

A liposzómák története

The history of liposomes

Dr. Budavári Bálint Péter PhD hallgató

Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Nanokémiai Kutatócsoport

budavari.balint_peter@med.semmelweis-univ.hu

Initially submitted Febr.27, 2022; accepted for publication March 19, 2022

Abstract

The history of liposomes started in the middle of the 20th century, and they have gone through impressive progress in the last sixty years. Nowadays they have various applications e. g. pharmaceutical, cosmetics and food industry, although now we focus on the medical use. Their structure has changed a lot since their discovery, which results in important differences in their physicochemical and physiological-immunological behaviour. Liposomal drugs are used in lots of different indications such as tumour therapy, bacterial and fungal infections, dermatology, and rheumatoid arthritis.

kulcsszavak

legújkorai felfedezések, gyógyszerészet, liposzóma használata

keywords

recent discoveries, pharmacy, use of liposome

Kezdetek – A liposzómák felfedezése

A liposzómák története 1961-es felfedezésükig nyúlik vissza, amikor Dr. Alec D. Bangham brit hematológus és kollégája, R. W. Horne foszfolipidek negatív festésével a cambridge-i Babraham Intézet új elektronmikroszkópját tesztelték. A megfigyelt struktúrák sejtmembránokkal mutatott hasonlósága egyértelmű volt, és ez szolgált első képi bizonyítékkal a sejtthártya lipid-kettősréteg szerkezetéről. (Tikhshdeep, 2012) Bangham és munkatársai eredményeiket csak 1964-ben publikálták, és ekkor használták először a liposzóma kifejezést, ami két görög szó összetételéből származik: a „liposz” zsírt, a „szóma” pedig testet jelent. (Sharma, 2020) Az eredeti kísérletükben lecitin és koleszterin keverékét vizsgálták vizes közegben, és 2%-os Na-foszfovolframát oldattal festették. A diszperzióban rázatást vagy ultrahangos besugárzást követően egyes kis- és nagyméretű vezikulákat figyeltek meg. Ezek az apró gömbök lamelláris szerkezettel rendelkeztek, 44,2 Å szélességű lipid réteggel, valamint 25,6 Å szélességű vízréteggel. A lecitin gömbök lizolecitin hatására 70-80 Å méretű micellákat képeztek. (Nejat & Gregoriadis, 2005). További kísérleteiről maga Bangham 1983-ban így fogalmazott: „1962 végére meggyőződünk róla, hogy apró, 50 nm átmérőjű lipid zsákokat láttunk a mikroszkóp alatt” (Bangham A. , Liposome Letters, 1983).

Kezdetben a liposzómákat pusztán kutatási céllal használták, és elsősorban különböző permeabilitási tesztekben alkalmazták, mint modellmembránokat. Ezen a területen Bangham külön kiemeli az anesztetikumokkal végzett kísérleteit. (Bangham A. , Liposomes: the Babraham connection, 1993) Az elsőként előállított liposzómák nagyméretű, multilamelláris vezikulák voltak, ezt követően jelentek meg a

szakirodalomban a kis és nagyméretű unilamelláris liposzómák. Csoportosításuk egyik leggyakoribb szempontja manapság is a méretük és rétegeik száma, és angol elnevezéseik rövidítése után MLV-nek (multilamellar vesicles), LUV-nak (large unilamellar vesicles), és SUV-nak (small unilamellar vesicles, legfeljebb 100 nm-es átmérőjű gömbök) hívjuk ezeket a részecskéket. Már 1967-ben ultrahangos besugárzás útján alakították át az MLV-eket SUV-okká (Papahadjopoulos & Miller, Phospholipid model membranes - I. Structural characteristics of hydrated liquid crystals, 1967). Ezeket a SUV-okat elsősorban arra használták, hogy bizonyos anionok és kationok permeabilitási tulajdonságait megismerjék, a membrán lipid-összetételének függvényében. (Papahadjopoulos & Watkins, Phospholipid model membranes - II. Permeability properties of hydrated liquid crystals, 1967) A liposzómák első gyógyászati vonatkozása az 1970-es évek elején merült fel, amikor felismerték, hogy ezek a részecskék alkalmasak lehetnek bizonyos gyógyszerhatóanyagok bezárására, a külső fázistól történő elkülönítésére. (Gregoriadis, Gregory et al, 1971) Gregoriadis ebben a korai cikkében rávilágít a liposzómák alkalmazásának egyik kulcsfontosságú előnyére, egyúttal fény derül az egyik legfontosabb immunológiai problémára is. A kísérletben amiloglükozidáz enzimet zártak többrétegű liposzómákba, radioaktív jód-izotóppal (^{131}I) jelölt albuminnal együtt. Patkányokban intravénás adagolást követően 10 percen belül kiürült a keringésből a liposzómák 60%-a, ezzel szemben a ^3H -val jelölt koleszterin tartalmú liposzómák érintetlenek maradtak, és a bezárt fehérjék sem jutottak ki a vezikulákból. Megfigyelték, hogy a liposzómák a májban (és alacsonyabb koncentrációban a lépben) halmozódtak fel, azon belül is elsősorban a parenchimális és a Kupffer sejtekben. A megfigyelt tapasztalatok alapján a szerzők javasolták az olyan enzim-tartalmú liposzómák alkalmazását, amelyek célja a máj, illetve a lép, mivel a szabad hatóanyaghoz képest sokkal nagyobb arányban értek célba a liposzómába zárt enzimek, vagyis célzott hatóanyagleadást értek el, ami számtalan terápiás előnnyel jár, ugyanakkor problémát jelent az intravénás adagolást követő gyors elimináció. A későbbiekben erre vonatkozóan több megoldási javaslat is született a gyógyszertechnológiai fejlesztéseknek köszönhetően.

