

## INTERACȚIUNI FARMACOCINETICE ȘI IMUNOLOGICE ALE SISTEMELOR TERAPEUTICE LIPOZOMALE

A. Neamțu<sup>1</sup>, C. Neamțu<sup>2</sup>, O. C. Mungiu<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Asist. drd. – Disciplina de Biofizică și Bioinstrumentație, Facultatea de Medicină Dentară, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Iași

<sup>2</sup> Prof. Dr. – Disciplina de Fiziologie, Facultatea de Medicină Dentară, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Iași

<sup>3</sup> Prof. Dr. – Disciplina de Farmacologie, Toxicologie și Algeziologie, Facultatea de Medicină, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Iași

### Cuvinte cheie

Lipozomi, Sisteme terapeutice lipozomale

Lipozomii au fost și sunt larg utilizați în cercetarea medicală fundamentală și în special în cea fizio-farmacologică. În plus, implicațiile în sfera farmacologiei depășesc cadrul cercetării pure, întrucât structurile lipozomale s-au validat în timp și continuă să evolueze ca Sisteme Terapeutice de succes pentru transportul și eliberarea controlată a diverselor substanțe active medicamentoase, în special din clasa chimioterapicelor. Din acest motiv o înțelegere cuprinzătoare a comportamentului lor în contact cu mediul intern al organismului este extrem de importantă. Parcurgerea literaturii din domeniu relevă o mare abundență de studii în acest sens, o parte chiar contradictorii, progresele înregistrate în ultimii 20 de ani fiind semnificative. Această situație impune unele sistematizări, utile în evaluarea sintetică a interacției lipozom-organism viu. În acest sens, scopul materialului prezentat este acela de a încerca succint o astfel de sistematizare care, având în vedere volumul enorm de date existente, este susceptibilă a suferi rafinări ulterioare.

### Abreviar:

LC – Lipozom convențional

LSS – Lipozom stabilizat steric

PEG – Polietilenglicol

SRE – Sistem Reticulo-Endotelial

GM<sub>1</sub> – Gangliozidul M<sub>1</sub>

PS – Fosfatitilserina

CAM – Complexul de atac membranar

Apo-LP – Apolipoproteine

### Keywords

Liposomes, Liposome Drug Delivery Systems

### Pharmacokinetical and Immunological Interactions of Liposomal Drug Delivery Systems

Liposomes are largely used in fundamental medical research and especially in physio-pharmacological one. They are often used as transporters for different types of substances including drugs. That is why a comprehensive understanding of their interaction within the body is extremely important. There is a great amount of experimental data in this respect in the field literature, few even contradictory. Because of this great diversity of data there is need for some systematization which will be useful in understanding the liposome biological interactions. This material tries succinctly to present such a synthetic view, which, because of the huge amount of data published in the last 20 years, will surely be subjected to refinements.

## Introducere

Lipozomul este o formulare reușită de protecție a medicamentelor în fața inactivării metabolice și non-metabolice. Totodată, transportul ansamblurilor macromoleculare prin peretele capilar fiind limitat, trecerea cu dificultate a lipozomilor prin endoteliul integru evită acumularea lor în țesuturile sănătoase (Working, 1994). Aceste două calități fac din structurile lipozomale o soluție deosebit de atractivă pentru realizarea unor Sisteme Terapeutice cu administrare sistemică.

Structura lipozomilor este comparabilă cu cea a unei membrane închise, care delimitează un spațiu interior apos utilizat pentru captarea diferitelor substanțe active medicamentoase (frecvent agenți chimioterapici) pentru terapie sau diagnostic.

Există în prezent, din punct de vedere al formulării și eficienței terapeutice două clase de lipozomi transportori de medicamente: lipozomi convenționali (LC) și lipozomi stabilizați steric (LSS), ultimii fiind protejați în fața reactivității imunologice. Lipozomii fac parte din Sistemele Terapeutice nanoparticulate și sunt folosiți ca sistem de eliberare controlată, lentă, pentru diverse substanțe active medicamentoase ce necesită prezența unui nivel de concentrație constant pentru o perioadă mai lungă de timp (de ex. o singură doză s.c. de morfină încapsulată în lipozomi menține o concentrație utilă sanguină timp de 6 zile) (Smith, 2003).

Cele două tipuri de lipozomi amintite mai sus diferă prin prezența polimerului de înveliș (adesea polietilenglicol - PEG) pe suprafața LSS și absența acestuia la LC. Acest înveliș asigură stabilizarea sterică a lipozomului care a fost gândită ca limitatoare a legării opsoninelor serice sau a interacțiunii directe cu celulele sistemului reticulo-endotelial (Allen, 1991), procese cu consecințe practice deosebit de importante asupra duratei de viață în circulație a lipozomilor.

