

**Mihaela Dasović**

**Liposomi kao nosači lijekova: parenteralna  
primjena**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

*Diplomski rad prijavljen je na kolegiju Oblikovanje lijekova 1 i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim mentorstvom doc. dr. sc. Željke Vanić.*

*Želim se zahvaliti svima koji su sudjelovali u izradi ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Željki Vanić na stručnom vodstvu tijekom izrade diplomskog rada, na strpljenju, pomoći i vremenu koje mi je ukazala.*

*Također veliko hvala mojim roditeljima i bratu na bezuvjetnoj podršci i ljubavi, te obitelji i prijateljima koji su bili uz mene tijekom cijelog razdoblja studiranja.*

*A najveće hvala Sveboru na ljubavi, razumijevanju, potpori i vjeri u mene!*

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. GRAĐA LIPOSOMA I NJIHOVA SVOJSTVA .....	2
1.2. PODJELA LIPOSOMA.....	5
1.3. LIPOSOMI KAO NOSAČI LIJEKOVA.....	9
1.4. METODE PRIPRAVE I STABILNOST LIPOSOMSKIH PRIPRAVAKA .....	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	13
3. MATERIJALI I METODE .....	14
4. RASPRAVA.....	15
4.1. PRIMJENA LIPOSOMA U LIJEČENJU TUMORA .....	15
4.2. LIPOSOMI U VAKCINACIJI .....	22
4.3. LIPOSOMSKE FORMULACIJE U OFTALMOLOGIJI-VISUDYNE® .....	24
4.4. LIPOSOMSKI PRIPRAVCI U LIJEČENJU BOLI .....	24
4.5. LIJEČENJE SISTEMSkih GLJIVIČNIH INFEKCIJA.....	25
5. ZAKLJUČAK .....	26
6. LITERATURA.....	27
7. SAŽETAK.....	31
8. SUMMARY .....	32

## 1. UVOD

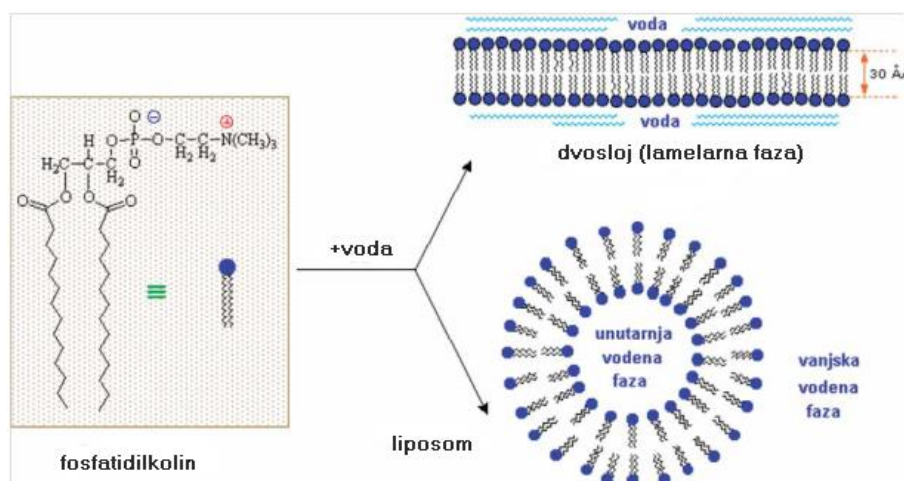
Posljednjih 40-ak godina velika se pažnja posvećuje razvoju novih terapijskih sustava koji će poboljšati farmakokinetička svojstva lijeka. Uklapanjem ili vezanjem ljekovite tvari u/za odgovarajući nosač može se promijeniti njezin terapijski indeks ili trajanje učinka lijeka. Time bi se značajno smanjila nusdjelovanja, toksičnost i učestalost doziranja, čime bi pripravak bio prikladniji za bolesnika. Uz već poznate sustave nosača kojima se može ostvariti kontrolirano, produljeno i /ili odgođeno oslobađanje ljekovite supstance (mikrosfere, mikrokapsule, nanosfere, micele, virosomi, kubosomi, polimerni prolijekovi, ciklodekstrinski kompleksi i dr.), istaknuto mjesto zauzimaju liposomi (Vanić, 2012a). To su sferične fosfolipidne tvorevine u kojima je unutarnja, vodena faza obavijena s jednom ili više koncentrično položenih fosfolipidnih membrana. Promjer im se može kretati od 20-ak nm do 10-ak  $\mu\text{m}$ . Otkrio ih je britanski biofizičar Alec Douglas Bangham 1965. godine. On je opisao pojavu da tekući kristali lecitina u kontaktu s vodom formiraju tvorevine veoma slične biološkim membranama. Na početku su korišteni kao modelne stanične membrane, no ubrzo se počinju istraživati kao nosači lijekova (70-ih godina prošlog stoljeća). Liposomi mogu biti nosači hidrofobnih lijekova, koji se uklapaju u unutarnju vodenu fazu, hidrofobnih lijekova koji se ugrađuju u lipidni dvosloj te amfipatskih koji će biti smješteni između lipidne i vodene regije. Dakle, strukturna svojstva liposoma omogućuju uklapanje lijekova različitih fizičko-kemijskih svojstava kao i makromolekula poput proteina (Slika 1). Zbog svoje sličnosti s biološkim membranama, netoksičnosti, neimunogenosti i biorazgradljivosti liposomi su u potpunosti fiziološki prihvatljivi što im osigurava primjenu u različitim terapijskim područjima: infektivna oboljenja (virusna, bakterijska, gljivična, parazitska), dijagnostika, hormonska terapija, onkologija, stimulacija imunološkog odgovora, vakcinacija (Torchilin, 2005). Primjenjuju se različitim putovima primjene, a kako se mogu pripremiti u sterilnom i apirogenom stanju, prikladni su za parenteralnu aplikaciju (Jalšenjak i sur., 1998). Najveći broj registriranih liposomskih pripravaka s antitumorskim, antimikrobnim i protuupalnim lijekovima je u području parenteralne primjene (Vanić, 2012a).

Parenteralna primjena podrazumijeva puteve primjene lijeka koji pri svojem prvom ulasku u opću cirkulaciju zaobilazi probavni trakt, na način da se lijek unosi u tkiva direktno pomoću prikladnih ljekovitih oblika (injekcijske i infuzijske otopine, suspenzije i emulzije) ubrizgavanjem u venu (intravenski), u mišić (intramuskularno), pod kožu (subkutano), u kožu (intradermalno), u arteriju (intraarterijski), u srce (intrakardijalno), u kralješnični kanal (intralumbalno) i u zglob (intraartikularno). Riječ „parenteralno(a)“ potječe od grčkih riječi

„para“ = „mimo“ i „enteron“ = „crijeva“. Ovim putem primjene se obično primjenjuju lijekovi koji bi se prolazom kroz probavni trakt razgradili. Parenteralno primijenjen lijek većinom djeluje brže i sigurnije nego nakon peroralne aplikacije (Bradamante i sur., 1993).

## 1.1. GRAĐA LIPOSOMA I NJIHOVA SVOJSTVA

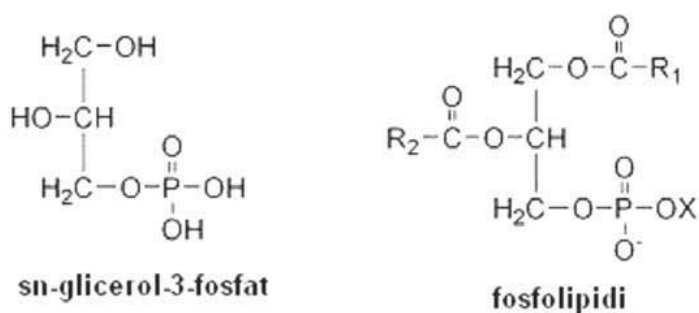
Osnovne gradivne jedinice liposoma su fosfolipidi. Riječ je o amfipatskim molekulama, diesterima fosfatne kiseline, koji su s jedne strane esterificirani derivatom sfingozina ili glicerola, a s druge strane kolinom, etanolaminom, serinom, inozitolom ili glicerolom. U ovojnici liposoma fosfolipidi su složeni u obliku dvosloja, pri čemu su polarne, hidrofilne "glave" orijentirane prema vanjskoj i unutarnjoj vodenoj fazi zaklanjajući pritom nepolarne, hidrofobne "repove" (lanci masnih kiselina) jedan prema drugome (Slika 1).

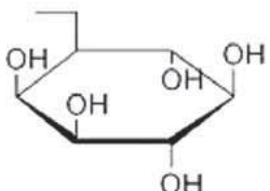


Slika 1. Shematski prikaz formiranja liposoma (Vanić, 2012a)

Zajednička je karakteristika fosfolipida da u prisutnosti vode formiraju dvosloj koji predstavlja stanje najniže energije. Kolin, etanolamin i serin sadrže bazični dušik koji u fiziološkom pH području nosi pozitivan naboj. Kako je fosfatna skupina negativno nabijena, ti su fosfolipidi dipolarni spojevi. Najčešće se za pripremu liposoma upotrebljava lecitin, koji je smjesa fosfolipida s najvećim udjelom fosfatidilkolina u kojima su lanci masnih kiselina različite duljine i stupnja zasićenosti. Na Slici 2 na kojoj je prikazana i struktura

fosfatidilkolina, vidljivo je da su preko glicerola s jedne strane vezani lanci masnih kiselina (hidrofobni "repovi"), a s druge strane hidrofilne, polarne "glave" fosfokolina. Prirodni se lecitin najčešće dobiva ekstrakcijom i pročišćavanjem iz jaja i soje. Karakteristično je da lecitin iz soje sadrži veći udio nezasićenih masnih kiselina od onog koji je dobiven iz žutanjaka jaja. Znatno su kvalitetniji, zbog točno definiranog sastava, sintetski proizvedeni derivati fosfatidilkolina (dipalmitoilfosfatidilkolin, distearoilfosfatidilkolin, dimiristoilfosfatidilkolin i dr.). Umjesto kolina, na fosfatnu grupu u molekuli fosfolipida mogu biti vezane molekule etanolamina, serina, inozitola ili glicerola (Slika 2). Te skupine su odgovorne za kemijska svojstva fosfolipida i prema njima slijede i nazivi: fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, fosfatidilinozitol, fosfatidilglicerol, te fosfatidna kiselina (Vanić 2012a).



X-OH	X	fosfolipid
voda	—H	fosfatidna kiselina
etanolamin	—CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	fosfatidiletanolamin
kolin	—CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> <sup>+</sup>	fosfatidilkolin
inozitol		fosfatidilinozitol
glicerol	—CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> OH	fosfatidilglicerol

Slika 2. Strukturni prikaz različitih fosfolipida (Vanić, 2012a)

Lecitin je netopljiv u vodi i pri tome poprima planarnu dvoslojnu strukturu da bi se minimalizirale neželjene interakcije između vodene faze i hidrofobnih lanaca. Nasuprot tome, druge amfipatske molekule kao što su detergensi i lizofosfolipidi formiraju micide. To je zato što dvostruki lanci masnih kiselina u fosfatidilkolinu daju molekuli cilindričan oblik prikladan za formiranje dvosloja, za razliku od detergensa čija molekula ima oblik obrnutog konusa pogodnog za oblikovanje heksagonalne faze, micela. Fosfatidiletanolamin u vodenom mediju poprima obrnuto heksagonalnu strukturu (obrnute micide). Takva pojava fosfolipida da u vodenom okruženju poprimaju različite strukture i faze naziva se lipidni polimorfizam i od velike je važnosti u biološkim procesima, ali i u dizajniranju terapijskih sustava kontroliranih otpuštanja uklopljenog lijeka (Kirby i Gregoriadis, 1999).