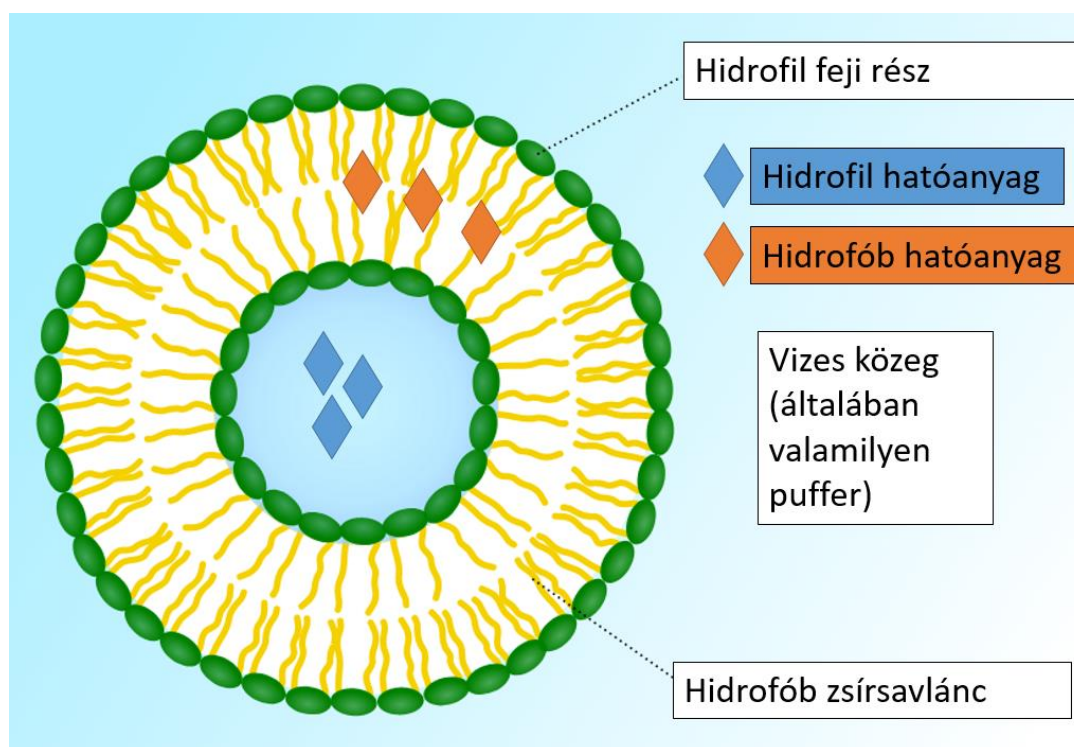
A liposzómák szerkezete

Mielőtt a liposzómák előállításának és felszíni módosításainak lehetséges technikáiról, előnyeiről és hátrányairól ejtenénk szót, fontos tisztázni, hogy molekuláris szinten hogyan épülnek fel ezek a kolloid mérettartományba eső részecskék. Liposzómákat számos különböző alapanyagból, sokféle módon létre lehet hozni, azonban van néhány közös tulajdonsága ezeknek a részecskéeknek. Először is alapvetően foszfolipidből épülnek fel, amelyek amfipatikus molekulák, vagyis egy poláris feji részből és egy apoláros oldalláncból állnak. A glicerín alapvázhoz csatlakozó poláris csoportot változatos kémiai struktúrák alkotják (pl. kolin, szerin, etanolamin, glicerol), amelyek egy foszforsavon keresztül kötődnek a glicerín harmadik szénatomjához. Az első két szénatomot pedig valamilyen 12-16 szénatomszámú, telített (pl. sztearinsav, palmitinsav) vagy telítetlen zsírsav (pl. olajsav) észteresíti. (Budai Marianna, 2001)

Ezen felül sokszor alkalmaznak koleszterint is az előállítás során. Ennek a zsírsavak karakterétől függően membránstabilizáló vagy destabilizáló hatása van: ha telítetlen zsírsav mellé épül be a membránba, akkor a kettős kötés következtében kialakuló szabad térrészbe be tud ékelődni a koleszterin, amennyiben viszont telített zsírsavakat tartalmazó foszfolipidek építik fel a membránt, akkor megtöri a rendezett struktúrát, és ezáltal csökkenti a membrán stabilitását. Ez a stabilitás elsősorban a fizikai-kémiai tulajdonságaiban (a fázisátalakulási hőmérsékletben), nyilvánul meg. A fázisátalakulási hőmérséklet minden foszfolipidre külön-külön, és a liposzómát alkotó keverékre egyaránt jellemző, de szám szerint eltérő értékű fontos paraméter, ami azt fejezi ki, hogy milyen hőmérsékleten következik be a membrán viszonylag merev gélállapotából a sokkal fluidabb, folyadékkristályos állapotába történő átmenet, azáltal, hogy fellazulnak a zsírsavláncok közötti kötőerők. (Budai Marianna, 2001) A membrán fluiditása a liposzómába zárt hatóanyag felszabadulása szempontjából kulcsfontosságú paraméter, ha ugyanis túlságosan hamar kijut a gyógyszer, mielőtt elérné a célterületet, akkor csökken a dózis a kívánt hatáshelyen, valamint megnő a nemkívánatos mellékhatások kockázata is. Ezért különösen jelentős, hogy a koleszterin

egy bizonyos arány felett lecsökkenti a membrán átteresztő képességét, ezzel biztosítva a bezárt hatóanyag hosszútávú felszabadulását. (Curby et al, 1980)

A foszfolipidek, és a köztük ékelődő koleszterin molekulák vizes közegben olyan kettősréteg szerkezetet vesznek fel, amelyben a hidrofób láncok befelé (egymás felé), a hidrofíli feji részek pedig kifelé, a vizes közeg irányába mutatnak. A zsírsavláncok hosszától függően a kettősréteg vastagsága 7-10 nm között változik. (Budai Marianna, 2001) (Balgavy, 2001) Fontos, hogy a liposzómát alkotó foszfolipidek vagy természetes eredetűek, vagy azok módosított változatai, amelyek nem toxikusak, és biodegradálhatók. Ezzel szemben magukat a liposzómákat (később részletezendő folyamatok révén) az immunrendszer idegen anyagként észleli, így a vérkeringésbe bejutva különböző immunreakciókat váltanak ki. Ezt az ún. elsőgenerációs vagy más néven konvencionális liposzómák esetében figyelték meg, és kezdetben komoly hátráltató tényezőnek bizonyult a liposzómák gyógyszerek további kutatásában-fejlesztésében, valamint későbbi elterjedésében. (Mohamed, 2019) Gabizon és Papahadjopoulos 1988-ban publikált eredményei alapján a fázisátalakulási hőmérsékletnek nem csupán fizikai-kémiai, hanem immunológiai szempontból is komoly jelentősége van, ugyanis a magasabb fázisátalakulási hőmérséklettel rendelkező liposzómák hosszabb keringési idővel rendelkeznek. (Gabizon & Papahadjopoulos, 1988)



1. ábra: A liposzóma általános szerkezete (Wikimedia commons alapján saját szerkesztés)

Előállítási módszerek

Liposzómákat számos különböző módszerrel lehet előállítani, ám ezen módszerek között van némi átfedés, és alapvetően mind egy közös metódust követnek. Az első lépés a membránalkotó lipidek feloldása valamilyen szerves oldószerben, majd az oldószer eltávolítása (jellemzően párologtatás útján), miközben vékony lipidfilm képződik a tárolóedény falán. Ezt követően vizes közegben melegítés és rázogatózás közben spontán módon képződnek a liposzómák. Ezt a módszert röviden vékonyréteg hidratációs technikának nevezik a szakirodalomban, és a mai napig széles körben alkalmazzák. (Bangham & Standish, 1965) (Akbarzadeh, 2013) Az ezen módszerrel előállított MLV-eket többféle módon is át tudjuk alakítani SUV-okká. Az egyik, korábban már említett módszer az ultrahangos besugárzás alkalmazása, azonban ennél

sokkal megbízhatóbb, és reprodukálható eredményt nyújt az ún. extrudálás, amely során egy vékony, tetszőleges pórus-átmérővel (50-1000 nm) rendelkező polikarbonát membránon préseljük át a liposzómákat tartalmazó kolloid oldatot. (Olson, F. et al, 1979) Ezen felül számos egyéb módszer létezik, azonban célszerű ezeket csoportosítani, méghozzá a liposzóma-előállításával szoros összefüggésben álló, hatóanyag-bezárási technikákkal együtt, ugyanis sok esetben ez a két lépés nem különíthető el egymástól, és a kívánt hatóanyag csapdázása a liposzómán belül az előállítási procedúra köztes lépésévé válik. A hatóanyag liposzómába történő bejuttatása két alapvetően különböző úton mehet végbe: aktív és passzív módon. Az aktív módszer sokszor valamilyen kémiai folyamatot takar, amely során a hatóanyag oldhatósági viszonyai különböznek a membrán két oldalán, és kikristályosodás vagy komplexképződés útján csapdába esik a liposzómán belül. Ilyen módszert alkalmaznak a szakirodalomban sokszor idézett, doxorubicin tartalmú Doxil® előállítása során is. A passzív csapdázási technikákat további alcsoportokra oszthatjuk: mechanikai diszpergálásra, oldószer-diszperziós módszerre, valamint detergens-eltávolításos módszerre. A korábban említett ultrahangozás és extrudálás a mechanikai módszerek közé tartozik, de ezen az alcsoporton belül helyezkedik még el az angol szakirodalom által „French pressure cell extrusion”-nek nevezett módszer, a gyors fagyasztás – lassú olvasztás, a fagyasztva szárítás, és a mikroemulgeálás. (Akbarzadeh, 2013)

