

Aspectos Biofarmacéuticos de Liposomas administrados por Vía Parenteral

Fabiana LAIRION, Pedro DI ROCCO y Marcelo NACUCCHIO*

*Cátedra de Farmacotecnia I, Dpto. Tecnología Farmacéutica
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires
Junín 956, (1113), Capital Federal, República Argentina*

RESUMEN. La administración parenteral de drogas en el hombre es, de hecho, la ruta más investigada y no sólo involucra la ruta intravenosa, sino también la vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intraarticular, intraarterial, etc., siendo la administración intravenosa de liposomas una de las principales rutas de administración de dicho sistema terapéutico. El empleo de sistemas terapéuticos para lograr la administración selectiva y controlada de drogas por vía parenteral es sujeto de constantes investigaciones en la actualidad. Dentro de dichos sistemas, los liposomas han demostrado poseer una versatilidad inusual. En la presente actualización se revisa en forma crítica los parámetros que inciden significativamente en el éxito terapéutico de los liposomas administrados en forma sistémica.

SUMMARY. "Biopharmaceutical Aspects of Liposomes administered through parenteral way". Liposomal drug intravenous delivery will be reviewed, under a biopharmaceutical and technological viewpoint. Pharmaceutical manufacturing, delivery, *in vitro* e *in vivo* data, as well clinical applications will be discussed of this versatile drug delivery system.

INTRODUCCION

En los últimos años se ha observado, en la Industria Farmacéutica, un gran esfuerzo dirigido hacia el desarrollo de diferentes estrategias que permitan, en mayor o menor grado, una optimización de la acción de los medicamentos, compensando la escasa aparición de nuevas drogas debido, quizás, a los altos costos y elevados tiempos que insume la investigación para el desarrollo y síntesis de nuevos agentes terapéuticos. En este aspecto, el avance logrado en tecnología farmacéutica ha conducido al desarrollo de nuevas formas farmacéuticas de las drogas ya conocidas, con el objeto de mejorar distintos parámetros, tales como la farmacocinética, disminución de la toxicidad, accesibilidad al blanco terapéutico, etc.

Dentro de estas nuevas formas farmacéuticas se encuentran los sistemas transportadores de drogas, capaces de vehiculizar moléculas farmacológicamente activas mediante una administración selectiva y/o controlada de las mismas. Se

PALABRAS CLAVE: Liposomas. Vía parenteral.

KEY WORDS: Liposomes. Parenteral delivery.

* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia

han propuesto diversos sistemas farmacéuticos macromoleculares o particulados, aunque solo algunos han subsistido como potenciales transportadores de moléculas con actividad biológica, tal el caso de los *liposomas*.

ADMINISTRACION DE LIPOSOMAS COMO SISTEMA TRANSPORTADOR DE DROGAS

El primer reporte de la administración clínica de liposomas data de mediados de la década del '70, cuando los liposomas fueron administrados al hombre para mejorar la efectividad de la terapia de reemplazo enzimático¹⁻⁵. En la misma época, fueron estudiados para la localización por imágenes de tumores⁶⁻⁸. Luego distintos investigadores ingresaron en el campo de la quimioterapia, siendo la función de los mismos cambiar la biodistribución de los citostáticos o solubilizar aquellas drogas poco solubles en agua⁹⁻¹³. Más recientemente, los liposomas han demostrado resultados promisorios en el tratamiento de micosis sistémicas, particularmente vigentes ante el crecimiento de enfermedades que comprometen el sistema inmunológico, como cáncer, sida y otras¹⁴⁻⁷.

Estos sistemas farmacéuticos son diseñados con el fin de lograr distintos objetivos, entre ellos se destacan, por ejemplo: i) proteger a las drogas de un medio ambiente biológico desfavorable; ii) proveer una liberación prolongada o controlada en el tiempo; iii) en algunos casos, el objetivo es lograr un sistema transportador de drogas que pueda actuar como depósito y permanecer en el sitio de la inyección por períodos prolongados de tiempo.

Pero quizás, el aspecto más abordado en los últimos tiempos, es la posibilidad de direccionarlos selectivamente a determinados sitios del organismo que constituyen el blanco terapéutico, es decir, obtener no sólo una administración *controlada* sino también *selectiva* de fármacos.

Esta posibilidad de dirigir los liposomas hacia un blanco específico en términos sajones se denomina "*targeting*", siendo su adaptación al castellano el término "*direccionamiento*". Muy brevemente, podemos distinguir entre un *direccionamiento pasivo* y uno *activo*¹⁸⁻³⁰, pudiendo ser ambos explotados terapéuticamente, pero siendo las demandas técnicas de ambos considerablemente diferentes:

* El *direccionamiento pasivo* ocurre cuando una droga o *carrier*, en este caso liposomas, se distribuye por sí mismo por un patrón natural al ser introducidos en el organismo. Vale como ejemplo la rápida concentración de partículas menores a 1 μm en el hígado o bazo luego de una administración intravenosa de las mismas, lo cual se debe a la función normal del sistema retículo endotelial (SRE). En caso que las partículas inyectadas por vía i.v. sean mayores que 5-7 μm , las mismas serán físicamente atrapadas en los capilares del pulmón, logrando de este modo un *targeting* pasivo en pulmón.

* El *direccionamiento activo* intenta alterar dicha localización natural con el fin de dirigir a los liposomas a células, tejidos u órganos específicos. Por ejemplo: puede ser *físico* (como es el caso de los liposomas pH-sensibles o temperatura-sensibles), o puede ser *químico* (mediante la estrategia de pegar a las vesículas ligandos específicos que reconozcan determinantes moleculares o macromoleculares de la superficie de la célula blanco).

De esta brevísima síntesis se desprende de manera evidente que la elección de liposomas como sistema terapéutico dirigido específicamente hacia los órganos

del SRE es muy efectiva, ya que se aprovecha su localización natural y, de hecho, muy importante dada la cantidad de enfermedades que se localizan en estos órganos, como veremos más adelante. Pero esto no le quita mérito, aunque sea más difícil desde el punto de vista tecnológico, al direccionamiento activo de los mismos para tratar patologías que se ubiquen fuera del SRE, siempre y cuando se siga avanzando en las investigaciones y se optimicen los sistemas droga-liposoma mediante un diseño racional que permita adecuar las formulaciones a los distintos requerimientos terapéuticos.

BARRERAS ANATOMO-FISIOLOGICAS A LA ADMINISTRACION SELECTIVA DE DROGAS POR LIPOSOMAS

La administración parenteral de drogas en el hombre es, de hecho, la ruta más investigada y no solo involucra la ruta intravenosa, sino también la vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intraarticular, intraarterial, etc., siendo la administración intravenosa de liposomas una de las principales rutas de administración de dicho sistema terapéutico ³¹⁻⁶.

El direccionamiento exitoso de liposomas administrados en forma sistémica a cualquier célula que resida en una ubicación extravascular requerirá que los mismos sean capaces de escapar de la circulación en forma previa.

