AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5 a dosis de 3, 5 y 10 mg/kg, así como de la formulación de referencia Ambisome[®] a dosis de 5 y 10 mg/kg en un volumen de 0,2 ml.

2.2.5. Análisis de anfotericina B en muestras orgánicas

El tiempo de retención de las muestras orgánicas fue de 6-8 minutos, expresando los resultados de concentración de anfotericina B en $\mu\text{g/g}$.

❖ Muestras cardíacas

Para analizar la concentración de anfotericina B alcanzada en el corazón, los ratones fueron sacrificados a las 24 horas tras la administración y se procede a la extracción del corazón de manera aséptica. El órgano fue pesado y homogeneizado con 0,5 ml de agua Mili Q. Las muestras cardíacas fueron almacenadas en tubos Pyrex a -20°C hasta su análisis.

Previo al análisis en el HPLC y una vez descongeladas las muestras, se añaden 800 μl de metanol a 400 μl de cada muestra homogenizada. Dicho preparado se lleva a agitación en un agitador tipo Vórtex[®] durante 2 minutos a 2400 rpm. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas durante 4 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante obtenido fue de nuevo filtrado usando un filtro HVLP de 0,45 μm . El nuevo sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar durante 2 minutos a 4000 rpm y se filtró nuevamente usando un filtro HVLP de 0,45 μm .

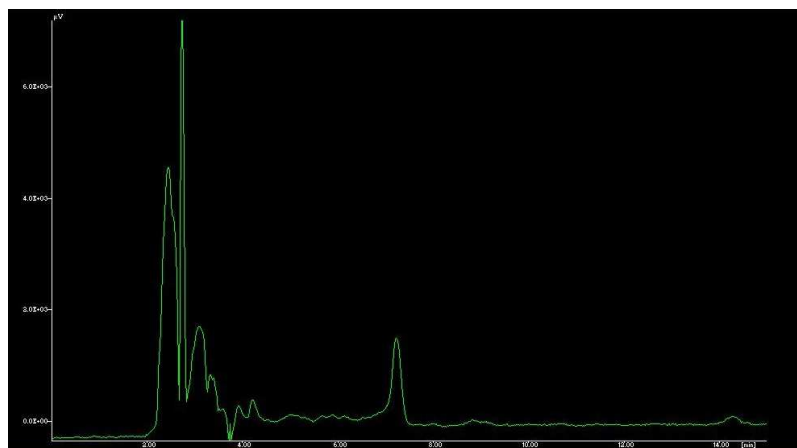


Figura 39. Cromatograma de anfotericina B en muestras cardiacas con la formulación de referencia Ambisome[®].

❖ Muestras cerebrales

Para analizar la concentración de anfotericina B alcanzada en el cerebro, los ratones fueron sacrificados a las 24 horas tras la administración y se procede a la extracción del cerebro de manera aséptica. El órgano fue pesado y homogeneizado con 0,5 ml de agua Mili Q. Las muestras cerebrales fueron almacenadas en tubos Pyrex a -20°C hasta su análisis.

Previo al análisis en el HPLC y una vez descongeladas las muestras, se añaden 800 µl de metanol a 400 µl de cada muestra homogeneizada. Dicho preparado se lleva a agitación en un agitador tipo Vórtex® durante 2 minutos a 2400 rpm. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas durante 4 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante obtenido fue de nuevo filtrado usando un filtro HVLP de 0,45 µm. El nuevo sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar durante 2 minutos a 4000 rpm y se filtró nuevamente usando un filtro HVLP de 0,45 µm.

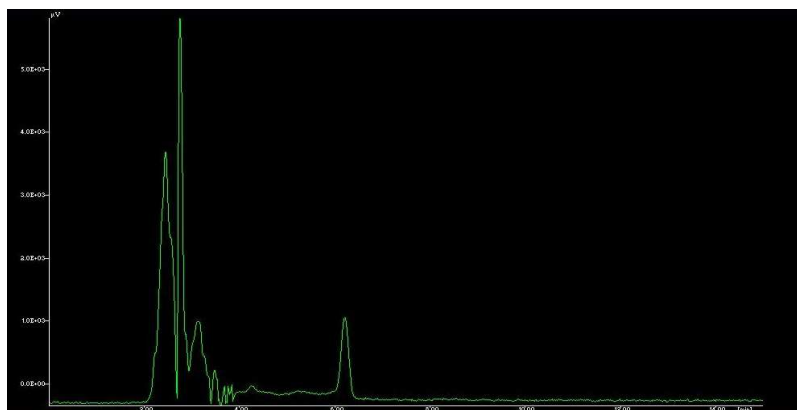


Figura 40. Cromatograma de anfotericina B en muestras cerebrales con las formulaciones AmB:DCH.

❖ Muestras pulmonares

Para analizar la concentración de anfotericina B alcanzada en los pulmones, los ratones fueron sacrificados a las 24 horas tras la administración y se procede a la extracción de los pulmones de manera aséptica. El órgano fue pesado y homogeneizado con 0,5 ml de agua Mili Q. Las muestras pulmonares fueron almacenadas en tubos Pyrex a -20°C hasta su análisis.

Previo al análisis en el HPLC y una vez descongeladas las muestras, se añaden 800 µl de metanol a 400 µl de cada muestra homogeneizada. Dicho preparado se lleva a agitación en un agitador tipo Vórtex® durante 2 minutos a 2400 rpm. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas durante 4 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante obtenido fue de nuevo filtrado usando un filtro HVLP de 0,45 µm. El nuevo sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar durante 2 minutos a 4000 rpm y se filtró nuevamente usando un filtro HVLP de 0,45 µm.

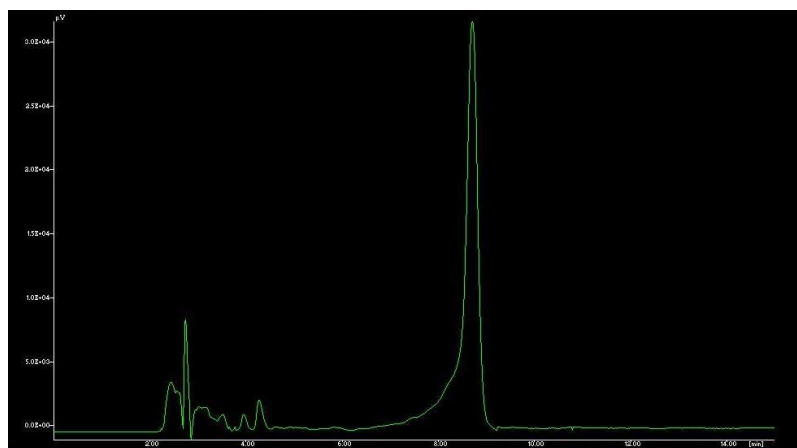


Figura 41. Cromatograma de anfotericina B en muestras pulmonares con las formulaciones AmB:DCH.

❖ Muestras renales

Para analizar la concentración de anfotericina B alcanzada en los riñones, los ratones fueron sacrificados a las 24 horas tras la administración y se procede a la extracción de los riñones de manera aséptica. El órgano fue pesado y homogeneizado con 0,5 ml de agua Mili Q. Las muestras renales fueron almacenadas en tubos Pyrex a -20°C hasta su análisis.

Previo al análisis en el HPLC y una vez descongeladas las muestras, se añaden 800 µl de metanol a 400 µl de cada muestra homogeneizada. Dicho preparado se lleva a agitación en un agitador tipo Vórtex® durante 2 minutos a 2400 rpm. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas durante 4 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante obtenido fue de nuevo filtrado usando un filtro HVLP de 0,45 µm. El nuevo sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar durante 2 minutos a 4000 rpm y se filtró nuevamente usando un filtro HVLP de 0,45 µm.

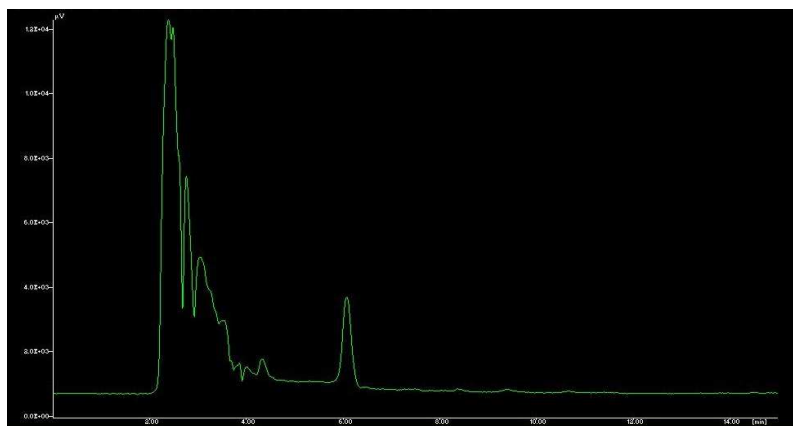


Figura 42. Cromatograma de anfotericina B en muestras renales con las formulaciones AmB:DCH.

❖ Muestras hepáticas

Para analizar la concentración de anfotericina B alcanzada en el hígado, los ratones fueron sacrificados a las 24 horas tras la administración y se procede a la extracción del hígado de manera aséptica. El órgano fue pesado y homogeneizado, en este caso, con 1 ml de agua Mili Q, debido a la magnitud de dicho órgano. Las muestras hepáticas fueron almacenadas en tubos Pyrex a -20°C hasta su análisis.

Previo al análisis en el HPLC y una vez descongeladas las muestras, se añaden 800 µl de metanol a 400 µl de cada muestra homogeneizada. Dicho preparado se lleva a agitación en un agitador tipo Vórtex[®] durante 2 minutos a 2400 rpm. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas durante 4 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante obtenido fue de nuevo filtrado usando un filtro HVLP de 0,45 µm. El nuevo sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar durante 2 minutos a 4000 rpm y se filtró nuevamente usando un filtro HVLP de 0,45 µm.

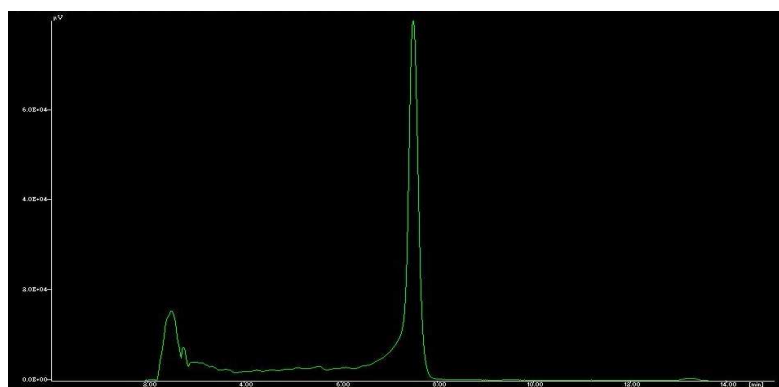


Figura 43. Cromatograma de anfotericina B en muestras hepáticas con las formulaciones AmB:DCH.

❖ Muestras esplénicas

Para analizar la concentración de anfotericina B alcanzada en el bazo, los ratones fueron sacrificados a las 24 horas tras la administración y se procede a la extracción del bazo de manera aséptica. El órgano fue pesado y homogeneizado con 0,5 ml de agua Mili Q. Las muestras esplénicas fueron almacenadas en tubos Pyrex a -20°C hasta su análisis.

Previo al análisis en el HPLC y una vez descongeladas las muestras, se añaden 800 µl de metanol a 400 µl de cada muestra homogeneizada. Dicho preparado se lleva a agitación en un agitador tipo Vórtex® durante 2 minutos a 2400 rpm. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas durante 4 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante obtenido fue de nuevo filtrado usando un filtro HVLP de 0,45 µm. El nuevo sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar durante 2 minutos a 4000 rpm y se filtró nuevamente usando un filtro HVLP de 0,45 µm.

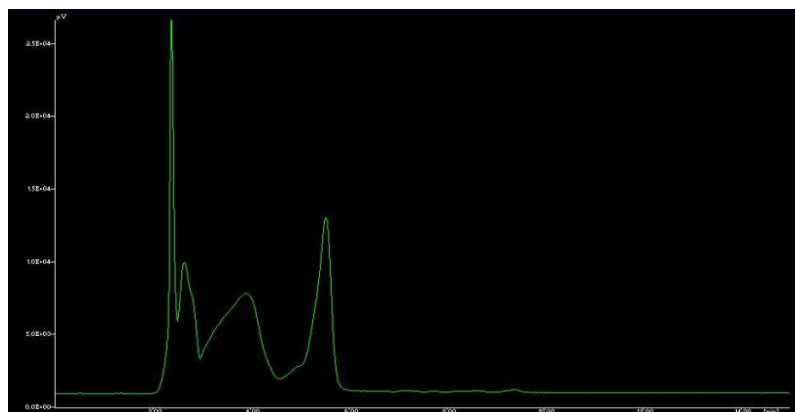


Figura 44. Cromatograma de anfotericina B en muestras esplénicas con las formulaciones AmB:DCH.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados han sido estadísticamente analizados utilizando el test de Mann-Whitney y expresados como resultado medio de concentración en $\mu\text{g/g} \pm$ desviación estándar. Un valor de P inferior a 0,05 ha sido considerado como diferencia significativa.

4. RESULTADOS

Se analizan los resultados obtenidos de las formulaciones de anfotericina B y desoxicolato en proporciones 1:0,8 y 1:1,5 a dosis de 3, 5 y 10 mg/kg, así como de la formulación comercial de referencia Ambisome[®] a dosis de 5 y 10 mg/kg.

Los valores de concentración de anfotericina B alcanzados en los distintos órganos van a estar determinados por las características farmacotécnicas de las formulaciones administradas. El estado de agregación, el tamaño de partícula, así como el tipo de formulación empleada (liposomas o micelas) van a influir en la distribución del fármaco en el organismo, tal y como recogen otros autores (Risovic y col., 2007).

Todos los resultados correspondientes a las concentraciones de anfotericina B obtenidas en los distintos órganos a las 24 horas de la administración de una única dosis de cada una de las formulaciones estudiadas (AmB:DCH 1:0,8, AmB:DCH 1:1,5 y Ambisome[®]) aparecen recogidos en la tabla 12.

Formulación	Dosis administrada (mg/kg)	Concentración de anfotericina B ± desviación estándar (µg/g)					
		Corazón	Cerebro	Pulmones	Riñones	Hígado	Bazo
AMB:DCH 1:0,8	3	-	-	0,344 ± 0,082	0,014 ± 0,004	0,406 ± 0,164	1,219 ± 0,201
	5	-	0,016 ± 0,003	1,723 ± 0,571	0,032 ± 0,003	1,101 ± 0,155	2,586 ± 0,181
	10	-	0,029 ± 0,001	5,723 ± 2,273	0,126 ± 0,056	10,162 ± 1,874	11,413 ± 3,863
AMB:DCH 1:1,5	3	-	-	0,386 ± 0,246	0,015 ± 0,006	0,522 ± 0,011	1,728 ± 0,158
	5	-	0,019 ± 0,003	2,632 ± 0,172	0,045 ± 0,010	1,212 ± 0,076	3,473 ± 0,201
	10	-	0,041 ± 0,007	5,804 ± 0,269	0,158 ± 0,015	10,258 ± 2,839	12,456 ± 0,653
Ambisome®	5	0,219 ± 0,043	0,028 ± 0,001	1,114 ± 0,033	0,751 ± 0,204	12,368 ± 0,883	39,635 ± 16,239
	10	0,794 ± 0,038	0,038 ± 0,006	5,449 ± 2,449	1,578 ± 0,072	31,293 ± 2,008	136,440 ± 56,311

Tabla 12. Concentraciones de anfotericina B en los distintos órganos obtenidas a las 24 h tras la administración de dosis única de las formulaciones AMB:DCH 1:0,8, AMB:DCH 1:1,5 y Ambisome®.

4.1. Muestras cardiacas

La formulación comercial Ambsiome[®] administrada a dosis de 5 y 10 mg/kg mostró bajas concentraciones de anfotericina B en el corazón ($0,219 \pm 0,043$ y $0,794 \pm 0,038$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente). Estas concentraciones de anfotericina B serían demasiado pequeñas para tratar distintas infecciones fúngicas dado que concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de 0,5-2 $\mu\text{g/ml}$ son las requeridas normalmente (Salas y col., 2012; Sandoval-Denis y col., 2014).

Las nuevas formulaciones poliagregadas AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5 a dosis de 3, 5 y 10 mg/kg alcanzaron el corazón a concentraciones demasiado bajas como para ser detectadas por el equipo HPLC. La distribución de anfotericina B a nivel cardiaco es mucho más baja que la que se produce en otros órganos con cualquiera de las formulaciones estudiadas en las distintas dosis administradas.

4.2. Muestras cerebrales

A nivel cerebral, los valores de concentraciones obtenidos con la formulación AmB:DCH 1:1,5 son muy similares a los obtenidos con la formulación comercial de referencia Ambsiome[®], cuando la dosis administrada es de 10 mg/kg ($0,041 \pm 0,007$ y $0,038 \pm 0,006$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente). La formulación poliagregada con menor proporción de tensioactivo (AmB:DCH 1:0,8) mostró concentraciones de anfotericina B inferiores a dosis de 10 mg/kg ($0,029 \pm 0,001$ $\mu\text{g/g}$), lo que podría atribuirse a su mayor tamaño de partícula, en torno a los 450 nm.

Cuando se administra una dosis más baja (5 mg/kg), se obtiene la mitad de la concentración ($0,016 \pm 0,003 \mu\text{g/g}$ y $0,019 \pm 0,003 \mu\text{g/g}$ para las formulaciones AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5, respectivamente).

Con la administración de la dosis más baja (3 mg/kg), las formulaciones poliagregadas de anfotericina B y desoxicolato no mostraron concentraciones de anfotericina B en cerebro detectables por el quipo HPLC, por lo que la concentración de anfotericina B en este caso debería ser inferior a $0,01 \mu\text{g/g}$ (límite de cuantificación del método).

La figura 45 recoge los valores de concentración de anfotericina B obtenidos en el cerebro tras la administración de AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5 a dosis de 3,5 y 10 mg/kg y la formulación comercial Ambisome[®], a dosis de 5 y 10 mg/kg.

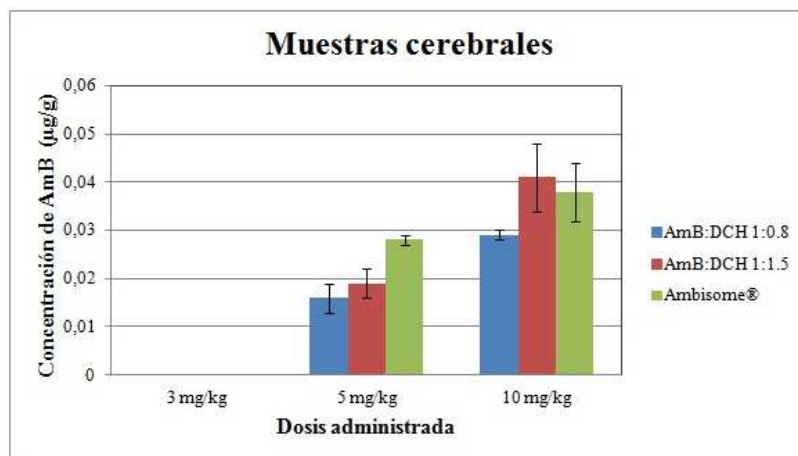


Figura 45. Concentraciones de anfotericina B en cerebro tras la administración de una única dosis de las formulaciones AmB:DCH 1:0,8, AmB:DCH 1:1,5 y Ambisome[®].

4.3. Muestras pulmonares

Cuando se administran las formulaciones AMB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5 en la dosis más baja (3 mg/kg), se alcanzan concentraciones de anfotericina B insuficientes en el pulmón ($<0,5 \mu\text{g/g}$) (Salas y col., 2012; Sandoval-Denis y col., 2014). Sin embargo, ambas formulaciones poliagregadas mostraron mayores concentraciones pulmonares que la formulación de referencia Ambisome[®], cuando se administran dosis mayores (5 y 10 mg/kg).