Tablica 1. Fizičko-kemijska svojstva fosfolipida korištenih za pripravu liposoma (Vanić, 2012a)

FOSFOLIPID	KRATICA	NABOJ	T <sub>c</sub> (°C)
Fosfatidilkolin (lecitin)	PC	0	-15 do -7
Dilauriol-fosfatidilkolin (C12:0)	DLPC	0	-1,8
Dimiristoil-fosfatidilkolin (C14:0)	DMPC	0	23
Dipalmitoil-fosfatidilkolin (C16:0)	DPPC	0	41
Diroleil-fosfatidilkolin (C18:1)	DOPC	0	-22
Dilauroil-fosfatidilglicerol	DLPG	-1	4
Dimiristoil-fosfatidilglicerol	DMPG	-1	23
Dipalmitoil-fosfatidilglicerol	DPPG	-1	41
Distearoil-fosfatidilglicerol	DSPG	-1	55
Diroleil-fosfatidilglicerol	DOPG	-1	-18
Dimiristoil-fosfatidna kiselina	DMPA	-1b	51
Dimiristoil-fosfatidna kiselina	DMPA	-2c	45
Dipalmitoil-fosfatidna kiselina	DPPA	-1d	67
Dipalmitoil-fosfatidna kiselina	DPPA	-2e	58
Dimiristoil-fosfatidiletanolamin	DMPE	-	50
Dipalmitoil-fosfatidiletanolamin	DPPE	-	60
Dimiristoil-fosfatidilserin	DPPS	-	38
Dipalmitoil-fosfatidilserin	DPPS	-	51
Fosfatidilserin	PS	-	6-8

Lanci masnih kiselina u molekuli fosfolipida mogu biti u čvrstom-gel stanju ili tekućem-kristaliničnom stanju. Temperatura na kojoj se odvija prijelaz iz gel faze u fazu tekućih kristala naziva se temperatura faznog prijelaza (T<sub>c</sub>) i ovisna je o duljini i stupnju zasićenosti

lanaca masnih kiselina u molekulama fosfolipida. Zbog heterogenog i kompleksnog sastava, fosfolipidi staničnih membrana imaju široku fazu prijelaza ( $T_c$  je ispod fiziološke temperature), dok je u sintetskih ta faza veoma uska zbog točno definiranog sastava (Tablica 1). Najčešće upotrebljavana metoda za određivanje temperature faznog prijelaza lipida je mikrokolorimetrija. Pokazalo se da povećanjem duljine lanaca masnih kiselina i stupnja njihove zasićenosti  $T_c$  poprima veće vrijednosti. Na prijelaz membrane liposoma iz gel u tekuće-kristalinično stanje može utjecati kolesterol. On se ugrađuje u fosfolipidni dvosloj između molekula fosfolipida te povećava njegovu čvrstoću (rigidnost) uslijed smanjene slobode kretanja molekula fosfolipida. U manjim količinama nema utjecaja na  $T_c$  fosfolipidne membrane, ali ako je prisutan u velikom udjelu može ju prekriti. Poznavanje temperature faznog prijelaza te fluidnosti membrane značajno je u proizvodnji liposoma jer se time određuju svojstva liposoma kao što su permeabilnost, fuzija, agregacija, vezanje na proteine plazme, a sve to utječe na njihovu stabilnost i ponašanje u biološkim fluidima. Što je  $T_c$  niža, fluidnost membrane je veća, ona je permeabilnija za uklopljeni sadržaj, čime je stabilnost liposoma smanjena.

Odabirom fosfolipida koji grade ovojnici liposoma moguće je utjecati na svojstva liposoma. Građa liposoma omogućuje da se u njih mogu uklapati različiti lijekovi: lipofilni u ovojnici, hidrofilni u unutarnju vodenu jezgru te amfipatski između vodene i lipidne regije. Uspješnost uklapanja lijekova u liposome varira ovisno o fizičko-kemijskim svojstvima lijeka. Lipofilni lijekovi se uklapaju u visokom postotku (do 100%), a hidrofilni u niskom.

## 1.2. PODJELA LIPOSOMA

Liposomi se mogu klasificirati prema veličini i broju fosfolipidnih dvoslojeva te prema strukturnim svojstvima i načinu oslobađanja uklopljenog sadržaja. Morfologiju većinom određuje postupak pripreme, a manjim dijelom fosfolipidni sastav.

Prema broju i veličini fosfolipidnih dvoslojeva razlikuju se:

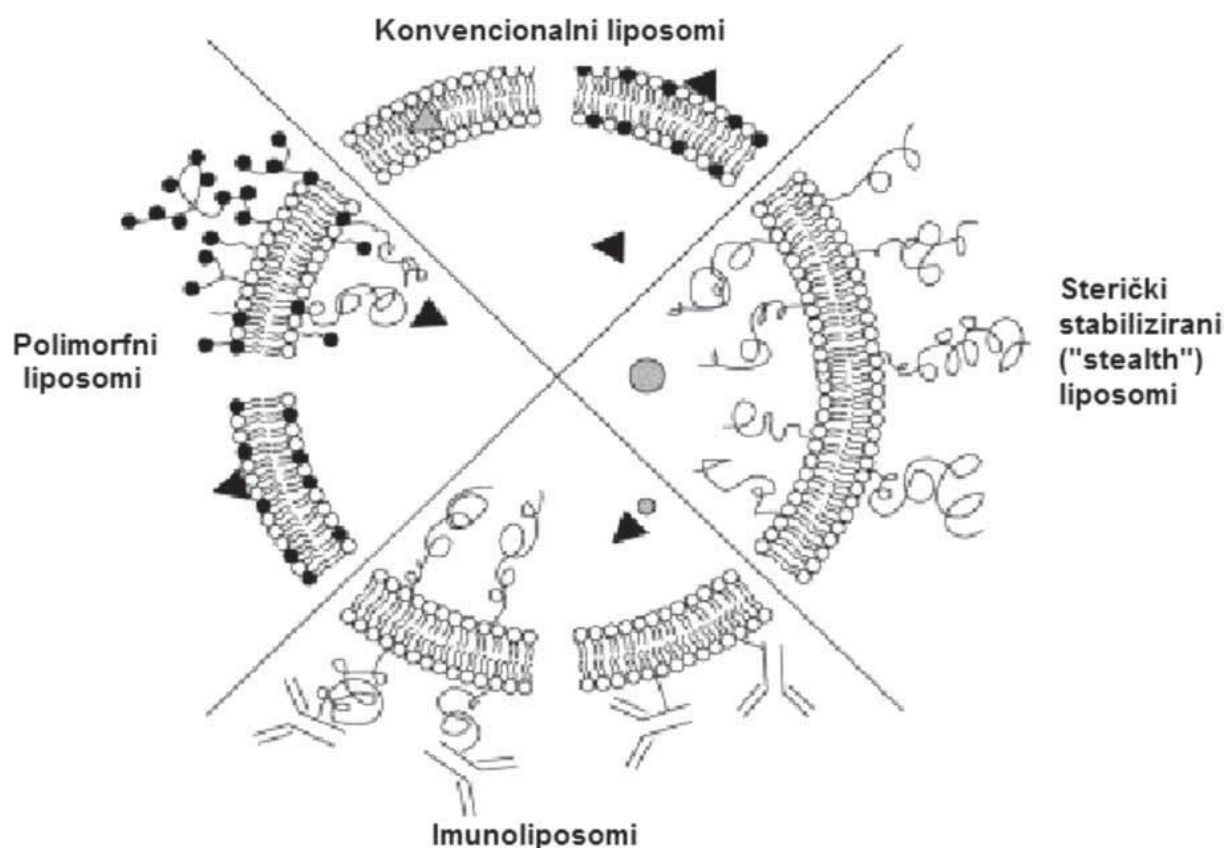
a) Unilamelarni liposomi (*unilamellar vesicles*, UV) - sadrže jednu fosfolipidnu ovojnici, a s obzirom na veličinu mogu se podijeliti na:

1. Male unilamelarne liposome (*small unilamellar vesicles*, SUV) promjera 20-100 nm
2. Srednje-velike unilamelarne liposome (*medium sized unilamellar vesicles*, MUV) promjera većeg od 100 nm



3. Velike unilamelarne liposome (*large unilamellar vesicles*, LUV)- promjera 100-1000 nm
  4. Veoma velike unilamelarne liposome (*giant unilamellar vesicles*, GUV)- promjer veći od 1000 nm
- b) Oligolamelarni liposomi (*oligolamellar vesicles*, OLV)-sadrže nekoliko koncentrično položenih fosfolipidnih dvoslojeva između kojih su vodeni prostori,
  - c) Multilamelarni liposomi (*multilamellar vesicles*, MLV)-sadrže velik broj koncentrično postavljenih fosfolipidnih dvosloja, te
  - d) Multivezikularni liposomi (*multivesicular liposome*, MVL)-čini ih mnogo manjih vezikula nasumično uklopljenih unutar velikog liposoma, pri čemu dvoslojevi mogu formirati trodimenzionalnu mrežu komora rezultirajući velikim sferičnim strukturama nalik na pjenu (Vanić 2012a).

Prema strukturnim svojstvima i načinu oslobađanja uklopljenog sadržaja razlikujemo konvencionalne, dugo-cirkulirajuće (sterički stabilizirane), imunoliposome i polimorfne liposome (Slika 3).



Slika 3. Klasifikacija liposoma prema strukturnim svojstvima i načinu oslobađanja uklopljenog sadržaja (Vanić, 2012a)

Konvencionalni liposomi mogu se definirati kao liposomi koji se tipično sastoje samo od fosfolipida (neutralno i/ili negativno nabijenih) bez ili s prisutnim kolesterolom koji stabilizira lipidni dvosloj. U većini ranijih radova o liposomima kao sustavima nosača lijekova za parenteralnu primjenu je korišten ovaj tip liposoma. I danas se ti liposomi istražuju za topikalnu primjenu. Konvencionalni liposomi mogu varirati u svojim fizikalnim svojstvima poput veličine, sastava lipida, površinskog naboja i broja te fluidnosti (elastičnosti) membrane. Obilježava ih nespecifična reaktivnost prema okruženju u kojem se nalaze. Nakon intravenske primjene kratko se zadržavaju u cirkulaciji. Budući da se akumuliraju u stanicama retikuloendotelnog sustava i makrofagima prikladni su u liječenju infektivnih oboljenja, vakcinaciji i dijagnostici oboljenja organa u kojima se nakupljaju (jetra, slezena) (Vanić, 2012a). Primjenjuju se i kao nosači lijekova u terapijskim sustavima za lokalnu primjenu. Koristili su se i za dostavu antigena. Liposomska cjepiva su se pokazala učinkovitima u eksperimentalnim modelima protiv viralnih, bakterijskih i parazitskih infekcija, kao i protiv tumora. Nekoliko cjepiva je testirano na ljudima i jedno od njih, liposomno cjepivo za hepatitis A, je dobilo odobrenje za stavljanje na tržište u Švicarskoj (Storm i Crommelin, 1998). Ukoliko su membrane (dvoslojevi) konvencionalnih liposoma naglašene rigidnosti (čvrstoće), što se postiže korištenjem hidrogeniranih lecitina, sintetskih lipida visoke Tc (npr. DSPC) i kolesterola, te ako su odgovarajuće veličine (SUV) omogućeno je dugo cirkuliranje čestica u krvotoku. Ovaj princip iskorišten je kod DaunoXome<sup>®</sup>, liposoma s daunorubicinom za pasivnu ciljanu terapiju tumora (Torchilin, 2005).