Existen una multitud de barreras fisiológicas ubicadas entre un complejo droga-carrier en la circulación (u otro compartimiento del organismo) y el blanco final de la droga en un tejido o célula ³⁷⁻⁴². Entre ellas se destacan las siguientes:

i) *Barrera endotelial*: como es conocido, el lumen de los vasos está delimitado por una capa de células endoteliales que sirven de separación entre los compartimientos vascular y extravascular, regulando el flujo de moléculas (especialmente macromoléculas) entre estos compartimientos.

ii) *Barrera de la lámina basal*: en todos los capilares con excepción de los del hígado, bazo y médula ósea, el endotelio está sostenido por una capa de material fibrilar denso que se llama lámina basal o membrana basal, de naturaleza altamente insoluble cuyo principal componente es el colágeno de tipo IV organizado en microfibrillas, conteniendo además una proteína de alto peso molecular llamada laminina que promueve la adhesión celular, así como diversos tipos de proteoglicanos; ésta tiene la habilidad de actuar como un ultrafiltro de macromoléculas y estructuras macromoleculares.

En base a estas barreras, se pueden diferenciar tres tipos de capilares (Fig.1): 1) *Capilares continuos* (en la mayoría de los tejidos tales como músculo, SNC y pulmón), donde las células lindan muy cercanas unas a otras y están unidas principalmente por uniones fuertemente oclusivas y también una membrana basal continua de entre 200-500 Å; 2) *Capilares fenestrados* (glándulas endócrinas, glomérulo renal y mucosa intestinal), presentan una capa celular muy delgada que es penetrada por aberturas circulares transcelulares (fenestraciones) de alrededor de 600-800 Å; de todas maneras, con excepción del glomérulo renal, los fenestrados no representan aberturas simples y están frenadas por un diafragma delgado (40-60 Å) con una membrana basal continua; y, 3) *Capilares discontinuos o sinuosotadales* (hígado, bazo y médula ósea), donde el endotelio y la membrana basal subyacente presentan brechas de hasta miles de Å en diámetro, y en la mayoría de las

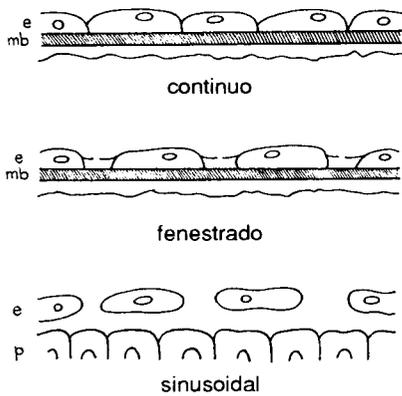


Figura 1. Esquema de la estructura de las diferentes clases de capilares sanguneos: continuos, fenestrados y sinusoidales (e: endotelio; mb: membrana basal; p: par3nquima).

especies, la membrana basal es inexistente en el h3gado. Evidentemente, 3ste es el 3nico tipo de capilares que permite el paso de liposomas (en funci3n del tama3o) a trav3s de los mismos.

A pesar de esto, se ha demostrado la acumulaci3n de liposomas en sitios de infecci3n e inflamaci3n, posiblemente transportados por un intermediario celular (ej. c3lulas involucradas en la respuesta inflamatoria) o por escape a trav3s de lechos capilares da3ados. Lo mismo se ha observado en tumores y en casos de infarto de miocardio, estando involucrado tambi3n, al menos en parte, el proceso de escape por vasculaturas incompletas o da3adas ⁴³⁻⁵.

iii) *Barrera Ret3culoendotelial:* para que un complejo droga-carrier pueda acceder satisfactoriamente a un blanco extravascular, este no s3lo debe ser capaz de escapar de la circulaci3n, pasando las barreras anteriores, sino que debe adem3s ser capaz de escapar del alcance del SRE, el mecanismo de defensa del cual dispone el organismo para part3culas extra3as y macrom3lculas. El SRE comprende un set de c3lulas fagoc3ticas mononucleares, que se originan de precursores en la m3dula 3sea y desarrollan una variedad de funciones, siendo una de sus funciones m3s simple la captaci3n de part3culas extra3as y macrom3lculas; las c3lulas m3s involucradas con esta funci3n son las c3lulas de Kupffer del h3gado y los macr3fagos del bazo. Una variedad de part3culas extra3as incluyendo liposomas, microesferas y otros coloides son tomados r3pidamente por los macr3fagos de h3gado y bazo *in vivo* y en menor grado por n3dulos linf3ticos, m3dula y pulm3n ⁴⁶. Los macr3fagos captan, adem3s de part3culas, ciertas prote3nas cuando son capaces de interactuar con receptores de la superficie del macr3fago. El complejo prote3na-receptor es internalizado en una estructura vesicular que luego se fusiona con lisosomas; la prote3na es luego degradada mientras que el receptor puede reubicarse sobre la superficie. Este sistema de internalizaci3n de los macr3fagos es extremadamente activo. Adem3s de capturar prote3nas solubles, este receptor puede tambi3n mediar en la captura de sistemas particulados. Por lo tanto cubriendo una part3cula con prote3nas capaces de interactuar con los receptores de superficie de los macr3fagos (proceso llamado *opsonizaci3n*) puede aumentarse enormemente la captura de las mismas ⁴⁶⁻⁸.

iv) *Barreras celulares:* Obviamente, y aunque no entraremos en detalles, cuando el blanco terap3utico est3 ubicado dentro de una c3lula en particular, los liposomas se encontraran con la *barrera celular*, que podr3n o no sortear mediante distintos procesos de interacci3n c3lula-liposoma que son esquematizados en la Fig. 2. Los mecanismos mediante los cuales los liposomas pueden interactuar con las c3lulas son: *adsorci3n* (a la superficie celular, ya sea no espec3fica o mediada por ligandos), *endocitosis*, *intercambio lip3dico* (entre la monocapa externa

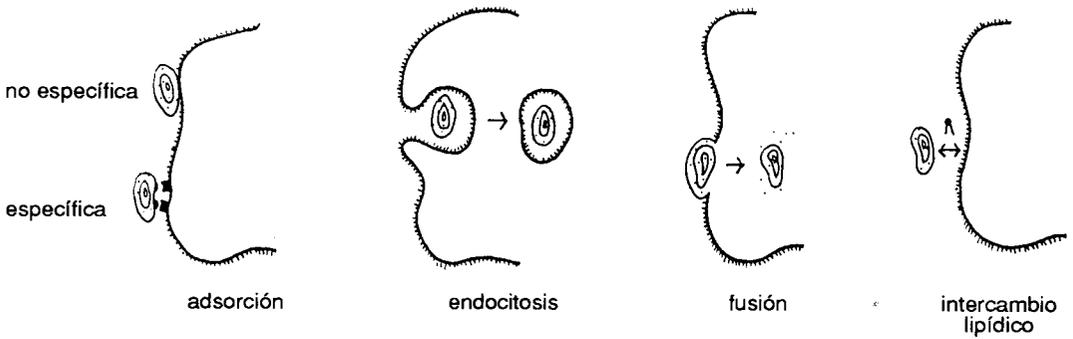


Figura 2. Posibles mecanismos de interacción entre liposomas y células.

del liposoma y la célula, sin asociación directa de ambas entidades) ó *fusión* (de la bicapa externa del liposoma y la membrana plasmática de la célula) 37,49-54.

