Tampereen yliopisto

Noora Alastalo

LIPOSOMIT LÄÄKEAINEKULJETTIMINA SYÖVÄN HOIDOSSA

Kandidaatintyö
Tekniikan ja luonnontieteiden tiedekunta
Tarkastaja: Elina Vuorimaa-Laukkanen
Toukokuu 2025

TIIVISTELMÄ

Noora Alastalo: Liposomit lääkeainekuljettimina syövän hoidossa
Liposomes as drug carriers in cancer treatment
Kandidaatintyö
Tampereen yliopisto
Tekniikan ja luonnontieteiden tiedekunta
Toukokuu 2025

Syöpä on maailmanlaajuisesti yksi eniten kuolemia aiheuttava sairaus. Lääkehoidon suurimpia ongelmia ovat riittämätön teho sekä lääkkeiden epäspesifi kohdentuminen elimistössä. Epäspesifin kohdentumisen seurauksena myös terveet solut vaurioituvat syöpähoitojen aikana. Lääkehoidon tehoa ja kohdennusta on pyritty parantamaan erilaisilla lääkeainekuljettimilla. Lääkeainekuljettimella pyritään saamaan lääkeaine kohdennettua vain haluttuihin kohdesoluihin. Tehokkaalla lääkeaineen kohdennuksella lääkehoidon terapeuttinen teho paranee sekä haittavaikutukset terveissä kudoksissa vähenevät. Tämän työn tavoitteena on tarkastella liposomien soveltuvuutta lääkeainekuljettimina syövän hoidossa saatavilla olevan kirjallisuuden perusteella.

Liposomit muodostuvat fosfolipideistä, jotka järjestäytyvät vesiliuoksessa spontaanisti pallomaiseen rakenteeseen. Usein liposomien rakenteeseen lisätään kolesterolia, sillä se muun muassa tiivistää liposomien rakennetta vähentäen lääkeaineiden passiivista vuotoa. Liposomien biohajoavuus, bioyhteensopivuus ja vähäinen toksisuus luovat hyvän lähtökohdan liposomien hyödyntämiseen lääkeainekuljetuksessa. Elimistössä veren proteiinit kiinnittyvät herkästi fosfolipideistä ja kolesterolista koostuvien klassisten liposomien pintaan. Elimistön puolustusjärjestelmä kykenee siten tunnistamaan ja tuhoamaan liposomit. Hydrofiilisellä polyetyleeniglykolilla voidaan suojata liposomin pintaa proteiinien kiinnittymiseltä, jonka seurauksena myös kiertoaika elimistössä pitenee.

Liposomit pyritään kohdentamaan spesifisti syöpäkudokseen. Passiivinen kohdentaminen perustuu syöpäkudoksen verisuonten laajentuneisiin soluväleihin, joista liposomit pääsevät kulkeutumaan syöpäkudokseen. Heikentyneen imunestekierron vuoksi liposomit eivät siirry normaalisti takaisin verenkiertoon, jonka vuoksi ne kertyvät syöpäkudokseen. Passiivinen kohdennus ei kuitenkaan usein ole riittävä, jonka vuoksi aktiivista kohdentamista tarvitaan. Aktiivinen kohdennus hyödyntää syöpäsolujen taipumusta yli-ilmentää tiettyä reseptorityyppiä. Liposomeihin voidaan liittää spesifejä kohdeligandeja, jotka tunnistavat yli-ilmentyvän reseptorin.

Lääkeaineen vapauttaminen liposomista on yksi tärkeimmistä tekijöistä lääkeainekuljetuksessa. Lääkeaineen kontrolloitu ja oikea-aikainen vapautuminen on kuitenkin osoittautunut haasteelliseksi. Lääkeaineen vapauttamiseen on tutkittu erilaisten ärsykkeiden hyödyntämistä. Liposomeista voidaan esimerkiksi valmistaa lämpöherkkiä siten, että syöpäkudoksen hieman korkeampi lämpötila saa aikaan muutoksia fosfolipidikaksoiskerroksen läpäisevyyteen, jonka seurauksena lääkeaine pääsee vapautumaan liposomista. Lisäksi lääkeaineen vapauttamisessa voidaan hyödyntää ulkoisia ärsykkeitä, kuten valoa tai ultraääntä. Useissa tutkimuksissa onkin saatu lupaavia tuloksia ulkoisten ärsykkeiden hyödyntämisestä.

Liposomeilla on saatu parannettua lääkeaineiden kohdentumista syöpäsoluihin ja sitä kautta parannettua hoidon tehoa. Lisäksi lääkeaineen vapautuminen on ollut lupaavaa sekä *in vitro* että *in vivo* -tutkimuksissa ja lääkeaine on saatu vapautettua liposomista halutussa paikassa. Lääkeaineen kontrolloituun vapauttamiseen liittyy kuitenkin haasteita, joita ei ole pystytty vielä täysin ratkaisemaan. Tämän vuoksi lisää tutkimuksia tarvitaan etenkin lääkeaineen vapautumisesta ainoastaan kohdesoluissa sekä passiivisen vuodon minimoimisesta.

Avainsanat: liposomi, lääkeainekuljetus, syöpä.

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check –ohjelmalla.

Opinnäytteessäni käytetyt tekoälytyökalut ja niiden käyttötarkoitukset on kuvailtu alla:

Työkalun nimi (ja versio):
Microsoft 365 Copilot Chat

Käyttötarkoitus ja osio, jossa työkalua käytettiin:
Tekoälyä hyödynnettiin työssä käytettyjen lähteiden suomentamisen tukena.

Olen tietoinen siitä, että olen täysin vastuussa koko opinnäytteeni sisällöstä, mukaan lukien tekoälyllä tuotetut osat, ja hyväksyn vastuun mahdollisista eettisten ohjeiden rikkomuksista.

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO 1
2 LIPOSOMIT LÄÄKEAINEKULJETTIMINA 3
2.1 Rakenne 3
2.2 Luokittelu 4
2.3 Ominaisuudet 7
3 LIPOSOMIEN VALMISTAMINEN 10
4 LÄÄKEAINEEN LATAAMINEN 14
4.1 Syövän hoidossa käytettäviä lääkeaineita 14
4.2 Passiivinen lataaminen 15
4.3 Aktiivinen lataaminen 16
5 KOHDENTAMINEN SYÖPÄSOLUUN 17
5.1 Passiivinen kohdentaminen 17
5.2 Aktiivinen kohdentaminen 18
6 LÄÄKEAINEEN VAPAUTTAMINEN 20
6.1 Soluun otto 20
6.2 pH-herkät liposomit 21
6.3 Lämpöherkät liposomit 21
6.4 Valoaktivoituvat liposomit 23
6.5 Ultraäänellä aktivoituvat liposomit 26
6.6 Magneettisesti aktivoituvat liposomit 27
7 JOHTOPÄÄTÖKSET 28
LÄHTEET 31

1 JOHDANTO

Syöpä on yksi eniten kuolemia aiheuttava sairaus maailmanlaajuisesti. Väestön ikääntyessä on todennäköistä, että syöpää sairastavien määrä tulee kasvamaan entisestään. [1] Syöpälääkehoidon suurimpia ongelmia ovat riittämätön teho, sekä epäspesifisyys. Sytotoksisten lääkeaineiden epäspesifinen kohdentuminen syöpäsoluihin, johtaa terveiden solujen vaurioihin. [2] Epäspesifin kohdentumisen takia tehokkaista lääkeaineista huolimatta syöpälääkehoito on rajoittunutta [3]. Tästä syystä uusia, täsmällisemmin kohdistettuja, lääkeaineita tai lääkeainekuljettimia tarvitaan.

Liposomien soveltuvuutta lääkeainekuljettimina on tutkittu paljon viimeisten vuosikymmenten aikana [3,4]. Liposomit ovat osoittaneet merkittäviä terapeuttisia hyötyjä kliinisissä tutkimuksissa. Ensimmäinen liposomaalinen syöpälääke, Doxil®, hyväksyttiinkin kliiniseen käyttöön vuonna 1995. [4]

Liposomit muodostuvat fosfolipideistä, jotka järjestäytyvät vesiliuoksessa spontaanisti pallomaiseen rakenteeseen. Ne voivat koostua yhdestä tai useammasta fosfolipidikaksoiskerroksesta. [4] Liposomien koko ja fosfolipidikaksoiskerrosten lukumäärä on tärkeimmät ominaisuudet, jotka vaikuttavat esimerkiksi lääkeaineiden kapselointitehokkuuteen [5]. Liposomien hyviä puolia ovat muun muassa niiden itsejärjestäytynyt rakenne, biohajoavuus, bioyhteensopivuus, sekä vähäinen toksisuus. [4]

Liposomien rakenteeseen liitetyillä molekyyleillä, kuten kolesterolilla ja/tai polyetyleeniglykolilla, pyritään parantamaan esimerkiksi stabiiliutta ja kiertoaikaa elimistössä [5,6]. Rakenteeseen voidaan liittää myös spesifejä kohdeligandeja, joita voidaan hyödyntää liposomien kohdennuksessa syöpäsoluihin [4]. Liposomeja voidaan kohdentaa passiivisesti perustuen syöpäkudosten poikkeavaan verisuonitukseen tai aktiivisesti hyödyntämällä kohdeligandeja [7].

Kohdennuksen lisäksi lääkeaineen oikea-aikainen ja kontrolloitu vapautuminen on yksi tärkeimmistä tekijöistä, mutta myös suurimpia haasteita [3]. Esimerkiksi liian aikainen lääkeaineiden vapautuminen voi johtaa ei toivottuihin haittavaikutuksiin [5]. Vapautumista voidaan kontrolloida sisäisillä- ja ulkoisilla signaaleilla. Sisäisten signaalien hyödyntäminen perustuu esimerkiksi syöpäkudoksen korkeampaan lämpötilaan ja/tai alhaisempaan pH-arvoon. Ulkoisilla signaaleilla voidaan kontrolloida vapautumista halutussa

paikassa esimerkiksi infrapunavalon tai ultraäänen avulla. [3] Spesifillä liposomien kohdennuksella ja lääkeaineen vapauttamisella terapeuttinen teho syöpäkudoksissa lisääntyy ja terveisiin kudoksiin/soluihin kohdistuvat sytotoksiset haittavaikutukset vähenevät.

Tämän työn tavoitteena on tarkastella liposomien soveltuvuutta lääkeainekuljettimiksi syövän hoidossa. Työssä tutustutaan liposomeihin, niiden valmistamiseen ja kohdentamiseen syöpäsoluihin. Lisäksi tarkastellaan lääkeaineen lataamista liposomiin ja vapauttamista liposomista. Tavoitteena on myös pohtia liposomien käyttöön liittyviä haasteita ja mahdollisuuksia.

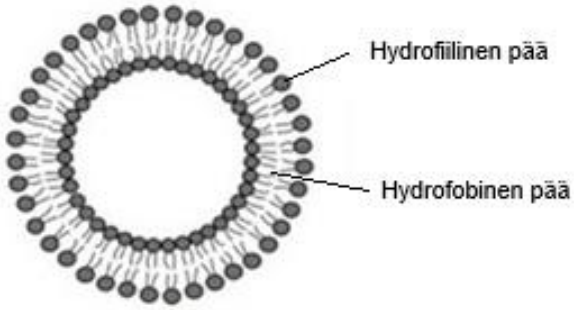
Luvussa 2 tarkastellaan liposomien rakennetta ja ominaisuuksia, jotka ovat oleellisia lääkeainekuljetuksessa. Näiden lisäksi luvussa perehdytään myös liposomien luokitteluun. Luvuissa 3 ja 4 esitellään liposomien tyypillisiä valmistusmekanismeja, sekä lääkeaineiden lataamista liposomeihin. Luvussa 5 tarkastellaan liposomien kohdentamista syöpäkudokseen passiivisella- ja aktiivisella menetelmällä. Luku 6 käsittelee lääkeaineen vapauttamista liposomista sisäisiä- ja ulkoisia ärsykkeitä hyödyntäen.