Razvoj dugo-cirkulirajućih (tzv. *stealth*, sterički-stabiliziranih liposoma) liposoma predstavljao je prekretnicu u istraživanju fosfolipidnih vezikula za intravensku primjenu. U odnosu na konvencionalne, dugo-cirkulirajući liposomi se dugo zadržavaju u cirkulaciji čime je omogućena isporuka uklopljenog lijeka na željeno mjesto djelovanja. Vjerojatno najbitnija ključna značajka ovih liposoma je što se nakupljaju na mjestima u tijelu gdje je povećana propusnost vaskularnog zida, pa se mogu koristiti u pasivnoj ciljanoj terapiji. Regije povećane kapilarne propusnosti uključuju patološka područja poput čvrstih tumora i mjesta infekcije i upale. Najpopularniji način proizvodnje dugo-cirkulirajućih liposoma je vezanje/ugradnja hidrofilnog polimera polietilenglikola (PEG) za površinu liposoma. Kovalentno vezani polietilenglikol (PEG) u velikoj se koncentraciji nalazi na površini liposoma i na taj način tvori steričku prepreku koja sprečava interakciju s molekularnim i staničnim komponentama u biološkom okruženju (lipoproteini i opsonini u krvi) čime je spriječeno njihovo prepoznavanje od strane stanica retikuloendotelnog sustava. Takvi PEG-ilirani liposomi se nazivaju i "sterički stabiliziranim". Vrijeme polueliminacije tih liposoma je značajno povećano i može

iznositi čak do 48 sati, za razliku od konvencionalnih (svega nekoliko sati). Zbog duljeg zadržavanja u plazmi, ovi liposomi mogu doći na mjesta do kojih konvencionalni ne mogu. Ako se promatra njihova reaktivnost uzrokovana promjenama u okruženju u kojem se nalaze, može se konstatirati da su *stealth* liposomi relativno inertni, nereaktivni. Danas na tržištu postoje registrirani pripravci sterički stabiliziranih liposoma s antitumorskim djelovanjem (Doxil<sup>®</sup>, Caelix<sup>®</sup>) (Storm i Crommelin, 1998; Torchilin, 2005; Vanić, 2012a).

Imunoliposomi su konvencionalni ili dugo-cirkulirajući liposomi koji na svojoj površini imaju vezana specifična antitijela ili fragmente antitijela kako bi poboljšali vezanje na ciljno mjesto (aktivna ciljana terapija). Iako su imunoliposomni sustavi bili istraživani za razne terapijske primjene, primarni fokus je bio ciljana dostava antitumorskih lijekova (Storm i Crommelin, 1998).

Skupina polimorfni liposoma obuhvaća, u usporedbi s već navedenima, novije generacije liposoma i u odnosu na njih su vrlo reaktivni prema okruženju. Tu spadaju:

- a) pH-osjetljivi liposomi koji uslijed pada pH vrijednosti okruženja u kojem se nalaze, točnije u endosomu stanice podliježu agregaciji, fuziji i destabilizaciji, te oslobađaju uklopljeni sadržaj u citoplazmu pri čemu je izbjegnuta njegova razgradnja u lizosomu (Vanić i sur., 2012);
- b) temperaturno-osjetljivi liposomi koji uslijed promjene tj. porasta temperature u okruženju oslobađaju uklopljeni sadržaj te
- c) kationski liposomi-sastoje se od kationskog lipida koji u interakciji s nukleinskim kiselinama stvara lipid-DNA komplekse (lipoplekse). Takvi kationski liposomi, lipopleksi fuzijom s plazmatskom membranom ulaze u stanicu (površina stanice je negativnog naboja).

Kod skupine polimorfni liposoma iskorišteno je svojstvo lipidnog polimorfizma, tj. da se različitim podražajima iz okruženja u kojem se liposomi nalaze (npr. pad pH unutar endosoma ili porast tjelesne temperature) uzrokuju promjene molekularnog oblika fosfolipida ili neke druge membranske komponente koja dovodi do promjene integriteta, tj. destabilizacije ovojnice i oslobađanja uklopljenog lijeka na željenom mjestu djelovanja (ciljani učinak) (Kirby i Gregoriadis, 1999; Torchilin, 2005; Vanić, 2012a).

### 1.3. LIPOSOMI KAO NOSAČI LIJEKOVA

Liposomi po svojoj strukturi i sastavu nalikuju biološkim membranama. Izgrađeni su od prirodnih biorazgradivih, netoksičnih i neimunogenih fosfolipidnih molekula, te zbog postojanja hidrofilne i lipofilne regije omogućuju uklapanje lipofilnih, hidrofilnih i amfipatskih lijekova različite veličine molekula.

Primjena liposoma kao nosača lijekova i oslobađanje uklopljenog lijeka zasniva se na fizikalno kemijskim karakteristikama kao što su fosfolipidni sastav, veličina liposoma, uspješnost uklapanja, stabilnost kao i njihove biološke interakcije sa stanicama. Postoji nekoliko vrsta interakcija između liposoma i stanica, a to su:

- ❖ lipidna izmjena koja uključuje izmjenu lipida liposoma s lipidima staničnih membrana, što dovodi do gubitka vodenog sadržaja liposoma
- ❖ adsorpcija na površini stanica, javlja se kada su privlačne sile (elektrostatske, elektrodinamičke, van der Waalsove sile) jače od odbojnih. Adsorpcija na stanice popraćena je endocitozom ili fuzijom.

Endocitozom se cijeli liposom može unijeti u citoplazmu, gdje se njegov sadržaj (ukoliko je riječ o nestabilnim supstancijama, npr. nukleinske kiseline) može razgraditi pod utjecajem niskog (kiselog) pH i enzima endosoma i lizosoma. Fuzijom se liposomski sadržaj oslobodi direktno u stanicu (citoplazmu), a fosfolipidi liposoma se stapaju s membranama stanice. Fuzija je karakteristična za kationske liposome (Lasic, 1998).

Liposomi koji se koriste kao nosači lijekova mogu biti formirani kao suspenzije, aerosoli, gelovi, kreme ili suhi prašci. *In vivo* se mogu primjenjivati topikalno na kožu i sluznice ili parenteralno gdje se najčešće radi o intravenskoj aplikaciji.

Ponašanje (sudbina) liposoma *in vivo* strogo je određeno veličinom, sastavom liposoma i koncentracijom lipida. Tako npr. liposomi u kojima nije prisutan kolesterol otpuštaju znatnu količinu lijeka kada se primjenjuju intravenski što se pripisuje interakcijama s proteinima plazme i lipidnom izmjenom s lipoproteinima. Mnogi liposomi primijenjeni intravenski uglavnom su prepoznati kao strane čestice te se uklanjaju iz cirkulacije putem retikuloendotelnog sustava (RES). Glavni organi RES-a su jetra, koštana srž, slezena što rezultira zadržavanjem lijeka u tim stanicama (Lasic, 1998). Slično biološkim membranama, liposomi imaju nisku propusnost hidrofilnih lijekova i visoku propusnost hidrofobnih lijekova. Doista, do danas, zadržavanje visoko hidrofobnih lijekova poput paklitaksela u

liposomima je problematično. Velik napredak na tom području bio je razvoj aktivnih metoda uklapanja lijeka. Taj princip iskorišten je kod Doxil<sup>®</sup>-a, liposomske formulacije doksorubicina. Prvo su pripremljeni prazni liposomi te je korištenjem transmembranskog gradijenta omogućena difuzija doksorubicina u neioniziranom obliku u liposome unutar kojih je zbog promjene pH došlo do ionizacije lijeka (ionizirani lijek ne može permeirati kroz membranu liposoma). Na taj način je osigurana stabilnost formulacije tijekom uskladištenja pripravka. Nasuprot tome ciprofloksacin, koji se ne taloži unutar liposoma (nije u ioniziranom obliku) se puno teže zadržava te je moguće otpuštanje uklopljenog lijeka tijekom uskladištenja pripravka (Allen i Cullis, 2013).

Parametri koji utječu na zadržavanje liposoma u cirkulaciji uključuju veličinu (srednji promjer) liposoma, koncentraciju lipida, naboj na površini i fluidnost/rigidnost membrane. Dobro je poznato da se pri istim koncentracijama lipida liposoma, čestice većeg srednjeg promjera brže uklanjaju iz cirkulacije od onih manjeg promjera (< 100 nm). Čvrstoća lipidnog dvojsloja uvelike utječe na stabilnost liposoma i zadržavanje čestica u cirkulaciji. Tako su se za parenteralnu primjenu pokazali prikladni i konvencionalni liposomi malog srednjeg promjera pripremljeni iz lipida visoke T<sub>c</sub> (npr. DPPC, DSPC) čija je membrana dodatno stabilizirana dodatkom kolesterola. Primjer takve formulacije je DaunoXome<sup>®</sup> (liposomski pripravak daunorubicina za antitumorsku terapiju).

Koncentracija lipida također utječu na vrijeme cirkuliranja liposoma po organizmu. Veća koncentracija znači i duže vrijeme zadržavanja u krvi. Primjerice, kod liposoma pripremljenih iz fosfatidilkolina (iz jaja) vrijednost t<sub>1/2</sub> za čestice manje od 100 nm raste od 20 minuta do 3 sata s povećanjem lipidne doze od 0,4 do 40 mg/kg. Može se pretpostaviti da su ti efekti povezani sa zasićenjem RES-a kod većih doza. Također je dokazano da se čestice koje sadrže negativan naboj lipida uklanjaju brže od neutralnih ili pozitivno nabijenih sustava (Lasic, 1998).