ADMINISTRACION PARENTERAL DE LIPOSOMAS

Vía intravenosa

Consideraciones generales

Diversos factores afectan la estructura e integridad de los liposomas en circulación. Por ejemplo, la activación del complemento puede llevar a la destrucción de los mismos, probablemente debido a la capacidad de dichos factores de unirse a fosfolípidos; las HDL, albúmina sérica, las α y β globulinas y anticuerpos antifosfolípidos pueden interactuar con los liposomas y afectar considerablemente su estabilidad 55-8.

El colesterol presente en la composición de estas vesículas puede ser transferido a lipoproteínas de alta y baja densidad, afectando la estabilidad de las mismas; por otro lado, el hecho que los liposomas, constituidos por un análogo dialquilado de la fosfatidilcolina, circulen por tiempos prolongados indica que las fosfolipasas circulantes pueden llevar también a la lisis de los liposomas en el plasma 59.

El problema de pérdida masiva de droga por los liposomas cuando se ponen en contacto con la sangre fue resuelta en parte luego de entender cual era el rol desempeñado por las HDL en la desestabilización de los liposomas. Se postuló que aumentando el colesterol en la bicapa, o, de manera similar, incorporando esfingomiélna, o incluyendo fosfolípidos de alta temperatura de transición se podría prevenir la remoción de los fosfolípidos por parte de las HDL y disminuir la pérdida de la droga 60-2. La manipulación de los fosfolípidos en la composición liposomal puede llevar a reducir o bien anular la incorporación de fosfolípidos por las HDL. Un experimento realizado por Senior y Gregoriadis 63,64 muestra la desestabilización de los liposomas por las HDL y la influencia del colesterol, trabajando con ratones a los que les depletaron las lipoproteínas por inyecciones repetidas de 4-amino-pirazolo-(3,4-d)pirimidina. Los resultados obtenidos demostraron que los liposomas (que no contenían colesterol) eran degradados mucho mas lentamente que aquellos inyectados en ratones no tratados (lipoproteínas normales), postulándose que la remoción de los fosfolípidos por parte de las HDL produce poros en la bicapa lipídica a través de los cuales las sustancias encapsuladas pueden ser liberadas al medio.

Resumiendo, es posible incrementar la estabilidad de los liposomas *in vivo* y reducir la p3rdida de la droga encapsulada por alguno de los siguientes mecanismos generales: incorporando colesterol, introduciendo esfingomielina que forma puentes intermoleculares con otros fosfol3pidos o gangli3sidos, seleccionando fosfol3pidos con una fase de transici3n alta (respecto a la temperatura fisiol3gica) y otras estrategias moleculares.

Dado que la desaparici3n de los liposomas de la circulaci3n implica que ellos son retenidos por varios 3rganos, es de esperar que su distribuci3n tisular *in vivo* sea funci3n de su composici3n lip3dica, su tama1o, su carga, la interacci3n con prote3nas ex3genas o end3genas y la v3a de administraci3n utilizada.

Considerando estos diferentes par3metros se observa que los liposomas circulantes se concentran fundamentalmente en tejidos ricos en c3lulas del sistema ret3culo endotelial, como el h3gado y bazo y en menor grado en el pulm3n, m3dula 3sea y ri1on ^{32,65-8}.

El rol dominante del h3gado en la eliminaci3n de los liposomas ha llevado a estudiar la contribuci3n de las diferentes c3lulas de 3ste 3rgano, observ3ndose que despu3s de una admnistraci3n intravenosa los liposomas se acumulan r3pidamente en la fracci3n de las c3lulas sinusoidales del h3gado, m3s espec3ficamente en las c3lulas de Kupffer, aunque es dependiente del tama1o del liposoma, por ejemplo con experimentos realizados con SUV marcados, se ha encontrado marca tanto en las c3lulas de Kupffer as3 como tambi3n en los hepatocitos en forma significativa aunque en menor cantidad que en las anteriores ⁶⁹⁻⁷¹.

Aunque el h3gado es el principal 3rgano de eliminaci3n de liposomas de la circulaci3n, la carga y el tama1o afectan la orientaci3n a trav3s de otros 3rganos. La acumulaci3n en bazo de MLV es mayor con liposomas cargados negativamente, al igual que en m3dula 3sea; por el contrario se observa una situaci3n inversa en el cerebro y pulm3n. La presencia de cargas positivas o negativas no tiene influencia sobre la retenci3n por parte del h3gado, aunque se observ3 que los liposomas neutros son incorporados preferentemente a los i3nicos.

Factores que influyen en la farmacocin3tica de los liposomas in vivo

Tama1o

El patr3n de eliminaci3n de liposomas es altamente dependiente del tama1o de los mismos. Los tiempos reportados para el clearance de diversos tipos liposomales van desde minutos a m3s de un d3a. Las ves3culas grandes (di3metro= varios micrones) compuestas por fosfatidilcolina y colesterol son eliminadas de la circulaci3n mucho m3s r3pidamente que los liposomas peque1os unilamelares (di3metro = 3-500 Å) (fig. 3a). La observaci3n de una eliminaci3n bif3sica (m3s r3pida en una primera etapa y m3s lenta en la segunda), puede reflejar una heterogeneidad en el tama1o; con poblaciones homog3neas de SUV (ves3culas unilamelares peque1as), la desaparici3n de sangre es exponencial ^{62, 72-5}.

Carga

Se ha observado para MLV (ves3culas multilamelares grandes), que la presencia de cargas negativas en su composici3n hace que sean eliminados mucho m3s

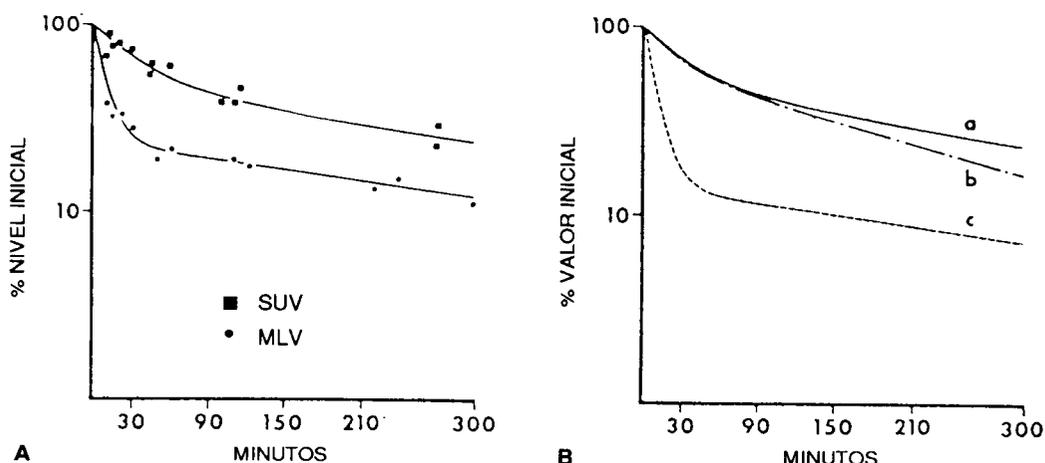


Figura 3. A. Eliminación de liposomas en función del tamaño de partícula. Liposomas SUV o MLV compuestos por fosfatidilcolina (Pc) y colesterol (Col), marcados con ^3H fueron inyectados en ratas y se midieron los niveles plasmáticos de ^3H ; los datos representan los promedios de 3-4 animales. B. Eliminación de liposomas en función de la carga. Se evaluaron liposomas SUV marcados con las siguientes composiciones: a) Pc:Col (2:1) (neutros); b) Pc:SA:col. (18:2:10) (positivos); c) Pc:PS:Col (1:1:1) (negativos); los datos representan promedios de 3-4 animales (Fuente: ref. 75).