Las nuevas formulaciones poliagregadas (AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5) mostraron concentraciones de anfotericina B por encima de $5 \mu\text{g/g}$ cuando se administra una dosis de 10 mg/kg. Además, estas concentraciones sí resultarían adecuadas para tratar la aspergilosis (MIC=2 $\mu\text{g/ml}$) y mucormicosis (MIC=0,5-1 $\mu\text{g/ml}$), tal y como indican distintos autores (Salas y col., 2012; Sandoval-Denis y col., 2014).

La figura 46 muestra las concentraciones de anfotericina B alcanzadas en el pulmón tras la administración de AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5 a dosis de 3,5 y 10 mg/kg y la formulación comercial Ambisome[®], a dosis de 5 y 10 mg/kg.

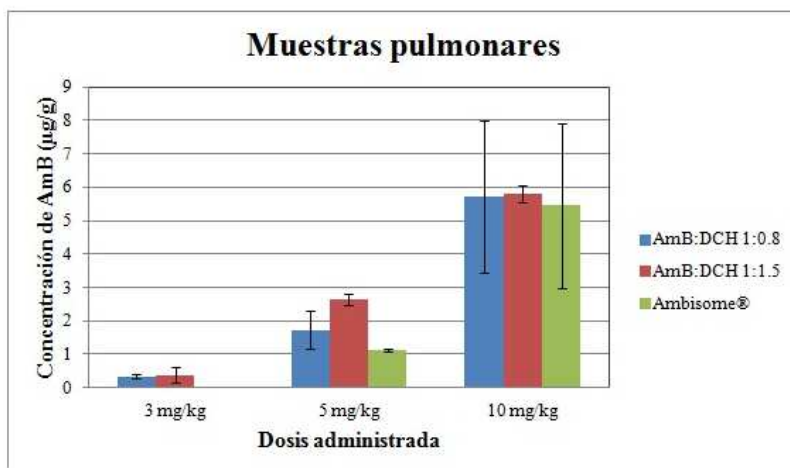


Figura 46. Concentraciones de anfotericina B en pulmón tras la administración de una única dosis de las formulaciones AmB:DCH 1:0,8, AmB:DCH 1:1,5 y Ambisome®.

A nivel pulmonar, cabe destacar que la formulación con mayor proporción de desoxicolato sódico (AmB:DCH 1:1,5) administrada a una dosis de 5 mg/kg mostró 2,4 veces más concentración a las 24 horas que la formulación comercial de referencia Ambisome®, de manera significativa ($P=0,005$), siendo esta última considerada como el tratamiento “gold standard” en infecciones sistémicas severas.

Las diferencias observadas en el tamaño de partícula entre estas dos formulaciones podrían explicar las diferencias encontradas en la distribución de anfotericina B en los distintos órganos (tabla 12), dado que un mayor tamaño de partícula permite una opsonización más rápida de las partículas por los macrófagos (Moreno-Rodríguez y col., 2015; Serrano y col., 2013).

Esto explicaría también las altas concentraciones obtenidas en el pulmón con respecto a otros órganos como cerebro y riñón, debido a la elevada presencia de macrófagos en este órgano (Souza y col., 2015).

4.4. Muestras renales

Las nuevas formulaciones micelares poliagregadas de anfotericina B y desoxicolato sódico elaboradas en este trabajo mostraron concentraciones renales de anfotericina B menores a las obtenidas con la formulación liposomal poliagregada de referencia Ambisome[®] (tabla 12) a dosis de 5 y 10 mg/kg, mostrando diferencias significativas ($P < 0,05$).

Cuando se comparan las formulaciones con distintas proporciones de desoxicolato, se obtiene un aumento significativo en la concentración de anfotericina B a nivel renal cuando se aumenta la proporción de tensioactivo ($P < 0,05$), lo que podría estar relacionado con la influencia del desoxicolato sódico (tensioactivo hidrofílico) en la distribución de las micelas. Sin embargo, a dosis de 3 mg/kg no hay diferencias significativas ($P = 0,808$).

Otros autores han llevado a cabo el estudio de complejos lipídicos de anfotericina B observando similares concentraciones renales a las obtenidas en este trabajo con la formulación de referencia Ambisome[®] (Clark y col., 1991; Wasan y col., 1994).

Tanto las formulaciones poliagregadas de anfotericina B como la formulación comercializada Ambisome[®], mostraron concentraciones de anfotericina B en el riñón por debajo de 1 µg/g, cuando la dosis administrada es de 5 mg/kg.

La figura 47 muestra las concentraciones de anfotericina B alcanzadas en el riñón tras la administración de AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5 a dosis de 3,5 y 10 mg/kg y la formulación comercial Ambisome[®], a dosis de 5 y 10 mg/kg.

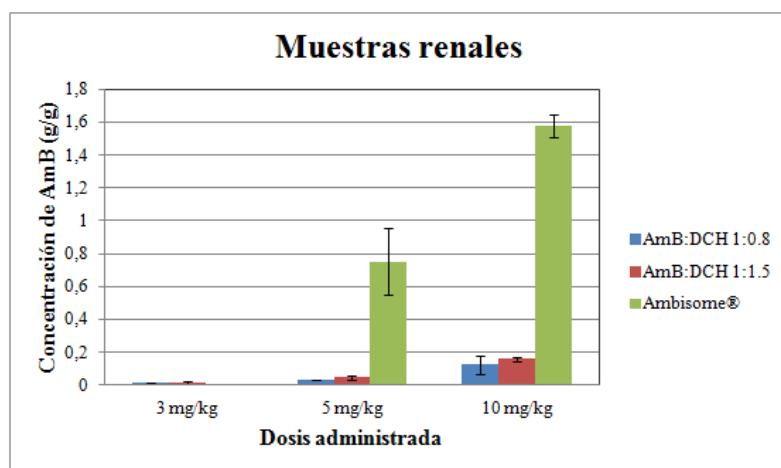


Figura 47. Concentraciones de anfotericina B en riñón tras la administración de una única dosis de las formulaciones AmB:DCH 1:0,8, AmB:DCH 1:1,5 y Ambisome[®].

4.5. Muestras hepáticas y esplénicas

En este estudio, el bazo mostró las concentraciones de anfotericina B más altas con valores por encima de MIC=0,5-2 µg/ml (Sandoval-Denis y col., 2014), tanto para las formulaciones poliagregadas como para la formulación de referencia Ambisome® (tabla 12). Sin embargo, la formulación Ambisome® mostró concentraciones de anfotericina B mucho más elevadas que las obtenidas con las formulaciones poliagregadas AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5, tanto en hígado como en bazo.

La gran acumulación de anfotericina B en órganos del sistema retículo-endotelial tras la administración de Ambisome® posiblemente esté relacionado con el menor tamaño de partícula de la anfotericina B en esta formulación lipídica. Este tamaño de partícula (próximo a 100 nm) es lo suficientemente grande para no ser filtrado por el riñón y a su vez es lo suficientemente pequeño para no ser rápidamente opsonizado por los componentes plasmáticos (Serrano y col., 2013).

Las figuras 48 y 49 muestran las concentraciones de anfotericina B alcanzadas en el hígado y el bazo, respectivamente, tras la administración de AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5 a dosis de 3,5 y 10 mg/kg y la formulación comercial Ambisome®, a dosis de 5 y 10 mg/kg.

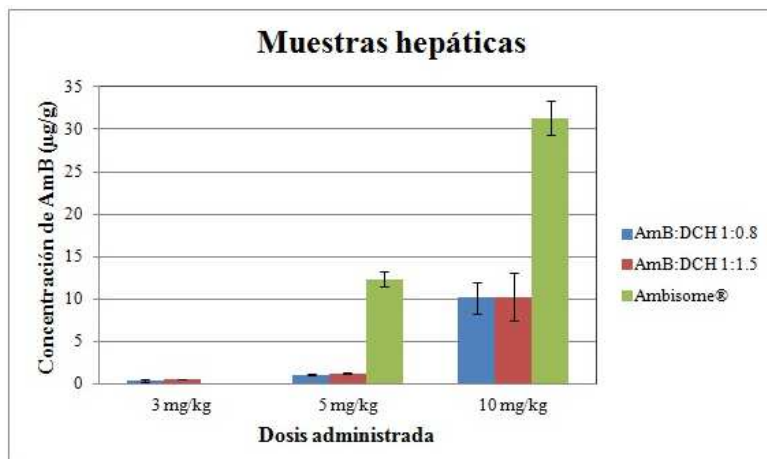


Figura 48. Concentraciones de anfotericina B en hígado tras la administración de una única dosis de las formulaciones AmB:DCH 1:0,8, AmB:DCH 1:1,5 y Ambisome®.

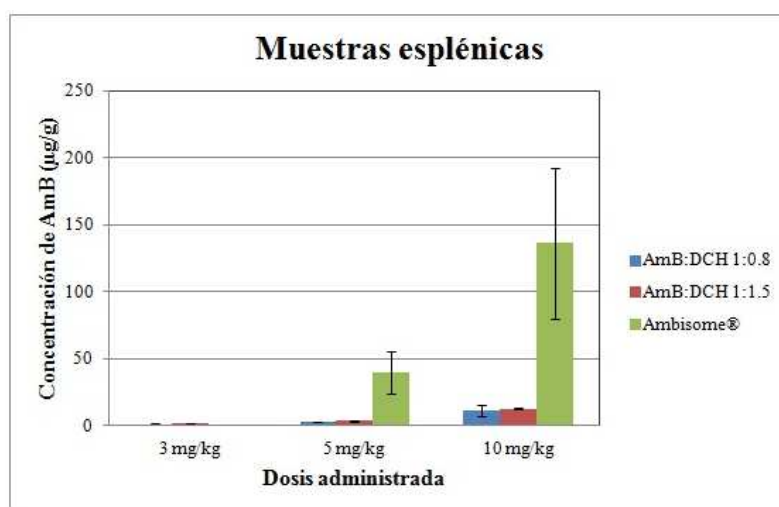


Figura 49. Concentraciones de anfotericina B en bazo tras la administración de una única dosis de las formulaciones AmB:DCH 1:0,8, AmB:DCH 1:1,5 y Ambisome®.

A nivel hepático, cuando se aumentó la proporción de desoxicolato de la formulación AmB:DCH 1:0,8 a la formulación AmB:DCH 1:1,5, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de anfotericina B alcanzadas a dosis de 5 y 10 mg/kg ($P=0,124$ y $P=0,373$, respectivamente).

A nivel esplénico ocurre lo mismo a dosis de 10 mg/kg ($P>0,05$). Sin embargo, cuando la dosis administrada es de 3 o 5 mg/kg, sí se obtuvieron diferencias significativas entre las concentraciones alcanzadas a nivel esplénico con las dos formulaciones poliagregadas ($P<0,05$).

4.6. Modelo lineal

Hay que destacar que las nuevas formulaciones poliagregadas de anfotericina B estudiadas presentaron una buena correlación lineal entre la dosis administrada de anfotericina B a 3, 5 y 10 mg/kg y las diferentes concentraciones de fármaco alcanzadas en distintos órganos (pulmón, riñón, hígado y bazo).

Los resultados correspondientes al modelo lineal aparecen recogidos en la tabla 13.

Formulación	Datos de regresión	Riñones	Pulmones	Hígado	Bazo
AmB:DCH 1:0,8	Intersección	0,0419	2,0503	4,9555	4,0217
	Pendiente	0,0165	0,7745	1,4742	1,5157
	R ²	0,9830	0,9990	0,9536	0,9755
AmB:DCH 1:1,5	Intersección	0,0524	1,5423	4,8305	3,6144
	Pendiente	0,0208	0,7472	1,4713	1,5833
	R ²	0,9935	0,9793	0,9534	0,9835

Tabla 13. Datos de regresión lineal de las concentraciones de anfotericina B en los distintos órganos ($\mu\text{g/g}$) frente a la dosis administrada (3, 5 y 10 mg/kg).

A continuación, aparecen recogidas las distintas rectas correspondientes a cada una de las formulaciones poliagregadas estudiadas en pulmón, riñón, hígado y bazo.

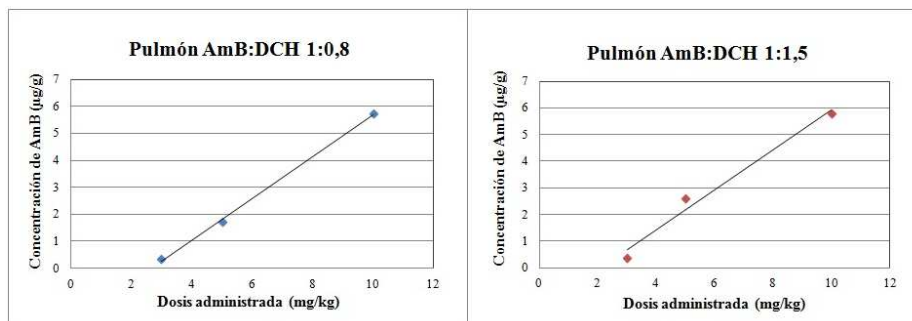


Figura 50. Concentración de anfotericina B frente a dosis administrada de las formulaciones AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5 en muestras pulmonares.

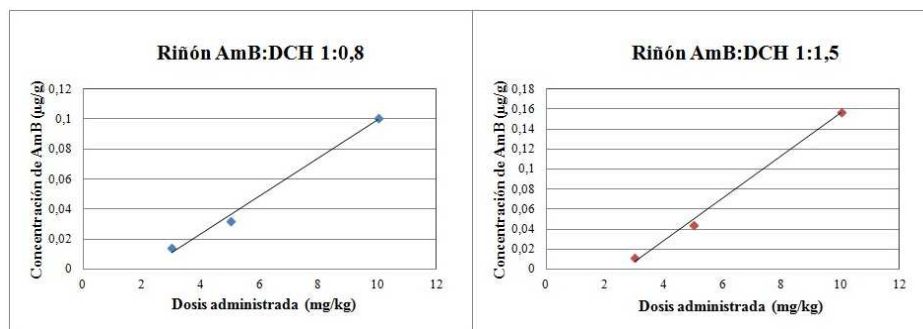


Figura 51. Concentración de anfotericina B frente a dosis administrada de las formulaciones AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5 en muestras renales.

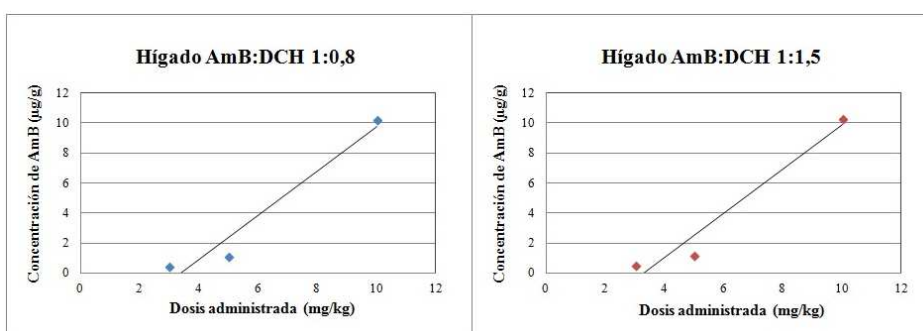


Figura 52. Concentración de anfotericina B frente a dosis administrada de las formulaciones AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5 en muestras hepáticas.

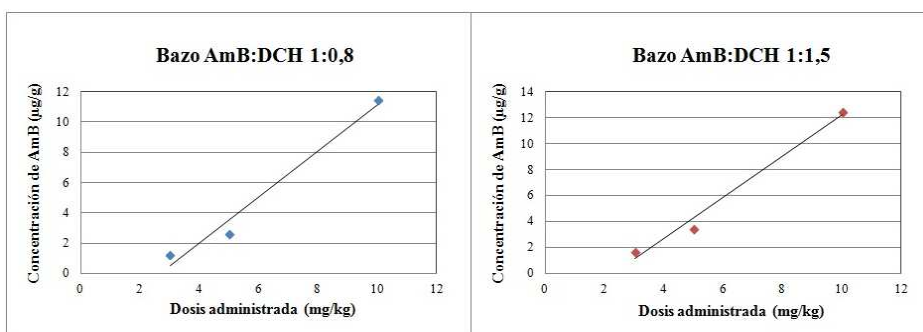


Figura 53. Concentración de anfotericina B frente a dosis administrada de las formulaciones AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5 en muestras esplénicas.

5. DISCUSIÓN

La formulación liposomal Ambisome[®] alcanzó principalmente órganos del retículo-endotelial, como son el hígado y el bazo, mientras que las formulaciones poliagregadas mostraron concentraciones más elevadas en órganos ricos en macrófagos, como los pulmones, tal y como aparece recogido en la bibliografía (Serrano y col., 2013).

A nivel cardiaco, similares concentraciones de anfotericina B han sido obtenidas por otros autores (Ibrahim y col., 2013; Zhao y col., 2014). Además, el modelo farmacocinético para una dosis única intravenosa diseñado por Kagan y col., 2011, también predice que las concentraciones más bajas se van a encontrar en el corazón, comparado con otros órganos, como riñón, pulmón, hígado y bazo.

Los resultados obtenidos a nivel cerebral concuerdan con lo que otros autores han observado con formulaciones de anfotericina B (Ibrahim y col., 2013). Estas bajas concentraciones cerebrales estarían relacionadas con el obstáculo que representa la barrera hematoencefálica.

A nivel pulmonar, la formulación AmB:DCH 1:1,5 presentó los valores de concentración de anfotericina B más homogéneos con menores desviaciones estándar tanto a dosis de 5 como 10 mg/kg ($2,632 \pm 0,172 \mu\text{g/g}$ y $5,804 \pm 0,269 \mu\text{g/g}$, respectivamente), obteniéndose a una dosis de 5 mg/kg, 2,4 veces más concentración que con la formulación comercial de referencia Ambisome[®].

A nivel renal, tanto la formulación lipídica poliagregada de anfotericina B (Ambisome[®]) como la forma dimérica de anfotericina B (Fungizona[®]) son capaces de reducir la carga fúngica en el riñón en animales infectados con mayor o menor efecto nefrotóxico (Jung y col., 2009; Sandoval-Denis y col., 2014). Debido a los bajos valores de concentración de anfotericina B renal, cabe esperar que estas nuevas formulaciones poliagregadas puedan reducir de manera más efectiva que la formulación comercial de anfotericina B la toxicidad renal del fármaco (Jung y col., 2009).

Hígado y bazo son considerados órganos reservorio de anfotericina B debido a la elevada acumulación de fármaco en órganos del sistema retículo-endotelial (Kagan y col., 2011; Luengo-Alonso y col., 2015; Zhao y col., 2014). La formulación liposomal Ambisome[®] presentó los mayores valores de concentración de anfotericina B en estos órganos, lo que se atribuye al diferente tamaño de partícula con respecto a las formulaciones poliagregadas AmB:DCH 1:0,8 y AmB:DCH 1:1,5.

La buena correlación entre Dosis/Concentración en órganos obtenida con las dos formulaciones poliagregadas podría ser particularmente importante en cuanto a la elevada toxicidad que presenta la anfotericina B a la hora de predecir la distribución del fármaco en los distintos órganos con otras dosis del fármaco, así como para optimizar las concentraciones de anfotericina B en un órgano específico a la vez que se reducen los efectos adversos y su toxicidad.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Clark, J.M., Whitney, R.R., Olsen, S.J., George, R.J., Swerdel, M.R., Kunselman, L., Bonner, D.P. Amphotericin B Lipid Complex Therapy of Experimental Fungal Infections in Mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991, 35:615-621.
- Ibrahim, F., Gershkovich, P., Sivak, O., Wasan, E.K., Wasan, K.M. Pharmacokinetics and tissue distribution of amphotericin B following oral administration of three lipid-based formulations to rats. *Drug Dev Ind Pharm.* 2013; 39(9):1277-1283.
- Jung, S.H., Lim, D.H., Jung, S.H., Lee, J.E., Jeong, K.S., Seong, H., Shin, B.C. Amphotericin B-entrapping lipid nanoparticles and their *in vitro* and *in vivo* characteristics. *Eur J Pharm Sci.* 2009; 37(3-4):313-320.
- Kagan, L., Gershkovich, P., Wasan, K.M. Mager, D.E. Physiologically Based Pharmacokinetic Model of Amphotericin B Disposition in Rats Following Administration of Deoxycholate Formulation (Fungizone®): Pooled Analysis of Published Data. *AAPS J.* 2011; 13:255-264.
- Luengo-Alonso, C., Torrado, J.J., Ballesteros, M.P., Malfanti, A., Bersani, S., Salmaso, S., Caliceti, P. A novel performing PEG-cholane nanoformulation for Amphotericin B delivery. *Int J Pharm.* 2015; 495:41-51.
- Moreno-Rodríguez, A.C., Torrado-Durán, S., Molero, G., García-Rodríguez, J.J., Torrado-Santiago, S. Efficacy and toxicity evaluations of new amphotericin B micelle systems for brain fungal infections. *Int J Pharm.* 2015; 494(1):17-22.

