

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ORIGINAL PAPER

**Βελτιστοποίηση συνδυαστικής θεραπείας
βορικοναζόλης-ανιντουλαφουγκίνης
έναντι *Aspergillus fumigatus*
Κλινικές επιπτώσεις στη θεραπεία
της αζολο-ανθεκτικής ασπεργίλλωσης***

ΣΚΟΠΟΣ Η συνδυαστική θεραπεία βορικοναζόλης με μια εχινοκανδίνη χρησιμοποιείται συχνά προκειμένου να ενισχυθεί η δραστηριότητα της μονοθεραπείας της βορικοναζόλης, ιδιαίτερα έναντι αζολο-ανθεκτικών στελεχών *Aspergillus fumigatus* και σε ασθενείς με υποθεραπευτικά επίπεδα στον ορό. Σκοπό, λοιπόν, της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση των φαρμακοδυναμικών αλληλεπιδράσεων του συνδυασμού βορικοναζόλης-ανιντουλαφουγκίνης έναντι *A. fumigatus*, περιλαμβανομένων αζολο-ανθεκτικών στελεχών, με τη βοήθεια ενός επικυρωμένου *in vitro* φαρμακοκινητικού/φαρμακοδυναμικού (ΦΚ/ΦΔ) μοντέλου για τον προσδιορισμό των τιμών-στόχων των συγκεντρώσεων τους στον ορό κατά τη συγχορήγησή τους. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Μελετήθηκαν τέσσερα κλινικά στελέχη *A. fumigatus* με διαφορετική *in vitro* ευαισθησία στη βορικοναζόλη (MIC 0,125–2 mg/L) και στην ανιντουλαφουγκίνη (MEC 0,008–0,015 mg/L) σε ένα *in vitro* ΦΚ/ΦΔ μοντέλο, προσομοιώνοντας τις συγκεντρώσεις των ελεύθερων φαρμάκων στον ανθρώπινο ορό για τις καθιερωμένες δοσολογίες τους. Η μυκητιακή ανάπτυξη αξιολογήθηκε σύμφωνα με την παραγωγή γαλακτομαννάνης, ενώ τα επίπεδα των φαρμάκων προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της διάχυσης σε άγαρ. Οι φαρμακοδυναμικές αλληλεπιδράσεις αναλύθηκαν με το κριτήριο ανεξαρτησίας κατά Bliss (BI) και τη μη γραμμική επιφάνεια-απόκρισης κανονικών μειγμάτων βασισμένη στην προσθετικότητα κατά Loewe (LA). Τα ποσοστά επίτευξης στόχου (ΠΕΣ) εκτιμήθηκαν με προσομοίωση Monte Carlo για διαφορετικές δόσεις ανιντουλαφουγκίνης (25, 50 και 100 mg) και για νοσοκομειακά κέντρα με αυξανόμενα ποσοστά αντοχής στις αζόλες (5–25%). **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Συνέργεια [BI 51 (8–80%), LA 0,63 (0,38–0,79)] παρατηρήθηκε σε χαμηλές συγκεντρώσεις ανιντουλαφουγκίνης και βορικοναζόλης ($fC_{max}/MIC < 10$), ενώ ανταγωνισμός [BI 12 (5–18%), LA 1,12 (1,04–4,6)] βρέθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Η μεγαλύτερη αύξηση στα ΠΕΣ εντοπίστηκε με τη δόση των 25 mg ανιντουλαφουγκίνης και για υψηλά (>10%) ποσοστά αντοχής. Τα ΠΕΣ για στελέχη με MICs βορικοναζόλης ≤ 1 , 2 και ≥ 4 mg/L ήταν $\geq 78\%$, 12% και 0% με τη μονοθεραπεία βορικοναζόλης και 96–100%, 68–82% και 9–20% με τη συνδυαστική θεραπεία, αντίστοιχα. Η βέλτιστη δραστηριότητα συνδέθηκε με την τιμή 1,5 της αναλογίας tC_{min}/MIC για τη μονοθεραπεία βορικοναζόλης και 0,75, αντίστοιχα, για το σχήμα συνδυασμού. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Η χαμηλή δόση ανιντουλαφουγκίνης μπορεί να αυξήσει την αποτελεσματικότητα και να μειώσει το κόστος της συνδυαστικής θεραπείας.

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2016, 33(6):768–781
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2016, 33(6):768–781

Μ. Σιώπη,
Ν. Σιαφάκας,
Σ. Βουρλή,
Λ. Ζέρβα,
Ι. Μελετιάδης

Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας,
Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο
«Αττικόν», Ιατρική Σχολή, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Αθήνα

Dose optimization
of the combination
of voriconazole-anidulafungin
against *Aspergillus fumigatus*:
Clinical implications
for azole-resistant aspergillosis

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Ανιντουλαφουγκίνη
Αντοχή στις αζόλες
Aspergillus fumigatus
Βορικοναζόλη
Συνδυαστική θεραπεία

Σε αμφότερες τις αμερικανικές και τις ευρωπαϊκές κατευθυντήριες οδηγίες, η βορικοναζόλη θεωρείται θεραπεία εκλογής για την αντιμετώπιση της διηθητικής ασπεργίλλωσης.¹ Εν τούτοις, η αποτελεσματικότητά της δεν είναι

*Β' Βραβείο του Επάθλου «Σωτήρης Παπασταμάτης» στο πλαίσιο του 42ου Ετήσιου Πανελληνίου Ιατρικού Συνεδρίου (Αθήνα, 11–14 Μαΐου 2016)

πάντα δεδομένη, κυρίως λόγω της ολοένα αυξανόμενης εμφάνισης ανθεκτικών κλινικών στελεχών *A. fumigatus*, καθώς και των υποθεραπευτικών επιπέδων της σε ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών.^{2,3} Προκειμένου, λοιπόν, να βελτιωθεί το θεραπευτικό αποτέλεσμα, η συγχορήγηση της με ένα άλλο αντιμυκητιακό αποτελεί μία από τις στρατηγικές που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη. Επί του παρόντος, ο συνδυασμός αζόλης-εχινοκανδίνης συνιστάται από τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες μόνο στο πλαίσιο της θεραπείας διάσωσης, καθώς και για την αντιμετώπιση δύσκολα ιάσιμων λοιμώξεων.⁴ Πρόσφατα ολοκληρώθηκε μια προοπτική, τυχαίοποιημένη κλινική μελέτη, κατά την οποία ο συνδυασμός βορικοναζόλης-ανιτουλαφουγκίνης συγκρίθηκε με τη μονοθεραπεία βορικοναζόλης ως θεραπεία πρώτης γραμμής για τη διηθητική ασπεργίλλωση, εμφανίζοντας αυξημένη αλλά όχι στατιστικά σημαντική αποτελεσματικότητα της συνδυαστικής θεραπείας με βάση την ανάλυση του πρωτεύοντος καταληκτικού σημείου.⁵ Δεδομένου ότι χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι καθιερωμένες δοσολογίες των δύο φαρμάκων και η *in vitro* ευαισθησία των στελεχών ήταν άγνωστη, δεν μπορούν να συναχθούν γενικευμένα συμπεράσματα σχετικά με την αποτελεσματικότητα των διαφόρων δόσεων των συγχορηγούμενων αντιμυκητιακών έναντι αζολο-ανθεκτικών στελεχών.

Η συνδυαστική αντιμυκητιακή θεραπεία μπορεί να εμπεριέχει περίπλοκες *in vitro* και *in vivo* φαρμακοδυναμικές αλληλεπιδράσεις που κυμαίνονται από συνέργεια μέχρι ανταγωνισμό, η φύση των οποίων εξαρτάται πολλές φορές από τη δόση και κατ'επέκταση τη συγκέντρωση των φαρμάκων.^{6,7} Τα αποτελέσματα μιας πρόσφατης μελέτης μας που διενεργήθηκε με τη βοήθεια ενός επικυρωμένου *in vitro* φαρμακοκινητικού/φαρμακοδυναμικού (ΦΚ/ΦΔ) μοντέλου έδειξαν ότι η αποτελεσματικότητα του συνδυασμού βορικοναζόλης-αμφοτερικίνης Β μπορεί να μεγιστοποιηθεί συνδυάζοντας την καθιερωμένη δοσολογία βορικοναζόλης με χαμηλές δόσεις αμφοτερικίνης Β. Συγχρόνως, προσδιορίστηκαν οι τιμές-στόχοι των συγκεντρώσεων των συγχορηγούμενων φαρμάκων στον ορό για στελέχη με μειωμένη *in vitro* ευαισθησία στις αζόλες.⁸ Κατόπιν αυτού, στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε το προαναφερόμενο *in vitro* μοντέλο προκειμένου να διερευνηθούν οι φαρμακοδυναμικές αλληλεπιδράσεις του συνδυασμού βορικοναζόλης-ανιτουλαφουγκίνης έναντι στελεχών *A. fumigatus*, περιλαμβανομένων αζολο-ανθεκτικών, προσομοιώνοντας το προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου στον ανθρώπινο ορό τόσο της καθιερωμένης όσο και χαμηλότερων δόσεων ανιτουλαφουγκίνης. Επί πλέον, προσδιορίστηκαν οι τιμές-στόχοι των επιπέδων των συγχορηγούμενων αντιμυκητιακών για στελέχη με αυξανόμενες τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (minimum inhibitory concentration, MIC)

και υπολογίστηκαν τα ποσοστά επίτευξης στόχου (ΠΕΣ) για διαφορετικά ποσοστά αντοχής στις αζόλες.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Στελέχη

Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα κλινικά στελέχη *A. fumigatus* με διαφορετικούς μηχανισμούς αντοχής στις αζόλες και διακριτή φαινοτυπική ευαισθησία στη βορικοναζόλη/ανιτουλαφουγκίνη. Σε αυτά περιλαμβάνονταν ένα στέλεχος αγρίου τύπου (AZN8196) και τρία με τις μεταλλάξεις G54W (V59-73), M220I (V28-77) και TR₃₅/L98H (V52-35), επιβεβαιωμένες με ανάλυση αλληλουχίας του γονιδίου *cyp51A*.⁹ Σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο μικροαραιώσεων σε ζωμό CLSI M38-A2,¹⁰ οι MICs βορικοναζόλης ήταν 0,125, 0,125, 0,25 και 2 mg/L, αντίστοιχα, ενώ οι τιμές της ελάχιστης δραστικής συγκέντρωσης (minimum effective concentration, MEC) ανιτουλαφουγκίνης ήταν 0,015 mg/L, εκτός του στελέχους V59-73 όπου βρέθηκε 0,008 mg/L. Τα στελέχη αποθηκεύτηκαν στους -70 °C σε διάλυμα γλυκερόλης 10% και ανακαλλιεργήθηκαν δύο φορές σε Sabouraud dextrose άγαρ εμπλουτισμένο με γενταμικίνη και χλωραμφαινικόλη (SGC2; bioMérieux) (5-7 ημέρες, 30 °C). Εναιώρημα κοινιδίων παρασκευάστηκε σε 10 mL στείρου φυσιολογικού ορού με 0,1% Tween 20 και στη συνέχεια προσδιορίστηκε ο αριθμός τους/mL, με τη βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου Neubauer, ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση εναιωρήματος 10³ cfu/mL, η οποία επιβεβαιωνόταν σε κάθε σειρά πειραμάτων με την επιστροφή ορισμένου όγκου εναιωρήματος σε SGC2.

Φάρμακα και θρεπτικό υλικό

Καθαρές ουσίες βορικοναζόλης και ανιτουλαφουγκίνης (Pfizer Inc, Groton, CT, USA) διαλύθηκαν σε στείρο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO; Carlo Erba Reactifs-SDS, Val de Reuil, France) σε αρχική συγκέντρωση 10 mg/mL και διατηρήθηκαν στους -70 °C μέχρι τη χρήση τους. Το θρεπτικό υλικό περιείχε 10,4 g/L RPMI 1640 με L-γλουταμίνη χωρίς δικαρβονικό νάτριο, ρυθμισμένο σε pH 7,0 με 0,165 M μορφολινοπροπανοσουλφονικό οξύ (MOPS), και 100 mg/L χλωραμφαινικόλη (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany).

