

ARAH DAN PERKEMBANGAN LIPOSOME DRUGS DELIVERY SYSTEMS

Mahdi Jufri

Departemen Farmasi, FMIPA Universitas Indonesia, Depok

ABSTRACT

Since the discovery of liposome or lipid vesicles derived from self limiting enclosed lipid bilayer upon hydration, liposome drug delivery systems have played a significant role in formulation of potent drugs to improve therapeutics. Currently most of these liposome formulation are designed to reduced toxicity and to some extent increase accumulation at the target site(s) in a the number of clinical application. The current pharmaceutical preparations of liposome based therapeutics stem from our understanding of lipid drug interactions and the liposome disposition mechanism including the inhibition of rapid clearance of liposome by controlling size , charge and surface hydration.

Key word : liposome, drug delivery systems, active target.

PENDAHULUAN

Sejak penemuan pada tahun 1950an bahwa hidrasi lapisan lemak kering membentuk gelembung spheris tertutup atau liposom yang menyerupai miniatur seluler organel dengan lemak lapis ganda. Penggunaan potensial liposom sebagai biodegradable atau pembawa obat-obat biokompatibel untuk meningkatkan potensi dan mengurangi toksisitas terapeutik mulai dikenal. Namun, pemakaian liposom untuk *drug delivery system* baru dapat direalisasikan hingga 30 tahun kemudian (Bangham AD 1993)

Liposom atau gelembung lemak adalah partikel koloid dapat dibuat dengan (turunan molekul, fosfolipid

baik dari sumber alam maupun sintesis kimia). Pada tahun 1960an dan 1970an, berbagai metoda pembuatan liposom dikembangkan untuk mempelajari proses biologis membran dan ikatan membran protein. Pada tahun 1970an telah diusulkan sebagai pembawa obat untuk modifikasi indeks terapeutik obat dengan mengurangi toksisitas atau meningkatkan efikasi (atau keduanya) obat induk.

Banyak kemajuan penelitian liposom pada akhir 1980an dan awal 1990an, termasuk pemahaman secara terinci polimorfisme lemak. Mekanisme fisiologis disposisi liposom in vivo dan lemak-obat dan interaksi protein lemak.

Hasilnya adalah rancangan liposom dengan stabilitas yang lebih baik

secara *in vitro* dan *in vivo*, dengan memperbaiki biodistribusi dan waktu tinggal optimal liposom dalam sirkulasi sistem atau darah. Tujuan penggunaan liposom sebagai pembawa obat dalam pemakaian farmasi baru direalisasikan pada pertengahan tahun 1990an. Obat-obat yang sekarang beredar di AS diformulasikan sebagai *liposome drug delivery systems* terutama antijamur dan terapi anti kanker, banyak produk, termasuk yang digunakan sebagai analgesik, terapi gen dan vaksin sedang dikembangkan (Lasic DD, 1998).

SIFAT-SIFAT DASAR LIPOSOM

Liposom atau gelembung lemak merupakan partikel koloid yang terdiri dari molekul-molekul fosfolipid sebagai konstituen utama dalam pembentukan lemak lapis ganda tertutup atau obat-lemak kompleks lembaran cakram. Walaupun kandungan lemak dapat bervariasi, banyak formulasi yang digunakan produk sintesis fosfolipid alami, terutama fosfatidilkolin. Pada tabel 1 tertera berbagai fosfolipid dan derivatnya dan tujuan pemakaiannya.

MUATAN PERMUKAAN

Berdasarkan pada komposisi kelompok bagian kepala lemak dan pH, liposom akan mempunyai muatan negatif, netral atau positif pada permukaannya.

Sifat alami dan densitas muatan

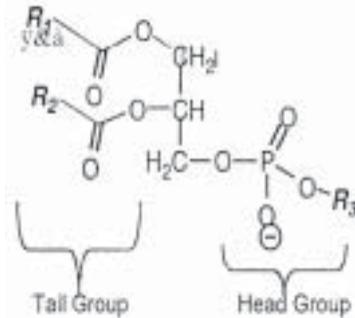
liposom mempengaruhi stabilitas, kinetika dan luasnya biodistribusi juga interaksi dengan ambilan liposom oleh sel target.