- Risovic, V., Rosland, M., Sivak, O., Wasan, K.M., Bartlett, K. Assessing the antifungal activity of a new oral lipid-based amphotericin B formulation following administration to rats infected with *Aspergillus fumigatus*. *Drug Dev Ind Pharm.* 2007; 33(7):703-707.

- Salas, V., Pastor, J., Calvo, E., Álvarez, E., Sutton, D.A., Mayayo, E., Fothergill, A.W., Rinaldj, M.G., Guarro, J. *In Vitro* and *In Vivo* Activities of Posaconazole and Amphotericin B in a Murine Invasive Infection by *Mucor circinelloides*: Poor Efficacy of Posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(5):2246-2250.

- Sandoval-Denis, M., Pastor, F.J., Capilla, J., Sutton, D.A., Fothergill, A.W., Guarro, J. In vitro pharmacodynamics and in vivo efficacy of fluconazole, amphotericin B and caspofungin in a murine infection by *Candida lusitaniae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2014; 43(2):161-164.

- Serrano, D.R., Hernández, L., Fleire, L., González-Alvarez, I., Montoya, A., Ballesteros, M.P., Dea-Ayuela, M.A., Miró, G., Bolás-Fernández, F., Torrado, J.J.. Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations. *Int J Pharm.* 2013; 447(1-2):38-46.

- Souza, A.C.O., Nascimento, A.L., Vasconcelos, N.M., Jeronimo, M.S., Siquiera, I.M., R-Santos, L., Cintra, D.O.S., Fuscaldi, L.L., Pires Junior, O.R., Titze-de-Almeida, R., Morin, M.F., Bão, S.N., Martins, O.P., Cardoso, V.N., Fernandes, S.O., Mortari, M.R., Tedesco, A.C., Amaral, A.C., Felipe, M.S.S., Bocca, A.L. Activity and in vivo tracking of Amphotericin B loaded PLGA nanoparticles. *Eur. J. Med. Chem.* 2015; 95:267-276.

- Wasan, K. M., Grossie Jr, V. B., Lopez-Berestein, G. Concentrations in Serum and Distribution in Tissue of Free and Liposomal Amphotericin B in Rats during Continuous Intralipid Infusion. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 1994; 38:2224-2226.

- Zhao, M., Hu, J., Zhang, L., Zhang, L., Sun, Y., Ma, N., Chen, X., Gao, Z. Study of amphotericin B magnetic liposomes for brain targeting. *Int J Pharm.* 2014; 475(1-2):9-15.

**CAPÍTULO IV:
ESTUDIOS EN
DOSIS MÚLTIPLE**

A. ESTUDIO DE NEFROTOXICIDAD

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas más importante que presenta la anfotericina B es su nefrotoxicidad. Por lo tanto, es importante estudiar este aspecto en las nuevas formulaciones con desoxicolato sódico, comparando los resultados obtenidos con las formulaciones actualmente comercializadas de anfotericina B.

Debido a razones éticas, este segundo estudio preclínico *in vivo* se realiza en animales inmunocompetentes para contribuir al bienestar de los animales de experimentación.

En este ensayo, se estudiarán diversos parámetros bioquímicos, como son la creatinina sérica y el nitrógeno ureico (BUN), y se realizará un estudio histopatológico del tejido renal, de manera que se puedan observar los daños nefrotóxicos producidos por las distintas formulaciones poliagregadas de anfotericina B con distintas proporciones de tensioactivo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

En este estudio se utilizan los siguientes productos y reactivos:

- La anfotericina B fue suministrada por Bristol Myers Squibb (Barcelona, España).
- El desoxicolato de sodio (DCH) fue suministrado por Fluka Chemierl A.G. (Buchs, Suiza).

- La fórmula comercial Ambisome[®] (constituida por anfotericina B, colesterol fosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilglicerol) fue suministrada por UCB-Pharma (Bruselas, Bélgica).
- El agua purificada fue obtenida mediante un sistema Milli-Q (Millipore, Estados Unidos).
- Colorantes hematoxilina y eosina (H&E, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), utilizados en la tinción de las muestras histopatológicas.

2.1.1. Formulaciones

La formulación poliagregada de anfotericina B seleccionada para el estudio de toxicidad es AmB:DCH 1:1,5, al ser la formulación poliagregada que presenta los mejores resultados de concentración pulmonar de anfotericina B a dosis única.

En este caso, se administran dos dosis: una dosis terapéutica media de 5 mg/kg y una dosis tóxica de 20 mg/kg, comparándose su valores bioquímicos y sus estudios histopatológicos frente a una formulación de Ambisome[®] a las mismas dosis (5 y 20 mg/kg).

❖ Formulaciones:

- Formulación AmB:DCH 1:0: se pesaron 10 mg de anfotericina B y se suspendieron en 20 ml de agua Mili Q.
- Formulación AmB:DCH 1:1,5: se pesaron 10 mg de anfotericina B y 15 mg de desoxicolato sódico y se suspendieron en 20 ml de agua Mili Q.

Como referencia se utilizan 3 formulaciones: la formulación comercializada Ambisome[®], la formulación poliagregada sin tensiactivo (AmB:DCH 1:0) a dosis de 5 y 20 mg/kg, y una formulación placebo de dextrosa al 5%, como grupo control.

2.1.2. Animales de experimentación

El estudio de toxicidad se llevó a cabo en ratones CD-1 machos (20 g), de 6 a 8 semanas de vida. Los animales permanecieron, a temperatura y humedad controladas, en el laboratorio de experimentación animal de la Universidad Complutense de acuerdo con los principios de protección de animales de la directiva de la legislación de la Unión Europea (86/609/CE, RD 53/2013).

2.1.3. Equipos

Para la preparación de las formulaciones, se utiliza un agitador tipo Vortex[®].

Para el análisis de los niveles de creatinina sérica y nitrógeno ureico (BUN) se utilizó el analizador modular AutoAnalyzer Cobas 711 (Roche, Basel, Switzerland).

Para el estudio de las muestras histopatológicas, se utilizó un microscopio invertido Olympus IX70 (Hamburg, Alemania).

2.2. Métodos

2.2.1. Elaboración de las formulaciones

El método de preparación seguido fue la disolución de desoxicolato sódico en agua purificada y la posterior adición de la cantidad correspondiente de anfotericina B. Se mantiene bajo agitación durante 4 minutos en un agitador tipo Vórtex[®] a una velocidad de 2400 rpm.

2.2.2. Administración de las formulaciones

Los ratones sanos fueron divididos en 7 grupos de 5 animales cada uno. Cada grupo de ratones recibió una administración intravenosa de la formulación AmB:DCH 1:1,5, así como de las formulaciones de referencia AmB:DCH 1:0 y Ambisome[®] a dosis de 5 y 20 mg/kg, y del placebo como grupo control, en un volumen de 0,2 ml.

Se realizaron un total de 6 administraciones en días consecutivos de cada formulación con el fin de observar el efecto acumulativo de anfotericina B con cada una de las formulaciones estudiadas.

2.2.3. Análisis de parámetros bioquímicos y estudio histopatológico

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas por punción cardiaca 24 horas después del sexto día de tratamiento.

Para realizar los estudios histopatológicos, los ratones fueron sacrificados a las 24 horas tras la administración de la última dosis y se procede a la extracción del riñón de manera aséptica. Los tejidos son homogeneizados con parafina y paraformaldehído al 4%. Se realizaron cortes del tejido con secciones de 5 μm y se colocaron en un porta, rehidratando y tiñendo la muestra para su posterior análisis. A continuación se procedió a su examen al microscopio y a la toma de microfotografías (aumento x20).

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados han sido estadísticamente analizados utilizando el test de Mann-Whitney y expresados como resultado medio de concentración en mg/dl \pm desviación estándar. Un valor de P inferior a 0,05 ha sido considerado como diferencia significativa.

4. RESULTADOS

Los parámetros bioquímicos séricos de creatinina y nitrógeno ureico (BUN) fueron evaluados después de la sexta dosis diaria de cada tratamiento (AmB:DCH 1:1,5, AmB:DCH 1:0, Ambisome[®]) a dosis terapéutica (5 mg/kg/día) o dosis tóxica (20 mg/kg/día) y del placebo (grupo control). En la tabla 13 se muestran los resultados de los niveles de creatinina y BUN.

Formulación	Dosis (mg/kg)	\bar{X} Creatinina \pm desviación estándar (mg/dl)	\bar{X} BUN \pm desviación estándar (mg/dl)
Placebo	-	0,18 \pm 0,008	18,29 \pm 0,609
Ambisome [®]	20	0,23 \pm 0,034	18,16 \pm 0,963
	5	0,24 \pm 0,018	18,29 \pm 0,609
AmB:DCH 1:0	20	0,22 \pm 0,028	17,27 \pm 0,875
	5	0,23 \pm 0,005	17,73 \pm 1,276
AmB:DCH 1:1,5	20	0,20 \pm 0,011	18,20 \pm 0,748
	5	0,21 \pm 0,005	19,88 \pm 0,762

Tabla 13. Concentraciones de creatinina y BUN (mg/dL) en animales no infectados 24 horas después de la sexta administración de las distintas formulaciones estudiadas a dosis de 5 y 20 mg/kg, así como del grupo control.

Todas las concentraciones de creatinina obtenidas con las formulaciones experimentales y la formulación comercial Ambisome[®] fueron ligeramente superiores a las obtenidas con el grupo control (placebo).

Los valores de creatinina obtenidos son similares cuando se administra una dosis terapéutica (5 mg/kg) o una dosis más elevada (20 mg/kg). Sin embargo, las concentraciones de creatinina alcanzadas con la formulación de Ambisome[®] son las más elevadas.

En cuanto al análisis estadístico de los resultados de creatinina obtenidos, cabe destacar que la formulación experimental AmB:DCH 1:1,5 no mostró valores de creatinina patológicos ni diferencias significativas con el grupo control a ninguna dosis estudiada ($P > 0,05$), mientras que las dos formulaciones de referencia AmB:DCH 1:0 y Ambisome[®] sí mostraron diferencias significativas con el grupo control a las dos dosis estudiadas ($P < 0,03$). Además, se encontraron diferencias significativas entre los valores de creatinina obtenidos tras la administración de Ambisome[®] y AmB:DCH 1:1,5 a las dos dosis estudiadas ($P < 0,01$).

Los parámetros bioquímicos nefrotóxicos estudiados mostraron valores de BUN similares entre todas las formulaciones comparadas con el grupo control a ambas dosis estudiadas (5 y 20 mg/kg) y no se encontraron diferencias significativas entre las distintas formulaciones estudiadas y el grupo control ($P > 0,05$).

Los estudios histopatológicos del tejido renal de los ratones tratados con 6 dosis de 5 mg/kg/día de AmB:DCH 1:1,5 mostraron alteraciones de la morfología glomerular comparado con el grupo control que mantuvo la morfología tubular normal, tal y como se observa en la figura 54.

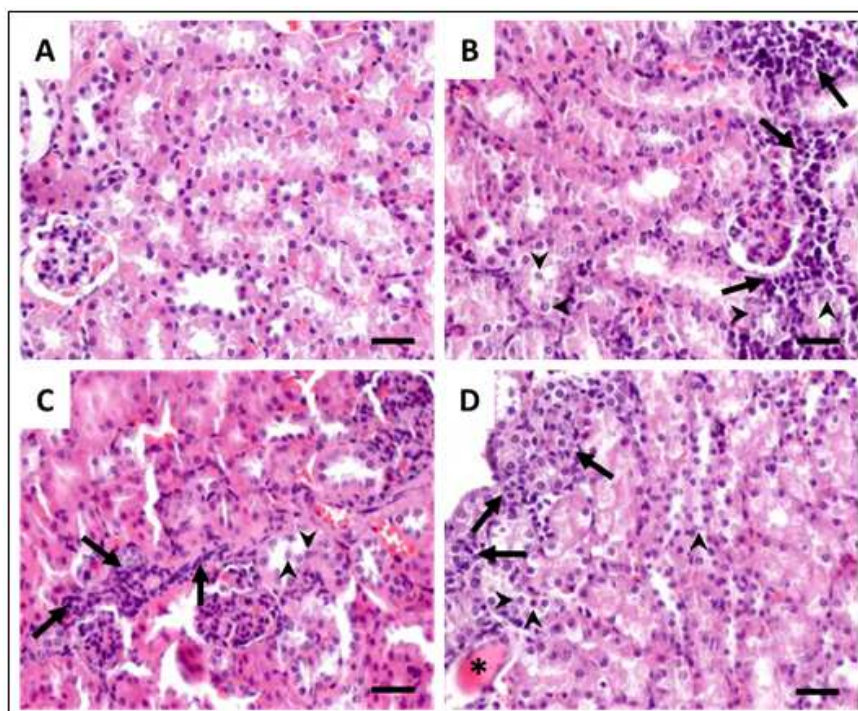


Figura 54. Histopatología de los riñones de animales inmunocompetentes 24 horas después de la administración de 6 dosis de 5 mg/kg/día. (A) Apariencia del tejido renal sano del grupo control. (B) Tejido renal de animales tratados con AmB:DCH 1:1,5. (C) Tejido renal de animales tratados con AmB:DCH 1:0. (D) Tejido renal de animales tratados con Ambisome[®]. Flecha: Células inflamatorias. Cabeza de flecha: Daño del epitelio tubular. Asterisco: Factor proteico intraluminal. Barra, 100 µm.

Estos cambios del tejido renal incluyen áreas con células inflamatorias (rodeando el glomérulo y los túbulos), glomerulonefritis proliferativa extracapilar y daño agudo del epitelio tubular con presencia de necrosis tubular, desprendimiento de restos tubulares, inflamación y dilatación tubular.

La muestra renal de los ratones a los que se administró Ambisome® mostraron además de los daños renales anteriormente descritos, factores proteicos en los túbulos renales.

Los estudios histopatológicos del tejido renal de los ratones tratados con 6 dosis de 20 mg/kg/día mostraron alteraciones de la morfología glomerular comparado con el grupo control que mantuvo la morfología tubular normal, tal y como se observa en la figura 55.

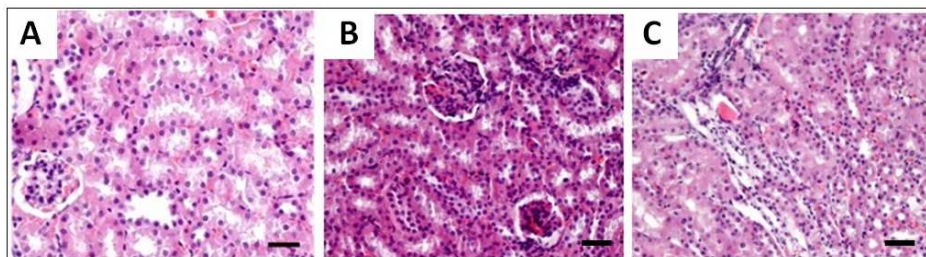


Figura 55. Histopatología de los riñones de animales inmunocompetentes 24 horas después de la administración de 6 dosis de 20 mg/kg/día. (A) Apariencia del tejido renal sano del grupo control. (B) Tejido renal de animales tratados con AmB:DCH 1:0. (C) Tejido renal de animales tratados con Ambisome®.

Los cambios del tejido renal observados cuando se administra una dosis tóxica (20 mg/kg) de la formulación AmB:DCH 1:0 incluyen principalmente áreas con células inflamatorias (rodeando el glomérulo y los túbulos) y daño agudo del epitelio tubular con presencia de necrosis tubular.

La muestra renal de los ratones a los que se administró Ambisome[®] a la misma dosis mostró además glomerulonefritis proliferativa extra-capilar desprendimiento de restos tubulares y factores proteicos en los túbulos renales.

5. DISCUSIÓN

Los estudios de los parámetros bioquímicos mostraron aumentos en los niveles de creatinina similares a los que han sido observados por otros autores con formulaciones poliagregadas de anfotericina B a dosis de 15 mg/kg (Zia y col., 2015). Los elevados valores de creatinina alcanzados con la formulación de referencia Ambisome[®] pueden estar relacionados con la mayor distribución renal de la anfotericina B cuando se administra dicha formulación (Fernández-García y col., 2017; Olson y col., 2006.), tal y como se muestra también en el Capítulo III en el estudio de distribución tras una única dosis.

Los parámetros bioquímicos nefrotóxicos estudiados mostraron también valores de BUN similares entre todas las formulaciones y el grupo control y a los obtenidos por otros autores en diferentes tratamientos con Ambisome[®] (Olson y col., 2006). Además, las altas concentraciones renales obtenidas con Ambisome[®] no se tradujeron en valores de BUN patológicos, tal y como se observa en el estudio histopatológico del tejido renal (figuras 54 y 55).

Por otro lado, la presencia de desoxicolato sódico en la formulación AmB:DCH 1:1,5 no aumenta la nefrotoxicidad tras la administración de 6 dosis de 5 o 20 mg/kg/día, dado que los daños renales observados en el estudio histopatológico no muestran un daño renal mayor cuando se administra dicha formulación en comparación con la formulación de referencia sin desoxicolato (AmB:DCH 1:0).

La existencia de similares valores elevados de nefrotoxicidad observados con la formulación AmB:DCH 1:1,5 tras 6 días de tratamiento a dosis terapéuticas (5 mg/kg) y a dosis elevadas (20 mg/kg), indicaría que la nefrotoxicidad en estas formulaciones poliagregadas estaría más relacionados con la existencia de partículas de elevado tamaño presentes en ambas dosis que con sus diferentes concentraciones renales.

Estos resultados serían consistentes con los valores de nefrotoxicidad obtenidos por otros autores, después de tratamientos prolongados con formulaciones de anfotericina B con tamaños de partícula grandes (Adler-Moore y col., 2008).

Por otro lado, los valores de nefrotoxicidad observados con la formulación Ambisome[®] al no presentar partículas de elevado tamaño, estarían más relacionados con altas concentraciones renales. Aunque esta nefrotoxicidad no muestra una relación concentración dependiente, ya que aunque la formulación Ambisome[®] presentó concentraciones 15 veces mayores que las obtenidas con la formulación AmB:DCH 1:1,5 a dosis de 5 mg/kg, no se observan daños renales 15 veces mayores.

Por lo tanto, todos los estudios preclínicos con formulaciones experimentales de anfotericina B deberían incluir estudios histopatológicos, debido a que los parámetros séricos creatinina y nitrógeno ureico son insuficientes para confirmar un daño renal agudo.

B. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO

1. INTRODUCCIÓN

En este estudio evaluamos la diferente distribución a diferentes órganos que presenta la anfotericina B tras la administración de dosis múltiples de las distintas formulaciones (micelar o liposomal) en animales inmunodeprimidos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

En este estudio se utilizan los siguientes productos y reactivos:

- La anfotericina B fue suministrada por Bristol Myers Squibb (Barcelona, España).
- El desoxicolato de sodio (DCH) fue suministrado por Fluka Chemierl A.G. (Buchs, Suiza).
- La fórmula comercial Ambisome[®] (constituida por anfotericina B, colesterol fosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilglicerol) fue suministrada por UCB-Pharma (Bruselas, Bélgica).
- El ácido acético glacial se obtuvo de Panreac S.A. (Barcelona, España).
- El acetonitrilo y el metanol se obtuvieron de Labscan (Dublín, Irlanda).
- El agua purificada fue obtenida mediante un sistema Milli-Q (Millipore, Estados Unidos).

