

### Kompozycja do zwalczania infekcji grzybiczych.

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja farmaceutyczna do zwalczania infekcji grzybiczych układowych i powierzchniowych, na bazie antybiotyku takiego jak amfoterycyna B, z udziałem związku chemicznego z grupy 1,3,4-tiadiazoli, takiego jak 4-(5-metylo-1,3,4-tiadiazol-2-ilo) benzeno-1,3-diol, o wzorze 1, wykazująca interakcje addytywne i synergistyczne w stosunku do patogenów grzybowych, przy jednoczesnym braku toksyczności dla komórek ludzkich.

Liczne grzyby patogenne, jak chociażby rodzaj *Candida*, *Aspergillu* czy *Rhodotorula* są jednymi z najbardziej rozpowszechnionych w środowisku patogenów, wywołujących ciężkie do leczenia infekcje układowe i powierzchniowe. Czynnikiem sprzyjającym pojawieniu się grzybicy jest przede wszystkim osłabienie układu odpornościowego, spowodowane intensywną antybiotykoterapią, chemioterapią, pierwotnym lub wtórnym niedoborem odporności, lub też celową immunosupresją wywoływaną po przeszczepach, a także wynikającą z leczenia chorób autoimmunologicznych, co wykazują liczne publikacje, jak np. Nawrot U., Karpiewska A., w artykule pt. „Patogeneza zakażeń wywołanych przez *Candida albicans*”, *Mikologia Lekarska*, t. 9, nr 3, 2002r (137-143) czy Wierzbička M. w artykule pt. „Grzybica kropidlakowa płuc (*Aspergiloza*)”, *Postępy Nauk Medycznych*, t. 1, 2001r. (36-41), oraz Zaas A.K. i in. w artykule pt. “ Risk of Fungemia Due to *Rhodotorula* and Antifungal Susceptibility Testing of *Rhodotorula* Isolates”, t. 41, nr. 11, 2003r. (5233–5235).

Leczenie infekcji grzybiczych jest trudne z uwagi na fakt, iż grzyby są komórkami eukariotycznymi, mającymi niewiele szlaków metabolicznych

odmiennych od komórek zwierzęcych. Mechanizmy działania znanych dotychczas leków przeciwgrzybiczych oraz nabywania na nie oporności przez patogeny grzybowe przedstawiono w publikacji autorstwa Aghannoum M.A., Rice L.B., *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 12, no.4, 1999 r., (501-517) oraz Dzierżanowska-Fangrat K., Gil L., Jakubas B., Kyrzcz-Krzemień S., Styczyński J., *Postępy Nauk Medycznych*, vol. 6, 2015 r.,(411-418).

Stosowane dotychczas leki przeciwgrzybicze z grupy azoli, takie jak, flukonazol, itraconazol, worykonazol czy posakonazol, wykazują działanie grzybostatyczne, indukując dość często oporność utrudniającą leczenie, co wykazano w artykule Kontoyiannis, D. P. and R. E. Lewis, *Lancet* vol. 359 nr 9312, 2002r.(1135-1144).

Z kolei leki przeciwgrzybicze będące analogami pirymidyny, takie jak, 5-fluorocytozyna czy flucytozyna, tworzące toksyczne antymetabolity pirymidyny i osłabiające syntezę kwasów nukleinowych DNA i RNA, powodują szybkie narastanie oporności i powinny być stosowana w skojarzeniu z innymi lekami przeciwgrzybicznymi, np. amfoterycyną B, gdyż występuje wówczas synergizm działania poprzez ułatwioną penetrację flucytozyny do komórki grzyba. Z uwagi na to, że związki te jako antymetabolity powodują supresję szpiku, są stosowane tylko w ciężkich zakażeniach.

Spośród leków z grupy polienów, najdłużej stosowanym i najskuteczniejszym antybiotykiem grzybobójczym jest amfoterycyna B, znana z opisu patentowego GB795482 i używana jako pierwsza linia obrony w ciężkich, zagrażających życiu mykozach systemowych (Mesa-Arango, A. C., L. Scorzoni and O. Zaragoza, *Frontiers in Microbiology* 3, 2012 r., (286). Jednakże leczenie amfoterycyną B w dotychczasowych jej preparatach takich jak mieszanka z dezoksychohanem sodu, lub w formach lipidowych, związane jest z poważnymi skutkami ubocznymi, a zwłaszcza z nefrotoksycznością i hepatotoksycznością. Z uwagi na skutki uboczne, w praktyce klinicznej stężenie amoterycyny B w osoczu krwi nie powinno przekraczać 1-2  $\mu\text{g/ml}$ , dlatego też jest ona nieskuteczna wobec szczepów dla których minimalne stężenie grzybobójcze MIC, np. dla *Candida parapsilosis* przekracza 1  $\mu\text{g/ml}$ , co wykazano w publikacji Patel, G. P., C. W. Crank and J. B. Leikin, *Journal of Medical Toxicology*, 7(1), 2011r.

