

# Liposomski antibiotici

---

**Buljan, Antonela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:482528>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-30**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Antonela Buljan**

# **Liposomski antibiotici**

## **DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Oblikovanje lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Željke Vanić.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Željki Vanić na stručnom vodstvu, strpljenju, pomoći i savjetima tijekom pisanja diplomskog rada.

Hvala mojoj obitelji na potpori tijekom studiranja kojom su mi olakšali ovih pet godina fakulteta. Zahvaljujem se Ianu čija mi je ljubav i potpora uljepšala akademski život te svim prijateljima s kojima sam kroz smijeh i međusobno razumijevanje uspjela ostvariti sve svoje akademske obaveze.

# SADRŽAJ

1.UVOD .....	1
1.1. ANTIMIKROBNA REZISTENCIJA.....	1
1.2. MEHANIZMI REZISTENCIJE .....	4
1.3. NOVI PRISTUPI U TRETIRANJU INFEKCIJA UZROKOVANIH REZISTENTNIM BAKTERIJAMA.....	7
1.4. LIPOSOMI KAO NOSAČI LIJEKOVA.....	13
2.OBRAZLOŽENJE TEME.....	15
3.MATERIJALI I METODE.....	16
4.RASPRAVA.....	17
4.1. LIPOSOMSKI ANTIBIOTICI ZA PARENTERALNU PRIMJENU.....	17
4.2. LIPOSOMSKI ANTIBIOTICI ZA LIJEČENJE PLUĆNIH INFEKCIJA .....	22
4.3. LIPOSOMSKI ANTIBIOTICI ZA TOPIKALNU PRIMJENU.....	28
5.ZAKLJUČAK.....	31
6.LITERATURA.....	32
7.SAŽETAK.....	37
8.SUMMARY.....	38
9. PRILOZI.....	39

# 1.UVOD

## 1.1. ANTIMIKROBNA REZISTENCIJA

Liječenje bakterijskih infekcija prije pojave prvih antibiotika je bilo poprilično teško i većinom bezuspješno. Prvi antibiotik, penicilin, otkriven 1928. godine zaslugom Alexandra Fleminga, je uvelike pridonio liječenju bakterijskih infekcija i novih spoznaja u medicini. Počeci sintetske proizvodnje antibiotika vežu se uz Gerharda Domagka koji je 1935. godine sintetizirao prvi sulfonamid, prontosil, za učinkovito liječenje streptokoknih infekcija. Od početnih otkrića pa do danas otkriveno je više skupina antibiotika koje su značajno doprinijele liječenju infektivnih bolesti smanjujući stopu smrtnosti. Antibiotici su većinom relativno male molekule koje antibakterijski učinak ostvaraju na dva načina, bakteriostatski ili baktericidno. Unatoč brzom razvoju, otkrića novih antibiotika su se usporila, te od 1987. godine nije otkriven niti jedan novi antibiotik. Nažalost, neracionalna uporaba antibiotika s vremenom je dovela do postupnog razvoja rezistencije bakterija na antibiotike (Ferri i sur., 2015).

Antimikrobna rezistencija je tijekom zadnja dva desetljeća postala jedna od glavnih prepreka učinkovitoj antimikrobnoj terapiji. Prema istraživanju Američkog centra za kontrolu i prevenciju bolesti (*Centers for Disease Control and Prevention, CDC*) u Sjedinjenim Američkim državama (SAD) je u 2019. godini zabilježeno 2,8 milijuna infekcija rezistentnih na antibiotike pri čemu je umrlo više od 35.000 ljudi te su u istraživanju izdvojeni određeni mikroorganizmi kao prijetnje zbog svoje rezistencije na antibiotike (Tablica 1). Nadalje, potvrđeno je 223.900 slučajeva infekcija s *Chlostridium difficile* u 2017. godini, a umrlo je 12.800 ljudi (CDC, 2019). Svjetska zdravstvena organizacija (*World Health Organization, WHO*) je 2019. godine objavila da je minimalno 700.000 ljudi umrlo kao posljedica infekcija rezistentnih na antibiotike ili kombinacije antibiotika. Na internet stranici WHO-a je objavljeno predviđanje Međuagencijske koordinacijske skupine Ujedinjenih naroda koje prikazuje da bi infekcije rezistentne na lijekove mogle uzrokovati 10 milijuna smrti svake godine do 2050. ako ne dođe do promjena koje bi smanjile problem bakterijske rezistencije. WHO je 2015. godine izdala priručnik o globalnom planu rješavanja antimikrobne rezistencije. Navodi se pet koraka koji bi se trebali provoditi: (i) povećanje svijesti i razumijevanja antimikrobne rezistencije, (ii) otkrivanje novih spoznaja o rezistenciji, (iii) prevencija infekcija, (iv) racionalna primjena antibiotika i (v) ulaganje u nove lijekove, dijagnostiku i cjepiva (WHO, 2015).

Postoje dva glavna problema koja utječu na učinkovitost antibiotika. Prvi problem je da će se uporabom novog antibiotika brzo razviti rezistencija. Drugi problem je da postoji veliki

vremenski razmak između sve veće rezistencije i otkrića novih molekula. Brzina otkrića i razvoja novog antibiotika je sporija u odnosu na brzinu širenja mehanizama rezistencije među bakterijama. Ta razlika je nastala zbog toga što farmaceutske industrije sve manje ulažu u sintezu i razvoj novih antimikrobnih lijekova. Razlog manjeg ulaganja se nalazi u tome da za uspješno stavljanje jednog antimikrobnog lijeka na tržište treba 10-15 godina po djelatnoj tvari i cijena se kreće između 800 i 900 milijuna dolara (Monnet, 2005).

Uzroci antimikrobne rezistencije su nepravilna, prečesta ili pogrešna primjena antimikrobnih lijekova kod ljudi i životinja. Infekcija s uzročnikom rezistentnim na antimikrobni lijek dovodi do smanjene kvalitete života, rekurentnih infekcija, razvoja kronične bolesti i budućih oportunističkih infekcija. Osim uzroka rezistencije zbog pogrešne primjene antibiotika kod ljudi, sve se više istražuje neodgovorna i povećana primjena antibiotika kod životinja. Primjenom najčešće manjih doza od terapijske kako bi se postigla profilaksa i potaknuli promotori rasta kod zdravih životinja dovelo je do povećanja rezistencije na neke patogene koji se mogu prenjeti na ljude (Hamer, 2002; Ferri i sur., 2015).

Humani mikrobiom je jedan od važnih mjesta gdje se može razviti antimikrobna rezistencija zbog svog kompleksnog sustava sastavljenog od trilijuna mikroba koji su u interakciji i izloženi rezistentnim uzročnicima. Mikrobiom je izložen vanjskom učinku, hrani koju unosimo i lijekovima. Rezistencija se može potaknuti prenošenjem rezistentnih gena kroz mikrobiom. Kao crijevni mikrobiom i oralni mikrobiom može biti potencijalni rezervoar rezistentnih gena. Oralni mikrobiom može sadržavati gene rezistentne na tetraciklin (e.g., tet(M), tet(O), tet(Q), and tet(W)), amoksicilin i eritromicin. Streptokok može biti nosač rezistencije u usnoj šupljini djece pokazujući rezistenciju na penicilin (Brinkac i sur., 2017).

Tablica 1. Popis mikroorganizama navedenih kao prijetnje za zdravstvenu skrb prema intenzitetu razvoja rezistencije. Prilagođeno iz članka Američkog centra za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC, 2019).

<b>Najveće prijetnje</b>	<b>Umjerene prijetnje</b>	<b>Rastuće prijetnje</b>	<b>Moguće prijetnje</b>
klindamicin- i metronidazol-rezistentna <i>Clostridioides difficile</i>	ciprofloksacin- i azitromicin-rezistentan <i>Campylobacter jejuni</i>	na eritromicin rezistentna grupa A <i>Streptococcus</i>	na makrolide rezistentna <i>Mycoplasma genitalium</i>
flukonazol-rezistentna <i>Candida auris</i>	na azolne antifungalne lijekove rezistentna <i>Candida glabrata</i>	na klindamicin rezistentan streptokok grupe B	na azole rezistentan <i>Aspergillus fumigatus</i>
karbapenem-rezistentan <i>Acinetobacter</i>	penicilin- i cefalosporin-rezistentne <i>Enterobacteriaceae</i>		
karbapenem-rezistentne <i>Enterobacteriaceae</i>	na makrolide-rezistentan <i>Streptococcus pneumoniae</i>		
sulfonamid-, tetraciklin- i penicilin-rezistentna <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	meticilin-rezistentan <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)		
	ceftriakson- i ampicilin-rezistentna <i>netifusna salmonela</i>		
	karbapenem-rezistentan <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
	vankomicin-rezistentan <i>Enterococcus faecium</i>		

## 1.2. MEHANIZMI REZISTENCIJE

Sposobnost rezistencije može biti urođena ili intrinzično povezana s anatomijom i fiziologijom mikroorganizma koji raznim mehanizmima razvija rezistenciju. Najčešći način postizanja rezistencije je kroz mutaciju i preuzimanje genetičkog materijala horizontalnim prijenosom od okolnih bakterija. Mutacije su relativno rijetke, odvijaju se otprilike u 1 od 10 bakterijskih stanica. Problem se nalazi u tome što bakterije imaju veliku brzinu umnažanja pa one koje imaju mutirani gen će vrlo brzo širiti rezistenciju. Horizontalnim prijenosom, geni rezistentni na lijekove se lako šire među bakterijama pomoću plazmida. Gram-negativne bakterije prenose gene transdukcijom. Plazmidi se smatraju najučinkovitijim mehanizmom prijenosa rezistencije jer se mogu prenositi i u vertikalnom i u horizontalnom smjeru (Ferri i sur., 2015).

Osim dobro poznatih mehanizama intercelularnog prijenosa genetskog materijala vertikalnog tipa (mutacije) ili horizontalnog tipa (transformacije, transdukcije i konjugacije), postoje i drugi načini razvoja rezistencije povezani s učinkom molekule lijeka na bakterijsku stanicu. Mehanizmi rezistencije na antimikrobne lijekove uključuju: efluks pumpe, enzimsku razgradnju antibakterijskih lijekova (beta-laktamaze), nove metaboličke puteve, izmjenu ciljnih proteina i promjene u permeabilnosti membrane bakterija (Ferri i sur., 2015).

Rezistencija uzrokovana mutacijom se temelji na promjeni bakterijske stanice unutar određene populacije. Dolazi do mutacije u genima na koje djeluje lijek te se time omogućuje preživljavanje bakterije. Nakon što antibiotik uništi bakterije koje nisu rezistentne, ove rezistentne će prevladati i razmnožiti se (Munita, 2016).

Utjecaj bakterijskih enzima na molekule antibiotika može dovesti do promjene strukture antibiotika ili raspada molekule. Proizvodnjom enzima dolazi do kemijskih promjena u antimikrobnoj molekuli kao što su: acetilacija (aminoglikozidi, kloramfenikol), fosforilacija (aminoglikozidi) i adenilacija (aminoglikozidi, linkozamidi). Promjenom strukture dolazi do smanjenja koncentracije lijeka na mjestu djelovanja i slabljenja učinka. Najpoznatiji enzim koji uzrokuje raspad molekule antibiotika je beta laktamaza koja kida amidnu vezu u beta laktamskom prstenu i time inhibira djelovanje penicilina (Munita, 2016).