Liposom dengan permukaan muatan netral mempunyai kecenderungan lebih rendah menjadi lebih jelas oleh sel-sel *retikuloendotelial system* (RES) setelah pemberian sistemik dan memiliki kecenderungan yang tertinggi menjadi agregat. Liposom yang bermuatan negatif mengandung fosfatidil serin (PS) atau fosfatidil gliserol (PG) diamati merupakan endosit pada kecepatan yang berlebih dan untuk lebih luas dibanding muatan netral. (Alen TM Hansen et all, 1991).

Permukaan yang bermuatan negatif dikenal pada reseptor yang ditemukan pada berbagai sel, termasuk makrofag. Dengan memasukkan beberapa glikolipid, seperti gangliosida GM1 atau fosfatidilinositol (PI), menghambat asupan oleh makrofag dan sel-sel RES sehingga menyebabkan waktu sirkulasi yang lebih panjang. Sejumlah kecil lemak bermuatan negatif menstabilkan liposom netral terhadap mekanisme asupan yang tergantung agregasi. (Lasic DD 1998)

Liposom bermuatan positif, liposom kationik, sering digunakan sebagai reagen kondensasi DNA untuk penghantaran DNA dalam terapi gen, memiliki kecenderungan yang tinggi untuk berinteraksi dengan protein serum, interaksi ini menyebabkan peningkatan asupan oleh RES dan klirens oleh paru-paru, hati atau limpa.

Tabel 1. Penggunaan umum fosfolipid dan pembagian kelompok kepala dan acyllemak (ekor).



Domain	Effect on Liposome Membrane	Functional Attribute on Lipid Bilayer
Tail group-Fatty acyl chains:		
R ₁ and R ₂ (C14-18 in length)		
Increase degree of saturation	Increase rigidity; decrease fluidity	Elevate T _c
Increase chain length of R ₁ and R ₂	Increase thickness of bilayer	Elevate T _c
Varying degree of saturation and chain length on R ₁ and R ₂	Decrease order of membrane packing	Lower T _c (compared to phospholipid with two identical fatty acyl tails)
Head group: R ₃		
Choline: -CH ₂ -CH ₂ -N(CH ₃) ₃ ⁺	Some surface hydration	Neutral charge
Ethanolamine: -CH ₂ -CH ₂ -NH ₃ ⁺	Minimum degree of surface hydration	Neutral charge
Serine: -CH ₂ -CH(COO ⁻)-NH ₃ ⁺	Some surface hydration	Negative charge
Glycerol: -CH ₂ -C(OH)CH ₂ OH	Some surface hydration	Negative charge
PEG (ethanolamine): -CH ₂ -CH ₂ -NH-PEG	Enhanced surface hydration and steric effect	Negative charge

PERMUKAAN HIDRASI ATAU EFEK STERIK

Permukaan membran liposom dapat dimodifikasi untuk mengu-

rangi agregasi dan mencegah pengenalan oleh RES dengan cara menggunakan polimer hidrofilik. Strategi ini sering dirujuk pada permukaan hidrasi atau modifikasi sterik.

Modifikasi permukaan sering dilakukan dengan menggabungkan gangliosida seperti GM 1 atau lipida yang secara kimia berkonyugasi dengan polimer higroskopik atau hidrofilik biasanya Poli Etilen Glikol (PEG). Teknologi ini sama dengan protein PEGylation. Dengan menggantikan konyugasi PEG terhadap protein terapeutik seperti adenosin deaminase (Alderase untuk pengobatan kombinasi sindroma menurunnya kekebalan tubuh yang parah) untuk mengurangi pengenalan kekebalan dan klirens yang cepat. (Beauchamp C 1984)

PEG dikonyugasi dengan ujung gugus amin fosfotidilolinetanolainin. Penambahan ini menghadirkan polimer hidrofilik pada permukaan liposom sehingga memberikan tambahan lapisan hidrasi permukaan. Liposom yang dihasilkan tidak dikenali oleh makrofag dan RES sebagai partikel asing.

