

Actividad *in vitro* de una formulación liposómica de nistatina (Nyotran®) frente a *Cryptococcus neoformans*

Rocío Alonso-Vargas¹, Leonardo González-Álvarez¹, María Teresa Ruesga¹, Alfonso Javier Carrillo-Muñoz², Estrella Martín-Mazuelos³, Thomas L. Wallace⁴, Paul A. Cossum⁴, José Pontón¹ y Guillermo Quindós^{1*}

¹Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao, España; ²Departamento de Microbiología, ACIA, Barcelona, España; ³Servicio de Microbiología Clínica, Hospital Universitario Valme, Sevilla, España; ⁴Aronex Pharmaceuticals, Inc., The Woodlands, Texas, EE.UU.

Resumen

Hemos evaluado por un método de microdilución en RPMI basado en el documento M27-A del *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) la actividad antifúngica *in vitro* de una nueva formulación liposómica de nistatina -NISTL- (Nyotran®, Aronex Ltd., EE.UU.) frente a 22 aislamientos de *Cryptococcus neoformans*. Esta actividad fue comparada con la mostrada por otros antifúngicos como nistatina (NIST), anfotericina B desoxicolato, anfotericina B liposómica, anfotericina B complejo lipídico, anfotericina B dispersión coloidal, fluconazol o itraconazol. NISTL fue más eficaz *in vitro* que NIST, observándose valores de CMI de dos a tres diluciones inferiores en el 90% de los aislamientos. Los resultados obtenidos permiten predecir que esta nueva formulación será de gran ayuda en el tratamiento de las criptococosis.

Palabras clave

Cryptococcus neoformans, Nistatina liposómica, Nistatina, Anfotericina B, Fluconazol, Itraconazol

In vitro activity of a liposomal nystatin formulation (Nyotran®) against *Cryptococcus neoformans*

Summary

The *in vitro* antifungal activity of a new liposomal nystatin formulation -NISTL- (Nyotran®, Aronex Ltd., EE.UU.) was evaluated by a microdilution method with RPMI based on the M27-A document of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) against 22 isolates of *Cryptococcus neoformans*. This antifungal activity was compared with those of other seven antifungal agents, such as nystatin (NIST), amphotericin B deoxycholate, liposomal amphotericin B, amphotericin B lipid complex, amphotericin B colloidal dispersion, fluconazole, and itraconazole. NISTL was more active *in vitro* than NIST, showing MIC values 2-3 fold smaller in 90% of the isolates. The results obtained suggest that this new formulation would be very helpful for the treatment of cryptococcosis.

Key words

Cryptococcus neoformans, Liposomal nystatin, Nystatin, Amphotericin B, Fluconazole, Itraconazole

Las infecciones por hongos oportunistas son relativamente frecuentes entre los pacientes con algún tipo de inmunosupresión [1]. Aunque *Candida albicans* y otras especies del género *Candida* se asocian con mayor frecuencia a infecciones sistémicas, otros géneros de levaduras, como *Cryptococcus neoformans*, están adquiriendo una gran importancia clínica por su incremento como patógenos oportunistas [2]. Este aumento no se ha visto correspondido con una mayor oferta de agentes antifúngicos para su tratamiento. La aparición de aislamientos resistentes a algunos antifúngicos, principalmente azólicos, como el fluconazol (FLC) [3,4], o el limitado uso de otros agentes por su escasa tolerancia o alta toxicidad, han creado una importante necesidad de nuevos antifúngicos o de nuevas formulaciones más eficaces de compuestos antimicóticos ya existentes [5,6].

C. neoformans es un hongo ubicuo encapsulado causante de criptococosis pulmonar y meníngea principalmente en pacientes con deficiencias en la inmunidad celular [2]. Es el responsable de la mayoría de los casos de

Dirección para correspondencia:

Dr. Guillermo Quindós
Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina y Odontología
Universidad del País Vasco
Apartado 699, E-48080 Bilbao, Vizcaya, España
Tel.: +34 94 601 2854; Fax: +34 94 464 9266
E-mail: oipquang@lg.ehu.es

Aceptado para publicación el 7 de junio de 2000

meningitis en pacientes infectados por el VIH. El diagnóstico precoz y un tratamiento temprano efectivo de la infección son necesarios para la curación de estos pacientes. La anfotericina B (AMB), los derivados azólicos (FLC e itraconazol -ITC-) y la 5-fluorocitosina (5FC) son los fármacos de elección en el tratamiento de las criptococosis pulmonar y diseminada [7,8], pero los resultados obtenidos no son plenamente satisfactorios en un número importante de enfermos.