Promjenom permeabilnosti u membrani štite se bakterije na koje antibiotici djeluju u unutrašnjosti bakterijske stanice. Antibiotik mora penetrirati u citoplazmu kako bi ostvario svoje djelovanje. Promjene u permeabilnosti vanjske membrane bakterija posebno utječu na hidrofilne molekule kao što su beta-laktami, tetraciklini i flourokinoloni zbog sklonosti korištenja difuzijskih kanala ispunjenih vodom zvanih porini. *P. aeruginosa* je rezistentan na



ove antibiotike jer reducira broj porina i time otežava ulazak u stanicu prethodno navedenih antibiotika (Munita, 2016).

Efluks pumpe su kompleksne sastavnice koje izbacuju antibiotik iz bakterijske stanice rezultirajući rezistencijom bakterija na antibiotike. Primjer se može vidjeti u bakteriji *Echerichiae coli* čije efluks pumpe izbacuju tetraciklin iz citoplazme. Efluks pumpe mogu biti specifične prema supstratu (za točno određen antibiotik) ili širok spektar supstrata što se često može naći u bakterijama rezistentnim na više antibiotika (Munita, 2016; Ferri, 2015).

Promjenom ili zaštitom mjesta djelovanja antibiotika, bakterije smanjuju afinitet za molekulu antibiotika ili sprječavaju vezanje antibiotika za određene strukture u bakterijskoj stanici. Primjer je rezistencija na rifampicin pri čemu se mutacijom jedne aminokiseline u veznom mjestu za rifampicin smanjio afinitet za njegovo vezanje u DNA-ovisnoj RNA polimerazi (Munita, 2016).

Rezistencija na određeni lijek nije uzrokovana isključivo jednim mehanizmom. Kod fluorokinolona se rezistencija može razviti na tri načina: mutacijom gena koji kodira mjesto vezanja lijeka (topoizomeraza IV), povećanom ekspresijom efluks pumpi i zaštitom mjesta vezanja lijeka (Munita, 2016)

## **Biofilm**

Biofilm predstavlja imobiliziranu koloniju mikroorganizama zaštićenih s matriksom proizvedenim od polimernih supstancija (polisaharidi, nukleinske kiseline i proteini). Matriks je kompleksna i heterogena struktura kroz koju prolaze kanali za prijenos vode i nutrijenata. Struktura i sastav biofilma ovisi o: površinskim svojstvima, dostupnosti nutrijenata i mikrobiološkim činiteljima (Flemming i Wingender, 2010).

Stvaranje biofilma na čvrstoj površini je proces koji se odvija u više koraka. Površina se oblaže s makromolekulama iz vodene okoline čime se omogućuje adhezija mikroorganizama. Iduća faza je formiranje čvrstih i ireverzibilnih veza s površinom, popraćeno proliferacijom i agregacijom mikroorganizama u višestanične ili višeslojne nakupine. Nakupine aktivno stvaraju izvanstanični matriks. Neke stanice se mogu odvajati iz biofilma i postati izvor za nove mikrokolonije. Rast i sazrijevanje biofilma reguliran je intercelularnom komunikacijom preko kemijskih signala zvanih „*quorum sensing*“. Ti signali utječu na gustoću stanice, ekspresiju gena, rezistenciju na stres i proizvodnju faktora virulencije (Hall-Stoodley i sur., 2004)

Pojava biofilmova vezana je uz kronične i bolničke infekcije te infekcije vezane za medicinske proizvode (umjetni zalisci, kateteri, intrauterini uređaji). Može se razviti i u zdravom i u

nekrotičnom tkivu te na ugrađenim materijalima. Povezuje se s visokom razinom rezistencije na antibiotike te povećanim mortalitetom. Više od 60% bolničkih infekcija nastaju zbog stvaranja biofilma na medicinskim proizvodima. Primjerice, korištenje katetera u SAD-u rezultiralo je razvojem infekcija kod 900.000 prijema u jednoj godini, a cijena iznosila je 28.000 dolara po pacijentu (Forier i sur., 2014).

Postoji nekoliko različitih stanja koja mogu biti uzrokovana pojavom biofilma, kao što su: rekurentne urinarne infekcije, prostatitis, kronične rane koje ne mogu zacijeliti, kronične infekcije pluća kod cistične fibroze i kronični otitis (Rukavina i Vanić, 2016).

Infekcije uzrokovane biofilmom se sporo razvijaju na jednom ili više žarišta. Mogu trajati mjesecima ili godinama, često s izmjenom stanja akutnih egzacerbacija i izostajanja kliničkih simptoma. Infekcije su manje agresivne od akutnih, ali je liječenje puno zahtjevnije. Povećana tolerancija biofilma na antibiotike je povezana s izvanstaničnim polimernim glikokaliksiom, većinom anionske prirode, koji otežava i usporava difuziju antibiotika. Izvanstanični matriks ima uvjete prikladne za nakupljanje velike količine enzima koji inaktiviraju antibiotike. Mutacija i horizontalni prijenos gena su povećane u biofilmu što objašnjava zašto mikroorganizmi koji formiraju biofilm mogu biti otporni na više lijekova. Svi navedeni mehanizmi rezistencije biofilma upućuju na nezadovoljavajuću antibiotsku terapiju i potrebu pronalaska rješenja za potpunu eradikaciju (Donlan i Costerton, 2001).

Metode suzbijanja pojave i rasta biofilma uključuju: prevenciju i minimalizaciju formiranja biofilma pomoću antiadhezivnih materijala, ultrazvučne i kirurške zahvate, ometanje signala u biofilmu te penetraciju i dostavu lijeka u biofilm pomoću elektromagnetskog polja (Rukavina i Vanić, 2016).

Važnu ulogu za učinkovitu dostavu lijeka kod infekcija povezanih s biofilmom ima nanotehnologija. Korištenjem polimernih, lipidnih i anorganskih nanočestica omogućuje se bolja i učinkovitija dostava antibiotika do bakterijskih stanica povećavajući time učinkovitost terapije (Rukavina i Vanić, 2016).

### **1.3. NOVI PRISTUPI U TRETIRANJU INFEKCIJA UZROKOVANIH REZISTENTNIM BAKTERIJAMA**

Razvoj novih antimikrobnih djelatnih tvari uključujući procese pretkliničkih i kliničkih ispitivanja je jako dugotrajan te zahtijeva značajna financijska ulaganja. Stoga je veliki dio istraživanja u tom području usmjeren na poboljšanja fizičko-kemijskih i farmakokinetičkih svojstava postojećih lijekova, bilo kemijskim modifikacijama molekula djelatnih tvari, formiranjem novih formulacija lijekova uklapanjem/vezanjem djelatne tvari za odgovarajući mikro- ili nano-nosač.

#### Antimikrobni peptidi

Prvi antimikrobni peptidi su otkriveni u vrijeme otkrića penicilina, ali su zbog toksičnosti i složenije proizvodnje zanemareni. Povećanom rezistencijom na konvencionalne antibiotike povećao se interes za antimikrobne peptide. Dok je djelovanje konvencionalnih antibiotika usmjereno samo na bakterije, antimikrobni peptidi pokazuju antimikrobnu aktivnost prema bakterijama, virusima, gljivicama i parazitima, premda svaki od njih ima nekog uzročnika na kojeg specifično djeluje, odnosno pokazuje veći učinak (Fry, 2018). Antimikrobni peptidi koji se trenutno nalaze u kliničkoj primjeni za liječenje rezistentnih uzročnika su navedeni u Tablici 2.

Antimikrobne peptide mogu proizvoditi biljke, gljivice i populacije eukariotskih stanica čime se dobiva veliki broj peptida za istraživanja. Identificirano je više od 2000 različitih prirodnih i više od 100 humanih antimikrobnih peptida koji imaju veliki potencijal za proizvodnju sintetskih antimikrobnih peptida te se dio njih nalazi i u kliničkim ispitivanjima (Tablica 3) (Fry, 2018).

Za razliku od konvencionalnih antibiotika (npr. penicilini) koji su najčešće sastavljeni od ugljika, dušika i sulfata, antimikrobni peptidi su amfipatske molekule te sadrže 5 do 50 aminokiselina i imaju sekundarnu alfa uzvojniju ili beta-nabranu ploču. Većina antimikrobnih peptida su kationi koji se vežu elektrostatskim vezama za anionske mete specifičnih mikroorganizama. Vezanjem za anionsku metu na bakterijama dolazi do oštećenja membrane, povećane penetracije i depolarizacije te ekstrasvazacije intracelularnih proteina. Sve navedene promjene uzrokuju propadanje bakterijske stanice. Takav mehanizam djelovanja potvrđen je kod sepse uzrokovane Gram-negativnim bakterijama gdje je meta kationskih antimikrobnih

peptida lipopolisaharidni sloj bakterija. Antimikrobni peptidi specifični za Gram-pozitivne bakterije imaju anionske mete na peptidoglikanu ili lipoteikoičnoj kiselini (Fry, 2018).

*S. aureus* sadrži 80% fosfatidilglicerola na svojoj membrani koji je negativnog naboja na površini te je stoga ujedno i meta za djelovanje kationskih antimikrobnih peptida. Specifičnost kationskih antimikrobnih peptida za anionske mete ne utječe na zwitter ione i fosfolipide u ljudskom organizmu jer se negativno nabijena strana membrane nalazi u unutrašnjosti pa se time štiti od učinka kationskih antimikrobnih peptida. Postoje i anionski antimikrobni peptidi kao npr. dermcidin koji se nalazi u znoju i regulira bakterijsku kolonizaciju kože. Antibakterijsko djelovanje antimikrobnih peptida unutar stanice se temelji na inhibiciji sinteze DNA, RNA i proteina (Fry, 2018).

Primjena antimikrobnih peptida je raznolika i doprinosi rješavanju infekcija. Kao primjer se mogu istaknuti glikopeptidi i lipopeptidi koji su antimikrobni peptidi za primjenu kod infekcija kože i mekih tkiva koje se često razvijaju kao posljedica operativnog zahvata. Antimikrobni peptidi su se pokazali učinkoviti i za liječenje meticilin-rezistentnog *S. aureus*-a (MRSA). Kationski peptidi su posebni po tome što mogu proći kroz matriks biofilma i time ostvariti svoje djelovanje. Bakterije koje formiraju biofilm se mogu nalaziti u kateterima i ventilatorima koji se primjenjuju u bolnicama pa su česte infekcije mokraćnog mjehura ili pluća kod pacijenata. Antimikrobni peptidi bi mogli biti rješenje za ovaj problem te se trenutno proučavaju mogućnosti njihove primjene (Fry, 2018). Potencijalni nedostaci antimikrobnih peptida su: nedostatna istraživanja na animalnim modelima, stabilnost tijekom skladištenja, farmakokinetički problemi povezani sa slabijom apsorpcijom i brzom razgradnjom, upitna toksičnost/sigurnost primjene, poteškoće u oblikovanju formulacija i visoka cijena proizvodnje (Fry, 2018).

Tablica 2. Antimikrobni peptidi koji se nalaze u kliničkoj primjeni. Prilagođeno iz Fry (2018).