Ultrahangozás

Az ultrahangos besugárzás az egyik legrégebbi módszer az MLV-k SUV-okká történő átalakítására, és két különböző technikával is megvalósítható. Alapvető hátránya ennek a módszernek a hatóanyag alacsony bezárási hatásfoka, valamint a liposzómákat alkotó foszfolipidek, illetve adott esetben a hatóanyag esetleges bomlása (ebből következik, hogy makromolekulák bezárása nem valósítható meg így), továbbá az ultrahangzó berendezésből származó fémszennyezés is előfordulhat. Ezenkívül maradhatnak MLV-k kimutatható mennyiségben az oldatban a SUV-ok mellett. A két ultrahangozási technika közül az egyik esetben a szonikátor feje (az ultrahang forrása) közvetlenül belemerül a liposzómás oldatba, ami igen nagy energiaterhelést jelent a rendszernek, ezért mindenképpen szükséges az oldat hűtése (általában vízfürdő segítségével). A másik lehetőség, hogy egy kádba helyezzük a mintát, ekkor kevésbé kritikus az oldat hűtése, de itt sem elhanyagolható. Ebben az esetben lehetséges a minta steril kezelése (zárt edényben tartva vagy inert atmoszféra biztosításával). (Akbarzadeh, 2013)

French pressure cell extrusion

Ez egy olyan folyamatot takar, amely során az MLV-ket tartalmazó oldatot átpréseljük egy apró nyíláson. Ekkor az ultrahangos módszerhez képest nagyobb méretű SUV-okat nyerünk, azonban ez az eljárás sokkal kíméletesebb a fehérje tartalmú mintákkal szemben, valamint az ultrahangozott liposzómákhoz képest hosszabb ideig tudják visszatartani a bezárt hatóanyagot. Általában véve célszerű ezt a technikát választani a külső hatásokra érzékenyebb, instabil hatóanyagok esetén. Egyedüli hátránya a relatíve kicsi sarzsméret, ami általában 50 ml körül maximalizálódik, illetve magas hőmérsékleti tartományban kevésbé megbízható a módszer. (Akbarzadeh, 2013) Lawrence D. Mayer írt egy 1986-os cikkében erről a módszerről, és az eddig leírtakon felül azt tapasztalta, hogy a hatóanyag bezárási hatásfoka 25% körül mozog, ám a molekulatömeg növelésével ez az érték lecsökken. (Mayer, 1986)

Fagyasztás-olvasztás

Ezzel a módszerrel nagyméretű unilamelláris liposzómákat lehet előállítani SUV-okból azáltal, hogy a kisméretű liposzómákat hirtelen lefagyasztjuk, majd lassan felolvasztjuk. Így elérjük, hogy a kis liposzómák fuzionáljanak, és ezáltal LUV-okat képezzenek. Ennek a technikának a limitáló tényezője a foszfolipid-koncentráció megemelése, és a közeg ionerősségének a növelése. A hatóanyag bezárási hatásfoka várhatóan 20-30% között alakul. (Akbarzadeh, 2013) (Pick, 1981)

Mikroemulgeálás

A maga nemében egyedülálló módszer, mivel kisméretű, de többrétegű liposzómák előállítására alkalmas. A folyamat a következő lépésekből áll: a koncentrált lipid-oldatot egy 5 µm átmérőjű lyukon nagy nyomással átpréselik, majd ezt követően két ágra szakad az áramlat (előre meghatározott csatornák mentén), hogy aztán nagy sebességgel keveredjenek, így kellően nagy energiával rendelkeznek a részecskék a külső rétegek leszakadásához. A készülékbe akár MLV-k formájában, akár valamilyen szerves oldószerben oldott lipidek formájában bejuttatható az alapanyag. A kész liposzómák mérete jellemzően 100-200 nm közé esik. (Chandraprakash Dwivedi et al, 2013) Maga a technika viszonylag új, és a szakirodalomban is kevés hivatkozás van rá, jellemzően az utóbbi 10-15 évben jelentek meg az első cikkek ebben a témában.

Oldószer elpárologtatás

A második nagy csoportja a liposzóma előállítási módszereknek az oldószer (jellemzően valamilyen szerves oldószer) elvonásán alapul. Ez leggyakrabban éter vagy etilalkohol szokott lenni. A módszer lényege a következő: a dietil-éter vagy éter-metanol elegyet fokozatosan a hatóanyag vizes oldatához keverik, miközben a rendszert 55-65°C közé melegítik, vagy csökkentett nyomáson tartják. Ezáltal a szerves oldószer gáz halmazállapotba kerül, és a liposzómák vizes oldata marad hátra. Lényeges hátránya ennek a technológiának, hogy a képződő vezikulák mérete relatíve széles tartományt ölel fel (70-200 nm között ingadozik), valamint adott esetben problémát jelenthet a hatóanyag számára a magas hőmérséklet. Ezt a technikát először egy 1978-as cikkben említik, amelyben transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével vizsgálták az elkészült mintákat. A liposzómák mérete jellemzően 100-200 nm között változott, és a mikroszkópos felvételek alapján jelentős mértékű aggregáció zajlott le a mintában. További lényeges megfigyelés, hogy jelentős számban alakultak ki többrétegű liposzómák is. (Deamer, 1978)

Amennyiben etanolt használunk oldószernek, a folyamat hasonlóan zajlik le: hirtelen, nagy mennyiségű pufferbe fecskendezzük a lipidek alkoholos oldatát, és itt is várhatóan széles tartományt ölel fel a képződő liposzómák mérettartománya (30-110 nm). További jelentős hátránya ennek a módszernek, hogy a liposzómák oldata nagyon híg, valamint az etilalkohol eltávolítása sem egyszerű feladat, mivel azeotrópos elegyet képez a vízzel, márpedig számos gyógyszerhatóanyag érzékeny lehet már minimális mennyiségű etanolra is. (Bosch, 1997)

Érdemes itt megjegyezni, hogy a szerves oldószer használatával járó eljárások fokozatosan szorulnak ki a gyógyszeriparból. Nemcsak napjainkban, de már néhány évtizeddel korábban megjelent ugyanis az a technológia, ami lehetővé teszi ezen vegyületek elhagyását, ugyanakkor rendelkezik a sokszor nélkülözhetetlen apoláris tulajdonsággal, így számos hidrofób hatóanyag oldódik benne. Ez pedig nem más, mint a szuperkritikus széndioxid, amit liposzómák előállításához is fel lehet használni, és erről már 1997-ben írt L. Frederiksen a Journal of Pharmaceutical Sciences hasábjain. (Frederiksen, 1997)

Detergens eltávolításos módszer

Ezzel a módszerrel nagyméretű unilamelláris liposzómákat kapunk, azáltal, hogy egy detergens hozzáadásával a vizes közegben elérjük annak kritikus micellaképződési koncentrációját. Ekkor micellákat képez az anyag, ezeknek a belső fázisában helyezkednek el a leendő liposzómák membránalkotó lipidjei. Ezután dialízis által kivonjuk az oldatból a detergenst, így LUV-okat kapunk végeredményül. Ehhez a módszerhez létezik speciálisan erre a célra kifejlesztett eszköz is (LipoPrep, Diachema AG, Svájc). (Akbarzadeh, 2013) A szakirodalomban jelenleg kevés hivatkozást találunk rá, nem elterjedt módszer.