2 LIPOSOMIT LÄÄKEAINEKULJETTIMINA

Liposomien rakenne ja ainutlaatuiset ominaisuudet luovat niille hyvän perustan lääkeainekuljetukseen. Niiden avulla voidaan parantaa muun muassa lääkeaineiden kohdentumista vain haluttuihin kohdesoluihin. [4] Tämän seurauksena tarvittava lääkeainemäärä pienenee ja haittavaikutukset terveissä soluissa ja kudoksissa vähenevät. Tässä luvussa tutustutaan tarkemmin liposomien rakenteeseen ja lääkeainekuljetuksen kannalta olennaisiin ominaisuuksiin. Lisäksi tarkastellaan liposomien luokittelua.

2.1 Rakenne

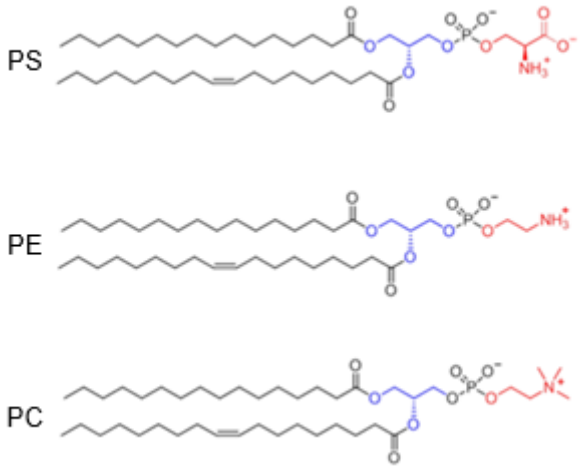
Liposomit ovat yhdestä tai useammasta fosfolipidikaksoiskerroksesta muodostuvia kalvorakkuloita eli vesikkeleitä. Fosfolipidit ovat amfifiilisia molekyylejä ja järjestäytyvät vesiliuoksessa spontaanisti pallomaiseen kaksoiskalvorakenteeseen (Kuva 1). [4,8] Fosfolipidin fosfaattipää on hydrofiilinen eli vesihakuinen ja hiilivetyhäntä hydrofobinen eli vesipakoinen. Molekyylien välisten vuorovaikutusten myötä hydrofiiliset fosfaattipäät asettuvat vesipintoja vasten ja hydrofobiset rasvahappoketjut vastakkain kalvon keskelle. [4,9]



Kuva 1. Liposomit muodostuvat fosfolipideistä niiden järjestäytyessä vesiliuoksessa spontaanisti pallomaiseen rakenteeseen. Hydrofiiliset päät asettuvat vesipintoja vasten ja hydrofobiset hännät vastakkain lipidikaksoiskalvon keskelle. Kuva muokattu lähteestä [4].

Fosfolipidit koostuvat glyserolirungosta, johon on sitoutunut kaksi rasvahappoketjua ja yksi fosfaattiryhmä [4,9]. Fosfaattiryhmään voi sitoutua glyserolin lisäksi toinen molekyyli, joka määrittää fosfolipidin kokonaisvarauksen (Kuva 2). Näin ollen fosfolipidit voivat olla negatiivisesti tai positiivisesti varautuneita tai neutraaleja. [4,10] Neutraaleja fosfolipidejä ovat muun muassa fosfatidyylikoliini (PC) ja fosfatidyylietanoliamiini (PE). Nega-

tiivisesti varautuneita fosfolipidejä ovat esimerkiksi fosfatidyyliseriini (PS), fosfatidyyliglyseroli (PG) ja fosfatidihappo (PA). Positiivisesti varautuneita liposomeja voidaan valmistaa lisäämällä fosfolipidikaksoiskerrokseen esimerkiksi positiivisesti varautunutta steryyliamiinia, dioleyylidimetyyliammoniumpropaanidiolia (DOPAD) tai trietyyliammoniumpropaania (TAP). [10,11]

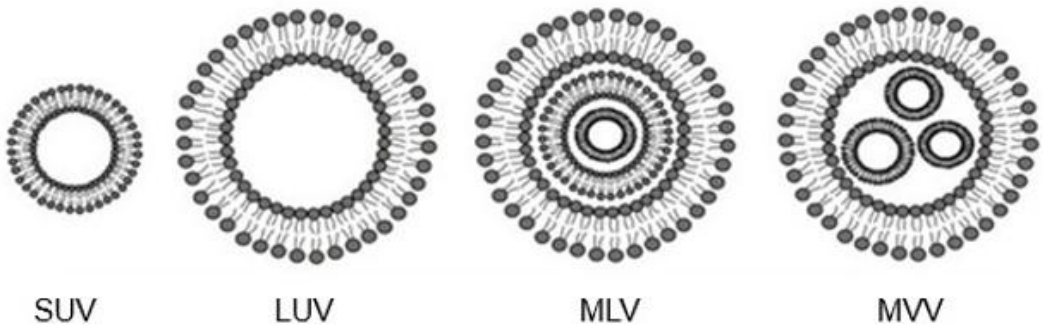


Kuva 2. Liposomit voivat muodostua muun muassa fosfatidyyliseriinistä (PS), fosfatidyylietanoliamiinista (PE) ja/tai fosfatidyylikoliinista (PC). PE ja PC ovat kahtaisioneja, joilla on neutraali kokonaisvaraus pH:ssa 7. PS on puolestaan negatiivisesti varautunut samalla pH-arvolla. Kuva muokattu lähteestä [12].

Liposomien rakenteessa voidaan käyttää luonnollisia tai synteettisiä fosfolipidejä [5]. Luonnollisia fosfolipidejä esiintyy nisäkkäiden solukalvoissa. Yleisimpiä solukalvoissa esiintyviä fosfolipidejä ovat PC ja PE. [13] PC on liposomeissa yleisin käytetty fosfolipidi, joka voidaan valmistaa myös synteettisesti [14]. Luonnolliset ja synteettiset fosfolipidit ovat biologisilta ominaisuuksiltaan ja rakenteeltaan samankaltaiset. Synteettisten fosfolipidien etuja ovat muun muassa puhtaus, saatavuus sekä kustannustehokkuus. [5]

2.2 Luokittelu

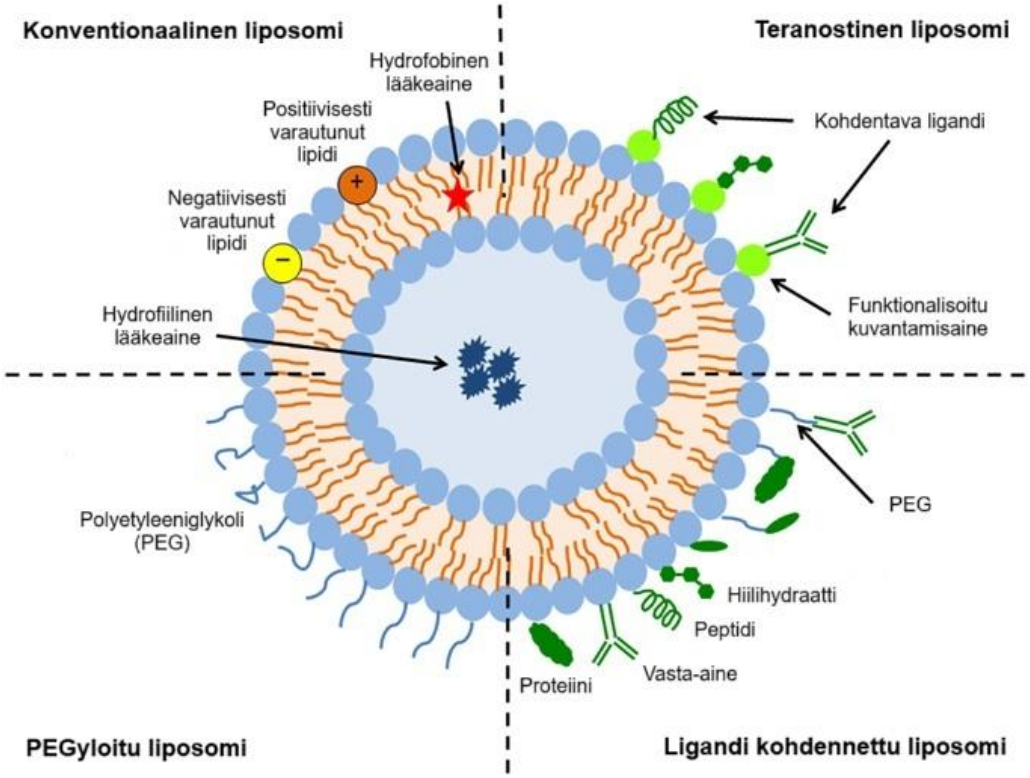
Liposomeja voidaan luokitella koon ja lamellaarisuuden mukaan kolmeen luokkaan: unilamellaarisiin (ULV), multilamellaarisiin (MLV, > 500 nm) ja multivesikulaarisiin (MVV, > 1000 nm) vesikkeleihin (Kuva 3) [4,7]. Unilamellaariset liposomit voidaan jakaa vielä kolmeen alaluokkaan niiden koon mukaisesti pieniin (SUV, ≤ 100 nm), suuriin (LUV, > 100 nm) ja valtaviin (GUV, > 1000 nm) vesikkeleihin [4]. Multilamellaariset vesikkelit muodostuvat useammasta kuin yhdestä fosfolipidikaksoiskerroksesta. Puolestaan multivesikulaarisissa vesikkeleissä suurempi liposomi on kapseloinut useita pienempiä liposomeja kaksoiskalvorakenteen rajaamaan vesiytimeen. [4,7]



Kuva 3. Liposomit voidaan luokitella koon ja lamellaarisuuden mukaan pieniin unilamellaarisiin (SUV), suuriin unilamellaarisiin (GUV), multilamellaarisiin (MLV) ja multivesikulaarisiin (MVV) vesikkeleihin. Kuva muokattu lähteestä [4].

Liposomin järjestäytyneen rakenteen vuoksi ne soveltuvat monien liukoisuudeltaan erilaisten molekyylien kuljettamiseen. Hydrofiiliset lääkeaineet hakeutuvat lipidikaksoiskerroksen muodostaman rakkulan vesipitoiseen ytimeen. Hydrofobiset lääkeaineet puolestaan fosfolipidikaksoiskerrokseen. [6] Unilamellaarisilla vesikkeleillä vesiytimen tilavuus on suurempi verrattuna multilamellaarisiin vesikkeleihin. Tämän vuoksi unilamellaariset vesikkelit soveltuvat paremmin hydrofiilisten lääkeaineiden kapseloimiseen. Multilamellaariset vesikkelit sisältävät enemmän kapselointitilaa hydrofobisille lääkeaineille. [4] Liposomin koko vaikuttaa muun muassa liposomien eliminaationopeuteen elimistössä. Suuret liposomit eliminoituvat nopeammin verrattuna pieniin liposomeihin. Koolla on myös vaikutusta liposomien kulkeutumiseen syöpäkudoksiin. [14]

Liposomeja voidaankin luokitella myös perustuen niiden lääkeainekuljetusominaisuuksiin (Kuva 4). Liposomien ominaisuudet riippuvat käytetyistä fosfolipideistä sekä liposomin pintaan kiinnitetyistä muista molekyyleistä [5]. Lääkeaineiden kuljettaminen liposomaalisessa kuoressa suojaa lääkeainetta elimistön vapaiden radikaalien aiheuttamalta hajoamiselta, parantaa lääkeaineen kohdentumista sekä vähentää haittavaikutuksia elimistön terveissä kudoksissa [15].