#### **1.4. METODE PRIPRAVE I STABILNOST LIPOSOMSKIH PRIPRAVAKA**

Tijekom četrdesetak godina poznavanja liposoma kao nosača lijekova razvijeni su brojni postupci za njihovu pripravu. Ključni moment nije proces formiranja ovojnice, koja nastaje spontano kao posljedica interakcija između fosfolipida i vode, već dobivanje liposoma točno određene veličine, građe i oblika, s visokim sadržajem uklopljene aktivne tvari. Odabirom odgovarajuće metode moguće je pripremiti liposome određene veličine, lamelarnosti i sadržaja

uklopljenog lijeka. Gotovo sve metode pripreme liposoma uključuju nekoliko osnovnih koraka: sušenje lipidnog sloja uklanjanjem organskog otapala, disperziju fosfolipida u vodi, odjeljivanje neuklopljenog sadržaja i analizu konačnog produkta. Optimalna metoda pripreme bila bi ona koja rezultira liposomima visoke uspješnosti uklapanja lijeka, te izbjegava uporabu štetnih organskih otapala, a da je pritom cijeli postupak jednostavan i reproducibilan. Za sve postupke pripreme liposoma vrijedi pravilo da se lipofilni lijekovi dodaju zajedno s fosfolipidima otopljenima u organskom otapalu, dok se hidrofilni lijekovi dodaju otopljeni u vodenoj fazi (Vanić, 2012b).

S obzirom na način dispergiranja fosfolipida, metode pripreme liposoma se mogu podijeliti u tri velike skupine:

### 1. POSTUPCI FIZIČKOG DISPERGIRANJA FOSFOLIPIDA

- ❖ Metoda hidratacije suhog fosfolipidnog sloja, tzv. film metoda
- ❖ Metoda dehidracije-rehidracije (*dehydration-rehydration vesicles*, DRV)
- ❖ Metoda smrzavanja-taljenja (*freeze-thaw*, FT)
- ❖ Soniciranje
- ❖ Visokotlačna homogenizacija

### 2. POSTUPCI DVOFAZNOG DISPERGIRANJA FOSFOLIPIDA

- ❖ Metoda etanolnog injiciranja
- ❖ Metoda eternog injiciranja
- ❖ Metoda pripreme liposoma uparavanjem V/U emulzija (*reverse phase evaporation*, REV)
- ❖ Metoda pripreme višestrukih emulzija (*multiple emulsion vesicles*)

### 3. PRIPRAVA LIPOSOMA SOLUBILIZACIJOM POMOĆU DETERGENSA

Također je moguća podjela metoda pripreme liposoma s obzirom na morfološka svojstva liposoma, te se u tom smislu razlikuju metode pripreme oligo i multi lamelarnih liposoma (OLV, MLV), malih i velikih unilamelarnih liposoma (SUV, LUV) te multivezikularnih liposoma (MVL) (Kirby i Gregoriadis, 1998; New, 1989; Vanić, 2012b).

Liposomi raspršeni u vodenoj otopini općenito su suočeni s fizičkim i kemijskim nestabilnostima nakon dugoročnog skladištenja. Hidroliza i oksidacija fosfolipida i liposoma

je čest uzrok nestabilnosti. Oksidacijskim promjenama većinom podliježu fosfolipidi koji u svojoj strukturi sadrže nezasićene masne kiseline. U prisutstvu svjetlosti, kisika, te povišene temperature, odvija se niz reakcija koje rezultiraju stvaranjem lipidnih peroksida. *In vitro* i *in vivo* ispitivanjima dokazano je da ti produkti izazivaju oštećenja stanica i tkiva. Upotrebom antioksidanasa (vitamin E i butilhidroksitoluen) oksidacija fosfolipida može biti umanjena. Jedan od načina kojim se može dodatno utjecati na smanjenje oksidacijskih razgradnih procesa u lipidnom dvosloju je i korištenje zasićenih umjesto nezasićenih fosfolipida (Grit i Crommelin, 1993; Lasic 1993). Znatno veći problem, kada je u pitanju kemijska stabilnost vodenih disperzija liposoma tijekom duljeg vremenskog perioda, predstavlja hidroliza estera glicerofosfolipida na slobodne masne kiseline, lizofosfolipide i glicerofosfatne komponente. Odgovarajuća količina ovih razgradnih produkata može rezultirati povećanjem veličine liposoma, permeabilnosti dvosloja i smanjenjem udjela uklopljenog sadržaja, te je stoga očito da fizička stabilnost liposomskih pripravaka ovisi o kemijskim promjenama (Grit i Crommelin, 1992; Crommelin i sur., 1994). Fizička nestabilnost suspenzija liposoma, koja se očituje povećanjem veličine čestica, pojavom agregata ili flokula i smanjenjem udjela uklopljenog sadržaja ljekovite supstancije, predstavlja veliki problem u čuvanju takvih pripravaka tijekom duljeg vremenskog razdoblja (Taylor i Craig, 1993). Prema dostupnoj literaturi, mnoge metode su razvijane za stabilizaciju liposoma, poput liofilizacije, zamrzavanja i sušenja-raspršivanjem. Komercijalni liposomski lijekovi AmBisome<sup>®</sup>, Amphotec<sup>®</sup>, Myocet<sup>®</sup>, Visudyne<sup>®</sup> i LEP-ETU<sup>®</sup> (liposomski uklopljen paklitaksel) su liofilizirani proizvodi. Općenito, liofilizacija povećava rok trajanja liposomskih formulacija i čuva ih u suhom obliku kao liofilizirane oblike koji se neposredno prije primjene rekonstituiraju pomoću vode za injekcije. Nadalje, moraju se dodati krioprotektanti da bi se održala izvorna veličina liposoma (srednji promjer i raspodjela veličine liposoma prije liofilizacije) nakon ciklusa rehidratacije. Različiti tipovi i koncentracije krioprotektanata su istraživani zbog svoje sposobnosti da stabiliziraju, tj. zaštite liposome od međusobne fuzije i curenja uklopljenog sadržaja kroz lipidni dvosloj tijekom procesa liofilizacije (EL-Neser i sur., 2010).

U komercijalnim liofiliziranim liposomskim proizvodima Amphotec<sup>®</sup>, Myocet<sup>®</sup> i Visudyne<sup>®</sup> kao krioprotektant se koristi laktoza dok je saharoza prisutna u formulaciji AmBisome<sup>®</sup> i LEP-ETU<sup>®</sup> za povećanje stabilnosti liposoma tijekom liofilizacije. Iako terapijska učinkovitost liposomskih lijekova može varirati ovisno o izboru lipida, metodi pripreme, fizikalnim karakteristikama bioaktivnih tvari i naboju na površini liposoma, liofilizacija je korisna za dugotrajnu stabilnost liposomskih lijekova (Chang i Yeh, 2012).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Terapijski nanosustavi koji će poboljšati farmakokinetička svojstva lijeka, omogućiti kontrolirano oslobađanje uklopljenog lijeka, ciljanu dostavu lijeka na oboljelo mjesto te smanjiti štetne nuspojave i toksičnost su od velikog medicinskog značaja. Liposomi se dugi niz godina istražuju kao nanoterapeutici te su među svim istraživanim nanosustavima najduže prisutni u kliničkoj praksi. Primjenjuju se različitim putevima primjene: parenteralno, dermalno, transdermalno i preko sluznica.

Ovaj rad donosi pregled istraživanja i kliničke primjene liposoma namijenjenih ciljanoj parenteralnoj terapiji prvenstveno tumorskih oboljenja, antimikrobnoj terapiji i vakcinaciji. Prikazani su potencijali parenteralne primjene liposomskih pripravaka, utjecaj fizičko-kemijskih svojstava nanosustava na njihovu stabilnost tijekom uskladištenja i in vivo, načini postizanja pasivne i aktivne ciljane terapije. Obradeni su komercijalno dostupni liposomi za parenteralnu primjenu te oni koji se nalaze u kliničkim ispitivanjima.



### **3. MATERIJALI I METODE**

Za pisanje ovog rada pretraživana je on-line baza podataka, pregledana je dostupna znanstvena literatura i udžbenici u tiskanom i elektroničkom obliku, te znanstvene baze podataka i članci u stručnim časopisima. Znanstvena literatura proučavana je analitički i kritički, prvenstveno zbog definiranja znanstvenog i stručnog problema, te istraživanja postojećih znanja o temi koju obrađuje ovaj diplomski rad. Pri proučavanju relevantnih znanstvenih članaka izdvojeni su značajniji rezultati istraživanja, rasprave i zaključci. Pri pretraživanju znanstvene literature traženi su odgovori na specifična pitanja vezana za problematiku ovog diplomskog rada.

## 4. RASPRAVA

### 4.1. PRIMJENA LIPOSOMA U LIJEČENJU TUMORA

Iako je farmaceutska znanost otkrila mnoge lijekove koji se primjenjuju kod liječenja raka, većina tih konvencionalnih kemoterapeutika imaju uski terapijski indeks i vrlo su toksični kako za zloćudne tako i za normalne, zdrave stanice. Zbog toga je bilo važno razviti novu nove terapijske sustave koji će poboljšati terapijski indeks lijeka, pa su u svrhu toga 1974. godine liposomi prvi put predloženi kao nosači lijekova za primjenu u kemoterapiji. Želi li se putem liposoma postići zadovoljavajući terapijski učinak lijeka na stanice tumora potrebno je zadovoljiti tri uvjeta: produljeno vrijeme poluživota u krvnoj cirkulaciji, dostatno nakupljanje u tumorskim stanicama, kontrolirano otpuštanje i oslobađanje lijeka u tumorske stanice prema odgovarajućoj farmakokinetici samog lijeka (Andresen i sur., 2005).

Doksorubicin je antraciklin koji se široko koristi za liječenje solidnih i hematoloških tumora, ali je njegov glavni nedostatak izražena kardiotoksičnost. Smatra se da je uzrok kardiotoksičnosti afinitet pozitivno nabijenog doksorubicina prema negativno nabijenom kardiolipinu, lipidu kojeg ima u obilju u srčanom mišiću, koji je uključen u lokalizaciju lijekova u srčanom mišiću. Liposomi s doksorubicinom su razvijeni za tretiranje agresivnih tumora, poput metastatskih tumora dojke, jajnika i Kaposijevog sarkoma (Chang i Yeh, 2012).