Konwencjonalną postacią leczniczą amoterycyny B jest preparat Fungizon, w którym dodatek dezoksyholanu sodu zwiększa rozpuszczalność antybiotyku w wodzie. Niestety, jak dowodzą publikacje, np. Inselmann, G., A. Volkmann and H. T. Heidemann, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(1), 2000r. (131-13), dezoksyholan sodu zwiększa toksyczność amoterycyny B, podobnie jak jej liczne formułacje lipidowe stosowane w wyższych dawkach, koniecznych w leczeniu zakażeń oportunistycznych i biofilmów, na co zwracają uwagę Clemons, K. V., J. A. Schwartz and D. A. Stevens, *Medical Mycology* vol. 49 nr 8, 2011r. (834-847), czy też Patel, G. P., C. W. Crank and J. B. Leikin, *Journal of Medical Toxicology* vol. 7 nr 1, 2011r. (12-15).

Z uwagi na uboczne skutki działania amfoterycyny B, w leczeniu grzybic zwłaszcza u osób z osłabionym układem odpornościowym, we wstępnej fazie stosuje się tzw. leki podtrzymujące, hamujące biosyntezę ergosterolu jak np. Fluconazol czy Itraconazol, a dopiero w razie zaostrzenia objawów następuje włączanie preparatów amfoterycyny B. Jak wynika z przykładowych publikacji, takich jak: Day J.N., M.D., Tran T.H. Chau, M.D., Wolbers M. i in., *The New England Journal of Medicine*, vol. 368, 2013r. (1291-1302); Lewis, R., Prince R.A., Chi J., Kontoyannis D.P., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 46, 2002r. (3208-3214); Sugar A. M; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 39, 1995r. (1907-1912); Cuenca-Estrella M., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol 54, 2004 r., (854-869), skojarzone lub sekwencyjne leczenie amfoterycyną B z lekami hamującymi biosyntezę ergosterolu, często nie tylko nie przynosi efektów synergistycznych czy addytywnych, ale skutkuje działaniem antagonistycznym, co wynika z faktu, że ergosterol jest cząsteczką docelową dla amfoterycyny B. Stanowi to duży problemem w leczeniu grzybic, ponieważ leki z grupy inhibitorów biosyntezy ergosterolu mogą indukować oporność patogenów grzybowych na samą amfoterycynę B.

Dla zmniejszenia toksyczności amfoterycyny B, podjęto próby tworzenia jej kompleksów między innymi z jonami metali, aminokwasami, kwasem cytrynowym, szczawiovym i bursztynowym. Opracowano także nowe formy lipidowe - liposomalne, koloidalne, kompleksów lipidowych oraz syntezę różnego typu pochodnych amfoterycyny B, czy też jej koniugatów z polisacharydami.

Podjęte liczne eksperymenty nad zmniejszeniem toksyczności amfoterycyny B, poprawiły jej rozpuszczalność w roztworach wodnych, co skutkowało stosunkowo niewielkim zmniejszeniem toksyczności ale zazwyczaj łączyło się to ze zmniejszeniem aktywności przeciwgrzybiczej, jak wykazano w publikacjach M. Gagoś, G. Czernel, D.M. Kamiński; K. Kostro, *BioMetals*, 24, 2011r. (915-922); B. Chudzik, I. B. Tracz, G. Czernel, M. J. Fiołka, G. Borsuk, M. Gagoś, *European Journal of Pharmacological Sciences*, vol. 49, nr 5, 2013r. (850-857); Gulati, M., S. Bajad, S. Singh, A. J. Ferdous, M. Singh *Journal of Microencapsulation*, 15, 1998r. (137-151); Saliba, F., B. Dupont, *Medical Mycology*, 46, 2008r. (97-112); Clemons, K. V., J. A. Schwartz, D. A. Stevens, *Medical Mycology*, 49, 2011r. (834-847); Patel, G. P., C. W. Crank, J. B. Leikin, *Journal of Medical Toxicology*, vol. 7, 2011r. (12-15), czy też opisach patentowych P.403105, US4054734, US4049898, WO2013186546, US3965090, FR2162076, US3879374, R20030039331, KR20070111854, JPH09241168, EP0421733, CN101797264, FR2593394, FR2593394, ZA201008812, PL199213, PL210774, US2017088572, US2017043029, CN105848721, US2016304548, WO2014165676, US2009186838, US5066646, WO9301203, a także WO2011061747.