A liposzómák fejlesztése

Elsőgenerációs liposzómák

A Bangham és munkatársai által alkotott első liposzómák szerkezete nagyon egyszerű volt: csupán foszfolipidekből és koleszterinből álltak, és a szakirodalomban konvencionális vagy elsőgenerációs liposzómáknak nevezik ezeket a részecskéket. Ezek a liposzómák nem rendelkeztek semmilyen kitüntetett

felszíni töltéssel, és egyéb felszíni módosításon sem estek át. Ennek következtében a retikulo-endotheliális rendszer (RES) sejtjei néhány óra alatt felveszik a keringésből az ilyen liposzómákat (amennyiben intravénás úton jutottak be a szervezetbe). (Scherphof, Gerrit L. et al, 1985) Ezt a jelenséget terápiás úton ki lehet használni, amennyiben az a cél, hogy valamilyen antimikrobás, illetve parazitaellenes szert juttassunk a RES-be, például leishmaniasis esetében. Amennyiben viszont a szervezet más területét célozzuk a liposzómás gyógyszerrel, ez a jelenség komoly problémát jelent. (Immordino et al, 2006)

A liposzómák makrofágok által történő felvételéhez vezető út első lépése a szérumfehérjék kötődése a liposzómák felszínéhez. Ez kulcsfontosságú, ugyanis önmagában a liposzómákat nem ismeri fel a RES, azonban a felszínükön rögzülő opszoninokat annál inkább. (Immordino et al, 2006) Az opszonizációs folyamat vizsgálatával számos kutatócsoport foglalkozott, és 1981-től 1995-ig az alábbi, az opszonizációban fontos szerepet betöltő fehérjéket azonosították: C-reaktív protein (Volanakis, John E. et al, 1981), immunglobulinok (HM, Patel, 1992), β -2-glikoprotein (Chonn A, 1995), β -2-makroglobulin (Murai M. et al, 1995). Az opszonizáció mellett a komplement rendszer aktiválódása is fontos szerepet játszik a hagyományos liposzómák által kiváltott immunreakciókban. A komplement rendszer kaskád sorában kiemelt jelentőségű a C5b-9 komplex, amelyek direkt membránkárosító hatású, mivel pórusokat képez a lipidmembránban. Ez a liposzómák esetén a bezárt hatóanyag idő előtti felszabadulását eredményezi. Vannak azonban bizonyos fehérjék, amelyek képesek megakadályozni az idegen részecskék felismerését és fagocitózist. Ezeket az angol szakirodalom „dyopsonic proteins”-nek nevezik, és ebbe a csoportba tartozik például a humán szérum albumin, és az IgA antitestek. Jelentőségük abban rejlik, hogy az előbb említett, fagocitózist serkentő fehérjékkel alkotott egyensúlyuk határozza meg a liposzómák clearance-ét. (Ishida, Tatsuhiro et al, 2002) A konvencionális liposzómák további hátránya, hogy a plazmában keringő lipoproteinekkal (HDL és LDL) is könnyen interakcióba lépnek, ami végső soron szintén a bezárt hatóanyag gyors kiürüléséhez vezet. (Senior & Gregoriadis, 1982)

Mindezek hatására intenzív kutatások indultak a liposzómák stabilitásának növelése érdekében. Már a 90-es évek elejére fényt derítettek számos, a stabilitást nagymértékben befolyásoló tényezőre, úgymint: felszíni töltés, hidrofobicitás, méret, és fluiditás. (HM, Patel, 1992) A membrán összetételének módosításával értelemeszerűen a membrán fluiditása is megváltozik, és ennek a folyamatnak a törvényszerűségeiről már 1981-ben írtak Damen és munkatársai. Megfigyeléseik alapján a koleszterin jelenléte, illetve mennyiségének növelése csökkenti a foszfolipidek átjutását a HDL-be, valamint a telített zsírsavakat tartalmazó foszfolipidek szintén javítják a liposzómák stabilitását a vérkeringésben. (Damen, Jan et al, 1981) A liposzómák méretével kapcsolatos kísérletek arra az eredményre vezettek, hogy a nagyobb méretű vezikulák hamarabb eliminálódnak a vérkeringésből, mint a kisméretűek. (Senior & Gregoriadis, 1982) A liposzómák felszíni töltése szintén befolyásolja a részecskék stabilitását, méghozzá az alábbi módon: a negatív töltéssel rendelkező liposzómák rövidebb féléletidővel rendelkeznek a semlegesekhez képest, (Nishikawa, Arai, & Inoue, 1990) (Funato, Kouichi et al, 1991) míg a pozitív töltésűek toxikusak, így rendkívül gyorsan lezajlik az eliminációjuk. (Senior, Judith et al, 1987) A helyzetet némileg tovább bonyolítja, hogy a komplement-aktivációs képességeik összefüggenek a liposzómák felszíni töltésével, vagyis a megfigyelések szerint a töltéssel rendelkező (akár negatív, akár pozitív) vezikulák sokkal nagyobb mértékben aktiválják a komplement rendszert, mint a töltés nélküliek. Igaz, a mechanizmusuk eltérő: a negatív liposzómák a klasszikus útvonalon, a pozitív töltésűek pedig az alternatív útvonalon fejtik ki hatásukat. (A. Cohn et al, 1991) (J. Marjan et al, 1994) (A. J. Bradley, 1998) (M. E. Price et al, 2001)

Annak ellenére, hogy a konvencionális liposzómákkal kapcsolatban felmerült néhány immunológiai kihívás, számos olyan gyógyszerkészítmény kapott forgalomba hozatali engedélyt, vagy tart valamelyik klinikai vizsgálati fázisban, ami elsőgenerációs liposzómákat tartalmaz. Az első ezen a listán a DaunoXome[®] nevű, Kaposi-szarkóma kezelésére használt gyógyszer, ami daunorubicint tartalmaz, és disztearoil-foszfadilkolinból valamint koleszterinből épül fel. Ezt a gyógyszert a Nexstar Pharmaceuticals hozta

forgalomba 1995-ben. A másik, hasonló típusú gyógyszer doxorubicint tartalmaz tojás-foszfatidilkolin és koleszterin keverékéből képzett liposzómákban. Myocet vagy Evacet néven került forgalomba (régiónként eltérő névvel), 2000-ben az Elan Pharma által. Terápiás indikációja az áttétes mellrák.