FLUIDITAS LEMAK LAPIS GANDA

Lemak lapis ganda dan membran liposom menunjukkan orde yang baik atau fase gel di bawah temperatur transisi fase lemak (T_c) dan kelainan atau fase aliran atas T_c . Transisi fase lemak diukur dan diekspresikan sebagai T_c , temperatur pada mana proporsi yang seimbang adanya dua fase. Pada temperatur yang berhubungan dengan T_c , kebororan liposom yang maksimum

diamati. Sifat fase membran liposom menentukan permeabilitas, agregasi, ikatan protein dan untuk mengurangi derajat, fusi liposom. Karena berbagai T_c tergantung pada panjang dan asal (jenuh atau tidak jenuh) rantai asam lemak (tabel 1), fluiditas lemak lapis ganda dapat dikendalikan oleh seleksi dan kombinasi lemak. Misalnya penggabungan kolesterol pada konsentrasi yang rendah kedalam lapisan ganda menyebabkan meningkatnya permeabilitas trans membran, dimana penggabungan jumlah yang banyak ($> 30 \text{ mol}\%$) kolesterol dapat menghilangkan fase transisi dan menurunkan permeabilitas membran pada temperatur $> T_c$. (Corvera E et all 1992)

Berbagai fase transisi lemak lapis ganda telah dirancang untuk menginduksi fusi liposom dan pelepasan obat.

Obat-obat yang dienkapsulasi dapat dilepaskan kedalam jaringan yang dituju dengan memodulasi temperatur jaringan lokal atau sinar laser. Tapi, obat-obat yang terikat dengan membran lemak dapat mengubah temperatur jaringan lokal dengan pemanasan dari luar menggunakan berbagai sumber energi, seperti infra merah, gelombang mikro atau sinar laser. Tapi, obat-obat yang terikat dengan membran lemak dapat mengubah temperatur transisi atau mencabut sifat fase transisi. Ikatan protein serum juga mempengaruhi sifat fase transisi dan melepaskan air dalam kandungan liposom. (Sullivan SM et all 1986).

UKURAN LIPOSOM

Penelitian pendahuluan telah menunjukkan bahwa ukuran liposom mempengaruhi distribusi gelembung dan klirens setelah pemberian sistemik. Kecepatan asupan liposom oleh RES meningkat seiring dengan ukuran vesicles. Dimana asupan RES secara *in vivo* dapat dijenuhkan dengan liposom dosis tinggi atau dengan predosing dengan jumlah besar yang dapat mengendalikan liposom, strategi ini tidak dapat dipraktikkan untuk penggunaan pada manusia karena efek samping yang berhubungan dengan gangguan fungsi fisiologis RES. (Senior J et al 1985)

Arah perkembangan umum untuk liposom komposisi yang sama ialah bahwa peningkatan ukuran sehingga menyebabkan perubahan dalam kecepatan asupan RES. Penyelidikan yang banyak dilakukan terakhir menggunakan gelembung unilamelar yang berukuran 50-100 nm, untuk penggunaan *drug delivery system*. Misalnya produk liposom anti-jamur AmBisome diformulasi dengan spesifikasi ukuran 45-80 nm untuk mengurangi asupan RES. Ikatan protein serum merupakan faktor penting yang mempengaruhi ukuran liposom dan meningkatkan kecepatan klirens *in vivo*. Komplemen yang diaktifkan oleh liposom dan opsonisasi tergantung pada ukuran liposom. Bahkan dengan inklusi PEG dalam komposisi liposom untuk mengurangi ikatan protein serum terhadap liposom,

limit ukuran teratas dan sirkulasi yang panjang PEG-PE liposom adalah 150-200 nm. Karena hambatan keadaan biologi, pengembangan sirkulasi liposom yang panjang berukuran besar (> 500 nm) menggunakan metoda stabilitas sterik tidak berhasil. Oleh sebab itu, pertimbangan ukuran liposom dan pengendaliannya dalam pabrik pada tahap dini. Pengembangan obat ini memberikan maksud untuk efisiensi liposome *drug delivery systems*.