Podjęto również badania nad kombinowaną terapią amfoterycyną B z produktami pochodzenia naturalnego, jak np. plumbaginą izolowaną z *Plumbago indica*. Przeprowadzone badania *in vitro* w kierunku zwalczania patogenów grzybowych, wykazały efekt addytywny, jedynie w wąskim zakresie stężeń, co opublikowali Hassan S.T.S., Berchová-Bímová K., Petráš J., *Phytotherapy Research*, 30, 2016r. (1487-1492).

Pomimo opisanych niedogodności, amfoterycyna B pozostaje stosunkowo najskuteczniejszym i najczęściej stosowanym lekiem przeciwgrzybicznym, dlatego też celem przedmiotowego wynalazku było opracowanie wykazujących wysoką aktywność grzybobójczą preparatów z jej udziałem, przy ograniczeniu toksyczności wobec ludzkiego organizmu.

Dotychczas nie prowadzono badań dotyczących interakcji amfoterycyny B z pochodnymi tiadiazoli, toteż badania ukierunkowano na pochodne 1,3,4-tiadiazolu, z uwagi na ich szerokie spektrum aktywności biologicznej, takie jak np. przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe czy przeciwzapalne, opisane w przykładowej publikacji

A.K. Jain, S. Sharma, A. Vaidya, V. Ravichandran, R.K. Agrawal, *Chemical Biology & Drug Design*, 81, 2013r, (557-576) oraz w opisach patentowych PL221216, PL216982, PL216358, PL216342, PL312329, US2017101387, MX2016015738, CN106008493, CN106008496, WO2017056012, WO2016142852, CN10590658, CN105837529, ZA201105525, CN105622599, CN105601587, WO2016052439, WO2016108249, KR20000070163, CN104892639.

Z kolei badania *in vitro*, znane z publikacji J. Matysiak, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 43, 2006r. (55-58); J. Matysiak, Z. Malinski, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 33, 2007r. (594-601); J. Matysiak, E. Krajewska-Kułak, J. Karczewski, A. Niewiadomy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2001 r. (5251-5257); J. Matysiak, A. Nasulewicz, M. Pełczyńska, M. Świtalska., I. Jaroszewicz, A. Opolski, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41, 2006 r. (475-482); J. Matysiak, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54, 2006 r (988-991); M. Juszczak, K. Walczak, E. Langner, M. Karpińska, J. Matysiak, W. Rzeski, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 20, 2013 r. (575-5790); M. Juszczak, J. Matysiak, A. Niewiadomy, W. Rzeski, *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 49, 2011 r. (436-444) oraz opisów patentowych PL189840, PL202089, PL204750, PL20509, PL202102, WO2005092873 wykazały, że grupa pochodnych 5-podstawionych 2-(2,4-dihydroksyfenylo)-1,3,4-tiadiazoli, oprócz aktywności przeciwnowotworowej i skuteczności w leczeniu chorób neurologicznych, ogranicza rozwój chorobotwórczych pleśni, drożdży i dermatofitów.

W przypadku związków z grupy 1,3,4-tiadiazoli, np. pochodnych 2-(2,4-dihydroksyfenylo)-1,3,4-tiadiazoli, wartości stężenia hamującego wzrost patogenów MIC, w stosunku do grzybów patogennych, wynoszą od kilkudziesięciu do kilkuset  $\mu\text{g/ml}$ . Dla związku określonego wzorem 1, znanego z opisu patentowego PL 202089 i publikacji J. Matysiak, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, nr 43, 2006r, (55-58), średnie wartości MIC wyznaczone w stosunku do szczepów *Candida* kształtują się na poziomie 67,2  $\mu\text{g/ml}$ , co udokumentowali autorzy J. Matysiak, Z. Malinski, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 33, 2007r. (594-601). Tak wysokie dawki są trudne do osiągnięcia *in vivo*, co ogranicza praktyczne zastosowanie tych substancji w monoterapii grzybic układowych.

Istotą wynalazku jest kompozycja zawierająca antybiotyk taki jak amfoterycyna B i związek z grupy 1,3,4-tiadiazoli, taki jak 4-(5-metylo-1,3,4-tiadiazol-2-ilo) benzeno-1,3-diol, o wzorze 1, do zastosowania w zwalczaniu infekcji grzybiczych.

Korzystnym dla uzyskania optymalnego działania addytywnego i synergistycznego przy braku toksyczności jest, jeśli kompozycja ma postać roztworu w dopuszczalnych medycznie mediach, o pH w granicach 7,2 – 7,7 i proporcjach komponentów: amfoterycyny B od 1 µg/ml do 0,03 µg/ml i tiadiazolu o wzorze 1 od 1 do 64 µg/ml, jak przedstawiono w tabelach 1, 2, 3 i 4, na przykładzie gatunków *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Aspergillus niger* i *Rhodotorula mucilaginosa*.