2.1.1. Formulaciones

La formulación de anfotericina B seleccionada para este ensayo *in vivo* es la que presenta mayor proporción de desoxicolato sódico (AmB:DCH 1:1,5), a una dosis de 5 mg/kg, debido a los resultados obtenidos en el ensayo de dosis única.

❖ **Formulaciones:**

- Formulación AmB:DCH 1:1,5: se pesaron 10 mg de anfotericina B y 15 mg de desoxicolato sódico y se suspendieron en 20 ml de agua Mili Q.
- Formulación M-AmB: se pesaron 10 mg de anfotericina B y se suspendieron en 500 ml de metanol.

Como formulación de referencia se utiliza la formulación comercializada Ambisome[®] a dosis de 5 mg/kg.

2.1.2. Animales de experimentación

El estudio de las concentraciones alcanzadas en órganos tras dosis múltiple se llevó a cabo en ratones CD-1 (30-35 g). Los animales permanecieron, a temperatura y humedad controladas, en el laboratorio de experimentación animal de la Facultad de Medicina de la Universidad Rovira i Virgili de acuerdo con los principios de protección de animales de la directiva de la legislación de la Unión Europea (86/609/CE, RD 53/2013).

Los distintos grupos de animales consisten en:

- Grupo tratado con AmB:DCH 1:1,5 (5 mg/kg/día): de 12 animales, 6 serán utilizados para estudiar la acumulación del fármaco 24 horas después de la primera dosis y otros 6 animales 24 horas después de la sexta dosis.
- Grupo tratado con Ambisome[®] (5 mg/kg/día): de 12 animales, 6 serán utilizados para estudiar la acumulación del fármaco 24 horas después de la primera dosis y otros 6 animales 24 horas después de la sexta dosis.

2.1.3. Equipos

Para la preparación de las formulaciones, se utiliza un agitador tipo Vortex[®] y para el tratamiento de las muestras se utiliza una centrífuga Universal 32 (Hettich Zentrifugen).

Para el análisis de las concentraciones alcanzadas a las 24 horas y a tras la administración de 6 dosis de anfotericina B con la formulación empleada se siguió la técnica descrita en el Capítulo III. El equipo HPLC utilizado fue el mismo sistema modular Jasco[®] (Japón), con diferentes condiciones cromatográficas, de manera que el método se adapte a la finalidad de este ensayo *in vivo*:

- Columna BDS C₁₈ 5 µm de diámetro interno y 250 x 4,6 nm.
- Fase móvil: acetonitrilo: ácido acético glacial: agua (40:4,3:55,7) (v/v/v)
- Temperatura de la columna: 25°C
- Flujo de la fase móvil: 1 ml/min.
- Volumen de inyección: 100 µl.

- Longitud de onda empleada en el detector: 406 nm.
- Tiempo de análisis: 20 minutos.
- Fase de lavado: acetonitrilo: agua (50:50) (v/v).

2.2. Métodos

2.2.1. Elaboración de las formulaciones

El método de preparación seguido fue la disolución de desoxicolato en agua purificada y la posterior adición de la cantidad correspondiente de anfotericina B. Se mantiene bajo agitación durante 4 minutos en un agitador tipo Vórtex® a una velocidad de 2400 rpm antes de su administración.

2.2.2. Puesta a punto del modelo de administración de dosis múltiple

Como se indicó en el Capítulo III, es necesario desarrollar un método de administración que permita asegurar la realización de diferentes inyecciones durante días consecutivos sin que se produzcan cuadros de flebitis o necrosis de la zona de administración.

Con el fin de elaborar la técnica más adecuada, se han realizado tres ensayos con grupos de 5 ratones CD-1 (20-30 g), empleando distintas formulaciones, de manera que se puedan encontrar las posibles causas de la aparición de estos procesos de flebitis en los animales.

De esta manera, aseguramos un correcto procedimiento de administración intravenosa y podemos atribuir a la anfotericina B ser la causa de estas reacciones adversas en el lugar de administración.

A la hora de elegir la vena lateral para la administración de cada dosis, se inicia la administración en la zona inferior de la cola y se va alternando el lado para evitar posibles alteraciones en dichas venas.

El primer ensayo se realiza con agua para inyección durante 10 días consecutivos. De esta manera, descartamos que los posibles efectos adversos como la tromboflebitis se produzca debido a la manipulación de los animales así como al procedimiento de administración de las diferentes dosis que se ha seguido durante el ensayo. La administración de 10 dosis no supone ninguna alteración en los animales, lo que indica una correcta metodología utilizada a la hora de realizar las diversas administraciones y por tanto se confirma la relación que guarda la formulación de estudio (anfotericina B y desoxicolato sódico) con los procesos adversos de trombosis y flebitis.

Un segundo ensayo se realiza con la administración únicamente del tensioactivo (desoxicolato sódico) disuelto en agua en la misma proporción que se administra con las formulaciones seleccionadas. En este caso, se utiliza la formulación AmB:DCH 0:1,5, con mayor proporción de tensioactivo, de manera que podamos determinar si las reacciones adversas se deben a la anfotericina B o al tensioactivo utilizado.

En este caso, al igual que ocurría con el primer ensayo, la administración de 10 dosis no supone ninguna alteración en los animales, lo que indica una correcta metodología utilizada a la hora de realizar las diversas administraciones y por tanto se confirma la relación que guarda la formulación de estudio (anfotericina B y desoxicolato sódico) con los procesos adversos de trombosis y flebitis.

El tercer ensayo se realiza con la formulación poliagregada de anfotericina B y desoxicolato sódico en una proporción AmB:DCH 1:1,5. Es la formulación con mayor proporción de tensioactivo empleada durante el estudio de las concentraciones de anfotericina B alcanzadas en órganos 24 horas después de la administración de una dosis única. En este caso, sólo se han podido realizar 4 administraciones debido al inicio de necrosis en la zona de administración de algunos ratones y al producirse callo en las venas laterales de las colas imposibilitando la administración de la totalidad de las dosis.

Estos resultados confirman la tromboflebitis asociada a la anfotericina B que habrá que tener en cuenta a la hora de realizar este ensayo de dosis múltiple con formulaciones poliagregadas de anfotericina B y desoxicolato sódico en distintas proporciones.

2.2.3. Puesta a punto del método analítico por HPLC

Se utiliza el método analítico de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) utilizado para el análisis de las concentraciones de anfotericina B a dosis única.

❖ Preparación de las muestras patrón

Se pesan 10 mg de anfotericina B y se llevan a un matraz aforado de 500 ml. Se añaden 250 ml de metanol y se lleva a agitación en un agitador tipo Vortex[®], durante 2 minutos a 2400 rpm. A continuación se enrasa con metanol hasta alcanzar los 500 ml y se lleva de nuevo a agitación en un agitador tipo Vortex[®], durante 2 minutos a 2400 rpm, hasta su completa disolución.

De la solución madre obtenida (20 µg/ml) se preparan y analizan distintas diluciones para los pulmones y los riñones. En el caso de los pulmones se obtienen las siguientes concentraciones 1,41, 2,12, 4,24 y 8,48 µg/ml. En el caso de los riñones las concentraciones obtenidas aparecen a continuación 0,1, 0,4 y 1 µg/ml. Para su análisis en HPLC, todas las muestras se filtran con un filtro Millipore HVLP de 0,45 µm.

En estas condiciones cromatográficas, el tiempo de retención de la anfotericina B en la formulación patrón es de 14-18 minutos.

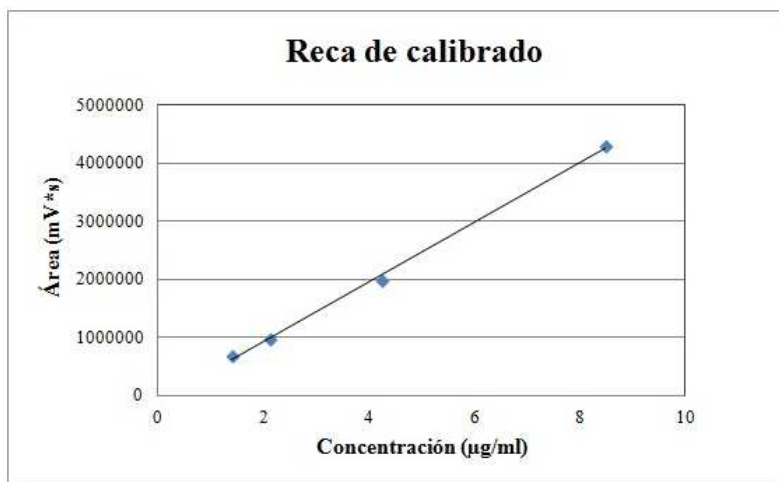


Figura 56. Recta de calibrado para las muestras pulmonares.

La recta de calibrado correspondiente a las muestras pulmonares cumple la ley de Lambert-Beer y se ajusta a la siguiente ecuación:

$$\text{Área} = 514534 \times C - 112706 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$R^2 = 0,9986$$

$$n = 4$$

$$\text{Rango} = 1,41 - 8,48 \mu\text{g/ml}$$

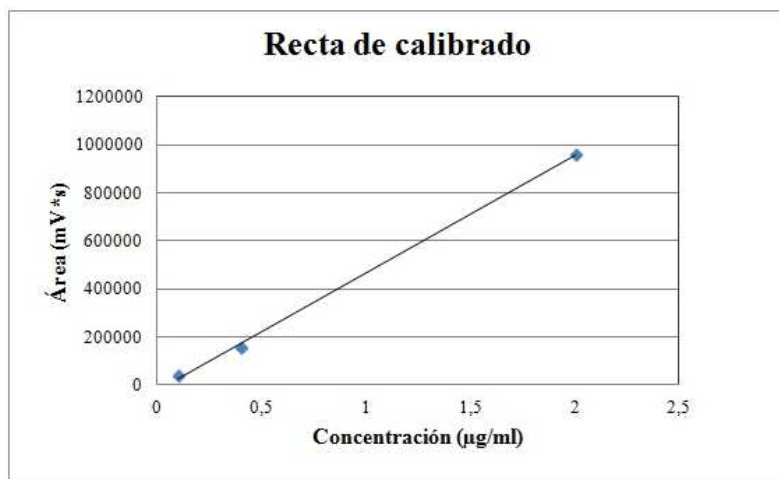


Figura 57. Recta de calibrado para las muestras renales.

La recta de calibrado correspondiente a las muestras renales cumple la ley de Lambert-Beer y se ajusta a la siguiente ecuación:

$$\text{Área} = 489557 \times C - 21985 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$R^2 = 0,999$$

$$n = 3$$

$$\text{Rango} = 0,1 - 2,0 \mu\text{g/ml}$$

2.2.4. Administración de las formulaciones

Los ratones fueron divididos en 4 grupos de 6 animales cada uno. Fueron inmunodeprimidos con acetato de cortisona por vía subcutánea (125 mg/kg) cada 3 días (Dixon y col., 1989). Cinco días después de la inmunosupresión, los animales recibieron una dosis única de 5 mg/kg de AmB:DCH 1:1,5 o Ambisome[®], o dosis múltiples de 5 mg/kg durante 6 días seguidos, por vía intravenosa.

2.2.5. Análisis de anfotericina B en muestras orgánicas

❖ Muestras pulmonares

Para analizar la concentración de anfotericina B alcanzada en los pulmones, dos grupos de 6 ratones (tratados con AmB:DCH 1:1,5 y Ambisome[®]) fueron sacrificados a las 24 horas tras la primera dosis y otros dos grupos de 6 animales (tratados con AmB:DCH 1:1,5 y Ambisome[®]) fueron sacrificados tras la administración de la sexta dosis. Posteriormente se procede a la extracción de los pulmones de manera aséptica. El órgano fue pesado y homogeneizado

con 0,5 ml de agua Mili Q y las muestras pulmonares fueron almacenadas en tubos Pyrex a -20°C hasta su análisis.

Previo al análisis en el HPLC y una vez descongeladas las muestras, se añaden 800 μl de metanol a 400 μl de cada muestra homogenizada. Dicho preparado se lleva a agitación en un agitador tipo Vórtex[®] durante 2 minutos a 2400 rpm. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas durante 4 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante obtenido fue de nuevo filtrado usando un filtro HVLP de 0,45 μm . El nuevo sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar durante 2 minutos a 4000 rpm y se filtró nuevamente usando un filtro HVLP de 0,45 μm .

El tiempo de retención de las muestras pulmonares fue de 14-16 minutos, expresando los resultados de concentración de anfotericina B en $\mu\text{g/g}$.

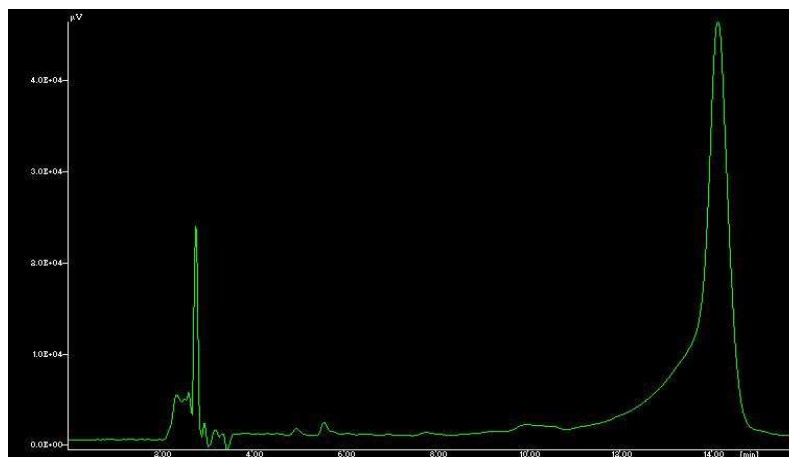


Figura 58. Cromatograma de anfotericina B en muestras pulmonares tras la administración de dosis múltiples de la formulación AmB:DCH 1:1,5.

❖ **Muestras renales**

Para analizar la concentración de anfotericina B alcanzada en los riñones, dos grupos de 6 ratones (tratados con AmB:DCH 1:1,5 y Ambisome[®]) fueron sacrificados a las 24 horas tras la primera dosis y otros dos grupos de 6 animales (tratados con AmB:DCH 1:1,5 y Ambisome[®]) fueron sacrificados tras la administración de la sexta dosis. Posteriormente se procede a la extracción de los riñones de manera aséptica. El órgano fue pesado y homogeneizado con 0,5 ml de agua Mili Q y las muestras renales fueron almacenadas en tubos Pyrex a -20°C hasta su análisis.

Previo al análisis en el HPLC y una vez descongeladas las muestras, se añaden 800 µl de metanol a 400 µl de cada muestra homogenizada. Dicho preparado se lleva a agitación en un agitador tipo Vórtex[®] durante 2 minutos a 2400 rpm.

Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas durante 4 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante obtenido fue de nuevo filtrado usando un filtro HVLP de 0,45 µm. El nuevo sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar durante 2 minutos a 4000 rpm y se filtró nuevamente usando un filtro HVLP de 0,45 µm.

El tiempo de retención de las muestras renales fue de 16-18 minutos, expresando los resultados de concentración de anfotericina B en µg/g.

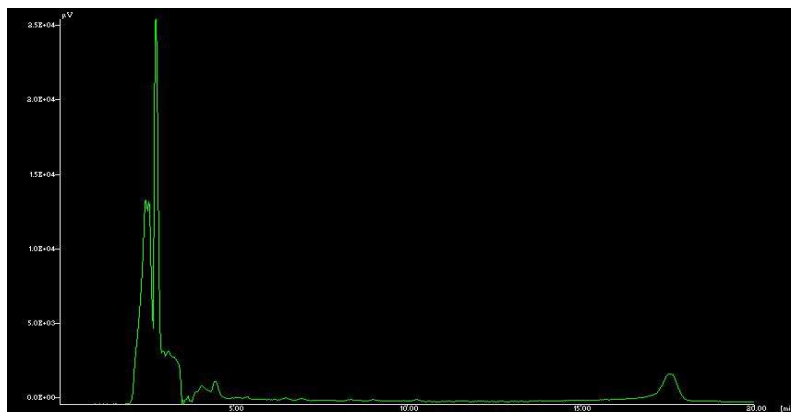


Figura 59. Cromatograma de anfotericina B en muestras renales tras la administración de dosis múltiples de la formulación AmB:DCH 1:1,5.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados han sido estadísticamente analizados utilizando el test de Mann-Whitney y expresados como resultado medio de concentración en $\mu\text{g/g} \pm$ desviación estándar. Un valor de P inferior a 0,05 ha sido considerado como diferencia significativa.

4. RESULTADOS

Se analizan los resultados obtenidos de la formulación de anfotericina B y desoxicolato AmB:DCH 1:1,5, así como de la formulación comercial de referencia Ambisome[®] a dosis de 5 mg/kg.

Los valores de concentración de anfotericina B alcanzados en los distintos órganos van a estar determinados por las características farmacotécnicas de las formulaciones administradas. El estado de agregación, el tamaño de partícula así como el tipo de formulación empleada (liposomas o micelas) van a influir en la distribución del fármaco en el organismo.

En este caso, se va a comparar la acumulación de anfotericina B en el órgano al cabo de 7 días con la alcanzada al cabo de 24 horas de manera que se pueda mantener un tratamiento prolongado en las infecciones fúngicas severas producidas a nivel pulmonar y que a su vez no se produzcan efectos nefrotóxicos.

Todos los resultados correspondientes a las concentraciones de anfotericina B obtenidas en los distintos órganos a las 24 horas y a los 7 días tras la administración de una única dosis y de 6 dosis de las formulaciones estudiadas (AmB:DCH 1:1.5 y Ambisome[®]), aparecen recogidos en la tabla 14.

Formulación	Número de dosis (5 mg/kg)	Concentración de AmB ± desviación estándar (µg/g)	
		Pulmón	Riñón
AmB:DCH 1:1,5	1	9,173 ± 0,498	0,119 ± 0,032
	6	18,125 ± 3,985	0,391 ± 0,167
Ambisome®	1	2,527 ± 0,386	1,797 ± 0,556
	6	6,567 ± 1,536	5,374 ± 1,157

Tabla 14. Concentraciones de anfotericina B en los distintos órganos obtenidas a las 24 h (1 única dosis) y a los 7 días (6 dosis) tras la administración de las formulaciones AmB:DCH 1:1,5 y Ambisome®.

4.1. Muestras pulmonares

La figura 60 muestra las concentraciones de anfotericina B alcanzadas en el pulmón tras la administración de AmB:DCH 1:1,5 y la formulación comercial Ambisome® a dosis de 5 mg/kg, a las 24 horas y a los 7 días tras la administración de dosis múltiple.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos en el primer ensayo *in vivo* con animales sanos, estas concentraciones son ligeramente más elevadas, debido a la inmunosupresión de los animales, pero guardan la misma proporción al comparar la formulación poliagregada AmB:DCH 1:1,5 con la formulación de referencia Ambisome®.

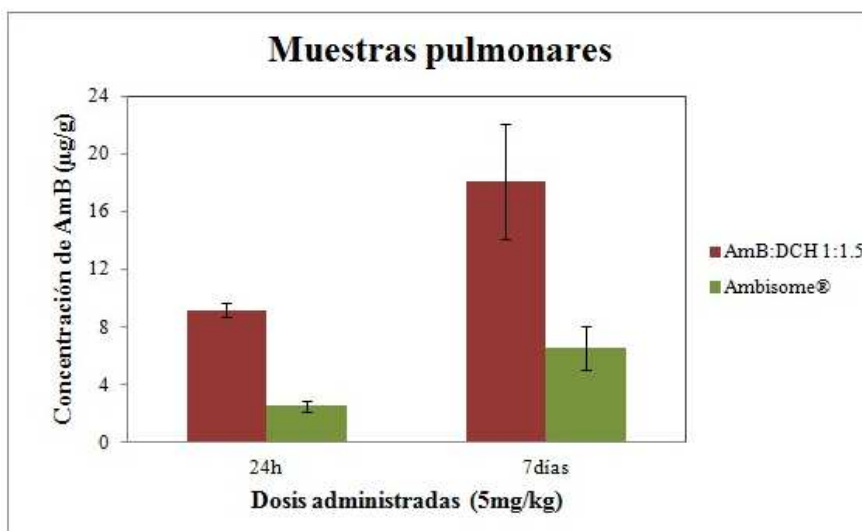


Figura 60. Concentraciones de anfotericina B en pulmón tras la administración de una única dosis de las formulaciones AmB:DCH 1:1.5 y Ambisome® (24 horas) y tras la administración de 6 dosis de las formulaciones AmB:DCH 1:1.5 y Ambisome® (7 días).