### Factori care influențează comportamentul farmacocinetic al lipozomilor transportori de medicamente

Medicamentele administrate liber au în general o biodistribuție extinsă, asociată în același timp, cu o acumulare semnificativă în anumite țesuturi. Încapsulați în lipozomi însă, agenții activi se concentrează preferențial în zone cu microcirculație discontinuă (de ex. tumorile) sau în organe cu o abundentă populație macrofagică aparținând SRE (ficat-splină), evitându-se astfel acumularea lor în arii sensibile cum este de exemplu inima (evitarea

cardiotoxicității). În acest din urmă caz, lipozomii medicamentoși nu pătrund în fibrele musculare cardiace acumulându-se numai în vasele sanguine și fiind incapabili de extravazare (Seymour, 1992; Lum, 1994; Working, 1994). Dimpotrivă, în țesutul tumoral cu capilare larg fenestrate, acumularea lipozomilor încărcăți cu medicament este marcantă datorită extravazării și transcitozei (Huang, 1993; Jain, 1996); dar chiar și în acest țesut ei se plasează în spațiile interstițiale ce înconjoară celulele tumorale precum și în macrofagele din zonă, nefiind identificați intracelular.

Alegerea unei substanțe active în vederea înglobării ei într-un transportor lipozomal se face ținând cont de o serie de criterii: să prezinte capacitate de încărcare suficientă pe transportor, să prezinte compatibilitate cu transportorul, să fie transportată stabil și eficient în țesutul țintă etc. (Neamțu, 2005).

Lipozomii pot modifica atât distribuția tisulară cât și rata de clearance a medicamentului datorită preluării de către substanțele active medicamentoase a parametrilor farmacocinetici ai transportorului, parametri care sunt modulați și adaptați adecvat de către producătorul de medicamente. Indubitabil, parametrii farmacocinetici ai lipozomilor vor depinde de proprietățile fizico-chimice ale acestora (mărime, încărcarea electrică de suprafață, structura membranei lipidice, stabilizarea sterică), de doza de administrare și de calea de administrare (Allen, 1999).

Durata de viață a lipozomilor în circulație și țesuturi este unul din cei mai importanți parametri care sunt luați în considerare în evaluarea eficienței terapiei cu lipozomi și depinde la rândul ei de cinetica îndepărtării lor din fluxul sanguin (clearance) prin captare fagocitară/non-fagocitară sau metabolizare.

Cea mai importantă calitate a Sistemelor Terapeutice care utilizează materiale artificiale, o reprezintă capacitatea acestora de a evita răspunsul generat de organism în cadrul reacției de apărare față de substanțele străine introduse/implantate într-o formă sau alta în organism pe o perioadă variabilă (Caldwell, 1998).

Soarta biomaterialului care vine în contact cu sângele este dependentă în primul rând de compoziția și starea conformațională a filmului de proteine ce începe a se forma la contactul cu un astfel de material. Proteinele plasmei intră în coliziune frecventă cu suprafețele expuse ale biomaterialelor urmată de adsorbția lor în funcție de natura chimică

a suprafeței și de stabilitatea structurală și chimică a proteinelor (Wojciechowski, 1993).

Odată acumulat, învelișul de proteină care se formează la suprafața artificială, începe să fie „explorat” de celulele sanguine circulante al căror tip de reacție cu suprafața poate reflecta compoziția învelișului superficial artificial.

Dacă, spre exemplu, stratul de suprafață este bogat în molecule de imunoglobuline (Ig) ale căror reacții de adsorbție sunt legate de factorul complement  $C_3b$  generat pe căi alternative ale activării complementului (Janatova, 1991), atunci coliziunea cu macrofagele circulante poate duce la fagocitare (Caldwell, 1997).

Studiile făcute în vederea anihilării cascadei imuno-fiziologice care are drept consecință eliminarea prin fagocitare a structurilor străine (exogene) pătrunse în plasmă au vizat „îmbrăcarea” (grefarea) suprafețelor artificiale cu un înveliș care să le facă „invizibile” față de factorii plasmatici.

Primele încercări de limitare sau excludere a efectelor de „urmărire” și îndepărtare a lipozomilor din circulație au fost realizate de Nagaoka (1984) care a modificat suprafețele acestora prin atașarea covalentă de PEG, procedură ce s-a arătat eficace în ceea ce privește atât reducerea adsorbției de proteine cât și supresarea adeziunii trombocitelor.

Medicamentele eliberate din lipozomii convenționali (LC), comparativ cu cele care sunt eliberate din lipozomii protejați imunologic (LSS) cu PEG sau  $GM_1$ , se acumulează în cantitate aproape dublă în ficat și splină reflectând captarea mai rapidă a acestor lipozomi de către SRE (Huang, 1992). Totuși, agenții activi eliberați din lipozomii protejați pot avea uneori la rândul lor concentrații înalte în țesuturi sănătoase dar care nu le depășesc pe cele întâlnite în cazul lipozomilor convenționali. Acest fenomen se datorează cel mai probabil timpului lung de circulație a acestei clase de transportori. Astfel, sistemul reticulo-endotelial îndepărtează prin intervenția macrofagelor splenice și hepatice majoritatea lipozomilor convenționali din circulație în câteva minute sau zeci de minute (Papahadjopoulos, 1991); lipozomii stabiliți steric și deci „invizibili” față de proteinele serice au un timp de circulație de 5 ori mai lung decât cei LC (până la 15 h) (Allen, 1998).