In vitro φαρμακοκινητικό/φαρμακοδυναμικό μοντέλο

Χρησιμοποιήθηκε ένα προηγούμενως βελτιστοποιημένο *in vitro* διδιαμερισματικό ΦΚ/ΦΔ μοντέλο.¹¹ Το μοντέλο αυτό αποτελείται από το εξωτερικό διαμέρισμα (ΕΞΔ), το οποίο περιλαμβάνει μια κωνική φιάλη που περιέχει θρεπτικό υλικό και συνδέεται με περισταλτική αντλία (Minipuls Evolution®, Gilson Inc), και το εσωτερικό διαμέρισμα (ΕΣΔ), ένα σωλήνα διάχυσης όγκου 10 mL (Spectra/Por® Float-A-Lyzer® G2, Spectrum Laboratories Inc, Breda, The Netherlands) κατασκευασμένο από ημιπερατή μεμβράνη κυτταρίνης (μοριακού βάρους περικοπής 20 kD), στον οποίο ενοφθαλμίζεται το εναιώρημα του μύκητα. Το *in vitro* μοντέλο είχε προσαρμοστεί πρωτίτερα για την ταυτόχρονη μελέτη φαρμάκων με διαφορετικούς χρόνους ημίσειας ζωής, επιτρέποντας τη διερεύ-

νηση συνδυασμών.⁸ Σε τακτά χρονικά διαστήματα πραγματοποιήθηκαν επαναλαμβανόμενες δειγματοληψίες (160 mL) από το ΕΣΔ προκειμένου να προσδιοριστούν τα προφίλ της συγκέντρωσης των φαρμάκων (60 mL) και των επιπέδων της γαλακτομαννάνης (100 mL) σε συνάρτηση με τον χρόνο. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -70 °C μέχρι την ανάλυσή τους.

In vitro φαρμακοκινητική

Οι μέσες τιμές (±διακύμανση) των ΦΚ παραμέτρων για τις καθιερωμένες δοσολογίες ενδοφλέβιας χορήγησης βορικοναζόλης (4 mg/kg δύο φορές ημερησίως) και ανιντουλαφουγκίνης (100 mg άπαξ την ημέρα) προσομοιώθηκαν στο *in vitro* ΦΚ/ΦΔ μοντέλο. Ειδικότερα, προσομοιώθηκαν τα προφίλ επιπέδων ελεύθερου φαρμάκου-χρόνου προκειμένου να συμπεριληφθούν χαμηλές, ενδιάμεσες και υψηλές συγκεντρώσεις, με μέγιστη συγκέντρωση ελεύθερης (fC_{max}) βορικοναζόλης 3, 1,5 και 0,35 mg/L, χρόνο ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$) 6 ωρών χορηγούμενη κάθε 12ωρο και fC_{max} ανιντουλαφουγκίνης 0,16, 0,08 και 0,01 mg/L, $t_{1/2}$ 24 ωρών χορηγούμενη κάθε 24 ώρες. Οι συγκεκριμένες fC_{max} s αντιστοιχούν στο ανώτερο, στο μέσο και στο κατώτερο 95% διάστημα εμπιστοσύνης (CI), αντίστοιχα, των επιπέδων ελεύθερου φαρμάκου που παρατηρήθηκαν στο πλάσμα ασθενών,^{12,13} λαμβάνοντας υπ' όψη τα ποσοστά πρωτεϊνοσύνδεσης 58% και 99% για τη βορικοναζόλη και την ανιντουλαφουγκίνη, αντίστοιχα. Κατά συνέπεια, μελετήθηκαν εννέα διαφορετικά σχήματα συνδυασμού, περιλαμβανομένων κάθε φορά των μονοθεραπειών, καθώς και δειγμάτων ελέγχου. Τα επίπεδα της βορικοναζόλης και της ανιντουλαφουγκίνης προσδιορίστηκαν με μικροβιολογική μέθοδο διάχυσης σε άγαρ.¹⁴ Δεδομένου ότι οι τιμές-στόχος των συγκεντρώσεων της ανιντουλαφουγκίνης ήταν κάτω από το όριο ευαισθησίας της μεθόδου υπολογίστηκαν οι 10x των προαναφερόμενων fC_{max} s.

In vitro φαρμακοδυναμική

Προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση των φαρμάκων στη μυκητιακή ανάπτυξη για κάθε δοσολογικό σχήμα των μονοθεραπειών και του αντίστοιχου συνδυασμού τους, συλλέχθηκαν 100 mL του διαλύματος των σωλήνων διάχυσης κάθε 6–12 ώρες και προσδιορίστηκε ο δείκτης γαλακτομαννάνης (GI) με τη βοήθεια ανοσοενζυμικής δοκιμασίας (Platelia *Aspergillus* EIA, Bio-Rad Laboratories). Τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -70 °C μέχρι την ανάλυσή τους. Κατασκευάστηκε η καμπύλη GI-χρόνου για το εκάστοτε εξεταζόμενο στέλεχος και σχήμα και προσδιορίστηκε η περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC), η οποία σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες λειτουργεί ως υποκατάστατος δείκτης της μυκητιακής ανάπτυξης.¹⁵

In vitro αλληλεπιδράσεις

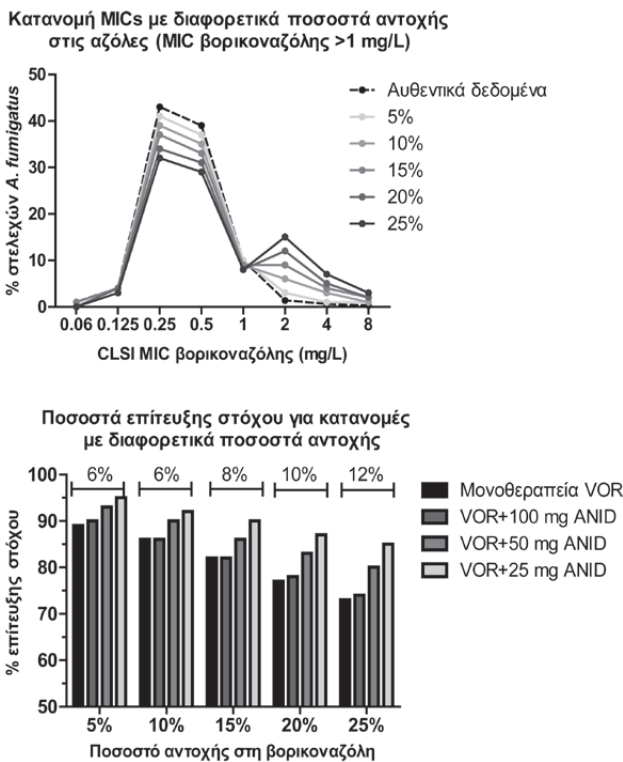
Προκειμένου να εκτιμηθεί η φύση των *in vitro* αλληλεπιδράσεων μεταξύ βορικοναζόλης-ανιντουλαφουγκίνης, τα δεδομένα αναλύθηκαν, εφαρμόζοντας το κριτήριο ανεξαρτησίας κατά Bliss και το μοντέλο προσθετικότητας κατά Loewe.^{16,17} (α) *Ανεξαρτησία κατά Bliss*: Περιγράφεται από την εξίσωση $E_{IND} = E_A + E_B - (E_A E_B)$, όπου

E_A , E_B είναι η % μυκητιακή αναστολή της μονοθεραπείας των A και B, αντίστοιχα, και E_{IND} είναι το αναμενόμενο ποσοστό μυκητιακής αναστολής ενός μη αλληλεπιδραστικού (ανεξάρτητου) θεωρητικού συνδυασμού των A και B. Η διαφορά ($\Delta E = E_{IND} - E_{OBS}$) μεταξύ της αναμενόμενης % αναστολής, E_{IND} , και του πειραματικά προσδιοριζόμενου ποσοστού της, E_{OBS} , περιγράφει την αλληλεπίδραση κάθε συνδυασμού συγκεντρώσεων των δύο φαρμάκων. Αν $\Delta E > 0$ συνεπάγεται συνέργεια κατά Bliss, ενώ στην αντίθετη περίπτωση ($\Delta E < 0$) ανταγωνισμό κατά Bliss. Κάθε άλλη περίπτωση ερμηνεύεται ως ανεξαρτησία κατά Bliss. Η ΔE υπολογίστηκε για τον εκάστοτε συνδυασμό και η στατιστική σημαντικότητά της προσδιορίστηκε με τη δοκιμασία Student's t test ($p < 0,05$).¹⁷ (β) *Προσθετικότητα κατά Loewe*: Προκειμένου να προσδιοριστεί η σχέση φαρμακευτικής έκθεσης-μυκητιακής ανάπτυξης του συνδυασμού βορικοναζόλης-ανιντουλαφουγκίνης χρησιμοποιήθηκε ένα μαθηματικό, μη γραμμικό μοντέλο φαρμακευτικής έκθεσης-μυκητιακής ανάπτυξης (ΦΕ-ΜΑ), όπως περιγράφηκε προηγουμένα.^{8,16} Το μοντέλο είναι ένα σύνολο εξισώσεων βασισμένων στο σιγμοειδές E_{max} μοντέλο, στο οποίο η μυκητιακή ανάπτυξη εκφράζεται συναρτήσει των δεικτών (fC_{max}/MEC)/ $EI_{50/ANID}$ και ($fAUC/MIC$)/ $EI_{50/VOR}$, όπου fC_{max}/MEC και $fAUC/MIC$ είναι οι λόγοι της μέγιστης συγκέντρωσης fC_{max} διά της τιμής MEC και της περιοχής κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου $fAUC$ διά της τιμής MIC και όπου $EI_{50/ANID}$ και $EI_{50/VOR}$ αντιστοιχούν στους δείκτες έκθεσης fC_{max}/MEC και $fAUC/MIC$, οι οποίοι σχετίζονται με την 50% ανάπτυξη για την ανιντουλαφουγκίνη και τη βορικοναζόλη, αντίστοιχα. Οι συγκεκριμένοι δείκτες χρησιμοποιήθηκαν επειδή έχει βρεθεί ότι είναι προγνωστικοί του *in vivo* αποτελέσματος για τις εχινοκανδίνες και τη βορικοναζόλη, αντίστοιχα.^{9,18}

Προσομοίωση Monte Carlo

Προκειμένου να συνδυαστούν τα *in vitro* δεδομένα με τη φαρμακοκινητική στον άνθρωπο, χρησιμοποιήθηκε ανάλυση Monte Carlo για την προσομοίωση 10.000 ασθενών με λοιμώξεις από στελέχη *A. fumigatus* με MICs βορικοναζόλης 0,125–8 mg/L και MECs ανιντουλαφουγκίνης 0,008–0,064 mg/L,^{19,20} οι οποίοι λάμβαναν την καθιερωμένη δοσολογία ενδοφλέβιας χορήγησης βορικοναζόλης (4 mg/kg δύο φορές ημερησίως) ως μονοθεραπεία ή μαζί με ανιντουλαφουγκίνη (100 mg άπαξ την ημέρα) ως σχήμα συνδυαστικής θεραπείας. Σε σταθεροποιημένη κατάσταση, η δοσολογία των 100 mg ανιντουλαφουγκίνης αντιστοιχεί σε μέγιστη συγκέντρωση πρωτεϊνοσυνδεόμενων μορίων (tC_{max}) στον ανθρώπινο ορό $7,2 \pm 1,7$ mg/L,²¹ η οποία ισοδυναμεί με τη μέγιστη συγκέντρωση μη πρωτεϊνοσυνδεόμενων ελεύθερων μορίων (fC_{max}) $0,072 \pm 0,017$ mg/L σύμφωνα με το 99% ποσοστό πρωτεϊνοσύνδεσης που έχει περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες.²² Για τη βορικοναζόλη, η δοσολογία των 4 mg/kg αντιστοιχεί σε $tAUC_{0-12}$ 51 ± 11 mg.h/L,²³ ενώ η $fAUC_{0-12}$ υπολογίστηκε για τα μη πρωτεϊνοσυνδεόμενα μόρια του φαρμάκου στα $21,4 \pm 9,2$ mg.h/L σύμφωνα με το 58% ποσοστό πρωτεϊνοσύνδεσής της. Για την εκτίμηση του ποσοστού της μυκητιακής ανάπτυξης σε καθέναν από τους 10.000 προσομοιωμένους ασθενείς που έλαβαν αγωγή μονοθεραπείας ή συνδυασμού, χρησιμοποιήθηκε το προαναφερθέν μαθηματικό, μη γραμμικό μοντέλο ΦΕ-ΜΑ. Οι ανεξάρτητες μεταβλητές για κάθε ασθενή ήταν ο λόγος fC_{max}/MEC