Al igual que AMB, la nistatina (NIST) es un antibiótico poliénico de amplio espectro y acción fungicida. Su uso por vía sistémica ha sido muy restringido por su alta toxicidad, razón por la cual se ha desarrollado una formulación liposómica con toxicidad reducida [9,10]. Esta formulación, comercializada como Nyotran® (Aronex Pharmaceuticals Ltd., EE.UU.) ha mostrado una alta eficacia frente a aislamientos clínicos de *Candida* spp. y *Aspergillus* spp. y en el tratamiento experimental y humano de candidiasis y aspergilosis diseminada [10-12].

El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar la efectividad *in vitro* de Nyotran® (NISTL) frente a aislamientos clínicos de *C. neoformans* en comparación a la mostrada por NIST, AMB, anfotericina B liposómica (AMBL), anfotericina B dispersión coloidal (ABCD), anfotericina B complejo lipídico (ABLCL), FLC e ITC.

Se evaluaron 22 aislamientos clínicos de *C. neoformans* procedentes de 17 pacientes ingresados en diferentes hospitales españoles. Los aislamientos llegaron al laboratorio de Micología Médica de la Universidad del País Vasco como subcultivos en agar glucosado de Sabouraud, confirmando su identidad mediante una prueba de asimilación de sustratos carbonados (API ATB ID32C, bioMérieux, España). La mayor parte de los aislamientos procedían de líquido cefalorraquídeo (LCR) y sangre, un aislamiento se obtuvo de aspirado bronquial y otro de médula ósea. De algunos pacientes se obtuvieron varios aislamientos, evaluándose en este estudio únicamente aquellos procedentes de muestras clínicas distintas (p.e., LCR y sangre). Se utilizaron tres cepas de colección (*C. neoformans* ATCC 90113, *Candida parapsilosis* ATCC 90018 y *Candida krusei* ATCC 6258) como controles de calidad de las pruebas de estudio de la sensibilidad por microdilución en caldo [13]. Todos los aislamientos se mantuvieron almacenados en agua destilada estéril a temperatura ambiente. Los subcultivos se realizaron en agar glucosado de Sabouraud, incubando a 35°C durante 48 h.

Las preparaciones farmacéuticas de NISTL (Nyotran®; Aronex Pharmaceuticals Ltd., EE.UU.), NIST (Lederle, EE.UU.), AMB (Fungizone®; Aphotecon, EE.UU.), AMBL (amBisome®; NexStar Pharmaceuticals Ltd., España), ABCD (Amphocil®; Sequus, EE.UU.), ABLCL (Abelcet®; Esteve Hospital, España), FLC (Diflucan®, Pfizer Ltd., Sandwich, UK) e ITC (Sporanox®, Janssen Ltd., Bélgica) se reconstituyeron siguiendo las indicaciones de sus respectivos proveedores. Las diluciones de los mismos se realizaron en medio RPMI 1640 (con L-glutamina y sin bicarbonato) (Gibco, España) tamponado a pH 7 con ácido 3-N-morfolino-propanosulfónico (MOPS) 0,165 M (Sigma Chemical Co., EE.UU.). NIST, AMB e ITC se disolvieron previamente en dimetilsulfóxido (DMSO), diluyendo posteriormente en RPMI hasta conseguir una concentración de DMSO igual o inferior al 1%.

Se determinó para cada aislamiento el valor de concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en caldo, siguiendo las recomendaciones propuestas por el NCCLS, en su documento M27-A [13]. Todos los agentes antifúngicos se ensayaron en un inter-

valo de concentraciones de 0,03 a 16 µg/ml, a excepción del FLC (0,125 a 64 µg/ml). Las pruebas se realizaron en placas de microtitulación de 96 pocillos con fondo en "U" (Greiner Labortechnik, España). Las suspensiones celulares se realizaron en solución salina estéril, diluyendo posteriormente en caldo RPMI 1640 tamponado con MOPS a pH 7, siendo la concentración final del inóculo en cada pocillo de 5×10^2 a $2,5 \times 10^3$ células/ml. Las placas se incubaron a 35°C durante 72 h antes de la lectura final de los resultados. Se calcularon para cada antifúngico las CMI 50 y CMI 90, así como el intervalo de valores CMI para cada uno de los antifúngicos evaluados.

