

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Maja Radiković

POTENCIJALI I IZAZOVI U RAZVOJU MULTIVEZIKULARNIH  
LIPOSOMA

Specijalistički rad

Zagreb, 2024.

PSS studij: Poslijediplomski specijalistički studij Razvoj lijekova

Mentorica rada: prof. dr. sc. Željka Vanić

Specijalistički rad obranjen je dana 27. rujna 2024. godine pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc. dr. sc. Zora Rukavina

2. prof. dr. sc. Željka Vanić

3. prof. dr. sc. Renata Jurišić Grubešić

Rad ima 59 listova.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Željke Vanić.

*Veliko hvala mentorici, prof. dr. sc. Željki Vanić, na izvanrednom stručnom vodstvu, podršci i povjerenju.  
Zahvaljujem Agenciji za lijekove i medicinske proizvode na upućivanju na ovaj specijalistički studij.  
Hvala mojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci i strpljenju.*

## **SAŽETAK**

### **CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog rada bio je pružiti sistematizirani pregled objavljene znanstvene i stručne literature vezane za razvoj i proizvodnju formulacija lijekova temeljenih na tehnologiji multivezikularnih liposoma. Opisana su specifična strukturna svojstva multivezikularnih liposoma i definirani kritični elementi u proizvodnji stabilnih formulacija lijekova. Prikazane su prednosti i ograničenja formulacija lijekova multivezikularnih liposoma u odnosu na konvencionalne oblike liječenja te u odnosu na druge tipove liposoma.

### **MATERIJALI/ISPITANICI I METODE**

Istraživanje je provedeno pretraživanjem akreditiranih baza podataka prema tematici relevantnoj za izradu specijalističkog rada. Među općim i specijaliziranim znanstvenim i stručnim člancima odabrani su relevantni članci s obzirom na postavljene ciljeve te su detaljno proučeni kako bi se napravio sistematizirani i kritički osvrt na zadanu temu.

### **REZULTATI**

Formulacije multivezikularnih liposoma razvijaju se kako bi se premostila ograničenja konvencionalnih formulacija lijekova i osigurala dostatna stabilnost lijekova peptidnog karaktera. Zahvaljujući veličini multivezikularnih liposoma od nekoliko desetaka mikrometara te unutarnoj strukturi koja podsjeća na pjenu, nakon primjene formulacije lijeka, moguće je formiranje depoa i produljeno oslobađanje djelatne tvari kroz dulji vremenski period.

Utvrđeno je da je, uz uobičajene sastavnice liposoma, za formiranje multivezikularnih liposoma potreban dodatak neutralnih lipida. Korištena metoda pripreme dvostruke emulzije uspješno je prenesena iz laboratorijskog u industrijsko mjerilo.

Dosad su odobrenje za stavljanje u promet dobile tri formulacije lijekova temeljenih na tehnologiji multivezikularnih liposoma. Jedna formulacija je dobila odobrenje za kliničko ispitivanje, dok je za drugu upućen zahtjev za kliničko ispitivanje. Brojne formulacije lijekova u fazi su pretkliničkih ispitivanja. Dvije odobrene formulacije lijekova povučene su zbog poteškoća u proizvodnji.

## ZAKLJUČAK

Lijekovi temeljeni na formulacijama multivezikularnih liposoma pružaju potencijalnu platformu za premošćivanje brojnih zdravstvenih izazova poput dostave peptidnih lijekova ili dostave lijekova čije djelovanje ovisi o specifičnoj fazi staničnog ciklusa. Njihova primjena bi mogla pridonijeti poboljšanoj adherenciji bolesnika zbog smanjene učestalosti doziranja parenteralnih lijekova. Zbog nedostatka prikladnijih metoda sterilizacije, specifičnog regulatornog okvira i standardiziranih analitičkih metoda, komercijalizacija ovih lijekova je otežana.

## **SUMMARY**

### **OBJECTIVES**

The goal of this thesis was to present a systematic review of the published literature on the development and manufacture of drug formulations based on multivesicular liposome technology. Specific structural properties of multivesicular liposomes were described as well as critical parameters in their manufacturing process. The potentials and limitations of drug-loaded multivesicular liposomes compared to conventional therapy and other types of liposomes were highlighted.

### **MATERIAL/PATIENTS AND METHODS**

The research was conducted by searching accredited databases with regard to the topic of this thesis. Relevant articles were selected based on the set objectives and studied in detail in order to create a systematic and critical review of the given topic.

### **RESULTS**

The formulations of multivesicular liposomes are being developed to overcome the limitations of conventional drug formulations and to ensure adequate stability of peptide-based drugs. Formation of a depot and prolonged drug release over extended period of time, following administration of drug-loaded multivesicular liposomes, are enabled by their size and internal foam-like structure.

The addition of neutral lipids was found to be crucial in formation of multivesicular liposomes. The implemented double-emulsion method was successfully commercialized.

Until now, three medicinal products based on multivesicular liposome technology were granted marketing authorisation. One formulation received approval for clinical testing, while a request for

clinical testing has been initiated for another formulation. Numerous drug product formulations are in the phase of preclinical trials. Two marketed medicinal products have been withdrawn due to difficulties in the manufacturing process.

## CONCLUSION

Drug product formulations based on multivesicular liposome technology provide a potential platform for overcoming numerous therapeutic challenges like the delivery of peptide drugs or drugs whose action depends on a specific cell-cycle phase. Utilization of this technology could contribute to enhanced patient adherence due to the reduction of parenteral administration frequency. Commercialization of these drug products is difficult due to the lack of adequate sterilization methods, a specific regulatory framework and standardized analytical methods.

## SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA .....	1
1.1. SVOJSTVA LIPOSOMA.....	1
1.2. PODJELA LIPOSOMA.....	3
1.3. METODE PRIPRAVE LIPOSOMA.....	5
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	8
3. MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI .....	9
3.1. OTKRIĆE MULTIVEZIKULARNIH LIPOSOMA.....	9
3.2. STRUKTURA MULTIVEZIKULARNIH LIPOSOMA .....	10
3.3. MEHANIZAM FORMIRANJA MULTIVEZIKULARNIH LIPOSOMA I OSLOBAĐANJA DJELATNE TVARI.....	13
3.4. PROIZVODNJA MULTIVEZIKULARNIH LIPOSOMA .....	18
3.5. STABILNOST MULTIVEZIKULARNIH LIPOSOMA.....	25
3.6. FORMULACIJE LIJEKOVA U PRETKLINIČKIM ISPITIVANJIMA .....	26
3.7. FORMULACIJE LIJEKOVA U KLINIČKIM ISPITIVANJIMA .....	38
3.8. ODOBRENE FORMULACIJE LIJEKOVA .....	39
4. RASPRAVA .....	43
5. ZAKLJUČAK.....	46
6. LITERATURA.....	47
7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	54
8. PRILOZI ZA DOZVOLE ZA KORIŠTENJE SLIKA.....	55
9. ŽIVOTOPIS.....	59

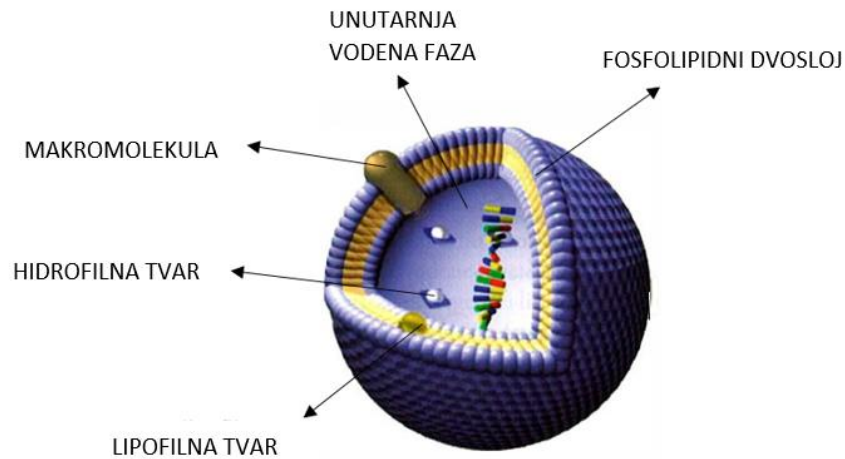


## 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

### 1.1. SVOJSTVA LIPOSOMA

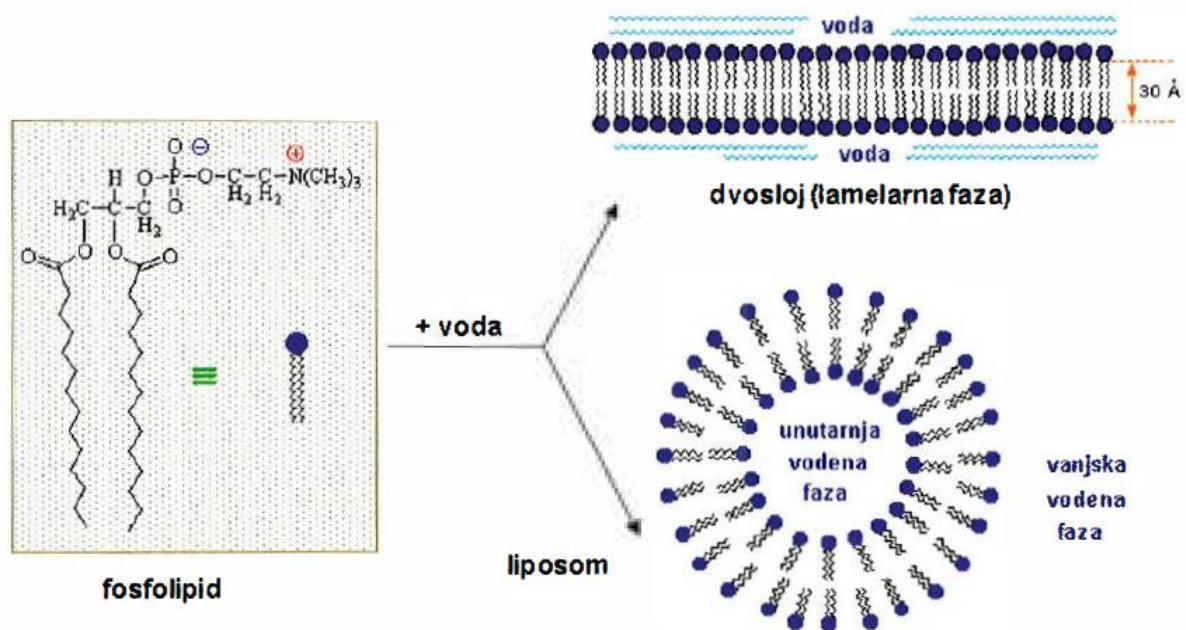
Kako bi se poboljšao farmakološki učinak lijekova loše bioraspodjelivosti, izraženih nuspojava i toksičnosti, zadnjih nekoliko desetljeća uvelike se istražuju različiti terapijski (nano)sustavi. Oni modificiraju farmakokinetička svojstva djelatne tvari na način da omogućuju njeno prilagođeno oslobađanje unutar organizma tijekom duljeg vremena, štite djelatnu tvar od fiziološke razgradnje ili pak pospješuju njenu dostavu na željeno mjesto djelovanja. Navedeni učinci rezultiraju smanjenom pojavnosti nuspojava te učestalosti doziranja što dovodi do poboljšane adherencije bolesnika. Liposomi predstavljaju jedan od najispitivanijih nosača djelatne tvari unutar te kategorije (1, 2). Radi se o sferičnim fosfolipidnim tvorevinama, uobičajenog promjera u rasponu od 20 nm do 10  $\mu$ m, koje se spontano formiraju uslijed kontakta s vodenim medijem. Prvotno su opisani 1965. godine kada je primijećeno da tekući kristali lecitina formiraju tvorevine slične biološkim membrana zbog čega su liposomi u početku istraživani kao modelne biološke membrane, no ubrzo se počeo istraživati i njihov potencijal nosača lijekova (1, 3). Do danas je na području Europe i Sjedinjenih Američkih Država odobreno dvadesetak parenteralnih formulacija lijekova temeljenih na tehnologiji liposoma, uglavnom namijenjenih intravenskom putu primjene te liječenju onkoloških oboljenja. Međutim, zastupljeni su i drugi putevi parenteralne primjene poput intramuskularne, supkutane, intratekalne te primjene na kožu i sluznice, ali i druge indikacije poput infekcija, anestezije, cjepiva itd. (4-6).

Unutarnji vodeni odjeljak/odjeljci, obavijeni su s jednim ili više koncentrično posloženih fosfolipidnih dvoslojeva. S obzirom na navedenu strukturu, liposomi omogućuju uklapanje velikog broja djelatnih tvari različite polarnosti te veličine molekula (Slika 1), dok zbog spomenute sličnosti s biološkim membrana predstavljaju neimunogene te fiziološki prihvatljive sustave (1).



Slika 1. Strukturni prikaz liposoma s uklopljenim djelatnim tvarima. Preuzeto iz (1) uz dozvolu izdavača (*Hrvatsko farmaceutsko društvo*).

Osnovnu gradivnu jedinicu liposoma čine fosfolipidi. To su amfilne molekule, diesteri fosfatne kiseline, čije se polarne „glave“ orijentiraju prema vanjskoj i unutarnjoj vodenoj fazi, dok se hidrofobni „reповi“ sastavljeni od masnih kiselina orijentiraju u dvosloj jedni prema drugima (Slika 2). O naboju hidrofilnih skupina „glave“ ovisi površinski naboj liposoma koji utječe na stabilnost liposomskih pripravaka. U neutralnom pH području on može biti neutralan (fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin) ili negativan (fosfatidilglicerol, fosfatidilserin, fosfatidilinozitol, fosfatidna kiselina) (1).



Slika 2. Shematski prikaz formiranja liposoma. Preuzeto iz (1) uz dozvolu izdavača (*Hrvatsko farmaceutsko društvo*).

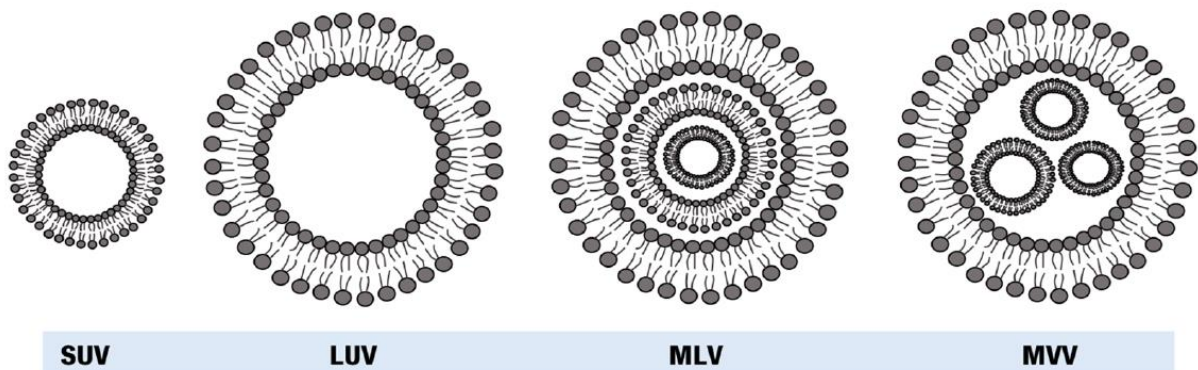
Izbor fosfolipida određuje čvrstoću membrane, a dodatkom tvari poput kolesterola ili rubnih aktivatora moguće je modificirati rigidnost/elastičnost fosfolipidnog dvosloja te na taj način utjecati na njihovu stabilnost ili sposobnost dostave lijeka u određena tkiva (1, 7). Nadalje, oblaganjem liposoma mukoadhezivnim polimerom ili polietilenglikolom, moguće je poboljšati ili smanjiti kontakt liposoma s mukusom sluznice (8).

## 1.2. PODJELA LIPOSOMA

Liposomi se klasificiraju s obzirom na veličinu i broj fosfolipidnih dvoslojeva koje posjeduju (Tablica 1, Slika 3). Ovi faktori utječu na sposobnost uklapanja djelatne tvari, stabilnost i namjenu pojedine vrste liposoma. Za izradu određene vrste liposoma ključna je metoda pripreme, dok je izbor fosfolipidne komponente manje značajan (1, 2). Nadalje, utvrđeno je da se uspješnost uklapanja hidrofilnih djelatnih tvari povećava s veličinom liposoma i brojem unutarnjih vodenih odjeljaka, međutim opada s brojem fosfolipidnih dvoslojeva (2, 9).

Tablica 1. Podjela liposoma prema veličini i broju fosfolipidnih dvoslojeva (1, 10).

TIP LIPOSOMA	PROMJER	BROJ FOSFOLIPIDNIH DVOSLOJEVA
mali unilamelarni liposomi (engl. <i>small unilamellar vesicles</i> , SUV)	20 – 100 nm	jedan
srednje veliki unilamelarni liposomi (engl. <i>medium sized unilamellar vesicles</i> , MUV)	> 100 nm	jedan
veliki unilamelarni liposomi (engl. <i>large unilamellar vesicles</i> , LUV)	100 – 1000 nm	jedan
veoma veliki unilamelarni liposomi (engl. <i>giant unilamellar vesicles</i> , GUV)	> 1000 nm	jedan
oligolamelarni liposomi (engl. <i>oligolamellar vesicles</i> , OLV)	> 500 nm	nekoliko koncentrično položenih dvoslojeva
multilamelarni liposomi (engl. <i>multilamellar vesicles</i> , MLV)	> 700 nm	veliki broj koncentrično položenih dvoslojeva
multivezikularni liposomi (engl. <i>multivesicular liposomes</i> , MVL ili <i>multivesicular vesicles</i> , MVV)	> 1000 nm	mного manjih vezikula obavijenih jednim fosfolipidnim dvoslojem nasumično smještenih unutar velikog liposoma



Slika 3. Strukturni prikaz podjele liposoma s obzirom na veličinu i broj fosfolipidnih dvoslojeva. LUV, veliki unilamelarni liposomi; MLV, multilamelarni liposomi; MVV, multivezikularni liposomi; SUV, mali unilamelarni liposomi. Preuzeto iz (11) uz dozvolu Elsevier-a.

Drugi način podjele liposoma odnosi se na strukturalna svojstva i način oslobađanja uklopljene tvari (Tablica 2).

Tablica 2. Podjela liposoma prema strukturnim svojstvima i načinu oslobađanja uklopljene tvari (1).

NAZIV LIPOSOMA	KARAKTERISTIKE
konvencionalni	<ul style="list-style-type: none"> <li>- uz fosfolipide mogu sadržavati kolesterol</li> <li>- kratko se zadržavaju u cirkulaciji te se akumuliraju u stanicama retikuloendotelnog sustava (pasivna ciljana terapija retikuloendotelnog sustava)</li> </ul>
sterički stabilizirani, dugocirkulirajući (tzv. <i>stealth</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>- za površinu su kovalentno vezani hidrofilni polimeri koji onemogućuju prepoznavanje od strane makrofaga i stanica retikuloendotelnog sustava</li> <li>- produljeno zadržavanje u cirkulaciji (vrijeme polueliminacije do 48 h)</li> <li>- mogućnost pasivne ciljane terapije na mjestima gdje je povećana permeabilnost stijenki krvnih žila (upala, infekcija, tumor)</li> </ul>
imunoliposomi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- za ovojnici konvencionalnih ili sterički stabiliziranih liposoma vezana su specifična antitijela čime se omogućuje aktivna ciljana terapija</li> </ul>
polimorfni liposomi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pH osjetljivi: oslobađaju uklopljen sadržaj uslijed pada pH</li> <li>- temperaturno-osjetljivi: oslobađaju uklopljen sadržaj uslijed porasta temperature</li> <li>- kationski: tvore komplekse s nukleinskim kiselinama te zbog pozitivnog naboja na površini lako stupaju u interakciju s negativno nabijenom površinom stanice</li> </ul>

### 1.3. METODE PRIPRAVE LIPOSOMA

Prilikom odabira metode pripreme liposoma potrebno je voditi računa o ciljanoj veličini liposoma, broju fosfolipidnih dvoslojeva, svojstvima djelatne tvari te sigurnosnom profilu korištenih sirovina.