Kompozycja amfoterycyny B z 1,3,4-tiadiazolem o wzorze 1, według wynalazku wykazuje oddziaływanie addytywne i synergistyczne w stosunku do patogenów grzybowych, nawet przy kilkunastokrotnym zmniejszeniu dawki amfoterycyny B, co bardzo wydatnie wpływa na wyeliminowanie toksyczności takiego leku w stosunku do ludzkich fibroblastów i erytrocytów krwi człowieka oraz braku oddziaływań antagonistycznych w stosunku do innych leków przeciwgrzybiczych, stosowanych nierzadko w łączonych lekoopornych terapiach.

W szerokim zakresie pH, kompozycja według wynalazku, ma postać klarownego roztworu bez agregatów amfoterycyny B i tiadiazolu.

Poniższe przykłady wykonania przedstawiają wynalazek i dokumentują jego pozytywne właściwości.

Przykład 1. Kompozycja według wynalazku i interakcja jej składników wobec patogenów z rodzaju *Candida*.

Do 1 mg tiadiazolu o wzorze 1, rozpuszczonego w 50 µl DMSO, dodano 950 µl buforowanego roztworu soli fizjologicznej PBS, o pH 7,2 uzyskując przejrzysty roztwór wyjściowy o stężeniu 1000 µg/ml i fizjologicznym pH. Następnie sporządzono roztwór amfoterycyny B, rozpuszczając jej 1 mg w 1 ml wody o pH 12,6, z którego następnie pobrano 100 µl i dodano do 9,9 ml buforu PBS o pH 7,2. Otrzymano roztwór wyjściowy amfoterycyny B o stężeniu 10 µg/ml, cechujący się zupełną przejrzystością i fizjologicznym pH, służący do sporządzania końcowych roztworów kompozycji według

wynalazku, jak również rozcieńczeń pojedynczych jej składników, przeznaczonych do hodowli komórek *Candida* i ludzkich fibroblastów skóry.

Aktywność przeciwgrzybiczą amfoterycyny B i tiadiazolu o wzorze 1, ustalano stosując standardowe przepisy metodyczne, wobec wzorcowych szczepów *Candida albicans* NCPF 3153 i *Candida parapsilosis* ATCC 20246, metodą mikrorozcieńczeń na płycie 96 dołkowej, przez wyznaczenie minimalnych dawek inhibicyjnych w jednostkach MIC  $\mu\text{g/ml}$ .

Interakcje amfoterycyny B i tiadiazolu o wzorze 1 badano *in vitro* na płycie 96 dołkowej metodą mikrorozcieńczeń krzyżowych, dzięki której uzyskano macierz wszystkich możliwych kombinacji w określonym zakresie stężeń tych dwóch związków.

Dla hodowli ze szczepem *Candida albicans*, zakres stężeń dla amfoterycyny B wynosił od 0,5 do 0,03125  $\mu\text{g/ml}$  i dla jej komponentu o wzorze 1 od 1 do 96  $\mu\text{g/ml}$ , zaś dla hodowli ze szczepem *Candida parapsilosis*, zakres stężeń dla amfoterycyny B wynosił od 2 do 0,0625  $\mu\text{g/ml}$  i dla jej komponentu o wzorze 1 od 1 do 64  $\mu\text{g/ml}$ . Dobór zakresu stężeń amfoterycyny B i związku o wzorze 1 dla obu badanych szczepów *Candida* uwzględniał ich różną wrażliwość na badane substancje.

Jako wartość MIC przyjmowano stężenie leków w kombinacji, które powodowało 100% zahamowania wzrostu mikroorganizmów po 48 godzinach hodowli.

Interakcja, czyli działanie synergistyczne, addytywne, nieróżnicujące lub antagonistyczne pomiędzy dwoma składnikami kompozycji o zadanych stężeniach, była interpretowana na podstawie współczynnika  $\Sigma\text{FIC}$  oznaczającego sumę cząstkowych stężeń hamujących, wzrost patogenów obydwu szczepów *Candida*.