Kuva 4. Liposomin ominaisuuksiin voidaan vaikuttaa fosfolipidien varausten, liposomin pintaan kiinnitettyjen polymeerien sekä erilaisten kohdentavien ligandien avulla. Kuva muokattu lähteestä [6].

Konventionaalisten/klassisten liposomien fosfolipidikaksoiskerros muodostuu neutraaleista, positiivisesti- ja/tai negatiivisesti varautuneista fosfolipideistä, sekä kolesterolista. Klassiset liposomit vähentävät lääkeaineiden toksisia vaikutuksia elimistössä. Klassisten liposomien käyttöä lääkeainekuljettimina kuitenkin rajoittaa niiden nopea eliminaatio elimistössä. Liposomin kulkeutuessa verenkierrossa sen pintaan kiinnittyy proteiineja, jonka myötä elimistön puolustusjärjestelmään kuuluvat makrofagit tunnistavat ja tuhoavat liposomit. Opsonisaatioksi kutsutaan sitä, kun makrofagit tunnistavat liposomit niiden pintaan kiinnittyneiden proteiinien välityksellä. [6] Klassiset liposomit hajoavat elimistössä herkästi myös pH:n ja entsyymien vaikutuksesta [16].

Steerisesti stabiilien liposomien pinnalla on suojaava kerros, mikä vähentää veren proteiinien kiinnittymistä fosfolipidikaksoiskerrokseen. Tällöin makrofagit eivät tunnista liposomeja ja opsonisaatio vähenee. [6,17] Liposomin suojana käytetään eniten polyetyleeniglykolia (PEG), jonka vuoksi liposomeja kutsutaan usein myös PEGyloiduiksi liposomeiksi. PEG on hydrofiilinen polymeeri, joka parantaa liposomien stabiiliuutta sekä lisää niiden kiertoaikaa elimistössä. [6,18] PEGyloidun liposomin kiertoaika elimistössä riippuu polymeerin molekyylipainosta eli pituudesta, sekä polymeerin määrästä lipo-

somissa eli polymeerikonsentraatiosta [18]. PEG:llä on ainutlaatuisia ominaisuuksia, joiden vuoksi se soveltuu hyvin lääkeainekuljettimeksi. PEG ei ole toksinen, se liukenee niin poolisiin kuin poolittomiin liuottimiin, sekä lopulta poistuu elimistöstä. [19] PEG-ketjut voivat kuitenkin vaikeuttaa liposomin kulkeutumista kohdesolun sisälle sekä häiritä lääkeaineen vapauttamista liposomista [20].

Liposomin pintaan tai PEG ketjuun voidaan kiinnittää myös spesifejä ligandeja, jolloin niitä kutsutaan ligandi kohdennetuiksi liposomeiksi [14,21]. Spesifit ligandit auttavat tunnistamaan kohdesolun, kuten syöpäsolun [21]. Ligandikohdennettuja liposomeja hyödynnetäänkin yleisesti aktiivisessa kohdennuksessa. Spesifit ligandit kiinnittyvät niitä kohdentaviin reseptoreihin. Erilaiset syöpäsolut voivat yli-ilmentää tiettyä reseptoria, kuten transferriini- tai folaattireseptoria. Yli-ilmentävien reseptorien avulla voidaan aktiivisesti kohdentaa liposomeja syöpäkudokseen. [7]

Liposomeissa käytettyjä ligandeja ovat esimerkiksi vasta-aineet, peptidit, proteiinit ja hiilihydraatit. Vasta-aineet ovat yksi monipuolisimmista ligandeista. Ne ovat stabiileja ja niillä on kaksi sitoutumiskohtaa. Ligandit voidaan yhdistää myös PEGyloituun liposomiin, jolloin saadaan stabiilimpia liposomeja. [6] PEG ketju voi kuitenkin häiritä ligandin ja kohdereseptorin välisiä vuorovaikutuksia, joka voi vaikuttaa liposomien soluun ottoon reseptorivälitteisellä endosytoosilla [20,21]. Sitä voidaan kuitenkin hillitä liittämällä ligandi PEG ketjun päähän [20].

Teranostisissa liposomeissa on sekä kohdentava ligandi että kuvantamisaine, kuten rautaoksidi tai kvanttipiste (quantum dot) [6,22]. Kuvantamisaine voidaan liittää liposomin pintaan tai kapseloida liposomiin [22]. Teranostiset liposomit yhdistävät diagnostiikan ja terapeuttisen lääkehoidon [6]. Niitä voidaan hyödyntää erilaisissa kuvantamismenetelmissä, mutta myös sairauksien seurannassa ja hoidossa [5].

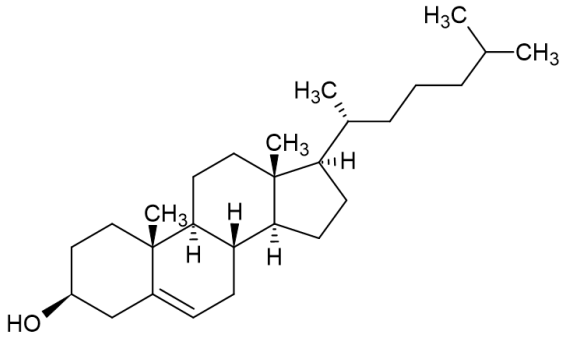
2.3 Ominaisuudet

Liposomeille tyypillisiä ominaisuuksia ovat biohajoavuus, bioyhteensopivuus ja vähäinen toksisuus, joiden vuoksi ne soveltuvat hyvin lääkeaineiden kuljetukseen [15]. Liposomin koko ja fosfolipidikaksoiskerrosten lukumäärä eli lamellaarisuus ovat kaksi tärkeintä lääkeainekuljetukseen vaikuttavaa ominaisuutta. Koko ja lamellaarisuus puolestaan vaikuttavat lääkeaineen kapselointitehokkuuteen sekä liposomin kiertoaikaan elimistössä. [5] Kapselointitehokkuus kuvaa liposomin sisälle kapseloituneen lääkeaineen määrää suhteessa käytettyyn lääkeaineen määrään. Kapselointitehokkuutta voidaan hyödyntää tarkasteltaessa liposomin soveltuvuutta lääkeainekuljettimeksi. [23]

Liposomin pinnan fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia, kuten varausta ja kalvon läpäisevyyttä, voidaan kontrolloida muokkaamalla fosfolipidien moolisuhdetta [21]. Liposomien kokonaisvarausta kuvataan usein zeta-potentiaalilla [4]. Siihen vaikuttaa liposomin rakenteen fosfolipidikoostumus sekä muut liitetyt molekyylit [4,23]. Zeta-potentiaalia voidaan käyttää liposomien stabiilisuuden ennustamiseen sitä ympäröivässä väliaineessa. [4] Yleensä neutraalit ja alhaisen zeta-potentiaalin omaavat liposomit aggregoituvat herkästi ja ovat siten epästabiileja lääkeainekuljettimia [4,23].

Kalvon läpäisevyyteen vaikuttaa fosfolipideille ominainen faasitransitiolämpötila. Faasitransitiolämpötilassa fosfolipidit muuttuvat geelifaasista nestemäiseen kidefaasiin. [4] Fosfolipidit ovat geelifaasissa lämpötilan ollessa alle faasitransitiolämpötilan. Tällöin rasvahappopäät ovat tiiviimmin järjestäytyneet ja kalvon läpäisevyys on alhainen. Faasitransitiolämpötilan yläpuolella fosfolipidit ovat nestemäisessä kidetilassa, jolloin fosfolipidit ovat löyhemmin järjestäytyneet ja kalvo hieman läpäisevämpi [4,14]. Lähellä faasitransitiolämpötilaa, jolloin fosfolipidit ovat siirtymässä geelifaasista nestemäiseen kidefaasiin, kalvon läpäisevyys on suurempi. Faasitransitiolämpötilaan vaikuttaa fosfolipidien rasvahappoketjujen pituus. Pidemmät rasvahappoketjut muodostavat enemmän heikkoja molekyylien välisiä voimia, jolloin fosfolipidikaksoiskerros on rakenteeltaan jäykempi ja läpäisee vähemmän molekyylejä, kuten lääkeaineita. [4] Fosfolipideillä, joissa on pidemmät rasvahappoketjut, on siis korkeampi faasitransitiolämpötila.

Liposomin ominaisuuksia voidaan muokata lisäämällä rakenteeseen muita molekyylejä, kuten polysakkarideja, steroleja tai muita pinta-aktiivisia aineita [5]. Kolesteroli (Kuva 5) on steroleihin luokiteltu luonnollinen lipidi, joka on tärkeä liposomien komponentti [5,14]. Liposomin rakenteen modifikaatioilla pyritään parantamaan muun muassa kapselointitehokkuutta ja liposomin kohdistusta haluttuun kohdesoluun sekä vähentämään haittavaikutuksia terveissä kudoksissa [5].



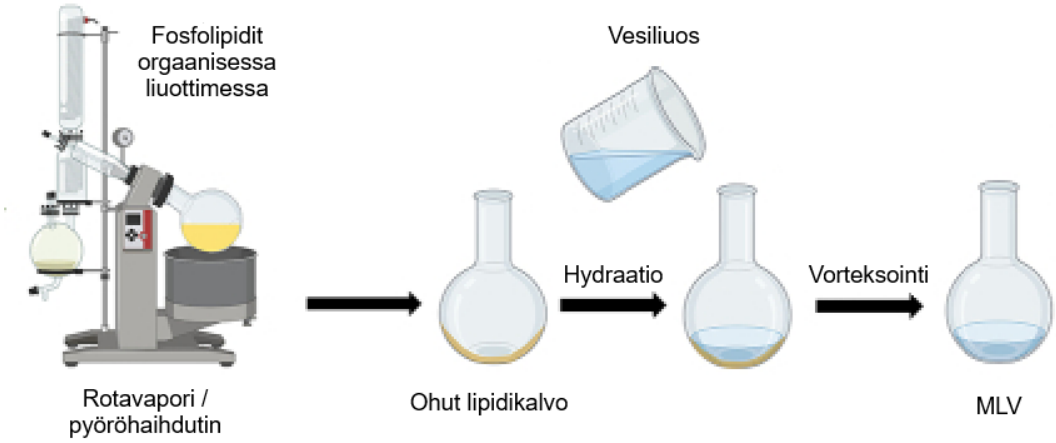
Kuva 5. Kolesterolin rakennekaava. Kolesterolissa on hydrofobinen hiilivetyketju ja hydrofiilinen alkoholiryhmä, jotka ovat sitoutuneena tasomaiseen rengasrakenteiseen steroidirunkoon.