Módosított liposzómák

Habár már az első generációs liposzómák esetében is történtek módosítások, ezek nem hoztak lényeges áttörést a gyógyszeres terápiában, és a legtöbb fizikai-kémiai vagy immunológiai jellegű problémára sem kínáltak megoldást. A sejten belül a konvencionális liposzómák nagy arányban halmozódnak fel a liposzómákban, ahol lebontásra kerülnek, ami terápiás szempontból kifejezetten előnytelen végkimenetelnek tekinthető. Ezt megelőzendő, a vírusok analógiáját követve, olyan pH-érzékeny liposzómákat készítettek, amelyek az endoszóma membránjával képesek fuzionálni. Ez a vírusok esetében az örökítőanyag, a liposzómák esetében pedig a bezárt hatóanyag citoszolba történő kijuttatását teszi lehetővé. (Chu C. J. et al, 1990) Az ilyen gyógyszer szállító rendszerek alkalmazása kifejezetten előnyös lehet, amennyiben a célzott régió pH-ja patológiás körülmények között eltér a környezet pH-jától, így egyfajta passzív célzott terápia valósítható meg általuk. Fontos kiemelni, hogy ez a jelenség hozzájárul ahhoz, hogy lecsökkenjen a várható mellékhatások száma és intenzitása.

Egy másik ígéretes fejlesztési útvonalat képviselnek az immunliposzómák. Ezek olyan vezikulák, amelyek felszínén valamilyen, az adott terápiás célnak megfelelő antitestet rögzítettek. Ezek a kísérletek rendkívül ígéretesnek bizonyultak *in vitro* körülmények között, (Engelhard et al, 1984) azonban az *in vivo* kísérletek során bebizonyosodott, hogy a szérumfehérjék jelenléte nagymértékben megnehezíti az ilyen liposzómák célbajuttatását.

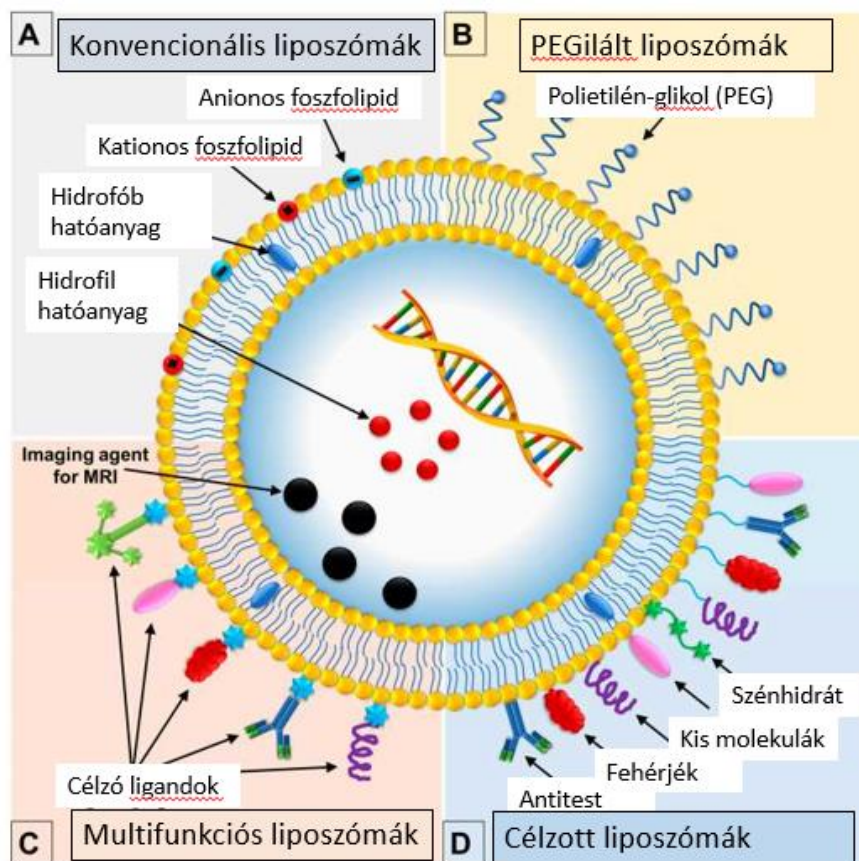
A liposzómáknak egy másik, az immunrendszerrel történő interakcióra épülő fontos felhasználási lehetősége az adjuvánsként történő alkalmazásuk. A makrofág-aktiváció, és antitest-termelés fokozására kifejlesztett hatásokról már 1991-ben, (R. A. C., 1991) a citotoxikus T-sejtek indukálásáról és a következményes tumorelles aktivitásról pedig már 1984-ben írtak (LeGrue S. J. et al, 1984) (Raphael L., 1984) A liposzómák vakcinákban betöltött (lehetséges) szerepéről egy későbbi fejezetben részletesebben lesz szó.

A gyógyszer technológia általános fejlődésével és a páciensek egyedi igényeinek mindinkább megfelelni vágyó terápiás célok előtérbe kerülésével egyre nagyobb hangsúlyt fektettek a gyógyszer gyártók a nyújtott hatóanyag-leadású rendszerek kifejlesztésére. Ez számtalan előnnyel jár a beteg és az egészségügyi rendszer, az egészségipar minden résztvevője számára, de ezek közül kétség kívül az a legfontosabb szempont, hogy a páciens számára kedvezőbb terápia alakítható ki, és ritkábban kell adagolnia a gyógyszert/gyógyszereit. A liposzomás gyógyszerek vitathatatlan előnyei közé felsorakozott az újabb fejlesztések révén az időben nyújtott hatóanyag leadás. Ez azonban nem valósítható meg bizonyos felszíni membrán-módosítások nélkül, hiszen a korábban részletezett okokból kifolyólag az immunrendszer bizonyos sejtjei relatíve hamar felismerik ezeket a testidegen részecskéket, és néhány óra alatt kivonták őket a keringésből. Vannak azonban olyan terápiás indikációk (például tumor-terápia), ahol kifejezetten fontos, hogy a hatóanyag hosszú időn keresztül lassan szabaduljon fel a hordozó rendszeréből, és folyamatosan biztosítsa a minimálisan effektív koncentrációt a célterületen. A liposzómák keringési idejének megnövelése céljából az első sikeres kísérleteket a 80-as évek végén végezték. Allen és Cohn 1987-ben gangliozid GM1, Gabizon és Papahadjopoulos pedig 1988-ban foszfatidilinozitol segítségével érte el a liposzómák megnövelt féléletidejét (Allen T. M., 1987) (Gabizon A., 1988), de a legnagyobb áttörést a polietilén glikol (PEG) alkalmazása hozta meg 1994-ben. Ebben az esetben a polimert kovalensen kötötték a membránalkotó lipidek valamelyikéhez, maga a PEG pedig ideális esetben 1500-5000 Da közötti molekulatömeggel rendelkezett. (Lasic D. et al, 1994) A PEG szerepe összetett: fontos a szterikus úton történő stabilizáló hatása, ami megakadályozza a liposzómák egymás közötti, valamint a szérumfehérjékkel (immunglobulinok,

komplement fehérjék, fibronektinek, stb.) szemben bekövetkező adhézióját, adszorpcióját. (Hadis Daraee et al, 2014) Ebből következik, hogy az immunrendszer elemei sem fogják idő előtt felismerni ezeket a részecskéket.