για την ανιντουλαφουγκίνη και $fAUC/MIC$ για τη βορικοναζόλη, ενώ η εξαρτημένη μεταβλητή ήταν το % μυκητιακής ανάπτυξης. Το ποσοστό των ασθενών στους οποίους εμφανίστηκε <50% της εκτιμώμενης μυκητιακής ανάπτυξης υπολογίστηκε για κάθε MIC βορικοναζόλης. Η τιμή-στόχος της ΦΚ/ΦΔ παραμέτρου που αντιστοιχεί στο 50% της μυκητιακής ανάπτυξης (EI_{50}) έχει βρεθεί προηγουμένως να συσχετίζεται με το ποσοστό επιβίωσης ασθενών με πνευμονική ασπεργίλλωση μετά από 6 εβδομάδες θεραπείας με βορικοναζόλη ή αμφοτερικίνη Β, χρησιμοποιώντας το ίδιο *in vitro* ΦΚ/ΦΔ μοντέλο.^{11,24} Εκτός από τα ΠΕΣ για την εκάστοτε MIC, υπολογίστηκε το ολικό ΠΕΣ για μια συλλογή στελεχών *A. fumigatus*, με τη βοήθεια προηγουμένως δημοσιευμένων κατανομών MEC ανιντουλαφουγκίνης (68% των στελεχών είχαν MEC 0,008 mg/L, 21% των στελεχών είχαν MEC 0,015 mg/L, 10% των στελεχών είχαν MEC 0,032 mg/L και 1% των στελεχών είχαν MEC 0,064 mg)²³ και MIC βορικοναζόλης προσομοιώνοντας ποσοστά αντοχής από 5–25%,²⁵ όπως φαίνεται στην εικόνα 1. Η συχνότητα κάθε κατανομής MIC βορικοναζόλης προσαρμόστηκε ώστε να διατηρηθούν οι ίδιες σχετικές συχνότητες για αγρίου τύπου και ανθεκτικά (MIC >1 mg/L) στελέχη. Επιπρόσθετα, προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη δόση ανιντουλαφουγκίνης, τα ΠΕΣ εκτιμήθηκαν και για τα χαμηλότερα δοσολογικά σχήματα των 50 mg και 25 mg, τα οποία αντιστοιχούν σε tC_{max} (fC_{max}) $4,2 \pm 0,94$ ($0,042 \pm 0,009$) και $2,1 \pm 0,47$ ($0,021 \pm 0,005$) mg/L, αντίστοιχα.²¹



Εικόνα 1. Κατανομές MIC που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση προσομοίωσης Monte Carlo (άνω γράφημα) και ποσοστά επίτευξης στόχου για κάθε σχήμα συνδυασμού (κάτω γράφημα). Τα αρχικά δεδομένα (διακεκομμένη γραμμή)¹⁹ προσαρμόστηκαν ώστε να ανταποκρίνονται στα αυξανόμενα ποσοστά αντοχής από 5–25% (στελέχη με MIC >1 mg/L), διατηρώντας παράλληλα τις σχετικές συχνότητες μεταξύ των MICs ίδιες.

Θεραπευτικές συγκεντρώσεις φαρμάκων

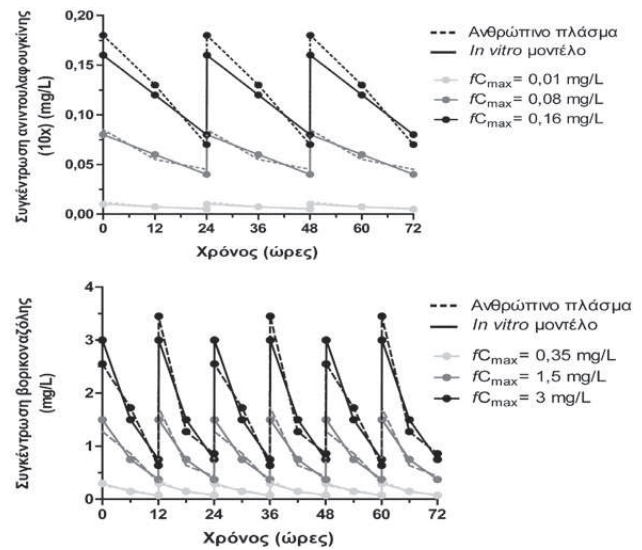
Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα φαρμάκων που απαιτούνται προκειμένου να επιτευχθεί η κλινικά σημαντική *in vitro* τιμή-στόχος EI_{50} για διαφορετικές MICs βορικοναζόλης και συγκεντρώσεις ανιντουλαφουγκίνης. Για τον σκοπό αυτόν υπολογίστηκαν οι απαιτούμενες fC_{max} s ανιντουλαφουγκίνης και fC_{min}/MIC βορικοναζόλης των μονοθεραπειών και του συνδυασμού, εφαρμόζοντας το μαθηματικό μοντέλο ΦΕ-ΜΑ. Τέλος, υπολογίστηκαν οι tC_{max} s ανιντουλαφουγκίνης και tC_{min} s βορικοναζόλης λαμβάνοντας υπ’ όψη τα ποσοστά πρωτεϊνοσύνδεσης 99% και 58%, αντίστοιχα.^{22,26}

Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν εις διπλούν και τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση του στατιστικού λογισμικού προγράμματος GraphPad Prism, έκδοση 5.0 για Windows (GraphPad Software, San Diego, CA) και JPM7.0 (Sas Institute, Cary, NC).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Φαρμακοκινητική ανάλυση

Οι ΦΚ παράμετροι της σταθεροποιημένης κατάστασης των φαρμάκων προσομοιώθηκαν καλά στο *in vitro* μοντέλο. Συγκεκριμένα, για τη βορικοναζόλη ο μέσος $t_{1/2}$ ήταν 7,4 ώρες, με αρχική fC_{max} στο ΕΣΔ $0,26 \pm 0,03$, $1,31 \pm 0,16$ και $2,62 \pm 0,32$ mg/L και για την ανιντουλαφουγκίνη 21 ώρες, με $0,01 \pm 0,001$, $0,08 \pm 0,005$ και $0,18 \pm 0,01$ mg/L, αντίστοιχα για τα τρία σχήματα που προσομοιώθηκαν. Οι άνω της MEC fC_{max} s (0,08 και 0,16 mg/L) επαληθεύτηκαν και μικροσκοπικά από την παρουσία αλλοιωμένων υφών στο ΕΣΔ του *In vitro* ΦΚ/ΦΔ μοντέλου. Τα προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου των δύο μονοθεραπειών παρουσιάζονται στην εικόνα 2.

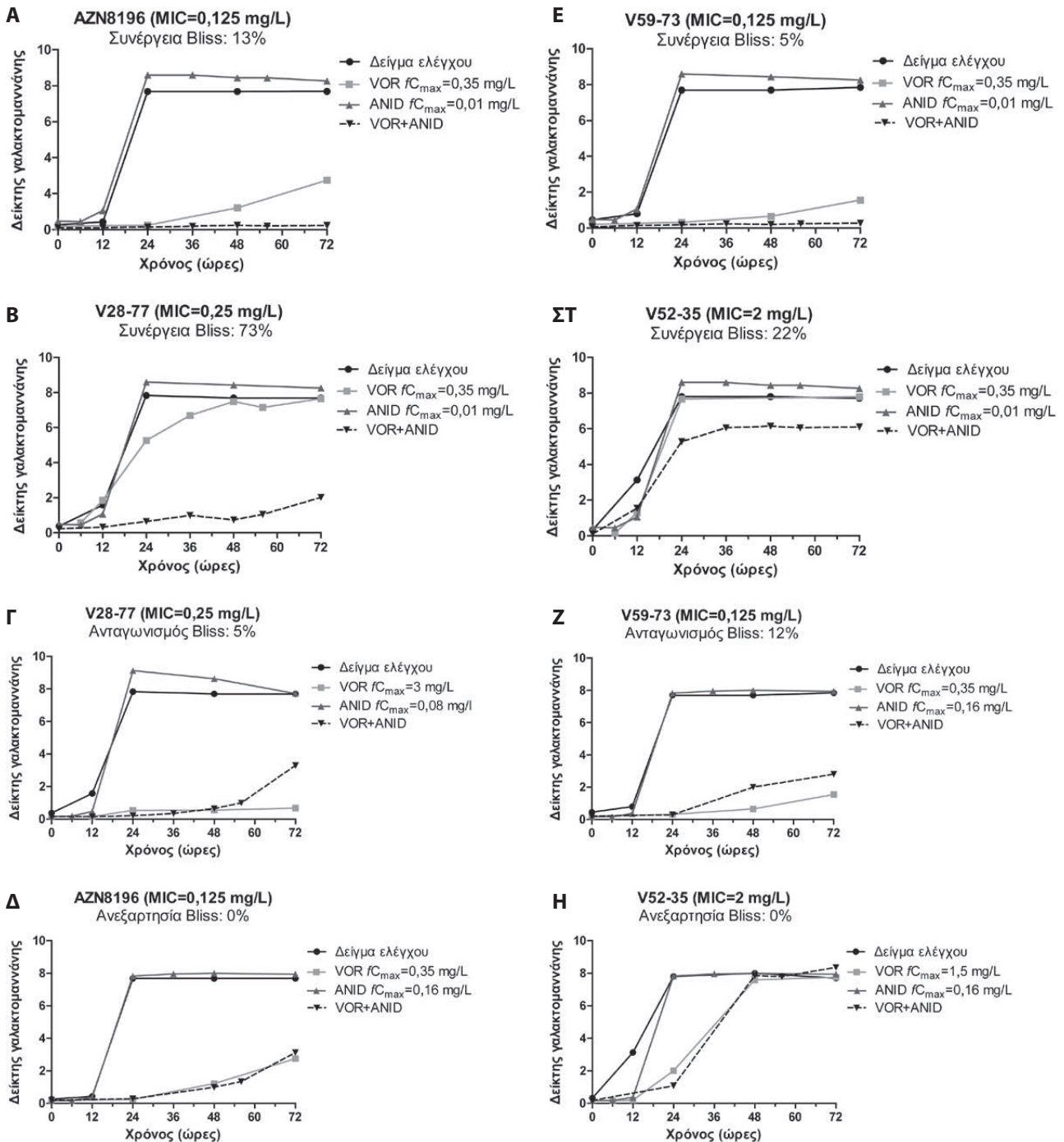


Εικόνα 2. Φαρμακοκινητικό προφίλ (καμπύλες συγκέντρωσης-χρόνου) των προσομοιωμένων δόσεων των μονοθεραπειών ανιντουλαφουγκίνης και βορικοναζόλης στο ανθρώπινο πλάσμα (διακεκομμένη γραμμή) και στο *in vitro* φαρμακοκινητικό/φαρμακοδυναμικό μοντέλο (συνεχής γραμμή).