În ceea ce privește mecanismele prin care se realizează clearance-ul lipozomal, Allen și colab. (1995) propun existența unei acțiuni combinat-sinergice a două sisteme de îndepărtare a acestora: (a) un sistem de captare cu afinitate înaltă pentru

lipozomi, dar cu capacitate de lucru redusă (cum este Sistemul Macrofagic și Sistemul Reticulo-Endotelial (SRE)) și (b) un sistem cu afinitate scăzută față de lipozomi, dar cu capacitate crescută de îndepărtare a acestora din circulație (cum este metabolismul lipidic).

### Mecanisme imunologice ale clearance-ului lipozomal

Interacțiunile LIPOZOM – CELULĂ având ca rezultat final decapsularea lipozomală, eliberarea medicamentului și îndepărtarea lipozomilor, se desfășoară întrucâtva diferit pentru condițiile *in vitro/in vivo* și de asemenea particularizat pentru lipozomii convenționali, cei protejați steric cu timp lung de circulație și lipozomii țintiți (imunolipozomi).

*In vitro*, lipozomii convenționali interacționează cu celulele fagocitare și non-fagocitare pe calea unor mecanisme variate și anume: adsorbția, endocitoza, fuziunea sau schimbul de lipide.

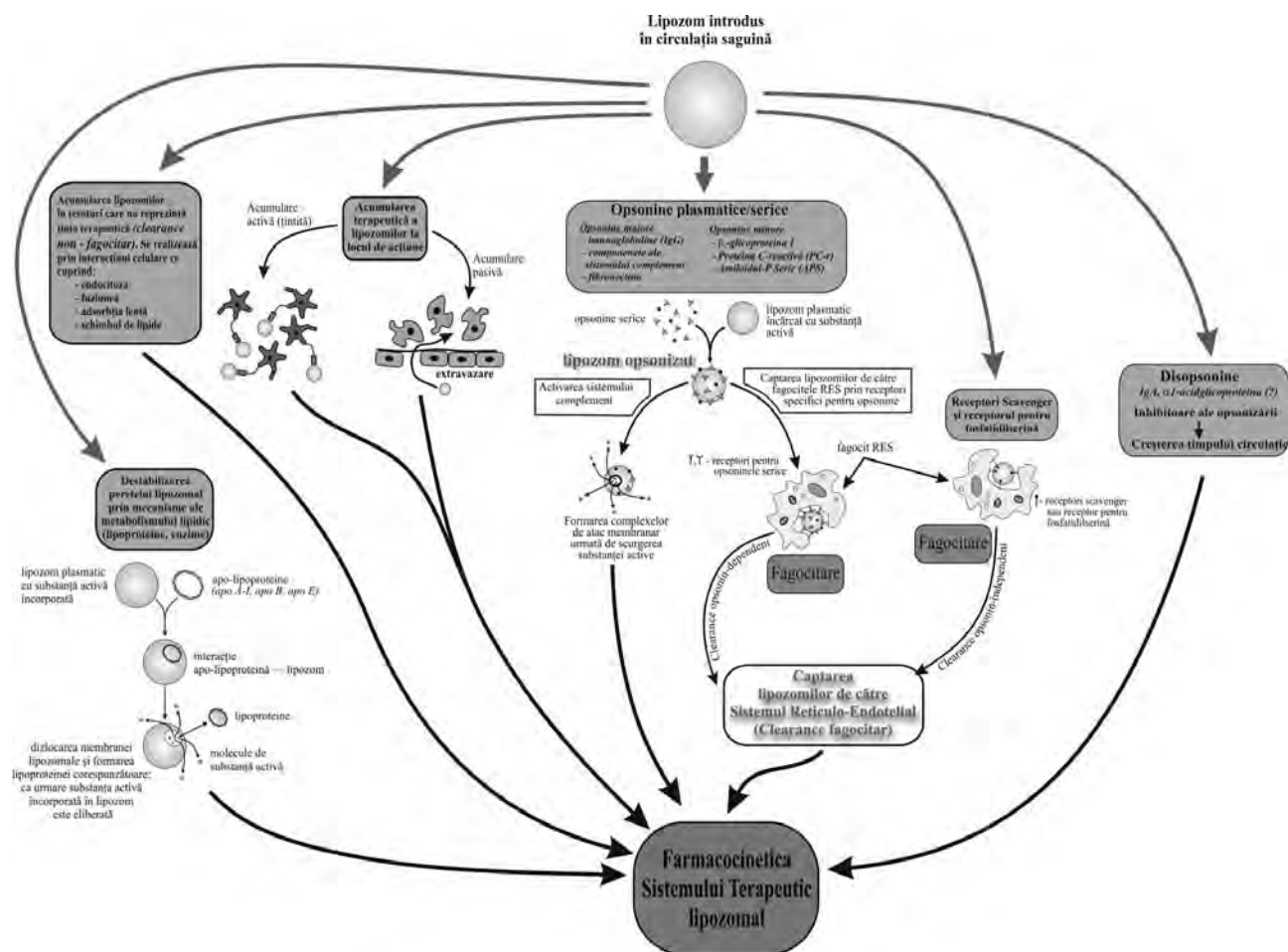
În aceste situații contactul direct lipozom – celulă este necesar, iar unele proprietăți fizice ale lipozomilor convenționali cum sunt suprafața, natura încărcării electrice și rigiditatea au o contribuție importantă (Margolis, 1984).