Ezeket a többnyire PEG-réteggel borított liposzómákat az angol szakirodalomban „stealth”, magyarul lopakodó vagy álcázott liposzómáknak nevezzük, és terápiás sikerüket mi sem bizonyítja jobban, mint a számos szabadalmaztatott liposzomás gyógyszer, amelyek közül sok még a mai napig is forgalomban van. Ezek legkiemelkedőbb, és a szakirodalomban is leggyakrabban említett példája a Sequus Pharmaceuticals által 1995-ben forgalomba bocsátott Doxil/Caelix® nevű gyógyszere, ami doxorubicin tartalmú, PEGilált liposzómákat tartalmazó, intravénás úton alkalmazandó gyógyszer Kaposi-szarkómára, valamint petefészek-és mellrák kezelésére. Maguk a liposzómák hidrogénezett szója-foszfátidilkolin, koleszterin, és metoxi-polietilén-glikol-2000-rel kötött disztearoil-foszfátidiletanolamin keverékéből állnak (56:39:5 molarányban). A technológia létjogosultságát bizonyítja, hogy még 2015-ben is forgalomba került egy hasonló liposzomás gyógyszer: a Merrimack Pharmaceuticals Inc. irinotecan tartalmú, Onivyde™ nevű készítménye. Ezt fluorouracillal és leukovorinnal kombinációban alkalmazzák a hasnyálmirigy metasztázisos adenokarcinómájára. (Upendra Bulbake, 2017)

Habár a PEG alkalmazása valóban jelentős áttörést hozott a liposzomás gyógyszerek fejlesztésében, és számos ilyen típusú gyógyszert hoztak forgalomba, amelyek napjainkban is elérhetőek, sajnos ez a módszer sem tökéletes, és felvetett néhány új, leküzdendő problémát. Ezek szintén immunológiai jellegűek, és változó gyakorisággal fordulnak elő a klinikai gyakorlatban. Az egyik ilyen jelenség, az angolul „ABC-phenomenon”-nak nevezett jelenség, ami a PEGilált liposzómák ismételt adagolásánál jelentkező, felgyorsult clearance-t takarja. Magyarázata: az első dózist követően PEG-elleni antitesteket kezd termelni a szervezet, ami jelentősen meggyorsítja az ismételt dózis kiürülését a szervezetből, tehát rontja a gyógyszer terápiás hatékonyságát. A jelenséget azonban árnyalja néhány paraméter: a magas lipid-dózis, a második dózis előtt eltelt hosszú idő (legalább négy hét), citotoxikus hatóanyag bezárása, valamint változás a liposzóma méretében és felszíni töltésében mind hozzájárul a felgyorsult clearance kivédéséhez. Sajnos a jelenséggel összefügg egy élelmiszeripari trend is: egyes megfigyelések szerint az élelmiszerekben fokozódó mennyiségben jelenlévő PEG (mint adalékanyag) szintén kiválthat ilyen immunreakciót, aminek következtében az adott személyen a liposzóma első dózisének beadásakor allergiás reakció mutatkozik. (Marwa Mohamed et al, 2019) Ezen kívül sokszor merül fel jogi akadály is: számos PEGilált liposzómák előállításával foglalkozó módszer szabadalma érvényben van a mai napig, ami jelentősen megnehezíti az új gyógyszerek kifejlesztését.



2. ábra: Módosított liposzómák típusai (<https://www.creative-biolabs.com/lipid-based-delivery/classification-of-liposomes.htm>)

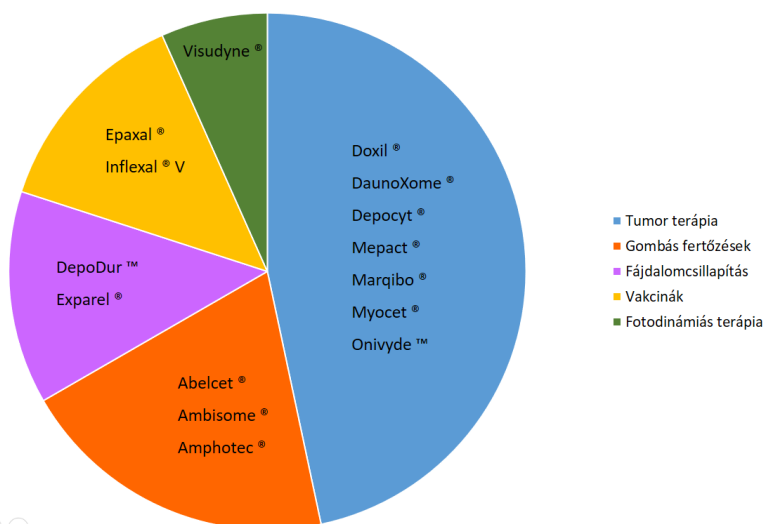
Mit hoz a jövő?

A liposzómák kutatása-fejlesztése napjaink egyik legdinamikusabban fejlődő területéhez, a nanomedicina tudományához tartozik. Ebből kifolyólag számos újdonságot tartogat ez a kutatási irány, nem csupán gyógyszer technológiai innovációk révén, hanem új terápiás indikációk bevonása által egyaránt.

Technológiai vonalon ígéretes iránynak tűnik a PEG alternatíváit kereső kísérletek sorozata. A fent részletezett (főként immunológiai eredetű) problémák elhárítására ideális megoldást nyújtana egy új, megfelelő polimer megtalálása és integrálása a liposzómás gyógyszerek terápiájába, amely képes megtartani a PEG-réteg nyújtotta előnyöket, azonban nem indukál olyan kedvezőtlen immunreakciókat, amelyekkel eddig találkoztunk. Habár maga az elképzelés nem teljesen újkeletű, mivel már a 90-es évek közepén elindultak ilyen irányú kutatások, a mai napig történnek új felfedezések. Az első jelöltek a PEG helyettesítésére a szintetikus poli-vinil-pirrolidon és a poli-akril-amid voltak. (Torchilin et al, 1994) (Az utóbbi széleskörű felhasználását akadályozza a monomer toxikus karaktere.) 2001-ben több különböző kutatócsoportnak is sikerült hosszú keringési idővel rendelkező liposzómákat előállítaniuk új polimerek felhasználásával: poli-[N-(2-hidroxi-propil)-metakrilamiddal, (Whiteman K. R., 2001) poli-N-vinilpirrolidonokkal, (Torchilin et al, 2001) és L-aminosav-alapú, biodegradábilis polimer-lipid konjugátumokkal (H., Takeuchi, 2001) végeztek sikeres kísérleteket. Ezt követően, az utóbbi 5 éven belül számtalan újabb polimert vizsgáltak meg, amelyek közül csak néhány fontos példa kerül említésre az alábbiakban. 2016-ban a glicerinnel különböző polimer-származékait vizsgálták, és habár számtalan előnyös tulajdonsággal rendelkezőt találtak, és ruházta fel a liposzómákat (kellő mértékben szerteágazó, nem immunogén, erősen hidofil, vizes oldata alacsony viszkozitású, biokompatibilis, kellően hosszú keringési időt biztosít a liposzómáknak, valamint nem jelentkezik az „ABC-phenomenon” sem), azonban túlságosan

nagy mértékben felhalmozódik a májban és a vesékben, ami jelentősen korlátozza gyógyszerhordozó rendszerként történő hasznosításukat. (Zhang, P. et al, 2016) Egy 2018-as cikkben a polioxazolinokat (POX) vizsgálták, mint lehetséges alternatív megoldást. Ezek termoszenzitív polimerek, hidrofil és hidrofób közegben is jól oldódnak, ellenállnak az oxidatív stressznek, valamint nem halmozódnak fel a szervezetben belül. Könnyen penetrálnak a nyálkahártyákon keresztül, amit nemcsak liposzómákkal végzett kísérletekben, hanem egyéb, gyógyászati szempontból releváns nanorészecskékkel is bizonyítottak. Egyetlen hátrányuk, hogy az előállítási költségeik nagyon magasak, mivel maga a szintézis is bonyolult folyamat, ezért jelenleg nem rendelkezik engedéllyel sem az FDA-tól, sem pedig az EMA-tól. (Khutoryanskiy, 2018)