Prva liposomska formulacija doksorubicina (prvi registrirani nanoterapeutik), odobrena je za primjenu devedesetih godina prošlog stoljeća. Riječ je o Doxil<sup>®</sup>/Caexyl<sup>®</sup> (Janssen Pharmaceutica NV, Beerse, Belgija) ili Myocet<sup>®</sup> (GP Pharm SA, Barcelona, Španjolska/Teva Pharmaceutical Industries Ltd, Krakow, Poljska) (Barenholz, 2012). Oba proizvoda sadrže doksorubicin, ali se razlikuju u lipidnom sastavu ovojnice. Doxil<sup>®</sup> sadrži hidrogenirani sojin fosfatidilkolin (HSPC), kolesterol i polietilenglikol 2000-distearoilfosfatidiletanolamin (PEG 2000-DSPE) u molarnom omjeru 56:39:5, a Myocet<sup>®</sup> EPC i kolesterol u molarnom omjeru 55:45 (Chang i Yeh, 2012). Doxil<sup>®</sup>, pegilirana liposomska formulacija doksorubicina je prvotno odobren za liječenje refraktornog Kaposijevog sarkoma, a sada je također indiciran za liječenje raka jajnika i recidivirajućeg raka dojki (Svenson, 2012). Uklapanje citotoksičnog antitumorskog lijeka doksorubicina u liposome povećava njegovo vrijeme polueliminacije ( $t_{1/2}$ ) i raspodjelu u tumorskim tkivima. Slobodan doksorubicin je imao  $t_{1/2}$  0.2 sata, dok je Myocet<sup>®</sup> imao 2.5 sati, a Doxil<sup>®</sup> 55 sati. Općenito,  $t_{1/2}$  liposoma u krvi se povećava sa smanjenjem

veličine, povećanjem čvrstoće fosfolipidnog dvosloja ili prisutnim PEG-om. Istraživanja i klinička primjena je pokazala da sve liposomske formulacije doksorubicina značajno smanjuju kardiotoksičnost u usporedbi sa slobodnim doksorubicinom (konvencionalni pripravak doksorubicina za intravensku primjenu). Rezultati kliničkih ispitivanja (faza III) Myocet<sup>®</sup>-a u kojoj se učinak uspoređivao sa konvencionalnim parenteralnim pripravkom doksorubicina kod pacijenata s metastatskim rakom dojke, dobiveni su slični rezultati kod preživljavanja u prvoj godini (64% za Myocet<sup>®</sup> nasuprot 69%, za konvencionalni pripravak) i preživljavanja bez progresije (3.8 nasuprot 4.3 mjeseca), ali je Myocet<sup>®</sup> imao nisku učestalost kardioloških događaja (13% nasuprot 29% za konvencionalni pripravak), mukozitisa /stomatitisa (8.6% nasuprot 11.9% za konvencionalni pripravak) te mučnina/povraćanja (12.3% nasuprot 20.3% za konvencionalni pripravak). Stoga, Myocet<sup>®</sup> ima prvenstveno tendenciju smanjiti kardiotoksičnost povezanu s primjenom klasičnog oblika doksorubicina. Slično Myocet<sup>®</sup>-u, Doxil<sup>®</sup> ima bolji sigurnosni profil, uključujući smanjenje kardiotoksičnosti, neutropenije, povraćanja i alopecije. Međutim, palmarno-plantarna eritrodisesteziya, stomatitis i mukozitis su češće bili povezani s Doxil<sup>®</sup>-om nego sa slobodnim doksorubicinom (Chang i Yeh, 2012).

Lipo-dox<sup>®</sup> (TTY Biopharm Company Ltd, Taipei, Taiwan) je PEGilirani liposomski doksorubicin druge generacije, sastavljen od distearoil-fosfatidilkolina (DSPC), kolesterola i PEG-a (Tablica 2). DSPC ima dvije potpuno zasićene masne kiseline (stearinske kiseline), visoku temperaturu faznog prijelaza (55°C,) te dobru kompatibilnost s kolesterolom. Lipidni dvosloj ima dvije termodinamičke faze: gel fazu ili fazu tekućih kristala. Na temperaturi <T<sub>c</sub>, lipidna membrana je u gel fazi, koja je relativno kruta i lipidne molekule su tijesno grupirane jer imaju nižu energiju nasumičnog gibanja te su hidrokarbonski lanci potpuno izduženi i blisko grupirani. Liposomi koji su sastavljeni od fosfolipida poput DSPC-a imaju veću stabilnost u usporedbi s ostalima koji sadrže nezasićene masne kiseline (fosfatidilkolin (PC) iz soje ili žumanjka jajeta) ili masne kiseline kraćih ili neuniformiranih lanaca poput hidrogeniranog sojinog PC (HSPC). U fazi I kliničkih ispitivanja Lipo-dox<sup>®</sup> je postigao najdulji poluživot u cirkulaciji (65 sati). Međutim, dokazano je da ne postoje razlike u preživljavanju između slobodnog doksorubicina (srednje vrijeme preživljavanja 23 dana) i Lipo-dox<sup>®</sup>-a (srednje vrijeme preživljavanja 23,5 dana) u animalnom modelu B-staničnog limfoma (na miševima) (Tseng i sur., 1999). Kod pacijenata s metastazirajućim rakom dojke primjenom Lipo-dox<sup>®</sup>-a srednje vrijeme do progresije bolesti bilo je 163 dana, a primjenom Doxil<sup>®</sup>-a 286 dana (Chao i sur., 2003). Neutropenija, stomatitis i toksičnost kože su primijećeni u mnogim slučajevima kod unosa Lipo-dox<sup>®</sup>-a. Štoviše, stomatitis je postao novi

faktor ograničenja primjene PEGiliranog liposomskog doksorubicina. Kod Lipo-dox<sup>®</sup>-a, stomatitis se pojavio u dozama od 30mg/m<sup>2</sup> i dostigao limit doze na 50mg/m<sup>2</sup>. Nasuprot njemu, Doxil<sup>®</sup> je dosegao limit doze na 80mg/m<sup>2</sup> te je stoga Lipo-dox<sup>®</sup> imao višu učestalost ozbiljnog stomatitisa od Doxil<sup>®</sup>-a. U usporedbi s Myocet<sup>®</sup>-om (nePEGiliranim oblikom liposomnog doksorubicina), Doxil<sup>®</sup> i Lipo-dox<sup>®</sup> (PEGilirani oblici liposomalnog doksorubicina) su pokazali značajnu učestalost stomatitisa kao nuspojave, koja je posljedica promjene biodistribucije korištenjem PEGiliranih liposoma.

Nova generacija liposoma s doksorubicinom su temperaturno-osjetljivi liposomi (tzv. *thermosensitive liposomes*, TSL). Riječ je o specifično dizajniranim liposomima koji oslobađaju uklopljeni lijek na točno određenim mjestima u organizmu gdje su lokalne temperature tkiva povišene. Usporedba s klasičnim (ne-TSL liposomima) koji ostanu stabilni pri povišenoj tjelesnoj T i ne oslobađaju lijekove u fiziološkom temperaturnom opsegu, TSL-i prolaze promjenu iz gel-faze u fazu tekućih kristala (tekuće kristalinično stanje) kad se zagriju, što membrane liposoma čini propusnijima za uklopljeni lijek. ThermoDox<sup>®</sup> (Celsion Corporation, Lawrenceville, NJ) je TSL formulacija s doksorubicinom koja je prošla fazu III kliničkih ispitivanja za liječenje hepatocelularnog karcinoma. Lipidni sastav ovih liposoma uključuje dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC), monostearoilfosfatidilkolin (MSPC) i PEG 2000-DSPE u molarnom omjeru 90:10:4. U dizajnu TSL-a, nužno je odabrati fosfolipid koji ima temperaturu faznog prijelaza (T<sub>c</sub>) u temperaturnom opsegu klinički ostvarive lokalne hipertermije (41-42°C). Mehanizam TSL-a je temperaturno inducirana membranska permeabilnost iznad T<sub>c</sub> korištenog lipida. DPPC s T<sub>c</sub>=41.5°C je idealan lipid za pripravu temperaturno-osjetljivih liposoma. Naime, na normalnoj tjelesnoj temperaturi (37 °C), membrane liposoma su u čvrstom gel stanju u kojem je membrana rigidna i nepermeabilna za uklopljeni sadržaj. Povišenjem temperature na temperaturu u kojoj membrane prelaze u stanje tekućih kristala pri čemu liposomi postaju permeabilni za uklopljeni sadržaj. Za liposome koji se sastoje samo od DPPC-a, brzina oslobađanja i razina oslobađanja su relativno malene. Uklapanjem male količine lizolipida, poput MSPC ili monopalmitoilfosfatidilkolina (MPPC), u liposome koji sadrže najveći udio DPPC, dovodi do blagog smanjenja T<sub>c</sub> i membranske nestabilnosti i brzina oslobađanja lijeka se značajno poboljšava. U *in vitro* studijama oslobađanja lijeka iz TSL-a koji sadrže MPPC, oko 45% uklopljenog doksorubicina se oslobodilo u govedem serumu na 42 °C unutar 20 sekundi, dok su čisti DPPC liposomi mogli osloboditi samo 20% lijeka nakon jednog sata.

Tablica 2. Komercijalno dostupni liposomi za parenteralnu primjenu (Chang i Yeh, 2012; Kraft i sur., 2014; Weissig i sur., 2014)

NAZIV PROIZVODA	NAČIN PRIMJENE	LIJEK	OBLIK	LIPIDNA KOMPONENTA	INDIKACIJA
<b>AmBisome<sup>®</sup></b>	Intravenozno	Amfotericin B	Prašak	HSPC, DSPG, kolesterol (2:0.8:1)	Sistemske gljivične infekcije
<b>DaunoXome<sup>®</sup></b>	Intravenozno	Daunorubicin	Emulzija	DSPC, kolesterol (2:1)	Kaposijev sarkom uzrokovan HIV-om
<b>DepoCyt<sup>®</sup></b>	Spinalno	Citarabin	Suspencija	Kolesterol, Triolein, DOPC i DPPG (11:1:7:1)	Limfomatozni maligni meningitis
<b>DepoDur<sup>®</sup></b>	Epiduralno	Morfin sulfat	Suspencija	Kolesterol, Triolein, DOPC, DPPG (11:1:7:1)	Liječenje boli nakon velikih operativnih zahvata
<b>Doxil<sup>®</sup></b>	Intravenozno	Doksorubicin	Suspencija	HSPC, kolesterol, PEG 2000-DSPE (56:39:5)	Kaposijev sarkom, rak jajnika, recidivirajući rak dojke
<b>Inflexal<sup>®</sup>V</b>	Intramuskularno	Inaktivirani hemaglutinin virusa gripe A i B	Suspencija	DOPC, DOPE	Gripa
<b>Marqibo<sup>®</sup></b>	Intravenozno	Vinkristin sulfat	Suspencija	Sfingomijelin, kolesterol (60:40)	Akutna limfatička leukemija
<b>Mepact<sup>®</sup></b>	Intravenozno	Mifamurtid	Prašak	POPC, OOPS	Nemetastazirajući osteosarkom
<b>Myocet<sup>®</sup></b>	Intravenozno	Doksorubicin	Prašak	EPC, kolesterol (55:45)	Metastazirajući rak dojke
<b>Visudyne<sup>®</sup></b>	Intravenozno	Verteporfin	Prašak	EPG, DMPC (3:5)	Fotodinamička terapija makularne degeneracije povezane sa starenjem

HSPC=hidrogenirani sojin fosfatidilkolina; DSPG=disteraol-fosfatidilglicerol; DSPC=disteraol-fosfatidilkolin; DOPC=diolil-fosfatidilkolin; DPPG=dipalmitoil-fosfatidilglicerol; EPC=fosfatidilkolin jajeta; EPG=fosfatidilglicerol jajeta; DMPC=1- $\alpha$ -dimiristoil-fosfatidilglicerol; PEG 2000-DSPE=polietilen glikol 2000-disteraol-fosfatidiletanolamin; DOPE=diolil-fosfatidiletanolamin; POPC=1-palmitoil-2-oleil-sn-glicerol-3-fosfokolin

Prisutnost MSPC-a, a ne PEG 2000-DSPE, u DPPC liposomima mogla je povećati brzinu oslobađanja lijeka *in vitro*. Lizolipid je važan faktor za utvrđivanje brzine oslobađanja lijeka iz TSL-a. Doista, pokazalo se da je prisutnost 9,6 mol% MSPC-a u TLS-u rezultirala bržom eliminiranju uklopljenog doksorubicina ( $t_{1/2}=1,29\text{h}$ ) u usporedbi s formulacijom bez lizolipida ( $t_{1/2}=2,91\text{ h}$ ) (Banno i sur., 2010). Uspoređivano je nakupljanje doksorubicina u tumorskom tkivu korištenjem animalnog modela (miševi). Pritom su korištene različite formulacije doksorubicina: ThermoDox<sup>®</sup>, Doxil<sup>®</sup> i slobodni doksorubicin. Rezultati istraživanja su pokazali da se doksorubicin postepeno povećavao u tumorima kada su se koristili Doxil<sup>®</sup> i ThermoDox<sup>®</sup>, ali ne i slobodni doksorubicin. 24 sata nakon primjene formulacija, koncentracije doksorubicina u tumorima su bile značajno više s Doxil<sup>®</sup>-om nego s ThermoDox<sup>®</sup>-om. ThermoDox<sup>®</sup> je trenutno u kliničkim ispitivanjima te je zbog toga njegova konačna terapijska učinkovitost još uvijek nepoznata (Dromi i sur., 2007).