Korišteni fosfolipidi mogu biti prirodnog ili sintetskog podrijetla, različitog stupnja zasićenosti masnih kiselina i različitog naboja na površini. Za razliku od prirodnih fosfolipida (lecitina), sintetski fosfolipidi imaju točno definiran sastav te su zbog toga prikladniji za izradu formulacija namijenjenih parenteralnoj primjeni. Istraživanja biokompatibilnosti provedena na animalnim modelima pokazala su da pozitivan naboj na površini liposoma može imati citotoksični učinak.

Priprema liposoma zahtijeva korištenje organskih otapala budući da su fosfolipidi netopljivi u vodi. U skladu s tim, potrebno je voditi računa o mogućnosti naknadnog uklanjanja otapala iz konačne formulacije. Pravilo kod pripreme liposoma je da se lipofilne djelatne tvari otapaju zajedno s fosfolipidima u organskoj fazi, dok se hidrofilne djelatne tvari dodaju otopljene u vodenoj fazi.

Osim uklanjanja organskog otapala, tipični koraci u pripremi suspenzije liposoma uključuju dispergiranje fosfolipida u vodenom mediju te homogenizaciju dobivene suspenzije.

Metode pripreme liposoma mogu se podijeliti s obzirom na način dispergiranja fosfolipida u skupine fizičkog dispergiranja fosfolipida, dvofaznog dispergiranja i solubilizacije fosfolipida.

a) Priprava liposoma postupcima fizičkog dispergiranja fosfolipida

Ova skupina metoda pripreme liposoma uključuje najčešće korištenu metodu u laboratorijskim uvjetima koja se zasniva na hidrataciji suhog fosfolipidnog sloja, a naziva se i film metodom. Prvo se otparavanjem organskog otapala na stijenci okrugle tikvice formira tanki film fosfolipida, zatim se dodatkom vodenog medija spontano formiraju liposomi. Nastali liposomi su uglavnom multilamelarne morfologije, zbog čega su posebno pogodni za uklapanje lipofilnih djelatnih tvari.

Druga metoda u ovoj skupini zasniva se na postupcima dehidratacije i rehidratacije na način da se pripremljeni multilamelarni liposomi soniciranjem prevode u male unilamelarne liposome kojima se dodaje otopina hidrofilne djelatne tvari. Nakon liofilizacije slijedi kontrolirana rehidratacija uslijed čega se djelatna tvar uklapa u liposome. Ova metoda pogodna je i za uklapanje osjetljivih bioloških molekula.

Metoda smrzavanja-taljenja također omogućuje dobro uklapanje hidrofilnih djelatnih tvari. Temelji se na naglom smrzavanju smjese malih unilamelarnih liposoma i otopine djelatne tvari. Prilikom odmrzavanja djelatna tvar ulazi kroz pukotine fosfolipidnog dvosloja te nastaju veliki unilamelarni liposomi s uklopljenom djelatnom tvari.

Uobičajenu metodu pripreme malih unilamelarnih liposoma predstavlja soniciranje suspenzija multilamelarnih i oligolamelarnih liposoma pomoću ultrazvučne kupelji ili sonde.

Mali unilamelarni liposomi se također mogu prirediti pomoću metode koja se zasniva na korištenju visokotlačnog homogenizatora. Ova metoda ne zahtijeva upotrebu organskih otapala budući da se disperzija fosfolipida u vodi propušta kroz sapnice homogenizatora, a prikladna je i za primjenu u industrijskom mjerilu.

#### b) Priprava liposoma postupcima dvofaznog dispergiranja fosfolipida

Metode pripreme iz ove skupine temelje se na miješanju organske i vodene faze, odnosno preskače se korak prethodnog uklanjanja organskog otapala u kojem su otopljeni fosfolipidi, kao što je to slučaj kod film metode. Korištena organska otapala mogu se ili ne moraju miješati s vodom te se iz disperzije liposoma naknadno uklanjaju. Jednostavne metode uključuju metodu etanolnog injiciranja (formiraju se mali unilamelarni liposomi) i metodu eternog injiciranja (formiraju se veliki unilamelarni liposomi); međutim, obje metode pripreme liposoma rezultiraju niskim uklapanjem hidrofilne djelatne tvari.

Emulzijske metode podrazumijevaju uvođenje vodene otopine djelatne tvari u veći udio organskog otapala koje se ne miješa s vodom te, ovisno o daljnjim koracima pripreme, rezultiraju liposomima različitih morfoloških obilježja.

Upotrebom metode koja uključuje pripremu višestrukih emulzija moguće je formirati multivezikularne liposome, a zbog velikog broja vodenih odjeljaka koje sadrži ovaj tip liposoma, visoka je uspješnost uklapanja hidrofilnih djelatnih tvari. Metoda je prikladna i za industrijsku primjenu.

#### c) Priprava liposoma solubilizacijom fosfolipida

Ova metoda prikladna je za uklapanje lipofilnih lijekova i proteina, a temelji se na korištenju detergensa koji zajedno s fosfolipidima formiraju miješane micelle. Detergens se potom uklanja iz micela dijalizom u vodenom mediju, pri čemu izlučivanjem detergensa spontano nastaju veliki unilamelarni liposomi (12).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Posljednjih godina zabilježen je porast odobrenih parenteralnih lijekova koji se temelje na tehnologiji liposoma, posebice cjepiva. Premda je većina odobrenih formulacija liposoma za parenteralnu primjenu nanometarskih dimenzija, postoje i oni mikrometarske veličine. Riječ je o multivezikularnim liposomima koji se od ostalih vrsta liposoma izdvajaju ne samo veličinom već i specifičnom unutarnjom strukturom koja pruža veliki kapacitet uklapanja hidrofilnih djelatnih tvari te omogućuje njihovo produljeno oslobađanje i terapijski učinak.

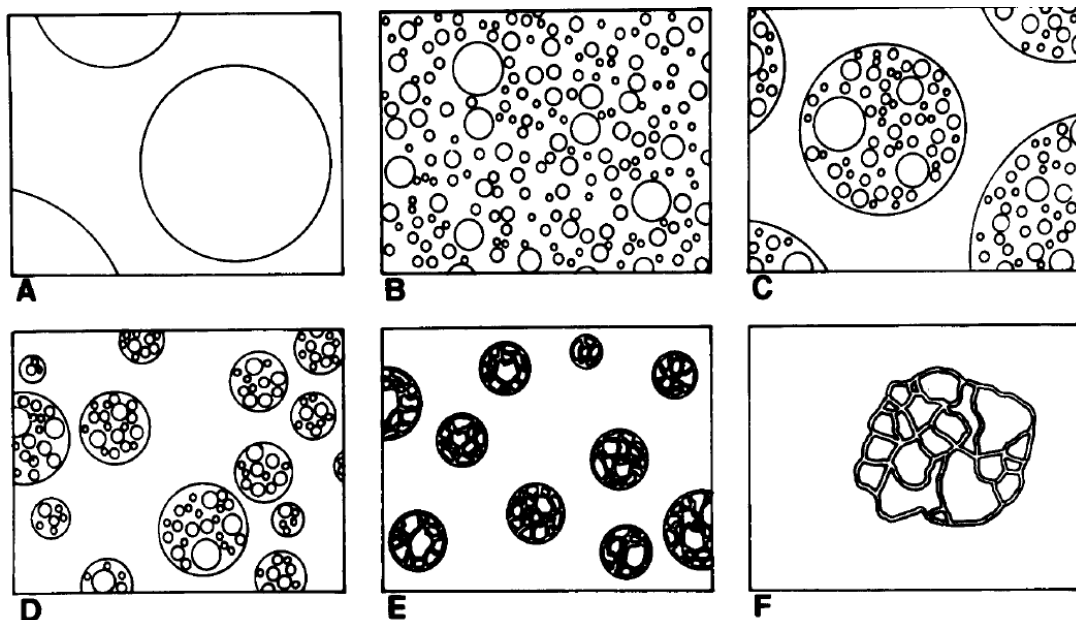
Cilj ovog rada bio je pružiti sistematizirani pregled objavljene znanstvene i stručne literature koja obrađuje problematiku multivezikularnih liposoma pretraživanjem akreditiranih baza podataka prema ključnim riječima: *liposomes, multivesicular liposomes, multivesicular lipid particles, sustained release, DepoFoam technology, approved liposomal drugs* i sl. Detaljno su proučeni odabrani relevantni članci uz definiranje kritičnih svojstava kakvoće lijeka kao i parametara proizvodnog postupka koji na njih utječu, uz osvrt na postojeći regulatorni okvir. Prikazane su prednosti i nedostaci ovakvih formulacija lijekova te njihova uloga u globalnim trendovima liječenja.



### 3. MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

#### 3.1. OTKRIĆE MULTIVEZIKULARNIH LIPOSOMA

Multivezikularni liposomi su prvotno opisani 1983. godine. Pripremljeni su korištenjem metode dvostruke emulzije. Lipidne komponente koje su činili amfipatski lipidi, kolesterol i mala količina neutralnog ulja (trioleina ili trikaprilina) otopljene su u smjesi kloroforma i dietiletera, dok se modelna djelatna tvar otopila u vodenoj fazi koja je sadržavala otopljenu sol ili saharozu u koncentraciji od 0,15 M. Vodena faza se polako dodavala u organsku fazu te je snažnim protresivanjem izrađena emulzija. Nastala V/U emulzija je potom uvedena u veći volumen vanjske vodene faze koja se sastojala od otopine saharoze koncentracije 0,2 M. Miješanjem na vrtložnom mješaču nastale su sferule različitih veličina, a otparavanjem organskih otapala formirali su se multivezikularni liposomi (Slika 4). Kako bi se neuklopljeni i otpadni materijal odvojio od proizvedenih liposoma, u suspenziju je dodan jednak volumen otopine 5 % glukoze ili fosfatnog pufera. Centrifugiranjem je supernatant uklonjen, a liposomi su resuspendirani u otopini 5 % glukoze ili fosfatnom puferu.

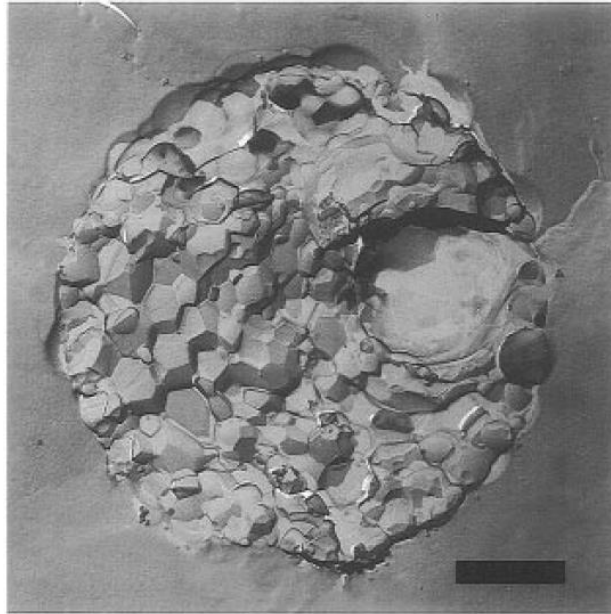


Slika 4. Shematski prikaz formiranja multivezikularnih liposoma: A - inicijalna emulzija, B - emulzija nakon protresivanja, C - sferule od kloroforma i dietiletera s uklopljenom modelnom djelatnom tvari (nastale uvođenjem primarne emulzije u vanjsku vodenu otopinu), D - formiranje sferula nakon protresivanja V/U/V emulzije, E – nastanak multivezikularnih liposoma nakon otparavanja kloroforma i dietiletera, F - uvećan prikaz multivezikularnog liposoma. Preuzeto iz (13) i prilagođeno hrvatskom jeziku uz dozvolu Elsevier-a.

Struktura tako formiranih liposoma usporedila se sa strukturom blastule embrija. Sferoidne tvorevine sadržavale su unutarnju strukturu poput granula, odnosno agregiranih mjehurića sapuna (13, 14). U multivezikularnom liposomu unutarnji vodeni odjeljci odijeljeni su pojedinačnim fosfolipidnim dvoslojevima dok vanjsku membranu također čini jedan fosfolipidni dvosloj. Premda bi se, prema teorijskim razmatranjima, ovom metodom mogla uklopiti ukupna količina djelatne tvari otopljena u unutarnjoj vodenoj fazi, do gubitka dijela vodene faze došlo je prilikom uvođenja primarne emulzije u vanjsku vodenu fazu te tijekom otparavanja organskih otapala. Uspješnost uklapanja modelne hidrofilne tvari bila je veća od 80 % što je značajno više nego kod unilamelarnih liposoma budući da su vodeni odjeljci udaljeni od površine te manje skloni pucanju. Uklopljene modelne tvari varirale su od malih molekula do makromolekula, a enzim goveđa dismutaza uklopljen je uz potpuno očuvanje enzimske aktivnosti. Također je primijećeno da je za formiranje multivezikularnih liposoma potreban dodatak neutralnog ulja za koje je pretpostavljeno da pomaže stabilizirati membrane liposoma (13).

### 3.2. STRUKTURA MULTIVEZIKULARNIH LIPOSOMA

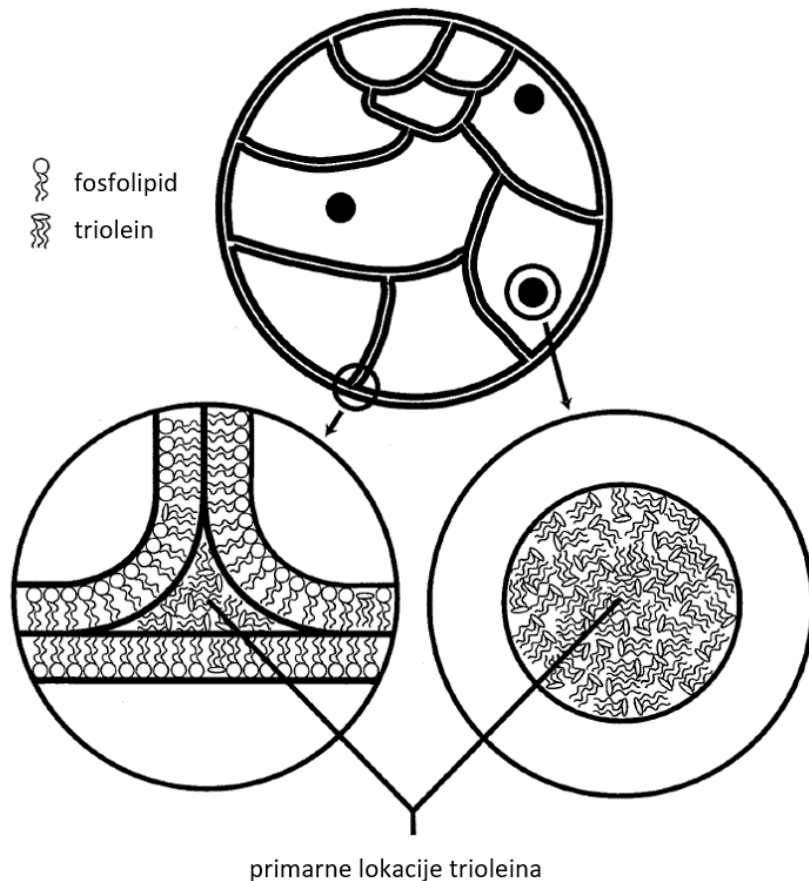
Elektronskom mikroskopijom analizirana je topologija multivezikularnih liposoma. Utvrđeno je da su kontaktne površine vodenih odjeljaka tetraedarski orijentirane što je analogno strukturi pjene. Unutarnji odjeljci gusto su pakirani u velikom broju unutar jednog liposoma te su polidisperzni. Kod liposoma prosječne veličine 10 mikrometra, promjer poliedarskih unutarnjih odjeljaka varira od 100 nm do nekoliko mikrometara (Slika 5). Broj stranica odjeljaka varira od tri do osam, pri čemu je najzastupljeniji oblik poliedarskih odjeljaka pentagonalni, dok debljina fosfolipidnog dvosloja iznosi oko 50 Å (15, 16).



Slika 5. Prikaz strukture multivezikularnog liposoma dobiven korištenjem *freeze-fracture* elektronske mikroskopije. Horizontalna crta predstavlja duljinu od 2 mikrometra. Preuzeto iz (15) i prilagođeno hrvatskom jeziku uz dozvolu *American Chemical Society*.

Korištenjem NMR metode i konfokalne mikroskopije s dvije fluorescentne fosfolipidne probe i jednom za trigliceride, detaljnije je ispitana distribucija strukturnih komponenata multivezikularnih liposoma koju čine fosfolipidi i trigliceridi (triolein). Primijećeno je da, ukoliko se koristi metoda pripreme dvostruke emulzije bez dodatka neutralnog lipida (triglicerida), nastaju unilamelarni liposomi ili pak oni s nekoliko koncentrično položenih fosfolipidnih dvoslojeva. Dodatkom neutralnog lipida (triolein), isti se inkorporira u spojevima nekoncentrično položenih fosfolipidnih dvoslojeva unutar liposoma. Triolein stoga služi kao hidrofobni stabilizator tih spojeva te omogućava karakterističnu strukturu multivezikularnog liposoma. Osim ove lokacije, drugo glavno mjesto nakupljanja triglicerida je u globulama unutar vodene faze uklopljene u vezikule liposoma (Slika 6) (16).

Utvrđeno je da se porastom koncentracije kolesterola u membranama smanjuje koncentracija trioletina te raste rigidnost membrane. S druge strane, dodatak trioletina smanjuje rigidnost i povećava odbojne sile između susjednih membrana što smanjuje mogućnost njihove fuzije (16-18).



Slika 6. Shematski prikaz položaja triglicerida unutar multivezikularnog liposoma. Preuzeto iz (16) i prilagođeno hrvatskom jeziku uz dozvolu izdavača *Taylor & Francis*.

Zbog velikog volumnog udjela vodene faze u odnosu na lipidnu (95 : 5), multivezikularni liposomi posebno su pogodni za uklapanje u vodi topljivih djelatnih tvari. Budući da su uglavnom raspona veličine od 10  $\mu\text{m}$  do 60  $\mu\text{m}$ , nisu prikladni za intravensku primjenu te nisu podložni brzom uklanjanju iz organizma od strane limfnog sustava i makrofaga. Zbog toga pokazuju potencijal formiranja depoa ukoliko se primijene drugom parenteralnom rutom (19). Ispitivanjima na životinjama dokazano je da primijenjena formulacija multivezikularnih liposoma produljuje oslobađanje djelatne tvari za faktor 6 – 600 u odnosu na neuklopljenu djelatnu tvar, odnosno produljeno je oslobađanje moguće postići u periodu od nekoliko dana do nekoliko tjedana. Za razliku od multivezikularnih liposoma, kod unilamelarnih i multilamelarnih liposoma period oslobađanja varira od nekoliko sati do nekoliko dana (Tablica 3) (16, 20).

Tablica 3. Usporedba vremena polueliminacije neuklopljenih djelatnih tvari i djelatnih tvari uklopljenih u formulaciju multivezikularnih liposoma (20).

DJELATNA TVAR	VRSTA ŽIVOTINJE	$t_{1/2}$ (h) UKLOPLJENA TVAR	$t_{1/2}$ (h) NEUKLOPLJENA TVAR	PUT PRIMJENE	MOGUĆA KLINIČKA PRIMJENA
citarabin	majmun	156	0,74	intratekalni	tumori
citarabin	miš	21	0,26	intraperitonealni	tumori
citarabin	štakor	148	2,7	intratekalni	tumori
citarabin	miš	96	0,16	supkutani	tumori
citarabin	kunić	52,5	0,2	supkonjunktivalni	tumori
metotreksat	štakor	96	7,2	intratekalni	tumori
metotreksat	miš	50,4	0,16	supkutani	tumori
metotreksat	miš	45,6	0,54	intraperitonealni	tumori
morfin	štakor	82	2,6	epiduralni	liječenje boli
IGF-1	štakor	26	4	supkutani	faktor rasta
interferon $\alpha$ -2b	miš	20	1,5	intraperitonealni	virusne infekcije, tumori
bleomicin	miš	31,8	0,13	supkutani	antibiotik
2'3'deoksicitidin	štakor	23	1,1	intraventrikularni	virusne infekcije
5-FUMP	kunić	124	4,5	intravitrealni	virusne infekcije

IGF-1, inzulinu sličan faktor rasta 1; 5-FUMP, 5-fluorouridin monofosfat

### 3.3. MEHANIZAM FORMIRANJA MULTIVEZIKULARNIH LIPOSOMA I OSLOBAĐANJA DJELATNE TVARI

U formiranju multivezikularnih liposoma ključnu ulogu imaju fosfolipidi, neutralni lipidi i kolesterol. Njihovom optimizacijom moguće je pripremiti stabilnu formulaciju multivezikularnih liposoma i utjecati na profil oslobađanja djelatne tvari.