Φαρμακοδυναμική ανάλυση

Μετά από επώαση 72 ωρών, η μονοθεραπεία ανιτουλαφουγκίνης οδήγησε σε ελάχιστη (<10%) αναστολή της παραγωγής γαλακτομαννάνης για όλα τα εξεταζόμενα στελέχη και δοσολογικά σχήματα. Από την άλλη πλευρά, η μονοθεραπεία βορικοναζόλης ανέστειλε την ανάπτυξη

των ευαίσθητων στελεχών AZN8196 και V59-73 σε ποσοστά >83% σε όλες τις συγκεντρώσεις, ενώ για τα στελέχη V28-77 και V52-35 η αναστολή ήταν 13%, 45%, 93% και 8%, 32%, 38% σε fC_{max} 0,35, 1,5 και 3 mg/L, αντίστοιχα. Χαρακτηριστικές καμπύλες GI-χρόνου ορισμένων από τις προσομοιωμένες δόσεων, τόσο των μονοθεραπειών όσο και των αντίστοιχων συνδυασμών τους, παρουσιάζονται



Εικόνα 3. Αντιπροσωπευτικές καμπύλες δείκτη γαλακτομαννάνης-χρόνου του συνδυασμού βορικοναζόλης-ανιτουλαφουγκίνης έναντι στελεχών *A. fumigatus* με αυξανόμενες MICs βορικοναζόλης.

στην εικόνα 3. Συγκεκριμένα, για συνδυασμούς με χαμηλή fC_{max} (0,01 mg/L) ανιντουλαφουγκίνης οι τιμές GI ήταν μικρότερες από εκείνες των αντίστοιχων μονοθεραπειών (εικ. 3Α–Δ), ενώ για υψηλότερες fC_{max} s ανιντουλαφουγκίνης οι τιμές GI ήταν παρόμοιες (εικ. 3Ζ–Η) ή μεγαλύτερες (εικ. 3Ε–ΣΤ) των μονοθεραπειών.

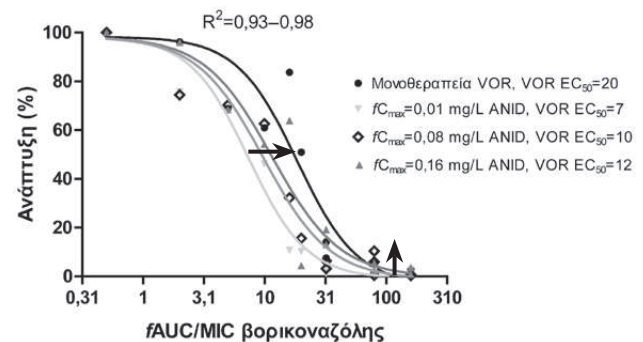
Φαρμακοδυναμικές αλληλεπιδράσεις

(α) Κατά Bliss. Η βασιζόμενη στα *in vitro* δεδομένα του GI ανάλυση έδειξε ότι ο συνδυασμός βορικοναζόλης-ανιντουλαφουγκίνης ήταν ανεξάρτητος στην πλειοψηφία των δοσολογικών σχημάτων έναντι των δύο ευαίσθητων στελεχών με MIC 0,125 mg/L (αγρίου τύπου AZN8196 και μη αγρίου τύπου V59–73). Η *in vitro* δραστηριότητα του συνδυασμού ήταν παρόμοια με εκείνη της μονοθεραπείας της βορικοναζόλης σε όλες τις προσομοιωμένες fC_{max} s των δύο φαρμάκων, με εξαίρεση τη χαμηλότερη fC_{max} βορικοναζόλης (0,35 mg/L) και ανιντουλαφουγκίνης (0,01 mg/L), όπου εμφανίστηκαν ασθενείς (8–16%) συνεργικές αλληλεπιδράσεις κατά Bliss (άθροισμα 8–36%). Ισχυρότερη συνέργεια κατά Bliss της τάξης του 23–80% (άθροισμα 270%) και 20–24% (άθροισμα 65%) παρατηρήθηκε έναντι των μη αγρίου τύπου στελεχών V28–77 με MIC 0,25 mg/L και του αζολοανθεκτικού V52–35 με MIC 2 mg/L, αντίστοιχα. Οι εν λόγω συνεργικές αλληλεπιδράσεις βρέθηκαν σε ενδιάμεσες και σε χαμηλές συγκεντρώσεις φαρμάκων (fC_{max} βορικοναζόλης $\leq 1,5$ mg/L, fC_{max} ανιντουλαφουγκίνης $\leq 0,08$ mg/L), ενώ στις υψηλές συγκεντρώσεις προέκυψε ανεξαρτησία κατά Bliss. Επίσης, στην υψηλότερη fC_{max} ανιντουλαφουγκίνης εμφανίστηκε ανταγωνισμός κατά Bliss για όλα τα στελέχη. Ωστόσο, στατιστικά σημαντικός βρέθηκε μόνο για τα V59–73 και V28–77. Συνεργικές, ανεξάρτητες και ανταγωνιστικές κατά Bliss αλληλεπιδράσεις απεικονίζονται στις καμπύλες GI-χρόνου (εικ. 3), με τη μεγαλύτερη μετατόπιση των καμπυλών του συνδυασμού να παρατηρείται για στελέχη με μειωμένη ευαισθησία στη βορικοναζόλη.

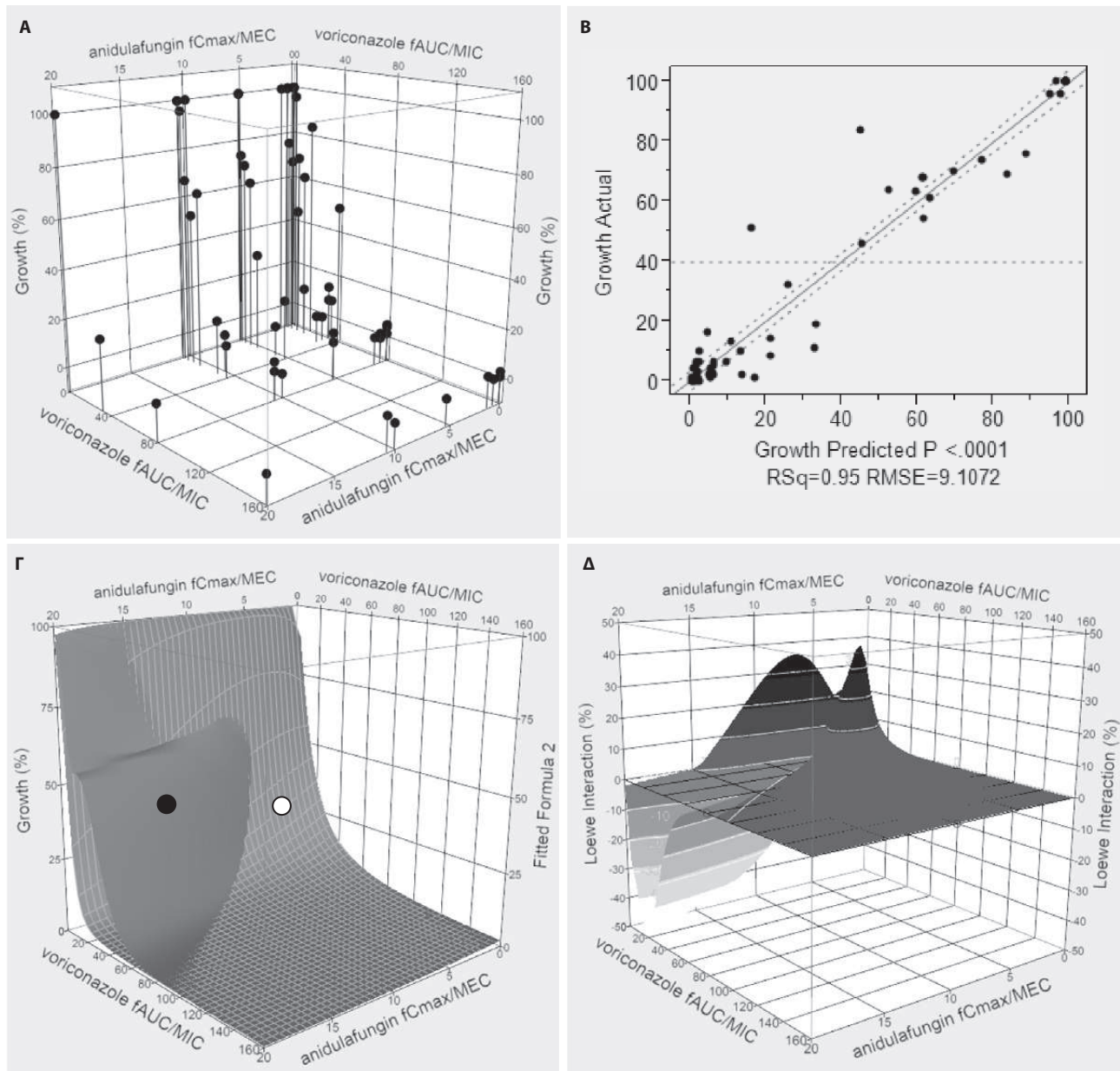
Ο ανταγωνισμός για το στέλεχος V28–77 με MIC 0,25 mg/L εμφανίστηκε σε υψηλότερη δόση βορικοναζόλης (fC_{max} 3 mg/L, $fAUC$ 20 mg.h/L, $fAUC/MIC$ 80) απ'ότι για το V59–73 με MIC 0,125 mg/L (fC_{max} 0,35 mg/L, $fAUC$ 4 mg.h/L, $fAUC/MIC$ 32), υποδεικνύοντας ότι η φύση των αλληλεπιδράσεων είναι δοσοεξαρτώμενη. Ως εκ τούτου, αναλογίες $fAUC/MIC > 32$ σχετίστηκαν με ανταγωνισμό. Ομοίως, για το AZN8196 με MIC βορικοναζόλης 0,125 mg/L και MEC ανιντουλαφουγκίνης 0,015 mg/L βρέθηκε συνέργεια σε fC_{max} s ανιντουλαφουγκίνης $\leq 0,08$ mg/L (5 fC_{max}/MEC), αλλά όχι σε fC_{max} 0,16 mg/L (10 fC_{max}/MEC), ενώ για το V59–73 με την ίδια MIC βορικοναζόλης, όμως με μικρότερη MEC ανιντουλαφουγκίνης (0,008 mg/L), συνέργεια παρατηρήθηκε

σε fC_{max} 0,01 mg/L (1 fC_{max}/MEC), αλλά όχι σε fC_{max} 0,08 mg/L (10 fC_{max}/MEC). Κατά συνέπεια, συνέργεια παρατηρήθηκε σε αναλογίες $fC_{max}/MEC < 10$. Για στελέχη με μειωμένη ευαισθησία στη βορικοναζόλη (MIC 0,25 και 2 mg/L), η fC_{max} βορικοναζόλης που απαιτείται για να επέλθει στάσιμη κατάσταση μειώνεται από ≥ 3 mg/L στη μονοθεραπεία σε $\leq 0,35$ mg/L στον συνδυασμό (εικόνες 3, 4).

