

## СОЗДАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ЛЕВОФЛОКСАЦИНА

Г.М. Сорокоумова, доцент, Я.О.Х. Ясин, студент, Ю.Л. Микулович,  
ведущий инженер, \*Т.Г. Смирнова, старший научный сотрудник,  
\*С.Н. Андреевская, старший научный сотрудник, \*\*А.А. Селищева,  
ведущий научный сотрудник, \*Л.Н. Черноусова, заведующий отделом,  
В.И. Швец, заведующий кафедрой

кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119571

\*Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, Москва, 107564

\*\*Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия

e-mail: galinams@yandex.ru

**П**олучена липосомальная форма левофлоксацина – антибиотика фторхинолонового ряда, применяемого при лечении резистентных форм туберкулеза. Используемый в работе метод активной загрузки позволил достичь 90% эффективности включения этого препарата. Для получения липосом были использованы традиционные липиды – фосфатидилхолин и холестерин. Исследование действия полученного препарата на рост *in vitro* резистентного штамма *Mycobacterium tuberculosis* CN-37, обладающего широкой лекарственной устойчивостью, показало, что липосомальная форма левофлоксацина обладает таким же бактерицидным действием, что и раствор левофлоксацина, но при этом высвобождение антибиотика из липосом происходит постепенно.

**Ключевые слова:** левофлоксацин, липосомальная форма, метод активной загрузки, эффективность включения антибиотика, микобактерии туберкулеза с широкой лекарственной устойчивостью.

### Введение

В настоящее время для лечения туберкулеза используется достаточно эффективная схема терапии, заключающаяся в одновременном приеме нескольких противотуберкулезных препаратов (ППП) первого ряда, включая рифампицин и изониазид. Однако из-за значительного увеличения числа больных, инфицированных клиническими штаммами микобактерий туберкулеза (МБТ), резистентных как к одному, так и к нескольким ППП первого ряда, для лечения используют препараты второго ряда, в том числе фторхинолоны – офлоксацин или его оптический изомер левофлоксацин (ЛФ) и т.п. Фторхинолоны достаточно хорошо проникают внутрь ткани и клетки [1], однако при назначении фторхинолонов наиболее распространены осложнения со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Для ЛФ частота побочных эффектов в отношении ЖКТ не превышает 2%, в то время как для других фторхинолонов может достигать 10%. Нейротоксичность занимает второе место по частоте возникновения побочных реакций при клиническом применении фторхинолонов [2].

Ранее на примере других лекарственных препаратов было показано, что включение препаратов в липосомы (частицы размером 200–500 нм из природных фосфолипидов) снижает токсичность препаратов, оказывает пролонгированное действие и позволяет доставить препарат в инфицированные макрофаги хозяина, которые фагоцитируют липосомы [3]. Известно несколько работ, посвященных получению липосомальной формы офлоксацина и ЛФ.

Так, в наиболее ранних работах исследовали действие липосомального офлоксацина как на различные бактерии (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) [4], так и на внутримакрофагальный микобактериальный комплекс *M. avium*–*M. intracellulare* [5]. При этом было показано, что офлоксацин в липосомальной форме легче проникал в бактериальные клетки, что приводило к снижению значения минимальной ингибирующей концентрации антибиотика в 3–5 раз в зависимости от липидного состава липосом. Для определения возможности увеличения эффективности действия липосомального офлоксацина на внутриклеточные патогены (например, *M. tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*) Fresta M. и соавторы [6] изучали накопление его в эукариотических клетках (клетках McCoу – синовиальных фибробластах человека) и показали, что офлоксацин в липосомальной форме в 2.6 раза лучше проникал в клетки McCoу по сравнению со свободной формой препарата.

Настоящая работа посвящена созданию липосомальной формы левофлоксацина. Особенностью данного подхода является использование различных методов загрузки ЛФ в липосомы разного липидного состава.