<b>Antimikrobni lijek</b>	<b>Meta djelovanja</b>	<b>Svojstva lijeka</b>
bacitracin	Gram-pozitivne bakterije	ciklički peptid za topikalnu primjenu, vrlo toksičan kod sistemske primjene
vankomicin	Gram-pozitivne bakterije	glikopeptid, najčešće se koristi kod MRSA-e, ali učinkovit i na druge Gram-pozitivne bakterije
daptomicin	Gram-pozitivne bakterije	lipopeptid, kod bakterijemije i postoperativnih infekcija mekog tkiva
oritavancin	Gram-pozitivne bakterije	lipoglikopeptid
dalbavancin	Gram-pozitivne bakterije	lipoglikopeptid
teikoplanin	Gram-pozitivne bakterije	glikopeptid
polimiksin B	Gram-negativne bakterije	dolazi u obliku topikalne masti koja se primjenjuje kod infekcija rana mekog tkiva
kolistin	Gram-negativne bakterije	kod rezistentnih infekcija uzrokovanih Gram-negativnim bakterijama

Tablica 3. Antimikrobni peptidi koji se nalaze u kliničkim ispitivanjima i pokazuju potencijal za terapijsku primjenu. Prilagođeno iz Fry (2018).

<b>Antimikrobni peptid</b>	<b>Porijeklo</b>	<b>Terapijska primjena</b>
iturin A	bakterijsko	gljivične infekcije
ramoplanin	bakterijsko	infekcije uzrokovane <i>C. difficile</i>
omiganin	iz goveda	infekcije uzrokovane primjenom katetera (česte bolničke infekcije)
lytixar	sintetsko	dekontaminacija kože od Gram-pozitivnih bakterija
Hlf1-11	humano	bakterijska/gljivična infekcija imunokompromitiranih transplantata hematopoetskih matičnih stanica
norexatin	humano	gljivična infekcija rožnatog tkiva
CZEN-0020	humano	vaginalna kandidijaza

## Nanosustavi

Nanosustavi istraživani za dostavu antimikrobnih lijekova moraju biti sigurni za primjenu (biokompatibilni) kako bi rizik od potencijalnih intoksikacija bio sveden na minimum. Mogu biti dizajnirani na način da transportiraju lijek do točno određenog, ciljanog, mjesta djelovanja u organizmu, te im je promjer obično oko 100 nm ili manji kako ih retikulo-endotelni sustav ne bi brzo fagocitirao (Wang i sur., 2020).

Nanosustavi za prijenos antimikrobnih lijekova obuhvaćaju: dendrimere, polimerne i metalne nanočestice, liposome, micle i nanovlakna. Antimikrobni lijek je u nanosustavima konjugiran ili uklopljen u nosač. U konjugiranim nanosustavima su antimikrobni lijekovi vezani za dendrimere pri čemu je potreban oprez kako ne bi došlo do inaktivacije djelatne tvari. Antimikrobni lijekovi mogu biti uklopljeni u nanosustav koji ih štiti od deaktivacije uzrokovane metabolizmom. Također služe kao zaštita od potencijalnih nuspojava i toksičnosti. Nanonosači mogu u strukturi imati steričke stabilizatore (molekule polietilenglikola) i pH-ovisne komponente koje omogućuju usmjeravanje nanosustava do željenog mjesta djelovanja i/ili nakupljanje u biofilmu (Wang i sur., 2020).

Dva najčešća nanosustava za uklapanje lijekova su micle i liposomi. Micle su samostalno udružene, sferične strukture sastavljene od jednog sloja surfaktanta s hidrofilnom glavom i hidrofobnim repom usmjerenim prema unutrašnjosti micle. Liposomi su sastavljeni od dvoslojeva fosfolipida, sličnih strukturi membrane. U micle se mogu uklopiti hidrofobni lijekovi kojih ima relativno malo. Hidrofilni antimikrobni lijekovi se uklapaju u vodenu jezgru liposoma, hidrofobni u lipidni dvojsloj liposoma, dok su amfipatski lijekovi raspoređeni između ovih dviju regija. Zbog strukturnih svojstava liposomi imaju puno širi spektar uklapanja antimikrobnih lijekova za razliku od micela (Tablica 4) i drugih nanosustava (Wang i sur., 2020).

Tablica 4. Usporedba svojstava liposoma i micela te sposobnosti uklapanja antimikrobnih lijekova. Prilagođeno iz Wang i sur. (2020), uz dozvolu *Frontiers Media S.A.*

Nanosustav	Antimikrobni lijek	Svojstva nanosustava
Liposomi	Amikacin, gentamicin, tobramicin, azitromicin, vankomicin, oksacilin, metronidazol i antimikrobni peptidi	Veliki kapacitet uklapanja hidrofilnih i hidrofobnih antimikrobnih lijekova te unutarstanično oslobađanje posredovano fuzijom s bakterijskim stanicama. FDA odobrila doze za kliničku upotrebu
Micelle	Triklosan, izoniazid, kurkumin, rifampicin, bedakvilin	Mogućnost uklapanja hidrofobnih lijekova; jednostavna primjena

FDA, *US Food and Drug Administration* (Američka agencija za hranu i lijekove)

### Polimerni nosači

Polimerne nanočestice su građene od različitih prirodnih i sintetskih polimera: kitozana, alginata, želatine, albumina, kolagena, polivinilpirolidona, polimljične i poliglikolne kiseline, poliuretana, itd. (Ferreira i sur., 2020).

Od prirodnih polimera, posebno je interesantan kitozan zbog svoje biorazgradivosti, biokompatibilnosti i brojnih bioloških učinaka. Kitozan sadrži veliki broj amino skupina koje protoniraju u kiselom i neutralnom pH području. Zbog svog pozitivnog naboja lako stupa u elektrostaske interakcije s negativno nabijenom površinom mikroorganizama (Ghsosh i sur., 2011).

### Kristali kalcijevog karbonata kao potencijalni nosači antimikrobnih lijekova

Kalcijev karbonat se sve više istražuje kao vektor za dostavu lijekova. Razmatra se njegova primjena za uklapanje i prijenos lijeka zbog njegove lake dostupnosti, niske cijene, biokompatibilnosti, biorazgradivosti i kontroliranog oslobađanja lijekova. Kalcijev karbonat štiti antimikrobne lijekove od vanjskih čimbenika i može biti dizajniran na način da kontrolirano oslobađa vezani lijek (djelatnu tvar). Kristali kalcijevog karbonata su osjetljivi na različite pH vrijednosti pa bi se sadržaj mogao oslobađati na kontrolirani način na točno određenim mjestima. Svojstva kristala kalcijevog karbonata se mogu lako mijenjati (veličina, oblik, sastav) pa ih to čini prihvatljivim nosačima za lijekove. Vaterit je polimorf kalcijevog

karbonata koji se koristi za medicinsku primjenu te je prikladan za uklapanje enzima, hormona, DNA i lijekova (Ferreira i sur., 2020).

### Razvoj novih djelatnih tvari

Strukturnim promjenama postojećih lijekova i uklapanjem u nanosustave se samo privremeno ublažava problem rezistencije bakterija. Dugotrajnije rješenje za rezistenciju bakterija bi bilo korištenje novih djelatnih tvari na koje bakterije nemaju razvijene mehanizme rezistencije (Deng, 2018).

Među novim djelatnim tvarima istaknuto mjesto zauzima plazomicin, aminoglikozid, za liječenje infekcija uzrokovanih visoko-rezistentnim rodovima *Enterobacteriaceae*. Omdacilin je novi derivat tetraciklina koji ima aktivnost prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama. Novi ketolid je solitromicin koji posjeduje imunomodulatorni i antiinflamatorni učinak bez nuspojava, za razliku od starijih generacija makrolida. Novi fluorokinoloni (delafloksacin, zabofloksacin, finefloksacin) pokazuju širok spektar djelovanja s minimalno neželjenih nuspojava (Plusa, 2018).



## 1.4. LIPOSOMI KAO NOSAČI ANTIBIOTIKA

Liposomi su sferične vezikule građene od jednog ili više fosfolipidnih dvoslojeva koji okružuju unutarnju vodenu fazu. Fosfolipidi koji grade ovojnici liposoma su ovisno o namjeni/putu primjene liposoma prirodni, polusintetski i sintetski, a česti sastojak ovojnice je i kolesterol. Strukturna obilježja liposoma razlog su da se u njima mogu uklapati različiti lijekovi: lipofilni u ovojnici (fosfolipidni dvosloj), hidrofilni u unutarnju vodenu jezgru te amfipatski između vodene i lipidne regije. Uspješnost uklanjanja lijekova u liposome varira ovisno o fizičko-kemijskim svojstvima lijeka. Općenito je pravilo da se lipofilni lijekovi uklapaju u visokom postotku (do 100 %), a problem niskog uklanjanja se povezuje s hidrofilnim lijekovima (Vanić, 2012).

Liposomi se mogu podijeliti prema veličini i broju fosfolipidnih dvoslojeva te prema strukturnim svojstvima i načinu oslobađanja uklopljenog sadržaja. Prema veličini i broju fosfolipidnih dvoslojeva, razlikuju se skupine unilamelarnih, multilamelarnih, oligolamelarnih i multivezikularnih liposoma. Prema strukturnim svojstvima i načinu oslobađanja uklopljenog sadržaja dijele se na: konvencionalne, sterički stabilizirane, imunoliposome i polimorfne liposome (Vanić, 2012).

Liposomi su važni nanosustavi u transportu lijekova. Primjenjuju se u raznim terapijskim područjima zbog njihove sposobnosti uklanjanja djelatnih tvari različite farmakodinamske aktivnosti, biorazgradivosti, netoksičnosti, neimunogenosti i biokompatibilnosti. Primjerice, liposomi mogu zaštititi lijek od nepovoljnih uvjeta unutar organizma (probavni enzimi). Također štite pacijenta koji uzima lijek od iritacija u gastrointestinalnom sustavu ili toksičnosti. Pomažu u dostavljanju lijeka na željeno mjesto djelovanja povećavajući terapijsku učinkovitost, ali liposomi mogu i usmjeriti lijek dalje od područja u tijelu koja su izrazito osjetljiva na toksične učinke lijeka/djelatne tvari. Mogu se ponašati kao depo iz kojeg će se lijek polako oslobađati u određenom vremenskom periodu (Storm i Crommelin, 1998).

Priprema liposoma uključuje četiri glavna koraka: sušenje lipidnog filma (uklanjanje organskih otapala), dispergiranje lipida u vodenom mediju, homogenizaciju liposomskih disperzija i uklanjanje neuklopljene frakcije lijeka. Postoji mnogo različitih metoda pripreme liposoma, a glavna razlika između tih metoda se očituje u metodi pripreme lipidne faze i redispergiranja u vodenom mediju (Vanić, 2012).

Najčešća metoda je hidratacija suhog fosfolipidnog filma tzv. film metoda. Postupak se zasniva na pripremi tankog fosfolipidnog sloja kojem se doda vodeni medij uz snažno protresivanje.