(β) Κατά Loewe. Οι σχέσεις έκθεσης-απόκρισης της βορικοναζόλης είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με αυξανόμενες fC_{max} s ανιντουλαφουγκίνης φαίνονται στην εικόνα 4. Για τη βορικοναζόλη, η αναλογία $fAUC_{0-12}/MIC$ ακολουθούσε σιγμοειδή καμπύλη ($R^2=0,99$) με EI_{50} (95% CI) 20 (17–26) που μειώθηκε σε 7, 10 και 12 με την παρουσία fC_{max} s ανιντουλαφουγκίνης 0,01, 0,08 και 0,16 mg/L, αντίστοιχα. Η επιφάνεια έκθεσης-απόκρισης του συνόλου των σχημάτων συνδυασμού για όλα τα στελέχη παρουσιάζεται στην εικόνα 5Γ. Συγκεκριμένα, η επιφάνεια είναι κοίλη σε χαμηλές συγκεντρώσεις φαρμάκων (λευκή κουκίδα), ενώ κυρτή σε υψηλότερες (μαύρη κουκίδα). Το τελικό μοντέλο που περιγράφει καλά ($R^2=0,95$) ολόκληρη την επιφάνεια έκθεσης-απόκρισης είναι το $E=100/(1+10^{[\log(1,13\pm 0,40x+0,79\pm 0,09y+10\pm 3,1xy+18,7\pm 4,9xy(x-y))-\log(U_{anid}+U_{vor})]^{-(8,1\pm 3,8x-1,6\pm 0,24y+18,4\pm 8,1xy+15,6\pm 7,7xy(x-y))}}$ (μέση τιμή \pm SEM). Οι συντελεστές μεταβλητότητας των περισσότερων παραμέτρων ήταν $< 30\%$, με την πλειοψηφία των διαφορών μεταξύ προβλεπόμενων-παρατηρούμενων τιμών να βρίσκεται σε ποσοστό $< 20\%$ (εικ. 5Α και Β). Συνέργεια βρέθηκε σε χαμηλές συγκεντρώσεις ανιντουλαφουγκίνης ($fC_{max}/MEC < 10$) και βορικοναζόλης ($fAUC/MIC < 10$), ενώ ανταγωνισμός εντοπίστηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (εικ. 5Δ). Η μέση τιμή (εύρος) των δεικτών της αλληλεπίδρασης των συνεργικών και των ανταγωνιστικών συνδυασμών ήταν 0,63 (0,38–0,79) και 1,12 (1,04–4,6).



Εικόνα 4. Καμπύλες έκθεσης στο φάρμακο-μυκητιακής ανάπτυξης της βορικοναζόλης παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ανιντουλαφουγκίνης για τα τέσσερα στελέχη *A. fumigatus* με διαφορετικές MICs. Η τιμή EC_{50} της βορικοναζόλης αυξήθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ανιντουλαφουγκίνης, υποδεικνύοντας ενίσχυση της δραστηριότητας της βορικοναζόλης (βέλος προς τα δεξιά). Ωστόσο, κάποιο ποσοστό ανάπτυξης παρατηρήθηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις βορικοναζόλης όταν συνδυάστηκε με ανιντουλαφουγκίνη, υποδεικνύοντας περιορισμό της δραστηριότητας της βορικοναζόλης (βέλος προς τα πάνω).

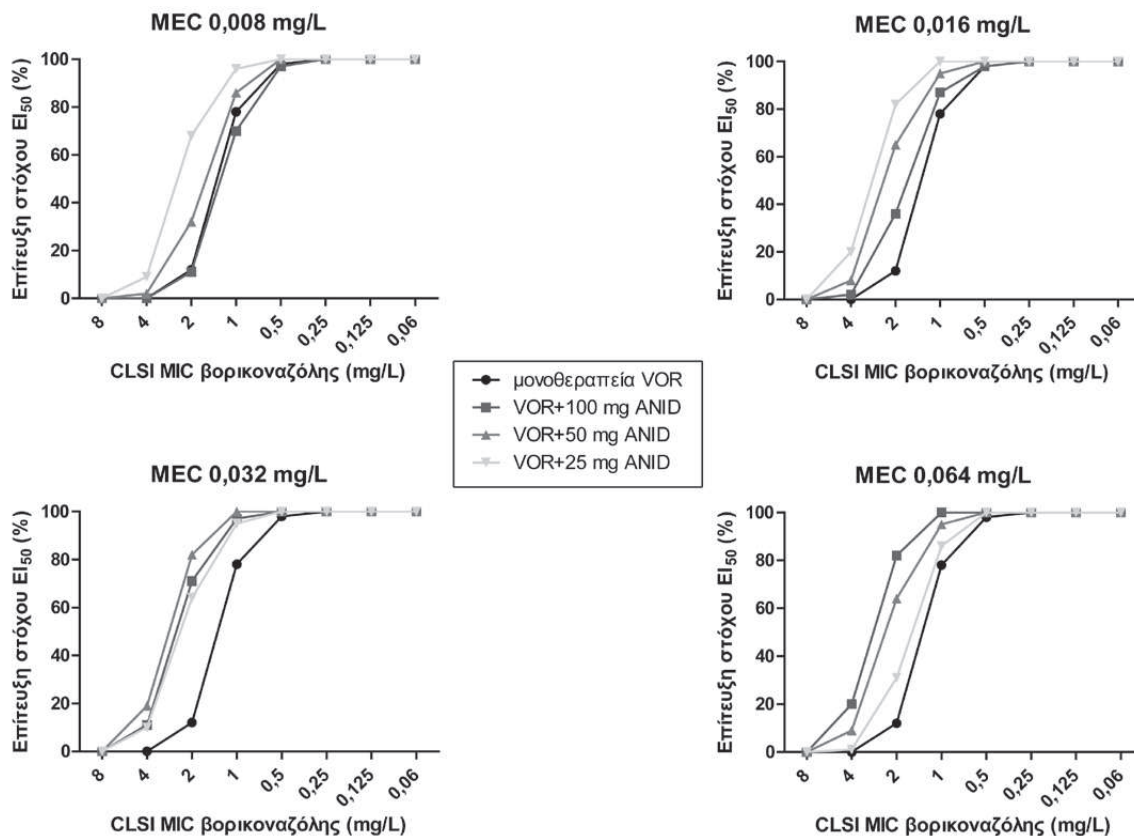


Εικόνα 5. Μοντελοποίηση επιφάνειας φαρμακευτικής έκθεσης-μυκητιακής ανάπτυξης (ΦΕ-ΜΑ) του συνδυασμού βορικοναζόλης-ανιτουλαφουγκίνης έναντι των εξεταζόμενων στελεχών *A. fumigatus*. (Α) Τρισδιάστατο ιστόγραμμα των πειραματικών δεδομένων. (Β) Γράφημα πραγματικής συναρτήσεως προβλεπόμενης ανάπτυξης. (Γ) Τρισδιάστατη επιφάνεια ΦΕ-ΜΑ έναντι των AUC/MICs των φαρμάκων. Η επιφάνεια του πλέγματος αντιστοιχεί στα επίπεδα μυκητιακής ανάπτυξης, αν τα δύο φάρμακα δρούσαν προσθετικά. Η στερεά επιφάνεια αντιστοιχεί στα επίπεδα μυκητιακής ανάπτυξης, όπως προβλέπονται από το μοντέλο (επιφάνεια απόκρισης). Οι λευκές και οι μαύρες κουκίδες είναι τα κύρια πεδία συνεργικών και ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων. (Δ) Τρισδιάστατη επιφάνεια συνεργικών (πάνω από το επίπεδο 0) και ανταγωνιστικών (κάτω από το επίπεδο 0) αλληλεπιδράσεων.

Προσομοίωση Monte Carlo

Τα ποσοστά επίτευξης του EI_{50} για στελέχη *A. fumigatus* με διαφορετικές τιμές MIC βορικοναζόλης και MEC ανιτουλαφουγκίνης παρουσιάζονται στην εικόνα 6. Τα ΠΕΣ για τη μονοθεραπεία της βορικοναζόλης ήταν $\geq 78\%$, 12% και 0% για στελέχη με MICs ≤ 1 , 2 και ≥ 4 mg/L, αντίστοιχα, τα οποία αυξήθηκαν στο σύνολο των συνδυαστικών σχη-

μάτων έναντι όλων των στελεχών με διαφορετικές MECs ανιτουλαφουγκίνης. Συγκεκριμένα, για στελέχη με MEC ανιτουλαφουγκίνης $0,008$ και $0,016$ mg/L, τα μεγαλύτερα ΠΕΣ διαπιστώθηκαν όταν η βορικοναζόλη συνδυάστηκε με 25 mg ανιτουλαφουγκίνης προσεγγίζοντας το $96-100\%$, το $68-82\%$ και το $9-20\%$ για στελέχη με MICs βορικοναζόλης 1 , 2 και 4 mg/L, αντίστοιχα. Για στελέχη με MEC ανιτουλαφουγκίνης $0,032$ και $0,064$ mg/L, τα υψηλότερα ΠΕΣ βρέθηκαν



Εικόνα 6. Ποσοστά επίτευξης στόχου της μονοθεραπείας βορικοναζόλης και του συνδυασμού βορικοναζόλης-ανιντουλαφουγκίνης έναντι στελεχών *A. fumigatus* με διαφορετικές MICs βορικοναζόλης και MECs ανιντουλαφουγκίνης, χρησιμοποιώντας έναν φαρμακοδυναμικό στόχο που σχετίζεται με ποσοστό ανάπτυξης 50%.

όταν η βορικοναζόλη συνδυάστηκε με 50 mg και 100 mg ανιντουλαφουγκίνης, αντίστοιχα, φθάνοντας το 100%, το 82% και το 20% για στελέχη με MICs βορικοναζόλης 1, 2 και 4 mg/L, αντίστοιχα. Οι διαφορές στα ΠΕΣ για συλλογές στελεχών με διαφορετικά ποσοστά αντοχής στις αζόλες και κατανομές MIC φαίνονται στην εικόνα 1. Τα ποσοστά επίτευξης του EI₅₀ μεταξύ μονοθεραπείας-συνδυαστικής θεραπείας έδειξαν αύξηση έως 6% και 8–12% για ποσοστά αντοχής 5–10% και 15–25%, αντίστοιχα, με τη μεγαλύτερη αύξηση να παρατηρείται πάντοτε στη χαμηλότερη δόση ανιντουλαφουγκίνης.

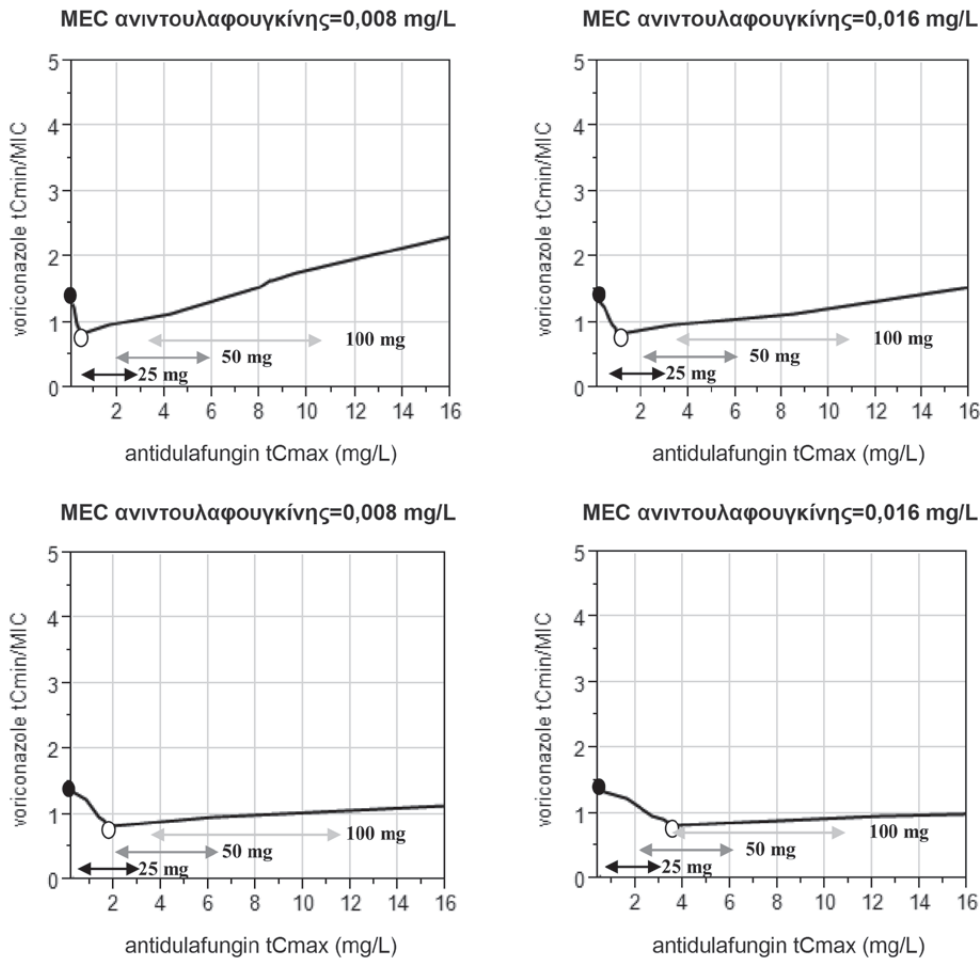
Θεραπευτικές συγκεντρώσεις

Οι σχετιζόμενες με τον EI₅₀ συγκεντρώσεις βορικοναζόλης και ανιντουλαφουγκίνης φαίνονται στην εικόνα 7, όπου παρουσιάζεται η αναλογία tC_{min}/MIC βορικοναζόλης σε συνάρτηση με την tC_{max} ανιντουλαφουγκίνης για στελέχη με MEC 0,008, 0,016, 0,032 και 0,064 mg/L. Ο EI₅₀ μπορεί να επιτευχθεί με μονοθεραπεία βορικοναζόλης, στοχεύοντας $1,5 tC_{min}/MIC$. Ως εκ τούτου, στελέχη με MIC 4 mg/L ή μεγαλύτερη θα απαιτήσουν υψηλά και δυνητικά τοξικά ελάχιστα