rápidamente que aquellos que cargados positivamente, teniendo los liposomas neutros un rango de eliminación intermedio. Resultados similares fueron obtenidos con SUV, salvo que los liposomas neutros se asemejan a la eliminación de los cargados positivamente (fig. 3b) ^{62,72,73,75}.

La rápida eliminación de los liposomas cargados negativamente puede reflejar una agregación de los liposomas inyectados. Por otro lado, diversos análisis han demostrado que los liposomas interactúan con ciertos componentes del plasma ($\alpha 2$ -macroglobulina en hombres o $\alpha 1$ - macroglobulina en ratas) adquiriendo cargas negativas independientemente de la carga inicial de los liposomas ⁶⁷.

Todavía no está claramente demostrado cuál es el rol jugado por las cargas iniciales del liposoma, y porque las células que tienen cargas negativas sobre sus membranas pueden incorporar liposomas negativos más rápidamente que los liposomas positivos. Es posible que los componentes del suero con carga negativa se unan más fuertemente a liposomas positivos o neutros que a los de carga negativa, confiriéndoles entonces, una alta carga neta negativa, la cual es capaz de influenciar sobre la distribución en los tejidos y modular su desaparición.

Los estudios de cinética de clearance de vesículas lipídicas han demostrado que: (1) las vesículas grandes se eliminan más rápidamente que las pequeñas, y (2) con vesículas similares en tamaño, las cargadas negativamente son eliminadas más rápido que las neutras o positivas.

Composición lipídica

Otro de los factores que impacta sobre el clearance de los liposomas es su composición lipídica. Se ha demostrado, por ejemplo, cómo varía el clearance de liposomas SUV en función de su composición: desde una vida media de 0,1 hs. en liposomas compuestos por dilaurilfosfatidilcolina hasta 16 hs en liposomas com-

puestos por esfingomielina (este 3ltimo caso corresponde a 800 veces la vida media de la carboxifluoresce3na libre que es de 1,2 min.). Como ya hemos mencionado, un aumento en la proporci3n de esfingomielina 3 colesterol, con respecto a la fosfatidilcolina permite una menor permeabilidad a los solutos, que se deber3a a un mayor empaquetamiento de la bicapa (por creaci3n de puentes intermoleculares con otros fosfol3pidos), permitiendo una menor adsorci3n o inserci3n dentro de las ves3culas de las prote3nas del plasma (opsoninas) responsables de la eliminaci3n de la circulaci3n por reconocimiento del SRE. Tambi3n el aumento de la saturaci3n y el largo de las cadenas de 3cidos grasos, reduce la probabilidad que los solutos encapsulados escapen del liposoma.

M3s a3n, modificando la composici3n lip3dica de los liposomas es posible modificar la incorporaci3n de los mismos por un tejido espec3fico. Por ejemplo, la inclusi3n de sialogangli3sidos y cardiol3pidos inhiben la incorporaci3n realizada por el h3gado; por el contrario, las gliceroceramidas lo incrementan ^{76,77}. A3n as3, estos cambios no llevan a un gran cambio en la situaci3n normal en donde estas ves3culas se distribuyen predominantemente en tejidos ricos en c3lulas del SRE. Cambios sutiles y astutos en la composici3n lip3dica pueden ocasionar la liberaci3n del contenido liposomal dependiendo de factores ambientales tales como pH o concentraci3n de calcio ^{78,79}.

Dosis

La cantidad de l3pidos inyectados influye tambi3n sobre la vida media de los liposomas. La vida media para LUV (100 nm, fosfatidilcolina-colesterol) aumenta de 20 minutos a 3 horas cuando la dosis de l3pidos se incrementa de 0,4 a 40 mg / kg ⁷⁸.

A medida que se aumenta la dosis de l3pidos, se aumenta la vida media de los liposomas en circulaci3n, presumiblemente debido a un bloqueo del SRE, como se detalla m3s adelante.

Efecto del bloqueo del sistema ret3culoendotelial

Aunque existen cuestionamientos acerca de la habilidad de los sistemas particulados de transportar las drogas fuera del sistema vascular, su habilidad para dirigir drogas al SRE est3 bien establecida. Existen, de hecho y como ya hemos mencionado, sistemas liposomales con efecto terap3utico aprovechando su direccionamiento natural hacia el SRE. Por ejemplo: i) tratamiento de Leishmaniasis (par3sito que replica en los macr3fagos) ⁸⁰; ii) pat3genos en el h3gado, como el *Mycobacterium avium*, *Candida*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella abortus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, etc. ^{81,82}; iii) estimulaci3n del sistema inmune ⁸³.

Pero, alternativamente, y con el objeto de lograr un mayor tiempo de circulaci3n sist3mica con reducida captaci3n hepatospl3nica y mayor captaci3n por otros 3rganos, por ejemplo en tejidos tumorales, se pueden dise3nar sistemas liposomados que eviten ser captados por los macr3fagos o se puede bloquear el SRE por inyecciones secuenciales de liposomas u otras part3culas, vehiculizando as3 las drogas encapsuladas a lugares distintos que las c3lulas fagoc3ticas.