Dodatkom vodenog medija rezultira hidratacijom fosfolipida i formiranjem liposoma. Nastali liposomi su multilamelarne strukture (Vanić, 2012).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Antimikrobna rezistencija predstavlja sve veći problem u učinkovitom liječenju infektivnih bolesti današnjeg doba. Neracionalnom i nepravilnom primjenom antibiotika povećava se broj bakterija koje su rezistentne na antibiotike. Nasuprot tome, proces istraživanja i razvoja novih antibiotika je iznimno dugotrajan i zahtijeva velika financijska ulaganja te su stoga brojna istraživanja usmjerena upravo na unaprjeđenje svojstava postojećih antimikrobnih lijekova. Naime, određeni antibiotici imaju ograničenu primjenu ili zbog svoje toksičnosti i/ili slabe bioraspoloživosti i neprikladnih farmakokinetičkih svojstava, što se pokušava prevladati njihovim uklapanjem u terapijske nanosustave. Među brojnim istraživanim nanosustavima, liposomi su prilično perspektivni zbog svoje sličnosti u građi s biološkim membranama, biokompatibilnosti, biorazgradivosti i interakcijama s bakterijskim stanicama. Uklapanjem antibiotika u liposome povećava se njihova apsorpcija i bioraspoloživost. Osim toga, liposomi omogućuju lokalizaciju antibiotika na željenom mjestu djelovanja u organizmu kroz dulji vremenski period te povećanu aktivnost uklopljene antimikrobne tvari kako na izvanstanične tako i na intracelularne patogene. Međusobno se razlikuju prema sastavu, morfološkim i fizikalno-kemijskim svojstvima te elastičnosti/rigidnosti dvoslojeva što u konačnosti doprinosi stabilnosti liposomske formulacije i njezinoj terapijskoj učinkovitosti.

U okviru ovog rada sistematizirano su prikazane formulacije registriranih liposomskih antibiotika te perspektivnih pripravaka liposomskih antibiotika za sistemsku i lokalnu antibakterijsku terapiju.

### 3. MATERIJALI I METODE

Tijekom pisanja ovog diplomskog rada korištena je online baza podataka, prvenstveno *Web of Science Core Collection* i *Scopus*. Osim toga, pregledana je dostupna znanstvena literatura i internetetske stranice zdravstvenih organizacija uključujući Hrvatsku agenciju za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), WHO i CDC. Na analitički i kritički način proučavana je literatura prema temi istraživanja.

U pretraživanju znanstvene literature korištene su ključne riječi na engleskom jeziku: *antimicrobial resistance, liposomes, new antibiotics, nanocarriers, parenteral liposomes, topical liposomes, mupirocin, arikace, inhaled liposomal antibiotic, pulmonary liposomes, lipoquin*, itd.

Temeljitim proučavanjem znanstvenih članaka odabrani su relevantni rezultati, rasprave i zaključci. Na temelju tih podataka (saznanja) formirana su vlastita razmatranja vezana za problematiku odabrane teme diplomskog rada.

## **4. RASPRAVA**

### **4.1. LIPOSOMSKI ANTIBIOTICI ZA PARENTERALNU PRIMJENU**

Intravenska primjena je najčešće korišten i najintenzivnije proučavan put primjene liposomskih pripravaka. Nakon intravenske aplikacije, liposomi cirkuliraju krvotokom i dolaze do ciljanog mjesta djelovanja (tkivo ili organ) ili bivaju fagocitirani od strane stanica retikulo-endotelno sustava, na što utječu njihova fizikalno-kemijska svojstva (veličina, rigidnost dvosloja, naboj na površini i površinska svojstva (oblaganje polimerima i/ili vezanje liganda) (Crommelin et al., 2020).

Uloga veličine liposoma kod intravenske primjene liposomskog pripravka je od izuzetnog značaja. Veliki liposomi, promjera većeg od 200 nm, su vrlo brzo prepoznati od strane makrofaga i uklonjeni iz cirkulacije te se većinom nakupljaju u slezeni. Takvi veliki liposomi su prikladni za intravensku primjenu ako su mete njihovog djelovanja makrofagi. Nasuprot tome, liposomi promjera 70-200 nm mogu izbjeći stanice retikulo-endotelno sustava i zadržati se dulje u cirkulaciji kako bi bili transportirani do željenog mjesta djelovanja, te se smatraju najprikladnijim za intravensku primjenu. Liposomi dijametra manjeg od 70 nm se značajno dulje zadržavaju u cirkulaciji od velikih i srednje-velikih liposoma, a zbog ekstravazacije kroz stijenke kapilara koje postaju propusnije na području upale i tumora napuštaju krvotok i dolaze do meta izvan krvožilnog sustava. Takva pojava ekstravazacije se često događa na mjestima upale gdje se u stijenkama kapilara pojavljuju pore kroz koje mogu proći liposomi ako su dovoljno malog promjera. Slične pore se pojavljuju kod tumora. Mali unilamelarni liposomi su stoga idealni za postizanje perifernog učinka sistemskom primjenom jer se akumuliraju na mjestu infekcije ili tumora nakon ekstravazacije iz kapilara (Brandl, 2001).

Sastav membrane i površinske karakteristike liposoma su također vrlo važni za dobivanje učinkovitog liposomskog pripravka. Dugolančani zasićeni fosfolipidi u kombinaciji s kolesterolom se koriste za sprječavanje gubitka (istjecanja) sadržaja uklopljenog lijeka iz liposoma. Kolesterol je vrlo važan za održavanje rigidnosti membrane (dvosloja) jer u slučaju nedovoljne čvrstoće dolazi do gubitka sadržaja izvorno uklopljenog lijeka prije dolaska liposoma na željeno mjesto djelovanja. Liposomi koji sadrže veći udio nezasićenih masnih kiselina u molekulama fosfolipida imaju brzi klirens djelovanjem makrofaga i akumuliraju se većinom u jetri i slezeni. Kako bi se izbjegli makrofagi liposomima se na površinu mogu dodati polimeri kao što je polietilenglikol (PEG). Takvi PEG-ilirani liposomi imaju veću stabilnost, uslijed smanjenih interakcija s proteinima plazme uzrokovanih steričnom stabilizacijom

površine liposoma, čime je značajno smanjeno prepoznavanje od strane makrofaga i osigurano dugo zadržavanje u krvotoku (sterični stabilizirani liposomi, tzv. *Stealth* liposomi) (Lasic, 1993).

Na zadržavanje liposoma u cirkulaciji osim veličine, rigidnosti membrane i steričke stabilizacije, utječe i naboj na površini, te su se u tom smislu najstabilnijim pokazali liposomi neutralnog naboja (Brandl, 2001). Vezanjem specifičnih liganada (antitijela) na površinu, bilo konvencionalnih, bilo PEG-iliranih (*Stealth*) liposoma, nastaju imunoliposomi. Njihova uloga značajna je u aktivnoj ciljanoj terapiji tumorskih oboljenja (Storm i Crommelin, 1998).

Liposomi također mogu biti dizajnirani da oslobađaju lijek pri određenom pH. Primjerice, kombinacijom dioleoilfosfatidiletanolamina i kolesteril-hemisukcinata se dobivaju pH-osjetljivi liposomi koji formiraju dvosloj u neutralnom pH području, dok u nižem pH području (pH 5,5) pomoćni lipid u dvosloju mijenja konformaciju, što rezultira otvaranjem dvosloja i oslobađanjem uklopljenog lijeka. Takvi liposomi imaju potencijala u liječenju infekcija karakteriziranih nižim pH, kakav je pronađen unutar biofilmova (Brandl, 2001).

Osim najčešće korištene intravenske primjene, liposomski antibiotski pripravci se primjenjuju intramuskularno i intravitrealno (Alipour i Omri, 2013).

## **Mupirocin**

Mupirocin je analog izoleucil-adenilata kojeg prirodno proizvodi *Pseudomonas fluorescens*. Ima mehanizam djelovanja drugačiji od ostalih antibiotika na tržištu pa zato učinkovito liječi infekcije uzrokovane jako rezistentnim *S. aureus*-om, *N. gonorrhoeae*-om i *S. pneumoniae*. CDC navodi kako mupirocin učinkovito djeluje na patogene svrstane u hitne, ozbiljne i zabrinjavajuće prijetnje (Tablica 1). Mupirocin djeluje na način da inhibira sintezu bakterijskih proteina prevenirajući vezanje izoleucina na tRNA (Goldmann i sur., 2019).

Intravenskom primjenom mupirocina se pokazalo da ima kratko vrijeme zadržavanja u cirkulaciji zbog velikog afiniteta za proteine plazme koji ga brzo odvođe u opsonizaciju što je ograničilo njegovu primjenu na topikalnu (Cern i sur., 2018).

Tvrtka Rebiotics Rx (Izrael) na svojoj *web* stranici navodi kako parenteralnom primjenom liposoma s mupirocinom dolazi do povećanja vremena zadržavanja mupirocina u cirkulaciji te postizanja terapijskog učinka (Nano-mupirocin™, Rebiotics Rx, Izrael). Nano-mupirocin™ je sastavljen od mupirocina uklopljenog u liposome koji na svojoj površini imaju polietilenglikol (PEG-ilirani liposomi). Premda je ova formulacija pokazala veliku fizikalnu stabilnost i

sposobnost uklapanja mupirocina, u cirkulaciji se zbog prisutnosti proteina u serumu nakon jednog sata oslobodilo čak 82% lijeka. Kako bi se spriječilo prebrzo oslobađanje antibiotika, u vodenu jezgru liposoma je dodano 15% hidroksipropil-beta ciklodekstrina. Time se usporilo oslobađanje mupirocina iz liposoma na 22% nakon jednog sata, te povećala stabilnost formulacije. Nano-mupirocin™ je stabilan najmanje godinu dana na 4 °C (Goldmann i sur., 2019).

Nano-mupirocin™ se sastoji od hidrogeniranog fosfatidilkolina, kolesterola i 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (3:1:1), a hidratacija je provedena na 65 °C s 200 mM kalcijevog acetata koji sadrži 15 % hidroksipropil-beta ciklodekstrina. Uklapanje mupirocina u PEG-ilirane liposome je izvršeno aktivnim putem, transmembranskim gradijentom kalcijevog acetata. Koncentracija mupirocina u liposomima je 200 mM, a hidroksipropil-beta ciklodekstrina 109 mM. Izvorna veličina tako pripremljenih liposoma je modificirana ekstruzijom kroz polikarbonatne filtere i varira između 74 i 85 nm (Cern i sur., 2018).

Učinkovitost Nano-mupirocina™ naspram MRSA-e je određivana *in vivo* na animalnom modelu (inficirani miševi). Ispitivanjem je određeno da je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) Nano-mupirocina™ iznosila 0,15 µg/ml, što je slično kao i za slobodni mupirocin. Minimalna baktericidna koncentracija (MBK) liposomskog pripravka mupirocina je isto slična slobodnom mupirocinu i iznosila je oko 2,5 µg/ml. Rezultati ovog ispitivanja su pokazali bakteriostatsko i baktericidno djelovanje Nano-mupirocina™, slično slobodnom mupirocinu, uz prednost duljeg zadržavanja u cirkulaciji što je važno za intravensku primjenu (Goldmann i sur., 2016).

## **Amikacin**

Tvrtka Nextar Pharmaceuticals (New Jersey, SAD) je razvila liposomski oblik aminoglikozidnog antibiotika amikacina (MiKasome™) te je objavila kako je lijek prošao prvu i drugu fazu kliničkih ispitivanja. Međutim, pretraživanjem literaure nisu pronađeni podaci o njegovoj dostupnosti na tržištu.