A liposzómás gyógyszerek elterjedésének másik lehetséges útvonala az új terápiás indikációk feltérképezésében és kiaknázásában rejlik. Jelenleg az alábbi területeken vannak forgalomba hozatali engedéllyel rendelkező liposzómás gyógyszerek: tumor-terápia, antimikrobás szerek (elsősorban gombás fertőzésekre), fájdalomcsillapítók, vakcinák, fotodinámiai készítmények. Ezek közül a különböző daganatellenes szerek csoportja öleli fel a legnagyobb kategóriát, de a felsoroltakon kívül más területeken is zajlanak intenzív kutatások, elsősorban a különböző gyulladásos betegségek terápiájában (például reumatoid arthritis) A jelenlegi és jövőbeli terápiás indikációkat a következő ábrák szemléltetik.



3. ábra: Forgalomba hozott liposzómás gyógyszerek megoszlása terápiás indikációik szerint (Upendra Bulbake, 2017) alapján saját szerkesztés)

Klinikai vizsgálati fázisok					
I.		II.		III.	
Név	Hatóanyag	Név	Hatóanyag	Név	Hatóanyag
LEM-ETU	mitoxantron	Aroplatin	platina-analóg	Arikace	amikacin
Grb-2	antiszensz-fehérje	S-ANNA	annamicin	Stimuvax	tekemotid
INX-0125	vinorelbin	SPI-077	ciszplatin	T4N5	T4 endonukleáz V
INX-0076	topoketán	OSI-211	lurtotekán	Liprostin	PGE-1
LiPlaCis	ciszplatin	S-CKD602	CKD-602	Thermodex	doxorubicin
SGT-53	p-53	LEP-ETU	paklitaxel	Lipoplatin	ciszplatin

1. táblázat: Különböző klinikai fázisban lévő liposzómás gyógyszerek ((Upendra Bulbake, 2017) alapján saját szerkesztés)

Az előbb felsorolt kategóriák közül napjainkban kiemelkedik a vakcinák jelentősége. A SARS-CoV-2 2019-es megjelenésével és 2020-as világszintű elterjedésével gyökeresen átformálta a gyógyszeripart is, és az új koronavírus elleni vakcinák kifejlesztésében sokat segített, hogy már meglévő technológiákra tudott építkezni. A Pfizer-BioNTech és a Moderna mRNS-alapú vakcinája úttörőnek számít a védőoltások történetében, és ezek technológiai megvalósításában a liposzómák fejlesztése is fontos szerepet játszott. A liposzómákkal történő DNS/RNS transzfer lehetősége már régen felmerült, azonban jelentős problémát jelentett, hogy a nukleinsav negatív karakteréhez ideálisan illeszkedő, permanens pozitív töltésű liposzómák toxikusak a szervezet számára. Ezért egy új megoldásra volt szükség: a környezet pH-jától függő töltéssel rendelkező lipideket alkalmaztak, amelyek a vér pH-ján semlegesek, azonban savas környezetben (az endoszóma belsejében) pozitív töltésűek lesznek, így segítve a bezárt anyag kijutását a citoplazmába. Az előbb említett vakcinák esetében, tekintettel a bezárt hatóanyag jellegére, a vizes belső fázissal rendelkező liposzómák helyett olyan lipid nanorészecskéket alkalmaztak, amelyek nem üregek, így belső fázisuk is lipofil. (Cross, 2021)

A SARS-CoV-19 elleni vakcinák előtt is került forgalomba néhány, liposzóma-alapú védőoltás. Ezek egyike az Epaxal® (1993.), ami inaktivált hepatitis A vírust tartalmaz a liposzómák felszínéhez rögzítve. Az alumínium-hidroxidhoz hasonlóan az adjuváns szerepét tölti be a liposzóma ebben az oltásban, és habár statisztikailag nincs szignifikáns különbség a kiváltott immunvédelemben (a hagyományos alumínium-hidroxid-tartalmú vakcinához képest), a liposzómás változat beadását követően kevesebb oltási reakcióról számoltak be. Egy másik említésre méltó példa az Inflexal® V, ami egy 1997-es influenza elleni védőoltás volt. Érdekeség, hogy mindkét vakcinát ugyan az a cég fejlesztette és gyártotta (Crucell, Berna Biotech), és mindkét esetben 150 nm körüli méretű, azonos összetételű liposzómákat használtak (dioleoil-foszfatidil-kolin és dioleoil-foszfatidil-etanolamin 3:1 molarányú keverékét). A hagyományos és az aleggység influenza vakcinákhoz képest is szignifikánsan erősebb immunválaszt váltott ki a liposzóma alapú védőoltás, valamint a többihez képest jobban tolerálhatónak bizonyult. (Upendra Bulbake, 2017)

Összegzés

A liposzómák és a liposzómás gyógyszerek fejlesztése az elmúlt fél évszázad során számos fontos mérföldkövön esett át, és napjainkban is egyre bővül a felhasználási területük mind a kutatás-fejlesztésben, mind pedig a klinikai gyakorlatban. A modern gyógyszerészi szemléletnek megfelelően ezek a gyógyszerhordozó rendszerek számtalan előnyt biztosítanak a gyógyszeres terápiában a hagyományos gyógyszerformákhoz képest (célzott és nyújtott hatóanyagleadás, mellékhatások csökkentése), és amennyiben sikerül a jelenleg fennálló (főként immunológiai jellegű) kihívásokat leküzdeni, széles körben elterjedhetnek egyre több betegség kezelésében.