(tC_{min}) επίπεδα βορικοναζόλης (>6 mg/L).²⁷ Εν τούτοις, ο EI₅₀ μπορεί να επιτευχθεί με συνδυαστική θεραπεία στοχεύοντας χαμηλότερες συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν σε $0,75 tC_{min}/MIC$, αρκεί η tC_{max} ανιντουλαφουγκίνης να είναι <0,5, 1, 2 και 4 mg/L για στελέχη με MEC 0,008, 0,016, 0,032 και 0,064 mg/L, αντίστοιχα. Κατά συνέπεια, με το συνδυαστικό σχήμα θα μπορούσε να επιτευχθεί ο ΦΔ στόχος για στελέχη με MICs έως 4 mg/L, χωρίς να απαιτούνται υψηλές, τοξικές συγκεντρώσεις βορικοναζόλης. Η δόση των 25 mg ανιντουλαφουγκίνης είναι επαρκής για να επιτευχθεί η μέγιστη μείωση των επιπέδων βορικοναζόλης, τα οποία απαιτούνται για την επίτευξη στόχου για στελέχη *A. fumigatus* με MEC 0,008 και 0,016 mg/L, που απομονώνονται και συχνότερα. Οι υψηλότερες δόσεις των 50 mg και 100 mg θα ελαχιστοποιήσουν ή θα αντιστρέψουν τη συγκεκριμένη θετική επενέργεια. Οι δύο τελευταίες δόσεις θα παρέχουν βέλτιστα επίπεδα ανιντουλαφουγκίνης μόνο για στελέχη με MEC 0,032 και 0,064 mg/L, αντίστοιχα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο συνδυασμός βορικοναζόλης-ανιντουλαφουγκίνης



Εικόνα 7. Επίπεδα βορικοναζόλης και ανιτουλαφουγκίνης στον ορό που απαιτούνται για την επίτευξη του φαρμακοδυναμικό στόχου EI_{50} στη μονοθεραπεία (μαύρες κουκίδες) και στον συνδυασμό. Η μεγαλύτερη μείωση στα επίπεδα της βορικοναζόλης παρατηρήθηκε στην tC_{max} ανιτουλαφουγκίνης (λευκές κουκίδες) <0,5, 1, 2 και 4 mg/L για στελέχη με MECs 0,008, 0,016, 0,032 και 0,064 mg/L, αντίστοιχα. Τα μαύρα, ανοικτό γκρι και σκούρο γκρι, βέλη δείχνουν τη συγκέντρωση ανιτουλαφουγκίνης στον ορό μετά από δόση 25 mg, 50 mg και 100 mg, αντίστοιχα. Η δόση των 25 mg είναι επαρκής για να επιτευχθεί η μέγιστη μείωση των επιπέδων βορικοναζόλης που απαιτούνται για την επίτευξη στόχου στα στελέχη *A. fumigatus*, με MEC 0,008 και 0,016 mg/L, τα οποία απομονώνονται συχνότερα. Οι υψηλότερες δόσεις των 50 mg και 100 mg θα ελαχιστοποιήσουν ή θα αντιστρέψουν αυτή τη θετική επίδραση.

έναντι ευαίσθητων και ανθεκτικών στις αζόλες στελεχών *A. fumigatus* που διερευνήθηκε με ένα επικυρωμένο *in vitro* ΦΚ/ΦΔ μοντέλο υπέδειξε για πρώτη φορά την ύπαρξη δοσο- και MIC-εξαρτώμενων αλληλεπιδράσεων. Χαμηλές συγκεντρώσεις ανιτουλαφουγκίνης ($fC_{max}/MEC < 10$) και βορικοναζόλης ($fAUC/MIC < 10$) εμφανίζουν συνέργεια, ενώ υψηλότερες ανταγωνισμό. Συνδυάζοντας τα *in vitro* δεδομένα με φαρμακοκινητικά δεδομένα στον άνθρωπο, ο συνδυασμός ανιτουλαφουγκίνης με την καθιερωμένη δοσολογία βορικοναζόλης (4 mg/kg) επέφερε υψηλότερα ΠΕΣ συγκριτικά με τη μονοθεραπεία βορικοναζόλης. Η μεγαλύτερη αύξηση βρέθηκε με τη χαμηλότερη δόση ανιτουλαφουγκίνης (25 mg), για στελέχη με MEC ανιτουλαφουγκίνης 0,008–0,016 mg/L και κατανομές MIC βορικοναζόλης με υψηλά (>10%) ποσοστά αντοχής. Η βέλτιστη

δραστηριότητα του συνδυασμού συνδέθηκε με τιμές 0,75 tC_{min}/MIC βορικοναζόλης και tC_{max} ανιτουλαφουγκίνης 0,5–4 mg/L, ανάλογα με τη MEC, ενώ το εξ ίσου αποτελεσματικό σχήμα μονοθεραπείας βορικοναζόλης απαιτεί 1,5 tC_{min}/MIC . Η εν λόγω υποδιπλάσια μείωση της tC_{min}/MIC επιτρέπει την επίτευξη στόχου για στελέχη με MICs βορικοναζόλης μέχρι 4 mg/L με χαμηλότερες συγκεντρώσεις από εκείνες της αντίστοιχης μονοθεραπείας. Με την παράλληλη παρακολούθηση των επιπέδων της βορικοναζόλης αναμένεται να επιτευχθεί αφ' ενός βελτιστοποίηση της συνδυαστικής θεραπείας έναντι αζολο-ανθεκτικών στελεχών και αφ' ετέρου περιορισμός της τοξικότητας.

Στη βιβλιογραφία, οι *in vitro* αλληλεπιδράσεις μεταξύ αζολών-εχινοκανδινών παραμένουν ασαφείς. Η πλειοψηφία των μελετών συνδυασμού βορικοναζόλης-ανιτου-

λαφουγκίνης έχει καταδείξει ανεξάρτητη δράση έναντι *A. fumigatus*,^{28,29} ενώ συνέργεια έχει παρατηρηθεί έναντι τόσο ευαίσθητων όσο και ανθεκτικών στις αζόλες στελεχών.³⁰⁻³³ Εν τω μεταξύ, ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις έχουν επίσης αναφερθεί.³⁴ Εν τούτοις, η πρότυπη μέθοδος σκακιέρας (checkerboard), η οποία εφαρμόστηκε σε συμβατικά *in vitro* μοντέλα (πλάκες μικροτιτλοποίησης) σε όλες τις προηγούμενες μελέτες, στηρίζεται σε στατικές συγκεντρώσεις φαρμάκων, με τις αλληλεπιδράσεις να προσδιορίζονται σε ένα μόνο χρονικό σημείο. Αντίθετα, το *in vitro* ΦΚ/ΦΔ μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε στη σχετική μελέτη επιτρέπει την έκθεση των μυκήτων σε μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις φαρμάκων προσεγγίζοντας την *in vivo* κατάσταση.^{11,35} Έτσι, παρατηρήθηκαν συνεργικές αλληλεπιδράσεις σε χαμηλές συγκεντρώσεις και ανταγωνιστικές σε υψηλότερες. Μια προηγούμενη *in vitro* ΦΚ/ΦΔ μελέτη δεν μπόρεσε να ανιχνεύσει τη δοσοεξαρτώμενη φύση των αλληλεπιδράσεων, ενδεχομένως επειδή χρησιμοποιήθηκαν απ' ενός ένα υψηλής συγκέντρωσης εναιώρημα (10^5 cfu/mL), επιφέροντας «κορεσμό» στη δοκιμασία ανίχνευσης της μυκητιακής ανάπτυξης με βάση την παραγωγή γαλακτομαννάνης, και απ' ετέρου ένα αδρό μαθηματικό μοντέλο που αδυνατεί να εντοπίσει με ακρίβεια τις δοσοεξαρτώμενες φαρμακοδυναμικές αλληλεπιδράσεις.³¹ Απεναντίας, η τάξη μεγέθους του εναιωρήματος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη (10^3 cfu/mL) είναι περισσότερο κλινικά σχετική, επιτρέπει την ανίχνευση μεταβολών της μυκητιακής ανάπτυξης και έχει οδηγήσει στην εξαγωγή αποτελεσμάτων συγκρίσιμων με *in vivo* δεδομένα.^{11,15} Επί πλέον, το μαθηματικό μοντέλο που εφαρμόστηκε είναι πολύ ευέλικτο και μπορεί να εντοπίσει περίπλοκες φαρμακοδυναμικές αλληλεπιδράσεις σε σύγκριση με άλλα μοντέλα επιφάνειας-απόκρισης.^{9,28,36} Τέλος, παρά το γνωστό γεγονός ότι η μονοθεραπεία ανιτουλαφουγκίνης δεν καταστέλλει σημαντικά την παραγωγή γαλακτομαννάνης, στη μελέτη μας παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων της τελευταίας όταν συνδυάστηκε με βορικοναζόλη σε σύγκριση με τις αντίστοιχες μονοθεραπείες, το οποίο είναι σε συμφωνία με προηγούμενες *in vivo* μελέτες.^{7,37}

Η πιο πιθανή εξήγηση για την εμφάνιση συνέργειας είναι ότι η ανιτουλαφουγκίνη προάγει την είσοδο της βορικοναζόλης στα μυκητιακά κύτταρα, διαταράσσοντας την ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος, και όχι επειδή μειώνει την εκροή της αλληλεπιδρώντας με τις αντίστοιχες αντλίες. Μεταβολές στο κυτταρικό τοίχωμα μπορεί να επηρεάσουν την πρόσβαση των αντιμυκητιακών φαρμάκων στην κυτταρική μεμβράνη και τελικά στο κυτταρόπλασμα.³⁸ Κατά συνέπεια, απαιτείται μια ελάχιστη συγκέντρωση ανιτουλαφουγκίνης (δηλαδή, η MEC) ικανή να αλλοιώσει τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος και να αλληλεπιδράσει

συνεργικά με τη βορικοναζόλη. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις ανιτουλαφουγκίνης δεν επέτειναν τις συνεργικές αλληλεπιδράσεις, όπως θα αναμενόταν, αν η ανιτουλαφουγκίνη είχε μεταβάλει την εκροή της βορικοναζόλης, σε συμφωνία με ευρήματα που δείχνουν έλλειψη διασταυρούμενης αντοχής μεταξύ αυτών των δύο κατηγοριών αντιμυκητιακών φαρμάκων.³⁹ Ο ανταγωνισμός που βρέθηκε σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις ανιτουλαφουγκίνης θα μπορούσε να αποδοθεί στο παράδοξο φαινόμενο (paradoxical effect), κατά το οποίο παρατηρείται αυξημένη ανάπτυξη σε μεγάλες συγκεντρώσεις εχινοκανδινών λόγω της ενεργοποίησης της οδού διάσωσης του κυτταρικού τοιχώματος που προάγει τη σύνθεση χιτίνης και την επιβίωση των κυττάρων.⁴⁰ Η εν λόγω αντισταθμιστική αύξηση χιτίνης ενεργοποιείται σε συγκεντρώσεις παραπλήσιες της MEC στον *A. fumigatus*.⁴⁰ Η αποκατάσταση της ακεραιότητας του κυτταρικού τοιχώματος από την αυξημένη παραγωγή χιτίνης μπορεί να μειώσει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα βορικοναζόλης και να επιφέρει την αύξηση της μυκητιακής ανάπτυξης και κατ' επέκταση την εμφάνιση ανταγωνισμού.⁴¹