MiKasom™ su mali unilamelarni liposomi, srednjeg promjera 45 nm, sastavljeni od fosfatidilkolina, kolesterola i 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina. Amikacin je uklopljen u vodenu jezgru liposoma. Uklapanjem amikacina je poboljšana njegova farmakokinetika, produljeno je vrijeme zadržavanja u cirkulaciji te je značajno smanjena nefrotoksičnost i ototoksičnost za razliku od slobodnog aminoglikozida (Xiong i sur., 1999).

U inokulumu bakterija količine  $10^5$  CFU/ml (*colony forming units/ml*) su određene vrijednosti MIK-ova za amikacin (2 mg/ml) i MiKasom™ (8 mg/ml). Iako je slobodni amikacin pri nižoj koncentraciji ostvario bolji inhibitorni učinak na rast bakterija, liposomski amikacin pokazao je manju toksičnost (Xiong i sur., 1999).

### **Ciprofloksacin**

Ciprofloksacin je hidrofilni antibiotik iz skupine fluorokinolona koji utječe na sintezu DNA bakterija. Slobodni ciprofloksacin se dozira dva puta dnevno zbog relativno brze eliminacije iz organizma (Rehman et al., 2019). Uklapanjem ciprofloksacina u liposome se smanjila učestalost doziranja na jednom dnevno, a povećala koncentracija na mjestu infekcije (Drulis-Kawa i Jach, 2010).

Ispitivanja s liposomskim ciprofloksacinom su se provodila za potencijalnu terapiju pneumonije štakora uzrokovane *Klebsiella-om pneumoniae* ili *P. aeruginosa-om*. Prvo se određivao utjecaj veličine liposoma na učinkovitost dostave antibiotika u pluća. Uspoređivali su se liposomi veličine 100, 280 i 360 nm te su se najprikladniji pokazali liposomi srednjeg promjera 100 nm (Schiffelers i sur., 1999). Liposomi su bili sastavljeni od distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), hidrogeniranog sojinog fosfatidilkolina i kolesterola (5:50:45). Površina liposoma je PEG-ilirana kako bi se dulje zadržavali u cirkulaciji te imaju promjer oko 100 nm (Bakker-Wounderberg i sur., 2001). Uspoređivana je učinkovitost liposomskog ciprofloksacina s otopinom ciprofloksacina te se pokazalo da ciprofloksacin uklopljen u PEG-ilirane liposome primijenjen jednom dnevno ostvaruje jednaki učinak kao otopina ciprofloksacina primijenjena dva puta dnevno. Uklapanjem ciprofloksacina u liposome se smanjila učestalost doziranja, a time i toksičnost te rizik od nuspojava. Toksičnost je bila minimalna i pri visokim dozama liposomskog ciprofloksacina (Bakker-Wounderberg i sur., 2001; Drulis-Kawa i Jach, 2010).



## **Gentamicin**

Gentamicin je hidrofilni aminoglikozidni antibiotik koji je uklopljen u liposome kako bi se smanjila toksičnost, povećala bioraspoloživost i zadržavanje u cirkulaciji. Liposomi su PEG-ilirani i sastavljeni od DSPE, fosfatidilkolina i kolesterola u omjeru 0.15: 1.85: 1.0. Promjer liposoma je bio oko 100 nm (Bakker-Woudenberg i sur., 1995). Učinkovitost liposomskog gentamicina određivana je u odnosu na otopinu gentamicina kod liječenja infekcije plućnog tkiva štakora uzrokovanog s *K. pneumoniae*. Kod neliječenih štakora je određeno  $10^6$  CFU *K. pneumoniae* koja je dovela do njihove smrti za 3 do 5 dana. Otopina gentamicina je primijenjena odjednom u dozi od 5 mg/kg, 26 sati nakon infekcije životinja s *K. pneumoniae*. Tako primijenjen gentamicin je bio djelomično učinkovit te je 6 dana nakon primjene oporavljeno 47 % štakora, dok je primjena liposomskog gentamicina u istoj dozi rezultirala oporavkom svih štakora. Štoviše, 6 dana nakon primjene količina prisutnih bakterija bila je za  $10^4$  manja nego preostala količina bakterija nakon tretmana slobodnim gentamicinom, a MBK liposomskog gentamicina iznosio je 0,4 µg/ml (Bakker-Woudenberg i sur., 1995).

## 4.2. LIPOSOMSKI ANTIBIOTICI ZA LIJEČENJE PLUĆNIH INFEKCIJA

Respiratorni sustav omogućuje olakšano liječenje infekcija zbog velike površine pluća i visoke permeabilnosti plućnog epitela. Tretiranje plućnih infekcija pomoću liposomskih antibiotika (aminoglikozida, fluorokinolona) na animalnim modelima pokazala je učinkovitost liposoma na mjestu infekcije u plućima. Liposomski antibiotici omogućuju održavanje koncentracije antibiotika iznad MIK vrijednosti u respiratornom traktu zbog postupnog oslobađanja lijeka i duljeg djelovanja. Kad liposomi dođu u respiratorni trakt, makrofagi ih fagocitiraju i dolazi do njihove razgradnje s postupnim oslobađanjem uklopljenog antibiotika (Zhou i sur., 2015).

Modifikacijom površine liposoma s manozom bi se moglo utjecati na ciljanje makrofaga koji u svojoj građi imaju manozne receptore. Visok afinitet manoznih receptora za manozu na liposomima omogućuje prepoznavanje makrofaga i uklanjanje uzročnika koji su ušli u makrofage, a nisu razgrađeni (npr. *Mycobacterium tuberculosis*) (Zhou i sur., 2015).

Naboj na površini liposoma utječe na učinkovitost liječenja liposomskim antibioticima. Negativno nabijeni liposomi se dulje zadržavaju u plućima, ali brže oslobađaju antibiotik od neutralnih liposoma. Neutralni liposomi imaju svojstvo agregacije pri čemu stvaraju vezikule koje se brzo uklanjaju djelovanjem plućnih makrofaga pa može doći do nakupljanja tih liposoma u bubregu. Usporedba *in vitro* antibiofilm učinka pozitivno nabijenih liposoma s negativno nabijenim liposomima je pokazala veći afinitet pozitivno nabijenih liposoma prema biofilmu zbog negativnog naboja koji je prisutan na površini biofilma. Pozitivno nabijeni liposomi bi stoga bili prikladniji za liječenje kroničnih, biofilm-uzrokovanih infekcija sa *P. aeruginosa*-om u odnosu na negativno nabijene liposome (Hadinoto i Cheow, 2014).

Membranska fluidnost liposoma također utječe na liječenje infekcija, tako što fluidniji liposomi produljeno oslobađaju antibiotik i dulje zadržavaju koncentraciju antibiotika iznad MIK vrijednosti (Hadinoto i Cheow, 2014).

## **Primjeri liposomskih antibiotika za primjenu putem pluća**

### **Amikacin**

Arikace™ (Transave Inc., New Jersey, SAD) je liposomska formulacija amikacina s produljenim oslobađanjem namijenjena za inhalacijsku primjenu. U 2009. godini započela su pretklinička i klinička ispitivanja liposomskog amikacina. Klinička ispitivanja u prvoj i drugoj fazi su utvrdila sigurnost, podnošljivost, poboljšanu farmakokinetiku i farmakodinamiku Arikace™ lijeka (14 ili 28 dana., 280 ili 560 mg) u cističnoj fibrozi i bronhostazi neovisnoj o cističnoj fibrozi u usporedbi s placebom (Bulbake i sur., 2017). Primjenom Arikace™ u pacijenata oboljelih od cistične fibroze smanjio se broj egzacerbacija te hospitalizacija (Zhou i sur., 2015). Arikace™ je prošao klinička ispitivanja te mu je FDA i Europska agencije za lijekove (EMA) dodijelila status tzv. lijeka „siročeta“ (eng. *orphan drug*) koji se primjenjuje u terapiji infekcija uzrokovanih sa *P. aeruginosa*-om kod pacijenata oboljelih od cistične fibroze. Ova formulacija je dobila od FDA status „lijeka siročeta“ i za pacijente koji ne boluju od cistične fibroze, a imaju *P. aeruginosa* uzrokovanu bronhostazu. U 2010. godini se tvrtka Transave Inc. povezala s tvrtkom Insmmed Inc. te je zatražena dozvola da se indikacija za ovu formulaciju proširi i na infekcije uzrokovane bakterijama iz porodice *Mycobacteriaceae* (osim infekcija s *M. tuberculosis*) (Bulbake i sur., 2017).

Arikace™ su liposomi sastavljeni od dipalmitoilfosfatidilkolina (DPPC) i kolesterola u omjeru 2:1. Formulacija je bila pripremljena na način da su lipidi otopljeni u otapalu, a zatim se otopina profiltrirala kroz filter od 1,2 µm kako bi se ukonile moguće veće čestice te je otapalo otpareno. Amikacin sulfat je otopljen u vodi, te dodan lipidnom filmu uz protresivanje pri čemu su formirani liposomi (Meers i sur., 2008). Promjer liposoma iznosi od 0,2 do 0,3 µm, a Arikace™ se primjenjuje jednom dnevno u dozi od 75 do 560 mg putem elektroničkog raspršivača (nebulizator eFlow®). Ovaj uređaj omogućuje ulazak i najsitnijih kapljica u pluća te time poboljšava biodistribuciju lijeka. Provedeno je kliničko ispitivanje pri čemu je dio pacijenata primjenjivao najveću dozu od 560 mg Arikace™, a dio placebo. Pokazano je kako nije bilo neželjenih reakcija niti toksičnosti te je potvrđena sigurnost ispitivane formulacije lijeka za humanu primjenu (Bulbake i sur., 2017).

Provedeno *in vitro* ispitivanje učinkovitosti Arikace™ u prodiranju u *P. aeruginosa* biofilm. potvrdilo je učinkovitost liposoma. U biofilmu se nalaze ramnolipidi koje proizvodi *P. aeruginosa* u sklopu *quorum sensing*-a. Ramnolipidi *P. aeruginose* imaju ulogu u građi biofilma time što održavaju kanale u biofilmu i smanjuju adheziju između stanica (Wood i sur., 2018). Ramnolipidi djeluju kao surfaktanti na liposome i potiču oslobađanje amikacina iz

liposoma. Dovoljan je jedan ramnolipid na 100 lipidnih molekula u liposomima da potakne oslobađanje lijeka (Meers i sur., 2008).

Ispitivanje učinkovitosti Arikace™ u odnosu na otopinu amikacina se provodilo na štakorima inficiranim s *P. aeruginosa*-om. Dio štakora je dobio dozu od 6 mg/kg liposomskog amikacina, a dio dozu od 6,8 mg/kg otopine amikacina. Obje formulacije su primijenjene inhalacijski pomoću raspršivača (nebulizatora). Slobodni amikacin je brzo dolazio u pluća (82% doze), ali se i brzo uklanjao iz pluća. Kod liposomskog amikacina je izmjereno postepeno i polagano oslobađanje amikacina tijekom 24 sata (Meers i sur., 2008).

EMA u svome izvještaju o procjeni učinkovitosti Arikace™ iz 2020. godine navodi u istraživanjima određen MIK koji iznosi oko 64 µg/ml. Također u istraživanjima su određeni i MIK<sub>50</sub> potreban za sprječavanje rasta 50 % bakterija (16 µg/ml) i MIK<sub>90</sub> za sprječavanje rasta 90 % bakterija (32 µg/ml) (EMA *Assessment report*, 2020).