Mecanismul dominant al internalizării conținutului lipozomal îl reprezintă endocitoza (fagocitoza), chiar și în cazul celulelor nefagocitare. În cadrul interacțiunii celule fagocitare–lipozom, cele mai implicate celule fagocitare sunt macrofagele care acționează „profesional” ca celule captatoare în clearance-ul lipozomilor liberi sau încărcăți cu medicament, îndeosebi macrofagele hepatice (celulele Kupffer) (Fig. 1).

Ele internalizează prin intermediul receptorilor membranari lipozomii ce vor fi supuși apoi acțiunii sistemului fago-lipozomal macrofagic ducând la degradarea completă a lipidelor lipozomale și eliberarea în circulație sau țesuturi a conținutului încapsulat (Dijkstra, 1985).

Rezultate importante în acest sens au fost obținute *in vivo* (pe baza avidității macrofagelor pentru particulele lipozomale) cu agenți medicamentoși anti-Leishmanioză, precum și în terapia cu imunomodulatori (Phillips, 1991), înregistrându-se creșteri de aproximativ 100 de ori (!) a potențialului terapeutic al medicamentelor sus menționate.

Captarea lipozomilor este uneori precedată de un pas premergător și anume cel al recunoașterii și legării unui receptor fosfatidilserinic (PS-R) de



**Figura 1** Reprezentarea sintetică a mecanismelor farmacocinetice și imunologice ce au loc după administrarea în circulație a Sistemelor Terapeutice lipozomale. Farmacocinetica Sistemului Terapeutic lipozomal este rezultatul a trei mecanisme: captarea (opsonin-fagocitară și non-fagocitară), acumularea transportorilor lipozomali în țesuturi și metabolismul lipidic.

pe suprafața celulară fagocitară cu structuri lipozomale cum sunt fosfatidilserina (PS), dietilfosfatul, fosfatidil-glicerolul sau acidul fosfatidic. În plus, receptorii scavenger și macrosialinici par și ei a fi implicați în acest proces (Fraley, 1981; Lee, 1993).

Fosfatidilserina (PS) se dovedește a avea un rol pivotal în direcționarea celulelor (de ex. hematii de șoarece sau om) sau a veziculelor lipozomale spre macrofage, ea servind ca semnal recunoscut de celule imune (Savill, 1990).

Receptorii PS localizați pe macrofage recunosc specific PS și lipidele menționate mai sus de pe celulele senescente, apoptotice sau de pe lipozomi în vederea fagocitării și îndepărtării din circulație a acestora.

Importantă este și observația din literatură potrivit căreia, chiar dacă receptorii unor celule fagocitare sau ne-fagocitare au fost implicați cu certitudine în captarea lipozomilor *in vitro*, această certitudine nu trebuie extinsă întotdeauna la

clearance-ul *in vivo*, în sensul că obligatoriu aceeași receptori mediază și captarea lipozomilor circulanți (Scherphof, 1997).

Toate dovezile credibile atribuie macrofagelor hepatice și splenice (și într-o mică măsură și celor din măduva oaselor) precum și hepatocitelor, limfocitelor, fibroblastelor și diferitelor linii de celule tumorale, exprimarea maximă a capacității de a capta lipozomi (Huang, 1978; Kercret, 1983; Senior, 1987; Scherphof, 1998; Ishida, 2001). Opsonizarea prin proteine serice, cum sunt fragmentul Complement  $C_3b$ ,  $\beta_2$ -glicoproteina I și porțiunea  $F_c$  a IgG, pare a juca un rol esențial în recunoașterea și clearance-ul secundar al lipozomilor prin macrofage SRE (Devine, 1997).