DISPOSISI LIPOSOM IN VIVO: MELIHAT MANFAAT PENELITIAN PREKLINIS DAN KLINIS

Mekanisme yang pasti mengenai biodistribusi dan disposisi *in vivo* bervariasi tergantung pada komposisi lemak, ukuran, muatan dan derajat permukaan/hidrasi sterik. Sebagai tambahan, cara pemberian mungkin akan mempengaruhi disposisi liposom *in vivo*. Segera setelah pemberian intravena, liposom biasanya terbungkus dengan protein serum dan diambil sel-sel RES dan akhirnya dieliminasi. (Liu D et al 1995 dan Chon A et al 1992)

Protein plasma akan berinteraksi dengan liposom termasuk albumin, lipoprotein (misalnya HDL dan LDL) dan sel lain yang berhubungan dengan protein. Beberapa protein misalnya HDL akan mengubah fosfolipid dalam liposom lemak lapis ganda, oleh sebab itu akan mende-

stabilisasi liposom. Proses ini secara potensial menyebabkan kebocoran yang prematur atau disosiasi obat-obat dari liposom. Sebagai tambahan, dalam kasus asam atau liposom yang sensitif terhadap pH, ikatan protein akan merusak liposom yang sensitif terhadap pH. Interaksi lemak-protein juga dapat menerangkan menurunnya secara drastis transfeksi aktivitas DNA-kationik lemak kompleks secara *in vivo*.

Pemberian liposom ukuran besar secara subkutan dan intramuskuler mungkin akan terjebak pada tempat injeksi dan akan memberikan sebagai depot obat. Dalam hal lain, liposom berukuran kecil (50-80 nm) yang diberikan secara subkutan akan tertahan dalam saluran limpa dan akhirnya meredistribusi obat-obat kedalam sirkulasi darah. Mekanisme peningkatan lokalisasi liposom disebabkan oleh pembatasan ukuran partikel saluran limpa. Ketergantungan terhadap ukuran latex dan partikel karbon yang pernah diteliti diperkirakan batas atas ukuran saluran nodus limpa menjadi 20-39 nm. Oleh sebab itu, kompleks-lemak-obat > 40-50 nm akan tertahan dalam limpa nodus seperti yang memasuki sistem limpatik.

LIPOSOM TARGET AKTIF

Sejak penemuan pemakaian liposom banyak ilmuwan mengembangkan liposom yang dapat menjadi target sel-sel khusus menggunakan

ligan atau reseptor yang unik ke jaringan sasaran atau sel. Kebanyakan liposom yang aktif ke sasaran sistem penghantaran menggunakan ligan kopling kimia yang ada pada membran liposom.

Dengan menggunakan strategi ini, berbagai ligan atau reseptor seperti antibodi, faktor pertumbuhan, sitokin, hormon dan racun, dan diekspresikan pada permukaan liposom jadi obat-obat tersebut, protein dan asam nukleat mungkin dapat diperkenalkan ke dalam sel-sel yang dituju. (Huang A et al 1983)

Penelitian *in vitro* liposom yang tersalut dengan antibodi monoklonal dapat memberikan ikatan target spesifik terhadap sel. Namun, sejumlah masalah kunci harus diajukan sebelum liposom target aktif menggunakan interaksi ligan-reseptor dapat direalisasikan secara *in vivo*.