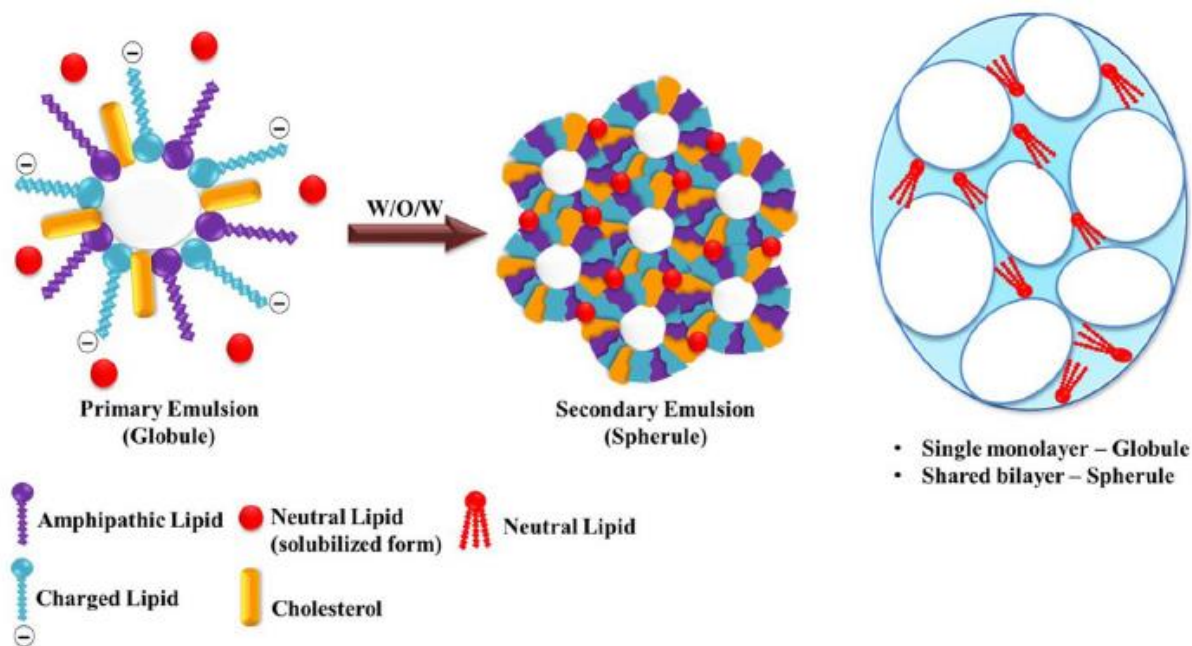
Lance masnih kiselina fosfolipida većinom čine nezasićene masne kiseline duljine 10 do 24 ugljikova atoma koje mogu sadržavati do 6 dvostrukih veza, a manji udio u lancima čine zasićene masne kiseline. Strukturna svojstva fosfolipida su uz temperaturu faznog prijelaza značajni parametri odgovorni za stabilnost liposoma. Veći broj nezasićenih veza ili niža temperatura faznog prijelaza iz *gel* u *sol* stanje, rezultirat će manjom zbijenošću molekula u fosfolipidnom dvosloju te slabijom stabilnosti na sobnoj temperaturi (21, 22). Za izradu liposoma uglavnom se koriste kombinacije fosfolipida koji istovremeno posjeduju pozitivni i negativni naboj (*zwitterion*) kao što su 1,2-dierukoilfosfatidilkolin (DEPC) ili

dioleoilfosfatidilkolin (DOPC) te anionskih fosfolipida poput dipalmitoilfosfatidilglicerola (DPPG) što je bitno za stabilnost membrana budući da istovrsni naboj uzrokuje elektrostatske odbojne sile (21).

Neutralni lipidi poput trioleina nemaju sposobnost formiranja membrane zbog nedostatka hidrofilne „glave“, ali omogućuju multivezikularnu strukturu membrana formiranih od dvoslojeva fosfolipida (Slika 7). Neutralni lipidi iz skupine dugolančanih triglicerida posjeduju bolji stabilizirajući učinak što rezultira sporijim oslobađanjem uklopljenog sadržaja iz liposoma u odnosu na kratkolančane trigliceride. Sporijem oslobađanju pridonose esterske skupine sastavljene od masnih kiselina s jednom nezasićenom vezom i 14 do 18 atoma ugljika u acilnom lancu te zasićene masne kiseline s 10 do 12 atoma ugljika u acilnom lancu. Lipidi izbora u tom su slučaju obično triolein ili tripalmitolein. Neutralni lipidi koji uzrokuju brzo oslobađanje djelatne tvari jesu trigliceridi koji sadrže esterske skupine sastavljene od zasićenih masnih kiselina sa 6 do 8 ugljikovih atoma u acilnom lancu. Najčešći su trikaprilin i smjese trikaprilina i trikaproina. Ukoliko se za proizvodnju koriste neutralni lipidi s manje od 6 ugljikovih atoma, oslobađanje djelatne tvari se odvija vrlo brzo (20, 21).

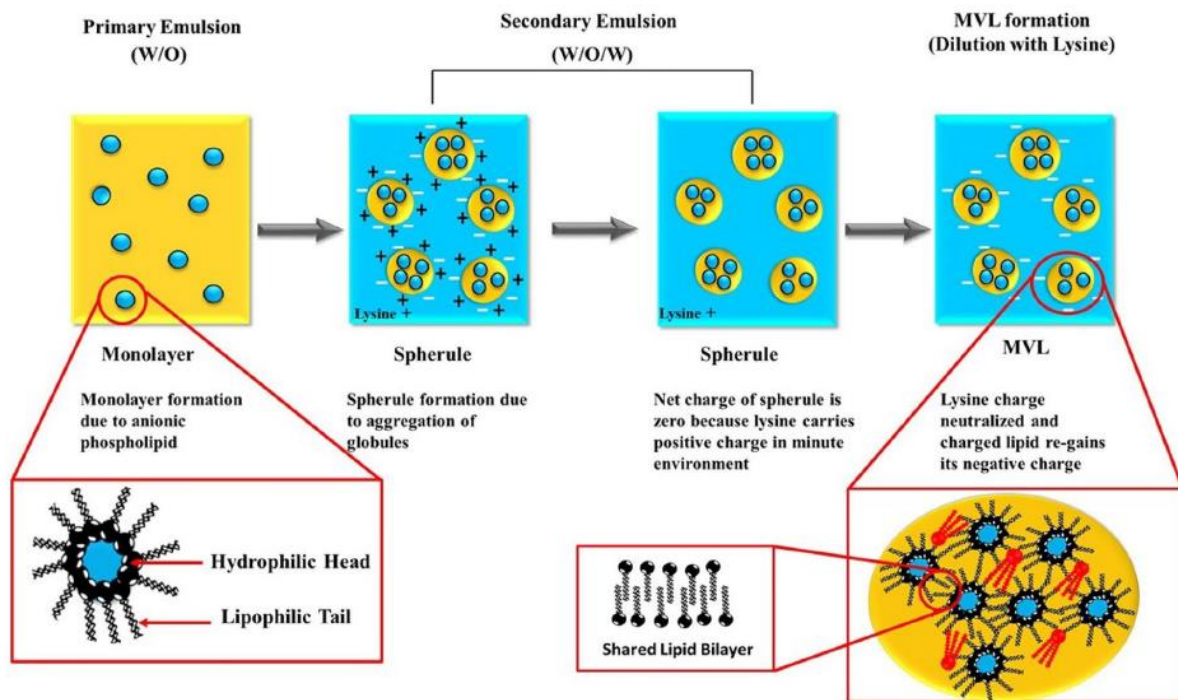
Osim vrste lipida, za oslobađanje djelatne tvari značajna je i njihova koncentracija. Povećanjem koncentracije trioleina, povećat će se i brzina oslobađanja. Ukoliko se triolein nalazi u suvišku, on može formirati kapljice u vodenoj fazi koje mijenjaju pH i osmotski tlak te dovode do ubrzanog oslobađanja djelatne tvari.

Kolesterol se koristi kako bi stabilizirao membrane liposoma te vezikularni sustav učinio rigidnijim. Njegova koncentracija u sustavu od velike je važnosti jer se stabilizacijom membrane usporava oslobađanje djelatne tvari. Međutim, izrazito visoke koncentracije kolesterola mogu imati negativan učinak na stabilnost jer prevelika rigidnost može dovesti do lakšeg pucanja membrana (23).



Slika 7. Shematski prikaz formiranja membrana multivezikularnih liposoma pomoću neutralnog lipida. Preuzeto iz (21) uz dozvolu *Springer Nature*.

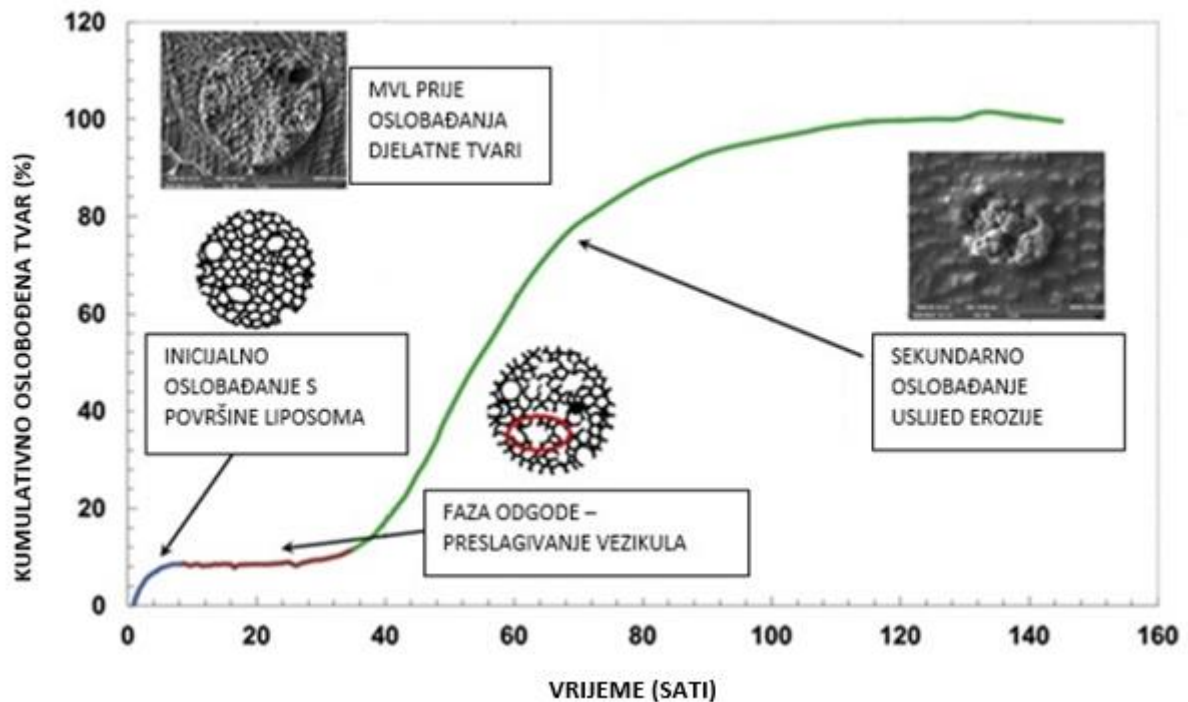
Proces formiranja multivezikularnih liposoma sastoji se od nekoliko kritičnih koraka (Slika 8). Formiranje stabilnih monoslojeva ključno je za stabilnost završne formulacije gdje važnu ulogu igra naboj fosfolipida. Anionski fosfolipidi (npr. DPPG) su pri višim pH vrijednostima ( $\approx 10$ ) potpuno ionizirani te u vodenoj fazi formiraju rašireni monosloj. Dodatkom kationskih pomoćnih tvari poput lizina dolazi do agregacije globula i formiranja stabilnih sferula zbog neutralizacije negativnog naboja. Uslijed prisustva neutralnih lipida na rubovima globula dolazi do stvaranja zajedničkog fosfolipidnog dvosloja. Nakon toga dolazi do deprotonacije lizina te fosfolipidi ponovo poprimaju negativan naboj (21).



Slika 8. Shematski prikaz formiranja multivezikularnih liposoma. Preuzeto iz (21) uz dozvolu *Springer Nature*.

Mehanizam oslobađanja djelatne tvari odvija se u tri faze kombinacijom mehanizama difuzije, erozije i preslagivanja unutarnjih fosfolipidnih dvoslojeva (Slika 9). U prvoj fazi oslobađa se djelatna tvar s površine liposoma. Zatim slijedi tzv. faza odgode tijekom koje je oslobađanje djelatne tvari neznatno. Ona je posljedica difuzije djelatne tvari iz unutrašnjosti liposoma kroz unutarnje membrane liposoma te preslagivanja membrana do kojeg može doći ukoliko se temperatura okoline približi temperaturi faznog prijelaza fosfolipida. Pritom može doći do fuzije membrana i urušavanja karakteristične unutarnje strukture multivezikularnih liposoma što rezultira produljenjem faze odgode ili sporijim sekundarnim oslobađanjem zbog povećanja debljine difuzijske barijere. Sekundarno oslobađanje nastupa u trećoj fazi te je posljedica kontinuirane erozije fosfolipidnih dvoslojeva (24).





Slika 9. Shematski prikaz mehanizma oslobađanja djelatne tvari iz multivezikularnih liposoma. MVL, multivezikularni liposom. Preuzeto iz (24) i prilagođeno hrvatskom jeziku uz dozvolu *Elsevier*-a.

Osim izborom lipidnih komponenata sustava, brzinu kontroliranog oslobađanja iz liposoma moguće je varirati izborom sastava vodene faze koja se uklapa. Što je osmolarnost unutarnje vodene faze veća, oslobađanje je sporije, pri čemu se osmolarnost može povećati povećanjem koncentracije djelatne tvari ili dodatkom sredstva za povećanje osmolarnosti (25).

Uz osmolarnost, prisustvo kiseline u unutarnjoj vodenoj fazi također utječe na brzinu oslobađanja djelatne tvari što je pokazano na primjeru uklapanja citarabina otopljenog u koncentraciji od 20 mg/ml u različitim kiselinama koncentracije 136 mM (Tablica 4).

Tablica 4. *In vitro* oslobađanje citarabina u ljudskoj plazmu pri 37 °C iz formulacija multivezikularnih liposoma izrađenih korištenjem različitih kiselina (20).

<b>KISELINA</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (dani)</b>
Perklorna kiselina	37,2 ± 8,0
Nitratna kiselina	54,5 ± 5,7
Fosfatna kiselina	6,5 ± 0,2
Formijatna kiselina	5,6 ± 0,2
Trikloracetatna kiselina	5,5 ± 0,6
Acetatna kiselina	4,8 ± 0,5
Trifluoracetatna kiselina	3,4 ± 0,4
Sulfatna kiselina	1,6 ± 0,5

Na brzinu oslobađanja djelatne tvari velikim dijelom utječe stupanj njezine ionizacije. Ukoliko je djelatna tvar ionizirana, njena topljivost u vodenom mediju će biti veća što će rezultirati značajnijim inicijalnim oslobađanjem. Međutim, sekundarno oslobađanje će biti sporije zbog slabije sposobnosti difuzije kroz fosfolipidne membrane (24).

Brzina oslobađanja djelatne tvari također ovisi o temperaturi i vrsti medija u kojem se oslobađanje odvija. Povišenjem temperature raste pokretljivost lipida što rezultira bržim oslobađanjem. Međutim, ukoliko se temperatura nastavi povećavati, može doći do fuzije membrana te sporijeg sekundarnog oslobađanja zbog povećanja difuzijske barijere. Ukoliko je medij bogat proteinima, kao što je slučaj s ljudskom plazmom, zbog interakcija s površinom liposoma dolazi do bržeg oslobađanja (20, 24).

Oslobađanje djelatne tvari iz multivezikularnih liposoma se dodatno može usporiti ako se djelatna tvar prethodno uklopi u ciklodekstrine (20).

### 3.4. PROIZVODNJA MULTIVEZIKULARNIH LIPOSOMA

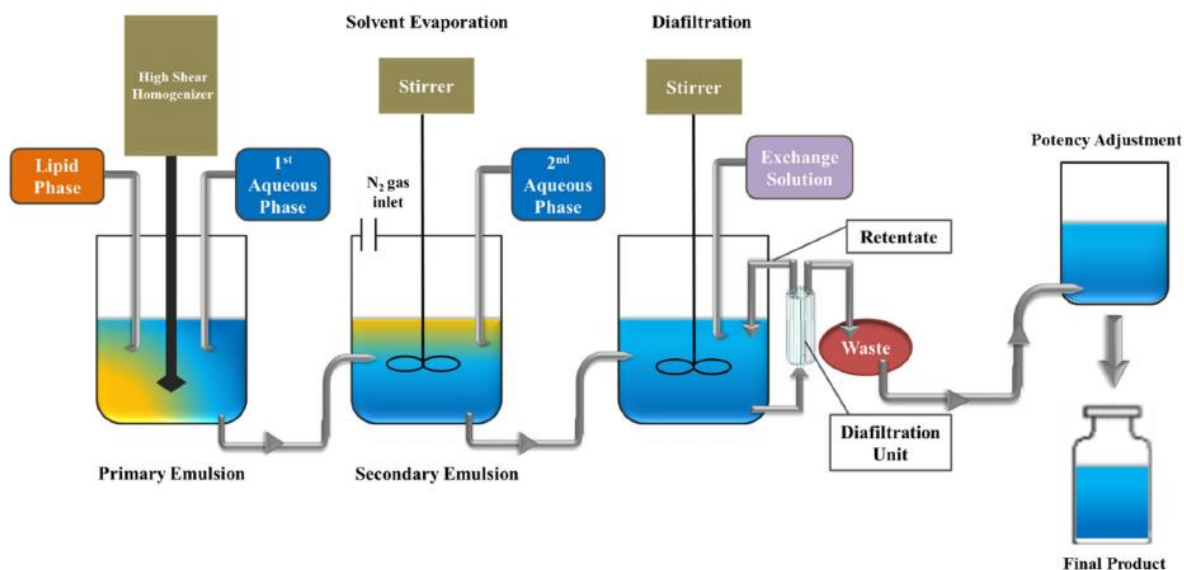
Proizvodnja multivezikularnih liposoma u komercijalnim serijama zahtjevan je posao budući da se radi o formulaciji lijeka na čije karakteristike utječu mnogi parametri formulacije i proizvodnog postupka.

Metoda pripreme dvostruke emulzije pokazala se uspješnom prilikom prenošenja u industrijsko mjerilo. Osim nje, moguća je i proizvodnja multivezikularnih liposoma pomoću atomizacije raspršivanjem (21).

#### *Metoda pripreme dvostruke emulzije*

Metoda pripreme dvostruke emulzije najrašireniji je postupak pripreme multivezikularnih liposoma, kao i patentno zaštićen proces proizvodnje formulacije multivezikularnih liposoma u industrijskom mjerilu pod nazivom DepoFoam®. Ova tehnologija korištena je u proizvodnji ljekovitih formulacija multivezikularnih liposoma koje su dobile odobrenje za stavljanje u promet na području Europe i Sjedinjenih Američkih Država (25-28).