## **Ciprofloksacin**

S ciljem poboljšanja terapijskog učinka ciprofloksacina, tvrtka Aradigm Corp (Hayward, CA, SAD) je razvila formulaciju liposomskog ciprofloksacina (Lipoquin™) te zatim kombinaciju liposomskog ciprofloksacina (50 mg/ml) i otopine ciprofloksacina (20 mg/ml) u omjeru 1:1 (Pulmaquin™). Obje navedene formulacije se primjenjuju pomoću raspršivača u pluća (PARI LC Sprint® nebulizator). Riječ je o malim unilamelarnim liposomima, promjera oko 90 nm (Cipolla i sur., 2016). Dvosloj liposoma je sastavljen od hidrogeniranog sojinog fosfatidilkolina (HSPC) i kolesterola u masenom omjeru 7:3 (Bruinenberg i sur., 2010).

Ispitivanja stabilnosti liposoma s ciprofloksacinom su pokazala da je Lipoquin™ stabilan 24 mjeseca na temperaturi 2-8 °C ili 6 mjeseci na sobnoj temperaturi. Također unutar tog perioda nije utvrđeno smanjenje količine početno uklopljenog ciprofloksacina (Cipolla i sur., 2016).

Ispitivanje antimikrobne učinkovitosti Lipoquina™ (50 mg/ml), otopine ciprofloksacina (30 mg/ml) i Pulmaquina™ (1:1 mikstura) na *P. aeruginosa* biofilm je pokazalo kako sva tri oblika imaju približno iste biofilm inhibitorne koncentracije (BIK), ali se liposomske formulacije zadržavaju 24 sata na mjestu infekcije i time omogućuju dulje djelovanje antibiotika. *In vivo* studije na miševima zaraženim *P. aeruginosa*-om potvrdile su veći postotak preživljavanja miševa tretiranih formulacijama Lipoquin™ i Pulmaquin™ za razliku od životinja tretiranih otopinom ciprofloksacina (Cipolla i sur., 2016). Provedene su prve dvije faze kliničkih ispitivanja za Lipoquin™. U prvoj fazi kliničkih ispitivanja je potvrđena sigurnost formulacije.

Naime, nije bilo neželjenih nuspojava te je povećana lokalizacija lijeka na mjestu djelovanja (manja koncentracija ciprofloksacina u krvi u odnosu na ciprofloksacin primijenjen oralno i intravenski). U drugoj fazi kliničkih ispitivanja su se ispitivali učinci liposomskog ciprofloksacina primijenjenog u dozama od 450, 350 ili 150 mg dnevno tijekom 14 ili 28 dana. Istraživanja su pokazala povećani forsirani ekspiratorni volumen pluća (FEV) i podnošljivost formulacije. Jednodnevna primjena Lipoquina™ u pacijenata oboljelih od cistične fibroze i bronhostaze neovisne o cističnoj fibrozi rezultirala je većom razinom ciprofloksacina u sputumu i smanjenom gustoćom *P. aeruginosa*-e kroz 28 dana. Liposomska formulacija ciprofloksacina je pokazala produljeno zadržavanje lijeka u plućima uz smanjene razine antibiotika u sistemskej cirkulaciji (Alipour i Omri, 2013).

Liposomski ciprofloksacin se pokazao učinkovit u liječenju infekcija uzrokovanih *P. aeruginosa*-om, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis* i smanjenju simptoma infekcije uzrokovane *Coxiella burnetti* (Cipolla i sur., 2016).

### **Klaritromicin**

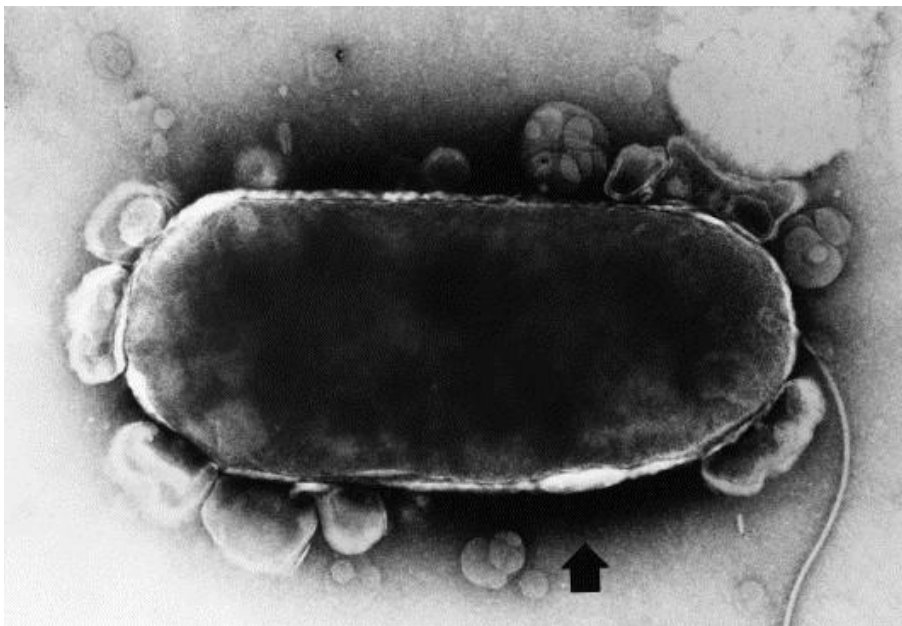
Klaritromicin je uklopljen u liposome kako bi se ispitala njegova učinkovitost u terapiji infekcija uzrokovanih *P. aeruginosa*-om. Pripremljeno je i ispitivano nekoliko formulacija liposoma koje su se međusobno razlikovale po naboju na površini: neutralni (DPPC/kolesterol), anionski (DPPC/kolesterol/dietilfosfat) te kationski liposomi (DPPC/kolesterol/didodecilmetilamonijev bromid (DODAB)). Promjer ispitivanih liposoma se kretao oko 200 nm. Ispitivanje je pokazalo eradikaciju *P. aeruginosa* biofilma nakon primjene kationskih i anionskih liposoma, pri čemu su izraženiji učinak imali kationski liposomi. Određeni BIK je iznosio 512 mg/l za liposomski klaritromicin (Hadinoto i Cheow, 2014).

### Fuzijski liposomi

Fuzijski liposomi također poznati kao i Fluidosomi™ su dizajnirani kako bi se poboljšala dostava antimikrobnih lijekova. Djeluju na način da potiču fuziju liposomske i bakterijske membrane i time povećavaju učinkovitost terapije. Dvosloj fuzijskih liposoma sadrži (fosfo)lipide koji uzrokuju poremećaj u membrani bakterija i omogućavaju fuziju. Sastavom lipida u dvosloju liposoma može se utjecati na fluidnost membrane liposoma. Primjenom kraćih alkilnih lanaca i dvostrukih veza se smanjuje temperatura faznog prijelaza ( $T_c$ ). Primjer je asimetrični fosfatidilkolin koji sadrži lipide s kraćim alkilnim lancem i povećanim brojem

dvostrukih veza te time utječe na fluidnost i poremećaj membrane bakterija. Za razliku od konvencionalnih liposoma koji imaju rigidnu membranu, fuzijski liposomi imaju elastični dvosloj (Forier i sur., 2014).

Tobramicin je hidrofilni aminoglikozidni antibiotik koji nije dovoljno učinkovit u liječenju infekcija uzrokovanih s rezistentnim bakterijama te može uzrokovati nefrotoksičnost zbog povećanog nakupljanja u bubrezima. Uklapanje tobramicina u liposome (Fluidosome™) se pokazalo uspješno te tobramicin ne ometa dvosloj liposoma i time je omogućena fuzija s bakterijskom membranom (Slika 1) (Sachetelli i sur., 1999). Paralelno se ispitivao meropenem koji je ometao dvosloj liposoma, a time i fuziju s bakterijskom membranom pa formulacija nije bila uspješna. Istraživanjima je utvrđeno da baktericidna aktivnost liposomskog tobramicina primarno ovisi o fluidnosti liposomske membrane (Forier i sur., 2014).



Slika 1. Interakcija Fluidosoma™ s membranom stanice *P. aeruginosa*-e. Preuzeto iz Sachetelli i sur., (1999), uz dozvolu Elsevier-a.

Liposomi u koje je uklopljen tobramicin su bili građeni od DPPC-a i dimiristoilfosfatidilkolina (DPMG) u omjeru 10:1. Ta vrijednost Fluidosoma™ (30 °C) utjecala je na učinkovito prodiranje nanoformulacije u biofilm *P. aeruginosa*-e. Korištenjem Fluidosoma™ je došlo do potpune eradikacije kronične infekcije pluća uzrokovane sa *P. aeruginosa*-om *in vivo* u štakora. DPPC/DPMG liposomi (15:1) u koje je uklopljen tobramicin su pomoću raspršivača aplicirani štakorima oboljelim od pneumonije uzrokovane *P. aeruginosa*-om. Lijek se najviše zadržavao

u plućima nakon primjene liposomskog pripravka, ali je bio prisutan i u sistemske cirkulaciji. Utvrđeno je više od 27 µg tobramicina po mg tkiva pluća štakora (Beaulac i sur., 1998). Dokazana je manja toksičnost jer su znatno manje količine tobramicina utvrđene u bubrezima što je od iznimnog značaja jer je tobramicin nefrotoksičan lijek. Fluidosomi™ su neimunogeni i mogu se učestalo primjenjivati kod kroničnih plućnih infekcija bez jake imunosne reakcije na lijek. Fluidosomi™ s uklopljenim tobramicinom su se pokazali učinkoviti *in vitro* u eradikaciji biofilmova uzrokovanih bakterijama *Burkholderia cepacia*, *S. aureus* i *E. coli* (Furier i sur., 2014).

Fluidosomi s uklopljenim tobramicinom su dostupni u obliku praška inhalata. Ova formulacija se nalazila u drugoj fazi kliničkih ispitivanja u Europi, a vlasnik patenta je tvrtka European Contract Research GmbH & Co (Švicarska). Formulacija je zaustavljena u drugoj fazi kliničkih ispitivanja te ju trenutno dalje razvija Axentis Pharma (Švicarska) za liječenje infekcija s *B. cepacia*-om kod pacijenata oboljelih od cistične fibroze (Furier i sur., 2014).

### 4.3. LIPOSOMSKI ANTIBIOTICI ZA TOPIKALNU PRIMJENU

Bakterijske infekcije kože i mekog tkiva su često prisutne u zdravstvu. Najčešći uzročnik je *S. aureus*. Kompleksne stafilokokne infekcije (erizipel, celulitis, impetigo, folikulitis, dermatitis) u kombinaciji s drugim komorbiditetima rezultirale su povećanjem broja hospitalizacija, ekonomskim troškom i povećanjem smrtnosti. Većina pacijenata s infekcijom kože i mekog tkiva uzrokovanog *S. aureus*-om doživjet će rekurentnu infekciju unutar godine dana od početne infekcije. *S. aureus* kolonizira sluznicu nosa i površinu kože pa je zato stalno prisutan u okolišu. Važno je kod pacijenata napraviti dekolonizaciju *S. aureus*-a na sluznici i koži kako bi se smanjio rizik rekurentnih infekcija. Također dodatan problem je razvoj visokorezistentnog oblika, MRSA-e. Taj rezistentni oblik nastaje kao posljedica uvođenja meticilina i penicilina u kliničku primjenu pri čemu dolazi do razvoja rezistencije *S. aureus*-a. Zadnjih nekoliko desetljeća MRSA otežava postoperativni oporavak, dijalizu pacijenata i liječenje kroničnih infekcija kože (Creech i sur., 2015).