Daunorubicin se klasificira kao antraciklinski lijek za liječenje leukemije i široke palete solidnih tumora, no njegov najveći nedostatak je mijelosupresija i kardiotsičnost. Daunorubicin je također istraživao kao liposomski pripravak u kemoterapiji različitih tumora. Registriran je pod zaštićenim nazivom DaunoXome<sup>®</sup> (Gilead Sciences Ltd, Co. Cork, Irska), a glavne su mu prednosti u usporedbi s konvencionalnim pripravkom daunorubicina smanjeni rizik od akutne i kumulativne kardiotsičnosti. Daunorubicin je u DaunoXome<sup>®</sup>-u uklopljen u male unilamelarne konvencionalne liposome (45nm) koje se sastoje od DSPC-a i kolesterola u molarnom omjeru 2:1. U *in vivo* studijama na miševima, primjenom DaunoXome<sup>®</sup>-a unos daunorubicina u tumor je povećan deset puta u usporedbi sa slobodnim lijekom. Nadalje, kliničke farmakokinetičke studije su pokazale da je AUC DaunoXome<sup>®</sup>-a bio 36 puta veći u odnosu na konvencionalni daunorubicin. U fazi III kliničkih ispitivanja DaunoXome<sup>®</sup>-a te kombinacija doksorubicina, bleomicina i vinkristina za liječenje Kaposijevog sarkoma povezanog s AIDS-om, učinkovitost DaunoXome<sup>®</sup>-a i vinkristina je bila komparabilna. Odgovor na terapiju (25% DaunoXome<sup>®</sup> naspram 28% vinkristin), vrijeme učinkovitosti lijeka, tj. vrijeme u kojem lijek pokazuje antitumorski učinak (115 za DaunoXome<sup>®</sup> naspram 99 dana vinkristin), ukupno preživljavanje (369 DaunoXome<sup>®</sup> naspram 342 dana vinkristin) su bili slični u oba slučaja. Štoviše, kod pacijenata koji su liječeni DaunoXome<sup>®</sup>-om učestalost alopecije je bila značajno manja (8% s DaunoXome<sup>®</sup>-om nasuprot 36% konvencionalnom terapijom), neuropatija (13% s DaunoXome<sup>®</sup>-om nasuprot 41% konvencionalnom terapijom). Također srčana funkcija kod pacijenata tretiranih DaunoXome<sup>®</sup>-

om je bila nepromijenjena. Stoga bi DaunoXome<sup>®</sup> mogao pružiti jednako učinkovitu, ali i sigurniju kemoterapiju.

Taxol<sup>®</sup> je registrirani pripravak paklitaksela za liječenje raka jajnika, dojke, velikostanični karcinom pluća i Kaposijevog sarkoma povezanog s AIDS-om. Međutim, paklitaksel je slabo topljiv u vodi, stoga je njegova intravenska primjena moguća ako je oblikovan topljivi oblik lijeka. Povećanje topljivosti može se postići dodatkom neionskog surfaktanta (solubilizatora) Chemophor EL (polietoksilirano ricinusovo ulje) kako bi se pripravila koncentrirana otopina lijeka. Međutim, Cremophor El povećava toksičnost i dovodi do reakcija preosjetljivosti kod određenog broja pacijenata. LEP-ETU<sup>®</sup> je liposomska formulacija paklitaksela koja je razvijena kako bi se potencijalno smanjila toksičnost povezana s Taxol<sup>®</sup>-om eliminirajući iz formulacije lijeka komponentu polietoksiliranog ricinusovog ulja. LEP-ETU<sup>®</sup> formulacija je sastavljena od 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfokolina (DOPC), kolesterola i kardiolipina u molarnom omjeru 90:5:5, a pripremljena je modificiranom metodom hidratacije tankog fosfolipidnog sloja-filma. DOPC ima nisku T<sub>c</sub> (-22°C) stoga je membrana liposoma elastičnija i može uklopiti veću količinu hidrofobnih molekula. Kolesterol se koristi u LEP-ETU<sup>®</sup> formulaciji kako bi povećao stabilnost liposoma povećanjem čvrstoće membrane. Liposomi koji sadrže kardiolipin smanjuju kardiotoksičnost povezanu s doksorubicinom, tako što mijenjaju farmakokinetiku i distribuciju lijeka u tkiva i tako on može pokazati slične rezultate kao LEP-ETU<sup>®</sup>.

Fetterly i sur. (2008) su istraživali maksimalnu dozvoljenu dozu, toksičnu dozu i farmakokinetiku liposomski uklopljenog paklitaksela (LEP-ETU<sup>®</sup>) u uspoređi s Taxol<sup>®</sup>-om. Maksimalna dozvoljena doza LEP-ETU<sup>®</sup> je bila 325 mg/m<sup>2</sup> (faza I kliničkih ispitivanja, pacijenti s lokalno uznapredovalim ili metastatskim karcinomom). Ove doze su bile veće od onih postignutih s Taxol<sup>®</sup>-om, koji je primijenjivan u dozi od 135-200 mg/m<sup>2</sup>. Glavna nuspojava paklitaksela je neuropatija. U fazi 1 kliničkih ispitivanja, neurotoksičnost se pojavila u 5 od 12 pacijenata (42%) koji su liječeni s LEP-ETU<sup>®</sup> u dozi  $\geq$  325 mg/m<sup>2</sup>. Iako direktna usporedba s Taxol<sup>®</sup>-om nije moguća, neutropenija je primijećena kod 53% pacijenata s metastatskim rakom dojke koji su liječeni s 250 mg/m<sup>2</sup> Taxol<sup>®</sup>-a (Winer i sur., 2004). Nakon unosa LEP-ETU<sup>®</sup>, AUC paklitaksela kod pacijenata s metastatskim karcinomom je bio veći povećanjem doze lijeka, slično Taxol<sup>®</sup>-u. Iako postoje sličnosti farmakokinetike u plazmi između dviju formulacija, klinički podaci dobiveni u I. fazi istraživanja pokazuju da LEP-ETU<sup>®</sup> može biti sigurno primijenjen u većim dozama od Taxol<sup>®</sup>-a.

Osim LEP-ETU<sup>®</sup> razvijena je i istraživana još jedna liposomska formulacija paklitaksela - EndoTAG-1<sup>®</sup>. Lipidni sastav formulacija EndoTAG-1<sup>®</sup> uključuje 1,2-dioleoil-3-trimetilamonijpropan (DOTAP), DOPC i paklitaksel u omjeru 50:47:3 (Tablica 3). DOTAP je kationski sintetički lipid koji se sastoji od jednog pozitivnog naboja na glavnoj grupi. Korištenje kationskih lipida za poboljšanje genetske dostave je intenzivno proučavan, ali je njihova primjena u klinici relativno neistražena. Kationski liposomi su karakterizirani da mogu selektivno ciljati tumorsku vaskulaturu. Ovaj selektivni afinitet kationskih liposoma prema tumorskoj vaskulaturi otvara mogućnosti za razvoj mnogih antiangiogenih i antikancerogenih formulacija temeljenih na kationskim liposomima. EndoTAG-1<sup>®</sup> je prva formulacija kationskih liposoma u kliničkim ispitivanjima s paklitakselom. Da bi se postigla odgovarajuća stabilnost EndoTAG-1<sup>®</sup> formulacije, liposomske disperzije se liofiliziraju i kao suhi oblici se čuvaju, te se rekonstituiraju s vodom za injekcije neposredno prije primjene. Rezultati predkliničkih studija pokazuju da je EndoTAG-1<sup>®</sup> spriječio rast tumora koji su rezistentni na Taxol<sup>®</sup> poput B16 melanoma i Sk-Mel 28 melanoma. EndoTAG-1<sup>®</sup> je pokazao jake antivaskularne učinke na postojeću tumorsku vaskulaturu i utjecao na nekoliko tumorskih mikrocirkulatornih parametara (Chang i Yeh, 2012).

DepoCyt<sup>®</sup> (Almac Pharma Services LTD, Craigavon, Velika Britanija), komercijalno je dostupna liposomska formulacija citarabina indiciranog za liječenje meningealne neoplazme. Za razliku od svih prethodno opisanih liposomskih formulacija karakteriziranih veličinom liposoma oko 100 nm, ovdje je riječ o multivezikularnim liposomima, proizvedenih DepoFoam<sup>®</sup> tehnologijom (Pacira Pharmaceuticals Inc.). Multivezikularni liposomi se sastoje od višestrukog nekoncentričnog vodenog odjeljka unutar pojedinog sloja lipidne membrane s izgledom poput pjene. Ova visoko organizirana multivezikularna struktura liposoma omogućava veću učinkovitost uklapanja lijeka, osigurava snažnu strukturnu stabilnost i postepeno oslobađanje lijeka. Intratekalna primjena DepoCyt<sup>®</sup>-a je korisna za ciljani učinak lijeka na meninge pri čemu se minimalizira sistemska izloženost organizma citarabinu. Kontinuirano oslobađanje citarabina osigurava produljenu izloženost lijeku i niže vršne koncentracije citarabina u usporedbi sa standardnim parenteralnim pripravkom citarabina. Primjenom DepoCyt<sup>®</sup>-a smanjena je učestalost doziranja s dva puta tjedno na jednom, svaki drugi tjedan (Angst i Drover, 2006).

Marqibo<sup>®</sup> je vinkristin sulfat uklopljen u liposome (promjera oko 100 nm) koji se sastoji od sfingomijelina i kolesterola u molarnom omjeru 60:40. Koristi se u liječenju akutne limfatičke leukemije (Weissig i sur., 2014).