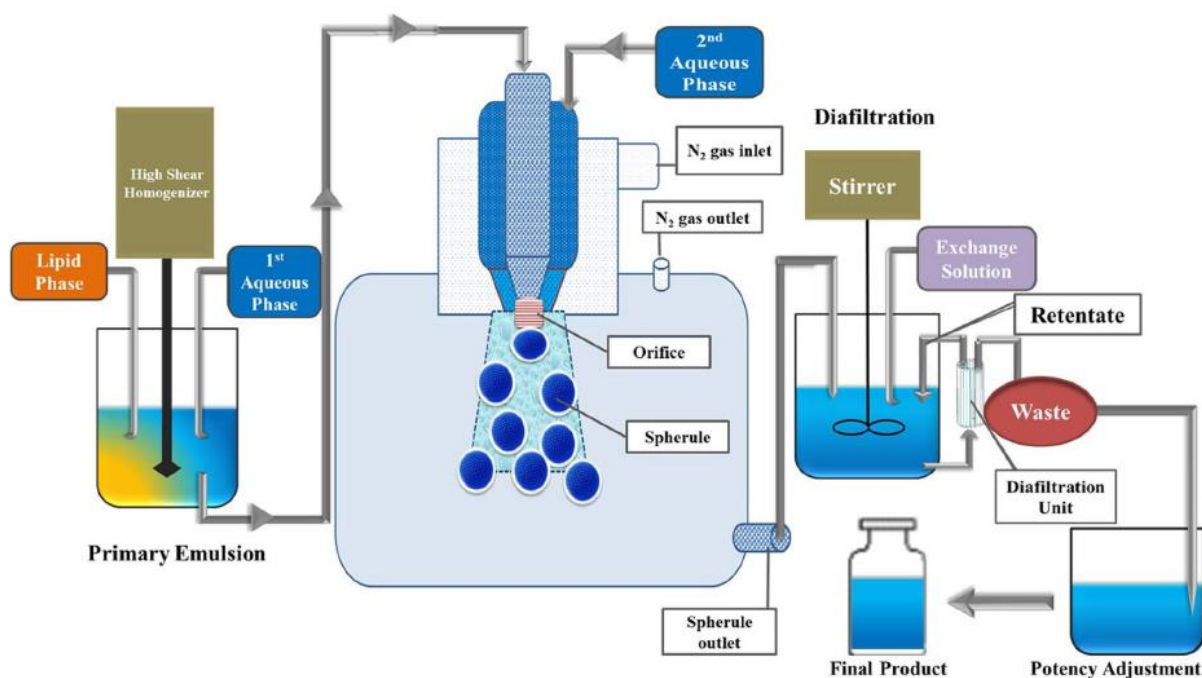
Metoda pripreme analogna je prvotno opisanoj u poglavlju 3.1. (Slika 10). Vodena faza i organska faza, u kojoj su otopljene lipidne komponente, pomiješaju se u prikladnom sustavu za homogenizaciju te formiraju primarnu V/U emulziju. Ovisno o topljivosti djelatna tvar može biti otopljena u vodenoj (npr. peptidi) ili u organskoj fazi (npr. bupivakain) (27). Primarna emulzija se zatim pomiješa u prikladnom mješaču sa sekundarnom vodenom fazom koja sadrži konstituense poput aminokiselina i glukoze kako bi nastala sekundarna V/U/V emulzija. Sekundarna emulzija se može dodatno razrijediti nakon čega slijedi otparavanje organskog otapala radi njegovog potpunog uklanjanja. Za uklanjanje organskih otapala može se koristiti veći broj tehnika poput otparavanja rotacijskim vakuum uparivačem te korištenja inertnih plinova. Nakon uklanjanja organskog otapala iz sekundarne emulzije, formiraju se multivezikularni liposomi. Za uklanjanje neuklopljene djelatne tvari i lipida koji nisu ušli u reakciju mogu se koristiti tehnike poput centrifugiranja i dijafiltracije. Za ispiranje i kao konačni medij za suspediranje proizvedenih liposoma mogu se koristiti izotonični pufer ili fiziološka otopina. Dijafiltracija je prikladna tehnika u industrijskoj proizvodnji, a osim za izmjenu pufera, može se koristiti i za ukoncentriravanje liposoma (21).



Slika 10. Shematski prikaz proizvodnje multivezikularnih liposoma metodom pripreme dvostruke emulzije. Preuzeto iz (21) uz dozvolu izdavača *Springer Nature*.

#### *Atomizacija raspršivanjem*

Ovaj način pripreve liposoma također se temelji na izradi dvostruke V/U/V emulzije, međutim oslanja se na korištenje tehnološki naprednijeg procesa (Slika 11). Primarna emulzija, vanjska vodena faza i inertni plin dovode se zasebnim kanalima u otvor mlaznice gdje uslijed visokog tlaka dolazi do formiranja sferula te uklanjanja otapala u atmosferi inertnog plina. Liposomi se zatim podvrgavaju izmjeni pufera, prilagodbi jačine doze lijeka te punjenju u spremnike. Prednost ove metode u odnosu na konvencionalnu metodu pripreme dvostruke emulzije je bolje miješanje faza te brzo i učinkovito uklanjanje organskog otapala (21).



Slika 11. Shematski prikaz proizvodnje multivezikularnih liposoma atomizacijom raspršivanjem. Preuzeto iz (21) uz dozvolu izdavača *Springer Nature*.

### *Osiguranje sterilnosti*

Formulacije multivezikularnih liposoma namijenjene su parenteralnoj primjeni. Regulatorni zahtjev je da parenteralni pripravci namijenjeni primjeni u tijelo čovjeka ili životinje budu sterilni (29). Klasične metode sterilizacije poput toplinske sterilizacije (suhim zrakom, vodenom parom), sterilizacije etilenoksidom, UV-zračenjem ili gama-zračenjem nepovoljno utječu na fizikalno-kemijske karakteristike, djelotvornost te stabilnost liposoma i ne smatraju se prikladnima. Potencijalne metode izbora jesu sterilna filtracija te provođenje izrade u aseptičkim uvjetima.

Sterilna filtracija zasniva se na primjeni filtera veličine pora 0,22  $\mu\text{m}$  kako bi se mikroorganizmi fizički uklonili. Ova tehnika nije primjenjiva ukoliko veličina liposoma prelazi veličinu pora filtera, kao što je to slučaj kod oligolamelarnih, multilamelarnih i multivezikularnih liposoma. Također, veličina pora nije dovoljno sitna za retenciju virusa i određenih bakterija. Međutim, može se primijeniti za sterilizaciju otopina organske i vodene faze koje se koriste u izradi liposoma.

Aseptički postupak podrazumijeva proizvodnju lijeka i punjenje u primarni spremnik u prostorima klase čistoće A. Kako bi se sterilnost održala, ovaj postupak zahtijeva primjenu skupe opreme i instalacija koje je potrebno redovito održavati. I u sklopu aseptičke proizvodnje za sterilizaciju komponenata liposoma koriste se filteri čiji su nedostaci ranije opisani. S obzirom na veliki broj koraka unutar proizvodnog procesa i rizik od slučajne kontaminacije, koji je nemoguće isključiti praćenjem i kontrolom proizvodnog procesa, teško je procijeniti pouzdan stupanj osiguranja sterilnosti (engl. *Sterility Assurance Level, SAL*). Osim toga ne postoji definiran biološki indikator koji bi potvrdio učinkovitost procesa ( $SAL \leq 10^{-6}$ ) (30).

#### *Utjecaj proizvodnih parametara na formulaciju multivezikularnih liposoma*

Kako bi se omogućila proizvodnja stabilne formulacije multivezikularnih liposoma potrebno je, osim variranja sastavnih komponenti liposoma, optimizirati i parametare proizvodnog postupka (Tablica 5).

Temperatura ima važnu ulogu tijekom proizvodnje multivezikularnih liposoma budući da membrane fosfolipida postaju savitljivije iznad temperature faznog prijelaza fosfolipida te tako lakše formiraju dvosloj. Međutim, primjena viših temperatura nepoželjna je u kasnijoj fazi proizvodnje jer može nepovoljno utjecati na integritet membrana. Stoga je bitno definirati odgovarajuću temperaturu tijekom svake pojedine procesne faze, ali i tijekom skladištenja gotove formulacije.

Tijekom proizvodnje multivezikularnih liposoma formiraju se brojni intermedijeri koji su stabilni ograničeno vrijeme. U skladu s time potrebno je optimizirati trajanje svakog proizvodnog koraka. Osim toga, brojni intermedijeri osjetljivi su na agresivne uvjete proizvodnje poput smičnog naprezanja koje se javlja uslijed primjene sile što je posebno bitno u kasnijim fazama proizvodnog procesa jer može dovesti do pucanja membrana liposoma (21).

Odabir prikladne metode uklanjanja organskog otapala je od velikog značaja tijekom proizvodnje liposoma. Naime, otapalo se treba ukloniti u što kraćem vremenskom periodu, ali uz očuvanje fizičke stabilnosti sustava. Pritom se kao metoda izbora pokazalo korištenje inertnog plina (26).

Važnu ulogu u uklanjanju otapala predstavljaju omjer volumena primarne emulzije i vanjske vodene faze (u sekundarnoj emulziji) te temperatura. Što je veći volumen vanjske vodene faze, organsko je otapalo više solubilizirano i potrebno ga je dulje uklanjati, dok je pri višoj temperaturi brzina uklanjanja veća (21).

Tablica 5. Popis procesnih parametara po fazama proizvodnje te utjecaj na svojstva kakvoće formulacije (20, 28).

FAZA U PROIZVODNJI	PARAMETRI PROIZVODNJE	SVOJSTVA KAKVOĆE FORMULACIJE
PRIMARNA EMULZIJA	brzina miješanja, vrijeme miješanja, temperatura, brzina kojom se vodena i organska faza dovode u homogenizator	viskoznost, provodljivost, veličina kapljica, omjer organske i unutarnje vodene faze, morfologija unutarnjih odjeljaka, uspješnost uklapanja
SEKUNDARNA EMULZIJA	brzina miješanja, vrijeme miješanja, promjer i dizajn rotora, temperatura, volumen vanjske vodene faze	veličina kapljica, distribucija veličine kapljica, morfologija multivezikularnih vezikula
UKLANJANJE ORGANSKOG OTAPALA	brzina protoka plina, pjenjenje, temperatura, vrijeme	učinkovitost uklanjanja otapala, brzina uklanjanja otapala
MIKROFILTRACIJA ILI CENTRIFUGIRANJE	brzina protoka, maseni protok kod recirkulacije, volumen izmjene pufera, brzina centrifugiranja, temperatura	svojstva vanjske vodene faze, uspješnost uklapanja, morfologija
UKUPNI PROCES	kakvoća polaznih tvari (npr. fosfolipida, neutralnog lipida, djelatne tvari)	veličina čestica, ukupno iskorištenje, stabilnost formulacije, profil oslobađanja lijeka ( <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> )

#### *Karakterizacija formulacije lijeka*

Kritična svojstva kakvoće formulacije liposoma mogu imati značajan utjecaj na farmakokinetička i farmakodinamička svojstva lijeka *in vivo*. Kako bi proizvodnja kompleksnog sustava multivezikularnih liposoma rezultirala lijekom koji će dobiti odobrenje za stavljanje u promet, potrebno je definirati relevantne fizikalno-kemijske karakteristike. One uključuju:

- temeljitu karakterizaciju lipidnih komponenata (opis, izvor, sadržaj, način proizvodnje, profil onečišćenja, izomere, stabilnost),
- kakvoću, čistoću i stabilnost drugih pomoćnih tvari,

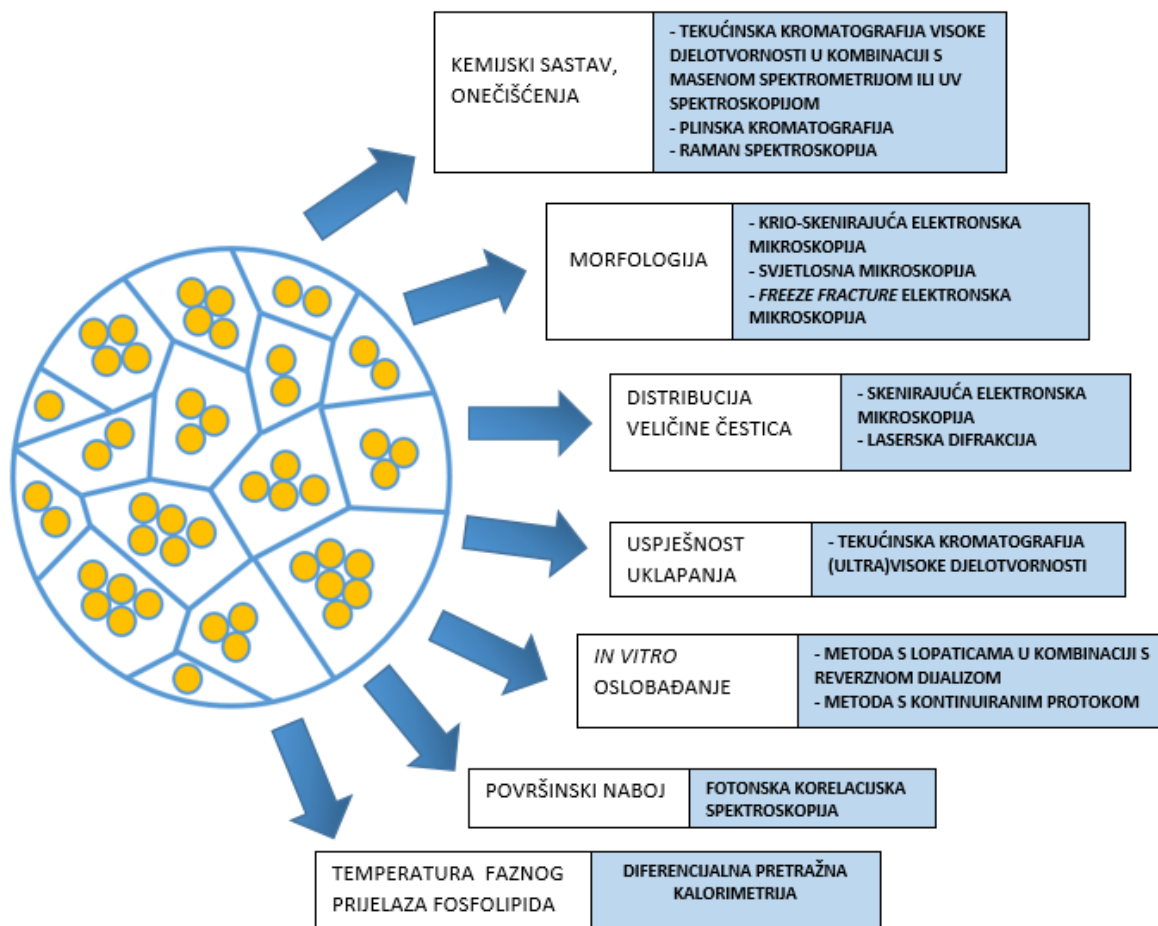
- identifikaciju i kontrolu ključnih intermedijera u proizvodnji,
- postavljanje prihvatljivog raspona omjera djelatne tvari i lipidnih komponenata u relevantnim koracima proizvodnje,
- morfologiju liposoma, srednji promjer i distribuciju veličine čestica, agregate,
- frakciju uklopljene djelatne tvari (ukupna količina djelatne tvari umanjena za količinu neuklopljene djelatne tvari),
- stabilnost djelatne tvari, lipida i funkcionalnih pomoćnih tvari u gotovom lijeku uz kvantifikaciju kritičnih razgradnih produkata (npr. oksidirane ili hidrolizirane skupine),
- profil oslobađanja djelatne tvari u relevantnim medijima,
- praćenje stabilnosti formulacije lijeka,
- robusnost procesa rekonstitucije ukoliko se lijek priprema *ex tempore*.

Kritičnim korakom smatra se određivanje kakvoće i čistoće polaznih sirovina lipida budući da su presudni za kakvoću gotove formulacije lijeka (31).

Ekstenzivna karakterizacija podrazumijeva razvoj velikog broja analitičkih metoda (Slika 12). S obzirom na varijabilnost sastavnica formulacija liposoma, razvoj robusnih, standardiziranih metoda primjenjivih na široki spektar formulacija je prilično izazovan. Posljedično se razvijaju metode specifične za određene formulacije. Takav pristup dovodi do rezultata upitne kvalitete i usporedivosti među različitim formulacijama, a to u konačnosti rezultira otežanom komercijalizacijom lijekova budući da regulatorni zahtjevi nisu dovoljno jasni. Regulatorna tijela Sjedinjenih Američkih Država i Japana izdala su smjernice koje se odnose na proizvodnju formulacija liposoma, dok je Europska agencija za lijekove izdala dokument koji se odnosi na dokumentaciju koju je potrebno priložiti prilikom registracije formulacije liposoma namijenjene intravenskoj primjeni u odnosu na originalnu formulaciju istog puta primjene. Ovi dokumenti služe kao općenite smjernice, ne pružaju informacije o specifičnim metodama potrebnim za karakterizaciju određene vrste liposoma te su stoga prikladniji za jednostavnije formulacije liposomskih lijekova baziranih na unilameralnim liposomima. Osim nedostatka



standardiziranih metoda za procjenu brojnih kritičnih svojstava kakvoće, problem predstavlja i nepostojanje referentnih standarda liposoma (5, 31-33).



Slika 12. Primjeri tehnika korištenih u karakterizaciji formulacija multivezikularnih liposoma. Slika izrađena prema podacima iz (5, 21).

### 3.5. STABILNOST MULTIVEZIKULARNIH LIPOSOMA

Uklapanjem termoosjetljivih djelatnih tvari u sustave poput nanoliposoma, kratkoročno se poboljšala njihova stabilnost. Literaturni podaci navode da je DepoFoam® formulacija stabilna u periodu od nekoliko mjeseci do nekoliko godina ukoliko se čuva na temperaturi od 4 °C (34).

Kako bi se ispitala mogućnost dugotrajne pohrane formulacije, provedena su ispitivanja fizičke stabilnosti multivezikularnih liposoma s uklopljenim citarabinom nakon postupka smrzavanja-taljenja

te liofilizacije formulacije. Kao lioprotektivno sredstvo korišten je disaharid trehaloza, za koju je utvrđeno je da pokazuje najbolji učinak ukoliko se priredi izotonična otopina jednakih koncentracija (9 %) u vanjskoj i unutarnjoj vodenoj fazi, što se može pripisati zadovoljavajućoj interakciji s molekulama fosfolipida i smanjenom istjecanju djelatne tvari zbog smanjenog osmotskog gradijenta. Budući da je poznato da sastav formulacije najvećim dijelom utječe na učinkovitost lioprotektivnih komponenata te retenciju uklopljene djelatne tvari (omjer izmjerene uspješnosti uklapanja nakon i prije smrzavanja-taljenja/liofilizacije), izrađeni su liposomi s tri različite vrste fosfolipida: dipalmitoilfosfatidilkolinom (DPPC), fosfatidilkolinom iz žutanjka jajeta (EPC) ili DOPC-om. Najlošije očuvanje uklopljenog citarabina zabilježeno je kod DOPC formulacije što je objašnjeno najlošijim interakcijama s molekulama trehaloze te nižom temperaturom faznog prijelaza DOPC-a. Također je uočeno da je triolein kao trigliceridna komponenta imao bolji protektivni učinak od srednjelančanih triglicerida zbog jačih van der Waalsovih interakcija sa slojevima fosfolipida. Uočeno je smanjenje veličine svih vrsta liposoma nakon provedenog procesa smrzavanja-taljenja, odnosno liofilizacije, što se može pripisati odvajanju triglicerida od fosfolipida prilikom formiranja kristala leda i rupture membrane vezikula tijekom smrzavanja. Međutim, nakon rehidratacije zabilježeno je djelomično očuvanje sposobnosti kontroliranog oslobađanja iz liposoma koje vjerojatno potiče od manjih liposoma koji su uspjeli očuvati strukturu (35).