Cu tot numărul impresionant de lucrări publicate și dedicate opsonizării, numai un număr limitat de proteine opsonizatoare au fost identificate având sigur această funcție, dintre care se disting: Imunoglobulinele (Metzger, 1991), Fibronectina

(Water, 1983), Sistemul Complement (cu rol major și dominant) (Ishida, 2000),  $\beta_2$ -glicoproteina (Chonn, 1995), Proteina C-reactivă (CRP) (Patel, 1992) și  $\alpha_2$ -macroglobulina (Murai, 1995).

Complementul poate totodată iniția formarea unor complexe de atac membranar la nivelul membranei lipozomale care declanșează liza acesteia, scurgerea medicamentului frecvent prea devreme și intensificarea captării de către populația fagocitară, periclitanând obiectivul terapeutic (Ishida, 2001).

Fagocitoza lipozomilor declanșată de opsonine este un proces inter-cooperativ, inițierea și rata acestuia depinzând de tipul și numărul opsoninelor participante. Opsoninele conțin cel puțin un sit recognoscibil de către receptorii specifici de pe suprafața fagocitelor și de asemenea câteva situri de cuplare la lipozom. Adsorbția opsoninelor pe lipozomi urmată de fagocitoză este în mod curent considerată ca mecanism primar de eliminare a lipozomilor din curentul sanguin, substratul mecanismului de îndepărtare *in vivo* și *in vitro*, inclusiv cel al captării hepato-splenice, reprezentându-l activarea Sistemului Complement dependentă de mărimea lipozomilor, conținutul crescut în colesterol a membranei acestora, încărcarea electrică, prezența glicolipidelor lipozomale, modul și gradul de participare a diferiților componenți și factori lipozomali, sunt aspecte care necesită încă eforturi importante de studiu pentru descifrare.

Există de asemenea și dovezi potrivit cărora activarea căii clasice a Complementului poate avea loc și în afara participării anticorpilor (Marjan, 1994), și de asemenea că activarea lipozomică a Complementului nu înseamnă în mod necesar și simultan implicarea opsonizării prin reacții Complement. Totuși, cele mai multe studii dovedesc participarea  $C_3$  sau  $C_3b$  ca factori cauzatori ai efectului opsoninic asupra lipozomilor urmată de clearance-ul acestora din sânge ca proces mediat macrofagic.

Întrebări interesante pun și *dis-opsoninele*, componente serice care dimpotrivă inhibă fagocitoza diferitelor particole străine pătrunse în sânge, implicit cele lipozomale. Dacă pentru microorganismele ce pătrund în circulație acest aspect este satisfăcut de disopsonine precum IgA sau  $\alpha_1$ -acidglicoproteina, pentru lipozomi astfel de agenți nu au fost încă identificați cu toate că se știe că în cazul lipozomilor mici (50-70nm) procesul de fagocitoză este inhibat pe această cale, inhibarea scăzând odată cu creșterea diametrului acestora.

În ceea ce privește clearance-ul imunolipozomilor trebuie subliniat că la început formulările

convenționale (nestabilizate steric) ale acestora pentru aplicațiile *in vivo* erau rapid îndepărtate din circulație atunci când anticorpii erau atașați direct la suprafața lor (Debbs, 1987), prin recunoașterea fragmentului Fc de către celulele macrofage (Maruyama, 1995). Parțial, problema a fost ameliorată odată cu atașarea anticorpilor la lipozomi pegilați, fie la suprafața bistratului lipidic, fie la capătul lanțurilor de PEG, timpul de circulație crescând la câteva ore (Allen, 1995).

### Mecanisme non-imunologice ale clearance-ului lipozomal

Un interes deosebit în ceea ce privește clearance-ul lipozomal îl dețin de asemenea lipoproteinele. Unii din receptorii pentru lipoproteine (LP) intervin în îndepărtarea lipozomilor din circulație, fapt nesurprinzător, întrucât se știe că lipoproteinele și receptorii lor sunt responsabili de transportul lipidelor și redistribuirea/procesarea colesterolului în organism. Există astfel categorii de apo-lipoproteine (apo-LP) cum sunt apo-B și apo-E care funcționează ca liganzi pentru îndepărtarea lipozomilor LP receptor – mediată din sânge (Scherpof, 1997).

Dintre receptorii pentru lipoproteine a fost identificat pe celulele Kupffer receptorul ScR-B tip I, o varietate de receptori din familia celor pentru lipoproteinele cu densitate înaltă (HDL-R) care pe lângă faptul că joacă un rol important în transferul și descărcarea colesterolului (preluat și transportat din țesuturi periferice de către HDL la ficat), leagă și lipozomii conținând fosfolipide anionice (Landschultz, 1996).

Interacțiunea dintre lipozomi și lipoproteinele cu densitate înaltă (HDL) favorizează eliberarea agenților încapsulați din lipozomi (Kirby, 1980) printr-un mecanism care implică atât transferul fosfolipidelor lipozomale din lipozom spre HDL, cât și penetrarea unei componente proteice din HDL (apo-A-I) în lipozom.