Mepact<sup>®</sup> se sastoji od mifamurtida (sintetičkog muramil tripeptid-fosfatidiletanolamina) uklopljenog u velike multilamelarne liposome pripravljene iz 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicerol-3-fosfokolina i 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina. Lijek, imuno stimulans, je "usidren" u negativno nabijenoj membrani liposomskog dvosloja (Weissig i sur.,2014). Indiciran je kod djece, adolescenata i mladih odraslih osoba za liječenje nemetastazirajućeg osteosarkoma visokog stupnja nakon potpune kirurške makroskopske resekcije. Primjenjuje se intravenskom infuzijom povezanom s postoperativnom kemoterapijom i pokazano je da značajno povećava ukupno preživljenje kod mladih bolesnika. Nakon primjene liposomske infuzije, lijek se eliminira iz plazme unutar nekoliko minuta i koncentrira se u plućima, jetri, slezeni, nazofarinksu i tiroidi. Stanice retikuloendotelnog sustava fagocitoziraju liposome (Frampton, 2010).

## 4.2. LIPOSOMI U VAKCINACIJI

Zbog nakupljanja u stanicama retikuloendotelnog sustava konvencionalni liposomi se mogu koristiti u pasivnoj ciljanoj terapiji organa i stanica RES-a. To su npr. liposomski pripravci s antibioticima, antivirusnim lijekovima, prostaglandinima, kortikosteroidima itd.. Infekcije su karakterizirane povećanom propusnosti krvnih žilama na sličan način kao kod stanica tumora. U takvim uvjetima sterički stabilizirani liposom može biti djelotvoran nosač za otpuštanje uklopljenog lijeka (Lasic, 1998). Pokazalo se da ugradnja proteina viralnih membrana ili peptida antigena u liposome pojačava staničnu i humoralnu imunost protiv patogena.

Virosomi su liposomi koji na svojoj površini imaju vezani virusni protein ili lipid. Oni ne sadrže genetičku informaciju virusa koja im omogućuje da se repliciraju ili uzrokuju infekciju (Stegmann i sur., 1987). Lipidni slojevi virosoma, sastavljeni od dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE) i DOPC-a (Tablica 2), se koriste kako bi oponašali viralne membrane za dostavu cjepiva. Komercijalno dostupna cjepiva koja koriste virosomski sustav dostave antigena su Epaxal<sup>®</sup> i Inflexal V<sup>®</sup>. Za proizvodnju Inflexal V<sup>®</sup>, virusi gripe, koji se uzgajaju u kokošjim jajima, se prvo inaktiviraju s beta-propiolaktonom. Površinski antigeni gripe, hemaglutinin i neuraminidaza, se onda pročišćavaju i miješaju s lecitinom kako bi oblikovali virosome. Zbog virosomske tehnologije, hepatitis A virusno (HAV) cjepivo Epaxal<sup>®</sup> i cjepivo gripe Inflexal V<sup>®</sup>, su visoko učinkoviti oponašajući prirodnu virusnu infekciju. Korištenje virosoma kako bi se dostavili antigeni hepatitisa A ili gripe stimulira jaku imunološku reakciju imunokompetentnih stanica. U odnosu na druga dostupna HAV cjepiva, Epaxal<sup>®</sup> je cjepivo koje ne sadrži aluminij te se temelji na virosomima koji sadrže formalinski neaktivne hepatitis

A antigene. U kliničkoj studiji koju su proveli Usonis i suradnici (2003), serozaštita je bila 100%-tna kod sve novorođenčadi i djece u 1. i 12. mjesecu nakon prvog cijepljenja Epaxal<sup>®</sup>-om. Usporedbe radi, serozaštita nakon cijepljenja cjepivom s aluminijem Havrix (GlaxoSmithKline Biologicals Rixensart, Belgija) je bila 67,7% kod novorođenčadi s već postojećim majčinskim protu-HAV protutijelima te je bilo potrebno dodatno cijepljenje. Štoviše, novorođenčad i djeca općenito bolje podnose Epaxal<sup>®</sup>, bez ozbiljnih sistemskih ili lokalnih nuspojava nakon prvog ili dodatnog cijepljenja (Chang i Yeh, 2012).

Tablica 3. Liposomi za parenteralnu primjenu u procesu kliničkih istraživanja (Chang i Yeh, 2012; Kraft i sur., 2014; Weissig i sur., 2014)

NAZIV PROIZVODA	NAČIN PRIMJENE	LIJEK	LIPIDNA KOMPONENTA	INDIKACIJA	FAZA KLINIČKOG ISTRAŽIVANJA
<b>LEP-ETU<sup>®</sup></b>	Intravenozno	Paklitaksel	DOPC, kolesterol, kardiolipin (90:5:5)	Rak jajnika, dojke, pluća	I/II
<b>LEM-ETU<sup>®</sup></b>	Intravenozno	Mitoksantron	DOPC, kolesterol, kardiolipin (90:5:5)	Leukemija, tumor jetre, jajnika	I
<b>EndoTAG<sup>®</sup>-1</b>	Intravenozno	Paklitaksel	DOTAP, DOPC (50:47)	Tumor dojke, gušterače	II
<b>ThermoDox<sup>®</sup></b>	Intravenozno	Doksorubicin	DPPC, MSPC, PEG 2000- DSPE (90:10:4)	Neoperabilni hepatocelularni karcinom	III
<b>Lipoplatin<sup>®</sup></b>	Intravenozno	Cisplatin	SPC, DPPG, kolesterol, mPEG 2000- DSPE	Metastazirajući kolorektalni karcinom	III
<b>INX-0076<sup>®</sup></b>	Intravenozno	Topotekan	Kolesterol i sfingomijelin iz jajeta (45:55)	Uznepredovali solidni tumori	I

DOPC=1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfokolin; DOTAP=1,2-dioleil-3-trimetilamonij-propan;  
DPPC=dipalmitoil-fosfatidilkolin; MSPC=monostearoil-fosfatidilkolin; mPEG 2000-DSPE=metoksi-  
polietilen glikol-distearoil fosfatidiletanolamin; SPC=sojin fosfatidilkolin

Za Inflexal V<sup>®</sup>, većina studija je pokazala slabiju učinkovitost ili neučinkovitost na kliničke parametre za ova cjepiva u usporedbi s neadjuvantnim, poluvirusnim ili pojedinačnim sezonskim cjepivima. Kanra i sur. (2004) su usporedili imunogenost i sigurnost Inflexal V<sup>®</sup> kod djece s Fluarix<sup>®</sup> cjepivom (GlaxoSmithKline Biologicals, Dresden, Njemačka). Oba cjepiva su bila dobro podnošljiva i mogla su izazvati učinkovitu imunoreakciju kod djece. Interesantno je to što je virusno adjuvantno cjepivo protiv gripe pokazalo veću imunogenost (88,8%) od Fluarix<sup>®</sup> cjepiva (77,5%) kod necijepljene djece. U biti, virosomske tehnike možda nisu u mogućnosti dati superiorni zaštitni imunitet u klinici, ali igraju važnu ulogu u prevenciji smrtnosti povezane s cjepivima.

#### **4.3. LIPOSOMSKE FORMULACIJE U OFTALMOLOGIJI-VISUDYNE<sup>®</sup>**

Verteporfin je hidrofobni fotosenzibilizator nalik kloru koji se pokazao jako učinkovitim *in vivo* kod fotodinamičkih terapija. Međutim, verteporfin također ima tendenciju agregiranja u vodenom mediju, koji može jako ograničiti bioraspoloživost lijeka u biološkim sustavima. Uklapanjem u liposome (Visudyne<sup>®</sup>) i intravenskom primjenom omogućena je dostava verteporfina u krvotok u njegovom monomernom obliku. Lipidni sastav Visudyne<sup>®</sup> obuhvaća nezasićeni fosfatidilglicerol (PG) i DMPC u molarnom omjeru 3:5. Visudyne<sup>®</sup> je bio jedini lijek koji je FDA odobrila za fotodinamičku terapiju makularne degeneracije povezane sa starenjem. Terapija Visudyne<sup>®</sup>-om sprječava rast destruktivnih krvnih žila bez da oštećuje okolno tkivo (Bressler i Bressler, 2000). Međutim, Chowdhary i sur. (2003) navode da se Visudyne<sup>®</sup> odmah destabilizira u prisutnosti relativno malenih koncentracija plazme. Stoga je cilj budućih istraživanja liposomskih formulacija u oftalmologiji razviti stabilne liposomske strukture koje će imati dulje vrijeme poluživota u plazmi nakon intravenske primjene (Chang, Yeh, 2012).

#### **4.4. LIPOSOMSKI PRIPRAVCI U LIJEČENJU BOLI**

Korištenjem DepoFoam<sup>®</sup> tehnologije (Pacira Pharmaceuticals, Inc.) pripremljen je DepoDur<sup>®</sup> (Almac Pharma Services Ltd), liposomska formulacija morfina u obliku injekcije s produljenim oslobađanjem, za liječenje boli nakon većih operativnih zahvata. Primjenjuje se epiduralno. Primjenom DepoDur<sup>®</sup>-a smanjena je doza sistemski primijenjenih analgetika koji su potrebni za adekvatnu terapiju boli nakon operacija (Angst i Drover, 2006).

#### 4.5. LIJEČENJE SISTEMSKIH GLJIVIČNIH INFEKCIJA

AmBisome<sup>®</sup> (Gilead Sciences Ltd) kao lijek koji se temelji na liposomima, odobren je kako bi se prevladale nuspojave povezane sa sistemskom primjenom amfotericina B, kao što su reakcije vezane za infuziju i nefrotoksičnost povezane s kroničnom primjenom (Fukui, 2003). Formulacija se sastoji od HSPC, kolesterola i disteraoilfosfatidilglicerola (DSPG), u molarnom omjeru 2:1:0.8. Kao mehanizam djelovanja lijeka pretpostavlja se selektivan prijenos lijeka s lipidnog kompleksa na gljivičnu stanicu s minimalnim unosom u ljudske stanice (Weissig i sur., 2014). Zbog svoje male veličine i negativnog naboja, liposomi s amfotericinom B izbjegavaju t prepoznavanje od strane retikuloendotelnog sustava. Stoga, pojedinačna doza liposomske formulacije amfotericina B omogućava mnogo veću vršnu koncentraciju u plazmi i mnogo veću površinu ispod krivulje ovisnosti koncentracije lijeka u plazmi o vremenu od konvencionalnog amfotericin B deoksikolata. Koncentracije lijeka u tkivima bolesnika koji su primali liposomsku formulaciju amfotericina B bile su najviše u jetri i slezeni i mnogo niže u bubrezima i plućima (Hamill, 2013).

## 5. ZAKLJUČAK

Liposomi zauzimaju istaknuto mjesto među terapijskim nanosustavima za parenteralnu primjenu i najduže su od svih nanosustava prisutni u kliničkoj praksi. Zbog svoje sličnosti s biološkim membranama, netoksičnosti, neimunogenosti i biorazgradljivosti liposomi su u fiziološki prihvatljivi što im osigurava primjenu u različitim terapijskim područjima: onkologija, infektivna oboljenja (virusna, bakterijska, gljivična, parazitska), dijagnostika, hormonska terapija, vakcinacija i dr.. Uklapanjem u liposome mijenjaju se farmakokinetička svojstva lijeka i poboljšava njegova bioraspoloživost te omogućava ciljana dostava lijeka na oboljelo mjesto, smanjujući sistemske nuspojave i toksičnost. Odabirom lipidnih i polimernih komponenti lipidnog dvosloja i metode pripreme moguće je proizvesti liposome odgovarajućih fizičko-kemijskih svojstava prikladnih za ciljanu terapiju brojnih oboljenja. Dug razvojni put i ekonomska isplativost predstavljaju moguća ograničenja za njihovu komercijalnu dostupnost.