Przyjęto znane ze standardowych przepisów metodycznych wartości kryteriów wskazujących na synergię i addytywność dla poszczególnych składników kompozycji w stosunku do patogenów *Candida albicans* i *Candida parapsilosis*. Współczynnik FIC obliczano na podstawie następującego wzoru:  $\Sigma\text{FIC} = \text{FIC}_{\text{AmB}} + \text{FIC}_{\text{Z1}}$ , gdzie:  $\text{FIC}_{\text{AmB}} = \text{MIC}_{\text{AmB}}$  w obecności Z1/ $\text{MIC}_{\text{AmB}}$  pojedynczo;  $\text{FIC}_{\text{Z1}} = \text{MIC}_{\text{Z1}}$  w obecności AmB/ $\text{MIC}_{\text{Z1}}$  pojedynczo. Przyjęto następujące kryteria interakcji:  $\Sigma\text{FIC} \leq 0,5$  - synergia,  $\Sigma\text{FIC} > 0,5$  do  $\leq 1$  - addytywność,  $\Sigma\text{FIC} > 1$  do  $< 2$  - brak interakcji,  $\Sigma\text{FIC} \geq 2$  - antagonizm.

Wyniki interakcji składników kompozycji według wynalazku, po 48 godzinach hodowli, wyrażone jako współczynniki  $\Sigma$ FIC wobec szczepów *C. albicans* i *C. parapsilosis* przedstawiono na rysunku w tabelach 1 i 2.

Przyjmując oznaczenia w tabelach takie jak: \* - addytywność, \*\* - synergia oraz „-” dla stężenia jednego składnika kompozycji, przy którym, następuje całkowite zahamowanie wzrostu patogenów grzybowych wykazano, że kompozycja amfoterycyny B i tiadiazolu o wzorze 1, wykazuje optymalne działanie synergistyczne i addytywne, w zakresie stężeń komponentu o wzorze 1 od 1 do 64  $\mu$ g/ml i odpowiadającym im stężeń amfoterycyny B od 1  $\mu$ g/ml do 0,03125  $\mu$ g/ml.

Przykład 2. Interakcja kompozycji według wynalazku wobec patogenów *Aspergillus niger* i *Rhodotorula mucilaginosa*.

Roztwór wyjściowy, służący do sporządzania końcowych roztworów kompozycji według wynalazku, jak również rozcieńczeń pojedynczych jej składników, przeznaczonych do hodowli komórek *Aspergillus niger* i *Rhodotorula mucilaginosa*, sporządzono jak w przykładzie 1.

Aktywność przeciwgrzybiczą amfoterycyny B i tiadiazolu o wzorze 1, ustalano stosując standardowe przepisy metodyczne, wobec grzybów pleśniowych dla *Aspergillus Niger* i wobec grzybów drożdżopodobnych dla *Rhodotorula mucilaginosa*, metodą mikrorozcieńczeń na płytce 96 dołkowej, przez wyznaczenie minimalnych dawek inhibicyjnych w jednostkach MIC  $\mu$ g/ml.

Interakcje amfoterycyny B i tiadiazolu o wzorze 1 badano *in vitro* na płytce 96 dołkowej metodą mikrorozcieńczeń krzyżowych, dzięki której uzyskano macierz wszystkich możliwych kombinacji w określonym zakresie stężeń tych dwóch związków.

Dla hodowli ze szczepem *Rhodotorula mucilaginosa* i *Aspergillus Niger* zakres stężeń dla amfoterycyny B wynosił od 1 do 0,03125  $\mu$ g/ml i dla jej komponentu o wzorze 1 od 1 do 64  $\mu$ g/ml. Jako wartość MIC przyjmowano stężenie leków w kombinacji, które powodowało 100% zahamowania wzrostu mikroorganizmów po 48 godzinach hodowli.

Interakcja, czyli działanie synergistyczne, addytywne, nieróżnicujące lub antagonistyczne pomiędzy dwoma składnikami kompozycji o zadanych stężeniach, była interpretowana na podstawie współczynnika  $\Sigma$ FIC

oznaczającego sumę cząstkowych stężeń hamujących, wzrost patogenów obydwu szczepów. Tak jak opisano w przykładzie 1, przyjęto znane ze standardowych przepisów metodycznych wartości kryteriów wskazujących na synergię i addytywność dla poszczególnych składników kompozycji w stosunku do mikroorganizmów patogennych.

Wyniki interakcji składników kompozycji według wynalazku, po 48 godzinach hodowli, wyrażone jako współczynniki  $\Sigma$ FIC wobec szczepów *Rhodotorula mucilaginosa* i *Aspergillus Niger* przedstawiono na rysunku odpowiednio w tabelach 3 i 4.

Wyniki zawarte w wyżej wymienionych tabelach wskazują, że kompozycja amfoterycyny B i tiadiazolu o wzorze 1, wykazuje optymalne działanie synergistyczne i addytywne, w zakresie stężeń komponentu o wzorze 1 od 1 do 64  $\mu\text{g/ml}$  i odpowiadającym im stężeń amfoterycyny B od 1  $\mu\text{g/ml}$  do 0,03125  $\mu\text{g/ml}$ .