Destabilizarea structurală a lipozomilor în prezența apo-lipoproteinelor HDL (ALP-HDL) are loc atunci când există o masă critică a HDL (în special apo-A-I) rezultând structuri discoidale, formate din domenii de bistraturi lipidice încorporate de proteine domeniile amfipatice ale helixului apo-A-I fiind aliniată în jurul periferiei particulelor, paralel cu lanțurile acil ale fosfolipidelor.

Important este și faptul că lipozomii unilamelari mici sunt sensibili la diferențele presiunii osmotice de o parte și de alta a bistratului fosfolipidic, iar

când această diferență atinge un anumit nivel apare liza veziculară. HDL scad toleranța (rezistența la această diferență), efect de scădere comparabil cu cel dat de acțiunea plasmei integrale. Destabilizarea litică a bistratului lipidic este dată cu probabilitate de inserția moleculelor de apo-lipoproteină (de ex. apo-A-I) printre moleculele de fosfolipide.

Pe de altă parte, o varietate de lipoproteină serică cu densitate joasă (LDL) și anume apo-lipoproteina B se poate cupla la lipozomi ca ligand pentru receptorul LDL (LDLr) (Klimov, 1983). S-a demonstrat de asemenea că încorporarea apo-lipoproteinei B în lipozomi colesterolo-fosfolipidici (raport 1:2) induce captarea receptor-mediată specifică a acestor lipozomi de către linii celulare *in vitro* (Lundberg, 1993)

Au apărut dovezi convingătoare că apo-lipoproteina E predominant hepatică joacă un important rol opsonic în eliminarea din sânge a lipozomilor mici neutri formulați din fosfatidilcolină/colesterol (PC/Col). Astfel de lipozomi adsorb puternic apo-lipoproteina E în condiții de incubare în plasmă, ceea ce conduce la captarea lor, proces mediat de receptorul LDL-R sau HDL-R și urmat de internalizare sau respectiv hidroliză și apoi captarea constituenților bistratului lipidic lipozomal (Scherpof, 1997)

Lipozomii cu o compoziție crescută în colesterol pot fuziona fie cu LDL umane (Zacharova, 1993), fie cu LDL acetilate (Mc Closkey, 1987). De asemenea o rată înaltă a colesterolului în raportul colesterol/fosfolipide lipozomale favorizează fuziunea cu LDL, dar inhibă interacțiunea cu HDL și apo-lipoproteinele aferente de schimb din clasele A, C, E.

Studii moleculare detaliate au explicat condițiile care facilitează interacțiunea cu apo-lipoprotele; de ex. apo-A-I umană are opt domenii helicoidale separate prin zone conținând prolină, astfel că molecula este flexibilă și permite domeniilor helix amfipatice să se insereze cu ușurință la interfața apă-fosfolipide și să realizeze legătura cu lipozomul (Shih, 2006).

## Concluzii

Principalele avantaje ale eliberării medicamentelor din vehiculele lipozomale sunt: timpul lung de circulație al acestora, parametru ce favorizează eliberarea lentă a agentului activ și acumularea lui în ariile vizate terapeutic, precum și toxicitatea redusă în comparație cu medicamentele administrate liber, calități obținute prin încapsularea agentului activ.

Terapia cu lipozomi reprezintă pentru viitor

o cale plină de speranțe în utilizarea Sistemelor Terapeutice, mai ales pentru tratamentul anti-tumoral. Lipozomii medicamentoși au fost asemănați întrucâtva în terapia anticanceroasă cu atât de mult doritul „glonț magic”, dat fiind capacitatea lor crescută de acumulare selectivă în tumori (Oyama, 2004). Problema este însă că nu toate cancerurile și nu toți pacienții răspund încă la acest „glonț”.

La direcțiile probabile, necesare și posibile de evoluții ale cercetărilor legate de îmbunătățirea condițiilor farmacocinetice și imunologice discutate a Sistemelor Terapeutice lipozomale, se mai adaugă noi strategii ce țin de viitor, precum: perfecționarea tehnicilor de atașare-ancorare a liganzilor lipozomali, a diversilor markeri, legarea de lipidele lipozomale a moleculelor mici (fragmente de anticorpi, vitamine, aminoacizi, oligopeptide), găsirea de metode și tehnici noi pentru legarea directă a lipidelor sau proteinelor conjugate (fără intermediari) la sistemul lipozomal țintit în vederea atât a simplificării tehnicilor de formulare lipozomale cât și a unei acțiuni mai rapide și directe a agentului medicamentos eliberat continuu (cum este cazul declanșării eliberării medicamentului imediat după cuplarea complexului lipozomal la celulele endoteliale ale vaselor sanguine).