### Результаты и их обсуждение

Целью данной работы явилось создание липосомального препарата, содержащего антибиотик фторхинолонового ряда – левофлоксацин, и определение его действия *in vitro* на рост *M. tuberculosis*. В соответствии с этим на

первых этапах работы необходимо было изучить некоторые физико-химические характеристики ЛФ, получить липосомы с максимальным включением в них ЛФ и определить скорость высвобождения антибиотика из липосом. На следующем этапе планировалось определить эффективность действия липосомального ЛФ на штамм клеток МБТ, обладающих широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ).

#### Краткая физико-химическая характеристика ЛФ

Левифлоксацин ((-)-(S)-9-фтор-2,3-дигидро-3-метил-10-(4-метил-1-пиперазинил)-7-оксо-7Н-пиродо[1,2,3-de]1,4-бензоксазин-6-карбоновая кислота) относится к амфолитам вследствие наличия в структуре одновременно и кислотного (карбоксильная группа), и основного (третичный алифатический атом азота) центров [7]. Он имеет характерный УФ-спектр с максимумами поглощения при 227, 293 и 327 нм. Наиболее интенсивный пик находится на длине волны 293 нм. Определенные нами коэффициенты экстинкции ЛФ при этой длине волны в 0.89%-ом водном растворе хлорида натрия и в 1%-ом растворе уксусной кислоты были равны 21000 и 28500  $M^{-1}\cdot cm^{-1}$  соответственно.

ЛФ характеризуется низкой растворимостью в метаноле, этаноле и ацетоне и высокой растворимостью в растворах кислот и щелочей.

#### Получение липосом, содержащих ЛФ

В настоящей работе однослойные липосомы (большие одноламеллярные везикулы, БОЛВ) получали из мультиламеллярных везикул (МЛВ), содержащих различные липиды природного происхождения, методом экструзии. Введение фторхинолона в липосомы осуществляли методом **пассивной** загрузки при получении МЛВ путем гидратирования липидной пленки раствором левофлоксацина в 1%-ом растворе уксусной кислоты с последующим многократным продавливанием через поликарбонатную

мембрану с размером пор 100–200 нм. При этом образовывались БОЛВ с включенным в них ЛФ. Средний размер липосом, определенный методами турбидиметрии и фотонно-корреляционной спектроскопии, составлял 180–220 нм.

Степень включения ЛФ в БОЛВ определяли спектрофотометрически после отделения свободного (не включившегося в липосомы) ЛФ методом гель-хроматографии. Чтобы добиться получения липосом оптимального липидного состава с максимальным включением в них фторхинолона, были выбраны липиды из фосфатидилхолина (ФХ) и холестерина (Хол). ФХ – компонент цитоплазматической мембраны всех эукариотических клеток, способный формировать липидный бислой; Хол – липид, также присутствующий в мембранах эукариотических клеток и придающий некоторую жесткость структуре бислоя липосом. Из данных, приведенных в таблице, видно, что при использовании метода пассивной загрузки липосом антибиотиком эффективность загрузки имеет низкое значение, равное 20%, что не является оптимальным для лекарственного препарата.

На следующем этапе работы применили **активный** метод загрузки липосом, заключающийся в использовании градиента сульфата аммония для «закачивания» препарата в липосомы, описанный ранее в работе [8]. Для этого «пустые» липосомы (БОЛВ) получали методом экструзии из МЛВ в присутствии сульфата аммония, затем с помощью гель-хроматографии отделяли от сульфата аммония, находящегося с наружной стороны липосом, и инкубировали БОЛВ с раствором ЛФ при температуре 50°C. Зависимость включения ЛФ в липосомы от их состава была исследована на примере липосом из ФХ и ФХ/Хол. Эффективность включения ЛФ в БОЛВ, рассчитанная на основе трех независимых экспериментов как процентное отношение концентрации ЛФ во фракции липосом к его исходной концентрации, представлена в таблице.