Topikalna primjena antibiotika je osnova liječenja kožnih infekcija, ali je većinom učinkovitost antibiotika smanjena zbog nedovoljne koncentracije lijeka na mjestu djelovanja, stvaranja biofilma ili nemogućnosti da lijek dođe na mjesto djelovanja. Zbog svega navedenog ovakva stanja se liječe s oralnim ili parenteralnim antibioticima što rezultira povećanjem nuspojava, alergijskih reakcija i razvoja rezistencije. Nanotehnologija se ističe kao potencijalno rješenje za učinkovitu topikalnu dostavu lijekova i uklanjanje rezistentnih sojeva u koži. Istraživanja provedena u zadnjem desetljeću su pokazala znatno veću apsorpciju i lokalni farmakološki učinak liposomskih antibiotika u odnosu na konvencionalne topikalne formulacije (Hsu i sur., 2017).

Učinkovitost formulacije ovisi o: lipidnom sastavu, naboju i veličini liposoma (Šentjerc i sur., 1998). Liposomski dvosloj ima važnu ulogu u transportu supstancija u kožu. Liposomi s heterogenim sastavom lipida i različitom fluidnosti u dvosloju povećavaju prodiranje uklopljenog lijeka u kožu (Hsu i sur., 2017). Također može doći do molekulskog miješanja liposomskog dvosloja s unutarstaničnim lipidima u *stratum corneum*-u te se time povećava permeacija lipofilnog lijeka u *stratum corneum* ili hidrofilnog lijeka u lamelarni prostor. Liposomi mogu biti i dovoljno čvrsti da prođu kroz *stratum corneum* netaknuti, a da se zatim raspadnu u dubljim slojevima kože (Šentjerc i sur., 1998).

Negativan naboj na liposomima može prevenirati fuziju i agregaciju liposoma te povećati njihovu fizičku stabilnost. Ispitivanjem je također dokazano da su liposomi promjera manjeg od 200 nm nestabilniji pri topikalnoj primjeni, raspadaju se na površini kože, a ponekad



formiraju sloj koji sprječava penetraciju hidrofilnog lijeka. Liposomi malog promjera bi jedino povećali apsorpciju lipofilnih lijekova. Povećanjem promjera liposoma s uklopljenim hidrofilnim lijekovima se povećava prijenos u kožu (Šentjerc i sur., 1998).

Liposomski antibiotici se mogu primjenjivati sami ili uz pojačivače apsorpcije koji djeluju na lipide u *stratum corneum*-u i omogućuju bolji prolazak lijeka kroz rožnati sloj u dublje slojeve epidermisa. Pojačivači apsorpcije su: dimetilsulfoksid, lecitin, ciklodekstrin, glicerol, itd. (Šentjerc i sur., 1998).

U Tablici 5 su navedeni primjeri formulacija topikalnih liposomskih antibiotika.

Tablica 5. Pregled svojstava odabranih topikalnih liposomskih antibiotika

Djelatna tvar	Liposomi	Sastav	Promjer liposoma	Rezultati ispitivanja	Literatura
Azitromicin	CLs	Lipoid S75	132-165 nm, osim CATLs 217 nm	Utjecaj fosfolipidnog sastava i propilenglikola na odlaganje lijeka u koži; učinkovita inhibicija rasta MRSA-e i formiranje biofilma primjenom liposoma; značajno snižene vrijednosti MIK-a primjenom liposoma (najveća antibakterijska aktivnost kationskih liposoma)	Rukavina i sur., 2018
	DLs	Lipoid S75/SDCh (85/15)			
	CATLs	DPPC/ DODAB (73/27)			
	PGLs	Lipoid S75/ PG(100/1500)			
Eritromicin	CLs	GDL/CH/POE (57/15/28)	200 nm	Učinkovito tretiranje papularnih akni u adolescenata i pustularno-papularnih akni kod odraslih; brži učinak i manja toksičnost u odnosu na otopinu eritromicina.	Shyamala i sur., 1996
Klindamicin	MLV	HSPC/ D- $\alpha$ -TOC-AC/CH (60/25/15)	20-1300 nm	Učinkovitost tretiranja otvorenih komedona nakon 6 tjedana primjene u 33% pacijenata u odnosu na otopinu klindamicina (8 % pacijenata bez komedona).	Honzak i Šentjunc, 2000
Propolis	CLs	HSPC/CH (80/20)	450 nm	Dokazano antibakterijsko i antifungalno djelovanje <i>in vitro</i> ; MIK-ovi za <i>P. aeruginosa</i> -u i <i>S. aureus</i> su iznosili 512 i 128 $\mu\text{g/ml}$ , a za <i>C. albicans</i> i <i>Candida krusei</i> 256 i 218 $\mu\text{g/ml}$ .	Aytekina i sur., 2019

CATLs, kationski liposomi; CH, kolesterol; CLs, konvencionalni liposomi; DLs, deformabilni liposomi; D- $\alpha$ -TOC-AC, D-alfa-tokoferil-acetat; DPPC, dipalmitoilfosfatidilkolin; DODAB, dimetildioktadecilamoni bromid; GDL, glicerilaurat; HSPC, hidrogenirani sojin fosfatidilkolin; Lipoid S75, sojin lecitin koji sadrži 75 % fosfatidilkolina; PGLs, PEG-ilirani liposomi; PG, propilenglikol; POE, polioksietilen-10-stearil eter; SDCh, natrijev deoksikolat.

## 5. ZAKLJUČAK

Uklapanjem antibiotika u liposome poboljšavaju se njihova farmakokinetička svojstva, bioraspoloživost i biokompatilnost te u većini slučajeva i antibakterijska aktivnost. Neželjene nuspojave su smanjene te je povećana lokalizacija antibiotika na željenom mjestu djelovanja. Prilagođavanjem strukturnih karakteristika liposoma dobivene su terapijski učinkovite formulacije liposomskih antibiotika za parenteralnu, pulmonalnu i topikalnu primjenu. Brojne formulacije liposomskih antibiotika su u pretkliničkim ispitivanjima, a neke od njih su klinički testirane. Dobivanjem odobrenja za stavljanje u promet takvim pripravcima bi se mogle uspješnije liječiti infekcije uzrokovane rezistentnim patogenima.

## 6. LITERATURA

Alhariri M, Azghani A, Omri A. Liposomal antibiotics for the treatment of infectious diseases. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2013, 10, 1515-1532.

Alipour M, Omri A. Liposome-entrapped antibiotics: recent progress and clinical applications. *Nanomedical Device and Systems Design*, 2013, 2, 467-469.

Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, 65, 36-48.

Aytekin AA, Tanriverdi ST, Köse FA, Kart D, Eroğlu I, Özer O. Propolis loaded liposomes: evaluation of antimicrobial and antioxidant activities. *Journal of Liposome Research*, 2019, 30, 107-116.

Bakker-Woundenberg IAJM, Kate MT, Guo L, Working P, Mouton J. Improved efficacy of ciprofloxacin administered in polyethylene glycol-coated liposomes for treatment of *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 45, 1487-1492.

Bakker-Woundenberg IAJM, Kate MT, Stearne-Cullen LET, Woodle MC. Efficacy of gentamicin or ceftazidime entrapped in liposomes with prolonged blood circulation and enhanced localization in *Klebsiella pneumoniae*-infected lung tissue. *Journal of Infectious Diseases*, 1995, 171, 938-47.

Brandl M. Liposomes as drug carriers: a technological approach. *Biotechnology Annual Review*, 2001, 7, 59-85.

Brinkac L, Voorhies A, Gomez A, Nelson K. The threat of antimicrobial resistance on the human microbiome. *Springer Science+Business Media New York*, 2017, 74, 1001-1008.

Bruinenberg, P, Blanchard JD, Cipolla D, Dayton F, Mudumga S, Gonda I. Inhaled liposomal ciprofloxacin: once a day management of respiratory infections. *Respiratory Drug Delivery*, 2010, 1, 73–82.

Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal formulations in clinical use: an updated review. *Pharmaceutics*, 2017, 9, 1-33.

Centers for Disease Control and Prevention, 2019, [www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html](http://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html), pristupljeno 11. 04. 2021.

Cern A, Connolly KL, Jerse AE, Barenholz Y. In vitro susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* strains to mupirocin. An antibiotic reformulated to parenteral nano-liposomal antibiotic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2018, 62, 4.

Cipolla D, Blanchard J, Gonda I. Development of liposomal ciprofloxacin to treat lung infections. *Pharmaceutics*, 2016, 8, 1-31.

Cipolla D, Shekunov B, Blanchard J, Hickey A. Lipid-based carriers for pulmonary products: preclinical development 2 and case studies in humans. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2014, 75, 53-80.

Creech CB, Zubeidi DN, Fritz SA. Prevention of recurrent *Staphylococcal* skin infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2015, 29, 429–464.

Crommelin DJA, van Hoogevest P, Storm G. The role of liposomes in clinical nanomedicine development. What now? Now what? *Journal of Controlled Release*, 2020, 318, 256-263.

Deng H, Yu H. New antibiotics: where are they? *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 2018, 10, 1-3.

Drulis-Kawa Z, Dorotkiewicz-Jach A. Liposomes as delivery systems for antibiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010, 387, 187–198.

Donlan, RM, Costerton, JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, 15, 167–193.

EMA Assessment report, 2014, [www.ema.europa.eu/en/medicines/human/summaries-opinion/arikayce-liposomal](http://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/summaries-opinion/arikayce-liposomal), pristupljeno 21. 04. 2021.

Ferri M, Ranucci E, Romagnoli P, Giaccone V. Antimicrobial resistance: a global emerging threat to public health systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2015, 57, 2857-2876.

Ferreira AM, Vikulina AS, Volodkin D. CaCO<sub>3</sub> crystals as versatile carriers for controlled delivery of antimicrobials. *Journal of Controlled Release*, 2020, 328, 470–489.

Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8, 623–633.

Fry DE. Antimicrobial peptides. *Surgical Infections*, 2018, 19, 804-811.

Forier K, Raemdonck K, De Smedt S, Demeester J. Lipid and polymer nanoparticles for drug delivery to bacterial biofilms. *Journal of Controlled Release*, 2014, 190, 607-623.

Ghosh S, Rannebennur TK, Vasan HN. Study of antibacterial efficacy of hybrid chitosan-silver nanoparticles for prevention of specific biofilm and water purification. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2011, 2011, 1-11.

Global action plan, 2015, [www.who.int/publications/i/item/global-action-plan-on-antimicrobial-resistance](http://www.who.int/publications/i/item/global-action-plan-on-antimicrobial-resistance), pristupljeno 11. 04. 2021.

Goldmann O, Cern A, Muesken M. Liposomal mupirocin holds promise for systemic treatment of invasive *Staphylococcus aureus* infections. *Journal of Controlled Release*, 2019, 316, 292-301.

Gonzalez-Gomez A, Syed S, Marshall K, Hosseinidoust Z. Liposomal nanovesicles for efficient encapsulation of *Staphylococcal* antibiotic. *American Chemical Society Omega*, 2019, 4, 10866–10876.