Cuando se administran la formulación AmB:DCH 1:1,5 se alcanzan concentraciones 3 veces más elevadas que las obtenidas con la formulación comercializada Ambisome® a las 24 horas y al cabo de 7 días ($P < 0.01$).

Además, las concentraciones pulmonares de anfotericina B mostraron un efecto acumulativo con las dos formulaciones administradas (AmB:DCH 1:1,5 y Ambisome®), tal y como se representa en la figura 60. Sin embargo, la concentración alcanzada con la formulación poliagregada de desoxicolato fue mucho mayor que la alcanzada con la formulación “gold standard” Ambisome® ($18,125 \pm 3,985 \mu\text{g/g}$ frente a $6,567 \pm 1,536 \mu\text{g/g}$), presentando un mayor efecto acumulativo (Adler-Moore y col., 2008).

Las concentraciones pulmonares obtenidas con Ambisome® tras dosis múltiple fueron similares a las obtenidas por otros autores con diferentes formulaciones de anfotericina B (Lewis y col., 2007; Takemoto y col., 2006).

4.2. Muestras renales

La figura 61 muestra las concentraciones de anfotericina B alcanzadas en el riñón tras la administración de AmB:DCH 1:1,5 y la formulación comercial Ambisome® a dosis de 5 mg/kg, a las 24 horas y a los 7 días tras la administración de dosis múltiple.

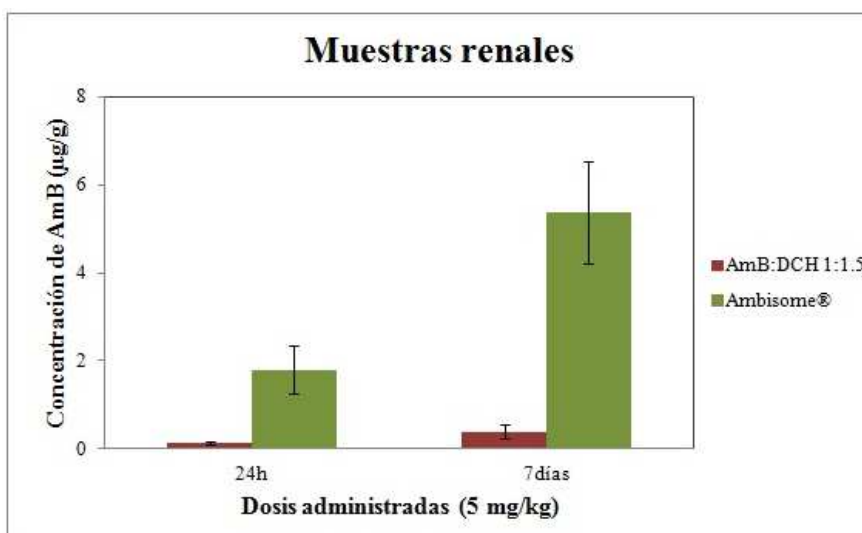


Figura 61. Concentraciones de anfotericina B en riñón tras la administración de una única dosis de las formulaciones AmB:DCH 1:1.5 y Ambisome® (24 horas) y tras la administración de 6 dosis de las formulaciones AmB:DCH 1:1.5 y Ambisome® (7 días).

A nivel renal, tanto la formulación lipídica de anfotericina B (Ambisome[®]) como la formulación micelar AmB:DCH 1:1,5 presentan concentraciones más bajas que las obtenidas en el pulmón, al igual que ocurría durante el estudio de dosis única (Capítulo III). A su vez, la formulación experimental AmB:DCH 1:1,5 mostró menores concentraciones de anfotericina B que el Ambisome[®], tanto a dosis única como a dosis múltiple.

Al contrario de lo que ocurría con el pulmón, tras 6 días de tratamiento, el efecto acumulativo en este caso es mayor con la formulación de referencia Ambisome[®], siendo la concentración renal de anfotericina B con Ambisome[®] 15 veces mayor que la obtenida con la formulación poliagregada AmB:DCH 1:1,5 ($P < 0.01$).

5. DISCUSIÓN

Cuando se administra la formulación AmB:DCH 1:1,5 presentan una mayor distribución a los pulmones, apreciándose una acumulación tras dosis repetidas tanto en la formulación poliagregada como en la formulación de referencia Ambsiome[®]. La formulación poliagregada alcanza concentraciones pulmonares 3 veces superiores cuando se compara con la formulación de referencia Ambsiome[®].

Esta acumulación pulmonar permite alcanzar concentraciones superiores a 4 µg/g, que es la concentración pulmonar requerida para obtener una eficacia terapéutica en el tratamiento de aspergilosis en modelos animales (Lewis y col., 2007). Por lo tanto, estas concentraciones serían adecuadas para el tratamiento de distintas infecciones fúngicas severas, tales como aspergilosis, superando las MIC más elevadas necesarias para la mayoría de los tratamientos (MIC=0,5-8 µg/ml) (Lass-Florl y col., 2009).

Las menores concentraciones renales de la formulación AmB:DCH 1:1,5 comparada con la formulación Ambsiome[®], tanto a las 24 como a los 6 días de tratamiento, parecen estar por debajo de las concentraciones necesarias para tratar infecciones sistémicas de aspergilosis con infecciones renales (Lass-Florl y col., 2009).

Sin embargo, si se logran evitar las fracciones de mayor tamaño de partícula, es posible que estas bajas concentraciones renales puedan disminuir la toxicidad renal si se compara con la formulación de referencia Ambsiome[®] y muchas de las formulaciones de anfotericina B desarrolladas (Adler-Moore y col., 2008; Andrew 2018; Clemons y col., 2012; Moreno-Rodríguez y col., 2015; Olson y col., 2008; Tuon y col., 2018; Wang y col., 2016), responsables de la supresión del tratamiento o del fracaso terapéutico en muchos tratamientos.

Los datos pulmonares y renales obtenidos a las 24 horas confirman lo obtenido durante el estudio de dosis única y los valores acumulativos al cabo de 7 días muestran una ventaja de la nueva formulación poliagregada frente a la comercializada, ya que ejercería un efecto positivo en infecciones pulmonares fúngicas severas, y si se elimina la fracción de elevado tamaño mediante un sencillo proceso de filtración antes de su inyección, posiblemente disminuya su efecto nefrotóxico permitiendo tratamiento más prolongados, especialmente importante en infecciones como la aspergilosis pulmonar.

C. ESTUDIO DE EFICACIA

1. INTRODUCCIÓN

Se realiza un estudio de eficacia de la formulación poliagregada AmB:DCH 1:1,5 en un modelo animal de aspergilosis con animales inmunodeprimidos, en el que se observa la supervivencia de los animales y se determina la carga fúngica presente en las distintas muestras renales y pulmonares.

El modelo de inmunosupresión utilizado así como las características de cada formulación influirán en la carga fúngica presente en cada muestra orgánica analizada. En este caso, los animales están infectados, lo que influye también en la distribución de anfotericina B según la formulación administrada.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

En este estudio se utilizan los siguientes productos y reactivos:

- La anfotericina B fue suministrada por Bristol Myers Squibb (Barcelona, España).
- El desoxicolato de sodio (DCH) fue suministrado por Fluka Chemierl A.G. (Buchs, Suiza).
- La fórmula comercial Ambisome[®] (constituida por anfotericina B, colesterol fosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilglicerol) fue suministrada por UCB-Pharma (Bruselas, Bélgica).
- El agua purificada fue obtenida mediante un sistema Milli-Q (Millipore, Estados Unidos).

2.1.1. Formulaciones

La formulación de anfotericina B seleccionada para este ensayo *in vivo* es la que presenta mayor proporción de desoxicolato sódico (AmB:DCH 1:1,5), a una dosis de 5 mg/kg, debido a los resultados obtenidos en el ensayo de dosis única.

❖ **Formulaciones:**

- Formulación AmB:DCH 1:1,5: se pesaron 10 mg de anfotericina B y 15 mg de desoxicolato sódico y se suspendieron en 20 ml de agua Mili Q.

Como formulación de referencia se utiliza la formulación comercializada Ambisome® a dosis de 5 mg/kg.

2.1.2. Animales de experimentación y material biológico

El estudio de eficacia de las formulaciones empleadas en el ensayo *in vivo* para estudiar la distribución del fármaco se llevó a cabo en ratones CD-1 (30-35 g). Los animales permanecieron, a temperatura y humedad controladas, en el laboratorio de experimentación animal de la Facultad de Medicina de la Universidad Rovira i Virgili de acuerdo con los principios de protección de animales de la directiva de la legislación de la Unión Europea (86/609/CE, RD 53/2013).

La cepa A1160 de *Aspergillus fumigatus* fue la empleada para infectar a los animales de experimentación.

2.2. Métodos

2.2.1. Elaboración de las formulaciones

El método de preparación seguido fue la disolución de desoxicolato en agua purificada y la posterior adición de la cantidad correspondiente de anfotericina B. Se mantiene bajo agitación durante 4 minutos en un agitador tipo Vórtex[®] a una velocidad de 2400 rpm antes de su administración.

2.2.2. Modelo animal de aspergilosis pulmonar

Para estudiar la eficacia de la administración intravenosa de las formulaciones AmB:DCH 1:1,5 y Ambisome[®], se desarrolla un modelo animal de aspergilosis pulmonar en animales inmunodeprimidos, infectados con la cepa A1160 de *Aspergillus fumigatus*. Dicha cepa fue cultivada en PDA e incubada a 37°C durante 5 días. La concentración del inoculo se ajusta mediante diluciones seriadas.

Los distintos grupos de animales consisten en:

- Grupo control: de 16 animales infectados, 8 serán utilizados para determinar la carga fúngica 8 días después de la infección y 8 animales serán utilizados para el estudio de supervivencia.
- Grupo tratado con AmB:DCH 1:1,5 (5 mg/kg/día): de 16 animales, 8 serán utilizados para determinar las unidades formadoras de colonias (CFU) 8 días después de la infección y 8 animales serán utilizados para el estudio de supervivencia 12 días después de la infección.

- Grupo tratado con Ambisome[®] (5 mg/kg/día): de 16 animales, 8 serán utilizados para determinar las unidades formadoras de colonias (CFU) 8 días después de la infección y 8 animales serán utilizados para el estudio de supervivencia 12 días después de la infección.

2.2.3. Administración de las formulaciones

Los ratones fueron inmunodeprimidos con acetato de cortisona por vía subcutánea (125 mg/kg) cada 3 días (Dixon y col., 1989). Cinco días después de la inmunosupresión, los animales recibieron dosis múltiples de 5 mg/kg de AmB:DCH 1:1,5 o Ambisome[®], durante 6 días seguidos, por vía intravenosa. El grupo control recibió solución de dextrosa al 5% (placebo).

2.2.4. Análisis de CFUs

La infección se realizó por vía intranasal administrando 5×10^4 CFUs/ratón en 20 μ L, previa anestesia con sevoflurano inhalado.

Ocho animales por grupo se utilizaron para determinar las unidades formadoras de colonias a los 8 días tras la infección y los otros ocho animales restantes para el estudio de supervivencia durante 12 días.

Doce días después de la infección y 24 horas después de la última dosis, los animales del grupo destinado al análisis de CFUs que sobreviven, fueron sacrificados y los pulmones y riñones fueron extraídos de manera aséptica y homogeneizados con suero salino 0,9%. Se realizó una dilución 1/10 y se colocaron en placas de agar para la determinación de CFUs expresado en CFU/g de tejido.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de carga fúngica han sido estadísticamente analizados utilizando el test de Mann-Whitney y expresados como resultado medio de concentración en log₁₀ CFU/g de tejido. Las curvas de supervivencia fueron comparadas utilizando el test de rango logarítmico. Las diferencias significativas se realizaron utilizando la tabla ANOVA y la comparación de grupos pareados se realizó mediante el test de Tukey. Un valor de P inferior a 0,05 es considerado como diferencia significativa.

4. RESULTADOS

4.1. Curvas de supervivencia y cambio de peso

La figura 62 muestra los datos de supervivencia de los ratones tratados con 5 mg/kg de AmB:DCH 1:1,5 y Ambisome[®], comparado con el grupo control.

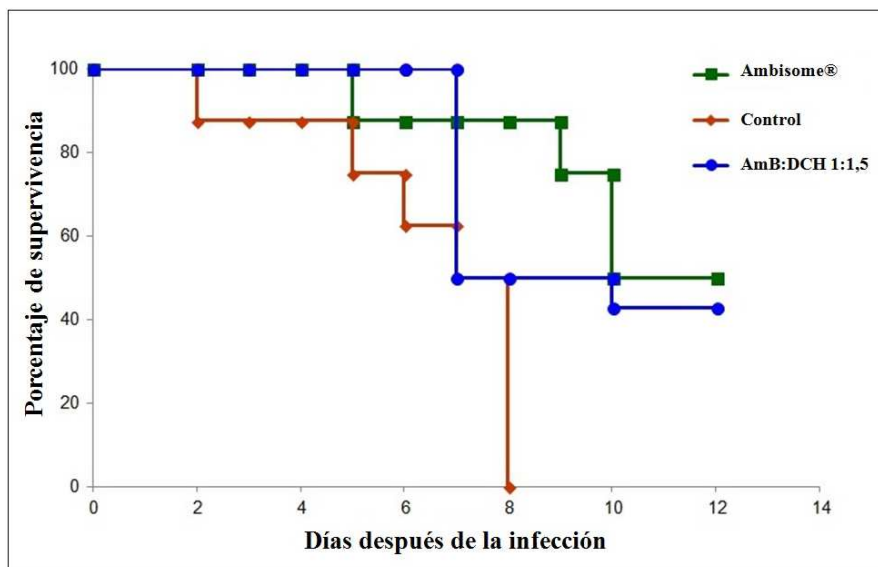


Figura 62. Supervivencia de los ratones (n=8 ratones/grupo) infectados con *A. fumigatus* y tratados con 5 mg/kg de Ambisome[®], AmB:DCH 1:1,5 y dextrosa (grupo control) durante 6 días.

Todos los animales del grupo control murieron a los 8 días después de la infección mientras que ambos tratamientos (AmB:DCH 1:1,5 y Ambisome[®]) aumentaron significativamente la supervivencia de los animales en porcentajes de supervivencia de 42,8% y 50% comparado con el grupo control (P=0,077). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos tratados (P>0,05).

La figura 63 muestra los datos de pérdida de peso de los ratones tratados con 5 mg/kg de AmB:DCH 1:1,5 y Ambisome[®], comparado con el grupo control.

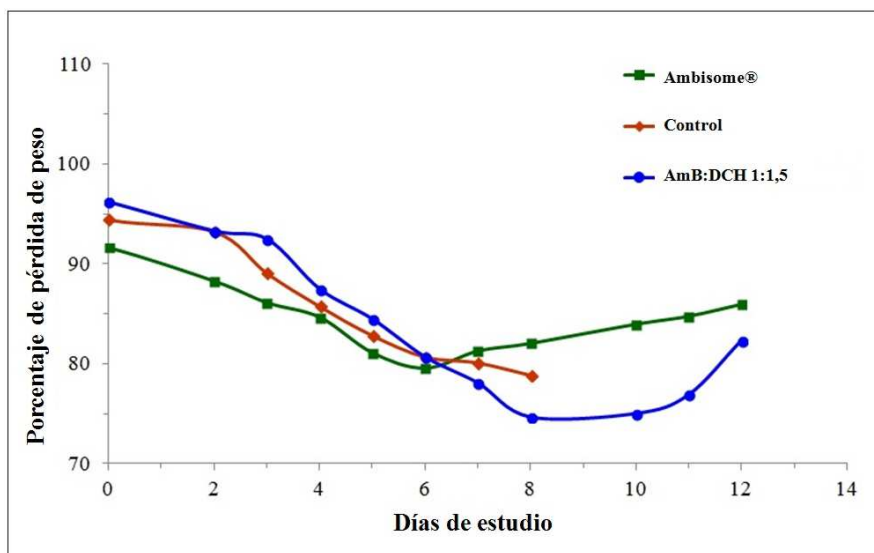


Figura 63. Porcentajes de pérdida de peso de los ratones (n=8 ratones/grupo) infectados con *A. fumigatus* y tratados con 5 mg/kg de Ambisome[®], AmB:DCH 1:1,5 y dextrosa (grupo control) durante 6 días.

Los datos correspondientes al peso de los animales mostraron una bajada muy marcada de peso en todos los animales. El grupo control presenta una bajada de peso de los animales hasta el día 8, momento de su fallecimiento. Los dos grupos de tratamiento, mostraron una bajada de peso inicial, similar al grupo control, pero pasado un número de días post-tratamiento, se observa un cambio de tendencia, produciéndose un aumento progresivo de peso, a los 6 días en el grupo de Ambisome[®] y a los 8 días en el grupo AmB:DCH 1:1,5.

La infección mostró elementos fúngicos viables en la mayoría de los pulmones del grupo control y de los animales tratados, sin encontrar diferencias significativas entre los grupos ($P > 0,05$). Esta ausencia de diferencias significativas, posiblemente esté relacionada con el bajo número de animales existente en el grupo control.

La carga fúngica en el grupo tratado con la formulación poliagregada AmB:DCH 1:1,5 mostró los valores más bajos ($\log_{10} 2,58 \pm 2,129$ CFU/g pulmón), con un 40% de los ratones que presentaron CFUs/g no detectables en el tejido. Sin embargo, contrario a lo que cabía esperar, todos los ratones que recibieron la formulación de referencia Ambisome[®] tuvieron elevados valores de CFUs/g ($\log_{10} 4,45 \pm 0,402$ CFU/g).

Por otro lado, la infección mostró baja diseminación al riñón en los animales del grupo control, mientras que un elevado aclaramiento de la carga fúngica fue observado en los animales tratados, con CFUs/g no detectables en el 80% de los ratones que recibieron AmB:DCH 1:1,5 y en el 100% de los ratones tratados con Ambisome[®].

Un rápido aclaramiento en el tejido pulmonar de la formulación poliagregada podría explicar el descenso en el porcentaje de supervivencia de los ratones tratados con AmB:DCH 1:1,5. Sin embargo, cuando se administraba Ambisome[®], se obtenían menores concentraciones pulmonares tras una única dosis en animales no infectados ($2,527 \pm 0,386$ $\mu\text{g/g}$ a las 24 horas).

Esta baja concentración inicial podría estar relacionada con un aumento en la carga fúngica en los ratones tratados con esta formulación durante el primer estadio de la infección (Lewis y col., 2007). Según otros autores, dosis de 10 mg/kg serían necesarias para obtener una reducción significativa de *A. fumigatus* durante el primer estadio de la infección (Clemons y col., 2005; Lewis y col., 2007).

La figura 65 muestra la carga fúngica en riñones y pulmones de los ratones que han sobrevivido durante 12 días. No se obtuvieron resultados del grupo control ya que todos los animales murieron debido a la infección.