Las t3cnicas para bloquear el SRE conducen a una modificaci3n considerable

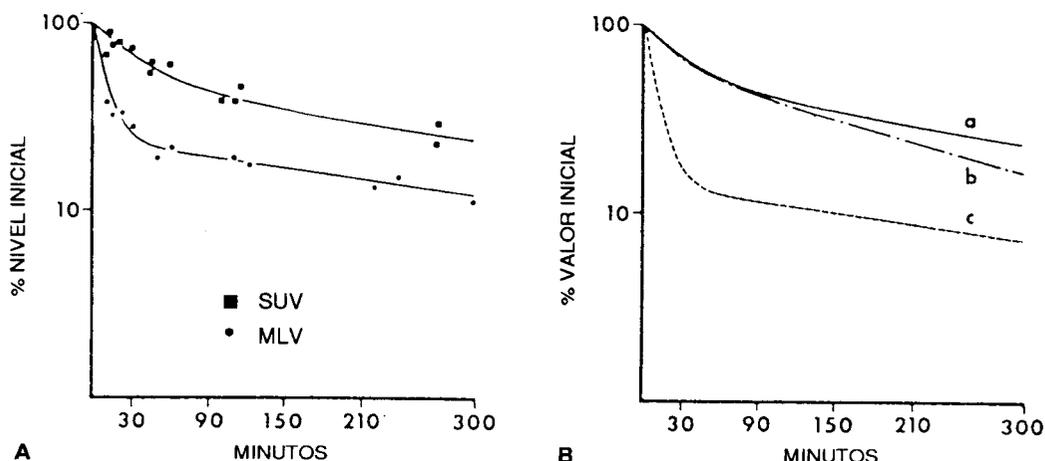


Figura 3. A. Eliminación de liposomas en función del tamaño de partícula. Liposomas SUV o MLV compuestos por fosfatidilcolina (Pc) y colesterol (Col), marcados con ^3H fueron inyectados en ratas y se midieron los niveles plasmáticos de ^3H ; los datos representan los promedios de 3-4 animales. B. Eliminación de liposomas en función de la carga. Se evaluaron liposomas SUV marcados con las siguientes composiciones: a) Pc:Col (2:1) (neutros); b) Pc:SA:col. (18:2:10) (positivos); c) Pc:PS:Col (1:1:1) (negativos); los datos representan promedios de 3-4 animales (Fuente: ref. 75).

rápidamente que aquellos que cargados positivamente, teniendo los liposomas neutros un rango de eliminación intermedio. Resultados similares fueron obtenidos con SUV, salvo que los liposomas neutros se asemejan a la eliminación de los cargados positivamente (fig. 3b) ^{62,72,73,75}.

La rápida eliminación de los liposomas cargados negativamente puede reflejar una agregación de los liposomas inyectados. Por otro lado, diversos análisis han demostrado que los liposomas interactúan con ciertos componentes del plasma ($\alpha 2$ -macroglobulina en hombres o $\alpha 1$ - macroglobulina en ratas) adquiriendo cargas negativas independientemente de la carga inicial de los liposomas ⁶⁷.

Todavía no está claramente demostrado cuál es el rol jugado por las cargas iniciales del liposoma, y porque las células que tienen cargas negativas sobre sus membranas pueden incorporar liposomas negativos más rápidamente que los liposomas positivos. Es posible que los componentes del suero con carga negativa se unan más fuertemente a liposomas positivos o neutros que a los de carga negativa, confiriéndoles entonces, una alta carga neta negativa, la cual es capaz de influenciar sobre la distribución en los tejidos y modular su desaparición.

Los estudios de cinética de clearance de vesículas lipídicas han demostrado que: (1) las vesículas grandes se eliminan más rápidamente que las pequeñas, y (2) con vesículas similares en tamaño, las cargadas negativamente son eliminadas más rápido que las neutras o positivas.

Composición lipídica

Otro de los factores que impacta sobre el clearance de los liposomas es su composición lipídica. Se ha demostrado, por ejemplo, cómo varía el clearance de liposomas SUV en función de su composición: desde una vida media de 0,1 hs. en liposomas compuestos por dilauroilfosfatidilcolina hasta 16 hs en liposomas com-

en el destino de las partículas a ser fagocitadas. Son posibles dos formas de bloqueo: i) resultado de la saturación de la capacidad de endocitosis de los macrófagos tisulares y ii) resultado de la depleción de las opsoninas circulantes, en un grado mucho menor. El efecto de bloqueo del SRE se manifiesta fundamentalmente en el hígado que es el sitio de mayor fagocitosis⁸⁴⁻⁸⁶. Ensayos preliminares para alterar la distribución tisular por bloqueo de las células del SRE con partículas de carbón o de latex, nunca llevaron a resultados concluyentes. Por el contrario, el tratamiento de animales con grandes cantidades de liposomas produce una inhibición de la captación hepática de los liposomas subsecuentemente inyectados, sin afectar otros tejidos⁸⁷⁻⁹⁰.

Otras vías parenterales

Administración intraperitoneal

Ha sido demostrado ampliamente y por distintos investigadores la capacidad de los liposomas de vehiculizar distintas drogas, cuando los mismos son administrados intraperitonealmente³⁵. Por ejemplo: actinomicina D, que demostró ser menos tóxica y más efectiva que la droga libre en el tratamiento de tumores ascíticos de Ehrlich en ratones^{91,92}; metotrexato, en el tratamiento de tumores sólidos resistentes a la misma⁹³.

La carga y el tamaño de los liposomas son dos variables que deben ser consideradas en este tipo de administración. Los liposomas pequeños son capaces de atravesar ciertas membranas endoteliales y por lo tanto son drenados por los conductos linfáticos a la circulación. En contraposición, los liposomas grandes no pueden pasar a los conductos linfáticos y permanecen en el sitio de administración, lo cual beneficia el efecto terapéutico^{35,94,95}.

La distribución tisular es, desde un punto de vista cualitativo, similar a la obtenida después de una inyección intravenosa y es solo levemente afectada por el tamaño y la carga de los liposomas. Sin embargo existen diferencias cuantitativas, por ejemplo, después de una inyección iv de liposomas marcados, cargados negativamente, el 50-60% de la radioactividad se localiza en el hígado, mientras que solo el 5-10% de la radioactividad se halla después de la inyección intraperitoneal^{96,97}.

Administración subcutánea

Los liposomas inyectados por vía subcutánea alcanzan la circulación por el conducto torácico y la circulación sistémica previo paso a través del sistema linfático⁹⁸.

En general se ha observado que después de 5 horas de una inyección subcutánea de liposomas, los mismos se hallarían en los conductos linfáticos y, después de 30 horas, aproximadamente, se concentrarían en los nódulos linfáticos^{98,99}. Los liposomas pequeños, neutros o positivos, son más fáciles de ser hallados en los nódulos que los cargados negativamente. Por otro lado, los liposomas grandes no ingresan a la linfa y permanecen localizados en los sitios de inyección por largos períodos de tiempo, probablemente debido a su tamaño que no les permite atravesar las barreras endoteliales⁹⁴.

El potencial terap3utico de los liposomas administrados por esta v3a se basa en su precisa localizaci3n en n3dulos linfáticos, al igual que la v3a intraperitoneal, vehiculizando agentes quimioterápicos para el tratamiento de linfomas o metástasis de tumores s3lidos.

Administraci3n intramuscular

Se ha observado que al administrar drogas liposomadas por esta v3a, la absorci3n por el organismo de las drogas vehiculizadas es mucho m3s lenta que cuando se administra la droga libre ³³. M3s a3n, aumentando la concentraci3n de colesterol en los liposomas se prolonga el tiempo de absorci3n de las mol3culas encapsuladas. De todas formas, la absorci3n depende de la naturaleza de las mol3culas encapsuladas.

Han sido propuestos para el tratamiento de la artritis reumatoidea cr3nica (prednisolona) ³⁴ y, debido a su efecto como adyuvante inmunol3gico, se ha propiciado su administraci3n intramuscular para vacunaci3n ^{100,101}.