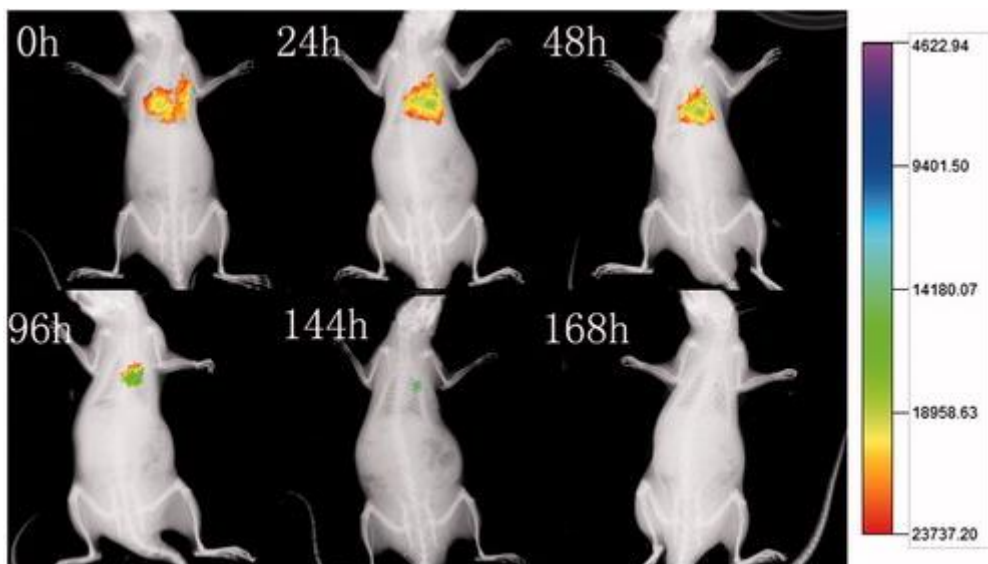
### 3.6. FORMULACIJE LIJEKOVA U PRETKLINIČKIM ISPITIVANJIMA

#### *Peptidni lijekovi*

Terapijski peptidi posebna su vrsta djelatnih tvari koje se sastoje od uređenog slijeda aminokiselina te ih karakterizira velika molekulska masa od 500 Da do 5000 Da. Posljednjih je desetak godina zabilježen porast broja peptidnih lijekova koje odlikuje veća terapijska učinkovitost u odnosu na kemijske lijekove niske molekulske mase, ali i slabija stabilnost u fiziološkim uvjetima (36). Kako bi im se povećala

stabilnost, istraživane su formulacije multivezikularnih liposoma s uklopljenim peptidnim tvarima poput leridistima, inzulinu sličnog faktora rasta 1 (IGF-1) i leuprorelina (21).

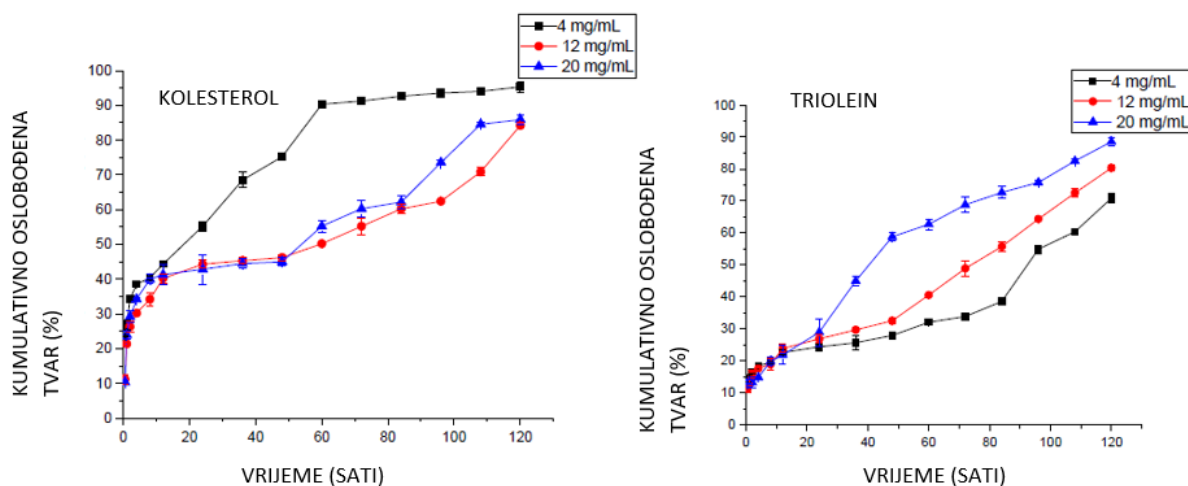
Liraglutid je jedna od naprednijih djelatnih tvari koja se primjenjuje u liječenju poremećaja metabolizma glukoze te u ublažavanju komplikacija uzrokovanih šećernom bolešću. Budući da je dijabetes doživotna bolest te je primjena antidijabetika svakodnevna, jedan od ciljeva novih formulacija je smanjenje frekvencije doziranja. S obzirom na to da je liraglutid hidrofilna tvar, metodom pripreme dvostruke emulzije uspješno je uklopljen (82 %) u multivezikularne liposome srednjeg promjera 6,69  $\mu\text{m}$ . Djelotvornost supkutano primjenjene formulacije ispitivala se na štakorima, a kao kontrola je korištena otopina neuklopljenog liraglutida. Utvrđeno je da je učinak snižavanja razine glukoze trajao čak 144 sata nakon primjene samo jedne doze inovativne formulacije lijeka, dok je u slučaju otopine liraglutida učinak trajao 30 sati. Kako bi se vizualiziralo njihovo zadržavanje na mjestu primjene nakon *in vivo* aplikacije, pripremljeni su fluorescentno označeni liposomi. Rezultati prikazani Slikom 13 ukazuju na postepen pad intenziteta fluorescencije nakon jednokratne primjene doze lijeka (37).



Slika 13. Dinamičko praćenje fluorescentno označenih multivezikularnih liposoma s uklopljenim liraglutidom nakon jednokratne primjene u štakora. Valne duljine pobuđivanja i emisije fluorescentnog markera iznosile su 730 i 790 nm. Preuzeto iz (37) i prilagođeno hrvatskom jeziku uz dozvolu izdavača Taylor & Francis.

Uklapanjem rekombinantnog humanog epidermalnog faktora rasta u multivezikularne liposome ispitivane su mogućnosti njegove peroralne primjene. Liposomi su pripremljeni metodom dvostruke emulzije te su provedena ispitivanja stabilnosti liposoma (u medijima kiselog i neutralnog pH) i zaštite djelatne tvari od enzimske razgradnje. Približno 50 % neuklopljenog peptida razgrađeno je u vodenoj otopini unutar 60 minuta naspram 10 % uklopljenog peptida u istom vremenskom periodu. Pomoću Caco-2 stanica ispitivala se i mogućnost transepitelnog transporta peptida primjenom multivezikularnih liposoma. Utvrđeno je da uklopljeni peptid pokazuje povećanu permeabilnost u odnosu na neuklopljeni. Ispitivanjem učinka zacjeljivanja akutnih čireva na želucu štakora, mjerenjem duljine ulceroznog tkiva nakon peroralne primjene, uočen je dvostruko bolji učinak uklopljenog peptida u odnosu na neuklopljeni peptid (38).

Poboljšana stabilnost i produljeni terapijski učinak nakon peroralne primjene, postignuti su i uklapanjem peptidnog inhibitora angiotenzin konvertirajućeg enzima 1 u negativno nabijene multivezikularne liposome promjera 45 – 55  $\mu\text{m}$ . Provedena *in vitro* ispitivanja ukazuju na kontrolirano oslobađanje djelatne tvari uz izostanak početnog naglog oslobađanja te snažan utjecaj koncentracija kolesterola i trioleina na profil oslobađanja. Brže oslobađanje peptida uočeno je pri nižim koncentracijama kolesterola te višim koncentracijama trioleina u formulaciji (Slika 14) (23).



Slika 14. Oslobađanje rekombinantnog humanog epidermalnog faktora rasta iz formulacije multivezikularnih liposoma ovisno o različitim koncentracijama kolesterola i trioleina u formulaciji. Preuzeto iz (23) i prilagođeno hrvatskom jeziku na temelju otvorenog pristupa pod uvjetima *Creative Commons CC BY* licence.

Nazalnim putem primjene ispitivana je mogućnost transmukozne dostave inzulina uklopljenog u multivezikularne liposome obložene mukoadhezivnim polimerima, kitozonom i karbopolom. Inzulin se iz takvih formulacija liposoma oslobađao tijekom 7 - 9 dana za razliku od konvencionalnih liposoma (24 sata). Nakon nazalne primjene (štakori) utvrđeno je da formulacija liposoma s kitozonom učinkovito snizuje razinu glukoze u plazmi (za 35 % tijekom dva dana), u odnosu na formulaciju multivezikularnih liposoma bez kitozana (smanjenje za 32 % nakon 12 sati) i formulaciju konvencionalnih liposoma (smanjenje za 34 % nakon 8 sati). Slični rezultati postignuti su i s formulacijom multivezikularnih liposoma obloženih karbopolom (39).

Konvencionalno liječenje inzulinom može rezultirati primjenom previsokih doza koje rezultiraju neadekvatnom kontrolom razine glukoze u krvi. Budući da glukoza-oksidadza katalizira brzu konverziju glukoze u glukonsku kiselinu i vodikov peroksid, Liu i suradnici (2021.) su pripravili multivezikularne liposome s inzulinom osjetljive na glukozu, pri čemu je oslobađanje kontrolirano razinom glukoze u okolini. U membrani liposoma uklopljeni su distearoilfosfatidiletanolamin (DSPE) i 3-fluoro-4-oktiloksikarbonilfenilboronska kiselina (FOP) koja pospješuje zasićenje površine liposoma glukozom. U vodenu fazu, osim inzulina, uklopljeni su enzimi glukoza-oksidadza i katalaza koja doprinosi reakciji

razgradnje glukoze razgradnjom vodikova peroksida na kisik i vodu. Uspješnost uklapanja svih peptida u liposome promjera 55  $\mu\text{m}$  se kretala između 40 % i 50 %. Utvrđeno je da lokalnim povišenjem koncentracije glukoze oko membrane liposoma, dolazi do katalize razgradnje *in situ* posredstvom glukoza-oksidge te formiranja glukonske kiseline i vodikovog peroksida, zbog čega dolazi do pada pH te povišenja lokalne koncentracije vodikova peroksida. Slijedi protonacija DSPE-a u membrani liposoma i peroksidacija lipida vodikovim peroksidom što vodi do destrukcije vanjske membrane liposoma te oslobađanja inzulina. Unutarnja struktura liposoma pritom ostaje sačuvana te je potrebna ponovna promjena lokalnih uvjeta kako bi došlo do oslobađanja djelatne tvari. *In vitro* ispitivanjem u otopinama glukoze koncentracija 100 mg/dl i 400 mg/dl utvrđeno je oslobađanje od 29 % i 39 % inzulina tijekom 5 sati, odnosno 48 % i 92 % inzulina tijekom 20 sati. Hipoglikemijski učinak formulacije *in vivo* je potvrđen ispitivanjem na štakorima s induciranim dijabetesom, dok je biokompatibilnost sustava potvrđena MTT testom na kulturi HeLa stanica (40).

#### *Antimikrobni lijekovi*

Grayson i sur. (1993.) su ispitivali terapijske mogućnosti multivezikularnih liposoma s gentamicinom (promjer 15 – 35  $\mu\text{m}$ ), pripremljenih iz DOPC-a, DPPG-a, kolesterola i trioleina. U sklopu *in vivo* ispitivanja, miševima su supkutno primijenjene inovativna formulacija ili formulacija neuklopljenog gentamicina. Tkivo oko mjesta primjene se uklanjalo u određenim vremenskim intervalima tijekom perioda od 5 dana. Utvrđeno je da je gentamicin iz formulacije s multivezikularnim liposomima bio prisutan u tkivu i 5 dana nakon primjene formulacije, dok su razine neuklopljenog gentamicina bile jedva prisutne u tkivu 6 sati nakon primjene formulacije. Ispitivanje mikrobiološke aktivnosti provedeno je na kulturi bakterija *Staphylococcus aureus*. Pokazano je da, ukoliko se uklopljeni gentamicin profilaktički primijeni 48 sati ranije na mjesto bakterijske inokulacije, dolazi do četverostrukog log smanjenja CFU po gramu tkiva u usporedbi s kontrolom (voda). Neuklopljeni gentamicin i liposomi bez uklopljenog lijeka, pod istim uvjetima, nisu pokazali smanjenje CFU (41).

Standardno liječenje sistemskim antibioticima uspješno je kod nekompliciranih infekcija. Međutim, u određenim slučajevima, poput slabe prokrvljenosti tkiva ili snažne adherencije bakterija uslijed prisutnosti stranog tijela, ovakva terapija nerijetko je neučinkovita. Kako bi se osigurale visoke lokalne koncentracije antibiotika na mjestu infekcije, uzrokovane prisutnim stranim tijelom, Roehrborn i sur. (1995.) su pripravili multivezikularne liposome s amikacinsulfatom. Miševima su supkutano implantirane teflonske cijevi te je lokalno, nakon 3 dana, inokulirana suspenzija bakterija *S. aureus*. Nakon inokulacije, dio životinja nije liječen, a pojedinim skupinama su lokalno aplicirane injekcije uklopljenog amikacinsulfata, neuklopljenog amikacinsulfata i liposoma bez uklopljene djelatne tvari. Nakon 10 dana životinje su žrtvovane te je izmjeren broj inficiranih teflonskih cijevi i log CFU u tkivu rane. Lokalno i sistemsko liječenje neuklopljenim amikacinsulfatom nije imalo učinka, dok je primjena liposomske formulacije rezultirala značajnim smanjenjem broja inficiranih teflonskih cijevi s 86 % na 25 %, a log CFU po gramu tkiva se smanjio s 4,8 na 1,3 (42).

#### *Antitumorski lijekovi*

Liječenje tumora je jedan od najvećih izazova u kontekstu globalnog zdravstva, a svake godine raste broj bolesnika kojima je dijagnosticirana neka vrsta tumora. Najčešće se primjenjuje kemoterapija citotoksičnim lijekovima koji ispoljavaju djelovanje u specifičnoj fazi staničnog ciklusa. Međutim, veliki broj ovih lijekova karakterizira kratko vrijeme polueliminacije. Zbog toga je potrebno češće primjenjivati lijek čime se povećava učestalost neželjenih nuspojava.

Multivezikularni liposomi predstavljaju potencijalnu platformu za dostavu upravo ove skupine lijekova. Oni omogućuju produljeno oslobađanje djelatne tvari uz dulje održavanje terapijske koncentracije što posljedično smanjuje frekvenciju doziranja i pojavnost nuspojava (19).

Najveći broj pretkliničkih ispitivanja antitumorskih lijekova uklopljenih u multivezikularne liposome obuhvaća supkutani put primjene. U multivezikularne liposome, namijenjene ovom putu primjene, uklapani su hidroskamptotecin, cisplatin, metotreksat i bleomicinsulfat (19). Hidroskamptotecin je

tvar slabo topljiva u vodi što je jedna od glavnih prepreka njegove kliničke primjene. Primjenjuje se u obliku nestabilnog karboksilata što rezultira iznimno kratkim vremenom polueliminacije u plazmi od 5 minuta te potencijalno nepredvidivim nuspojavama. Osim toga, djelovanje hidrosikamptotecina ovisi o fazi staničnog ciklusa. Uklapanjem u multivezikularne liposome mogla bi se poboljšati njegova stabilnost te produljiti vrijeme zadržavanja u cirkulaciji. Metodom pripreve dvostruke emulzije kompleks hidrosikamptotecina i fosfolipida je uspješno uklopljen (90 %) u multivezikularne liposome promjera 9  $\mu\text{m}$ . *In vivo* ispitivanjem na štakorima potvrđeno je postepeno oslobađanje hidrosikamptotecina tijekom perioda od 6 dana (43).

Xiao i sur. (2004.) su ispitivali antitumorski učinak cisplatina uklopljenog u multivezikularne liposome (17  $\mu\text{m}$ ). Miševima, kojima su prethodno supkutano inokulirane S180 stanice tumora, aplicirana je formulacija uklopljenog cisplatina ili otopina cisplatina (kontrola). Životinje su žrtvovane u određenim vremenskim intervalima te se mjerila koncentracija cisplatina u tumoru i raznim tkivima. Utvrđeno je produljeno zadržavanje cisplatina u plazmi (48 sati) i njegovo značajnije nakupljanje u tumoru, jetri i slezeni, odnosno organima mononuklearnog fagocitnog sustava u odnosu na otopinu cisplatina, što je rezultiralo većom učinkovitošću u smislu smanjenja volumena tumora (44).

Ispitivanje učinkovitosti supkutano primijenjenih multivezikularnih liposoma s metotreksatom provedeno na miševima, kojima je prethodno injicirana kultura stanica leukemije L1210, pokazalo je produljenje vremena polueliminacije s 0,53 sata na 100 sati uz povećanje potentnosti lijeka 130 puta (u odnosu na neuklopljeni metotreksat). Srednja smrtonosna doza,  $LD_{50}$ , smanjila se 110 puta zbog čega nije došlo do značajne promjene u terapijskom indeksu (45).

Pozitivni ishodi u liječenju melanoma na animalnom modelu (miševi) potvrđena je i s bleomicinsulfatom uklopljenim (77 %) u multivezikularne liposome (19  $\mu\text{m}$ ). Osim produljenog vremena polueliminacije (32 sata), postignuta je jača inhibicija rasta tumora u usporedbi s otopinom bleomicinsulfata (46).



Osim supkutane primjene, multivezikularni liposomi su često ispitivani za intratekalnu primjenu. Kim i suradnici (1987.) su ispitivali terapijske mogućnosti 1- $\beta$ -D-arabinofuranozilcitozina uklopljenog u multivezikularne liposome. Testiranja provedena na štakorima su pokazala poboljšanje terapijskog indeksa zbog smanjenih vršnih koncentracija djelatne tvari te značajno produljenje vremena oslobađanja ( $t_{1/2} = 148$  sati) u odnosu na neuklopljenu djelatnu tvar ( $t_{1/2} = 2,7$  sata) (19, 47).

Produljeno oslobađanje citarabina iz multivezikularnih liposoma dokazano je u sklopu *in vivo* ispitivanja na kunićima nakon supkonjunktivalne primjene formulacije kao potporne terapije kirurškom liječenju glaukoma. Terapija obično zahtijeva dnevnu primjenu fluorouracila supkonjunktivalno što je neugodno i povećava rizik od razvoja infekcije. Citarabin je stoga odabran kao potentniji antimetabolit u odnosu na fluorouracil. Kunićima je supkonjunktivalno aplicirana inovativna formulacija, a vrijeme polueliminacije citarabina iznosilo je 52,5 sati, za razliku od otopine citarabina (0,2 sata). U određenim vremenskim intervalima prikupljana je suzna tekućina te je u njoj i očnom tkivu koncentracija neuklopljenog lijeka bila manja od 1 % nakon 8 sati, dok je nakon primjene liposoma koncentracija citarabina u konjunktivi i episkleralnom tkivu iznosila gotovo 30 % nakon 72 sata (48).

Korištenje 5-fluorouracila povećava uspješan ishod trabekulektomije, ali zahtijeva čestu primjenu lijeka u obliku supkonjunktivalnih injekcija. Kako bi smanjili učestalost doziranja lijeka, Skuta i suradnici (1987.) su uklopili fluorouridin-5'-monofosfat, potentni metabolit 5-fluorouracila, u multivezikularne liposome, te ispitivali njihovu učinkovitost na primatima (vrsta noćni majmuni). Nakon sklerektomije, životinjama je supkonjunktivalno injicirana formulacija liposoma s 4 mg djelatne tvari u jedno oko, a fiziološka otopina (kontrola), u drugo oko. Određen broj životinja primio je tijekom narednih dana dodatne injekcije lijeka s 3 mg djelatne tvari. Utvrđeno je da bi primjena formulacije liposoma mogla odgoditi formiranje fibroznog tkiva koje se stvara nakon operacije; međutim, u jedne životinje je uočena sistemska toksičnost, a u druge teška kornealna komplikacija, za koje autori pretpostavljaju da bi se mogle izbjeći korištenjem nižih doza djelatne tvari (49). Osim supkonjunktivalnog puta primjene, potencijal produljenog djelovanja uklopljenog 5-fluorouridin-5'-monofosfata ispitan je i intravitrealno

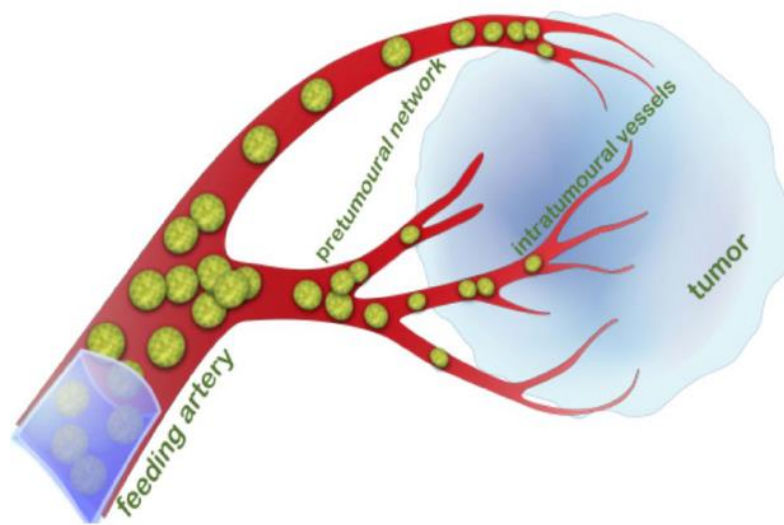
na kunićima gdje je zabilježeno produljenje vremena polueliminacije od 28 puta u odnosu na neuklopljenu djelatnu tvar (50).