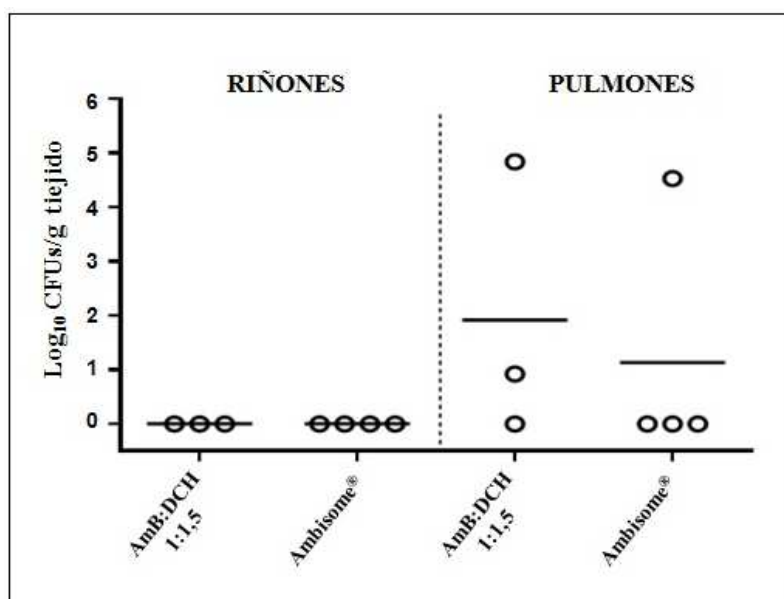


Figura 65. Carga fúngica en riñón y pulmón de los ratones que han sobrevivido durante 12 días tras la administración de 6 dosis de 5 mg/kg de Ambisome®, AmB:DCH 1:1,5, previa infección con *A. fumigatus*.

A los 12 días después de la infección, no se encontraron CFUs en el riñón al contrario de lo que se observó en los pulmones, donde algunos animales, tratados con AmB:DCH 1:1,5 y Ambisome[®], mostraron niveles de carga fúngica sin encontrarse diferencias significativas entre ambos grupos (P=0,371). Los resultados de carga fúngica obtenidos a los 12 días confirman lo observado al cabo de 8 días, con una baja diseminación en el riñón de la cepa de *A. fumigatus* utilizada (Gavaldá y col., 2005).

Si comparamos los resultados obtenidos entre el día 8 y el día 12 tras la infección observamos importantes cambios en los porcentajes de erradicación de cada grupo. Mientras que el grupo que recibió dosis de 5 mg/kg de AmB:DCH 1:1,5 presentó resultados similares, el grupo que recibió dosis de 5 mg/kg de Ambisome[®], mostró un aumento importante en los porcentajes de erradicación, tal y como se observa en las figuras 64 y 65.

Las diferencias en los valores de CFUs del tejido pulmonar entre AmB:DCH 1:1,5 y Ambisome[®], podrían estar relacionados con las distintas concentraciones de anfotericina B alcanzadas debido a los distintos tamaños de partícula entre las dos formulaciones (Espada y col., 2008; Serrano y col., 2013).

El descenso en las CFUs observado al final del estudio con la formulación comercial Ambisome[®] estaría relacionado con el menor tamaño de partícula y las características morfológicas de los liposomas de anfotericina B, tal y como indican otros autores (Adler-Moore 2016; Olson y col., 2015) o debido a que las pequeñas esferas de la formulación comercial de anfotericina B (Ambisome[®]) permanecen en el pulmón 12-48 horas después de la administración (Olson y col., 2008; Takemoto y col., 2006).

5. DISCUSIÓN

Los tratamientos de AmB:DCH 1:1,5 y Ambisome[®] mostraron eficacia similar en términos de supervivencia y reducción de la carga fúngica. Sin embargo, un descenso comparable en el peso de los ratones fue observado en los diferentes grupos.

El modelo de aspergilosis pulmonar utilizado ha demostrado una elevada infección pulmonar con elementos fúngicos viable 8 días después de la infección y con una baja infección renal. Estos resultados sugieren que la cepa A1160 de *A. fumigatus* se disemina poco a otros órganos 8 días después de la infección, tal y como reflejan otros autores (Barchiesi y col., 2016).

Los resultados obtenidos durante el ensayo de eficacia son consistentes con lo observado en las concentraciones pulmonares en el ensayo *in vivo* con animales inmunosuprimidos, pero no infectados. Probablemente, el mayor tamaño de partícula de la formulación AmB:DCH 1:1,5 por su mayor tamaño de partícula y la presencia en su morfología de un surfactante aniónico, produce una rápida biodistribución al tejido pulmonar ($9,173 \pm 0,498 \mu\text{g/g}$ a las 24 horas) y un mayor aclaramiento de la carga fúngica inicial (Groll y col., 2006). Sin embargo, la formulación Ambisome[®], por su menor tamaño de partícula y la morfología de los liposomas, posiblemente presente una eliminación pulmonar más lenta mejorando la eficacia en los días posteriores al tratamiento (2 días después de la última dosis).

Estos resultados nos permiten suponer el efecto beneficioso de nuestras formulaciones frente a aspergilosis pulmonares con cepas más resistentes a la anfotericina B. Además, sería interesante combinar estos nuevos tratamientos con el tratamiento de referencia (Ambisome[®]) frente a infecciones fúngicas sistémicas que produzcan una distribución tanto a nivel pulmonar como renal.

D. BIBLIOGRAFÍA

- Adler-Moore, J.P., Proffitt, R.T. Amphotericin B lipid preparations: what are the differences? *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14(4):25-36.
- Adler-Moore, J.P., Gangneux, J.P., Pappas, P.G. Comparison between liposomal formulations of amphotericin B. *Med Mycol.* 2016; 54(3):223-231.
- Andrew, E.C., Curtis, N., Coghlan, B., Cranswick, N., Gwee, A. Adverse effects of amphotericin B in children; a retrospective comparison of conventional and liposomal formulations. *Br J Clin Pharmacol.* 2018; 84(5):1006-1012.
- Barchiesi, F., Santinelli, A., Biscotti, T., Greganti, G., Giannini, D., Manso, E. Delay of antifungal therapy influences the outcome of invasive aspergillosis in experimental models of infection. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71(8):2230-2233.
- Clemons, K.V., Espiritu, M., Parmar, R., Stevens, D.A. Comparative efficacies of conventional amphotericin B, liposomal amphotericin B (AmBisome), caspofungin, micafungin, and voriconazole alone and in combination against experimental murine central nervous system aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 49(12):4867-4875.
- Dixon, D.M., Polak, A., Walsh, T.J. Fungus dose-dependent primary pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice. *Infect Immun.* 1989; 57(5):1452-1456.
- Espada, R., Valdespina, S., Alfonso, C., Rivas, G., Ballesteros, M.P., Torrado, J.J. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *Int J Pharm.* 2008; 36(1-2):64-69.

- Fernández-García, R., de Pablo, E., Ballesteros, M.P., Serrano, D.R. Unmet clinical needs in the treatment of systemic fungal infections: The role of amphotericin B and drug targeting. *Int J Pharm.* 2017; 525:139-148.
- Gavaldà, J., Martín, T., López, P., Gomis, X., Ramírez, J.L., Rodríguez, D., Len, O., Puigfel, Y., Ruiz, I., Pahissa, A. Efficacy of high loading doses of liposomal amphotericin B in the treatment of experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 11(12):999-1004.
- Groll, A.H., Lyman, C.A., Petraitis, V., Petraitiene, R., Armstrong, D., Mickiene, D., Alfaro, R.M., Schaufele, R.L., Sein, T., Bacher, J., Walsh, T.J. Compartmentalized intrapulmonary pharmacokinetics of amphotericin B and its lipid formulations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(10):3418-3423.
- Lass-Flörl, C., Alastruey-Izquierdo, A., Cuenca-Estrella, M., Perkhofer, S., Rodriguez-Tudela, J.L. In Vitro Activities of Various Antifungal Drugs against *Aspergillus terreus*: Global Assessment Using the Methodology of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(2):794-795.
- Lewis, R.E., Liao, G., Hou, J., Chamilos, G., Prince, R.A., Kontoyiannis, D.P. Comparative analysis of amphotericin B lipid complex and liposomal amphotericin B kinetics of lung accumulation and fungal clearance in a murine model of acute invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(4):1253-1258.

- Olson, J.A., Adler-Moore, J.P., Schwartz, J., Jensen, G.M., Proffitt, R.T. Comparative efficacies, toxicities, and tissue concentrations of amphotericin B lipid formulations in a murine pulmonary aspergillosis model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:2122–2131.
- Olson, J.A., Adler-Moore, J.P., Jensen, G.M., Schwartz, J., Dignani, M.C., Proffitt, R.T. Comparison of the physicochemical, antifungal, and toxic properties of two liposomal amphotericin B products. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(1):259-268.
- Olson, J.A., Schwartz, J.A., Hahka, D., Nguyen, N., Bunch, T., Jensen, G.M., Adler-Moore, J.P. Toxicity and efficacy differences between liposomal amphotericin B formulations in uninfected and *Aspergillus fumigatus* infected mice. *Med Mycol.* 2015; 53(2):107-118.
- Serrano, D.R., Hernández, L., Fleire, L., González-Alvarez, I., Montoya, A., Ballesteros, M.P., Dea-Ayuela, M.A., Miró, G., Bolás-Fernández, F., Torrado, J.J. Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations. *Int J Pharm.* 2013; 447(1-2):38-46.
- Takemoto, K., Yamamoto, Y., Ueda, Y., Sumita, Y., Yoshida, K., Niki, Y. Comparative study on the efficacy of AmBisome and Fungizone in a mouse model of pulmonary aspergillosis. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57(4):724-731.
- Tuon, F.F., Florencio, K.L., Rocha, J.L. Burden of acute kidney injury in HIV patients under deoxycholate amphotericin B therapy for cryptococcal meningitis and cost-minimization analysis of amphotericin B lipid complex. *Med Mycol.* 2018.

- Zia, Q., Khan, A.A., Swaleha, Z., Owais, M. Self-assembled amphotericin B-loaded polyglutamic acid nanoparticles: preparation, characterization and in vitro potential against *Candida albicans*. *Int J Nanomedicine*. 2015; 10:1769-1790.

CONCLUSIONES

1. Los espectros de absorción de las nuevas formulaciones con desoxicolato sódico corresponden a la forma poliagregada de la anfotericina B, en las que se forman sistemas micelares de tamaño nanométrico debido a la presencia de desoxicolato.
2. El desoxicolato sódico produce un efecto estabilizante en las formas poliagregadas de anfotericina B. Así, las formulaciones poliagregadas de anfotericina B y desoxicolato AmB:DCH [1:0,8] y [1:1,5], una vez reconstituidas, no presentan cambios en el tamaño de partícula, y son estables químicamente durante 7 días de almacenamiento a 25°C y protegidos de la luz.
3. Tras la administración de una dosis única de las formulaciones poliagregadas y de la formulación Ambisome[®], las nuevas formulaciones muestran concentraciones más elevadas a nivel pulmonar, mientras que la formulación Ambisome[®] alcanza mayores concentraciones en órganos del sistema retículo endotelial, como hígado y bazo.
4. Tras la administración de dosis múltiples en animales inmunodeprimidos, se confirma que la formulación poliagregada AmB:DCH 1:1,5 presenta concentraciones pulmonares tres veces superiores, y acumulaciones en tejido renal cuatro veces menores que la formulación de referencia Ambisome[®]. La nueva formulación presenta una leve mejora en los efectos nefrotóxicos comparada con la formulación de referencia.

5. Los estudios de eficacia en animales inmunodeprimidos tras infección con *Aspergillus fumigatus*, muestran un mayor descenso de la infección en tejido pulmonar durante la administración de la formulación poliagregada AmB:DCH 1:1,5 en los primeros días de tratamiento, comparada con el tratamiento de referencia.

6. Los estudios de eficacia en animales inmunodeprimidos tras infección con *Aspergillus fumigatus*, muestran una eficacia similar en términos de supervivencia y reducción de carga fúngica al final del tratamiento, al comparar la formulación poliagregada y la formulación de referencia. Este resultado posiblemente esté relacionado con una eliminación más lenta de la formulación de liposomas en relación con la formulación micelar poliagregada.

ANEXO I: PUBLICACIÓN

Experimental Amphotericin B-Deoxycholate formulations for pulmonary aspergillosis: efficacy, biodistribution and nephrotoxicity.

Alicia López-Sánchez ^a, Alba Pérez-Cantero ^b, Carlos Torrado-Salmerón ^a, Adela Martín-Vicente ^b, Víctor García-Herrero ^a, María Ángeles González-Nicolás ^c, Alberto Lázaro ^{c, d}, Alberto Tejedor ^{c, e}, Santiago Torrado-Santiago ^{a,f}, Juan José García-Rodríguez ^g, Javier Capilla ^b, Susana Torrado ^{a,f*}.

^aDepartment of Pharmaceutics and Food Technology, Faculty of Pharmacy, Complutense University, Madrid, Spain.

^bUnitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili and Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV). Reus, Spain.

^cRenal Physiopathology Laboratory, Department of Nephrology, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IiSGM), Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain.

^dDepartment of Physiology, School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain.

^eDepartment of Medicine, School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain.

^fInstituto Universitario de Farmacia Industrial, Complutense University, Madrid Spain.

^gDepartment of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, Complutense University, Madrid Spain.

* Corresponding author: Susana Torrado-Durán

Department of Pharmaceutics and Food Technology, Faculty of Pharmacy, Complutense University, Plaza Ramón y Cajal S/N, Madrid 28040, Spain.

Tel.: 34 01 3941620; Fax: 34 01 3941736

E-mail address: storrado@ucm.es

ABSTRACT

An experimental micellar formulation of amphotericin B (AMB) with sodium deoxycholate (DCH), AMB:DCH 1:1.5, was obtained and characterized to determine its aggregation state and particle size. Biodistribution, nephrotoxicity and efficacy against pulmonary aspergillosis in a murine model were studied and compared to the liposomal commercial amphotericin B after intravenous administration. The administration of 5 mg/kg AMB:DCH 1:1.5 presented 2.8-fold higher lung concentrations ($18.125 \pm 3.985 \mu\text{g/g}$, after 6 daily doses) and lower kidney exposure ($0.391 \pm 0.167 \mu\text{g/g}$) compared to liposomal commercial amphotericin B (6.567 ± 1.536 and $5.374 \pm 1.157 \mu\text{g/g}$, in lungs and kidneys, respectively). The different biodistribution of AMB:DCH micelle systems compared to liposomal commercial amphotericin B was attributed to their different morphology and particle size. The efficacy study has shown that both drugs administered at 5 mg/kg produced similar survival percentages and reduction of fungal burden. A slightly lower nephrotoxicity, associated to amphotericin B, was observed with AMB:DCH 1:1.5 than the one induced by the liposomal commercial formulation. However, AMB:DCH 1:1.5 reached higher AMB concentrations in lungs that could represent a therapeutic advantage over liposomal commercial amphotericin B-based treatment of pulmonary aspergillosis. These results are encouraging to explore the AMB:DCH 1:1.5 usefulness against this disease.

KEYWORDS: aspergillosis, Amphotericin B deoxycholate, pulmonary concentrations, efficacy, nephrotoxicity.

INTRODUCTION

The increase of immunosuppressive agents and the extensive usage of corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease have also led to a rising prevalence of invasive mycoses such as aspergillosis in recent years (1, 2). The initial site of most fungal infections as aspergillosis in humans is primarily the lungs, with hematogenous dissemination to the spleen, kidneys, liver, and brain as the disease progresses. So, high initial pulmonary concentrations of antifungal drugs are needed to avoid the dissemination of the pathogens that make the infection even more difficult to treat. Liposomal amphotericin B (LAMB) is the gold standard in aspergillosis therapy (1, 3). Several studies have demonstrated that large particle sizes of different AMB formulations are related to high nephrotoxicity (4-7). Commercial dimeric deoxycholate amphotericin B (D-AMB) shows a high percentage of small particles (56.2 ± 4.3 nm), and a small percentage of large particles (around $4.0 \mu\text{m}$) (6) being the latter related to nephrotoxicity (4-7) LAMB, the reference commercial formulation, with a poly-aggregated AMB form, shows low particle size (around 100 nm) that enhances antifungal efficacy and diminishes drug toxicity (8) while other lipid complexes marketed as Abelcet[®] (ABLC) presents poly-aggregated AMB with a particle size of 1.6-11 μm (7). This larger particle size of ABLC formulations favors a greater pulmonary distribution but also increases its nephrotoxicity compared to LAMB (4).

However, the high costs of commercial lipid formulations limit their use. On the other hand, the less expensive commercial dimeric deoxycholate amphotericin B (D-AMB) has lower antifungal efficacy and causes serious side effects (9). Therefore, various new amphotericin B formulations such as emulsions, liposomes and microspheres have been developed to increase efficacy and decrease side effects (10). In previous works, it has been observed that poly-aggregated systems of AMB with sodium deoxycholate are a safer and less toxic form than D-AMB, with the same

proportion of DCH, when administered intravenously (6, 11). The AMB distribution to organs with high presence of macrophages and organs of the reticulo-endothelial system like liver and spleen is related to formulation parameters such as the aggregation state and particle size (11, 12). After the parenteral administration of LAMB, the highest concentrations appeared in organs of the reticulo-endothelial system, while lower drug concentrations appeared in other organs such as lungs (13). So, a lung concentration of 1.44 $\mu\text{g/g}$ was obtained 24 hours after the administration of a 5 mg/kg dose of LAMB (14). These probably insufficient pulmonary concentrations make necessary to search new AMB formulations in order to guarantee higher efficacy against dangerous pulmonary pathogen agents like *Aspergillus* spp.

The aim of this project is to develop a lung-specific delivery system of AMB with a high pulmonary distribution and a low nephrotoxicity. A low renal dissemination pulmonary aspergillosis model was selected in order to correlate nephrotoxicity results with the new AMB formulation.

RESULTS

AMB formulations characteristics. The aggregation state of amphotericin B in the experimental formulations was evaluated by measuring UV-visible absorbance. A standard AMB formulation using methanol as solvent (M-AMB) and a formulation with no surfactant in water for injection (AMB:DCH 1:0) were used as reference formulations and compared with deoxycholate containing formulation (AMB:DCH 1:1.5). The absorption spectrum of M-AMB showed four high pronounced peaks at 353, 372, 390 and 414 nm. The absorption spectrum of AMB:DCH 1:0 showed two faint peaks at 386 y 403 nm.

Absorption spectrum of AMB:DCH 1:1.5 formulation in water showed a shoulder around 330 nm and some faint peaks at higher wavelengths (393, 407 and 424 nm). The absorbance values at different wavelengths of this deoxycholate containing formulation

was clearly different from the previously observed ones in the spectrum of M-AMB. Furthermore, AMB:DCH 1:1.5 showed 3-fold higher absorbance values than formulation with no DCH (AMB:DCH 1:0).

The particle size of experimental (AMB:DCH 1:1.5) and reference (AMB:DCH 1:0) formulations was performed and expressed as mean particle size (nm) \pm standard deviation (SD). Both formulations in water presented polydispersity indexes less than 0.6.

The presence of sodium deoxycholate in AMB:DCH 1:1.5 formulation decreased significantly ($P < 0.001$) the particle size (404.9 ± 1.7 nm) regarding the formulation without surfactant AMB:DCH 1:0 (514.8 ± 34.2 nm).

AMB biodistribution to kidneys and lungs. The study of AMB biodistribution consisted of the administration of a single and multiple doses of AMB in uninfected and immunosuppressed mice in order to evaluate the AMB concentration reached in lungs and kidneys.

AMB concentrations in renal and lung tissues 24 hours after a single dose of AMB:DCH 1:1.5 or LAMB formulations administered at 5 mg/kg dose are observed in Fig. 1. LAMB formulation showed AMB concentrations in kidneys 15 times greater than AMB:DCH 1:1.5 ($P < 0.01$). However, AMB concentrations reached in lung tissues with AMB:DCH 1:1.5 formulation at 24 hours were significantly higher ($P < 0.01$) than the ones obtained with LAMB treatment (9.173 ± 0.498 $\mu\text{g/g}$ versus 2.527 ± 0.386 $\mu\text{g/g}$, respectively). After 6 days of treatment, renal concentrations of AMB showed an important cumulative effect (Fig. 1A). However, low kidney levels of AMB were reached with AMB:DCH 1:1.5 formulation after 6 days of treatment (0.391 ± 0.167 $\mu\text{g/g}$). Thus, AMB renal concentration for LAMB were 15-fold higher than AMB:DCH 1:1.5 formulation ($P < 0.01$). Also, lung concentrations of AMB showed a cumulative effect with both AMB:DCH 1:1.5 and LAMB formulations (Fig. 1B). A higher concentration in lung tissue was observed with AMB:DCH 1:1.5 formulation at 5

mg/kg dose ($18.125 \pm 3.985 \mu\text{g/g}$) compared with a dose of 5 mg/kg/day of LAMB formulation ($6.567 \pm 1.536 \mu\text{g/g}$).