## 6. LITERATURA

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

Andresen TL, Jensen SS, Jorgensen K. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release, *Progress in Lipid Research* 44, 2005.

Angst MS, Drover DR. Pharmacology of drugs formulated with DepoFoam: a sustained release drug delivery system for parenteral administration using multivesicular liposome technology. *Clinical Pharmacokinetics* 2006;45 (12): 1153-1176.

Banno B, Ickenstein LM, Chiu GN, et al. The functional roles of poly(ethylene glycol)-lipid and lysolipid in the drug retention and release from lysolipid-containing thermosensitive liposomes in vitro and in vivo. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010;99(5):2295-2308.

Barenholz Y. Doxil®-the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *Journal of Controlled Release*. 2012;160(2):117-134.

Bradamante V i suradnici. Mjesto djelovanja lijeka. *Medicinska farmakologija*. Medicinska naklada. 1993:16-18.

Bressler NM, Bressler SB. Photodynamic therapy with verteporfin (Visudyne): impact on ophthalmology and visual sciences. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2000;41(3):624-628.

Chang H-I, Yeh M-K. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. *International Journal of Nanomedicine* 2012;7:49-60.

Chao TC, Wang WS, Yen CC, Chiou TJ, Liu JH, Chen PM. A dose escalating pilot study of sterically stabilized, pegylated liposomal doxorubicin (Lipo-Dox) in patients with metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Investigation Journal*. 2003;21(6):837-847.

Chowdhary RK, Shariff I, Dolphin D. Drug release characteristics of lipid based benzoporphyrin derivate. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2003;6(1):13-19.

Crommelin DJA, Grit M, Talsma H, Zuidam NJ. Liposomes as carriers for drugs and antigens: approaches to preserve their long term stability. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1994;20:547-556.

Dromi S, Frenkel V, Luk A et al. Pulsed-high intensity focused ultrasound and low temperature-sensitive liposomes for enhanced targeted drug delivery and antitumor effect. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(9):2772-2727.

EL-Nesser OH, Yahija SA, EL-Gazayerly ON. Effect of formulation design and freeze-drying on properties of fluconazole multilamellar liposomes. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2010;18:217-224.

Fetterly GJ, Grasela TH, Sherman JW, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling and simulation of neutropenia during phase I development of liposome-entrapped paclitaxel. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(18):5856-5863.

Frampton JE. Mifamurtide: a review of its use in the treatment of osteosarcoma. *Pediatric Drugs*. 2010;12(3):141-153.

Glück R, Mischler R, Brantschen S, Just M, Althaus B, Cryz SJ Jr. Immunopotentiating reconstituted influenza virus virosome vaccine delivery system for immunization against hepatitis A. *Journal of Clinical Investigation*. 1992;90(6):2491-2495.

Grit M, Crommelin DJA. The effect of aging on the physical stability of liposome dispersions. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1992;62:113-122.

Grit M, Crommelin DJA. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1993;64:3-18.

Hammil RJ. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs*. 2013;73:919-934.

Jalšenjak I, Jalšenjak V, Filipović-Grčić Jelena. *Farmaceutika*. Školska knjiga, 1998.

Kanra G, Marchision P, Feiterna-Sperling C, et al. Comparison of immunogenicity and tolerability of a virosome-adjuvanted and a split influenza vaccine in children. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2004;23(4):300-306.

Kirby C, Gregoriadis G. Liposomes In: Mathiowith E. (Ed.) *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*. New York-Chiester-Weinheim-Brisbane-Singapore-Toronto:Wiley, 1999:461-492.

Kraft JC, Freeling JP, Wang Z, Ho RJY. Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014;103(1):29-52.

Lasic DD. *Liposomes: from physics to applications*, Ed., Elsevier, Amsterdam-London-New York-Tokyo. 1993.

Lasic DD. Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology* , 1998; 16:307-321.

New RRC. *Liposomes a practical approach*. Oxford-New York-Tokyo: IRL Press, 1989. Storm G, Crommelin DJA. Liposomes: quo vadis? *Pharmaceutical Science & Technology Today*. 1998;1:19-31.

Svenson S. Clinical translation of nanomedicines. *Current Opinion in Solid State& Materials Science*. 2012;16(6):287-294.

Stegmann T, Morselt HV, Booy FP, et al. Functional reconstitution of influenza virus envelopes. *EMBO Journal*. 1987;6(9):2651-2659.

Taylor KMG, Craig DQM. Liposomes for drug delivery: developments and possibilities. *The International Journal of Pharmacy Practice*. 1993;2:128-135.

Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005; 4:145–160.

Tseng YL, Hong RL, Tao MH, Chang FH. Sterically stabilized anti-idiotypic immunoliposomes improve the therapeutic efficacy of doxorubicin in a murine B-cell lymphoma model. *International Journal of Cancer*. 1999;80(5):723-730.

Usonis V, Bakasėnas V, Valentelis R, Katiliene G, Vidzeniene D, Herzog C. Antibody titres after primary and booster vaccination of infants and young children with a virosomal hepatitis A vaccine (Epaxal). *Vaccine*. 2003;21(31):4588-4592.

Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: strukturalna svojstva i klasifikacija. *Farmaceutski glasnik* 68, 6/2012.

Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: metode priprave. *Farmaceutski glasnik* 68, 7-8/2012.

Weissig V, Pettinger TK, Murdock N. Nanopharmaceuticals (part I): products on market. *International Journal of Nanomedicine* 2014;9:4357-4373.



Winer EP, Berry DA, Woolf S, et al. Failure of higher-dose paclitaxel to improve outcome in patients with metastatic breast cancer: cancer and leukemia group B Trial 9345. *Journal of Clinical Oncology*. 2001;22(11):2061-2068.

## 7. SAŽETAK

Liposomi zauzimaju istaknuto mjesto među terapijskim nanosustavima za parenteralnu primjenu i najduže su od svih nanosustava prisutni u kliničkoj praksi. Zbog svoje sličnosti s biološkim membranama, netoksičnosti, neimunogenosti i biorazgradljivosti liposomi su fiziološki prihvatljivi što im osigurava primjenu u različitim terapijskim područjima: onkologija, infektivna oboljenja (virusna, bakterijska, gljivična, parazitska), dijagnostika, hormonska terapija, vakcinacija i dr.. Uklapanjem u liposome mijenjaju se farmakokinetička svojstva lijeka i poboljšava njegova bioraspoloživost te omogućava ciljana dostava lijeka na oboljelo mjesto, smanjujući sistemske nuspojave i toksičnost. Ovaj rad donosi pregled istraživanja i kliničke primjene liposoma namijenjenih ciljanoj parenteralnoj terapiji prvenstveno tumorskih oboljenja, antimikrobnoj terapiji i vakcinaciji. Obrađeni su komercijalno dostupni liposomi za parenteralnu primjenu te oni koji se nalaze u kliničkim ispitivanjima.

## **8. SUMMARY**

Among different nanopharmaceuticals (nanosystems, nanocarriers) investigated for parenteral drug delivery liposomes have the longest history in clinical practice. Because of their structural similarity with biological membranes, biodegradability, biocompatibility, non-immunogenicity and non-toxicity, liposomes are physiologically acceptable and can be used in different therapeutic areas: oncology, infectious diseases (viral, bacterial, fungal, parasitic), diagnostics, hormone therapy, vaccination, etc.. Liposomes are able to modify pharmacokinetic properties of the encapsulated drug and enhance its bioavailability. Moreover, they allow targeted drug delivery to the pathological area, thus reducing systemic side effects and toxicity. This thesis provides an overview of the research and clinical applications of liposomes intended for targeted drug delivery by parenteral route of drug administration, primarily tumor targeting, antimicrobial therapy and vaccination. Majority of the presented formulation of liposomes are commercially available or are in the final stages of clinical examinations.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Zavod za Farmaceutsku tehnologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Liposomi kao nosači lijekova: parenteralna primjena

Mihaela Dasović

Liposomi zauzimaju istaknuto mjesto među terapijskim nanosustavima za parenteralnu primjenu i najduže su od svih nanosustava prisutni u kliničkoj praksi. Zbog svoje sličnosti s biološkim membranama, netoksičnosti, neimunogenosti i biorazgradljivosti liposomi su fiziološki prihvatljivi što im osigurava primjenu u različitim terapijskim područjima: onkologija, infektivna oboljenja (virusna, bakterijska, gljivična, parazitska), dijagnostika, hormonska terapija, vakcinacija i dr.. Uklapanjem u liposome mijenjaju se farmakokinetička svojstva lijeka i poboljšava njegova bioraspoloživost te omogućava ciljane dostavu lijeka na oboljelo mjesto, smanjujući sistemske nuspojave i toksičnost. Ovaj rad donosi pregled istraživanja i kliničke primjene liposoma namijenjenih ciljanoj parenteralnoj terapiji prvenstveno tumorskih oboljenja, antimikrobnoj terapiji i vakcinaciji. Obradeni su komercijalno dostupni liposomi za parenteralnu primjenu te oni koji se nalaze u kliničkim ispitivanjima.

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

Rad sadrži: 32 stranice, 3 grafička prikaza, 3 tablice i 36 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku

Ključne riječi: liposomi, parenteralna primjena, ciljane terapije, tumori, antimikrobna terapija, vakcine

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Željka Vanić**, *docentica* Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Anita Hafner**, *izvanredna profesorica* Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Roberta Petlevski**, *izvanredna profesorica* Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2015.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of Pharmaceutical Technology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Liposomes as drug carriers: parenteral administration

Mihaela Dasović

Among different nanopharmaceuticals (nanosystems, nanocarriers) investigated for parenteral drug delivery liposomes have the longest history in clinical practice. Because of their structural similarity with biological membranes, biodegradability, biocompatibility, non-immunogenicity and non-toxicity, liposomes are physiologically acceptable and can be used in different therapeutic areas: oncology, infectious diseases (viral, bacterial, fungal, parasitic), diagnostics, hormone therapy, vaccination, etc.. Liposomes are able to modify pharmacokinetic properties of the encapsulated drug and enhance its bioavailability. Moreover, they allow targeted drug delivery to the pathological area, thus reducing systemic side effects and toxicity. This thesis provides an overview of the research and clinical applications of liposomes intended for targeted drug delivery by parenteral route of drug administration, primarily tumor targeting, antimicrobial therapy and vaccination. Majority of the presented formulation of liposomes are commercially available or are in the final stages of clinical examinations.

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

Thesis includes: 32 pages, 3 figures, 3 tables and 36 references. Original is in Croatian language.

Keywords: liposomes, parenteral drug delivery, drug targeting, tumors, antimicrobial therapy, vaccination

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

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

**Anita Hafner, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Roberta Petlevski, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2015.