Характеристика липосом, содержащих левофлоксацин ( $C_{ЛФ}^{исх} = 2.5$  мг/мл,  $C_{липидов}^{исх} = 10$  мг/мл)

Метод загрузки антибиотика	Липидный состав липосом	Размер частиц, нм	Эффективность включения ЛФ в липосомы, %
Пассивная загрузка	ФХ	180±20	20.0±2.0
	ФХ/Хол (4:1 по массе)	200±20	9.6±0.5
Активная загрузка	ФХ	200±20	50.0±5.0
	ФХ/Хол (4:1 по массе)	200±20	90.0±5.0

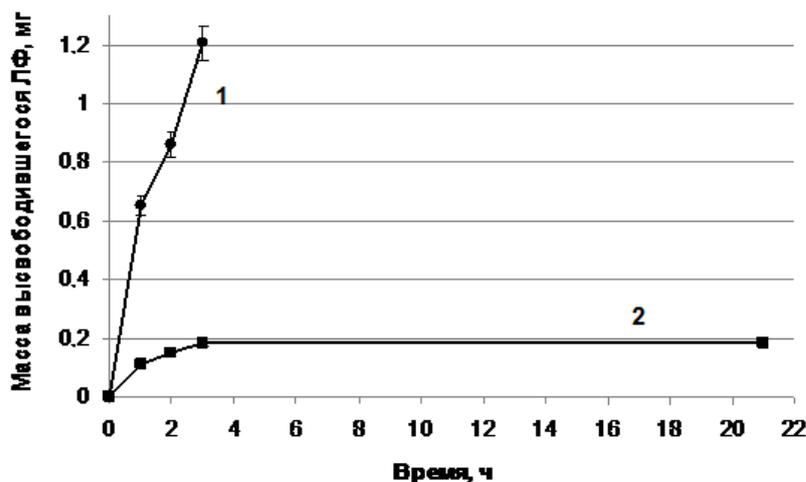
Из таблицы видно, что степень включения фторхинолона методом активной загрузки значительно выше (50–90%) по сравнению с включением

препарата методом пассивной загрузки (10–20%).

Далее исследовали **кинетику высвобождения ЛФ из липосом ФХ/Хол** с помощью

диффузионной ячейки Франца в сравнении с диффузией свободной формы ЛФ. Суть данного метода заключается в том, что ЛФ, в отличие от больших по размеру липосом, диффундирует по градиенту концентраций через мелкопористую мембрану, расположенную между двумя камерами ячейки Франца: в верхнюю донорную камеру вносят исследуемые липосомы с включенным в них ЛФ, а нижнюю рецепторную камеру заполняют 0.89%-ым раствором хлорида натрия и инкубируют при 37°C, периодически отбирая раствор и добавляя свежую порцию 0.89%-го раствора NaCl. Содержание ЛФ в рецепторной камере определяли через каждый час в течение первых 3 ч, моделируя тем самым

ситуацию в кровотоке. Следующее измерение проводили через 18 ч, т.е. в общем высвобождение ЛФ из липосом определяли в течение 21 ч. Как следует из рисунка, в течение первых 3 ч ЛФ в свободной форме полностью переходит в акцепторную камеру, тогда как из липосом за это время выходит только 18% ЛФ. В последующие 18 ч никакого увеличения ЛФ в акцепторной камере не наблюдается. С учетом того, что степень включения ЛФ в липосомы составляет 80%, кинетику высвобождения антибиотика из липосом можно объяснить тем, что в акцепторную камеру выходит антибиотик, который не включился в липосомы.



Зависимость высвобождения левофлоксацина (ЛФ,  $m_{\text{исх}}=1.25$  мг) из раствора (1) и из липосом состава ФХ/Хол (4:1 по массе) (2) от времени, полученная с помощью диффузионной ячейки Франца.

Полученные результаты позволяют сделать заключение, что при активной загрузке получают липосомы с высоким содержанием антибиотика, который не диффундирует из липосом в течение длительного времени. Нам представляется, что это свойство липосомальной ЛФ является важным для эффективности действия противотуберкулезного препарата в организме человека с учетом того, что клетки микобактерий размножаются в альвеолярных макрофагах, а липосомы фагоцитируются макрофагами.

На завершающем этапе данной работы провели *исследование влияния липосомальной формы ЛФ на рост микобактерий туберкулеза*. Особенно важно подчеркнуть, что в этом эксперименте использовали штамм *M tuberculosis* CN-37 с широкой лекарственной устойчивостью, характеризующийся резистентностью к пяти противотуберкулезным препаратам (ППП) 1-го ряда и к трем ППП 2-го ряда.