Οι *in vivo* μελέτες συνδυασμού βορικοναζόλης-ανιτουλαφουγκίνης σε πειραματικά ζωικά μοντέλα διηθητικής ασπεργίλλωσης έχουν κατά κύριο λόγο αναδείξει αυξημένα ποσοστά επιβίωσης συγκριτικά με τα αντίστοιχα των μονοθεραπειών.^{37,42} Σε ένα πειραματικό μοντέλο διηθητικής πνευμονικής ασπεργίλλωσης σε κουνέλια με παρατεταμένη ουδετεροπενία παρατηρήθηκαν δοσοεξαρτώμενες αλληλεπιδράσεις, συνεργικές όταν η βορικοναζόλη (10 mg/kg) συγχρηγήθηκε με τη χαμηλότερη δόση ανιτουλαφουγκίνης (5 mg/kg) και ανταγωνιστικές όταν συνδυάστηκε με την υψηλότερη δόση (10 mg/kg).⁷ Μάλιστα, το δοσολογικό σχήμα που επέφερε ανταγωνισμό σχετίστηκε με υψηλότερα επίπεδα γαλακτομαννάνης με την πάροδο της λοίμωξης από αυτά που προσδιορίστηκαν στη μονοθεραπεία βορικοναζόλης, όπως βρέθηκε και στην παρούσα μελέτη. Διερευνώντας την αποτελεσματικότητα του συνδυασμού σε μη ουδετεροπενικό μυϊκό μοντέλο διάσπαρτης ασπεργίλλωσης και χρησιμοποιώντας ένα ευρύ φάσμα δόσεων, παρατηρήθηκαν δοσοεξαρτώμενες αλληλεπιδράσεις με ισχυρή συνέργεια (15%) έναντι ευαίσθητων στις αζόλες στελεχών (MIC 0,25 mg/L) σε χαμηλές δόσεις (5 mg/kg) που αντιστοιχούσαν σε αναλογίες <10 AUC/MIC.⁴³ Στην κλινική πράξη, μια τυχαίοποιημένη, πολυκεντρική, ελεγχόμενη, συγκριτική μελέτη απέτυχε να τεκμηριώσει την υπεροχή του συνδυασμού 4 mg/kg q12h βορικοναζόλης με 100 mg q24h ανιτουλαφουγκίνης για τη θεραπεία πνευμονικής ασπεργίλλωσης σε αιματολογικούς ασθενείς (72% στη μονοθεραπεία βορικοναζόλης έναντι 80% στον συνδυασμό).⁵ Αυτό είναι σύμφωνο με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, όπου η συνδυαστική θεραπεία με 100 mg

ανιτοουλαφουγκίνης οδήγησε σε οριακά (1–2%) υψηλότερα ΠΕΣ απ' ό,τι η μονοθεραπεία βορικοναζόλης για στελέχη *A. fumigatus* με MEC ανιτοουλαφουγκίνης έως 0,016 mg/L, που απομονώνονται και συχνότερα. Ένα σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης το οποίο χρήζει περαιτέρω έρευνας σε κλινικό επίπεδο είναι ότι η χαμηλότερη δόση ανιτοουλαφουγκίνης (25 mg) επήγαγε σημαντικά υψηλότερα ΠΕΣ (6–12%) απ' ό,τι η μονοθεραπεία βορικοναζόλης. Η χαμηλή δόση θα οδηγήσει σε επίπεδα ελεύθερου φαρμάκου ακριβώς υπεράνω της MEC των στελεχών, μεγιστοποιώντας τις συνεργικές αλληλεπιδράσεις, ενώ σε υψηλότερες δόσεις θα παρατηρηθούν ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις. Αυτό είναι επίσης συμβατό με τον μηχανισμό αλληλεπίδρασης των δύο φαρμάκων, όπου απαιτούνται συγκεντρώσεις παραπλήσιες της MEC προκειμένου να διαταραχθεί το κυτταρικό τοίχωμα και να εμφανιστεί συνέργεια, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις δεν αυξάνουν περαιτέρω τις συνεργικές αλληλεπιδράσεις, αλλά προάγουν τις ανταγωνιστικές. Ένα επί πλέον ενδιαφέρον εύρημα της παρούσας μελέτης είναι το γεγονός ότι η μεγαλύτερη διαφορά (10–12%) στα ΠΕΣ βρέθηκε για μια συλλογή στελεχών με υψηλά ποσοστά αντοχής στις αζόλες (>10%). Στην πραγματικότητα, η συγκεκριμένη διαφορά είναι παρόμοια με τη διαφορά επιβίωσης (11%) που παρατηρήθηκε στην προαναφερόμενη κλινική μελέτη, όταν αναλύθηκε μόνο ένα υποσύνολο των ασθενών με θετική γαλακτομαννάνη και απεικονιστικά ευρήματα (73% στη μονοθεραπεία βορικοναζόλης έναντι 84% στον συνδυασμό).⁵ Δεδομένου ότι τα στελέχη δεν ήταν διαθέσιμα, δεν είναι γνωστό εάν το εν λόγω υποσύνολο των ασθενών μολύνθηκε με αζολο-ανθεκτικά στελέχη, μιας και πολλά από τα συμμετέχοντα κέντρα της μελέτης βρίσκονται στην Ευρώπη, όπου έχουν αναφερθεί ποσοστά αντοχής έως και 25%.⁴⁴ Το επίπεδο του ποσοστού αντοχής στις αζόλες >10% που προσδιορίστηκε στην παρούσα μελέτη προτάθηκε πρόσφατα από μια διεθνή επιτροπή γνωμοδότησης ως ουδός έναρξης εμπειρικής συνδυαστικής θεραπείας βορικοναζόλης με μια εχινοκανδίνη ή με λιποσωμιακή αμφοτερικίνη Β.⁴⁵

Η βέλτιστη δραστηριότητα συνδέθηκε με συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν σε 1,5 tC_{min}/MIC για τη μονοθεραπεία βορικοναζόλης, σε συμφωνία με προηγούμενες κλινικές μελέτες, όπου η αναλογία >2 ελάχιστα (trough) επίπεδα/MIC συσχετίστηκε με τη σχεδόν μέγιστη πιθανότητα ανταπόκρισης.⁴⁶ Εν τούτοις, το ίδιο αποτέλεσμα μπορεί να επέλθει με το συνδυαστικό σχήμα στην τιμή 0,75 του λόγου tC_{min}/MIC . Αυτό είναι ιδιαίτερα κρίσιμο κατά τις πρώτες ημέρες της θεραπείας, όταν τα επίπεδα της βορικοναζόλης δεν έχουν ακόμη σταθεροποιηθεί και ως εκ τούτου οι συγκεντρώσεις της ενδέχεται να είναι υποθεραπευτικές για μεγάλο χρονικό διάστημα.³ Η συνδυαστική θεραπεία μπορεί να ελαττώσει την εν λόγω περίοδο, δεδομένου ότι η αναλογία 0,75 tC_{min}/MIC θα επιτευχθεί νωρίτερα από εκείνη των 1,5 tC_{min}/MIC . Επί πλέον, ο υποδιπλασιασμός της τιμής της παραμέτρου tC_{min}/MIC είναι σημαντικός για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από στελέχη με μειωμένη ευαισθησία στη βορικοναζόλη. Συγκεκριμένα, στελέχη με MIC 4 mg/L θα απαιτούσαν υψηλά τοξικά επίπεδα βορικοναζόλης (6 mg/L)²⁷ στη μονοθεραπεία, ενώ με τη χορήγηση συνδυαστικής θεραπείας μπορεί να αντιμετωπιστούν στελέχη με MICs έως 4 mg/L, χωρίς να απαιτούνται δυνητικά τοξικές συγκεντρώσεις βορικοναζόλης.

Συνοψίζοντας, ο *in vitro* συνδυασμός βορικοναζόλης-ανιτοουλαφουγκίνης προσομοιώνοντας το φαρμακοκινητικό προφίλ τους στο ανθρώπινο πλάσμα ανέδειξε δοσο- και MIC-εξαρτώμενες συνεργικές και ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις. Τα ευρήματα της μελέτης υποδεικνύουν ότι η χαμηλή δόση ανιτοουλαφουγκίνης αναμένεται να ενισχύσει τη συνέργεια για τα περισσότερα στελέχη *A. fumigatus*, μειώνοντας παράλληλα το κόστος της συνδυαστικής αντιμυκητιακής θεραπείας. Τα ΠΕΣ των σχημάτων συνδυασμού ήταν σημαντικά υψηλότερα συγκριτικά με εκείνα της μονοθεραπείας, κυρίως για ποσοστά αντοχής στις αζόλες >10%. Τέλος, η παρακολούθηση των επιπέδων της βορικοναζόλης στον ορό θα συμβάλει στην αποτελεσματικότητα της συνδυαστικής θεραπείας για την αντιμετώπιση της αζολο-ανθεκτικής ασπεργίλλωσης, ιδιαίτερα σε ασθενείς με υποθεραπευτικές συγκεντρώσεις.

ABSTRACT

Dose optimization of the combination of voriconazole-anidulafungin against *Aspergillus fumigatus*: Clinical implications for azole-resistant aspergillosis

M. SIOPI, N. SIAFAKAS, S. VOURLI, L. ZERVA, J. MELETIADIS

Laboratory of Clinical Microbiology, "Attikon" University General Hospital, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2016, 33(6):768–781

OBJECTIVE Combination therapy of voriconazole with an echinocandin is often administered to increase the efficacy of voriconazole monotherapy, particularly against azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates and in patients

with subtherapeutic serum levels. The aim of this study was to investigate the pharmacodynamic effects of the combination of voriconazole-anidulafungin against *A. fumigatus*, including azole-resistant strains, using a validated *in vitro* pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) model for determining target serum levels of combination regimens. **METHOD** Four clinical *A. fumigatus* isolates with different *in vitro* susceptibility to voriconazole (MIC 0.125–2 mg/L) and anidulafungin (MEC 0.008–0.015 mg/L) were tested in an *in vitro* PK/PD model simulating human serum free concentrations of standard dosages of antifungals. Fungal growth was assessed using galactomannan production and drug concentrations were determined by bioassay. Pharmacodynamic interactions were assessed using the Bliss independence analysis (BI) and the Loewe additivity-based canonical mixture response-surface non-linear regression analysis (LA). Target attainment rates (TAR) were estimated with Monte Carlo analysis for different doses of anidulafungin (25 mg, 50 mg and 100 mg) and for centers with increasing azole-resistance rates (5–25%). **RESULTS** Synergy [BI 51 (8–80%), LA 0.63 (0.38–0.79)] was found at low anidulafungin and voriconazole exposures ($fC_{max}/MIC < 10$), while antagonism [BI 12 (5–18%), LA 1.12 (1.04–4.6)] was found at higher exposures. The largest increase in TAR was found with 25 mg of anidulafungin and voriconazole MIC distributions with high (>10%) resistant rates. The TAR for isolates with voriconazole MICs ≤ 1 , 2 and ≥ 4 mg/L were $\geq 78\%$, 12% and 0% with voriconazole monotherapy and 96–100%, 68–82%, 9–20% with combination therapy, respectively. Optimal activity was associated a tC_{min}/MIC ratio of 3 for voriconazole monotherapy and 1.5 for combination therapy. **CONCLUSIONS** A low dose of anidulafungin may increase efficacy and reduce the costs of combination therapy.