Administraci3n intraarticular

Se ha propuesto su utilizaci3n para ciertos casos de reumatismo, como la artritis reumatoidea. Shaw *et al.* demostraron que liposomas conteniendo esteroides son estables a 37 °C en presencia de l3quido sinovial y, la intensidad y la duraci3n de la actividad anti-inflamatoria son mayores al comienzo de la fase aguda de la inflamaci3n ¹⁰²⁻⁴.

Administraci3n intratecal

Los liposomas no tienen acceso, o este es muy limitado, al sistema nervioso central despu3s de una inyecci3n intravenosa ^{32,105,106}. Es practicamente imposible para ellos atravesar la barrera endotelial cont3nua, que separa el cerebro de la circulaci3n. Teniendo en cuenta estas caracter3sticas, diversos investigadores han llevado adelante la administraci3n intracerebroventricular en animales, por ejemplo administrando metotrexato, obteniendo resultados promisorios para el tratamiento anticancer3geno de tumores cerebrales s3lidos ¹⁰⁵.

Debe recordarse que, en el caso de patolog3as cerebrales que alteren la barrera endotelial, permitiendo por lo tanto la difusi3n de macromol3culas, dejar3a de existir el obst3culo para la llegada de los liposomas desde la circulaci3n, haci3ndose innecesaria la administraci3n intracerebral.

ASPECTOS TECNOLOGICOS EN LA ELABORACION DE LIPOSOMAS PARA ADMINISTRACION PARENTERAL

Los liposomas, al igual que otros sistemas farmac3uticos para uso parenteral, deben ser *est3riles, libres de pirog3enos y estables*. Adem3s, el producto debe ser dise3ado de tal manera que la administraci3n de los mismos no requiera una excesiva manipulaci3n por el personal m3dico.

Los productos deber3an estar f3sica y qu3micamente bien definidos respecto de par3metros tales como *tama3o, carga y rigidez de la bicapa* que aqu3 se presentan como cr3ticos en la obtenci3n de resultados reproducibles *in vivo* e *in vitro*.

Desafortunadamente la mayoría de los autores no dan una caracterización física y química completa de sus preparados.

La esterilización de liposomas puede llevarse a cabo por distintas técnicas. En la mejor de las situaciones, el producto final podría ser tratado después del llenado, en el envase final, para garantizar su esterilidad. Desafortunadamente, para la mayoría de los sistemas en desarrollo, basados en liposomas, la esterilización final por calor o radiaciones ionizantes no son una buena opción. En muchos casos son descartados porque los principios activos son sensibles al calor o las radiaciones. Pero, los lípidos mismos, son factibles de hidrolizar rápidamente a las altas temperaturas requeridas para la esterilización. La radiación γ no sólo agrava la hidrólisis sino que también parece acelerar la peroxidación de lípidos insaturados ¹⁰⁷.

Por lo tanto existen dos opciones para asegurar la esterilidad de formulaciones liposomadas: i) pre-esterilizar todos los materiales y aparatos y desarrollar el proceso en forma aséptica; ii) filtración de la dispersión a través de filtros esterilizantes con poros de 0,45 y 0,22 μm .

Por otro lado, lo más apropiado para lograr productos liposomados parenterales apirógenos, se basa en trabajar con materias primas apirógenas, diseñar procesos que sean asépticos y usar aparatos despirogenizados (por técnicas convencionales). Los métodos más utilizados para el test de apirogenicidad son el de conejos y el limulus test. Se debe tener especial cuidado en la validación de los ensayos utilizados para detectar y cuantificar el nivel de pirogenos: los lipopolisacáridos son moléculas lipofílicas con solubilidad similar a la de los fosfolípidos, por lo tanto, pueden incorporarse en las bicapas internas en los liposomas multilamelares interfiriendo con los ensayos (como el LAL test) que han sido diseñados para detectar los pirogenos en sistemas acuosos ¹⁰⁸.

Cualquiera sea el procedimiento elegido para la elaboración de los liposomas, es importante usar lípidos altamente purificados. Además, se debe tener la precaución de remover totalmente los solventes (en los que se disuelven los lípidos durante la elaboración), no solo por la toxicidad para los pacientes, fundamentalmente para formulaciones inyectables, sino también porque pueden conducir a una desestabilización física de los liposomas ¹⁰⁷.

Cabe destacarse, que en la actualidad pueden elaborarse liposomas como dispersiones acuosas convencionales (formas líquidas) o como sistemas sólidos liofilizados (en presencia de crioprotectores), que se resuspenden en el momento de ser utilizados, lo cual constituye una ventaja respecto de la estabilidad de los productos terminados.

FUTURO

Se encuentran en desarrollo e incluso comercializadas distintas formulaciones liposomales para ser utilizadas por administración intravenosa, formas tópicas sobre ojos y piel, o inyectados intramuscular o subcutáneamente para la liberación controlada de diversas drogas.

Para ser fieles al objetivo de este reporte, mencionaremos algunas de las formulaciones de aplicación parenteral que han alcanzado ya etapas de investigación clínica avanzada y muchas de ellas están disponibles en el mercado internacional