Kolesterolia lisätään usein lääkeainekuljetuksessa käytettyihin liposomeihin, sillä se muun muassa parantaa liposomien stabiiliutta [24]. Kolesteroli edesauttaa myös fosfolipidien järjestäytymistä liposomeille tyypilliseen pallomaiseen rakenteeseen [10]. Faasitransitiolämpötilan alapuolella kolesteroli vähentää fosfolipidien järjestäytyneisyyttä ja tekee fosfolipidikalvosta hieman läpäisevämmän [14]. Puolestaan faasitransitiolämpötilan yläpuolella kolesteroli jäykistää liposomin nestemäistä fosfolipidikalvoa vähentämällä fosfolipidien rasvahappoketjujen kiertymistä [14,18]. Fosfolipidikaksoiskerros on kolesterolin vaikutuksesta tiiviimpi, jolloin lääkeaineiden läpäisevyys vähenee [18,25]. Edellä mainittujen ominaisuuksien vuoksi se on tärkeä komponentti liposomin rakenteessa, sillä se pidentää liposomin kiertoaikaa elimistössä sekä vähentää lääkeaineiden passiivista vuotoa.

3 LIPOSOMIEN VALMISTAMINEN

Liposomien valmistamisessa voidaan käyttää useita eri menetelmiä, joista yleisimpiä on esitetty taulukossa 1 [4,26]. Menetelmän valinnalla vaikutetaan muun muassa liposomin lopullisiin ominaisuuksiin, kuten kokoon, lamellaarisuuteen ja kapselointitehokkuuteen [4]. Tässä luvussa käsitellään tarkemmin ohutkalvon hydraatiota ja käänteisfaasin haihdutusta sekä liposomien koon pienentämiseen käytettäviä menetelmiä, ekstruusiota ja sonikaatiota.

Ohutkalvon hydraatio on yksi yleisimmistä menetelmistä liposomien valmistuksessa [5]. Ohutkalvon hydraatio tunnetaan myös nimellä Bangham-menetelmä [4]. Menetelmässä fosfolipidit liuotetaan orgaaniseen liuottimeen, yleensä kloroformiin, eetteriin tai metanoliin. Sen jälkeen orgaaninen liuotin haihdutetaan pyöröhaihduttimessa, jolloin muodostuu ohut lipidikalvo pyörökolvin pohjalle. Haihdutuksen jälkeen lipidikalvo hydratoidaan. Pyörökolviin lisätään siis vesiliuos, jolloin fosfolipidit järjestäytyvät spontaanisti liposomeiksi. [4,5] Hydraation aikana lämpötilan tulee olla korkeampi kuin käytetyn fosfolipidin faasitransitiolämpötila. Hydraation aikainen ravistelu muodostaa erikokoisia multilamellaarisia vesikkeleitä. Multilamellaaristen liposomien kokoa ja lamellaarisuutta voidaan pienentää mekaanisilla menetelmillä, kuten ekstruusiolla ja sonikaatiolla. [5] Kuvassa 6 havainnollistetaan ohutkalvon hydraatio -menetelmän vaiheet.



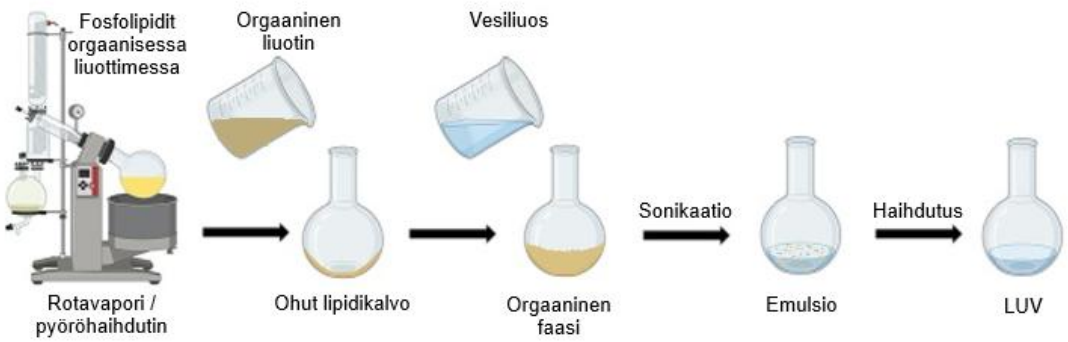
Kuva 6. Liposomien valmistus ohutkalvon hydraatio -menetelmällä. Kuva muokattu lähteestä [27].

Taulukko 1. Yleisimpiä liposomien valmistusmenetelmiä ja niihin liittyviä ominaisuuksia. Menetelmän valinta vaikuttaa muodostuneiden liposomien kokoon ja lamellaarisuuteen.

Valmistus-menetelmä	Ominaisuudet	Liposomi	Lähde
Ohutkalvon hydraatio	Fosfolipidit liuotetaan orgaaniseen liuottimeen, joka haihdutetaan hitaasti pois, jolloin muodostuu ohut lipidikalvo. Lipidikalvon hydraation ja vorteksoinnin jälkeen muodostuu MLV. Yleinen ja yksinkertainen menetelmä. Hydrofiilisille lääkeaineille melko alhainen kapselointitehokkuus ilman aktiivista lataamista. Menetelmän käyttö on haastavaa teollisessa mittakaavassa.	MLV	[4,5, 10,19]
Käänteis-faasin haihdutus	Menetelmässä muodostetaan emulsio sonikoimalla seos, joka koostuu fosfolipidit sisältävästä orgaanisesta faasista ja vesifaasista. Lopulta emulsiosta haihdutetaan orgaaninen liuotin hitaasti pois. Menetelmällä saadaan muodostettua suurempi liposomin sisäinen vesiydin verrattuna ohutkalvon hydraatioon. Menetelmän haasteena on tuottaa liposomeja suuressa mittakaavassa.	LUV	[4,10, 28]
Ekstruusio	MLV lamellaarisuuden ja koon pienentäminen polykarbonaattikalvon läpi puristamalla. Menetelmällä on helppo kontrolloida liposomien kokojakaumaa.	LUV / SUV	[29]
Sonikaatio	MLV lamellaarisuuden ja koon pienentäminen ultraäänikäsittelyllä. Yksinkertainen menetelmä, mutta kokojakauman kontrollointi haastavampaa verrattuna ekstruusioon. Sonikaatiota käyttäessä saavutetaan myös matalampi kapselointitehokkuus.	SUV	[29]
Etanoli-injektio	Etanoliin liuotetut fosfolipidit injektoidaan nopeasti esilämmitettyyn vesifaasiin. Yksinkertainen ja nopea menetelmä, joka on helppo toistaa. Etanolin poistaminen lopputuotteesta voi olla haasteellista. Menetelmällä on alhainen kapselointitehokkuus hydrofiilisille lääkeaineille.	LUV / SUV / MLV	[4,28, 29]
Eetteri-injektio	Fosfolipidit liuotetaan eetteriin, jonka jälkeen se injektoidaan hitaasti 55-65 °C lämmitettyyn vesifaasiin. Orgaaninen liuotin haihdutetaan prosessin aikana. Menetelmässä muodostuu herkästi vaihtelevan kokoisia liposomeja.	SUV / LUV / MLV	[28,29]
Kylmäkuivaus eli lyofilisaatio	Liposomit voidaan kylmäkuivata säilyvyyden parantamiseksi. Liposomiliuoksen vesifaasi ensin jäädytetään ja sen jälkeen se poistetaan sublimoimalla. Kylmäkuivatut liposomit tulee säilyttää ilmatiiviissä astioissa.	SUV	[26,28]

Ohutkalvon hydraatiossa vesiliuoksen tilavuus vaikuttaa muodostuvien liposomien ominaisuuksiin. Suuret tilavuudet johtavat multilamellaaristen liposomien muodostumiseen. Hydraation nopeus puolestaan vaikuttaa kapselointitehokkuuteen. Korkeampi kapselointitehokkuus saadaan hitaammalla hydraationopeudella. [5] Olosuhteita muuttamalla voidaan vaikuttaa liposomien kokoon ja lamellaarisuuteen. [4,5] Ohutkalvon hydraatiossa haasteeksi muodostuu liposomien valmistus teollisessa mittakaavassa [10].

Käänteisfaasin haihdutus on vaihtoehtoinen menetelmä liposomien valmistukseen (Kuva 7) [4,10]. Myös käänteisfaasihaihdutuksessa fosfolipidit liuotetaan orgaaniseen liuottimeen, jonka jälkeen orgaaninen liuotin haihdutetaan, jolloin muodostuu ohut lipidikalvo [4]. Orgaanisena liuottimena käytetään usein kloroformia [30]. Ohut lipidikalvo liuotetaan uudelleen orgaaniseen liuottimeen [4]. Lipidikalvon sisältämä orgaaninen liuotin ja vesiliuos sekoitetaan keskenään, jolloin muodostuu vesi-öljyssä-emulsio. [4,10] Vesi-öljyemulsiossa vesi on pisaroina öljyssä. Homogeenisen emulsion ja käänteisten misellien muodostamiseksi seos ultraäänikäsitellään [4]. Lopulta orgaaninen liuotin haihdutetaan hitaasti pois ja fosfolipidit järjestäytyvät pallomaiseen rakenteeseen [30].



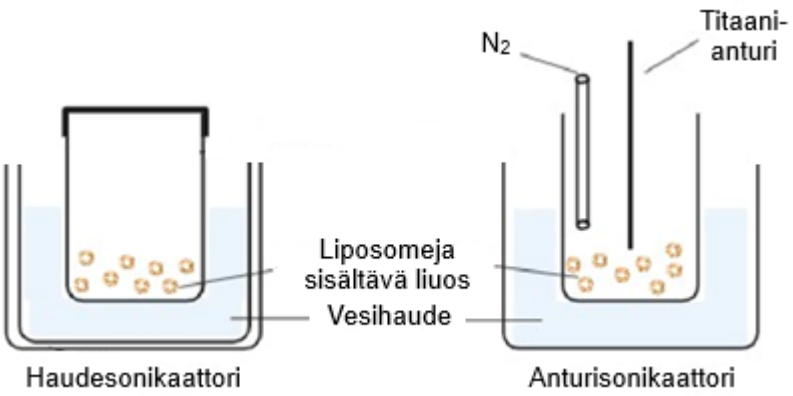
Kuva 7. Liposomien valmistus käänteisfaasin haihdutus -menetelmällä. Kuva muokattu lähteestä [27].

Käänteisfaasihaihdutus -menetelmällä voidaan saavuttaa suurempi kapselointitehokkuus, etenkin hydrofiilisille lääkeaineille, verrattuna ohutkalvon hydraatioon [4,10,30]. Menetelmän hyödyntäminen teollisessa mittakaavassa on kuitenkin haastavaa monimutkaisen valmistusprosessin vuoksi [10,30].