## Bibliografie

1. Allen TM, Stuart DD – **Liposome pharmacokinetics. Classical, sterically-stabilized, cationic liposomes and immunoliposomes – Rational Design** (Janoff A.S. ed ), pp 63-87, Marcel Dekker, Inc, New York, 1999
2. Allen TM, Hansen CB, Lopes de Menezes DE – **Pharmacokinetics of long-circulating liposomes – Adv. Drug Del. Rev.**, 16, 267-284, 1995
3. Allen TM, Hansen C – **Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: Effect of dose – Biochim. Biophys. Acta**, 1068, 133-141, 1991
4. Allen TM – **Liposomal drug formulations. Rationale for development and what we can expect in the future – Drugs**, 56, 747-756, 1998
5. Caldwell KD – **Interactions between Blood Components and Artificial surfaces, Targeting of Drugs 6: Strategies for Stealth Therapeutic Systems**, Edit Gregoriadis and Mc Cormack, Plenum Press, New York, pg. 1-13, 1998
6. Caldwell KD – **Material surface interactions with blood components – Targeting of Drugs: Strategies for Stealth Therapeutic Systems, Symp.**, Cape Sounion Beach, Greece, 24 June-5 July, 1997
7. Chonn A, Semple SC, Cullis P –  **$\beta$ 2-Glycoprotein I is a major protein associated with very rapidly cleared liposomes in vivo, suggesting a significant role in the immune clearance of “non-self” particles – J. Biol. Chem.**, 270, 25845-25849, 1995
8. Debs RJ, Heath TD, Papahadjopoulos D, - *Biochim.*

*Biophys. Acta*, 901:183-190, 1987

9. Devine DV – The role of immunoproteins in the survival of liposomes in the circulation, *CRC Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 14, 105-131, 1997

10. Dijkstra J, van Galen M, Scherphof G – Influence of liposome charge on the association of liposomes with Kupffer cells in vitro. Effects of divalent cations and competition with latex particles, *Biochim. Biophys. Acta*, 813:287-297, 1985

11. Fraley R et al – Liposome-mediated delivery of deoxyribonucleic acid to cells: enhanced efficiency of delivery related to lipid composition and incubation conditions, *Biochemistry*, 20:6978-69887, 1981

12. Huang L, Ozato K., Pagano R.E. – *Membr. Biochem.*, 1:1-25, 1978

13. Huang SK, Mayhew E, Gilani S, Lasic DD, Martin FJ, Papahadjopoulos D – Pharmacokinetics and therapeutics of sterically stabilized liposomes in mice bearing C-26 colon carcinoma – *Cancer Res.*, 52, 6774-6781, 1992

14. Huang SK, Martin FJ, Jay G, Vogel J, Papahadjopoulos D, Friend DS – Extravasation and transcytosis of liposomes in Kaposi's sarcoma-like dermal lesions of transgenic mice bearing the HIV Tat gene – *Am. J. Pathol.*, 143, 10-14, 1993

15. Ishida T, Harashima H, Kiwada H – Interactions of Liposomes with Cells *In Vitro* and *In Vivo*: Opsonins and Receptors, *Curr. Drug Metabolism*, 2:397-409, 2001

16. Ishida T, Kojima H, Harashima H, Kiwada H – *Int. J. Pharm.*, 205:183-193, 2000

17. Jain RK – Delivery of molecular medicine to solid tumors – *Science (Wash DC)*, 271, 1079-1080, 1996

18. Janatova J, Cheung AK, Parker CJ – Biomedical polymers differ in their capacity to activate complement – *Complement Inflamm.*, 8, 61, 1991

19. Kercret H, Chiovetti JR, Foundatin MW, Segrest JP, - *Biophys. Biochim. Acta*, 733:65-74, 1983

20. Kirby C, Clarke J, Gregoriadis G – Cholesterol content of small unilamellar liposomes controls phospholipid loss to high density lipoproteins in the presence of serum – *FEBS Lett.*, 111, 324, 1980

21. Klimov AN, Korovkin BF, Kuznetsov AS, Popov IN – Apolipoprotein B of plasma lipoproteins incorporated in liposomes: Immunological properties and organ distribution when administered to rabbits, *Biull. Eksp. Biol. Med.*, 96:47-50, 1983

22. Landschultz KT, Pathak RK, Riggotti A, Krieger M, Hobbs HH – Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat, *J. Clin. Invest.*, 98:984-995, 1996

23. Lee K, Nir S, Papahadjopoulos D – Quantitative analysis of liposome-cell interactions in vitro: Rate constants of binding and endocytosis with suspension and adherent J774 cells and human monocytes, *Biochemistry*, 32, 889-899, 1993

24. Lum H, Malik AB – Regulation of vascular endothelial barrier function – *Am. J. Physiol.*, 267, L223-L241, 1994

25. Lundberg B, Hong K, Papahadjopoulos D - Conjugation of apolipoprotein B with liposomes and targeting to

cells in culture, *Biochim. Biophys. Acta* 1149, 305-312, 1993

26. Margolis L B, Cell interaction with model membranes: Probing, modification and simulation of cell surface functions, *Biochim. Biophys. Acta* 779, 161-189, 1984.