NIST es un antifúngico poliénico (derivado de *Streptomyces noursei*) con una estructura similar a AMB. El mecanismo de acción de ambos se atribuye a su unión al ergosterol provocando una alteración de la membrana celular y la liberación de K^+ , carbohidratos y metabolitos [12]. NIST tiene un espectro de actividad antifúngica amplio que incluye a *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Histoplasma* spp. y *Coccidioides*, pero su uso clínico está restringido al tratamiento tóxico de las candidiasis mucocutáneas. NISTL es una formulación liposómica de NIST que intenta evitar la toxicidad asociada al uso intravenoso de NIST. Su aplicación clínica está orientada al tratamiento de infecciones fúngicas invasoras y ha probado su eficacia terapéutica en candidiasis y aspergilosis sistémicas [10,12,14-16]. NISTL está compuesta de dimiristoil fosfatidil colina, dimiristoil fosfatidil glicerol y NIST en una proporción de 7:3:1 y se observa más de un 99% de NIST encapsulada después de su reconstitución. Las concentraciones séricas máximas de NISTL obtenidas en seres humanos son de 15 y 24 µg/ml después de la administración intravenosa de dosis de 2 y 4 mg NIST/kg/día, respectivamente [17].

Las MIC de AMB, FLC e ITC con las cepas control de calidad estaban dentro de los límites aceptados [13]. En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos *in vitro* con las cepas control y las diferentes formulaciones lipídicas de polienos estudiadas. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos *in vitro* con los 22 aislamientos clínicos evaluados. Estos datos se muestran como intervalos y medias geométricas de CMI y como las CMI que inhibían al 50 y 90% de los aislamientos de *C. neoformans*. Todos los aislamientos eran inhibidos por concentraciones de NISTL ≤ 2 µg/ml y esta formulación liposómica era de forma constante más activa contra *C. neoformans* que NIST. Estos valores de CMI eran mucho más bajos que las concentraciones séricas que se obtienen con las dosis terapéuticas recomendadas de NISTL. En el presente estudio, NISTL se mostraba más activa que en el estudio de Johnson y cols. [18], en el que 20 aislamientos de *C. neoformans* eran inhibidos por concentraciones de NISTL ≤ 4 µg/ml. Sin embargo, los resultados son similares a los obtenidos por Carrillo-Muñoz y cols. [11] y por Wallace y cols. [17]. Estos últimos autores observaron que la CMI 90 era 1 µg/ml para 111 aislamientos de *C. neoformans* procedentes de un estudio multicéntrico que incluía 64 aislamientos africanos, 42 europeos y siete norteamericanos.

NISTL poseía una actividad *in vitro* similar a AMB y ligeramente inferior a las formulaciones lipídicas de este polieno. La actividad anticriptocócica era superior a la de FLC e inferior a la de ITC. Los polienos tienen una actividad antifúngica con un mayor espectro que los azoles aunque en este estudio tanto FLC como ITC eran inhibidores a concentraciones terapéuticas de los aislamientos de *C. neoformans* estudiados.

NISTL (Nyotran®) resultó activo contra todos los aislamientos de *C. neoformans* con concentraciones más

Tabla 1. Valores de sensibilidad *in vitro* obtenidos con las cepas de control evaluadas.

Cepa	CMI ($\mu\text{g/ml}$)				
	NIST	NISTL	AMBL	ABCD	ABLC
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90113	4	2	1	1	0,5
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	2	0,5-1	1	0,5-1	0,5
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	4	0,5-2	2	2	1

Tabla 2. Valores de sensibilidad *in vitro* obtenidos con los aislamientos clínicos evaluados.

	Antifúngico ($\mu\text{g/ml}$)							
	NIST	NISTL	AMB	AMBL	ABCD	ABLC	FLC	ITC
CMI 50	4	1	1	0,5	0,5	0,5	4	0,25
CMI 90	4	1	1	1	0,5	0,5	8	0,5
Intervalo CMI	2-8	0,5-2	0,5-1	0,25-2	0,25-1	0,125-0,5	0,5-8	0,125-0,5
*MG	4	0,939	0,939	0,550	0,484	0,401	3,012	0,322

*MG = Media geométrica de CMIs

bajas que NIST convencional y las concentraciones inhibitorias requeridas estaban muy por debajo de las concentraciones séricas máximas obtenidas en seres humanos con la administración intravenosa de 2 o 4 mg/kg. NISTL es una alternativa anticriptocócica muy atractiva, por lo que en el momento actual se están desarrollando estudios clínicos en fase III para comprobar su eficacia en el tratamiento de las meningitis criptocócicas.