В данной работе мы проверяли действие липосомальной формы ЛФ в составе липосом из ФХ/Хол, полученной методом активной загрузки. Рост штамма *M. tuberculosis* CN-37 с широкой лекарственной устойчивостью ( $10^5$  КОЕ/мл) в присутствии препаратов регистрировали в авто-

матизированной системе ВАСТЕС MGIT 960 по наличию флуоресценции красителя, расположенного на дне пробирки, в которой культивируют МБТ. Конечные концентрации ЛФ в свободной и липосомальной форме при добавлении к клеткам МБТ составляли 1, 2 и 4 мкг/мл.

В результате проведенных исследований было установлено, что свободная форма ЛФ в концентрации 1 мкг/мл вызывает задержку начала роста *M. tuberculosis* CN-37 на одни сутки, в концентрации 2 мкг/мл – на двое суток, а в концентрации 4 мкг/мл рост не зарегистрирован. Липосомальная форма ЛФ на основе ФХ/Хол практически не изменяет картину роста, т.е. в концентрации 1 и 2 мкг/мл вызывает незначительную задержку роста, а в концентрации 4 мкг/мл рост клеток не наблюдается.

Подводя итоги, отметим, что для получения липосомальных форм фторхинолонов необходимо использовать активный метод загрузки препарата, при котором достигается максимальная эффективность включения для ЛФ (96%), и этот препарат обладает антибактериальным действием по отношению к резистентному штамму *M. tuberculosis* с широкой лекарственной устойчивостью.

### Экспериментальная часть

В работе использовали: фосфатидилхолин (ФХ) (94.0% чистоты, Lipoid S-100, «Lipoid GmbH», Германия), холестерин (Хол) (Merck, США), левофлоксацин (ЛФ) (Sigma-Aldrich, США), этанол – х.ч., фирмы «Химмед», Россия.

Липосомы получали при помощи экструдера «LiposoFast basic» (Avestin Inc., США), с использованием фильтров «Whatman» (США) с размером пор 100–200 нм.

Спектры в видимой и УФ-областях получали на спектрофотометрах Shimadzu (Япония) и Specord M40 (США).

**Получение липосом методом пассивной загрузки.** Липосомы (большие однослойные везикулы – БОЛВ), содержащие ЛФ, получали методом экструзии дисперсии МЛВ через поликарбонатные фильтры с размером пор 100–200 нм. МЛВ получали диспергированием пленки липидов: ФХ или ФХ/Хол (4:1 по массе) с раствором левофлоксацина в 1%-ой уксусной кислоте. Исходная концентрация липидов в липосомах составляла 10 мг/мл, а ЛФ – 2.5 мг/мл.

**Получение липосом методом активной загрузки.** На первой стадии получали «пустые» МЛВ из липидов: ФХ или ФХ/Хол (4:1 по массе). Для этого липидную пленку гидратировали 1 мл сульфата аммония (0.3 М), перемешивая на приборе Vortex до образования МЛВ, далее методом экструзии дисперсии МЛВ через поликарбонатный фильтр (диаметр пор 100–200 нм) получали БОЛВ и удаляли сульфат аммония с наружной стороны липосом гель-фильтрацией на колонке illustra NAP 5 с сорбентом Sephadex G-25 (фирма GE Healthcare (Великобритания), используя в качестве элюента изотонический раствор хлорида натрия. Таким образом, получали фракцию пустых БОЛВ, содержащих внутри сульфат аммония. Загрузку ЛФ в липосомы проводили по методике, описанной в работе [9]. Для этого 0.25 мл раствора фторхинолона ( $C_{\text{исх}}=10$  мг/мл) в 1%-ом растворе уксусной кислоты добавляли к 0.75 мл пустых БОЛВ и инкубировали смесь на водяной бане при 50°C в течение 20 мин.

**Определение эффективности включения ЛФ в липосомы.** Отделение фракции липосомального фторхинолона от свободного препарата проводили методом гель-фильтрации на колонке illustra NAP. Определение степени включения ЛФ в липосомы проводили спектрофотометрически, измеряя поглощение света при длине волны 293 нм во фракции с разрушенными липосомами (разрушали 5.4%-ым раствором дезоксихолата натрия) и во фракции со свободным фторхинолоном.