27. Marjan J, Xie Z, Devine DV, Liposome-induced activation of the classical complement pathway does not require immunoglobulin, *Biochim. Biophys. Acta* 1192, 35-44, 1994

28. Maruyama K, Takizawa T, Yuda T, Kennel SJ, Huang L, Iwatsuru M – Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipatic poly(ethylene glycol)s conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies – *Biochim. Biophys. Acta*, 1234, 74, 1995

29. McCloskey HM, Rothblat GH, Glick JM – Incubation of acetylated low-density lipoprotein with cholesterol-rich dispersions enhances cholesterol uptake by macrophages, *Biochim. Biophys. Acta*, 921, 320-332, 1987

30. Metzger H – *Curr. Opin. Immunol.*, 3:40-46, 1991

31. Murai M, Aramaki Y, Tsuchiya S - Identification of the serum factor required for liposome-primed activation of mouse peritoneal macrophages. Modified alpha2-macroglobulin enhances Fc receptor-mediated phagocytosis of opsonized sheep red blood cells, *Immunology* 86, 64-70, 1995

32. Nagaoka S, Mori Y, Takiuchi H, Yokota K, Tanzawa H, Nishiumi S – Interaction between blood components and hydrogels with poly(oxyethylene) chains – *Polymers and Biomaterials*, S.W. Shalaby, A.S. Hoffman, B.D. Ratner, and T.A. Horbett, eds. Plenum, New York, 1984

33. Neamtu A, Mungiu OC, Monica Neamtu – *Sisteme Terapeutice și Biomateriale: de la concepere la utilizare*, Ed. "Gr. T. Popa" Iași, 2005

34. Oyama M, Heston WD, Nishiyama T, Horiguchi Y, Nakajima Y, Novick AC, Murai M, Larchian WA – Experimental and molecular Therapeutics 33: Gene Therapy II: Intravesical liposome-mediated interleukin-2 gene therapy plus BCG in an orthotopic murine bladder cancer model, *AACR Meeting Abstracts*, pp. 870, 2004

35. Papahadjopoulos D, Allen TM, Gabizon A, Mayhew E, Mattay K, Huang SK, Lee K-D, Woodle MC, Lasic DD, Redemann C, Martin FJ – Sterically stabilized liposomes: Improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 11460-11464, 1991

36. Patel HM – Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 9:39-90, 1992

37. Phillips N C, Tsao M-S - Liposomal muramyl dipeptide therapy of experimental M5076 liver metastases in mice, *Cancer Immunol. Immunother.* 33, 85-90, 1991

38. Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C – Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis, *Nature*, 343, 170-173, 1990

39. Scherphof GL, Kamps AAM – Receptor versus non-receptor mediated clearance of liposomes, *Adv. Drug. Delivery Rev.*, 32:81-97, 1998

40. Scherphof GL, Velinova M, Kamps J, Donga J, van der Want J, Kuipers F, Havekes L, Daemen R – Modulation of pharmacokinetic behavior of liposomes, *Adv. Drug. Deliv.*

*Rev.*, 24:179-191, 1997

41. Senior JH – Fate and behaviour of liposomes *in vivo*; A review of controlling factors - *CRC Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 3, 123-193, 1987

42. Seymour LW - Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates – *CRC Crit. Rev. Ther Drug Carrier Syst.*, 9, 135-187,1992

43. Shih AY, Arkhipov A, Freddolino PL, Schulten K – Coarse Grained Protein-Lipid Model with Application to Lipoprotein Particles, *J. Phys. Chem. B*, 110:3674-3684, 2006

44. Smith LJ, Krugner-Higby L, Clark M, Wendland A, Heath TD – A Single Dose of Liposome-Encapsulated Oxymorphone or Morphine Provides Long-term Analgesia in an Animal Model of Neuropathic Pain, *Comparative Medicine*, 53:71-78, 2003

45. Water LDV, Destree AT, Hynes RO – *Science*, 220:201-204, 1983

46. Wojciechowski PW, Brash JL – Fibrinogen and albumin adsorption from human blood plasma and from buffer onto chemically functionalized silica substrates – *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1: 107, 1993

47. Working PK, Newman MS, Huang SK, Mayhew E, Vaage J, Lasic DD – Pharmacokinetics, biodistribution, and therapeutic efficacy of doxorubicin encapsulated in Stealth<sup>®</sup> liposomes (Doxil<sup>®</sup>) – *J. Liposome. Res.*, 4, 667-687, 1994

48. Zacharova TS, Ivanov AS, Echkalov AP, Beriozov AT, Khalilov EM, Archakov AI – Interaction of cholesterol containing liposomes with blood serum lipoproteins, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 31, 315-324, 1993