Drug nephrotoxicity. One of the most important problems of amphotericin B is its nephrotoxicity. Therefore, renal toxicity of all AMB new experimental formulations should be tested and compared with commercial formulations. In this first preclinical study of toxicity, immunocompetent mice were used.

Serum nephrotoxicity biochemical parameters as creatinine and blood urea nitrogen (BUN) were tested after six daily doses of each treatment at therapeutic or elevated AMB doses (5 and 20 mg/kg/day). Table 1 shows the results of creatinine and BUN serum levels. All creatinine concentrations obtained with experimental and commercial formulations were slightly higher than the one obtained with control group. These creatinine values were similar after the administration of therapeutic or high doses of AMB. Commercial LAMB formulation presented the highest values of creatinine concentrations.

Histopathological studies of renal tissue of all treated mice with 6 daily AMB 5 mg/kg/day doses showed tubular and glomerular morphologic abnormalities compared to the control group that maintained the normal morphology (Fig. 2). These changes in renal tissue of mice treated with experimental and commercial AMB formulations include extensive areas of inflammatory cells (surrounding tubules and glomeruli), extra-capillary proliferative glomerulonephritis and acute tubular epithelial damage with the presence of tubular necrosis, cell debris detachment, swelling and tubular dilation. The renal sample of LAMB formulation also showed protein casts in renal tubules. The photomicrographs of mice kidney sections regarding higher AMB doses (20 mg/kg/day) showed a small increase of renal tissue damages (data not shown) when this dose was administered as compared with the same formulations given at 5 mg/kg/day.

Drug efficacy. This study was performed in immunosuppressed and infected animals. Fig. 3A shows survival rates of untreated animals and of those treated with 5 mg/kg AMB:DCH 1:1.5 or LAMB. All animals from control group succumbed within 8 days post-challenge. Both treatments, AMB:DCH 1:1.5 and LAMB, significantly increased the survival of the animals with survival rates of 42.8% and 50.0% in comparison to the control group ($P=0.077$). However, no significant differences were found between treated groups ($P>0.05$).

Body weights showed a drop in all animals (Fig. 3B). This pattern was followed by a continuous drop in weight in control animals, in contrast to a progressive rise in weight of treated groups. Infected mice treated with AMB:DCH 1:1.5 and LAMB formulations at doses of 5 mg/kg showed similar percentages of weight loss as well as weight recovery starting on the day 8 and day 6 post infection, respectively.

Infection showed viable fungal elements in most of the lungs from control and treated animals with no significant differences between groups ($P>0.05$). Fungal burden in the group treated with experimental AMB:DCH 1:1.5 formulation showed the lowest values ($\log_{10} 2.58 \pm 2.130$ CFU/g lung tissue), with 40% of mice displaying non-detectable CFUs in this tissue. But, contrary to our expectations, all mice in the group receiving LAMB had high CFUs/g values ($\log_{10} 4.45 \pm 0.40$ CFU/g lung tissue). Infection showed low spread to kidneys in control animals but high clearance was observed in treated animals with undetectable CFUs in 80% of animals receiving AMB:DHC 1:1.5 and 100% of those receiving LAMB.

No CFUs were recovered from kidneys at the end of the experimental time i.e., 12 days after infection in treated animals in contrast to the results in lungs, where a few treated animals with AMB:DHC 1:1.5 and LAMB showed low fungal burden with no significant differences between them ($P=0.371$) (data not shown). Important changes on eradication percentages for each treatment group between days +8 and +12 were observed. Thus, the group that received 5 mg/kg of AMB:DCH 1:1.5 formulation

presented similar eradication results in lung tissue 12 days after infection to the obtained on day 8. The group that received 5 mg/kg/day of LAMB formulation showed an important increase in eradication percentages between day +8 and day +12 ($3 \log_{10}$).

DISCUSSION

The aggregation state study of the reference M-AMB formulation showed peaks corresponding to the monomeric form of AMB (15). However, absorption spectrum of AMB:DCH 1:1.5 formulation was clearly different from the previously observed spectrum of the monomeric form and did not show the characteristic high peak of the dimeric form (15). Therefore, this spectrum of experimental AMB:DCH formulation was indicative of the presence of amphotericin B poly-aggregated form, which usually presents a lower nephrotoxicity than D-AMB (6, 9). AMB:DCH 1:1.5 showed higher absorbance values than the reference formulation with no deoxycholate (AMB:DCH 1:0). These higher absorbance values of AMB:DCH 1:1.5 formulation may be related with a poly-aggregated AMB form into a small size micellar system, induced by the surfactant action of the sodium deoxycholate (16, 17).

Particle size measurements were performed in triplicate and represented by the mean result (\pm standard deviation). Polydispersity indexes were similar to the ones presented by other authors in micellar formulations (6). In previous studies, the poly-aggregated formulation AMB:DCH 1:0 showed a higher particle size (1280 ± 216.0 nm) when using a shorter agitation time (2 minutes) (6). Therefore, stirring conditions has been proved to be a key issue in order to obtain small poly-aggregated AMB systems as other authors have also reported (17).

AMB:DCH 1:1.5 poly-aggregated formulation presented a small value of standard deviation when its particle size was studied and this low variability should be attributed to the stabilizing effect of DCH by means of ionic interactions with AMB (5). Thus, in this AMB formulation, sodium deoxycholate acts as a stabilizing agent inhibiting

particle growth, so the surfactant effect is critical in AMB nanoparticle systems (16, 17). The use of surfactants as stabilizing agents has been previously reported by several authors (6, 18).

Finally, it is noteworthy that particle size of AMB in this poly-aggregated preparation was very different from the one observed with commercial AMB formulation (LAMB) that has been reported as about 100 nm by other authors and therefore may be related to different organ distribution (19).

AMB concentrations obtained in this work with the studied formulations showed different AMB distribution to kidneys and lungs as other authors have previously observed (13). Our results suggest that particle size and surface morphology of colloidal and liposomal systems may influence the distribution of AMB to different organs. Formulations with small particle size (LAMB) presented high concentrations in organs like kidney whilst the new poly-aggregated AMB:DCH formulation with higher particle size led to a greater lung distribution.

At renal level, the new poly-aggregated formulation developed in this work showed less AMB concentrations in kidneys than the ones observed with LAMB (20, 21) either after 1 or 6 days of treatment (5 mg/kg/day). The increase in AMB renal concentrations observed with the DCH formulation may be related to the influence of the hydrophilic sodium deoxycholate surfactant on micelles distribution. However, due to the important renal effects of AMB formulations (11), a toxicity study was performed with the experimental DCH formulation, employing LAMB and AMB:DCH 1:0 formulations as reference, to observe the possible influence of AMB and DCH in the nephrotoxicity.

The serum nephrotoxicity biochemical parameters study showed that BUN values for all the formulations were similar to the control group at both doses studied (5 and 20 mg/kg) and similar to those obtained in different treatments with LAMB (22).

Therefore, the high AMB renal concentrations after LAMB treatment did not translate into pathological BUN values.

All AMB formulations induced higher creatinine values than the control group. Similar increases in creatinine levels were observed with other poly-aggregated AMB formulations at elevated doses (15 mg/kg) (23). But, an increase in creatinine values was observed in LAMB group compared to AMB:DCH 1:1.5 at both doses studied (5 and 20 mg/kg). These high creatinine values were possibly related to high AMB redistribution into the kidneys observed with LAMB (22, 24). It is particularly noteworthy that the experimental AMB:DCH 1:1.5 formulation did not show pathological creatinine values and no significant difference ($P>0.05$) with the control group was observed. But there were significant differences between creatinine values after administration of LAMB and AMB:DCH 1:1.5 formulations at therapeutic and elevated AMB doses (5 and 20 mg/kg/day) ($P<0.001$ and $P<0.01$, respectively).

Nevertheless, all renal tissue samples of mice treated with all the formulations after 6 daily doses of 5 or 20 mg/kg/day presented inflammatory cells and tubular epithelial damage, whilst protein cast were only observed in renal tissue of mice treated with LAMB. So, all preclinical nephrotoxic studies with experimental AMB formulations should include histopathological studies, due to the fact that serum nephrotoxicity biochemical parameters (creatinine and BUN values) would be insufficient to confirm a prompt renal damage.

Furthermore, the renal histopathological study has shown the existence of renal damage (see Fig. 2) when AMB renal concentrations are equal to or greater than 0.372 $\mu\text{g/g}$, since this was the AMB renal concentration of mice treated i.v. with 5 mg/kg/day of AMB:DCH 1:1.5 for six days (see Fig. 1). On the other hand, when renal damage was compared between DCH formulations (AMB:DCH 1:0 and AMB:DCH 1:1.5), it was observed that the presence of DCH in AMB formulations did not increase the nephrotoxicity after 6 daily doses of 5 and 20 mg/kg/day (see Table 1 and Fig. 2).

Nephrotoxicity values described in AMB:DCH 1:1.5 formulation for 6 days at high doses (20 mg/kg) were more related to the presence of large particles at this dose than with its high renal AMB concentration. These results are consistent with the nephrotoxicity values after prolonged treatments observed in AMB formulations with high particle size (25). However, nephrotoxicity values described with LAMB formulation are more related to a high AMB renal concentration. However, it must be emphasized that while LAMB formulation presented 15-fold higher AMB renal concentrations than DCH formulations, a 15-fold greater nephrotoxicity was not observed.

Lung AMB concentrations reached with experimental AMB:DCH 1:1.5 formulation at 5 mg/kg dose were higher than the ones obtained with LAMB. Differences in the particle size between AMB:DCH 1:1.5 and LAMB formulations may explain the differences observed in the distribution of AMB to the lungs because a higher particle size will allow a faster opsonization by macrophages (11). This may also explain the high AMB concentrations reached with both experimental AMB formulations in organs rich in macrophages like the lungs (14). These lung concentrations would be adequate to treat aspergillosis (MIC 0.5 - 8 µg/ml) (26). Furthermore, when experimental AMB:DCH 1:1.5 formulation was administered, the threshold pulmonary concentration (>4 µg/g) required for therapeutic efficacy of LAMB treatment in a murine model of pulmonary aspergillosis (27), was exceeded. Pulmonary AMB concentrations obtained with LAMB after multiple doses were similar to the ones obtained with different AMB formulations by other authors (27, 28). AMB:DCH 1:1.5 formulation had the greatest cumulative effect on lung tissue compared to LAMB formulation (25).

Treatments consisting on AMB:DCH 1:1.5 and the gold standard formulation (LAMB) have shown equivalent efficacy in terms of survival and reduction of tissue burden despite AMB levels were higher in lungs of animals receiving AMB:DCH than

in those treated with LAMB. This may be due to the immunomodulatory effect of the drug carrier since it has been demonstrated that empty liposomes show efficacy against IPA modelled in corticosteroid-immunosuppressed mice. The role of empty liposomes, as well as DCH, into the progression and outcome of the infection deserves to be further explored (29). In addition, a comparable decrease of the percentage of weight loss in the different groups was observed. A similar relation between survival times and weight losses results has been previously observed in different AMB aspergillosis treatments (7, 30).

Our pulmonary model has demonstrated high pulmonary affection with viable fungal elements at day 8 post infection with low renal affection suggesting that the A1160 strain has poorly disseminated to other organs+8 days post-challenge (31). The absence of nephrotoxicity after treatment allow us to consider that nephrotoxicity results in uninfected mice could be adequate to compare AMB:DCH 1:1.5 and LAMB at doses of 5 mg/kg. Previous studies showed similar BUN values between infected and uninfected mice in LAMB and ABLC treatments (22).

The high mortality displayed by the infected control group was due to the fungal burden (32, 33). In addition, tissue burden study performed 8 days post infection showed great fungal clearance in lungs of those animals receiving 5 mg/kg of AMB:DCH 1:1.5 while all mice receiving with 5 mg/kg of LAMB showed slightly higher levels of CFUs. These results were consistent with the lung concentration data obtained in uninfected mice. Probably, the highest particle size of AMB:DCH 1:1.5 formulation produced a faster biodistribution to lung tissue ($9.173 \pm 0.498 \mu\text{g/g}$ at 24 h) and a greater fungal burden clearance (34). The drug fast clearance of lung tissue for AMB:DCH 1:1.5 formulation might explain the decrease in survival rate (+8 day) (see Fig 3). Nevertheless, LAMB at doses of 5 mg/kg had low lung concentration values after the initial dose in uninfected mice ($2.527 \pm 0.386 \mu\text{g/g}$ at 24 h). This low initial biodistribution could be related to an increase in fungal burden during the first stage of

the infection in this group (27). Doses of 10 mg/kg of LAMB formulation would be required in order to obtain a significant reduction in *A. fumigatus* growth, during the first stage of the infection (27, 35).

The fungal burden results obtained on day +12 confirm that this *A. fumigatus* infection model by pulmonary inhalation poorly disseminated to kidneys (33). Differences in lung tissue CFUs values for AMB:DCH 1:1.5 and LAMB treatment may be related to the AMB concentrations due to the different particle size between both formulations (11, 15). A decrease in CFUs for LAMB formulation at the end of the study (+12 day) was related to a smaller particle size and morphological characteristic of liposome form of AMB (30, 36). Thus, small spheres of commercial AMB formulation (LAMB) remain in the lungs 12-48 hours after administration (7, 28). These results from different formulations suggest that their morphology and particle size could affect the pharmacokinetic/pharmacodynamic characteristics of the different AMB formulations.

Nevertheless, a limitation of this study, performing the pharmacokinetic comparisons between uninfected mice and infected mice is the fact that the AMB concentrations that would be reached in infected mice would be higher than the ones obtained in this study in uninfected mice (22, 27). So, the similar efficacy observed with AMB:DCH 1:1.5 and LAMB would be related to concentrations higher than 4 µg/g in infected animals (AMB concentration associated with a significant reduction of lung fungal burden) with both formulations and not only the concentrations observed with uninfected animals (see Fig. 1) in the first 24 hours (27).

In conclusion, micellar poly-aggregated AMB:DCH 1:1.5 formulation showed 2.8-fold higher AMB concentration in lungs than commercial LAMB formulation after 6 doses of 5 mg/kg and a slightly lower nephrotoxicity due to the formulation characteristics. The improved pulmonary efficacy/toxicity ratio allows the micellar AMB:DCH 1:1.5 formulation to be considered a good alternative to LAMB liposomes

for the treatment of pulmonary aspergillosis. Future studies with infected mice will be performed to evaluate the pharmacokinetic/pharmacodynamic efficacy of treatments with experimental AMB:DCH 1:1.5 and commercial LAMB formulations on its own compared to treatments combining different doses of these formulations.

MATERIALS AND METHODS

Drugs. Amphotericin B (AMB) (PubChem CID: 5280965) was supplied supply by Bristol Myers Squibb (Barcelona, Spain) and LAMB (Ambisome[®]) was supplied by UCB-Pharma (Brussels, Belgium).

Preparation of formulations. Experimental micellar formulation was prepared with AMB and DCH at a ratio of 1:1.5 w/w of drug to carrier proportions. The preparation method was as follows. 18.75 mg of DCH (PubChem CID: 23668196) purchased from Fluka-Biochemika (Bucks, Switzerland) were dissolved in 50 ml of water for injection and then 12.5 mg of AMB was added and vortexed during 4 minutes at 2400 rpm. These suspensions were diluted in 5% dextrose solution, as necessary, and vortexed during 4 minutes at 2400 rpm and stored in darkness at 25°C. For the characterization of the aggregation state of the formulations, an AMB standard solution (M-AMB) was required. This formulation was prepared as follows. 10.0 mg of AMB were dissolved in 500 ml of methanol and vortexed during 4 minutes at 2400 rpm. M-AMB formulation was diluted in 5% dextrose solution, as necessary.

AMB formulations characterization. Different AMB:DCH formulations in water (AMB:DCH 1:0 and AMB:DCH 1:1.5) and M-AMB formulation in methanol were spectrophotometrically analyzed by UV absorption to determine the aggregation state of AMB. A scanning spectrum of each formulation was recorded by Shimadzu UV-1700 spectrophotometer (Kyoto, Japan) between 300-450 nm. Each sample was analyzed in triplicate.

The particle size of AMB:DCH formulations in water was analyzed by Microtrac[®] S-3500, (Microtrac Inc, Montgomeryville, USA). Mean size (nm) was determined based on size distribution in number. Each sample was analyzed in triplicate.

Animals. Four weeks-old OF-1 male mice weighting between 27-32 g were used (Criffa S.A., Barcelona, Spain) in all experiments. All animals were housed under standard conditions with water and food *ad libitum*. All animal care procedures were supervised and approved by the Complutense University Animal Welfare and Ethics Committee as well as the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee.

AMB biodistribution to kidneys and lungs. This study was performed in immunosuppressed uninfected mice in order to evaluate the AMB concentrations in kidneys and lungs after single dose or 6 daily doses of AMB (5mg/kg/day).

Four groups of 6 animals each, were immunosuppressed by subcutaneous injection of cortisone acetate (125 mg/kg) every 3 days (37). Five days after immunosuppression began, animals received a single dose of AMB:DCH 1:1.5 or LAMB both administered intravenously (i.v.) at doses of 5 mg/kg or multiple doses administered once daily (QD) at doses of 5 mg/kg for six days.

To determine the concentrations of AMB in kidney and lung tissues, mice were euthanized 24 hours after the last administration. Organs were aseptically removed and frozen until used. Then, organs were homogenized in 0.5 ml of water for injection and determination of total AMB concentration in tissue was performed by the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method using a modification of previously published assays (38). Briefly, all HPLC assays were performed using the modular system Jasco[®] (Tokyo, Japan) that consisted of an automatic sample injection (A5-2050), a high pressure pump (PU-1580) and an UV detector (1575), operating at 406 nm. Analyses were performed on a Hypersil BDS[®] C18 column (5 μ m, 250 mm x 4.6 mm). The column was isocratically eluted at a flow rate of 1 ml/min with

40:4.3:55.7 v/v/v acetonitrile/acetic acid/water mobile phase. The injection volume was 100 µl. Each sample was analyzed in triplicate.

Homogenized tissue samples were spiked with meloxicam (10 µl at 200 µg/ml). Two extractions of the homogenate aqueous tissue were carried out with methanol (400 µl × 2). After every extraction, the mixture was vortexed (2500 rpm, 2 min) and then centrifuged (4000 rpm, 4 min). The supernatant was filtered using a filter HVLP of 0.45 µm. Previous to the homogenization and analysis by HPLC, each organ was weighed weight and the results were expressed as µg/g of each organ. Under these conditions, the relative retention times of AMB and the internal standard were 8.5 and 6.1 min, respectively. Tissue AMB concentrations were calculated from linear regression calibration curves of the AMB/internal standard peak height ratio. The linear range in plasma was 0.01 to 10 µg/ml ($y=0.2191x-0.0026$; $R^2=0.9986$).

Drug nephrotoxicity. This study was performed in immunocompetent uninfected mice. Thirty five mice were divided in seven groups (n = 5) and treated i.v. with 5 or 20 mg/kg/day of LAMB, AMB:DCH 1:0, AMB:DCH 1:1.5 or placebo (5% dextrose) for six days. Blood samples were collected by cardiac puncture 24 h after the sixth treatment. Creatinine and blood urea nitrogen (BUN) were analysed in serum using a modular AutoAnalyzer Cobas 711 (Roche, Basel, Switzerland).

Histopathological evaluations were also performed on the renal tissues in these seven groups of mice. Kidneys were collected 24 h after the last drug treatment. Tissues were fixed in 4% paraformaldehyde (24 h) and paraffin-embedded. Cut tissue sections of 5 µm were mounted on glass slides, rehydrated in water, and stained with haematoxylin and eosin (H&E, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). All tissues were examined and microphotographs of sections with x20 magnification were taken from the stained samples using an inverted IX70 microscope (Olympus, Hamburg, Germany).