Sebagai tambahan terhadap antibodi, ligan lain seperti apo E (glikoprotein apolipoprotein E) yang memiliki afinitas yang tinggi terhadap ligan untuk reseptor LDL, dapat digabungkan kedalam liposom yang kecil ke sasaran sel tumor yang dapat mengekspresikan densitas yang tinggi reseptor LDL. Karena reseptor asam folat banyak terekspresi dalam sel kanker manusia, asam folat yang menempel pada liposom meningkatkan asupan dan internalisasi liposom oleh sel tumor. Dengan mengetahui bahwa sel tumor yang sedang tumbuh, sel tumor ini mengekspresikan reseptor transferin densitas tinggi (untuk asupan ion)

menyebabkan perkembangan sejumlah strategi untuk mengekspresikan transferin pada liposom dan meningkatkan penghantaran antrasiklin seperti adriamisin dan metotrexat menuju sel tumor secara *in vitro*.

Walaupun pendekatan ini dalam menempelkan antibodi, derivatnya dan ligan pada permukaan liposom akan memberikan selektivitas sasaran *in vitro* dan *in vivo*, biaya dan reproduisibilitas derivat ini dalam kualitas dan kuantitas yang memadai untuk pemakaian farmasi merupakan tantangan.

Prospek penggunaan derivat antibodi monoklonal, ScFv, menempel pada permukaan liposom ke sasaran jaringan dan sel yang lebih luas untuk pemakaian terapeutik mungkin dapat dipraktekkan. Secara teoritis asam amino mudah diasilasi oleh modifikasi pasca translasional pada inang bakteri dapat disisipkan ke dalam sekuens DNA yang berhubungan dengan daerah yang hipervariabel molekul FV untuk menghasilkan rekombinan ScFV yang telah diasilasi. Selanjutnya scFVs yang telah diasilasi dapat segera digabungkan ke dalam liposom dengan mudah dan dibutuhkan efisiensi untuk sediaan farmasi skala besar dengan sukses untuk scFV dengan spesifitas ke sasaran antigen yang lebih luas, termasuk sejumlah tumor yang berhubungan dengan antigen, faktor pertumbuhan sel endotel (misal VEGF, endostatin dsb) dan reseptor sel T (CD3, CD34, dsb) dapat direkayasa dengan cara skrining sistem

high throughput, termasuk penampilan teknologi faga. (Ho RJ et al 1986) Penggabungan asilasi antibodi dan peptida telah dicirikan dengan baik dan dibuktikan menjadi proses yang efisien.

PEMAKAIAN LAIN

Penghantaran vaksin

Mekanisme dimana liposom meningkatkan respon imun antigen spesifik belum dipahami dengan jelas. Dari penelitian disposisi liposom *in vivo*, jelas bahwa liposom yang berukuran besar akan diambil secara efisien oleh makrofag RES di dalam darah dan jaringan, termasuk hati dan limpa, karena makrofag dianggap menjadi predominan dan bertanggung jawab untuk proses yang berhubungan dengan liposom dan antigen enkapsulasi, formulasi liposom memberikan cara yang terbaik untuk meningkatkan penghantaran antigen dan presentasi baik humoral dan vaksin yang menstimulasi imun seluler. (Rao M, Alving CR 2000)

Pengaruh sifat fisikokimia liposom, seperti densitas muatan, fluiditas membran dan densitas epitop, pada respon imun antigen telah diteliti secara luas. Sebagai tambahan terhadap antigen, stimulator imun lain yang merupakan peptida muramil ampifilik atau lemak yang larut seperti monofosforil lipid A dan muramil tripeptidil fosfotidil etanolamin juga dapat digabungkan ke

dalam liposom untuk meningkatkan efek adjuvannya.

Belum lama ini vaksin baru hepatitis A berbasis liposom (Epaxal) dikembangkan oleh Lembaga Vaksin dan Serum Swiss dan telah diuji pada manusia. Vaksin ini mengandung partikel virus hepatitis A yang di inaktifkan dalam formalin yang ditempelkan pada gelembung fosfolipid bersama dengan virus influenza hematglutinin. Keuntungan seperti vaksin ini tidak saja menginduksi antibodi terhadap antigen hepatitis A tapi juga protein virus influenza yang berada di permukaan liposom.