Hadinoto K, Cheow WS. Nano-antibiotics in chronic lung infection therapy against *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids and Surfaces: Biointerfaces*, 2014, 116, 772-85.

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2, 95–108.

Hamer DH. From the farm to the kitchen table: the negative impact of antimicrobial use in animals on humans. *Nutrition Reviews*, 2002, 60, 261-264.

Honzak L, Šentjurc M. Development of liposome encapsulated clindamycin for treatment of *acne vulgaris*. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 2000, 440, 44-45.

Hsu CY, Yang SC, Sung CT, Weng YH, Fang JY. Anti-MRSA malleable liposomes carrying chloramphenicol for ameliorating hair follicle targeting. *Internacional Journal of Nanomedicine*, 2017, 12, 8227–8238.

Lasic DD. Novel applications of liposomes. *Tibtech*, 1993, 16, 307-321.

Meers P, Neville M, Malinin V, Sardaryan G, Kurumunda R. Biofilm penetration, triggered release and in vivo activity of inhaled liposomal amikacin in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008, 61, 859– 868.

Monnet DL. Antibiotic development and the changing role of the pharmaceutical industry. *International Journal of Risk & Safety in Medicine*, 2005, 17, 133–145.

Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*, 2016, 4, 1-24.

Plusa T. New antibiotics in infection treatment. *Polski Merkuriusz Lekarski*, 2018, 45, 213-219.

Rehman A, Patrick WM, Lamont L. Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: new approaches to an old problem. *Journal of Medical Microbiology*, 2019, 68, 1–10.

Rukavina Z, Vanić Ž. Current trends in development of liposomes for targeting bacterial biofilms. *Pharmaceutics*, 2016, 8, 18.

Rukavina Z, Šegvić-Klarić M, Filipović-Grčić J, Lovrić J, Vanić Ž. Azithromycin-loaded liposomes for enhanced topical treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018, 553, 109–119.

Schiffelers RM, Bakker-Woudenberg IAJM, Snijders S, Storm G. Localization of sterically stabilized liposomes in *Klebsiella pneumoniae*-infected rat lung tissue: influence of liposome characteristics. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1421, 329-339.

Schiffelers RM, Bakker-Woudenberg IAJM, Storm G. Liposome encapsulated aminoglycosides in pre-clinical and clinical studies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, 48, 333-344.

Shyamala C, Ramachandran C, Weiner N. Topical delivery of erythromycin from various formulations: an in vivo hairless mouse study. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1996, 85, 1082-1084.

Storm G, Crommelin DJA. Liposomes: quo vadis? *Research Focus Reviews*, 1998, 1, 19-31.

Šentjurs M, Vrhovnik K, Kristl J. Liposomes as a topical delivery system: the role of size on transport studied by the EPR imaging method. *Journal of Controlled Release*, 1999, 59, 87–97.

Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005, 4, 145-160.

Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: strukturna svojstva i klasifikacija. *Farmaceutski glasnik*, 2012a, 68, 391-400.

Wang DY, Mei HC, Ren Y, Busscher RJ. Lipid-based antimicrobial delivery-systems for the treatment of bacterial infections. *Frontiers in Chemistry*, 2020, 7, 872.

Wood TL, Gong T, Zhu L, Miller L, Miller D, Yin B, Wood TK. Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* disperse the biofilms of sulfate-reducing bacteria. *Biofilms and Microbiomes*, 2018, 4, 22.

Xiong YQ, Kupferwasser LI, Zack PM, Bayer AS. Comparative efficacies of liposomal amikacin (MiKasome) plus oxacillin versus conventional amikacin plus oxacillin in experimental endocarditis induced by *Staphylococcus aureus*: microbiological and echocardiographic analyses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, 43, 1737-1742.

Zhou QT, Leung SSY, Tang P, Parumasivam P, Loh ZH, Chan HK. Inhaled formulations and pulmonary drug delivery systems for respiratory infections. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015, 85, 83-99.



## 7. SAŽETAK

Antimikrobna rezistencija je tijekom zadnja dva desetljeća postala jedan od glavnih problema u učinkovitoj antimikrobnoj terapiji. Znanstvenici predlažu dva smjera u borbi protiv rezistencije: razvoj novih antibiotika ili unaprjeđenje postojećih uklapanjem u različite lipidne i polimerne nanosustave te hibridne sustave s antimikrobnim peptidima.

Uklapanjem antibiotika u liposome poboljšavaju se njegova farmakokinetička svojstva i bioraspoloživost, smanjuje toksičnost, te u većini slučajeva povećava antimikrobna aktivnost. Osim toga, liposomi služe kao zaštita antibiotika od neželjenih učinaka metabolizma, a pritom štite i pacijenta koji uzima lijek od neželjenih nuspojava antibiotika. Liposomski antibiotici mogu biti dizajnirani da ciljaju intracelularne infekcije gdje važnu ulogu imaju konvencionalni liposomi koji bivaju fagocitirani i transportirani do inficiranih stanica. PEG-iliranjem površine liposoma produljuje se vrijeme polueliminacije što doprinosi održavanju konstantne razine antibiotika u serumu. Liposomi koji na svojoj površini imaju imunoglobuline, proteine ili saharide usmjereni su prema specifičnim ciljevima kao što su određena tkiva, patogeni ili bakterijski biofilm.

Brojna istraživanja u ovom području rezultirala su kliničkim ispitivanjima liposomskih antibiotika, a neki od njih su i registrirani, što je sistematizirano prikazano ovim radom.

## 8. SUMMARY

Antimicrobial resistance has become one of the major problem for effective antimicrobial therapy, and the list of antibiotic-resistant bacteria is increasing over the last two decades. To overcome this problem, scientists suggest two options: the development of new antibiotics or the improvement of already existing antibiotics by their incorporation in nanocarriers and synthesis of antimicrobial peptides. Among the various nanosystems investigated, liposomes have the longest clinical use.

Incorporation of antibiotics into liposomes results in: improved pharmacokinetics and bioavailability of the liposomally-incorporated antibiotic, reduced toxicity, increased activity against intracellular and extracellular pathogens and modified drug release. Liposomes serve as a way of protecting antibiotics against early metabolic degradation, as well as protecting patients against drug side effects. Liposomal antibiotics can be ingested by macrophages and transported to the infected cells. By modifying the liposomal surface by polyethyleneglycol derivatives, the circulation time increases, thus maintaining adequate levels of the antibiotic in serum. Moreover, to achieve targeted delivery to pathogens and biofilm, the liposomal surface can be modified with immunoglobulins, proteins or saccharides.

This paper provides an overview of selected, the most perspective, liposomal antibiotics aimed for parenteral, pulmonary and dermal delivery, which are currently in preclinical and clinical studies.

## 9. PRILOZI

Privole izdavača za objavljivanje slika i tablica u diplomskom radu nalaze se na sljedećim poveznicama:

<https://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=9c15bf37-5c66-4549-8c51-e9e9b8e37b62>



**Editorial Office** 18. lip

prima ja ▾



Dear Antonela,

Under the Frontiers Terms and Conditions, authors retain the copyright to their work. Furthermore, all Frontiers articles are Open Access and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY 3,0), which permits the use, distribution and reproduction of material from published articles, provided the original authors and source are credited, and subject to any copyright notices concerning any third-party content. More information about CC-BY can be found here: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

You can therefore freely reuse your article, or parts of it, in your thesis.

Best regards,

Frontiers Editorial Office

---

Head of Research Integrity: [Elena Vicario](#), PhD

Frontiers | London Office  
12 Moorgate  
EC2R 6DA  
London, UK  
Office T [+41 215 101 797](#)

*Now more than ever, open and rapid access to the latest scientific results are paramount in these unprecedented times of the COVID-19 pandemic. As we all work with our communities to mitigate its*

---

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za Farmaceutsku tehnologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Liposomski antibiotici

Antonela Buljan

#### SAŽETAK

Antimikrobna rezistencija je tijekom zadnja dva desetljeća postala jedan od glavnih problema u učinkovitoj antimikrobnoj terapiji. Znanstvenici predlažu dva smjera u borbi protiv rezistencije: razvoj novih antibiotika ili unaprjeđenje postojećih uklapanjem u različite lipidne i polimerne nanosustave te hibridne sustave s antimikrobnim peptidima.

Uklapanjem antibiotika u liposome poboljšavaju se njegova farmakokinetička svojstva i bioraspodjeljivost, smanjuje toksičnost, te u većini slučajeva povećava antimikrobna aktivnost. Osim toga, liposomi služe kao zaštita antibiotika od neželjenih učinaka metabolizma, a pritom štite i pacijenta koji uzima lijek od neželjenih nuspojava antibiotika. Liposomski antibiotici mogu biti dizajnirani da ciljaju intracelularne infekcije gdje važnu ulogu imaju konvencionalni liposomi koji bivaju fagocitirani i transportirani do inficiranih stanica. PEG-iliranjem površine liposoma produljuje se vrijeme polueliminacije što doprinosi održavanju konstantne razine antibiotika u serumu. Liposomi koji na svojoj površini imaju imunoglobuline, proteine ili saharide usmjereni su prema specifičnim ciljevima kao što su određena tkiva, patogeni ili bakterijski biofilm.

Brojna istraživanja u ovom području rezultirala su kliničkim ispitivanjima liposomskih antibiotika, a neki od njih su i registrirani, što je sistematizirano prikazano ovim radom.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 39 stranica, 0 grafičkih prikaza, 5 tablica i 53 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: antimikrobna rezistencija, liposomi, novi antibiotici, nanosustavi, parenteralni liposomi, topikalni liposomi, inhalacijski liposomi

Mentor: **Dr. sc. Željka Vanić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Željka Vanić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Mario Jug**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2021.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Technology  
Domagojeva 2 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Liposomal antibiotics

**Antonela Buljan**

#### SUMMARY

Antimicrobial resistance has become one of the major problem for effective antimicrobial therapy, and the list of antibiotic-resistant bacteria is increasing over the last two decades. To overcome this problem, scientists suggest two options: the development of new antibiotics or the improvement of already existing antibiotics by their incorporation in nanocarriers and synthesis of antimicrobial peptides. Among the various nanosystems investigated, liposomes have the longest clinical use.

Incorporation of antibiotics into liposomes results in: improved pharmacokinetics and bioavailability of the liposomally-incorporated antibiotic, reduced toxicity, increased activity against intracellular and extracellular pathogens and modified drug release. Liposomes serve as a way of protecting antibiotics against early metabolic degradation, as well as protecting patients against drug side effects. Liposomal antibiotics can be ingested by macrophages and transported to the infected cells. By modifying the liposomal surface by polyethyleneglycol derivatives, the circulation time increases, thus maintaining adequate levels of the antibiotic in serum. Moreover, to achieve targeted delivery to pathogens and biofilm, the liposomal surface can be modified with immunoglobulins, proteins or saccharides.

This paper provides an overview of selected, the most perspective, liposomal antibiotics aimed for parenteral, pulmonary and dermal delivery, which are currently in preclinical and clinical studies.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 39 pages, 0 figures, 5 tables and 53 references. Original is in Croatian language.

Keywords: antimicrobial resistance, liposomes, new antibiotics, nanocarriers, parenteral liposomes, topical liposomes, mupirocin, arikace, inhaled liposomal antibiotic, pulmonary liposomes

Mentor: **Željka Vanić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Željka Vanić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Mario Jug, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Sanda Vladimir-Knežević, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2021.