Murine model of pulmonary aspergillosis. *A. fumigatus* strain A1160 was cultured on PDA and incubated at 37°C for 5 days. A conidial suspension was obtained by flooding the culture plate with 5 ml of saline with 0.05% Tween 20, scraping the fungal growth with a culture loop and drawing up the resultant suspension with a Pasteur pipette. The suspension was then filtered to remove clumps of hypha or agar and inoculum adjusted by hemocytometer count and serial dilution to the desired concentration. Animals were immunosuppressed by subcutaneous injection of cortisone acetate (125 mg/kg) starting 4 days prior infection and then every 3 days (37). Infection was performed by nasal instillation of 5×10^4 CFUs/mouse in 20 μ l prior anesthesia with inhaled sevoflurane.

Efficacy study. Infection was performed by nasal instillation of 5×10^4 CFUs/mouse in 20 μ L prior anaesthesia with inhaled sevoflurane.

Groups of 16 animals each, received LAMB or AMB:DCH 1:1.5. Both formulations were administered i.v. at a dose of 5 mg/kg QD for 7 days. Control group received placebo (5% dextrose). Eight animals per group were used to CFU determination (+8 days) and the rest 8 animals to survival follow up for 12 days.

Twelve days post-infection, surviving animals from CFUs groups were euthanized by CO₂ inhalation followed by cervical dislocation. Kidneys and lungs were aseptically removed, homogenized in 0.9% saline, 10-fold diluted and placed on PDA plates for CFU/g determination (+12 days).

Statistical analysis. Results related to particle size studies were expressed as mean values \pm standard deviation of three measures and tested by the independent-sample *t* test. Results related to AMB concentrations were tested by Mann-Whitney test. Fungal burden data was analyzed by Mann-Whitney test and survival curves were compared using the log rank test. Statistical differences were performed via one-way ANOVA test using Minitab 15 (Minitab Ltd., Coventry, U.K.). Tukey's test was used

for paired-group comparisons. A *P* value of less than 0.05 was considered to indicate statistical significance.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was jointly funded by a project of the R + D + i research program (reference SAF2015-66690-R) and a grant from the Complutense University of Madrid and the Administration of the Community of Madrid for the research group 910939. This work was supported by Spanish grants from the Ministry of Economy and Competitiveness ISCIII-FIS (PI14/01195, PI17/00276) cofinanced by FEDER Funds from the European Commission, ‘A way of making Europe’, ISCIII-RETIC REDinREN/RD16/0009/0026 and Comunidad de Madrid B2017/BMD-3686 (CIFRA2-CM).

REFERENCES

1. Fortún J, Meije Y, Fresco G, Moreno S. 2012. Aspergillosis. Clinical forms and treatment. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 30(4):201-208.
2. Voltan AR, Quindós G, Medina KP, Fusco-Almeida AM, Soares MJ, Chorilli M. 2016. Fungal diseases: could nanostructured drug delivery systems be a novel paradigm for therapy? *Int J Nanomedicine* 11:3715-3730.
3. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA. 2008. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 70(3):327-360.
4. Clemons KV, Schwartz JA, Stevens DA. 2012. Experimental central nervous system aspergillosis therapy: efficacy, drug levels and localization, immunohistopathology, and toxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 56(8):4439-4449.
5. Wang Y, Ke X, Voo ZX, Yap SSL, Yang C, Gao S, Liu S, Venkataraman S, Obuobi SAO, Khara JS, Yang YY, Ee PLR. 2016. Biodegradable functional polycarbonate micelles for controlled release of amphotericin B. *Acta Biomater* 46:211-220.
6. Moreno-Rodríguez AC, Torrado-Durán S, Molero G, García-Rodríguez JJ, Torrado-Santiago S. 2015. Efficacy and toxicity evaluations of new amphotericin B micelle systems for brain fungal infections. *Int J Pharm* 494(1):17-22

7. Olson JA, Adler-Moore JP, Jensen GM, Schwartz J, Dignani MC, Proffitt RT. 2008. Comparison of the physicochemical, antifungal, and toxic properties of two liposomal amphotericin B products. *Antimicrob Agents Chemother* 52(1):259-268.
8. Nahar M, Mishra D, Dubey V, Kumar Jain N. 2008. Development, characterization and toxicity evaluation of amphotericin B-loaded gelatin nanoparticles. *Nanomedicine* 4(3):252-261.
9. Ishida K, Alves Castro R, Torrado JJ, Serrado DR, Pereira Borba-Santos L, Pereira Quintella L, de Souza W, Rozental S, Lopes-Bezerra LM. 2017. Efficacy of a poly-aggregated formulation of amphotericin B in treating systemic sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. *Med Mycol* 0:1-9.
10. Mariné M, Espada R, Torrado JJ, Pastor FJ, Guarro J. 2009. Efficacy of a new formulation of amphotericin B in murine disseminated infections by *Candida glabrata* or *Candida tropicalis*. *Int J Antimicrob Agents* 34(6):566-569.
11. Serrano DR, Hernández L, Fleire L, González-Alvarez I, Montoya A, Ballesteros MP, Dea-Ayuela MA, Miró G, Bolás-Fernández F, Torrado JJ. 2013. Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations. *Int J Pharm* 447(1-2):38-46.
12. Souza AC, Nascimento AL, Vasconcelos NM, Jerônimo MS, Siqueira IM, R-Santos L, Cintra DO, Fuscaldi LL, Pires Júnior OR, Títze-de-Almeida R, Borin MF, Bão SN, Martins OP, Cardoso VN, Fernandes SO, Mortari MR, Tedesco AC, Amaral AC, Felipe MS, Bocca AL. 2015. Activity and *in vivo* tracking of Amphotericin B loaded PLGA nanoparticles. *Eur J Med Chem* 95:267-276.
13. Zhao M, Hu J, Zhang L, Zhang L, Sun Y, Ma N, Chen X, Gao Z. 2014. Study of amphotericin B magnetic liposomes for brain targeting. *Int J Pharm* 475(1-2):9-15.
14. Lewis RE, Albert ND, Liao G, Hou J, Prince RA, Kontoyiannis DP. 2010. Comparative pharmacodynamics of amphotericin B lipid complex and liposomal amphotericin B in a murine model of pulmonary mucormycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 54(3):1298-1304.

15. Espada R, Valdespina S, Alfonso C, Rivas G, Ballesteros MP, Torrado JJ. 2008. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *Int J Pharm* 36(1-2):64-69.
16. Faustino C, Serafim C, Ferreira I, Pinheiro L, Calado A. 2015. Solubilization power of amino acid-based gemini surfactant towards the hydrophobic drug amphotericin B. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 480:426-432.
17. Zu Y, Sun W, Zhao X, Wang W, Li Y, Ge Y, Liu Y, Wang K. 2014. Preparation and characterization of amorphous amphotericin B nanoparticles for oral administration through liquid antisolvent precipitation. *Eur J Pharm Sci* 53:109-117.
18. Tan SW, Billa N, Roberts CR, Burley JC. 2010. Surfactant effects on the physical characteristics of amphotericin B-containing nanostructured lipid carriers. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 372:73-79.
19. Jung SH, Lim DH, Jung SH, Lee JE, Jeong KS, Seong H, Shin BC. 2009. Amphotericin B-entrapping lipid nanoparticles and their *in vitro* and *in vivo* characteristics. *Eur J Pharm Sci* 37(3-4):313-320.
20. Clark JM, Whitney RR, Olsen SJ, George RJ, Swerdel MR, Kunselman L, Bonner DP. 1991. Amphotericin B lipid complex therapy of experimental fungal infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 35(4):615-621.
21. Wasan KM, Grossie Jr VB, Lopez-Berestein G. 1994. Concentrations in serum and distribution in tissue of free and liposomal amphotericin B in rats during continuous intralipid infusion. *Antimicrob Agents Chemother* 38(9):2224-2226.
22. Olson JA, Adler-Moore JP, Schwartz J, Jensen GM, Proffitt RT. 2006. Comparative efficacies, toxicities, and tissue concentrations of amphotericin B lipid formulations in a murine pulmonary aspergillosis model. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2122-2131.
23. Zia Q, Khan AA, Swaleha Z, Owais M. 2015. Self-assembled amphotericin B-loaded polyglutamic acid nanoparticles: preparation, characterization and *in vitro* potential against *Candida albicans*. *Int J Nanomedicine* 10:1769-1790.
24. Fernández-García R, de Pablo E, Ballesteros MP, Serrano DR. 2017. Unmet clinical needs in the treatment of systemic fungal infections: The role of amphotericin B and drug targeting. *Int J Pharm* 525:139-148.

25. Adler-Moore JP, Proffitt RT. 2008. Amphotericin B lipid preparations: what are the differences? *Clin Microbiol Infect* 14 (4): 25-36.
26. Lass-Flörl C, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Perkhofer S, Rodriguez-Tudela JL. 2009. In Vitro Activities of Various Antifungal Drugs against *Aspergillus terreus*: Global Assessment Using the Methodology of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Antimicrob Agents Chemother* 53(2):794-795.
27. Lewis RE, Liao G, Hou J, Chamilos G, Prince RA, Kontoyiannis DP. 2007. Comparative analysis of amphotericin B lipid complex and liposomal amphotericin B kinetics of lung accumulation and fungal clearance in a murine model of acute invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 51(4):1253-1258.
28. Takemoto K, Yamamoto Y, Ueda Y, Sumita Y, Yoshida K, Niki Y. 2006. Comparative study on the efficacy of AmBisome and Fungizone in a mouse model of pulmonary aspergillosis. *J Antimicrob Chemother* 57(4):724-731.
29. Lewis RE, Chamilos G, Prince RA, Kontoyiannis DP. 2007. Pretreatment with empty liposomes attenuates the immunopathology of invasive pulmonary aspergillosis in corticosteroid-immunosuppressed mice. *Antimicrob Agents Chemother* 51(3):1078-1081.
30. Olson JA, Schwartz JA, Hahka D, Nguyen N, Bunch T, Jensen GM, Adler-Moore JP. 2015. Toxicity and efficacy differences between liposomal amphotericin B formulations in uninfected and *Aspergillus fumigatus* infected mice. *Med Mycol* 53(2):107-118.
31. Barchiesi F, Santinelli A, Biscotti T, Greganti G, Giannini D, Manso E. 2016. Delay of antifungal therapy influences the outcome of invasive aspergillosis in experimental models of infection. *J Antimicrob Chemother* 71(8):2230-2233.
32. Lewis RE, Albert ND, Kontoyiannis DP. 2014. Comparative pharmacodynamics of posaconazole in neutropenic murine models of invasive pulmonary aspergillosis and mucormycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 58(11):6767-6772.
33. Gavaldà J, Martín T, López P, Gomis X, Ramírez JL, Rodríguez D, Len O, Puigfel Y, Ruiz I, Pahissa A. 2005. Efficacy of high loading doses of liposomal amphotericin B in the treatment of experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 11(12):999-1004.

34. Groll AH, Lyman CA, Petraitis V, Petraitiene R, Armstrong D, Mickiene D, Alfaro RM, Schaufele RL, Sein T, Bacher J, Walsh TJ. 2006. Compartmentalized intrapulmonary pharmacokinetics of amphotericin B and its lipid formulations. *Antimicrob Agents Chemother* 50(10):3418-3423.
35. Clemons KV, Espiritu M, Parmar R, Stevens DA. 2005. Comparative efficacies of conventional amphotericin B, liposomal amphotericin B (AmBisome), caspofungin, micafungin, and voriconazole alone and in combination against experimental murine central nervous system aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 49(12):4867-4875.
36. Adler-Moore JP, Gangneux JP, Pappas PG. 2016. Comparison between liposomal formulations of amphotericin B. *Med Mycol* 54(3):223-231.
37. Dixon DM, Polak A, Walsh TJ. 1989. Fungus dose-dependent primary pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice. *Infect Immun* 57(5):1452-1456.
38. Corral MJ, Serrano DR, Inmaculada Moreno I, Torrado JJ, Domínguez M, Alunda JM. 2014. Efficacy of low doses of amphotericin B plus allicin against experimental visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* 69(12):3268-3274.

FIGURE 1

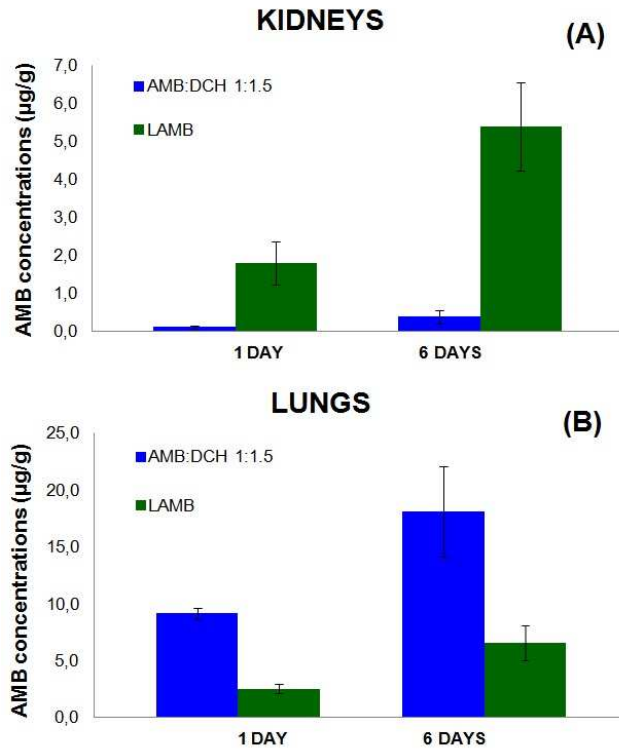


Figure 1 Mean and standard deviation of AMB concentrations (µg/g) in (A) kidneys and (B) lungs of immunosuppressed mice (n=6 mice/group) intravenously treated with 1 or 6 daily doses of 5 mg/kg of AMB:DCH 1:1.5 or LAMB. * LAMB treatments with 1 or 6 daily doses were significantly different from AMB:DCH 1:1.5 (P<0.01).

FIGURE 2

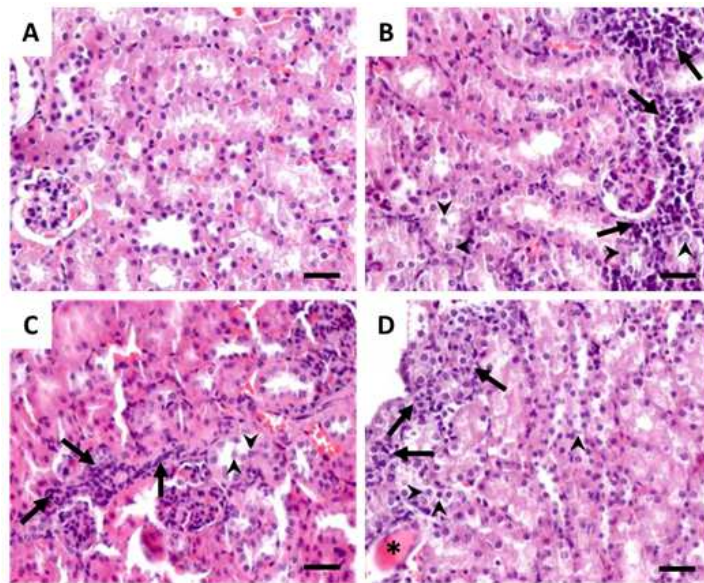


Figure 2 Histopathology of kidneys from no-immunosuppressed, uninfected mice following intravenous treatment with AMB formulations at a 6 daily therapeutic dose of 5 mg/kg/day. (A) Appearance of normal renal tissue in a kidney from control group. (B) Tissue from mice treated with AMB:DCH 1:1.5. (C) Tissue from mice treated with AMB:DCH 1:0. (D) Tissue from mice treated with commercial formulation (LAMB). Arrow: inflammatory cells. Arrow head: tubular epithelial damage. Asterisk: intraluminal protein casts. Bar, 100 μ m.

FIGURE 3

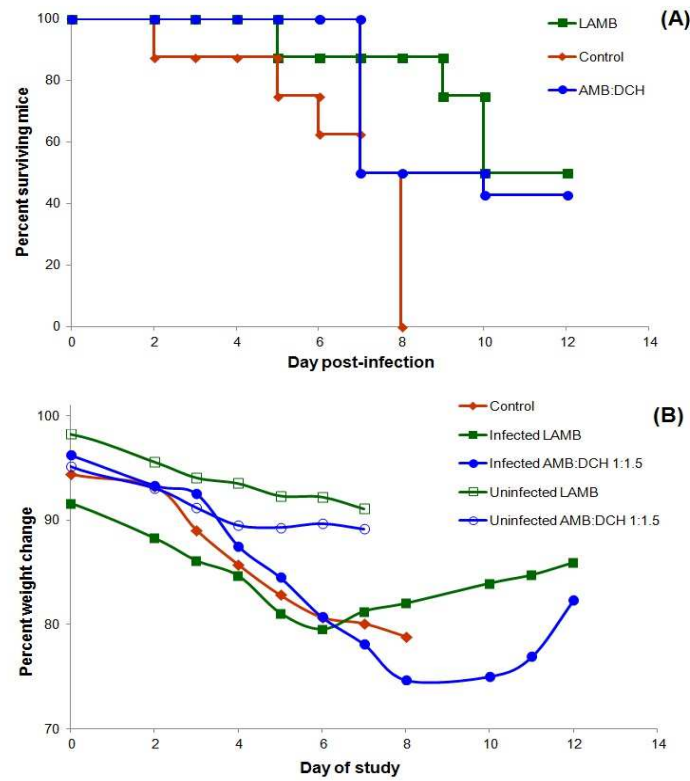


Figure 3 (A) Survival of mice (n= 8 mice/group) challenged intranasally with 20 μ l of *A. fumigatus* (5×10^4 conidia/ml) and then intravenously treated with 5 mg/kg for 6 days with placebo (5% dextrose), 5 mg/kg LAMB, and 5 mg/kg AMB:DCH 1:1.5. (B) Mean percent weight change in uninfected immunosuppressed (n= 8/group): 5 mg/kg LAMB and 5 mg/kg AMB:DCH 1:1.5; and in infected mice (n= 8/group): 5 mg/kg LAMB, and 5 mg/kg AMB:DCH 1:1.5. * P<0.05 in comparison to control group.

TABLE 1

Table 1 Creatinine and BUN concentrations (mg/dl) in uninfected mice 24 h after a 6 daily dose of the indicated amphotericin B formulation group: Control; LAMB (20 mg/kg), LAMB (5 mg/kg), AMB:DCH 1:0 (20 mg/kg), AMB:DCH 1:0 (5 mg/kg), AMB:DCH 1:1.5 (20 mg/kg), AMB:DCH 1:1.5 (5 mg/kg).

Formulation	Doses (mg/kg)	Creatinine	BUN
		$\bar{x} \pm SD$ (mg/dl)	$\bar{x} \pm SD$ (mg/dl)
Control	---	0.18 ± 0.008	18.29 ± 0.609
LAMB	20	0.23 ± 0.034*	18.160 ± 0.963*
	5	0.24 ± 0.018*	18.29 ± 0.609*
AMB:DCH 1:0	20	0.22 ± 0.028*	17.27 ± 0.875*
	5	0.23 ± 0.005*	17.73 ± 1.276*
AMB:DCH 1:1.5	20	0.20 ± 0.011*	18.20 ± 0.748*
	5	0.21 ± 0.005*	19.88 ± 0.762*

* LAMB treatments at 20 and 5 mg/kg doses were significantly different from control group (P<0.01 and P<0.001, respectively).

AMB:DCH 1:0 treatments at 20 and 5 mg/kg doses were significantly different from control group (P=0.035 and P<0.01, respectively).

AMB:DCH 1:1.5 treatments at 20 and 5 mg/kg doses were not significantly different from control group (P=0.055 and P=0.057, respectively).

LAMB treatments at 20 and 5 mg/kg doses were significantly different from AMB:DCH 1:1.5 (P=0.005 and P=0.007, respectively).

All treatments related to BUN levels were not significantly different from control group (P>0.05).