Multilamellaaristen ja suurien liposomien kokoa voidaan pienentää mekaanisesti esimerkiksi ekstruusiolla. Ekstruusio on menetelmä, jolla voidaan tuottaa unilamellaarisia vesikkeleitä. Multilamellaariset vesikkelit puristetaan polykarbonaattikalvon läpi kohotetussa lämpötilassa siten, että huokoskoko pienenee asteittain. Huokoskokoina voidaan käyttää esimerkiksi 50–200 nm. Ekstruusio toistetaan kussakin huokoskoossa viidestä kymmeneen kertaan, kunnes saavutetaan haluttu koko. [26] Huokoskoon lisäksi painetta

kontrolloimalla voidaan vaikuttaa syntyvien liposomien kokoon. Huokoskokoa ja painetta säätelemällä saadaan muodostettua joko pieniä tai suuria unilamellaarisia vesikkeleitä. Ekstruusiolla saadaan helposti hallittua liposomien kokojakaumaa. [29]

Sonikaatio, eli ultraäänikäsittely, on yksinkertainen menetelmä liposomien koon pienentämiseen [5,26]. Menetelmässä voidaan käyttää joko haudesonikaattoria (bath sonicator) tai anturisonikaattoria (probe sonicator) (Kuva 8). Anturisonikaattoria käytettäessä saadaan kohdistettua liposomeja sisältävään liuokseen suurempi energia ja ne ovat siten nopeampia. Menetelmässä on kuitenkin suurempi kontaminaatioriski. [8,14] Haudesonikaattorilla puolestaan lämpötilan kontrollointi on helpompaa ja käsittely voidaan suorittaa steriilisti. [8] Haudesonikaattorilla voidaan myös käsitellä suurempia määriä kerralla [14].



Kuva 8. Sonikaatiossa voidaan käyttää haudesonikaattoria tai anturisonikaattoria. Kuva muokattu lähteestä [31].

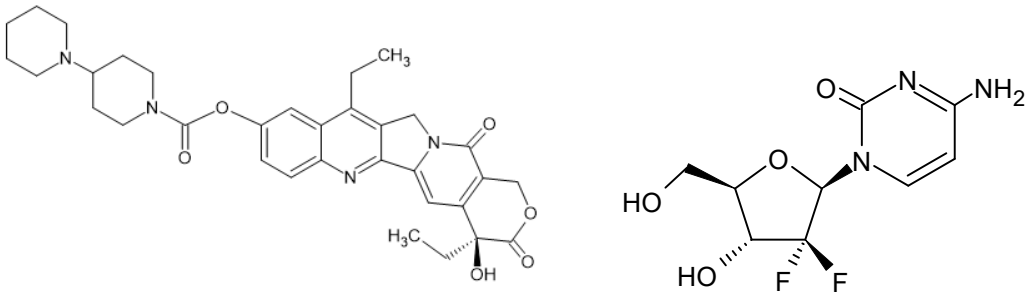
Sonikaatiossa tuotetaan usein 20–50 nm kokoisia unilamellaarisia vesikkeleitä. Fosfolipidien ominaisuudet vaikuttavat liposomien lopulliseen kokoon. [29] Etenkin suuressa mittakaavassa sonikaatio voi olla helpompi ja kätevämpi tapa pienentää kokojakaumaa verrattuna ekstruusioon. Sonikaation heikkoutena voidaan kuitenkin pitää epätasaisempaa kokojakaumaa, sekä alhaisempaa lääkeaineiden kapselointitehokkuutta. Lisäksi sonikaatiossa syntyvä lämpö voi vahingoittaa lipidejä ja/tai kapseloituja lääkeaineita. [5]

4 LÄÄKEAINEEN LATAAMINEN

Lääkeaine voidaan ladata liposomiin passiivisella tai aktiivisella menetelmällä [4,15]. Sopivan menetelmän valintaa riippuu useista eri tekijöistä, kuten lääkeaineen liukoisuudesta, lääkeaine/lipidi -suhteesta, kustannustehokkuudesta, sekä liposomin stabiiliuudesta. [4] Lääkeaineiden kemiallisten rakenteiden perusteella ne voidaan jakaa hydrofiilisiin ja hydrofobisiin lääkeaineisiin. Hydrofiilisille lääkeaineille on tyypillistä hakeutua liposomin vesiytimeen, kun taas hydrofobiset lääkeaineet kertyvät fosfolipidikaksoiskerrokseen [6]. Tässä luvussa tutustutaan muutamiin syövän hoidossa käytettyihin lääkeaineisiin. Lisäksi tarkastellaan lääkeaineen passiivista ja aktiivista lataamista.

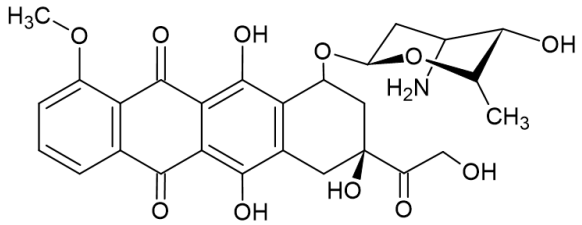
4.1 Syövän hoidossa käytettäviä lääkeaineita

Syövän hoidossa käytettäviä hydrofiilisia lääkeaineita ovat esimerkiksi irinotekaani ja gemsitabiini (Kuva 9) [2,32]. Hydrofiiliset lääkeaineet läpäisevät heikosti solukalvoja, mikä vaikuttaa niiden terapeuttiseen tehoon [32]. Irinotekaani luokitellaan topoisomeraasi I:n estäjiin. Topoisomeraasit ovat entsyymejä, jotka vaikuttavat DNA:n synteesiin. Liposomaalista irinotekaania käytetään haimasyövän hoidossa. Antimetaboliitteihin luokitellun gemsitabiinin vaikutus perustuu DNA:n synteesin estämiseen. [2]



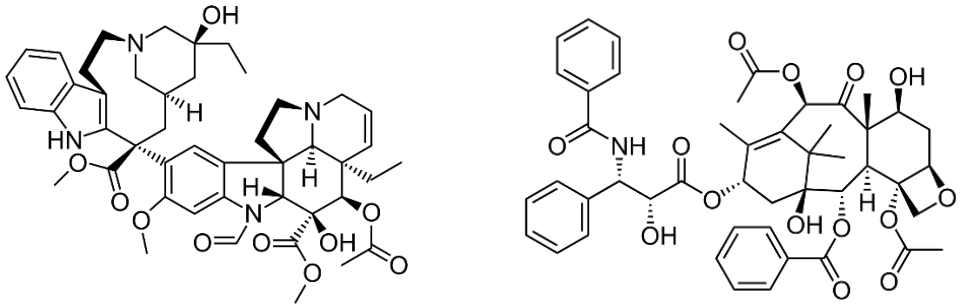
Kuva 9. Irinotekaanin rakenne vasemmalla ja gemsitabiini oikealla. Molemmat lääkeaineista ovat hydrofiilisiä.

Doksorubisiinia sisältävä liposomaalinen valmiste, Doxil®/Caelyx®, on ensimmäinen FDA:n ja EMA:n kliinisesti hyväksymä liposomaalinen lääkevalmiste [4]. Doksorubisiinilla (Kuva 10) on sekä hydrofobisia että hydrofiilisia ominaisuuksia [2]. Doksorubisiinia käytetään yleensä hydrokloridimuodossa, jolloin se käyttäytyy hydrofiilisena aineena [33,34]. Antrasykliineihin luokiteltu doksorubisiini kykenee asettumaan DNA-ketjujen väliin hydrofobisen rengasrakenteen ansiosta ja kiinnittymään DNA:n ja topoisomeraasi II:n muodostamaan kompleksiin. Näin entsyymin toiminta estyy ja DNA:n kopioituminen pysähtyy. [2]



Kuva 10. Doksorubisiinin rakenne. Doksorubisiinin rakenteessa nelirenkainen antrakinoniosa ja siihen liittynyt daunosamiinisokeri.

Hydrofobiset lääkeaineet aggregoituvat herkästi verenkierrossa, jonka vuoksi niiden terapeuttinen teho heikentyy. Hydrofobisia lääkeaineita ovat esimerkiksi paklitakseli ja vinkristiini (Kuva 11). [32] Molempien vaikutus perustuu mitoosin estoon [2].



Kuva 11. Hydrofobiset lääkeaineet vinkristiini (vasemmalla) ja paklitakseli (oikealla). Vinkristiinin kuva lähteestä [35] ja paklitakselin kuva lähteestä [36].

Paklitakseli luokitellaan taksaaneihin ja sitä käytetään muun muassa rinta- ja munasarjasyövän hoidossa [2]. Vinkristiini lukeutuu puolestaan vinka-alkaloideihin ja sitä käytetään yleensä kliinisesti vinkristiinisulfaattina [2,37]. Vinkristiinin käyttökohteita ovat esimerkiksi akuutti lymfaattinen leukemia ja rintasyöpä [37].

4.2 Passiivinen lataaminen

Passiivisessa kapselointimenetelmässä lääkeaine ladataan liposomiin samalla, kun fosfolipidit järjestäytyvät liposomeille ominaiseen pallomaiseen kaksoiskalvorakenteeseen. Lääkeaineen lataus ja liposomin valmistus suoritetaan siis samanaikaisesti. [15,38] Luvussa 3 käsiteltiin liposomien yleisimpiä valmistusmenetelmiä. Liposomien valmistuksessa hydrofiiliset lääkeaineet liuotetaan vesifaasiin ja ne jakautuvat liposomin ulkoiseen ja sisäiseen vesifaasiin. Hydrofobiset lääkeaineet liuotetaan puolestaan orgaaniseen liuottimeen ja ne hakeutuvat fosfolipidikaksoiskalvoon. [30] Lääkeaineen kapselointitehok-

kuuteen vaikuttaa useita eri tekijöitä, kuten lääkeaineen liukoisuus, liposomin koko, fosfolipidikonsentraatio sekä käytetty valmistusmenetelmä [38]. Myös lääkeaineen varaus vaikuttaa kapselointitehokkuuteen, sillä varauksettomat lääkeaineet voivat diffundoitua liposomin lipidikaksoiskalvon läpi [4].

Hydrofobiset lääkeaineet saadaan kapseloitua tehokkaammin passiivisella latauksella verrattuna hydrofiilisiin lääkeaineisiin. Ohutkalvon hydraatiolla passiivinen kapselointitehokkuus on usein yli 90 %:a ja jopa lähemmäs 100:aa %:a. [8,30] Kapselointitehokkuus riippuu kuitenkin lääkeaineen liukoisuudesta fosfolipidikaksoiskalvoon [8].

Hydrofiilisille lääkeaineille ohutkalvon hydraatiolla kapselointitehokkuus on yleensä vain noin 10–30 % [8,30]. Käänteisfaasin haihdutuksella saadaan hieman suurempi kapselointitehokkuus, noin 30–50 %. Tehostaakseen lääkeaineen lataamista liposomiin voidaan hyödyntää aktiivista lataamista. [30]

4.3 Aktiivinen lataaminen

Aktiivisessa kapselointimenetelmässä lääkeaine ladataan vasta liposomien valmistuksen jälkeen [14]. Aktiivinen lataaminen perustuu gradientin luomiseen fosfolipidikaksoiskerroksen sisä- ja ulkopuolelle, jolloin vesifaasi liposomin ytimessä eroaa liposomin ulkoisesta vesifaasista. Pääasiassa käytetään joko pH- tai ionigradienttia. Muodostuneen gradienttieron avulla lääkeaine saadaan ladattua liposomin fosfolipidikaksoiskerroksen läpi. [37,38]

pH-gradientti muodostetaan valmistamalla liposomit matalan pH:n liuoksessa, jolloin liposomin sisäiseen vesifaasiin pH on matala. Tämän jälkeen liposomin ulkoisen faasin pH-arvoa nostetaan emäksisellä liuoksella. [14] Liu et al. [37] tutkivat vinkristiinin lataamista pH-gradienttia hyödyntäen. Liposomin ulkopuolisessa pH:ssa lääkeaine on neutraalissa muodossa ja läpäisee fosfolipidikalvon. Liposomin sisäinen matalampi pH muuttaa lääkeaineen ionimuotoon, joka vähentää sen läpäisevyyttä kalvon läpi. Lääkeaineen kapselointitehokkuudeksi 65 °C:ssa saatiin yli 95 %:a.