Kolorektalni tumor spada u skupinu agresivnih tumora čije metastaziranje u peritonealnu šupljinu uglavnom završava smrtnim ishodom. Sistemska kemoterapija u takvom slučaju pokazuje nisku učinkovitost, a kao jedna od terapijskih mogućnosti navodi se citoreduktivna operacija nakon koje slijedi intraperitonealna kemoterapija korištenjem oksaliplatina. Nažalost, kratko vrijeme polueliminacije ove djelatne tvari otežava njezinu kliničku primjenu. Uklapanjem oksaliplatina u multivezikularne liposome ispitala se mogućnost postizanja produljenog terapijskog učinka. Provedena je optimizacija formulacije variranjem (fosfo)lipidnih sastavnica i njihovih omjera. Distearoilfosfatidilglicerol (DSPG) se pokazao ključnim za povećano uklapanje oksaliplatina (90 %). Osim produljenog oslobađanja (5 dana), značajno su porasli bioraspoloživost i vrijeme zadržavanja u plazmi u odnosu na neuklopljeni oksaliplatin (51).

Kako bi se povećala stabilnost leuprorelina, peptidne djelatne tvari koja se koristi u liječenju tumora vezanih za reproduktivni sustav, pripremljeni su multivezikularni liposomi. Primjenom samo jedne intramuskularne injekcije (štakori) došlo je do supresije razina testosterona, čiji je učinak trajao mjesec dana (52, 53).

Učinkovitost multifunkcionalnih multivezikularnih liposoma u liječenju tumora jetre transarterijskom kemoembolizacijom utvrđena je u ispitivanju na kunićima s induciranim VX2 tumorom jetre. U liposome pripravljene metodom dvostruke emulzije su uklopljeni ioversol (kontrastno sredstvo) i doksorubicin u obliku doksorubicinklorida. Optimizacijom proizvodnog postupka pripravljene su liposomi promjera 20 - 30  $\mu\text{m}$  te 50 - 60  $\mu\text{m}$ , a embolizacijski učinak se postigao variranjem lipidnih sastavnica formulacije lijeka. Hidrofobne tvari, posebno kolesterol i triolein, korištene su u visokoj koncentraciji kako bi se priredili stabilni liposomi čvršćih membrana. Rigidnost fosfolipidnih dvoslojeva postignuta je korištenjem hidrogeniranog sojinog fosfatidilkolina (HSPC) koji za razliku od DOPC-a ima višu temperaturu faznog prijelaza (55 °C). Uspješnost uklapanja ioversola iznosila je oko 73 %, dok je

uklopljenost doksorubicinklorida iznosila gotovo 99 %. Primijećeno je da s porastom koncentracije doksorubicinklorida opada stabilnost liposoma, što može biti posljedica utjecaja visoke koncentracije iona na fosfolipidni dvosloj. Status tumora, implementiranog u desni režanj jetre kunića, pratio se pomoću magnetske rezonancije (MR) i kompjutorizirane tomografije (CT). Kunići su podijeljeni u tri skupine od kojih je jedna primala formulaciju manjih liposoma, druga formulaciju većih liposoma, a treća skupina 0,9 % otopinu natrijevog klorida. Formulacije, odnosno fiziološka otopina, aplicirani su u lijevu jetrenu arteriju koja opskrbljuje tumor krvlju (Slika 15).



Slika 15. Shematski prikaz vaskularne okluzije multivezikularnim liposomima. Liposomi su nakon primjene u arteriju koja hrani tumor nošeni tokom krvi u sustav žila unutar tumora. Zbog sferičnog oblika, stabilne strukture i dobre fluidnosti, okluzija liposomima je preciznija u odnosu na okluziju česticama nesferičnog, nepravilnog oblika. Preuzeto iz (54) na temelju otvorenog pristupa pod uvjetima *Creative Commons CC BY* licence.

Angiografijom je utvrđena retencija liposoma u tkivu tumora. Stupanj embolizacije izvan ciljnog mjesta bio je niži kod liposoma veličine 50 – 60  $\mu\text{m}$  u odnosu na liposome veličine 20 – 30  $\mu\text{m}$ . Volumen tumora se u skupini životinja koje su primile formulacije liposoma značajno smanjio u odnosu na netretirane životinje, pri čemu nije bilo značajne razlike u smanjenju volumena tumora između skupina koje su primile formulaciju većih, odnosno manjih liposoma (54).

### *Ostali lijekovi*

Pored ranije spomenutih puteva primjene, ispitivana je mogućnost topikalne primjene uklopljenih hidrofilnih djelatnih tvari, odnosno njihove dostave u dublje slojeve kože olakšavanjem penetracije kroz epidermis.

Fotodinamička terapija jest posebna vrsta terapije koja se primjenjuje u liječenju kanceroznih i nekanceroznih bolesti kože. Podrazumijeva primjenu fotosenzibilizatora koji se nakupljaju u ciljnim stanicama te aktiviraju vidljivim svjetlom nakon čega dolazi do formiranja reaktivnih intermedijera (radikala) koji uništavaju ciljne stanice. Bengalska ruža (engl. *rose bengal*) jest potentni fotosenzibilizator čija je klinička primjena ograničena slabom topljivošću u lipidima i posljedičnom nemogućnošću prolaska kroz biološke membrane. Kako bi se poboljšala permeabilnost ove tvari, korištena je formulacija multivezikularnih liposoma. Variranjem (fosfo)lipidnog sastava (fosfatidilkolin ili DPPC, kolesterol, tripalmitin) optimiziran je sastav liposoma u pogledu veličine (2 – 4 µm), uspješnosti uklapanja te profila oslobađanja djelatne tvari. Najveća uspješnost uklapanja od 79 % postignuta je s formulacijom koja je sadržavala DPPC, kolesterol i tripalmitin u omjeru 1 : 0,7 : 0,1. Oslobađanje uklopljene djelatne tvari bilo je gotovo 2,5 puta brže nego kod drugih formulacija, a usporeno je uklapanjem liposoma u gel karboksimetilceluloze. Penetracija bengalske ruže u kožu iz ovih formulacija ispitivala se topikalnom primjenom na albino miševima. 15 - 30 minuta nakon nanošenja gela na obrijano područje kože, slijedilo je žrtvovanje polovice životinja iz svake skupine te izrezivanje uzorka kože. Druga polovica životinja osvjetljivana je 10 minuta sa svjetlosti valne duljine 550 nm. Te životinje su zatim žrtvovane i uzorci kože su uzeti i tretirani bojanjem s hematoksilin-eozinom. Histološkom analizom potvrđena je bolja penetracija fotosenzibilizatora u dublje slojeve kože kad je primijenjena formulacija multivezikularnih liposoma (55).

Injekcije steroidnih lijekova koriste se u liječenju naglog sensorineuralnog gubitka sluha. Međutim, njihova klinička primjena ograničena je specifičnom anatomijom uha koja otežava lokalno zadržavanje formulacije na mjestu djelovanja. Kako bi se doskočilo tom problemu, deksametazonnatrijfosfat je

uklopljen u multivezikularne liposome, umiješane u termosenzitivni gel. Srednji promjer liposoma iznosio je 14,7  $\mu\text{m}$  s uspješnosti uklapanja oko 50 %. *In vitro* ispitivanja su pokazala produljeno oslobađanje deksametazona tijekom 7 dana. Formulacija liposoma u gelu je potom aplicirana u jedno uho (bubnjište) zamorcima, prethodno izloženim velikoj buci kako bi se izazvalo oštećenje sluha, dok je u drugo uho (bubnjište) aplicirana fiziološka otopina (kontrola). Ispitivanje je pokazalo produljeno zadržavanje deksametazona u perifernoj limfi (5 - 7 dana), pri čemu nisu zabilježene značajne nuspojave lijeka (56).

Promjene u tlakovima tjelesnih tekućina mogu igrati značajnu ulogu u nastanku akutnog visinskog edema pluća. U takvim situacijama potrebno je brzo liječenje kako bi se spriječio fatalni ishod. U tu svrhu razvijena je formulacija multivezikularnih liposoma osjetljivih na tlak. Kao djelatna tvar odabran je amlodipinbesilat, blokator kalcijevih kanala. Selektivnom inhibicijom ulaska iona kalcija u glatke mišićne žila, amlodipinbesilat uzrokuje dilataciju plućnih žila i snižuje naglo povišen plućni arterijski tlak (normalni tlak < 25 mmHg), koji je jedan od glavnih faktora smrtnosti kod akutnog visinskog edema pluća. Osnovu liposoma činili su DEPC, DPPG, kolesterol i trikaprilin. Koncentracija trikaprilina bila je odgovorna za osjetljivost liposoma na tlak. Tako je u liposomima neosjetljivim na tlak koncentracija trikaprilina iznosila 4,8 mg/ml, a kod liposoma osjetljivih na tlak 1,2 mg/ml. Neovisno o sastavu, prosječna veličina liposoma kretala se oko 27  $\mu\text{m}$ , dok je zeta potencijal iznosio - 35 mV. Osjetljivost liposoma na tlak ispitala se promjenama u veličini i morfologiji liposoma. Primjena tlaka > 25 mmHg rezultirala je brzim oštećenjem liposoma osjetljivih na tlak, dok su neosjetljivi liposomi ostali stabilni između 25 mmHg i 55 mmHg. Dodatno je *in vitro* ispitivanjima na umjetnom modelu tkiva (gel kalcijeva alginata), utvrđeno da uslijed povišenog tlaka dolazi do brzog oslobađanja djelatne tvari iz liposoma osjetljivih na tlak. Kako bi se ispitaio položaj lipidnih komponenata u liposomu, korištene su Raman konfokalna mikroskopija i diferencijalna pretražna kalorimetrija. Zabilježen je gubitak specifičnih regija trikaprilina te smanjena debljina fosfolipidnog dvosloja (20 nm). Kultura humanih vaskularnih endotelnih stanica (HUVEC) korištena je za ispitivanje citotoksičnosti, a kultura humanih stanica arterijskog glatkog mišića (HUASMC) za praćenje internalizacije liposoma u stanice, kvantifikaciju

intracelularnog kalcija te ispitivanja kontraktilnosti stanica. Rezultati provedenih ispitivanja pokazali su da su liposomi s amlodipinbesilatom netoksični, ne mijenjaju protok krvi u većim žilama pluća te da se koncentriraju u plućima i sporo oslobađaju djelatnu tvar pri normalnom tlaku, što ima profilaktički učinak prije nego se razvije akutni visinski edem pluća. Uslijed povišenja plućnog arterijskog tlaka, dolazi do naglog oslobađanja amlodipinbesilata. Posljedično dolazi do uspješnijeg usporavanja progresije akutnog visinskog plućnog edema u odnosu na formulaciju gdje je djelatna tvar uklopljena u liposome koji nisu osjetljivi na tlak (57).

### 3.7. FORMULACIJE LIJEKOVA U KLINIČKIM ISPITIVANJIMA

Traneksamatna kiselina jest djelatna tvar iz skupine antihemoragika koja postiže antihemoragični učinak inhibirajući fibrinolitička svojstva plazmina. Primjenjuje se kod prevencije i liječenja krvarenja koje se može javiti prilikom različitih operativnih zahvata (58). Odobrene formulacije traneksamatne kiseline postižu učinak u trajanju od nekoliko sati, dok rizik od krvarenja može potrajati do dva ili tri dana nakon operacije. S obzirom na navedeno, formulacija multivezikularnih liposoma pod nazivom DepoTXA®, s uklopljenom traneksamatnom kiselinom, dobila je odobrenje za kliničko ispitivanje kod zahvata ugradnje totalne proteze koljena (59). Prednost ispitivane formulacije je jednokratna lokalna primjena uz postepeno oslobađanje uklopljene djelatne tvari i održavanje terapijske koncentracije kroz dulji period u usporedbi s konvencionalnim oblikom, a sama formulacija je sigurna i podnošljiva za bolesnika. Proizvođač lijeka je tvrtka Pacira Pharmaceuticals, Inc. Ispitivanje je započelo 2016. godine, no prekinuto je 2017. godine zbog malog broja ispitanika (59, 60).

Zahtjev za kliničkim ispitivanjem meloksikama, uklopljenog u formulaciju multivezikularnih liposoma, tvrtka Pacira Pharmaceuticals, Inc. predala je 2017. godine. Radi se o nesteroidnom protuupalnom lijeku namijenjenom liječenju umjerene do jake boli uklopljenom u multivezikularne liposome sastavljene od DEPC-a, DPPG-a, kolesterola i trikaprilina (21, 61). Formulacija lijeka namijenjena je jednokratnoj lokalnoj primjeni s ciljem ostvarivanja produljenog terapijskog učinka te ublažavanja boli pri nižim koncentracijama u odnosu na nesteroidne protuupalne lijekove sa sistemskim učinkom. Za

njih je poznato da uzrokuju gastrointestinalne nuspojave ovisne o dozi, a trenutno odobrene formulacije meloksikama namijenjene su peroralnoj primjeni. Početak kliničkih ispitivanja bio je planiran za 2018. godinu; međutim, trenutno nema objavljenih podataka o statusu i rezultatima ispitivanja (61).

### 3.8. ODOBRENE FORMULACIJE LIJEKOVA

#### *DepoCyte®*

Citarabin je hidrofilna antitumorska djelatna tvar koja djeluje u fazi replikacije stanične DNA. Zbog toga je njegovo produljeno zadržavanje u okolini stanice tumora od velikog značaja za uspjeh terapije (62). Nuspojave koje se mogu javiti prilikom primjene citarabina uključuju mijelosupresiju i neurotoksičnost, a njihova incidencija može se smanjiti ukoliko se izbjegava primjena visokih doza lijeka te održava terapijska koncentracija citarabina kroz dulji vremenski period (35).

Multivezikularni liposomi s uklopljenim citarabinom, primijenjeni intraperitonealno i supkutano, omogućili su produljeno oslobađanje i terapijski učinak citarabina, što je potvrđeno animalnim, ali i kliničkim ispitivanjem (48, 62-64). Učinkovitost intratekalno primjenjene formulacije liposoma s citarabinom postignuta je u liječenju relapsa središnjeg živčanog sustava kod akutne limfoblastične leukemije te veoma agresivnih limfoma (65). Takvi pozitivni terapijski ishodi rezultirali su registracijom formulacije multivezikularnih liposoma s citarabinom. Lijek DecpoCyte®, tvrtke Pacira Pharmaceuticals Inc., namijenjen liječenju limfomatoznog meningitisa, dobio je odobrenje za stavljanje u promet na tržištu Sjedinjenih Američkih Država 1999. godine te na tržištu Europe 2001. godine. Radi se o suspenziji za injekciju za intratekalnu primjenu gdje je djelatna tvar citarabin uklopljena u liposome proizvedene DepoFoam® tehnologijom (28, 66). Strukturne komponente liposoma u DepoCyte®-u su fosfolipidi DOPC i DPPG u molarnom omjeru 7 : 1, dok preostale lipidne komponente čine kolesterol i triolein u omjeru 11 : 1 (28). Liposomi su pripremljeni u 0,9 % otopini natrijeva klorida kao vanjskoj vodenoj fazi te pakirani u bočice volumena 5 ml u koncentraciji od 10 mg/ml citarabina (21, 66).

Preporučena duljina primjene varira ovisno o vrsti terapije (indukcijska terapija, konsolidacijska terapija ili terapija održavanja), a pojedinačne doze od 50 mg djelatne tvari primjenjuju su svakih 14 ili 28 dana. Lijek je potrebno primjenjivati polaganim injiciranjem izravno u cerebrospinalnu tekućinu kroz razdoblje od 1-5 minuta (66).

Ovom formulacijom doskočilo se problemu kratkog vremena polueliminacije citarabina u cerebrospinalnom fluidu te se izbjegla potreba za učestalom intratekalnom primjenom koja nosi rizik od infekcija, zahtijeva veći vremenski angažman medicinskog osoblja, a osim toga je i neugodna za bolesnika. Međutim, lijek je na zahtjev nositelja odobrenja povučen 2018. godine zbog kontinuiranih poteškoća u proizvodnji za koje se pretpostavlja da su povezani s izazovima u provođenju aseptičke izrade (34, 67-69).

#### *DepoDur®*

Primjena opioidnih lijekova epiduralnom infuzijom može dovesti do učinkovite postoperativne analgezije, ali i poteškoća koje su vezane uz zahtjevnju tehničku izvedbu ovog načina primjene lijeka ili problema vezanih uz položaj epiduralnog katetera zbog mogućnosti nastanka hematoma (70).

Druga formulacija multivezikularnih liposoma koja je dobila odobrenje za stavljanje u promet namijenjena je postoperativnoj analgeziji jednokratnom primjenom injekcije u epiduralni prostor. Time se izbjegavaju neželjene posljedice primjene katetera te olakšava primjena lijeka (70). Riječ je o lijeku DepoDur®, tvrtke Pacira Pharmaceuticals Inc., gdje su multivezikularni liposomi s morfinsulfatom, kao uklopljenom djelatnom tvari, suspendirani u 0,9 % otopini natrijevog klorida. Koncentracija morfinsulfata iznosila je 10 mg/ml, a pakiranja su volumena 1 ml, 1,5 ml i 2 ml (71). DepoDur® je načinjen od DOPC-a i DPPG-a u omjeru 4,2 : 0,9 te kolesterola, trioleina i trikaprilina u omjeru 3,3 : 0,1 : 0,3 (28). Primjena DepoDur®-a rezultirala je produljenim oslobađanjem morfina uz ograničenu sistemsku apsorpciju te poboljšanom retencijom lijeka u epiduralnom prostoru zbog ograničenog nakupljanja u limfnom sustavu, što je rezultat većih dimenzija vezikula (7 - 40 µm) (70). Lijek je dobio

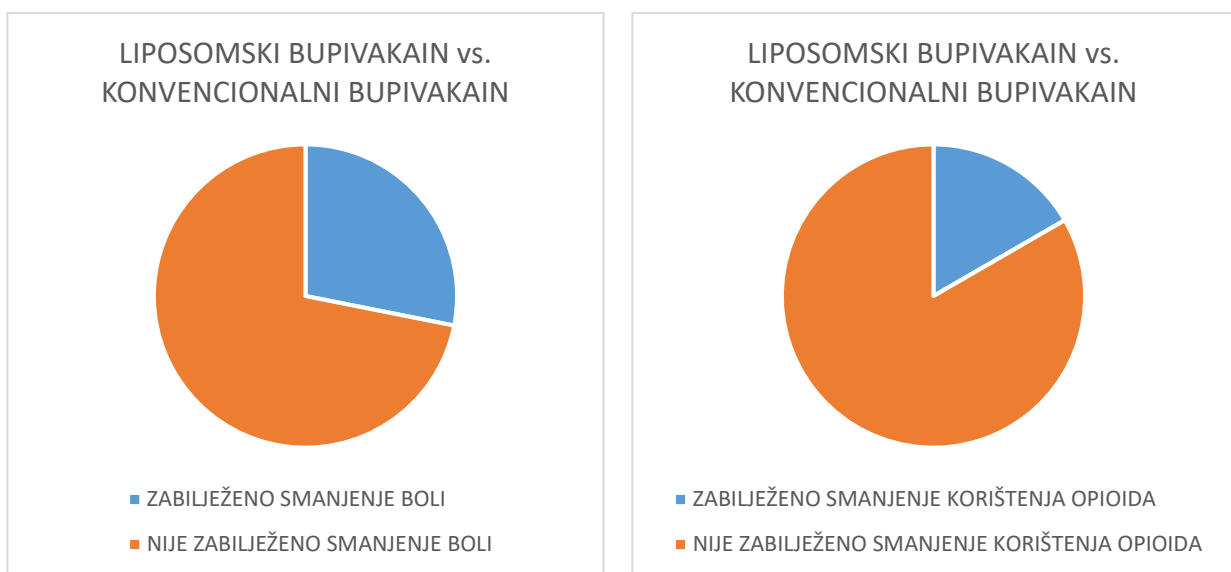


odobrenje za primjenu u Sjedinjenim Američkim Državama 2004. godine; međutim, tvrtka odgovorna za proizvodnju lijeka, Pacira Pharmaceuticals Inc., naknadno je, iz razloga koji nisu poznati, ukinula proizvodnju (21, 68).