o ser3n comercializados en breve. Por ejemplo: i) Anfotericina B liposomal (comercializada); ii) Factor Activador de Macr3fagos (fase II-III); iii) Doxorubicina (existen distintas formulaciones, una comercializada y dos en fase III-IV); iv) An3logos del Cis-Platino (fase III); v) Gentamicina/Amikacina (fase III), etc.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Gregoriadis, G., P.D. Leathwood y B.E. Ryman (1971) *FEBS Lett.* **14**: 95-9
2. Finkelstein, M.C. y G. Weissmann (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **587**: 202-16
3. Gregoriadis, G. (1976) *New Engl. J. Med.* **295**: 704-14, 765-70
4. Findelstein, M.C. y G. Weissmann (1978) *J. Lipid. Res.* **19**: 289-303
5. Papahadjopoulos, D. (Ed.) (1978) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Vol **308**
6. Caride, V.J. (1985) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1**: 121-53
7. Hnatowich, D.J. y B. Clancy (1980) *J. Nucl. Med.* **21**: 622-5
8. Proffitt, R.T., L.E. Williams, C.A. Present, G.W. Tin, J.A. Uliana, R.C. Gamble y J.D. Baldeschwieler (1983) *J. Nucl. Med.* **24**: 45-51
9. Weinstein, J.N., R.L. Magin, R.L. Cysyk y D.S. Zaharko (1979) *Cancer Res.* **40**: 1388-95
10. Forssen, E.A. y Z.A. Tokes (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**: 1295-301
11. Gabizon, A., A. Dagan, D. Goren, Y. Barenholz y Z. Fuks (1982) *Cancer Res.* **42**: 4734-39
12. Weinstein, J.N. y L.D. Leserman (1984) *Pharmacol. Ther.* **24**: 207-33
13. Poste, G., R. Kirsh y P. Bugelski (1984) "Liposomes as a drug delivery system in cancer therapy" en "*Novel Approaches to Cancer Chemotherapy*" (P. Sunkara, ed.), Academic Press, New York, p3gs. 165-230
14. Lopez-Berestein, G., R. Mehta, R.L. Hopper, K. Mills, L. Kasi, K. Mehta, V. Fainstein, V. Luma, E.M. Hersh y R. Juliano (1983) *J. Infect. Dis.* **147**: 939-45
15. Lopez-Berestein, G., M.G. Rosenblum y R. Mehta (1984) *Cancer Drug Deliv.* **1**: 199-205
16. Mehta, R., G. Lopez-Berestein, R. Hopfer, K. Mills y R.L. Juliano (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **770**: 230-4
17. Lopez-Berestein, G., R.L. Hopfer, R. Mehta, K. Mehta, E.M. Hersh y R.L. Juliano (1984) *J. Infect. Dis.* **150**: 278-83
18. Reichlin, V.P. (1985) *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2**: 65-115
19. Connor, J., S. Sullivan y L. Huang (1985) *Pharmacol. Ther.* **28**: 341-65
20. Gregoriadis, G. (1981) *Lancet* **2**: 241
21. Huang, A., S.J. Kennel y L. Huang (1983) *J. Biol. Chem.* **258**: 14034-40
22. Gregoriadis, G. y E.D. Neerunjun (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **65**: 537-44
23. Mauk, M.R., R.C. Gamble y J.D. Baldeschwieler (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 4430-4
24. Barbet, J., P. Machy y L.D. Leserman (1981) *J. Supramolec. Struct. Cell. Biochem.* **16**: 243-58
25. Yatvin, M.B., W. Kreutz, B.A. Horwitz y M. Shimitzky (1980) *Science* **210**: 1253-5
26. Yatfin, M.B., J.N. Weinstein, W.H. Dennis y R. Blumenthal (1978) *Science* **202**: 1290-3
27. Weinstein, J.N., R.L. Magin, M.B. Yatvin y D.S. Zaharko (1979) *Science* **204**: 188-91
28. New, R.R.C., M.L. Chance, S.C. Thomas y W. Peters (1978) *Nature* **272**: 55-6
29. Leserman, L.D., J.N. Weinstein, R. Blumenthal y W.D. Terry (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 4089-93
30. Poste, G., R. Kirsh, W.E. Fogler y I.J. Fidler (1979) *Cancer Res.* **39**: 881-92
31. Gregoriadis, G. y B.E. Ryman (1972) *Eur. J. Biochem.* **24**: 485-91

32. Jonah, M.M., E.A. Cerny y Y.E. Rahman (1975) *Biochim. Biophys Acta* **401**: 336-48
33. Arakawa, E., Y. Imai, H. Kobayashi, K. Okumura y H. Seraki (1975) *Chem. Pharm. Bull.* **23**: 2218-22
34. Shinozawa, S., Y. Araki y T. Oda (1979) *Res. Commun. Chem. Path. Pharm.* **24**: 223-32
35. McDougall, I.R., J.K. Dunnick, M.L. Goris y J.P. Kriss (1975) *J. Nucl. Med.* **16**: 488-91
36. Stevenson, R.W., T.I. Tsakok y J.A. Parsons (1980) *Diabetologia* **18**: 423-6
37. Pagano, R.E., A.J. Schroit y D.K. Struck (1981) "Interactions of phospholipid vesicles with mammalian cells in vitro: Studies of mechanism", en *"Liposomes: From Physical Structure to Therapeutic Applications"* (C.G. Knight, ed.) Elsevier/North Holland, Amsterdam, págs. 324-48
38. Anderson, R.G. (1981) "Cell Surface membrane structure and the function of endothelial cells", en *"Structure and Function of the Circulation"* (J. Schwartz, N.T. Werthesen y S. Wolf, eds.), Plenum Press, New York, vol. **2**, págs. 239-86
39. Bundgaard, M. (1980) *Annu. Rev. Physiol.* **42**: 325-36
40. Martínez-Herandez, A. (1981) "The basement membrane in the microvasculature", en *"Microcirculation"* (R. Effros, H. Schmid-Shonben y J. Ditzel, eds.) Academic Press, New York, págs. 125-46
41. Nelson, D.S. (1981) *Clin. Exp. Immunol.* **45**: 225-33
42. Juliano, R.L. y D. Layton (1980) Liposomes as a drug delivery system", en *"Drug Delivery Systems: Characteristics and Biomedical Applications"* (R.L. Juliano, ed.), Oxford University Press, págs. 189-236
43. Sharkey, R.M., F.J. Primus y D.M. Goldenberg (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 2843-46
44. Layton, D., G.A. Luckenbach, R. Andreesen y P.G. Munder (1980) *Eur. J. Cancer* **16**: 1529-38
45. Caride, V.J., J. Twickler y B.L. Zaret (1984) *J. Cardio. Pharmacol.* **6**: 996-1005
46. Juliano, R.L. (1981) "Interaction of liposomes with the reticuloendothelial system: Implications for the controlled delivery of drugs", en *"Optimization of Drug Delivery"* (H. Bundgaard, A.B. Hansen y H. Kofod, eds.) Munksgaard Copenhagen, págs. 405-15
47. Saba, T.M., F.A. Blumenstock, P. Webe y J.E. Kaplan (1978) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **312**: 43-55
48. Hsu, M. y R.L. Juliano (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **720**: 411-9 49. Weinstein, J.N., S. Yoshikami, P.A. Henkart, R. Blumenthal y W.A. Hagins (1977) *Science* **195**: 489-92
50. Straubinger, R.M., K. Hong, D.S. Friend y D. Papahadjopoulos (1983) *Cell.* **32**: 1069-79
51. Machy, P., J. Barbet y L.D. Leserman (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 4148-52
52. Machy, P. y L.D. Leserman (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **730**: 313-20
53. Blumenthal, R., E. Ralston, P. Dragsten, L.D. Leserman y J.N. Weinstein (1982) *Mem. Biochem.* **4**: 283-303
54. Poste, G. y D. Papahadjopoulos (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 1603-7
55. Scherphof, G., J. Damen y D. Hoekstra (1981) "Interactions of liposomes with plasma proteins and components of the immune system", en *"Liposomes: from Physical Structure to Therapeutic Applications"* (C.G. Knight, ed.), Amsterdam, vol. **7**, págs. 299-322
56. Guo, L.S., R.L. Hamilton, J. Goerke, J.N. Weinstein y R.J. Havel (1980) *J. Lipid Res.* **21**: 993-1003
57. Kirby C., J. Clarke y G. Gregoriadis (1980) *Biochem. J.* **186**: 591-8
58. Alving, C.R. (1984) *Biochem. Soc. Trans.* **12**: 342-4
59. Deshmukh, D.S., W.D. Bear, H.M. Wisniewski y H. Brockerhoff (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **82**: 328-34