**Кинетика высвобождения фторхинолона из липосом *in vitro*.** Степень высвобождения ЛФ из липосом ФХ/Хол (4:1 по массе) определяли с помощью ячейки вертикальной диффузии (Франца), состоящей из двух камер, между которыми расположен фильтр. В верхнюю донорную камеру ячейки на фильтр помещали 0.5 мл ОЛВ, а нижнюю рецепторную камеру заполняли 4 мл 0.89%-го раствора хлорида натрия. Диффузионную ячейку Франца помещали в водяную баню и инкубировали при 37°C. Через 1, 2, 3 и 21 ч отбирали раствор из рецепторной камеры и анализировали его на содержание фторхинолона методом спектрофотометрии при 293 нм. Рецепторную камеру каждый раз заполняли свежим 0.89%-ым раствором NaCl.

**Влияние липосомальной формы левофлоксацина на рост клеток *Mycobacterium tuberculosis* CN-37 *in vitro*.** В работе использовали клетки *Mycobacterium tuberculosis* CN-37 с широкой лекарственной устойчивостью (резистентность к рифампицину, изониазиду, стрептомицину, этамбутолу и пиразинамиду (ПТП 1-го ряда), офлоксацину, амикацину, капреомицину (ПТП 2-го ряда), выделенные из мокроты больных в ЦНИИ туберкулеза РАМН, и липосомы из ФХ/Хол с включенным в них ЛФ.

Рост культуры клеток в присутствии препаратов регистрировали в автоматизированной системе ВАСТЕС MGIT 960 в индикаторных пробирках MGIT (*Mycobacterium Growth Indicator tube*) со средой Middlebrook 7H9, которые содержат в придонной части флуоресцирующий индикатор (трис-4,7-дифенил-1,10-фенантролин-рутениум хлорид пентагидрат), «погашенный» высокими концентрациями кислорода. Каждый час при УФ-облучении пробирок показания прибора сохраняются в программе компьютера. Время проведения эксперимента составило 42 дня согласно протоколу Vecton Dickinson. Бактериостатическую активность соединения оценивали по задержке начала роста культуры по сравнению с контролем без препаратов. Исходное количество клеток *M. tuberculosis* CN-37 составляло  $10^5$  КОЕ/мл. Общий объем системы в пробирке составлял 8.4 мл, конечные концентрации ЛФ в свободной и липосомальной форме при добавлении к клеткам МБТ – 1, 2 и 4 мкг/мл, концентрация липидов – 600 мкг/мл. В качестве контроля использовали: 1) культуру клеток *M. tuberculosis* CN-37 (без препаратов); 2) *M. tuberculosis* CN-37 в присутствии свободной формы ЛФ (конечные концентрации 1, 2 и 4 мкг/мл).

*Работа выполнена при финансовой поддержке и в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры России» Федерального агентства по образованию (Соглашение с МОН РФ № 14.В 37.21.0193).*

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Шмелев Е.И., Чуканов В.И. Применение фторхинолонов при туберкулезе // Пульмонология и фтизиатрия. 2000. Т. 2. № 10. С. 429–431.
2. Никитин А.В., Литовченко К.В. Побочное действие фторхинолонов. Безопасность и переносимость левофлоксацина при клиническом применении // Антибиотики и химиотерапия. 2002. Т. 47. № 4. С. 20–23.
3. Bermudez L.E. Use of liposome preparation to treat mycobacterial infections // Immunobiology. 1994. V. 191. P. 578–583.
4. Furneri P.M., Fresta M., Puglisi G., Tempera. Ofloxacin-loaded liposomes: *in vitro* activity and drug accumulation in bacteria // Antimicrob. Agents Chemother. 2000. V. 44. № 9. P. 2458–2464.
5. Сyprian O.O., Nightingale C.H., Nicolau D.P., Quintiliani R. Efficacies of liposome-encapsulated clarithromycin and ofloxacin against *Mycobacterium avium*–*M. intracellulare* complex in human macrophages // Antimicrob. Agents Chemother. 1994. V. 38. № 3. P. 523–527.
6. Fresta M., Sprado A., Cerniglia G., Roperо I.M., Puglisi G., Furneri P.M. Intracellular accumulation of ofloxacin-loaded liposomes in human synovial fibroblasts // Antimicrob. Agents Chemother. 1995. V. 39. № 6. P. 1372–1375.
7. Титов И.В., Дорофеев В.Л., Арзамасцев А.П. Использование метода УФ-спектрометрии для установления подлинности лекарственных средств группы фторхинолонов // Вестник ВГУ. 2004. № 2. С. 264–269.
8. Zhang X., Sun P., Ru Bi, Wang J., Zhang Na, Huang G. Targeted delivery of levofloxacin-liposomes for the treatment of pulmonary inflammation // J. Drug Targeting. 2009. V. 17. № 5. P. 399–407.
9. Liu X., Wang J., Miao L., Zhang X., Huang G. Prolonged systemic delivery of antibacterial agent levofloxacin using liposomes // Asian J. Pharm. Sci. 2011. V. 6. № 6. P. 259–266.