### *Exparel®*

Treća formulacija lijeka temeljena na tehnologiji multivezikularnih liposoma koja je dobila odobrenje za stavljanje u promet na području Sjedinjenih Američkih Država 2011. godine i na području Europe 2020. godine jest Exparel® proizvođača Pacira BioSciences Inc (28). Djelatna tvar je neopioidni anestetik bupivakain koji se primjenjuje lokalno, infiltracijom ili perineuralno, a njegova primjena mogla bi smanjiti potrebu za primjenom opioidnih lijekova u liječenju postoperativne boli (72, 73). Liposomi s uklopljenom djelatnom tvari suspendirani su u 0,9 % otopini natrijeva klorida, a sastavljeni su od DEPC-a, DPPG-a, kolesterola i trikaprilina (8,2 : 0,9 : 4,7 : 2) (21, 28). Exparel® je indiciran za ublažavanje bolova nakon određenih kirurških zahvata u odraslih i djece u dobi od šest godina i starije ili pak u odraslih za regionalno ublažavanje bolova ubrizgavanjem lijeka oko živca koji opskrbljuje donje udove ili rame. Jednokratno se primjenjuje, a preporučena doza ovisi o veličini patološkog područja i samom bolesniku, no ne smije premašivati 266 mg djelatne tvari. Farmaceutski oblik lijeka je disperzija za injekciju s produljenim oslobađanjem, dostupna u bočicama volumena 10 ml i 20 ml, pri čemu 1 ml suspenzije sadrži 13,3 mg bupivakaina. Budući da je bol subjektivni doživljaj, teško je procijeniti točno trajanje učinka primijenjenog Exparel®-a. Rezultati kliničkih ispitivanja navode terapijski učinak u trajanju od nekoliko dana nakon primjene samo jedne doze lijeka, pri čemu je učinkovitost Exparel®-a uspoređivana s placebo (72). Međutim, rezultati ispitivanja učinkovitosti liposomske formulacije bupivakaina u odnosu na konvencionalnu formulaciju bupivakaina su nejasni. Objavljeni rezultati kliničkih ispitivanja ukazuju na poboljšan učinak liposomskog bupivakaina u odnosu na neliposomski bupivakain u smislu smanjenja primjene opioidnih lijekova i bolje kontrole boli (74, 75). S druge strane, metaanalizom randomiziranih kliničkih ispitivanja kod primjene liposomske formulacije bupivakaina infiltracijom, zaključeno je kako liposomski bupivakain nema prednost u smislu poboljšane, odnosno

produljene analgezije, niti smanjuje primjenu opioda u odnosu na konvencionalne formulacije lokalnih anestetika neliposomskog bupivakaina ili ropivakaina (Slika 16). Nije utvrđen značajan analgetski učinak nakon 24 sata, kao niti kraće trajanje liječenja; međutim, postoperativna mučnina je bila značajno smanjena u ispitanika koji su primili liposomski bupivakain (75-77). Nadalje, metaanalizom kliničkih ispitivanja gdje je liposomski bupivakain primijenjen perineuralno, zaključeno je da nema klinički značajnih benefita u odnosu na klasičnu formulaciju bupivakaina (78).



Slika 16. Prikaz ishoda objavljenih randomiziranih kliničkih ispitivanja liposomskog bupivakaina u odnosu na konvencionalnu formulaciju bupivakaina. Izrađeno prema podacima objavljenim u (75).

#### 4. RASPRAVA

Liposomi, kao nosači lijekova, nude brojne prednosti u odnosu na konvencionalne farmaceutsko-tehnološke oblike; međutim, postoje i ograničenja u vidu niske uspješnosti uklapanja hidrofilnih djelatnih tvari te dugoročne stabilnosti liposoma. S obzirom na veličinu koja može dosegnuti nekoliko desetaka mikrometara, veliki udio uklopljene vodene faze (95 %) te karakterističnu unutarnju strukturu, gdje tvar u unutrašnjosti liposoma ostaje sačuvana kroz dulji vremenski period, multivezikularni liposomi mogu poslužiti kao platforma koja premošćuje navedena ograničenja. Istovremeno se mogu očuvati pozitivne karakteristike liposoma kao nosača lijekova poput povećanja bioraspoloživosti i biokompatibilnosti. Budući da posjeduju veću uspješnost uklapanja od konvencionalnih ili multilamelarnih liposoma, potrebno je za istu dozu lijeka primijeniti manju količinu formulacije što bi moglo rezultirati manjom učestalosti nuspojava. Na poboljššan profil nuspojava utječe i mogućnost postizanja kontroliranog oslobađanja uklopljene djelatne tvari kroz dulji vremenski period, uz izostanak naglog, početnog oslobađanja velike količine djelatne tvari, što bi moglo rezultirati smanjenom frekvencijom doziranja i većom suradljivošću bolesnika.

Produljeni terapijski učinak, uz izbjegavanje visokih vršnih koncentracija djelatne tvari u krvi, od posebnog je značaja u liječenju antitumorskim lijekovima. Njihovo djelovanje nerijetko ovisi o specifičnoj fazi staničnog ciklusa, a u visokim koncentracijama mogu izazivati teške nuspojave i oštetiti zdravo tkivo.

Dok su trenutno odobrene formulacije liposoma namijenjene uglavnom intravenskoj primjeni, multivezikularni liposomi zbog svoje veličine i unutarnje strukture pružaju mogućnost formiranja depoa na mjestu primjene te se stoga primjenjuju drugim putevima parenteralne primjene, najčešće supkutano, intratekalno i intramuskularno. Usprkos tome, provedeno je ispitivanje intravenski primijenjene formulacije multivezikularnih liposoma na glodavcima (miševi) te je pokazano da njihova primjena nema utjecaj na protok krvi u većim žilama pluća. Međutim, potrebno je uzeti u obzir i veličinu liposoma u provedenom ispitivanju ( $< 30 \mu\text{m}$ ) te provesti dodatna ispitivanja koja bi potvrdila ovu

pretpostavku (57). Ukoliko se ovaj način primjene pokaže izvedivim, formulacije multivezikularnih liposoma mogle bi se pasivnom embolizacijom koncentrirati u žilama pluća i koristiti za liječenje bolesti pluća.

Posljednjih godina došlo je do ekspanzije u istraživanju i razvoju bioloških lijekova čije su djelatne tvari visokomolekularni peptidi topljivi u vodi, osjetljivi na fiziološke uvjete. S obzirom na veliki udio vodene faze koju je moguće uklopiti u multivezikularne liposome, svoju bi primjenu mogli pronaći upravo u ovom brzo rastućem području farmaceutske industrije.

U skladu s 3R načelom, prisutan je trend smanjivanja korištenja animalnih studija u prekliničkim ispitivanjima. Na temelju navedenih primjera ispitivanih formulacija lijekova, vidljivo je da je određen broj *in vitro* ispitivanja proveden na staničnim modelima. Međutim, kako veličina stanica uglavnom ne premašuje 100  $\mu\text{m}$ , upitna je primjenjivost ovakvih modela u ispitivanju formulacija multivezikularnih liposoma što bi moglo otežati njihov razvoj.

Iza odobrenih formulacija lijekova koje se temelje na tehnologiji multivezikularnih liposoma (DepoFoam®) zasad stoji samo jedna tvrtka, iako su provedena brojna preklinička istraživanja. Jednu od glavnih prepreki za komercijalizaciju ovog tipa formulacije lijeka predstavlja potreba za posjedovanjem kompleksnog postrojenja koje omogućava provođenje velikog broja aseptičkih koraka proizvodnje. Drugi limitirajući čimbenik su kvalificirani zaposlenici zaduženi za razvoj proizvodnog postupka gdje je potrebno optimizirati (fosfo)lipidni sastav formulacije, jasno definirati trajanje svakog koraka te kritične parametre po fazama proizvodnje. Osoblje mora biti dobro educirano za proizvodnju u aseptičkim uvjetima kako bi se izbjegla slučajna kontaminacija mikroorganizmima. Ovim izazovima moglo bi se doskočiti razvojem ekonomičnih automatiziranih postrojenja ili pak alternativnim metodama sterilizacije. Razvoj prikladnijih metoda sterilizacije bio bi od posebnog značaja s obzirom na to da trenutno ne postoji drugi način sterilizacije strukturnih lipidnih komponenata osim sterilne filtracije kojom se, zbog veličine pora filtera, ne isključuje rizik od kontaminacije virusima i nekim manjim bakterijama.

Komercijalizaciju dodatno otežavaju nedostatak standardiziranih analitičkih metoda za definiranje kakvoće polaznih sirovina, intermedijera i gotove formulacije lijeka te nedostatak egzaktnog regulatornog okvira koji bi se odnosio na specifične vrste liposoma što otežava definiranje dokumentacije potrebne prilikom registracije lijeka.

Usprkos navedenim ograničenjima, razvidno je da formulacija multivezikularnih liposoma pruža brojne mogućnosti što je rezultiralo povećanim brojem istraživanja koja obuhvaćaju pametne formulacije lijekova ili multifunkcionalne liposome. Utvrđeno je da se variranjem koncentracije neutralnih lipida kao i uvođenjem novih strukturnih elemenata liposoma, pored standardnih fosfolipida, kolesterola i neutralnog lipida, mogu proizvesti multivezikularni liposomi osjetljivi na uvjete okoline kao što su pH i tlak (40, 57). Nadalje, moguće je kombinirati intrinzična svojstva hidrofobnih komponenata liposoma, kao što je potencijal embolizacije (54) i farmakološke učinke djelatnih tvari koje je zbog sinergističkog učinka potrebno primijeniti u nižoj dozi, čime se povećava učinkovitost terapije i izbjegava rizik od nuspojava. Takav pristup bi u bližoj budućnosti mogao rezultirati novim formulacijama lijekova prikladnim za klinička ispitivanja.

## 5. ZAKLJUČAK

Značajna uloga multivezikularnih liposoma leži u mogućnosti uklapanja visokih koncentracija hidrofilnih makromolekula što je komplementarno rastućem tržištu bioloških lijekova. Budući da omogućuju produljeno oslobađanje djelatne tvari iz formulacije lijeka, potencijal njihove primjene obuhvaća širok spektar farmakoloških i tehnoloških izazova, od liječenja malignih oboljenja do učestale primjene lijeka. Ovo je potkrijepljeno s tri formulacije lijekova temeljenih na tehnologiji multivezikularnih liposoma koje su dobile odobrenje za stavljanje u promet (DepoCyte<sup>®</sup>, DepoDur<sup>®</sup>, Exparel<sup>®</sup>), dva klinička ispitivanja te brojnim pretkliničkim ispitivanjima. Međutim, uspješno prenošenje iz laboratorijskog u industrijsko mjerilo još je uvijek vrlo izazovno što je u konačnici rezultiralo povlačenjem s tržišta dva odobrena lijeka. Proizvodnja je kompleksna budući da suptilne varijacije u sastavnicama ili postupku proizvodnje mogu utjecati na svojstva kakvoće, a posljedično i farmakokinetična i farmakodinamička svojstva formulacije lijeka *in vivo*. Kako bi se riješio ovaj problem, potreban je razvoj prikladnijih metoda sterilizacije i regulatornog okvira koji bi obuhvaćao standardizirane analitičke metode u pojedinim fazama proizvodnje, odnosno životnog ciklusa lijeka.

## 6. LITERATURA

1. Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: strukturna svojstva i klasifikacija. *Farmaceutski glasnik* 2012;68:391-400.
2. Nsairat H, Khater D, Sayed U, Odeh F, Al Bawab A, Alshaerf W. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon* 2022;8(5):e09394.
3. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965;13:238-252.
4. Liu P, Chen G, Zhang J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. *Molecules* 2022;27(4):1372.
5. Giordani S, Marassi V, Zattoni A, Roda B, Reschiglian P. Liposomes characterization for market approval as pharmaceutical products: Analytical methods, guidelines and standardized protocols. *J Pharm Biomed Anal* 2023;236:115751.
6. Crommelin DJA, van Hoogevest P, Storm G. The role of liposomes in clinical nanomedicine development. What now? Now what? *J Control Release* 2020;318:256-263.
7. Hussain A, Singh S, Sharma D, Webster TJ, Shafaat K, Faruk A. Elastic liposomes as novel carriers: recent advances in drug delivery. *Int J Nanomedicine* 2017;12:5087-5108.
8. Yamazoe E, Fang JY, Tahara K. Oral mucus-penetrating PEGylated liposomes to improve drug absorption: Differences in the interaction mechanisms of a mucoadhesive liposome. *Int J Pharm* 2021;593:120148.
9. Cohen R, Steiner A, Kanaan H, Barenholz Y. Chemical and physical characterization of remotely loaded bupivacaine liposomes: comparison between large multivesicular vesicles and small unilamellar vesicles. *J Mater Chem* 2013;1:4619-4627.
10. Mozafari MR, Mazaheri E, Dormiani K. Simple Equations Pertaining to the Particle Number and Surface Area of Metallic, Polymeric, Lipidic and Vesicular Nanocarriers. *Sci Pharm* 2021;89(2):15.
11. Guimarães D, Cavaco-Paulo A, Nogueira E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. *Int J Pharm* 2021;601:120571.
12. Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: metode priprave. *Farmaceutski glasnik* 2012;68,457-466.
13. Kim S, Turker MS, Chi EY, Sela S, Martin GM. Preparation of multivesicular liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1983;728(3):339-48.

14. Salehi B, Mishra AP, Nigam M, Kobarfard F, Javed Z, Rajabi S, Khan K, Ashfaq HA, Ahmad T, Pezzani R, Ramírez-Alarcón K, Martorell M, Cho WC, Ayatollahi SA, Sharifi-Rad J. Multivesicular Liposome (Depofoam) in Human Diseases. *Iran J Pharm Res* 2020;19(2):9-21.
15. Spector MS, Zasadzinski JA, Sankaram MB. Topology of multivesicular liposomes, a model biliquid foam. *Langmuir* 1996;12:4704-4708.
16. Ellena JF, Le M, Cafiso DS, Solis RM, Langston M, Sankaram MB. Distribution of phospholipids and triglycerides in multivesicular lipid particles. *Drug Deliv* 1999;6:97–106.
17. Spooner PJR, Small DM. Effect of free cholesterol on incorporation of triolein in phospholipid bilayers. *Biochemistry* 1987;26:5820-5825.
18. Pakkanen KI, Duelund L, Qvortrup K, Pedersen JS, Ipsen JH. Mechanics and Dynamics of Triglyceride-Phospholipid Model Membranes: Implications for Cellular Properties and Function. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2011;1808(8),1947– 1956.
19. Naeini SBM, Dadashzadeh S, Haeri A, Mahjoub MA, Javidi J, Vatankhah M. Multivesicular liposomes as a potential drug delivery platform for cancer therapy: A systematic review. *J Drug Deliv Sci Technol* 2021;66:102842.
20. Mantripragada S. A lipid based depot (DepoFoam technology) for sustained release drug delivery. *Prog Lipid Res* 2002;41(5):392-406.
21. Chaurasiya A, Gorajiya A, Panchal K, Katke S, Singh AK. A review on multivesicular liposomes for pharmaceutical applications: preparation, characterization, and translational challenges. *Drug Deliv Transl Res* 2022;12(7):1569-1587.
22. Pande S. Liposomes for drug delivery: review of vesicular composition, factors affecting drug release and drug loading in liposomes. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2023;51(1):428-440.
23. Li N, Shi A, Wang Q, Zhang G. Multivesicular liposomes for the sustained release of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from peanuts: design, characterization, and in vitro evaluation. *Molecules* 2019;24(9):1746.
24. Manna S, Wu Y, Wang Y, Koo B, Chen L, Petrochenko P, Dong Y, Choi S, Kozak D, Oktem B, Xu X, Zheng J. Probing the mechanism of bupivacaine drug release from multivesicular liposomes. *J Control Release* 2019;294:279-287.
25. Sankaram MB, Kim S. Preparation of multivesicular liposomes for controlled release of encapsulated biologically active substances. US5993850A (Patent) 1999.  
*Available at: <https://patents.google.com/patent/US5993850A/en>. Accessed March 26, 2024.*
26. Hartounian H, Meissner D, Pepper CB. Production of multivesicular liposomes. US9585838B2 (Patent) 2017.  
*Available at: <https://patents.google.com/patent/US9585838B2/en>. Accessed March 26, 2024.*



27. Hall JS, Turnbull DJ, Grigsby JJ, Ardekani SM, Davis PN, Garcia LD, Kurz SM, Los KDA. Manufacturing of bupivacaine multivesicular liposomes. US11033495B1 (Patent) 2021.  
*Available at:* <https://patents.google.com/patent/US11033495B1/en>. Accessed March 26, 2024.
28. Lu B, Ma Q, Zhang J, Liu R, Yue Z, Xu C, Li Z, Lin H. Preparation and characterization of bupivacaine multivesicular liposome: A QbD study about the effects of formulation and process on critical quality attributes. *Int J Pharm* 2021;598:120335.
29. European Pharmacopoeia. 11th edition. Strasbourg: Council of Europe; 2023. Parenteral preparations; p. 396-400.
30. Delma KL, Lechanteur A, Evrard B, Semd  R, Piel G. Sterilization methods of liposomes: Drawbacks of conventional methods and perspectives. *Int J Pharm* 2021;597:120271.
31. European Medicines Agency (EMA): Data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product - Scientific guideline: Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product 2013.  
*Available at:* [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-data-requirements-intravenous-liposomal-products-developed-reference-innovator-liposomal-product-revision-2\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-data-requirements-intravenous-liposomal-products-developed-reference-innovator-liposomal-product-revision-2_en.pdf). Accessed May 15, 2024.
32. U.S. Food & Drug Administration (FDA): Regulatory information: Search for FDA Guidance Documents: Liposome Drug Products: Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation 2018.  
*Available at:* <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/liposome-drug-products-chemistry-manufacturing-and-controls-human-pharmacokinetics-and>. Accessed May 15, 2024.
33. National Institute of Health Sciences: Drugs-Medical Devices: Division of Drugs: Guideline for the Development of Liposome Drug Products 2016.  
*Available at:* [https://www.nihs.go.jp/drug/section4/160328\\_MHLW\\_liposome\\_guideline.pdf](https://www.nihs.go.jp/drug/section4/160328_MHLW_liposome_guideline.pdf). Accessed May 15, 2024.
34. Angst MS, Drover DR. Pharmacology of drugs formulated with DepoFoam: a sustained release drug delivery system for parenteral administration using multivesicular liposome technology. *Clin Pharmacokinet* 2006;45(12):1153-76.
35. Chen C, Han D, Zhang Y, Yuan Y, Tang X. The freeze-thawed and freeze-dried stability of cytarabine-encapsulated multivesicular liposomes. *Int J Pharm* 2010;387(1-2):147-53.
36. Wang L, Wang N, Zhang W, Cheng X, Yan Z, Shao G, Wang X, Wang R, Fu C. Therapeutic peptides: current applications and future directions. *Sig Transduct Target Ther* 2022;7:48.