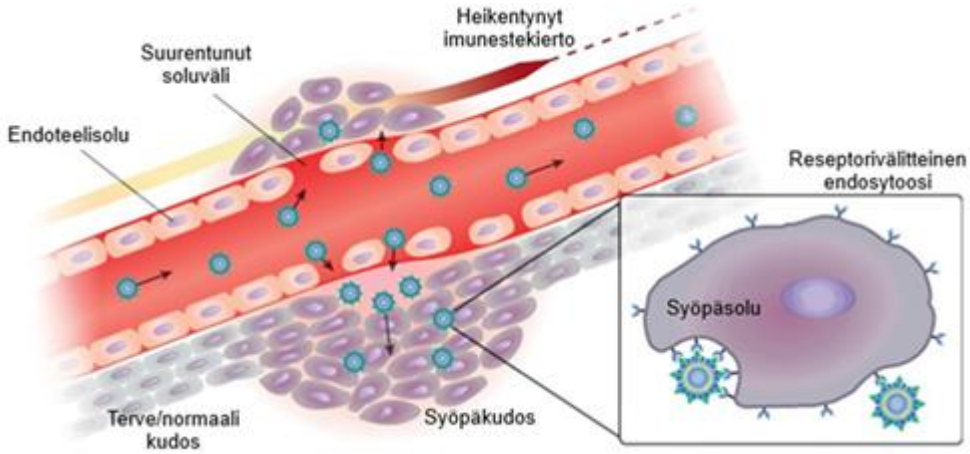
Aktiivisessa lataamisessa voidaan hyödyntää myös ammoniumsulfaattigradienttia, jossa ammoniumsulfaatin pitoisuus sisäisessä vesiytimessä on suurempi verrattuna liposomia ympäröivään liuokseen [33,34]. Pathak et al. [33] tutkivat doksorubisiinin lataamista ammoniumsulfaattigradientilla. Doksorubisiinin kapselointitehokkuudeksi saatiin yli 95 %:a. Ghosh et al. [34] tutkivat kahden lääkeaineen, vinkristiinin ja doksorubisiinin, lataamista ammoniumsulfaattigradienttia hyödyntäen. Molempien lääkeaineiden kapselointitehokkuudeksi saatiin yli 95 %:a.

5 KOHDENTAMINEN SYÖPÄSOLUUN

Liposomit voidaan kohdentaa syöpäsoluihin joko passiivisesti tai aktiivisesti [4,21]. Passiivisessa kohdennuksessa liposomit kertyvät verenkierron mukana syöpäkudoksiin johtuen niiden poikkeavasta verisuonituksesta [7]. Aktiivisessa kohdennuksessa ne kohdennetaan liposomin pintaan kiinnitettyjen ligandien avulla spesifisti haluttuun kohdesoluun. [7,21] Tässä luvussa tutustutaan tarkemmin liposomien kohdentamiseen syöpäkudokseen passiivisella ja aktiivisella menetelmällä.

5.1 Passiivinen kohdentaminen

Liposomien passiivisella kohdentamisella pyritään parantamaan lääkeaineiden terapeuttista tehoa syöpäkudoksessa [4]. Liposomit kulkeutuvat verenkierron mukana ja kerääntyvät syöpäkudoksiin niiden poikkeavan verisuonituksen takia [4,7]. Syöpäkudoksissa verisuonten seinämien endoteelisolut eivät ole tiiviitä, vaan niiden soluvälit ovat suurentuneet (Kuva 12) [21]. Syöpätyypistä riippuen soluvälit voivat olla jopa 100–780 nm. Terveen kudoksen soluvälit ovat tyypillisesti 5–10 nm. [20] Liposomit kulkeutuvat suurentuneiden soluvälien kautta syöpäkudoksiin ja syöpäkudoksen puutteellisen imunestekierron takia ne kertyvät syöpäkudokseen, eivätkä siirry takaisin verenkiertoon. Passiivinen kohdentaminen perustuu siis syöpäkudoksen verisuonten suurempaan läpäisevyyteen ja imunestekierron puutteeseen, josta käytetään termiä EPR-vaikutus (enhanced permeability and retention effect). [7]



Kuva 12. Passiivinen kohdentaminen perustuu EPR-vaikutukseen, jossa syöpäkudoksen suuremman läpäisevyyden vuoksi liposomit kulkeutuvat ja imunestekierron puutteen vuoksi kertyvät syöpäkudoksiin. Kuva muokattu lähteestä [21].

Passiivinen kohdennus edellyttää liposomin suojautumista elimistön puolustusmekanismeilta, jotta voidaan välttää liposomien nopea eliminaatio [4]. Luvussa 2.2 käsiteltiin erityyppisiä liposomeja, sekä niiden ominaisuuksia suojautua puolustusmekanismeilta. Klassisten liposomien käyttö lääkeainekuljetuksessa on rajoittunutta juuri niiden nopean eliminaation vuoksi. Sen sijaan PEGyloidut liposomit soveltuvat paremmin passiiviseen kohdentamiseen, sillä PEG suojaa liposomia opsonisaatiolta. Tällöin liposomien verenkiertoaika pitenee, joka mahdollistaa tehokkaamman kertymisen syöpäkudoksiin. PEG-ketjut voivat kuitenkin häiritä liposomien soluun ottoa sekä lääkeaineen vapautumista liposomista. Passiivisen kohdennuksen tehokkuuteen vaikuttavat myös liposomien pintavaraus ja koko. Liposomien koon tulisi olla korkeintaan 400 nm. Alle 200 nm kokoisilla liposomeilla on havaittu tehokkaampi kertyminen syöpäkudoksiin. [20]

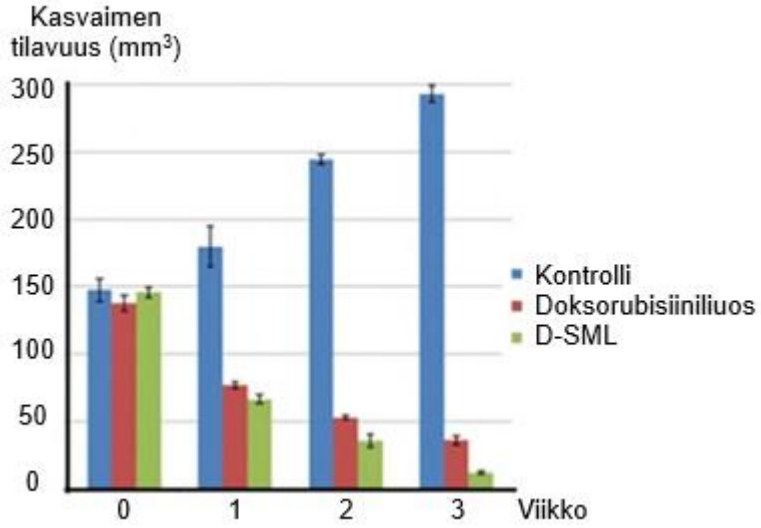
5.2 Aktiivinen kohdentaminen

Aktiivinen kohdentaminen perustuu liposomin pintaan kiinnitettyihin kohdentaviin ligandeihin, jotka spesifisti tunnistavat kohdesolun. Kohdentavia ligandeja ovat muun muassa monoklonaaliset vasta-aineet, proteiinit, peptidit, vitamiinit ja hiilihydraatit. [4,21] Liposomit hyödyntävät kohdentavien ligandien lisäksi EPR-vaikutusta syöpäkudokseen kohdentuessa [39].

Syöpäsoluille on tyypillistä yli-ilmentää tiettyä reseptoria, jota hyödynnetään kohdentavien ligandien valinnassa [21,40]. Eri syöpätaudeissa yli-ilmeneviä reseptorityyppejä ovat muun muassa epidermaaliset kasvutekijäreseptorit HER1 ja HER2, folaattireseptori, sekä transferriinireseptori [7,21]. Kohdentavien ligandien valinnassa pyritään siihen, että terveet solut ilmentäisivät valittua ligandia mahdollisimman vähän tai ei ollenkaan [21]. Kuitenkin useimmiten syöpäsoluissa yli-ilmentyvät reseptorityypit esiintyvät myös terveissä soluissa [41].

Folaattireseptori on tyypillinen syöpäsoluissa, etenkin munasarjasyövässä, yli-ilmentyvä reseptorityyppi [21]. Lee ja Low [42] tutkivat *in vitro* doksorubisiinilla ladattujen folaatti-PEG-liposomien aktiivista kohdentumista folaattireseptoria yli-ilmentäviin syöpäsoluihin. Ligandikohdennettujen doksorubisiinia sisältävien liposomien soluun ottoa ja sytotoksisuutta verrattiin klassisiin, ei-kohdennettuihin, doksorubisiinia sisältäviin liposomeihin sekä vapaaseen doksorubisiiniin. Ligandikohdennetut liposomien soluun otto oli 45 kertaa suurempi verrattuna ei-kohdennettuihin liposomeihin ja 1,6 kertaa suurempi verrattuna vapaaseen lääkeaineeseen. Vastaavasti sytotoksisuus oli 86 ja 2,7 kertaa suurempi.

Asialoglykoproteiinireseptorit (ASGPR) ovat maksasolujen pinnalla yli-ilmentyviä reseptoreja [21]. Arabinogalaktaani (AG) toimii reseptorin kohdeligandina [33]. Patnak et al. [33] tutkivat doksorubisiinilla ladattujen arabinogalaktaania sisältävien liposomien kohdentumista. Hiirissä suoritetussa *in vivo* -tutkimuksessa tarkasteltiin doksorubisiinia sisältävän ligandikohdennetun liposomin ja doksorubisiiniliuoksen tehokkuutta maksasyövän hoidossa. Kuvassa 13 on esitetty tulokset kolmen viikon seurantajaksolta.



Kuva 13. Doksorubisiinilla ladattujen arabinogalaktaania kohdeligandina sisältävien liposomien (D-SML) vaikutus kasvaimen tilavuuteen kolmen viikon seurantajaksolta hiirissä suoritetusta *in vivo* -tutkimuksesta. Kuva muokattu lähteestä [33].

Tuloksista huomataan, että aktiivisella kohdennuksella kasvaimen koko pieneni verrattuna vapaaseen lääkeaineeseen. Vaikuttaakin siltä, että aktiivisella kohdentamisella voidaan parantaa merkittävästi liposomien terapeuttista tehoa verrattuna vapaaseen lääkeaineeseen ja passiiviseen kohdennukseen [21]. Tehokkaammalla kohdennuksella pyritään vähentämään lääkeaineiden sytotoksisia haittavaikutuksia terveissä kudoksissa [43].

6 LÄÄKEAINEEN VAPAUTTAMINEN

Lääkeaineen oikea-aikainen vapautuminen liposomista on yksi tärkeimmistä tekijöistä lääkeainekuljetuksessa. Siihen liittyy kuitenkin haasteita, kuinka lääkeaine saadaan vapautumaan liposomista kontrolloidusti oikeassa paikassa [3]. Lääkeaineen passiivinen, kontrolloimaton, vapautuminen syöpäkudoksessa voi johtaa heikentyneeseen tehokkuuteen [21]. Lääkeaineen vapauttamisen tehostamiseksi voidaan käyttää erilaisia ärsykkeitä, jotka vaikuttavat fosfolipidikaksoiskalvon läpäisevyyteen [3]. Ne voidaan jakaa sisäisiin ja ulkoisiin ärsykkeisiin. Sisäisiin ärsykkeisiin luokitellaan esimerkiksi elimistön luontaisiin pH:n tai lämpötilan muutoksiin perustuva lääkeaineen vapautuminen. Ulkoisina ärsykkeinä voidaan käyttää muun muassa ulkoista valonlähdettä, ultraääntä tai magneettikenttää. [40,41] Tässä luvussa tarkastellaan lyhyesti liposomien soluun ottoa sekä lääkeaineen vapauttamista liposomista sisäisiä ja ulkoisia ärsykkeitä hyödyntäen.