Prowadzone hodowle poddano również oglądowi pod mikroskopem fluoroscencyjnym o powiększeniu 600x dla *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* i *Rhodotorula mucilaginosa* oraz 150x dla *Aspergillus niger*, przy użyciu filtra 380-420 nm, po barwieniu kalkofluorem, wykrywającym chitynę w ścianach komórkowych grzybów. W celu uzyskania odpowiedniej ilości komórek do wykonania preparatów mikroskopowych z prób traktowanych kompozycją o stężeniu składników według wynalazku, zawiesinę hodowlaną wirowano, a następnie z niewielkiej ilości powstałego osadu pobierano 20  $\mu\text{l}$  i przenoszono na szkiełka mikroskopowe.

Poszczególne obrazy mikroskopowe zostały zamieszczone na rysunku jako fig. 1, gdzie: A odpowiada hodowli kontrolnej szczepu *Candida albicans*, zaś B i C hodowli szczepu *Candida albicans* z kompozycją według wynalazku o stężeniach składników odpowiednio: amfoterycyna B - 0,125  $\mu\text{g/ml}$  i tiadiazol o wzorze 1 – 4  $\mu\text{g/ml}$  oraz amfoterycyna B - 0,125  $\mu\text{g/ml}$  i tiadiazol o wzorze 1 – 8  $\mu\text{g/ml}$ . Z kolei obraz D odpowiada hodowli kontrolnej szczepu *Aspergillus niger*, zaś E i F hodowli tego szczepu traktowanego kompozycją według wynalazku o stężeniach składników odpowiednio: amfoterycyna B - 0,03125  $\mu\text{g/ml}$  i tiadiazol o wzorze 1 – 16  $\mu\text{g/ml}$  oraz amfoterycyna B - 0,03125  $\mu\text{g/ml}$  i tiadiazol o wzorze 1 – 32  $\mu\text{g/ml}$ .

Całkowite zahamowanie wzrostu badanych szczepów traktowanych kompozycją do leczenia patogenów grzybowych według wynalazku, w porównaniu z kontrolami i składnikami kompozycji stosowanymi pojedynczo, dowodzi o synergistycznym i addytywnym działaniu obydwu składników.

### Przykład 3.

Dla potwierdzenia klarowności roztworów kompozycji według wynalazku wykonano badanie absorpcji elektronowej z użyciem spektrofotometru UV-Vis.

Przedstawione na rysunku jako fig. 2, widma kompozycji o stężeniach składników według wynalazku:

A – amfoterycyna B - 1  $\mu\text{g/ml}$  i tiadiazol o wzorze 1 – 1  $\mu\text{g/ml}$ ,

B - amfoterycyna B – 0,5  $\mu\text{g/ml}$  i tiadiazol o wzorze 1 – 2  $\mu\text{g/ml}$ ,

C - amfoterycyna B - 0,25  $\mu\text{g/ml}$  i tiadiazol o wzorze 1 – 4  $\mu\text{g/ml}$ ,

D - amfoterycyna B - 0,125  $\mu\text{g/ml}$  i tiadiazol o wzorze 1 – 8  $\mu\text{g/ml}$ ,

E – amfoterycyna B - 0,0625  $\mu\text{g/ml}$  i tiadiazol o wzorze 1 – 16  $\mu\text{g/ml}$ ,

F - amfoterycyna B - 0,0625  $\mu\text{g/ml}$  i tiadiazol o wzorze 1 – 32  $\mu\text{g/ml}$  oraz

G - amfoterycyna B – 0,03125  $\mu\text{g/ml}$  i tiadiazol o wzorze 1 – 64  $\mu\text{g/ml}$ ,

wykonane w pH 7,4 wskazują na występowanie form monomerycznych związków wchodzących w skład kompozycji według wynalazku. Brak rozpraszania światła w zakresie 700-440 nm świadczy o klarowności roztworów kompozycji. Pasma z maksimum przy około 321 nm oraz przy około 360 nm są charakterystyczne dla widma absorpcji elektronowej 1,3,4-tiadiazolu o wzorze 1, wykonanych w roztworze wodnym w pH 7,4. Pasma pochodzące od amfoterycyny B mają małą intensywność, ze względu na niskie stężenie tej cząsteczki w kompozycji i są widoczne przy 408 nm i 390 nm. Na klarowność kompozycji wskazuje również fakt, że pasma charakterystyczne dla tiadiazolu o wzorze 1 oraz amfoterycyny B są wyraźnie rozdzielone. Ponadto, po obniżeniu pH roztworu do wartości  $\leq 2$ , przy którym 1,3,4-tiadiazol o wzorze 1 ulega wytrąceniu, w kompozycji według wynalazku roztwór pozostawał klarowny. Również pozostawienie kompozycji w ciemności, na 24 h i temperaturze 4°C, w atmosferze gazu obojętnego, roztworu wodnego w pH 7,4 nie spowodowało wytrącenia się tiadiazolu z roztworu.