37. Zhang L, Ding L, Tang C, Li Y, Yang L. Liraglutide-loaded multivesicular liposome as a sustained-delivery reduces blood glucose in SD rats with diabetes. *Drug Deliv* 2016;23(9):3358-3363.
38. Li H, An JH, Park JS, Han K. Multivesicular liposomes for oral delivery of recombinant human epidermal growth factor. *Arch Pharm Res* 2005;28:988–94.
39. Jain AK, Chalasani KB, Khar RK, Ahmed FJ, Diwan PV. Muco-adhesive multivesicular liposomes as an effective carrier for transmucosal insulin delivery. *J Drug Target* 2007;15(6):417-27.
40. Liu G, He S, Ding Y, Chen C, Cai Q, Zhou W. Multivesicular Liposomes for Glucose-Responsive Insulin Delivery. *Pharmaceutics* 2021;14,21.
41. Grayson LS, Hansbrough JF, Zapata-Sirvent RL, Kim T, Kim S. Pharmacokinetics of DepoFoam gentamicin delivery system and effect on soft tissue infection. *J Surg Res* 1993;55(5):559-64.
42. Roehrborn AA, Hansbrough JF, Gualdoni B, Kim S. Lipid-based slow-release formulation of amikacin sulfate reduces foreign body-associated infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(8):1752-5.
43. Zhao Y, Liu J, Sun X, Zhang ZR, Gong T. Sustained release of hydroxycamptothecin after subcutaneous administration using a novel phospholipid complex-DepoFoam technology. *Drug Dev Ind Pharm* 2010;36(7):823-31.
44. Xiao C, Qi X, Maitani Y, Nagai T. Sustained release of cisplatin from multivesicular liposomes: potentiation of antitumor efficacy against S180 murine carcinoma. *J Pharm Sci* 2004;93(7):1718-24.
45. Bonetti A, Chatelut E, Kim S. An extended-release formulation of methotrexate for subcutaneous administration. *Cancer Chemother Pharmacol* 1994;33(4):303-6.
46. Roy R, Kim S. Multivesicular liposomes containing bleomycin for subcutaneous administration. *Cancer Chemother Pharmacol* 1991;28(2):105-8.
47. Kim S, Kim DJ, Geyer MA, Howell SB. Multivesicular liposomes containing 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine for slow-release intrathecal therapy. *Cancer Res* 1987;47(15):3935-7.
48. Assil KK, Weinreb RN. Multivesicular liposomes. Sustained release of the antimetabolite cytarabine in the eye. *Arch Ophthalmol* 1987;105(3):400-3.
49. Skuta GL, Assil K, Parrish RK 2nd, Folberg R, Weinreb RN. Filtering surgery in owl monkeys treated with the antimetabolite 5-fluorouridine 5'-monophosphate entrapped in multivesicular liposomes. *Am J Ophthalmol* 1987;103(5):714-6.
50. Gariano RF, Assil KK, Wiley CA, Munguia D, Weinreb RN, Freeman WR. Retinal toxicity of the antimetabolite 5-fluorouridine 5'-monophosphate administered intravitreally using multivesicular liposomes. *Retina* 1994;14(1):75-80.

51. Abuzar SM, Park EJ, Seo Y, Lee J, Baik SH, Hwang SJ. Preparation and Evaluation of Intraperitoneal Long-Acting Oxaliplatin-Loaded Multi-Vesicular Liposomal Depot for Colorectal Cancer Treatment. *Pharmaceutics* 2020;12(8):736.
52. National cancer institute: Leuprolide acetate  
*Available at:* <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/leuprolide-acetate>. Accessed May 11, 2024.
53. Ye Q, Asherman J, Stevenson M, Brownson E, Katre NV. DepoFoam technology: a vehicle for controlled delivery of protein and peptide drugs. *J Control Release* 2000;64(1-3):155-66.
54. Tang H, Cao C, Zhang G, Sun Z. Impact of particle size of multivesicular liposomes on the embolic and therapeutic effects in rabbit VX2 liver tumor. *Drug Deliv* 2023;30(1):1-16.
55. Ali MF. Topical delivery and photodynamic evaluation of a multivesicular liposomal rose bengal. *Lasers Med Sci* 2011;26:267–75.
56. Li Y, Zhang R, Li X, Li W, Lu Y, Dai C. The preparation of dexamethasone sodium phosphate multivesicular liposomes thermosensitive hydrogel and its impact on noise-induced hearing loss in the Guinea pigs. *Exp Cell Res* 2020;387(1):111755.
57. Li H, Liu S, Dai W, Yao B, Zhou Y, Si S, Yu H, Zhao R, Jin F, Jiang L. Pressure-sensitive multivesicular liposomes as a smart drug-delivery system for high-altitude pulmonary edema. *J Control Release* 2024;365:301-316.
58. Agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED): Baza lijekova: Traneksamatna kiselina Alpha-Medical 100 mg/ml otopina za injekciju: Sažetak opisa svojstava lijeka.  
*Available at:* <https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Traneksamatna-kiselina-Alpha-Medical-100-mg-ml-otopina-za-injekciju/15986/>. Accessed May 4, 2024.
59. Clinical trials.gov: Study of local administration of DepoTXA for reduced postsurgical bleeding in subjects undergoing TKA. NCT02922582 (Clinical study) 2020.  
*Available at:* <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02922582>. Accessed March 27, 2024
60. U.S. Securities and Exchange Commission: Pacira Pharmaceuticals, Inc. Form 10-K annual report 2015.  
*Available at:*  
<https://www.sec.gov/Archives/edgar/data/1396814/000162828016011728/pcrx-12312015x10k.htm>. Accessed May 4, 2024.
61. U.S. Securities and Exchange Commission: Pacira Pharmaceuticals, Inc. Form 10-K annual report 2017.  
*Available at:*  
<https://www.sec.gov/Archives/edgar/data/1396814/000139681418000009/pcrx-12312017x10k.htm>. Accessed May 5, 2024.

62. Chamberlain MC, Khatibi S, Kim JC, Howell SB, Chatelut E, Kim S. Treatment of leptomeningeal metastasis with intraventricular administration of depot cytarabine (DTC 101). A phase I study. *Arch Neurol* 1993;50(3):261-4.
63. Kim S, Howell SB. Multivesicular liposomes containing cytarabine entrapped in the presence of hydrochloric acid for intracavitary chemotherapy. *Cancer Treat Rep* 1987;71(7-8):705-11.
64. Kim S, Howell SB. Multivesicular liposomes containing cytarabine for slow-release Sc administration. *Cancer Treat Rep* 1987;71(5):447-50.
65. Gökbuget N, Hartog CM, Bassan R, Derigs HG, Dombret H, Greil R, Hernández-Rivas JM, Huguet F, Intermesoli T, Jourdan E, Junghanss C, Leimer L, Moreno MJ, Reichle A, Ribera J, Schmid M, Serve H, Stelljes M, Stuhlmann R, Hoelzer D; German Multicenter Study Group for Adult ALL and the European Working Group for Adult ALL. Liposomal cytarabine is effective and tolerable in the treatment of central nervous system relapse of acute lymphoblastic leukemia and very aggressive lymphoma. *Haematologica* 2011;96(2):238-44.
66. European Medicines Agency (EMA): Medicines: DepoCyt.  
*Available at:* <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/depocyte>. Accessed March 14, 2024.
67. FDA News: Pacira Shuttters DepCyt Operations After Years of Manufacturing Problems 2017.  
*Available at:* <https://www.fdanews.com/articles/182667-pacira-shuttters-depcyt-operations-after-years-of-manufacturing-problems>. Accessed March 14, 2024.
68. Yu M, Yuan W, Xia Z, Liu Y, Wang Y, Xu X, Zheng J, Schwendeman A. Characterization of exparel bupivacaine multivesicular liposomes. *Int J Pharm* 2023;639:122952.
69. Union Register of not active medicinal products for human use: DepoCyt.  
*Available at:* <https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/h187.htm>. Accessed March 14, 2024.
70. Nagle PC, Gerancher J. DepoDur® (extended-release epidural morphine): a review of an old drug in a new vehicle. *Tech Reg Anesth Pain Manag* 2007;11:9–18.
71. Food and Drug Administration (FDA): DepoDur 2007.  
*Available at:*  
[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2007/021671s019lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2007/021671s019lbl.pdf). Accessed June 18, 2024.
72. European Medicines Agency (EMA): Medicines: Exparel liposomal.  
*Available at:* [https://www.ema.europa.eu/hr/documents/overview/exparel-liposomal-epar-medicine-overview\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/hr/documents/overview/exparel-liposomal-epar-medicine-overview_hr.pdf). Accessed May 4, 2024.

73. Asche CV, Dagenais S, Kang A, Ren J, Maurer BT. Impact of liposomal bupivacaine on opioid use, hospital length of stay, discharge status, and hospitalization costs in patients undergoing total hip arthroplasty. *J Med Econ* 2019;22(12):1253-1260.
74. Clinical Trials Arena: News: Pacira publishes data showing Exparel reduces opioid use 2024. Available at: <https://www.clinicaltrialsarena.com/news/pacira-publishes-data-showing-exparel-reduces-opioid-use/>. Accessed June 18, 2024.
75. Ji YD, Harris JA, Gibson LE, McKinley SK, Phitayakorn R. The Efficacy of Liposomal Bupivacaine for Opioid and Pain Reduction: A Systematic Review of Randomized Clinical Trials. *J Surg Res* 2021;264:510-533.
76. Kendall MC, Castro Alves LJ, De Oliveira G. Liposome Bupivacaine Compared to Plain Local Anesthetics to Reduce Postsurgical Pain: An Updated Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Pain Res Treat* 2018;2018:5710169.
77. Abildgaard JT, Chung AS, Tokish JM, Hatstrup SJ. Clinical Efficacy of Liposomal Bupivacaine: A Systematic Review of Prospective, Randomized Controlled Trials in Orthopaedic Surgery. *JBJs Rev* 2019;7(7):e8.
78. Hussain N, Brull R, Sheehy B, Essandoh MK, Stahl DL, Weaver TE, Abdallah FW. Perineural liposomal bupivacaine is not superior to nonliposomal bupivacaine for peripheral nerve block analgesia. *Anesthesiology* 2021;134(2):147-164.

## 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

5-FUMP - 5-fluorouridin monofosfat  
CFU – jedinica za stvaranje kolonija  
CT - kompjutorizirana tomografija  
DEPC - 1,2-dierukoilfosfatidilkolin  
DOPC – dioleoilfosfatidilkolin  
DPPC - dipalmitoilfosfatidilkolin  
DPPG – dipalmitoilfosfatidilglicerol  
DSPE – distearoilfosfatidiletanolamin  
DSPG - distearoilfosfatidilglicerol  
EPC - fofsatidilkolin iz žutanjka jajeta  
FOP - 3-fluoro-4-oktiloksikarbonilfenilboronska kiselina  
GUV – veoma veliki unilamelarni liposomi  
HSPC - hidrogenirani sojin fosfatidilkolin  
HUASMC - humane stanice arterijskog glatkog mišića  
HUVEC - humane vaskularne endotelne stanice  
IGF-1 - inzulinu sličan faktora rasta 1  
LD<sub>50</sub> - srednja smrtonosna doza  
LUV - veliki unilamelarni liposomi  
MR - magnetska rezonancija  
MLV - multilamelarni liposomi  
MUV – srednje veliki unilamelarni liposomi  
MVL ili MVV - multivezikularni liposomi  
NMR – nuklearna magnetska rezonancija  
OLV – oligolamelarni liposomi  
SAL – stupanj osiguranja sterilnosti  
SUV - mali unilamelarni liposomi  
 $t_{1/2}$  – vrijeme polueliminacije  
U - ulje  
V – voda

## 8. PRILOZI ZA DOZVOLE ZA KORIŠTENJE SLIKA

Slike 1. i 2.

---

### Pravo korištenja slika u završnom radu

2 messages

---

Maja Radiković <mradiukovic@gmail.com>  
To: hfd-fg-ap@zg.t-com.hr

Tue, Jun 11, 2024 at 6:28 PM

Poštovani,

nisam sigurna obraćam li se na pravu adresu, no zanima me je li ovim putem moguće dobiti pravo korištenja dvije slike iz preglednog rada koji je objavljen u Farmaceutskom glasniku? Slike bih preuzela (i modificirala) u svrhu pisanja završnog specijalističkog rada. Radi se sljedećem članku:  
Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: struktura svojstva i klasifikacija. Farmaceutski glasnik 2012;68:391-400.

Autorica članka, prof. Vanić, je ujedno mentorica mog specijalističkog rada.

Srdačan pozdrav,  
Maja Radiković

---

hfd-croatian-pharmaceutical-society <hfd-fg-ap@zg.t-com.hr>  
To: Maja Radiković <mradiukovic@gmail.com>

Wed, Jun 12, 2024 at 8:34 PM

Poštovana,

Slike smijete koristiti uz navod da su prenesene iz Farm. glasnika.

Lp, Maja Jakševac Mikša

Doc. dr. sc. Maja Jakševac Mikša, mag. pharm.

Glavna i odgovorna urednica

časopisa Farmaceutski glasnik

HRVATSKO FARMACEUTSKO DRUŠTVO

Masarykova 2

10000 Zagreb

Telefon | +385 1 48 72 849

Fax | +385 1 48 72 853

Web | <http://www.farmaceut.org>

Slika 3.

<https://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=d4a92fe6-9a4c-42a8-860b-69273963215d>

Slika 4.

<https://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=29752f00-2d30-4dee-a131-349d0ad72819>

Slika 5.

11. 06. 2024. 17:32

Rightslink® by Copyright Clearance Center



RightsLink

[Sign in/Register](#)



### Topology of Multivesicular Liposomes, a Model Biliquid Foam



Author: M. S. Spector, J. A. Zasadzinski, M. B. Sankaram

Publication: Langmuir

Publisher: American Chemical Society

Date: Jan 1, 1996

Copyright © 1996, American Chemical Society

#### PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

[BACK](#)

[CLOSE WINDOW](#)

© 2024 Copyright - All Rights Reserved | [Copyright Clearance Center, Inc.](#) | [Privacy statement](#) | [Data Security and Privacy](#)  
| [For California Residents](#) | [Terms and Conditions](#) Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customer-care@copyright.com](mailto:customer-care@copyright.com)

Slika 6.

11. 06. 2024. 17:48

Rightslink® by Copyright Clearance Center



RightsLink

[Sign in/Register](#)



### Distribution of Phospholipids and Triglycerides in Multivesicular Lipid Particles



Author: Rosa M. Solis, Melissa Langston, Michelle Le, et al

Publication: Drug Delivery

Publisher: Taylor & Francis

Date: Sep 29, 2008

Rights managed by Taylor & Francis

#### Thesis/Dissertation Reuse Request

Taylor & Francis is pleased to offer reuses of its content for a thesis or dissertation free of charge contingent on resubmission of permission request if work is published.

[BACK](#)

[CLOSE](#)

© 2024 Copyright - All Rights Reserved | [Copyright Clearance Center, Inc.](#) | [Privacy statement](#) | [Data Security and Privacy](#)  
| [For California Residents](#) | [Terms and Conditions](#) Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customer-care@copyright.com](mailto:customer-care@copyright.com)



Slike 7., 8., 10., 11.

<https://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=59dc23c9-e08b-449c-9d0b-5cfe43798f45>

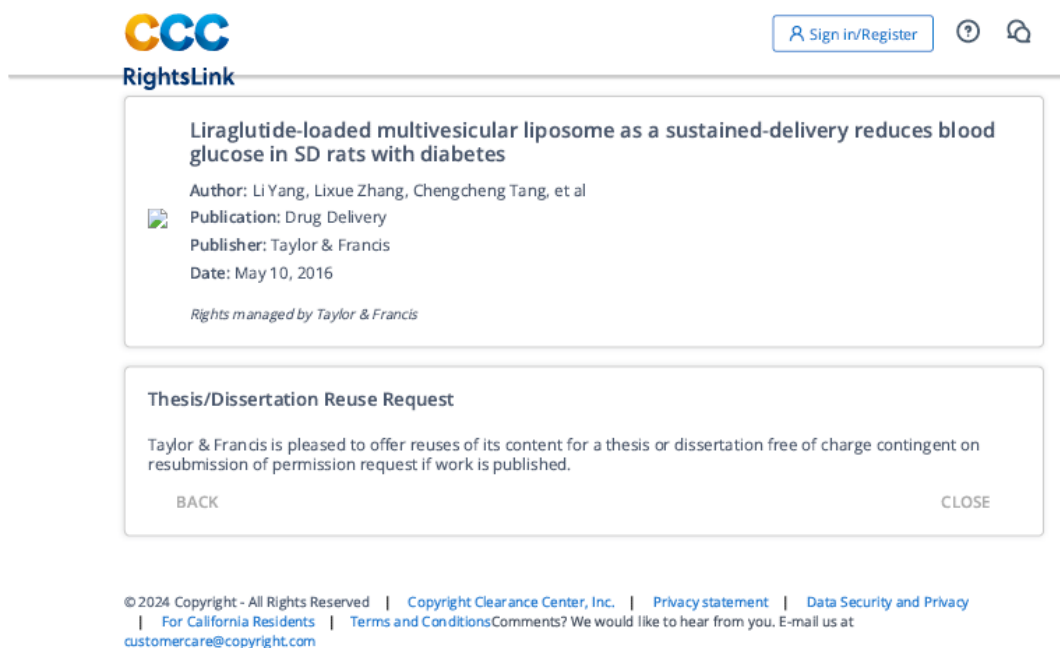
Slika 9.

<https://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=823e799c-e594-490b-97ab-0ae4c8aeecbc>

Slika 13.

19. 06. 2024. 10:36

Rightslink® by Copyright Clearance Center



The screenshot shows the RightsLink interface. At the top left is the CCC RightsLink logo. At the top right is a 'Sign in/Register' button and a help icon. The main content area displays the following information:

**Liraglutide-loaded multivesicular liposome as a sustained-delivery reduces blood glucose in SD rats with diabetes**  
Author: Li Yang, Lixue Zhang, Chengcheng Tang, et al  
Publication: Drug Delivery  
Publisher: Taylor & Francis  
Date: May 10, 2016  
*Rights managed by Taylor & Francis*

Below this is a 'Thesis/Dissertation Reuse Request' section with the text: 'Taylor & Francis is pleased to offer reuses of its content for a thesis or dissertation free of charge contingent on resubmission of permission request if work is published.' It includes 'BACK' and 'CLOSE' buttons.

At the bottom, there is a footer with copyright information: '© 2024 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Data Security and Privacy | For California Residents | Terms and Conditions Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com'

Slika 14.

As a library, NLM provides access to scientific literature. Inclusion in an NLM database does not imply endorsement of, or agreement with, the contents by NLM or the National Institutes of Health.  
Learn more: [PMC Disclaimer](#) | [PMC Copyright Notice](#)



[Molecules](#). 2019 May; 24(9): 1746.

Published online 2019 May 5. doi: [10.3390/molecules24091746](https://doi.org/10.3390/molecules24091746)

PMCID: PMC6539825

PMID: [31060345](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31060345/)

## Multivesicular Liposomes for the Sustained Release of Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides from Peanuts: Design, Characterization, and In Vitro Evaluation

Ning Li,<sup>1,2</sup> Amin Shi,<sup>2</sup> Qiang Wang,<sup>2,\*</sup> and Guoquan Zhang<sup>1,\*</sup>

► Author information ► Article notes ► Copyright and License information ► [PMC Disclaimer](#)

Copyright © 2019 by the authors.

Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Slika 15.

26. 06. 2024. 21:29 [Impact of particle size of multivesicular liposomes on the embolic and therapeutic effects in rabbit VX2 liver tumor: Drug Del...](#)

**Drug Delivery** >  
Volume 30, 2023 - Issue 1

Open access

2,149 0 Views | CrossRef citations to date | 0 Altmetric

Research Article

# Impact of particle size of multivesicular liposomes on the embolic and therapeutic effects in rabbit VX2 liver tumor

Hailing Tang , Changhui Cao, Guangyuan Zhang & Zhengkao Sun

Pages 1-16 | Received 07 Aug 2022, Accepted 06 Dec 2022, Published online: 16 Jan 2023

Cite this article <https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2157519> Check for updates

Full Article Figures & data References Citations Metrics

Licensing Reprints & Permissions View PDF View EPUB

## Reprints and Permissions

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons CC BY license, which permits unrestricted use, distribution, reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article in part or whole.

## Related research

People also read

Recommended articles

Cited by