6.1 Soluun otto

Lääkeaineen kohdennuksen jälkeen liposomin/lääkeaineen tulee kulkeutua solukalvon läpi syöpäsolun sytoplasmaan. Soluun otto voi tapahtua usealla eri mekanismilla, kuten endosytoosilla tai fuusioitumalla [44]. Liposomien soluun otto tapahtuu ensisijaisesti endosytoosi välitteisesti. Lääkeaineen soluun otto voi kuitenkin joissain tapauksissa tapahtua myös liposomin fuusioituessa solukalvon kanssa. Tällöin lääkeaine vapautuu suoraan sytoplasmaan. [45]

Endosytoosissa liposomi sitoutuu solun pintaan, jonka jälkeen solukalvo kuroutuu liposomin ympärille ja endosomi vangitsee liposomin [44,46]. Liposomi kuljetetaan joko lysosomiin hajotettavaksi tai endosomin rakennetta pyritään epävakauttamaan, jolloin lääkeaine vapautuu sytoplasmaan jo ennen lysosomiin kulkeutumista [44]. Lysosomeissa vallitsee hapan ympäristö (pH < 5), joka voi vaikuttaa lääkeaineen säilyvyyteen ja sitä kautta tehoon. Endosomeissa ympäristö on puolestaan lievästi hapan (pH 6–6,5). [20]

Endosytoosi voi tapahtua eri reittejä pitkin riippuen liposomien pintavarauksesta, koosta sekä koostumuksesta [21]. Endosytoosin eri reittejä ovat muun muassa fagosytoosi, makropinosytoosi, klatriinivälitteinen- sekä kaveoliinivälitteinen endosytoosi [21,46]. Spesifi reseptorivälitteinen endosytoosi tehostaa liposomin soluun ottoa. Reseptorivälitteistä endosytoosia varten liposomin rakenteeseen tulee olla liitetty spesifi kohdeligandi, joka tunnistaa syöpäsolussa esiintyvän reseptorin. [39–41]

6.2 pH-herkät liposomit

Syöpäkudoksen solunulkoinen pH-arvo on tyypillisesti matalampi kuin normaalin/terveen kudoksen [47]. pH-herkät liposomit hyödyntävät syöpäkudoksen ja normaalin kudoksen poikkeavaa pH-arvoa lääkeaineen vapauttamisessa [40]. Niiden pääkomponentteina käytetään tyypillisesti fosfolipidejä ja pH-herkkiä polymeerejä, jotka reagoivat alentuneeseen pH-arvoon konformaaatiomuutoksilla. Tämän seurauksena liposomin rakenne muuttuu epävakaammaksi ja lääkeaine pääsee vuotamaan fosfolipidikalvon läpi. [44]

Usein pH-herkät liposomit kulkeutuvat soluun endosytoosilla [48]. Liposomit pysyvät stabiileina fysiologisissa olosuhteissa (pH 7,4), mutta endosomin happamassa ympäristössä liposomin rakenne muuttuu epävakaaksi ja lääkeaine vapautuu [40,48]. Liposomit voivat myös vapauttaa lääkeaineen fuusioitumalla endosomin solukalvon kanssa [48].

Kim et al. [49] tutkivat *in vivo* gemsitabiinin vapauttamista pH-herkistä ligandikohdennetuista liposomeista. Liposomien rakenne koostui dioleyylifosfatidyylietanolamiinista (DOPE) sekä kolesteryylihemisukkinaatista (CHEMS) moolisuhteella 6:4, jolloin liposomi on pH-herkkä pH:ssa 5,5–6. Spesifeinä reseptoreina käytettiin epidermaalisia kasvutekijäreseptoreita. Ligandikohdennetun pH-herkän liposomin tehoa verrattiin pH-herkkään liposomiin, vapaaseen lääkeaineeseen ja kontrollina käytettyyn fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen. Kuukauden kuluttua ensimmäisestä lääkkeen annosta kontrollina toimineiden hiirten kasvainten koko oli 20 kertaa suurempi verrattuna lähtötilanteeseen. Ligandikohdennetuilla pH-herkillä liposomeilla kasvaimen koko oli suurentunut 3,26 kertaisesti. Suurin vaikutus saavutettiin ligandikohdennetuilla pH-herkillä liposomeilla, sitten pH-herkillä liposomeilla ja pienin vaikutus vapaalla lääkeaineella.

6.3 Lämpöherkät liposomit

Lämpöherkkien liposomien toiminta perustuu fosfolipidien rakenteen muutokseen siirryttäessä geelifaasista nestemäiseen kidefaasiin kohonneen lämpötilan seurauksena [50]. Fosfolipidien lisääntynyt läpäisevyys vapauttaa lääkeaineen liposomista [40]. Lämpöherkät liposomit voivat aktivoitua sisäisestä ja/tai ulkoisesta ärsykkeestä. Sisäisenä ärsykkeenä toimii syöpäkudoksen luonnostaan hieman korkeampi lämpötila verrattuna normaaliin kehonlämpötilaan [51]. Tätä ominaisuutta voidaan hyödyntää lääkeaineen vapauttamisessa. Fosfolipidien koostumusta ja moolisuhdetta muokkaamalla voidaan valmistaa liposomi, jossa syöpäkudoksen hieman korkeampi lämpötila saa aikaan lääkeaineen vapautumisen [21,50]. Haasteina lämpöherkkien liposomien hyödyntämisessä pi-

detään hidasta lääkeaineen vapautumista kohdesolussa ja passiivista vuotoa fysiologisessa lämpötilassa. Lisäksi liposomien rakenteissa usein käytetty kolesteroli voi heikentää lääkeaineen vapautumista. [48]

Needham et al. [52] tutkivat doksorubisiinin vapautumista lämpöherkistä liposomeista lievästi fysiologista lämpötilaa korkeammassa lämpötilassa 42 °C:ssa. Doksorubisiinin vapautumista tutkittiin kolmella eri koostumuksella (Taulukko 2). Kaikkiin liposomeihin liitettiin PEG-ketjuja, jotta liposomien kiertoaika hiiren elimistössä olisi pidempi.

Taulukko 2. Tutkimuksessa käytettyjen lämpöherkkien liposomien koostumukset. NTSL=ei-lämpöherkkä liposomi, TTSL=perinteinen lämpöherkkä liposomi, LTSL=lysolekitiiniä sisältävä lämpöherkkä liposomi.

Liposomi	Koostumus	Moolisuhde	Koko (nm)
NTSL	HSPC/kolesteroli/DSPE-PEG-2000	75:50:3	~ 140
TTSL	DPPC/HSPC/kolesteroli/DSPE-PEG-2000	100:50:30:6	~ 140
LTSL	DPPC/MPPC/DSPE-PEG-2000	90:10:40	~ 140

Hiirissä suoritetussa *in vivo* -tutkimuksessa liposomaalisten valmisteiden tehoa verrattiin vapaaseen lääkeaineeseen ja kontrollina toimineeseen suolaliuokseen. Tutkimuksessa päätetapahtumana käytettiin syöpäkasvaimen tilavuuden kasvua viisinkertaiseksi tai 60 vuorokautta tutkimuksen aloituksesta. Tutkimuksen aikana tarkasteltiin syöpäkasvaimen pienenemistä ja yhtenä parametrina käytettiin syöpäkasvaimen pienenemistä kahdessa peräkkäisessä mittauksessa. Lisäksi lääkehoidon jälkeistä aikaa seurattiin 60 päivän ajan. Toisena parametrina käytettiin syöpäkasvaimen tuhoutumista siten, että sitä ei esiinny 60 päivän seurantajakson aikana. Tutkimus suoritettiin kahdessa eri lämpötilassa 34 °C:ssa ja 42 °C:ssa. Saadut tulokset on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. *In vivo* -tutkimuksen tulokset suolaliuoksen, vapaan doksorubisiinin ja doksorubisiinia sisältävien liposomaalisten NTSL, TTSL ja LTSL valmisteiden teho syöpäkasvaimeen. Päätetapahtumana käytettiin syöpäkasvaimen tilavuuden kasvua viisinkertaiseksi tai 60 vuorokauden kulumista. Tulos ilmoitettiin vuorokausina. Regressio määritellään kasvaimen koon pienenemisenä kahdessa peräkkäisessä mittauksessa. Kontrolli kuvastaa sitä, että kasvainta ei esiinny 60 päivän kuluttua hoidosta. Sulkeissa kunkin ryhmän hiirten kokonaislukumäärä.

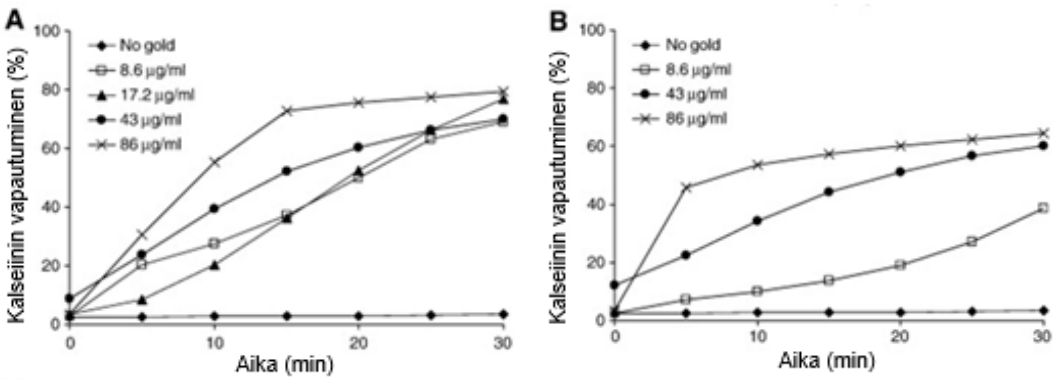
	Suola-liuos	Vapaa DOX	NTSL	TTSL	LTSL
34 °C Päätetapahtuma	9,8	13,5	20,9	11,1	11,4
34 °C Regressio	0 (10)	0 (10)	2 (10)	0 (8)	0 (10)
34 °C Kontrolli	0 (10)	0 (10)	0 (10)	0 (8)	0 (10)
42 °C Päätetapahtuma	19,8	23,7	31,9	35,1	51,4
42 °C Regressio	3 (11)	6 (12)	10 (11)	11 (12)	8 (9)
42 °C Kontrolli	0 (11)	0 (12)	0 (11)	1 (12)	6 (9)

Yleisesti korkeammassa lämpötilassa päätetapahtuma saavutettiin myöhemmin verrattuna matalempaan lämpötilaan, eli lääkeainetta vapautui enemmän korkeammassa lämpötilassa. Matalemmassa lämpötilassa liposomaalisilla valmisteilla, vapaalla lääkeaineella ja suolaliuoksella ei ollut huomattavaa eroa päätetapahtuman saavuttamisessa lukuun ottamatta NTSL-valmistetta. NTSL-valmisteella saavutettu tulos viittaisi lääkeaineen passiiviseen vuotoon liposomista. Korkeammassa lämpötilassa LTSL-valmisteella saavutettiin paras teho syöpäkasvainta vastaan. Kuudessa yhdeksästä tapauksessa ei esiintynyt kasvainta 60 vuorokauden kuluessa hoidon päätyttyä. Tällä liposomikoostumuksella saadaan lääkeaine vapautumaan tehokkaasti 42 °C:ssa. Valmisteen käyttäytymistä fysiologisessa lämpötilassa olisi hyvä tutkia mahdollisen lääkeainevuodon takia.