Przykład 4. Badanie cytotoksyczności kompozycji według wynalazku.

Jak opisano w przykładzie 1, sporządzono roztwory kompozycji o stężeniu składników takich jak amfoterycyna B i tiadiazol o wzorze 1, w optymalnym zakresie. Badania cytotoksyczności kompozycji przeprowadzono na prawidłowych ludzkich fibroblastach linii HSF. Komórki przechowywano w ciekłym azocie, rozmrażano w temp. 37°C, następnie przelewano do butelek hodowlanych zawierających podłoże Dulbecco's, po czym namnażano w inkubatorze w temp. 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO<sub>2</sub>. Po namnożeniu, komórki przepłukiwano buforem PBS bez jonów wapnia i magnezu, a następnie odklejano od dna naczynia używając roztworu 0,25 % trypsyny z dodatkiem EDTA i rozcieńczano podłożem hodowlanym do gęstości  $2 \times 10^4$  komórek/ml. Otrzymaną zawiesinę komórek, rozlewano do płytki 96 dołkowej, hodowano przez 24 godz., a po uzyskaniu monowarstwy komórek, delikatnie ściągano płyn hodowlany i dodawano roztwory kompozycji w pożywce hodowlanej uzupełnionej 10% surowicą bydlęcą. Hodowlę prowadzono przez 48 godz., w inkubatorze w wilgotnej atmosferze zawierającej 5 % CO<sub>2</sub> i temp. 37°C. Równocześnie, w takich samych warunkach hodowano ludzkie fibroblasty bez dodatku kompozycji, jako kontrolę.

Żywotność komórek określano przy pomocy testu MTT, w którym sól tetrazoliowa MTT, to jest bromek (3-(4,5-dimetylotiazolo-2-1)-2,5-difenylo-tetrazoliowy) o barwie żółtej, jest przekształcana przez aktywne enzymy mitochondrialne do formazanu o barwie intensywnie fioletowej. Ilość powstałego formazanu jest wprost proporcjonalna do liczby komórek oraz ich aktywności metabolicznej. Ilość powstałego barwnika określano spektrofotometrycznie przy użyciu czytnika mikroplótek E-max Reader, przy długości fali 570 nm.

Na rysunku – fig. 3 przedstawiono wyniki pokazujące żywotność komórek HSF traktowanych kompozycją według wynalazku o stężeniach składników:  
A – amfoterycyna B - 1 µg/ml i tiadiazol o wzorze 1 – 1 µg/ml,  
B - amfoterycyna B – 0,5 µg/ml i tiadiazol o wzorze 1 – 2 µg/ml,  
C - amfoterycyna B - 0,25 µg/ml i tiadiazol o wzorze 1 – 4 µg/ml,  
D - amfoterycyna B - 0,125 µg/ml i tiadiazol o wzorze 1 – 8 µg/ml,

E – amfoterycyna B - 0,0625  $\mu\text{g/ml}$  i tiadiazol o wzorze 1 – 16  $\mu\text{g/ml}$ ,  
F - amfoterycyna B - 0,0625  $\mu\text{g/ml}$  i tiadiazol o wzorze 1 – 32  $\mu\text{g/ml}$   
G - amfoterycyna B – 0,03125  $\mu\text{g/ml}$  i tiadiazol o wzorze 1 – 64  $\mu\text{g/ml}$ ,  
w przeliczeniu na procent kontroli. Podano wartości średnie z odchyleniem standardowym. Zaprezentowane dane wskazują, że kompozycja do leczenia infekcji grzybiczych wywołanych przykładowymi grzybami z rodzaju *Candida* oraz *Aspergillus* i *Rhodotorula*, według wynalazku, nie wykazuje znaczącej cytotoksyczności wobec komórek ludzkich.

Prowadzone hodowle poddano również oglądowi pod mikroskopem fluoroscencyjnym o powiększeniu 450 x przy użyciu filtra 330-380 nm, z wykorzystaniem barwnika DAPI, pozwalającego na detekcję zmian morfologicznych jądra komórkowego. Uzyskane obrazy mikroskopowe oznaczone jako fig. 4 zostały zamieszczone na rysunku i oznaczają jak poniżej.