60. Sherphof, G., F. Roerdink, M. Waite y J. Parks (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **542**: 296-307
61. Weinstein, J.N., R.D. Klausner, T.L. Innerarity, E. Ralston y R. Blumenthal (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **647**: 270-84
62. Cullis, P.R., L.D. Mayer, M.B. Bally, T.D. Madden y M.J. Hope (1989) *Adv. Drug Deliv. Rev.* **3**: 267-82
63. Senior, J. y G. Gregoriadis (1984) *Biochem. Soc. Trans.* **12**: 339-40
64. Senior, J., G. Gregoriadis y K.A. Mitropoulos (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **760**: 111-18
65. Gregoriadis, G. y B.E. Ryman (1972) *Eur. J. Biochem.* **24**: 485-91
66. Hunt, C.A., Y.M. Rustum, E. Mayhew y D. Papahadjopoulos (1979) *Drug. Metab. Dispos.* **7**: 124-8
67. Juliano, R.L. y D. Stamp (1978) *Biochem. Pharmacol.* **27**: 21-7
68. Wisse, E., G. Gregoriadis y W.T. Daems (1976) *Adv. Exp. Med. Biol.* **73**: 237-45
69. Rahman, Y.E., E.A. Cerny, K.R. Patel, E.H. Lau y B.J. Wright (1982) *Life Sci.* **31**: 2061-71
70. Roerdink, F., J. Dijkstra, G. Hartman, B. Bolscher y G. Scherphof (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **677**: 79-89
71. Scherphof, G., F. Roerdink, J. Dijkstra, H. Ellens, R. De Zanger y R. Wisse (1983) *Biol. Cell.* **47**: 47-57
72. Gregoriadis, G. y E.D. Neerunjun (1974) *Eur. J. Biochem.* **47**: 179-85
73. Juliano, R.J. y D. Stamp (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **63**: 651-8
74. Sharma, P., D.A. Tyrrell y B.E. Ryman (1977) *Biochem. Soc. Trans.* **5**: 1146-9
75. Juliano, R.L., D. Stamp y N. McCullough (1978) *Annals N. Y. Acad. Sci.* **308**: 411-25
76. Jonah, M.M., E.A. Cerny y Y.E. Rahman (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **541**: 321-33
77. Hnatowich, D.J., B. Clancy, S. Kilprath y T. O'Connell (1979) *J. Nucl. Med.* **20**: 680-1
78. Ostro, M.J. y P.R. Cullis (1989) *Am. J. Hospital Pharm.* **46**: 1576-87
79. de Gier, J., J.S. Mandersloot y L.L.M. van Deenen (1968) *Biochim. Biophys. Acta* **150**: 666-75
80. Nacy C.A., M.J. Gilbreath y G.M. Swartz (1989) "Liposome composition and activation of macrophages for antimicrobial activities against *Leishmania parasites*", en "*Liposomes in the Therapy of Infectious Diseases and Cancer*" (G. Lopez-Berestein, I. Fidler, eds.), New York, p3ags. 167-76
81. L3pez-Berestein, G., V. Fainstein, R. Hopfer y R. P3rez Soler (1985) *J. Infect. Dis.* **151**: 704-10
82. Gangadharam, P.R.J., V.K. Perumal y L. Kesavalu (1989) "Comparative activities of free and liposome encapsulated amikacin against *Mycobacterium avium complex*", en "*Liposomes in the Therapy of Infectious Diseases and Cancer*" (G. Lopez-Berestein, I. Fidler, eds.), New York, p3ags. 177-90
83. Fidler, I.J., A. Raz y W.E. Fogler (1980) *Cancer Res.* **40**: 4460-6
84. Souhami, R.L. (1972) *Immunology* **22**: 685-94
85. Ellens, H., E. Mayhew y Y.M. Rustum (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **714**: 479-85
86. Bosworth, M.E. y C.A. Hunt (1982) *J. Pharm. Sci.* **71**: 100-4
87. Gregoriadis, G. y E.D. Neerunjun (1974) *Eur. J. Biochem.* **47**: 179-85
88. Gregoriadis, G., D.E. Neerunjun y R. Hunt (1977) *Life Sci.* **21**: 357-70
89. Kao, Y.J. y R.L. Juliano (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **677**: 453-61
90. Proffitt, R.T., L.E. Williams, C.A. Presant, G.W. Tin *et al.* (1983) *Science* **220**: 502-5
91. Rahman, Y.E., E.A. Cerny, S.L. Tollaksen, B.J. Wright y S.L. Nance (1974) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **146**: 1173-6
92. Gregoriadis, G. y E.D. Neerunjun (1975) *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.* **10**: 351-62

93. Kosloski, M.J., F. Rosen, R.J. Milholland y D. Papahadjopoulos (1978) *Cancer Res.* **38**: 2848-53
94. Segal, A.W., G. Gregoriadis y C.D.V. Black (1975) *Clin. Sci. Mol. Med.* **49**: 99-106
95. Rustum, Y., C. Dave, E. Mayhew y D. Papahadjopoulos (1979) *Cancer Res.* **39**: 1390-5
96. Kimelberg, H.K. y E.G. Mayhew (1978) *Crit. Rev. Toxicol.* **6**: 25-9
97. Magee, W.E., M.L. Talcott, S.X. Straub y C.Y. Vriend (1976) *Biochem. Biophys. Acta* **451**: 610-8
98. Osborne, M.P., V.J. Richardson, K. Jeyasingh y B.E. Ryman (1979) *Int. J. Nucl. Med. Biol.* **6**: 75-83
99. Ryman, B.E., R.F. Jewkes, K. Jeyasingh, M.P. Osborne, H.M. Patel *et al.* (1978) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **308**: 281-307
100. Heath, T.D., P.C. Edwards y B.E. Ryman (1976) *Biochem. Soc. Trans.* **4**: 129-33
101. Allison, A.C. y G. Gregoriadis (1974) *Nature* **252**: 252-4
102. Shaw, I.H., C.G. Knight, D.P. Page Thommas, N.C. Phillips y J.T. Dingle (1979) *Br. J. Exp. Path.* **60**: 142-50
103. Shaw, I.H. y J.T. Dingle (1980) "Liposomes as steroid carriers in the intra-articular therapy of rheumatoid arthritis", en "*Liposomes in Biological Systems*" (G. Gregoriadis y A.C. Allison, eds.) New York, págs. 299-324
104. De Silva, M., B.L. Hazleman, D.P. Page-Thomas y P. Wright (1979) *Lancet* **I**: 1320-2
105. Kimelberg, H.K. (1980) "Liposomes as carriers for methotrexate", en "*Liposomes in Biological Systems*" (G. Gregoriadis y A.C. Allison, eds.) New York, págs. 219-48
106. Kimelberg, H.K., T.F. Tracy, R.E. Watson, D. Kung, *et al.* (1978) *Cancer Res.* **38**: 706-12
107. Martin, F.J. (1990) "Pharmaceutical manufacturing of liposomes", en "*Drugs and the Pharmaceutical sciences*" (P. Tyle, ed.), vol. **41**, cap. 6, págs. 267-316
108. Dijkstra, J., J.W. Mellors, J.L. Ryan y F.C. Szoka (1987) *J. Immunol.* **138**: 2663