## PRODUCTION AND INVESTIGATION OF PROPERTIES OF LIPOSOMAL LEVOFLOXACIN

**G.M. Sorokoumova<sup>®</sup>, Ya.O.H. Yasin, Ju.L. Mikulovich, \*T.G. Smirnova, \*S.N. Andreevskaya, \*\*A.A. Selischeva, \*L.N. Chernousova, V.I. Shvets**

*M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow, 119571 Russia*

*\*Central Research Institute of Tuberculosis, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 107564 Russia*

*\*\*M.V. Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty, Moscow, 119991 Russia*

<sup>®</sup>Corresponding author e-mail: galinams@yandex.ru

*Liposomal levofloxacin was prepared with the extrusion technique. Levofloxacin is a fluoroquinolone used for resistant tuberculosis treatment. Traditional lipids such as phosphatidylcholine (PC), as well as a mixture of PC and cholesterol (Chol) were used for liposome preparation. Antibiotic encapsulation into the liposomes was carried out with the passive and active loading methods. The active method of levofloxacin loading into liposomes was conducted with ammonium sulphate gradient. Levofloxacin encapsulation efficiency into liposomes containing PC/Chol (4:1, w/w) was found to be as high as 90% when active the loading method was used, while levofloxacin encapsulation efficiency was as low as 20% when the passive loading method was used. Levofloxacin releasing kinetics with Franz diffusion cell was investigated. Levofloxacin was shown to release gradually from liposomes containing PC and Chol to 18% for 21 h, while levofloxacin released completely for 3 h from antibiotic solution.*

*The prepared liposomal levofloxacin was used to test its activity on extensively drug resistant strain *Mycobacterium tuberculosis* CN-37 growth with automatized system BACTEC MGIT 960. *Mycobacterium tuberculosis* CN-37 was resistant to rifampicin, isoniazide, streptomycin, ethambutol, pyrazinamide, ofloxacin, amikacin, capreomicin. *Mycobacteria* growth monitoring with automatized system BACTEC MGIT 960 was based on fluorescence measurement of fluorophore located at the bottom of *Mycobacteria* Growth Indicator Tube (MGIT). This fluorophore is «neutralized» by high oxygen concentrations. The living bacterial cells take in oxygen, which results in fluorescent increase. The liposomal levofloxacin as well as levofloxacin solution at 1 and 2 mkg/mL were found to delay *mycobacteria* growth by 1-2 days while both levofloxacin forms at 4 mkg/mL inhibited *mycobacteria* growth completely. It means that the liposomal levofloxacin is active as an antibiotic solution against *mycobacteria*.*

*Summing up, it is the active loading method that can be rationally used for the liposomal levofloxacin preparing with maximal encapsulation efficiency. The prepared liposomes loaded with levofloxacin allow the antibiotic to release gradually. So, the antibiotic is active for a long time. It is important for increase of the antibiotic activity within human organism.*

**Key words:** levofloxacin, liposomal form, active encapsulation approach, encapsulation efficiency, *mycobacteria tuberculosis* with extensively drug resistant.