Irodalomjegyzék

- AKBARZADEH, A. (2013). Liposome: classification, preparation, and application. *Nanoscale Research Letters*, 8(102). <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>
- ALLEN, T. M. (1987). Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Letters*, 223. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80506-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80506-9)
- ALVING, C. R. (1991). Liposomes as carriers of antigens and adjuvants. *Journal of Immunological Methods*, 140, 1-13. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90120-5](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90120-5)
- BALGAVY, P. (2001). Bilayer thickness and lipid interface area in unilamellar extruded 1,2-diacylphosphatidylcholine liposomes: a small-angle neutron scattering study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 40-52. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(01\)00298-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(01)00298-X)
- BANGHAM, A. (1983). Liposome Letters. *Academic Press*.
- BANGHAM, A. (1993). Liposomes: the Babraham connection. *Chemistry and Physics of Lipids*, 275-285. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(93\)90071-A](https://doi.org/10.1016/0009-3084(93)90071-A)
- BANGHAM, A., & STANDISH, M. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13, 238-252, 238-252. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6)
- BOSCH, I. (1997). Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine behave as substrates of the human MDR1 P-glycoprotein. *Biochemistry*, 36. <https://doi.org/10.1021/bi962728r>
- BRADLEY, A. J. et al (1998). Inhibition of liposome-induced complement activation by incorporated poly(ethylene glycol)-lipids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 357, 185-194. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0798>
- BUDAI, M. et al (2001). A liposzóma mint gyógyszer szállító rendszer - A liposzómák előállítása, alapvető típusaik és terápiás alkalmazásuk előnyei. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 114-118.
- DWIVEDI, C. et al. (2013). Review on Preparation and Characterization of Liposomes with Application. *Journal of Scientific and Innovative Research*, 2.
- COHN A. et al. (1991). The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. *Journal of Immunology*, 146, 4234-4241.
- CHONN A. et al. (1995). Beta 2-glycoprotein I is a major protein associated with very rapidly cleared liposomes in vivo, suggesting a significant role in the immune clearance of "non-self" particles. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 25845-9. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.43.25845>
- CHU, C. J. et al. (1990). Efficiency of cytoplasmic delivery by pH-sensitive liposomes to cells in culture. *Pharmaceutical research*, 7.
- CROSS, R. (2021). Without these lipid shells, there would be no mRNA vaccines for COVID-19. *Chemical and Engineering News*.
- CURBY et al. (1980). Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro. *The Biochemical Journal*, Volume 186, Issue 2. <https://doi.org/10.1042/bj1860591>
- DAMEN, J. et al. (1981). Transfer and exchange of phospholipid between small unilamellar liposomes and rat plasma high density lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 665, 538-545. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(81\)90268-X](https://doi.org/10.1016/0005-2760(81)90268-X)
- DARAEI, H. et al. (2014). Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 1. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.953633>
- DEAMER, D. (1978). Preparation and properties of ether-injected liposomes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 308, 250-258. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1978.tb22027.x>
- ENGELHARD et al. (1984). Cytotoxic T lymphocyte recognition of HLA-A/B antigens introduced into EL4 cells by cell-liposome fusion. *The Journal of Immunology*, 132.

- FREDERIKSEN, L. (1997). Preparation of Liposomes Encapsulating Water-Soluble Compounds Using Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86, 921-928.
<https://doi.org/10.1021/js960403q>
- FUNATO, K. et al. (1991). Contribution of complement system on destabilization of liposomes composed of hydrogenated egg phosphatidylcholine in rat fresh plasma. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1103, 198-204. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(92\)90087-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(92)90087-3)
- GABIZON A. et al (1988). Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. 85. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.18.6949>
- GABIZON, A. et al (1988). Liposomes formulation with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.18.6949>
- GREGORIADIS, G. et al. (1971). Liposomes as Carriers of Enzymes or Drugs: a New Approach to the Treatment of Storage Diseases. *The Biochemical Journal*, 124. <https://doi.org/10.1042/bj1240058P>
- IMMORDINO et al. (2006). Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine*, 1, 297-315.
- ISHIDA, T. et al. (2002). Liposome Clearance. *Bioscience Reports*, 22, 197-224.
<https://doi.org/10.1023/A:1020134521778>
- KHUTORYANSKIY, V. (2018). Beyond PEGylation: Alternative surface-modification of nanoparticles with mucus-inert biomaterials. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 124, 140-149.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.07.015>
- LASIC, D. et al. (1994). Sterically stabilized vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 33.
<https://doi.org/10.1002/anie.199416851>
- LEGRUE, S. J. et al. (1984). Carrier and adjuvant properties of liposome-borne tumor-specific antigens. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 17. <https://doi.org/10.1007/BF00200050>
- MARJAN, J. et al. (1994). Liposome-induced activation of the classical complement pathway does not require immunoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1192, 35-44. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)90140-6](https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)90140-6)
- MOHAMED, M. et al. (2019). PEGylated liposomes: immunological responses. *Science and Technology of Advanced Materials*, 20. <https://doi.org/10.1080/14686996.2019.1627174>
- MAYER, L. (1986). Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 40, 333-345. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(86\)90077-0](https://doi.org/10.1016/0009-3084(86)90077-0)
- MOHAMED, M. (2019). PEGylated liposomes: immunological responses. 20.
<https://doi.org/10.1080/14686996.2019.1627174>
- MURAI M. et al. (1995). Identification of the serum factor required for liposome primed activation of mouse peritoneal macrophages: modified 2-macroglobulin enhances Fc gamma receptor mediated phagocytosis of opsonized sheep red blood cells. *Immunology*, 86, 64-70.
- NEJAT, D. et al (2005). Introduction: The Origins of Liposomes: Alec Bangham at Babraham. *Methods in Enzymology*.
- NISHIKAWA, K. et al (1990). Scavenger Receptor-mediated Uptake and Metabolism of Lipid Vesicles Containing Acidic Phospholipids by Mouse Peritoneal Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 5226-5231. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)34110-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)34110-9)
- OLSON, F. et al. (1979). Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 557, 9-23. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(79\)90085-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(79)90085-3)
- PAPAHADJOPOULOS, D. et al (1967). Phospholipid model membranes - I. Structural characteristics of hydrated liquid crystals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 624-638. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(67\)90094-6](https://doi.org/10.1016/0005-2736(67)90094-6)

- PAPAHADJOPOULOS, D. et al (1967). Phospholipid model membranes - II. Permeability properties of hydrated liquid crystals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 639-652. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(67\)90095-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(67)90095-8)
- PATEL, H. M. (1992). Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 9.
- PICK, U. (1981). Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 212, 186-194. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(81\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(81)90358-1)
- PRICE, M. E. et al. (2001). Protein adsorption to polyethylene glycol modified liposomes from fibrinogen solution and from plasma. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1512, 191-205. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(01\)00330-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(01)00330-3)
- RAPHAEL, L. et al (1984). Liposome facilitated xenogeneic approach for studying human colon cancer immunity: carrier and adjuvant effect of liposomes. *Clinical and Experimental Immunology*, 55, 1-13.
- SCHERPHOF, G. L. et al. (1985). Uptake and intracellular processing of targeted and nontargeted liposomes by rat Kupffer cells in vivo and in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 446. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1985.tb18414.x>
- SENIOR, J. et al (1982). Is half-life of circulating liposomes determined by changes in their permeability? *FEBS Letters*, 145, 109-114. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(82\)81216-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(82)81216-7)
- SENIOR, J. et al. (1987). Fate and behavior of liposomes in vivo: a review of controlling factors. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 3, 123-93.
- SHARMA, V. K. (2020). A historical perspective of liposomes - a bio nanomaterial. *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.11.952>
- TAKEUCHI, H. (2001). Evaluation of circulation profiles of liposomes coated with hydrophilic polymers having different molecular weights in rats. *Journal of Controlled Release*, 75, 83-91. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00368-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00368-6)
- TIKSHDEEP, C. (2012). Liposome Drug Delivery: A Review. *Materials Science*.
- UPENDRA B. et al (2017). Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics*, 9. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>
- VOLANAKIS, J. E. et al. (1981). Interaction of C-reactive protein with artificial phosphatidylcholine bilayers and complement. *Journal of Immunology*, 126, 1805-1820.
- WHITEMAN, K. R. (2001). Poly(HPMA)-coated liposomes demonstrate prolonged circulation in mice. *Journal of Liposome Research*, 11, 153-164. <https://doi.org/10.1081/LPR-100108459>
- ZHANG, P. et al. (2016). Anti-PEG antibodies in the clinic: Current issues and beyond PEGylation. *Journal of Controlled Release*, 244. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.040>