R. Alonso-Vargas es becaria predoctoral de la Universidad del País Vasco y M.T. Ruesga es becaria del Ministerio de Educación y Cultura. Este trabajo ha sido parcialmente financiado por los proyectos de investigación 97/2052 (Ministerio de Sanidad y Consumo / Fondo de Investigación Sanitaria-Plan Nacional de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico, modalidad C para 1997) y UPV 093.327-EC233/97 (Universidad del País Vasco).

Este trabajo fue presentado como póster en el 4th Congress of the European Confederation of Medical Mycology de la British Society for Medical Mycology, celebrado en Glasgow (Reino Unido) en 1998.

Bibliografía

- Cabral Passoni LF. Wood, animals and human beings as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection. Rev Iberoam Micol 1999; 16: 77-81.
- Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 515-548.
- Espinel-Ingroff A. Clinical relevance of antifungal resistance. Infect Dis Clin North America 1997; 11: 929-944.
- Venkateswarlu K, Taylor M, Manning NJ, Rinaldi MG, Kelly SL. Fluconazole tolerance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 748-751.
- Tsukuda T, Shiratori Y, Watanabe M, et al. Modeling, synthesis and biological activity of novel antifungal agents. Bioorg Med Chem Lett 1998; 8: 1819-1824.
- Brogden RN, Goa KL, Coukell AJ. Amphotericin-B colloidal dispersion. A review of its use against systemic fungal infections and visceral leishmaniasis. Drugs 1998; 56: 365-383.
- Yamamoto Y, Maesaki S, Kakeya H, et al. Combination therapy with fluconazole and flucytosine for pulmonary cryptococcosis. Chemotherapy 1997; 43: 436-441.
- Diamond DM, Bauer M, Daniel BE, et al. Amphotericin B colloidal dispersion combined with flucytosine with or without fluconazole for treatment of murine cryptococcal meningitis. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 528-533.
- Mehta RT, Hopper RL, Gunner LA, Juliano RL, Lopez-Berestein G. Formulation, toxicity, and antifungal activity in vitro of liposome-encapsulated nystatin as therapeutic agent for systemic candidiasis. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31: 1897-1900.
- Mehta RT, Hopper RL, McQueen T, Juliano RL, Lopez-Berestein G. Toxicity and therapeutic effects in mice of liposome-encapsulated nystatin for systemic fungal infections. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31: 1901-1903.
- Carrillo-Muñoz AJ, Quindós G, Tur C, et al. In-vitro antifungal activity of liposomal nystatin in comparison with nystatin, amphotericin B cholesteryl sulphate, liposomal amphotericin B, amphotericin B lipid complex, amphotericin B desoxycholate, fluconazole and itraconazole. J Antimicrob Chemother 1999; 44: 397-401.
- Wallace TL, Paetznick V, Cossum PA, Lopez-Berestein G, Rex JH, Anaissie E. Activity of liposomal nystatin against disseminated *Aspergillus fumigatus* infection in neutropenic mice. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 2238-2243.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne PA 1997.
- Groll AH, Gonzalez CE, Giri N, et al. Liposomal nystatin against experimental pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits: efficacy, safety and non-compartmental pharmacokinetics. J Antimicrob Chemother 1999; 43: 95-103.
- Boutati EI, Maltezou HC, Lopez-Berestein G, Vartivarian SE, Anaissie EJ. Phase I study of maximum tolerated dose of intravenous liposomal nystatin (L-NYST) for the treatment of refractory febrile neutropenia (RFN) in patients with hematological malignancies, abstr. LM22, p. 330. In Abstracts of the 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington DC, American Society for Microbiology, 1995.
- Graham DR, Wesley OH, Molmar VL, Crabtree D, Jennison SH. Successful therapy of invasive pulmonary aspergillosis with intravenous nystatin in a cardiac transplant recipient, abstr. A62, p.31. In Abstracts of the 98th General Meeting of the American Society for Microbiology. Washington DC, American Society for Microbiology, 1998.
- Wallace T, Ghannoum M, Warnock D, Carrillo-Muñoz A, Quindós G, Stevens D. In vitro antifungal activity of Nyotran (liposomal nystatin) versus four formulations of amphotericin B, fluconazole and itraconazole against *Cryptococcus neoformans* clinical isolates. 4th International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis, Londres, 1999.
- Johnson EM, Ojwang JO, Szekely A, Wallace TL, Warnock DW. Comparison of in vitro antifungal activities of free and liposome-encapsulated nystatin with those of four amphotericin B formulations. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 1412-1416.