Fig. 4 – mikroskopowe obrazy: A - dla hodowli kontrolnej komórek HSF, zaś B, C, D, E, F, G i H– dla hodowli komórek HSF traktowanych kompozycją według wynalazku, o stężeniach składników:

B – amfoterycyna B - 1  $\mu\text{g/ml}$  i tiadiazol o wzorze 1 – 1  $\mu\text{g/ml}$ ,  
C - amfoterycyna B – 0,5  $\mu\text{g/ml}$  i tiadiazol o wzorze 1 – 2  $\mu\text{g/ml}$ ,  
D - amfoterycyna B - 0,25  $\mu\text{g/ml}$  i tiadiazol o wzorze 1 – 4  $\mu\text{g/ml}$ ,  
E - amfoterycyna B - 0,125  $\mu\text{g/ml}$  i tiadiazol o wzorze 1 – 8  $\mu\text{g/ml}$ ,  
F – amfoterycyna B - 0,0625  $\mu\text{g/ml}$  i tiadiazol o wzorze 1 – 16  $\mu\text{g/ml}$ ,  
G - amfoterycyna B - 0,0625  $\mu\text{g/ml}$  i tiadiazol o wzorze 1 – 32  $\mu\text{g/ml}$   
H - amfoterycyna B – 0,03125  $\mu\text{g/ml}$  i tiadiazol o wzorze 1 – 64  $\mu\text{g/ml}$ ,  
Zaprezentowane obrazy wskazują na prawidłową gęstość hodowli oraz brak zmian apoptotycznych w komórkach traktowanych kompozycją według wynalazku.

Przykład 5. Badanie aktywności hemolitycznej wobec ludzkich erytrocytów.

W sposób standardowy, poprzez odwirowywanie osocza i kilkukrotne przepłukiwanie w buforze PBS o pH 7,2, uzyskano erytrocyty krwi ludzkiej, zawieszane w buforze PBS o pH 7,2 w proporcji 1:100, służące do sporządzenia próby kontrolnej i prób badawczych, uzupełnionych roztworami kompozycji według wynalazku, przygotowanych w stężeniach składników jak

opisano w przykładzie 1. Próbkę zawiesin erytrocytów kontrolnych i traktowanych odpowiednimi stężeniami kompozycji, jak podano w przykładzie 3, inkubowano w temp. 37°C, na kołysce laboratoryjnej przez 24 godziny. Po inkubacji próbki odwirowywano i spektrofotometrycznie, przy użyciu spektrofotometru UV-Vis, oznaczano ilość uwolnionej z erytrocytów hemoglobiny. Całkowitą hemolizę erytrocytów indukowano dodatkiem do zawiesiny Tritonu w stężeniu 10%.

Wyniki przedstawione na rysunku jako fig. 5 obrazują procent hemolizy zachodzącej w erytrocytach kontrolnych - A, zaś B, C, D, E, F, G i H w erytrocytach poddanych przez 24 godz. działaniu kompozycji według wynalazku, o stężeniach składników:

B – amfoterycyna B - 1 µg/ml i tiadiazol o wzorze 1 – 1 µg/ml,  
C - amfoterycyna B – 0,5 µg/ml i tiadiazol o wzorze 1 – 2 µg/ml,  
D - amfoterycyna B - 0,25 µg/ml i tiadiazol o wzorze 1 – 4 µg/ml,  
E - amfoterycyna B - 0,125 µg/ml i tiadiazol o wzorze 1 – 8 µg/ml,  
F – amfoterycyna B - 0,0625 µg/ml i tiadiazol o wzorze 1 – 16 µg/ml,  
G - amfoterycyna B - 0,0625 µg/ml i tiadiazol o wzorze 1 – 32 µg/ml oraz  
H - amfoterycyna B – 0,03125 µg/ml i tiadiazol o wzorze 1 – 64 µg/ml,  
Wyniki prób kontrolnej i badawczych przedstawiono jako procent hemolizy w stosunku do całkowitej hemolizy wywołanej tritonem, podano wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym. Wyniki wskazują, że kompozycja amfoterycyny B i tiadiazolu o wzorze 1, według wynalazku, nie indukuje znaczącej hemolizy erytrocytów, w porównaniu z kontrolą.

UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ  
pl. Marii Curie-Skłodowskiej 5  
20-031 LUBLIN

PROREKTOR  
ds. Nauki, Wdrożeń i Współpracy Międzynarodowej

*Meywald*  
prof. dr hab. Zbigniew Grądziński

PROREKTOR

*[Signature]*  
prof. dr hab. Radosław Dębrowski

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY  
w Lublinie  
ul. Akademicka 13  
20-950 Lublin, skr. poczt. 158  
fax 48/81-533-35-49, tel. 81-445-66-77  
REGON 000001896

DYREKTOR  
INSTYTUTU PRZEMYSŁU ORGANICZNEGO

*[Signature]*  
dr inż. Krzysztof Hajdor