Bila liposom yang mengandung protein atau antigen peptida yang terenkapsulasi diabsorpsi dengan aluminium hidroksida, peningkatan respon antibodi diamati dengan beberapa antigen, dimana dengan antigen lain adanya aluminium hidroksida juga tidak memberikan efek atau menyebabkan pengurangan respon antigen. Imunogenisitas protein atau antigen peptida dapat ditingkatkan dengan formulasi liposom yang mengandung lemak A dan tergantung pada antigen, dapat ditingkatkan lebih jauh dengan absorpsi formulasi antigen liposomal dengan garam aluminium.

Pada penelitian imunisasi kolesterol liposom dan imunostimulasi pada kelinci aterosklerosis yang diinduksi dengan diet tinggi kolesterol ternyata plak aterosklerosis tidak nampak pada aorta intima kelinci yang diimunisasi dengan kolesterol liposom.

TERAPI GEN

Walaupun sejumlah lipida kationik dan senyawa polimer kationik lain yang digunakan sebagai bahan kondensasi DNA untuk meningkatkan penghantaran plasmid DNA dan terapi gen, pengalaman usulan seperti itu bahwa tak satupun dari bahan itu nampak bermakna dan secara konsisten memperbaiki ekspresi penghantaran DNA oleh lipida kationik dibanding dengan hasil yang bebas, injeksi plasmid DNA asli. Walaupun pemberian intravena kompleks lipida-DNA akan mengurangi degradasi kecepatan DNA secara in vivo, derajat komplemen ikatan protein terhadap komponen kationik lipida akan mengurangi efisiensi transfeksi, dan dalam beberapa kasus, menghasilkan aktivasi komplemen. (Mahato RI et al 1997))

PENGHANTARAN OBAT ORAL

Penggunaan liposom dalam penghantaran obat oral telah lama diteliti dan dibahas belakangan ini. Tiga faktor destabilisasi utama seperti pH, garam empedu dan enzim pankreas ada dalam saluran cerna. Beberapa metoda permukaan membran polimerisasi kimia telah dikembangkan untuk menutupi liposom dan kandungannya dari lingkungan luar saluran cerna, namun, polimerisasi yang tidak lengkap dan toksisitas bahan residu dan derivatnya tetap menjadi perhatian. Secara alternatif, liposom dapat digunakan

sebagai bahan pensolubilisasi atau bahan pensuspensi untuk obat-obat yang sangat lipofilik dan praktis tidak larut untuk dihantarkan sebagai mikroemulsi pada kapsul gel lunak untuk sediaan oral. Mikroemulsi dalam bentuk kapsul gel lunak digunakan untuk meningkatkan reproduktibilitas dan bioavailabilitas siklosporin A, yang biasanya diformulasikan dalam tablet. Formulasi oral liposom-antigen dapat pula digunakan untuk merangsang respon kekebalan mukosal, meningkatkan penghantaran antigen ke antigen yang ada dalam sel-sel yang secara aktif mengambil partikel dalam saluran cerna. Manfaat tambahan menggunakan liposom untuk penggunaan seperti itu, termasuk biokompatibilitas, fleksibilitas dalam rancangan, perlindungan antigen, sasaran antigen ke antigen yang ada dalam sel, dan menginefektifkan stimulasi respon imun dengan penghantaran secara oral antigen yang larut.

Dalam penggunaan aerosol oral amphotericin B yaitu aerosol dalam liposom bermuatan netral menunjukkan hasil kecepatan eliminasi yang paling lambat. Dengan demikian amphotericin B bermuatan netral memiliki manfaat yang lebih lama karena memiliki waktu paruh yang lebih lama, sehingga membutuhkan frekuensi pemberian yang lebih sedikit, menurunkan biaya terapi serta meminimalkan efek samping.