Key words: Anidulafungin, *Aspergillus fumigatus*, Azole resistance, Combination therapy, Voriconazole

Βιβλιογραφία

1. LEROUX S, ULLMANN AJ. Management and diagnostic guidelines for fungal diseases in infectious diseases and clinical microbiology: Critical appraisal. *Clin Microbiol Infect* 2013, 19:1115–1121
2. VAN DER LINDEN JW, SNELDERS E, KAMPINGA GA, RIJNDERS BJ, MATSSON E, DEBETS-OSSENKOPP YJ ET AL. Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007–2009. *Emerg Infect Dis* 2011, 17:1846–1854
3. KARTHAUS M, LEHRNBECHER T, LIPP HP, KLUGE S, BUCHHEIDT D. Therapeutic drug monitoring in the treatment of invasive aspergillosis with voriconazole in cancer patients – an evidence-based approach. *Ann Hematol* 2015, 94:547–556
4. MIKULSKA M, VISCOLI C. Current role of echinocandins in the management of invasive aspergillosis. *Curr Infect Dis Rep* 2011, 13:517–527
5. MARR KA, SCHLAMM HT, HERBRECHT R, ROTTINGHAUS ST, BOW EJ, CORNELLY OA ET AL. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis: A randomized trial. *Ann Intern Med* 2015, 162:81–89
6. MELETIADIS J, TE DORSTHORST DT, VERWEIJ PE. The concentration-dependent nature of *in vitro* amphotericin B-itraconazole interaction against *Aspergillus fumigatus*: Isobolographic and response surface analysis of complex pharmacodynamic interactions. *Int J Antimicrob Agents* 2006, 28:439–449
7. PETRAITIS V, PETRAITIENE R, HOPE WW, MELETIADIS J, MICKIENE D, HUGHES JE ET AL. Combination therapy in treatment of experimental pulmonary aspergillosis: *In vitro* and *in vivo* correlations of the concentration- and dose-dependent interactions between anidulafungin and voriconazole by Bliss independence drug interaction analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, 53:2382–2391
8. SIOPI M, SIAFAKAS N, VOURLI S, ZERVA L, MELETIADIS J. Optimization of polyene-azole combination therapy against aspergillosis using an *in vitro* pharmacokinetic-pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 2015, 59:3973–3983
9. MAVRIDOU E, BRUGGEMANN RJ, MELCHERS WJ, VERWEIJ PE, MOUTON JW. Impact of *cyp51A* mutations on the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of voriconazole in a murine model of disseminated aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, 54:4758–4764
10. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *M38-A2: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard*. Second edition. Wayne, PA, USA, 2008, 28:1–35
11. SIOPI M, MAVRIDOU E, MOUTON JW, VERWEIJ PE, ZERVA L, MELETIADIS J. Susceptibility breakpoints and target values for therapeutic drug monitoring of voriconazole and *Aspergillus fumigatus* in an *in vitro* pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *J Antimicrob Chemother* 2014, 69:1611–1619
12. LIU P, RUHNKE M, MEERSSEMAN W, PAIVA JA, KANTECKI M, DAMLE B. Pharmacokinetics of anidulafungin in critically ill patients with candidemia/invasive candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2013, 57:1672–1676
13. PURKINS L, WOOD N, GHAHRAMANI P, GREENHALGH K, ALLEN MJ, KLEINERMANS D. Pharmacokinetics and safety of voriconazole following intravenous- to oral-dose escalation regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, 46:2546–2553
14. SIOPI M, GAMALETSSOU M, SIPSAS N, PIROUNAKI M, STAMOULI M, ZERVA L ET AL. Determination of voriconazole levels in serum of hematological patients with a microbiological assay. *Bull Hell Soc Microbiol* 2013, 58:1–9
15. MELETIADIS J, AL-SAIGH R, VELEGRAKI A, WALSH TJ, ROILIDES E,

- ZERVA L. Pharmacodynamic effects of simulated standard doses of antifungal drugs against *Aspergillus* species in a new *in vitro* pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 2012, 56:403–410
16. MELETIADIS J, STERGIOPOULOU T, O'SHAUGHNESSY EM, PETER J, WALSH TJ. Concentration-dependent synergy and antagonism within a triple antifungal drug combination against *Aspergillus* species: Analysis by a new response surface model. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 51:2053–2064
 17. MELETIADIS J, PETRAITIS V, PETRAITIENE R, LIN P, STERGIOPOULOU T, KELAHER AM ET AL. Triazole-polyene antagonism in experimental invasive pulmonary aspergillosis: *In vitro* and *in vivo* correlation. *J Infect Dis* 2006, 194:1008–1018
 18. WIEDERHOLD NP, KONTOYIANNIS DP, CHI J, PRINCE RA, TAM VH, LEWIS RE. Pharmacodynamics of caspofungin in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis: Evidence of concentration-dependent activity. *J Infect Dis* 2004, 190:1464–1471
 19. PFALLER MA, BOYKEN L, HOLLIS RJ, KROEGER J, MESSER SA, TENDOLKAR S ET AL. *In vitro* susceptibility of clinical isolates of *Aspergillus* spp to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: A head-to-head comparison using the CLSI M38-A2 broth microdilution method. *J Clin Microbiol* 2009, 47:3323–3325
 20. ANTACHOPOULOS C, MELETIADIS J, SEIN T, ROILIDES E, WALSH TJ. Comparative *in vitro* pharmacodynamics of caspofungin, micafungin, and anidulafungin against germinated and non-germinated *Aspergillus* conidia. *Antimicrob Agents Chemother* 2008, 52:321–328
 21. LIU P. Population pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of anidulafungin in adult patients with fungal infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2013, 57:466–474
 22. ANDES D, DIEKEMA DJ, PFALLER MA, PRINCE RA, MARCHILLO K, ASHBECK J ET AL. *In vivo* pharmacodynamic characterization of anidulafungin in a neutropenic murine candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2008, 52:539–550
 23. LIU P, MOULD DR. Population pharmacokinetic analysis of voriconazole and anidulafungin in adult patients with invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2014, 58:4718–4726
 24. ELEFANTI A, MOUTON JW, VERWEIJ PE, ZERVA L, MELETIADIS J. Susceptibility breakpoints for amphotericin B and *Aspergillus* species in an *in vitro* pharmacokinetic-pharmacodynamic model simulating free-drug concentrations in human serum. *Antimicrob Agents Chemother* 2014, 58:2356–2362
 25. ESPINEL-INGROFF A, DIEKEMA DJ, FOTHERGILL A, JOHNSON E, PELAEZ T, PFALLER MA ET AL. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *J Clin Microbiol* 2010, 48:3251–3257
 26. ROFFEY SJ, COLE S, COMBY P, GIBSON D, JEZEQUEL SG, NEDDERMAN AN ET AL. The disposition of voriconazole in mouse, rat, rabbit, guinea pig, dog, and human. *Drug Metab Dispos* 2003, 31:731–741
 27. PASCUAL A, CALANDRA T, BOLAY S, BUCLIN T, BILLE J, MARCHETTI O. Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin Infect Dis* 2008, 46:201–211
 28. JEANS AR, HOWARD SJ, AL-NAKEEB Z, GOODWIN J, GREGSON L, WARN PA ET AL. Combination of voriconazole and anidulafungin for treatment of triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* in an *in vitro* model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2012, 56:5180–5185
 29. PLANCHE V, DUCROZ S, ALANIO A, BOUGNOUX ME, LORTHOLARY O, DANNAOUI E. *In vitro* combination of anidulafungin and voriconazole against intrinsically azole-susceptible and -resistant *Aspergillus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2012, 56:4500–4503
 30. FURUSTRAND TAFIN U, ORASCH C, TRAMPUZ A. Activity of antifungal combinations against *Aspergillus* species evaluated by isothermal microcalorimetry. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013, 77:31–36
 31. PHILIP A, ODABASI Z, RODRIGUEZ J, PAETZNICK VL, CHEN E, REX JH ET AL. *In vitro* synergy testing of anidulafungin with itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against *Aspergillus* spp and *Fusarium* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49:3572–3574
 32. SEYEDMOUSAVI S, MELETIADIS J, MELCHERS WJ, RIJS AJ, MOUTON JW, VERWEIJ PE. *In vitro* interaction of voriconazole and anidulafungin against triazole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013, 57:796–803
 33. KRISHNAN-NATESAN S, WU W, CHANDRASEKAR PH. *In vitro* efficacy of the combination of voriconazole and anidulafungin against voriconazole-resistant *cyp51A* mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012, 73:135–137
 34. PERKHOFER S, JOST D, DIERICH MP, LASS-FLÖRL C. Susceptibility testing of anidulafungin and voriconazole alone and in combination against conidia and hyphae of *Aspergillus* spp under hypoxic conditions. *Antimicrob Agents Chemother* 2008, 52:1873–1875
 35. AL-SAIGH R, ELEFANTI A, VELEGRAKI A, ZERVA L, MELETIADIS J. *In vitro* pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of voriconazole activity against *Aspergillus* species in a new *in vitro* dynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 2012, 56:5321–5327
 36. MELETIADIS J, VERWEIJ PE, TEDORSTHORST DT, MEIS JF, MOUTON JW. Assessing *in vitro* combinations of antifungal drugs against yeasts and filamentous fungi: Comparison of different drug interaction models. *Med Mycol* 2005, 43:133–152
 37. VAN DE SANDE WW, MATHOT RA, TEN KATE MT, VAN VIANEN W, TAVAKOL M, RIJNDERS BJ ET AL. Combination therapy of advanced invasive pulmonary aspergillosis in transiently neutropenic rats using human pharmacokinetic equivalent doses of voriconazole and anidulafungin. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, 53:2005–2013
 38. GALE EF. Nature and development of phenotypic resistance to amphotericin B in *Candida albicans*. *Adv Microb Physiol* 1986, 27:277–320
 39. BACHMANN SP, PATTERSON TF, LÓPEZ-RIBOT JL. *In vitro* activity of caspofungin (MK-0991) against *Candida albicans* clinical isolates displaying different mechanisms of azole resistance. *J Clin Microbiol* 2002, 40:2228–2230
 40. WALKER LA, LEE KK, MUNRO CA, GOW NA. Caspofungin treatment of *Aspergillus fumigatus* results in ChsG-dependent upregula-

- tion of chitin synthesis and the formation of chitin-rich microcolonies. *Antimicrob Agents Chemother* 2015, 59:5932–5941
41. WALKER LA, MUNRO CA, DE BRUIJN I, LENARDON MD, MCKINNON A, GOW NA. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS Pathog* 2008, 4:e1000040
42. GALIGER C, BROCK M, JOUVION G, SAVERS A, PARLATO M, IBRAHIM-GRANET O. Assessment of efficacy of antifungals against *Aspergillus fumigatus*: Value of real-time bioluminescence imaging. *Antimicrob Agents Chemother* 2013, 57:3046–3059
43. SEYEDMOUSAVI S, BRÜGGEMANN RJ, MELCHERS WJ, RIJS AJ, VERWEIJ PE, MOUTON JW. Efficacy and pharmacodynamics of voriconazole combined with anidulafungin in azole-resistant invasive aspergillosis. *J Antimicrob Chemother* 2013, 68:385–393
44. VAN DER LINDEN JW, ARENDRUP MC, WARRIS A, LAGROU K, PELLOUX H, HAUSER PM ET AL. Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerg Infect Dis* 2015, 21:1041–1044
45. VERWEIJ PE, ANANDA-RAJAH M, ANDES D, ARENDRUP MC, BRÜGGEMANN RJ, CHOWDHARY A ET AL. International expert opinion on the management of infection caused by azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resist Updat* 2015, 21-22:30–40
46. TROKE PF, HOCKEY HP, HOPE WW. Observational study of the clinical efficacy of voriconazole and its relationship to plasma concentrations in patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, 55:4782–4788

Corresponding author:

J. Meletiadis, Clinical Microbiology Laboratory, "Attikon" University General Hospital, 1 Rimini street, GR-124 62 Haidari, Greece
e-mail: jmeletiadis@med.uoa.gr

.....