ARAH MASA DEPAN

Pengembangan baru dalam rancangan molekul untuk ekspresi ligan atau molekul reseptor pada permukaan liposom akan memperbaiki interaksi liposom dengan sel. Perbaikan waktu tinggal liposom (karena menurunnya CL) akan memberikan kesempatan pada obat-obat yang berhubungan dengan liposom akhirnya mencapai sasaran tempat yang diinginkan.

Seperti tambahan ligan dengan afinitas yang lebih tinggi dan spesifitas yang kontinu untuk dikembangkan, dan kemajuan dibuat dalam rekayasa antibodi untuk memproduksi preparat liposom yang tepat sasaran, kompleks obat-liposom dengan terapeutik yang diperpanjang kini dapat terlaksana.

Belum lama ini, antibodi HER2 (terikat dengan erb2-produk onkogen pada sel tumor yang terpilih) yang ada pada liposom menunjukkan hasil yang mendukung dalam penelitian klinis. Jika hasil ini dapat dikonfirmasi dalam penelitian klinis pada manusia, kita segera dapat memiliki sistem penghantaran liposom yang tepat sasaran yang secara potensial dapat dibuat untuk formulasi obat-obat yang memiliki potensi yang tinggi dengan perbaikan yang bermakna pada keamanan dan efikasi. Pengembangan tambahan sensor biomembran yang berfungsi secara efektif (misal sensitif terhadap pH untuk penghantaran sitoplasmik, pengenalan membran ini

untuk penghantaran DNA ke inti) secara *in vivo* dalam lingkungan darah dan jaringan akan menambah secara bermakna dalam suksesnya penghantar obat-obat tidak hanya pada sel-sel tapi juga pada organel selektif di dalam sel-sel yang dituju, menggunakan *liposome drugs delivery systems*.

DAFTAR PUSTAKA

- Allen TM Hansen C Martin F Rademann C Yauyong A, 1991 , Liposomes containing syntetic lipid derivates of polyethylen glycol show prolonged circulation half lives *in vivo* , *Biochem Biophys Acta* 1066: 29-36.
- Bangham AD 1993, Liposome the Babraham connection *Chem Phys Lipids* 64 :275-285.
- Beauchamp C Dadonna PE, Menapace DP, 1984 Properties of Novel PRG derivatives of calf adenosine deaminase , *Adv Exp Med Biol* 165 : 447-52.
- Corvera E Mouritsen D Singer MA Zuckerman MJ, 1992. The Permeability and the effect of acylchain lenght for phospholipid bilayers containing cholesterol, Theory and experiment, *Biochim Biophys Acta* 1107: 261-270.
- Chon A, semple SC, Cullis PR, 1992 Association of Blood protein with large unilamellar liposomes *in vivo*. Relation to circulation lifetimes. *J Biol Chem* 267; 18759-18765.
- Ho RJ Rouse BT, Huang L, 1986. Target sensitive immunoliposomes: Preparatioi and characterization. *Biochemistry* 25 : 5500-5506
- Huang A , Kennel SJ , Huang L , 1983. Iteractions of immunoliposomes with target cells. *J Biol Chem* 285: m 1403-14040.
- Lasic DD 1998, Novel Application of liposomes, *Trend Biotechnol* 16: 307-327.
- Liu D, Liu F, Song YK, 1995. Recognition and clearance of liposomes containing phosphatidylserine are mediated by serum opsonin. *Biochim Biophys* 1235 : 140-146.
- Mahato RI , Rolland A, Tomlinson E, 1997, Cationic lipid based gene delivery systems : pharmaceutical perspectives. *Pharm Res* 14: 853-859.
- Rao M Alving CR 2000. Delivery of lipids and liposmomal proteins to the cytoplasm and Golgi of antigen presenting cells *Adv Drug Deliv Rev* 41 : 171-188.
- Senior J , Crawley JC, Gregoriadis G. 1985 Tissue distribution of liposomes exhibiting long half lives in the circulation after intravenous injection in rat serum *Biochem Biophys Acta* 839: 1-8.
- Sullivan SM, Huang L, 1986, Enhanced delivery to target cells by heat sensitive immunoliposomes *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 6117-6121.