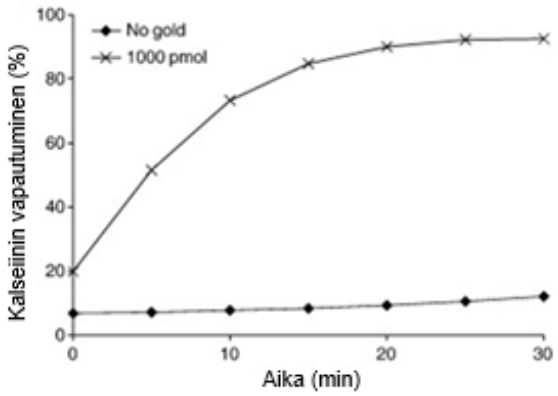
6.4 Valoaktivoituvat liposomit

Lääkeaineen vapauttamisen tehostamiseksi voidaan hyödyntää ulkoista valonlähdettä. Ulkoisen valonlähteen avulla saadaan säädeltyä tarkasti lääkeaineen vapautumisaikaa ja -paikkaa. [40] Valonlähteinä on tutkittu muun muassa UV-valoa ja lähi-infrapunavaloa [50,53,54]. Valonlähteen valinnassa tulee ottaa huomioon, kuinka syvälle kudokseen valo pystyy tunkeutua [40]. Valoaktivoituvissa liposomeissa voidaan hyödyntää lämpöherkkien liposomien lisäksi esimerkiksi kultananopartikkeleita, jotka muuttavat valoenergian lämmöksi [51,53]. Kohonneen lämpötilan seurauksena fosfolipidikaksoiskerroksen läpäisevyys lisääntyy ja lääkeaine pääsee vapautumaan liposomista [50,53].

Paasonen et al. [50] tutkivat kalseiinin vapautumista lämpöherkistä liposomeista 37 °C:ssa UV-valon vaikutuksesta. Liposomi, joka koostui DSPC ja DPPC suhteessa 9:1, valikoitui tutkimukseen, sillä se vapautti kalseiinin hieman fysiologisen lämpötilan yläpuolella noin 45 °C:ssa. Liposomeina käytettiin suuria unilamellaarisia vesikkeleitä. Lisäksi liposomiin oli kapseloitu kultananopartikkeleita, jotka aktivoivat valoenergian lämmöksi. Tutkimuksessa käytettiin lipidikalvoon (Au-C6SH), sisäiseen vesiytimeen (Au-MSA) sekä lipidikalvon ja vesifaasin rajapintaan (DPPE-Nanogold®) kapseloituja kultananopartikkeleita. Liposomeihin kohdistettiin 250 nm UV-valoa, jolloin kalseiinin vapautuminen tehostui (Kuvat 14 ja 15).



Kuva 14. A) Liposomiin kapseloituna hydrofobinen kultananopartikkeli (Au-C6SH). B) Liposomiin kapseloituna hydrofiilinen kultananopartikkeli (Au-MSA). Kalseiinin vapautumisprosentti eri kultananopartikkelipitoisuuksilla ajan funktiona 250 nm UV-valon vaikutuksesta 37 °C:ssa. Kuva muokattu lähteestä [50].



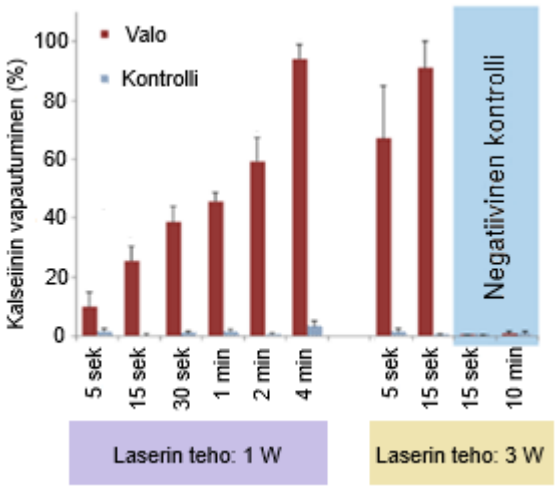
Kuva 15. Kalseiinin vapautumisprosentti ajan funktiona UV-valoärsytyksen vaikutuksesta kaupallista DPPE-Nanogold® sisältävistä liposomeista 37 °C:ssa. Kuva muokattu lähteestä [50].

Kaikki kultananopartikkeleita sisältävät liposomit vapauttivat UV-valoärsykkeen vaikutuksesta kalseiinia. Puolestaan liposomit ilman kultananopartikkeleita eivät reagoineet UV-valoon, eivätkä tehostanut kalseiinin vapautumista. Liposomeissa, joissa käytettiin hydrofiilisia kultananopartikkeleita, kalseiinin vapautuminen oli vähäisintä. Kaupallisella

DPPE-Nanogold® oli suurin vaikutus kalseiinin vapautumiseen. DPPE-Nanogold® on hydrofobinen kultananopartikkeli, joka sitoutuu fosfolipidikalvon sisä- ja ulkopuolelle, toisin kuin hydrofobinen Au-C6SH, joka hakeutuu fosfolipidikaksoiskerroksen sisään.

Tutkimuksessa tarkasteltiin myös liposomien käyttäytymistä ilman UV-valoaltistusta. Hydrofobiset kultananopartikkelit Au-C6SH alensivat kalseiinin vapautumislämpötilaa liposomeista muutamalla asteella ja vapautumista havaittiin jo 37 °C:ssa. Kuitenkin suurin osa kalseiinin vapautumisesta tapahtui selkeästi yli 37 °C:ssa. DPPE-Nanogold® sisältävistä liposomeista vapautui vähemmän kalseiinia 37 °C:ssa ilman UV-valoärsykettä verrattuna Au-C6SH ja Au-MSA sisältäviin liposomeihin. Tämän tutkimuksen perusteella DPPE-Nanogold® soveltuisi parhaiten valoaktivoituvaksi aineeksi tutkituista kultananopartikkeleista, koska näissä liposomeissa oli vähiten lääkeaineen passiivista vuotoa fysiologisissa olosuhteissa. Lisäksi lääkeaineen vapautuminen oli tehokkainta UV-valon vaikutuksesta.

Lajunen et al. [54] tutkivat kultananopartikkeleiden korvaamista kliinisesti hyväksytyllä kuvantamisaineella, indosyaniinivihreällä (ICG). Tutkimuksessa käytettiin lämpöherkkiä liposomeja, jotka muodostuivat DPPC/DSPC/Lyso PC/DSPE-PEG fosfolipideistä eri moolisuhteilla. Lämpöherkkien liposomien stabiilisuutta testattiin 37 °C:ssa ja 42 °C:ssa. Liposomit, joissa fosfolipidien moolisuhteet olivat 75:15:10:4, todettiin stabiilisuuden kannalta parhaaksi, joten ne valikoituivat jatkotutkimuksiin. Lisäksi kalseiinin vapautumista tutkittiin eri ICG:n ja fosfolipidien suhteilla, joista moolisuhde 1:50 soveltui parhaiten tutkimukseen. Tutkimuksessa tarkasteltiin vielä kalseiinin vapautumista ICG lämpöherkistä liposomeista aiempien tulosten perusteella valikoiduilla moolisuhteilla laservaloaktivoinnin aikana. Laservaloa kohdistettiin liposomeihin 1 ja 3 watin (W) teholla (Kuva 16).



Kuva 16. Kalseiinin vapautuminen indosyaniinivihreää sisältävistä liposomeista 1 ja 3 watin (W) teholla. Ulkoisena valonlähteenä tutkimuksessa käytettiin laservaloa. Kontrolli kuvastaa kalseiinin vapautumista ilman valoärsykettä. Negatiivisessa kontrollissa liposomien rakenteeseen ei ole liitetty indosyaniinivihreää. Kuva muokattu lähteestä [54].

Tuloksista huomataan, että 3 W teholla kalseiinin vapautuminen oli nopeampaa verrattuna käytettäessä laservaloa 1 W teholla. 1 W laservaloärsykkeen vaikutuksesta 91 %:a kalseiinista vapautui 4 minuutin altistuksen jälkeen. Vastaavasti suuremmalla teholla 91 %:a kalseiinista vapautui jo 15 sekunnissa. ICG on siis potentiaalinen valoaktivoituva aine liposomeihin, sillä se tehosti merkittävästi kalseiinin vapautumista valoärsykkeen vaikutuksesta. Lisäksi ICG on jo kliinisessä käytössä, joten se on todettu turvalliseksi.

6.5 Ultraäänellä aktivoituvat liposomit

Ultraäänen hyödyntäminen on yksi lääkeaineen vapauttamiseen käytetyistä ulkoisista ärsykkeistä. Yksi ultraäänen hyvistä ominaisuuksista on sen kyky tunkeutua tehokkaasti syvälle kudoksiin [40]. Ultraääntä voidaan käyttää lämpö ja/tai mekaanisten vaikutusten aikaansaamiseksi [55]. Ultraääni on mekaanista aaltoliikettä, joka saa väliaineen molekyylit värähtelemään ja osa kineettisestä energiasta muuttuu lämpöenergiaksi. Lämpöenergia absorboituu kudoksiin nostaen niiden lämpötilaa, jonka seurauksena lämpötilaherkkien liposomien fosfolipidikaksoiskerroksen läpäisevyys suurenee ja lääkeaine vapautuu liposomista. Liposomien rakennetta voidaan horjuttaa myös mekaanisesti esimerkiksi akustisella kavitaatiolla. [41] Akustinen kavitaatio tarkoittaa mikrokuplien muodostumista ja värähtelyä ultraääniaaltojen aiheuttaman paineen vaihteluiden vuoksi [55].

Hosseinikhah et al. [56] tutkivat ultraäänen hyödyntämistä doksorubisiinin vapauttamisessa lämpöherkistä liposomeista. Lämpöherkkien liposomien faasitransitiolämpötila asetettiin hieman korkeammaksi, jotta lääkeaineen passiivinen vuoto olisi vähäisempää. Ultraäänen avulla saadaan lämpötilaa nostettua. Liposomit koostuivat HSPC /DPPC/MSPC/DSPE-mPEG$_{2000}$ komponenteista eri mooliosuuksilla. Doksorubisiinin vapautumista tutkittiin *in vitro* kolmella eri pH-arvolla, jotka jäljittelevät fysiologista (7,4), syöpäkudosten (6,5) ja endosomien (5,5) ympäristöä 37 °C:ssa ja 42 °C:ssa. Tuloksista havaittiin, että HSPC vähensi doksorubisiinin passiivista vapautumista liposomeista. Lämpötilan nostaminen ultraäänen avulla 42 °C:een lisäsi doksorubisiinin vapautumista verrattuna vapautumiseen 37 °C:ssa. Lisäksi matalammassa pH:ssa lääkeaineen vapautuminen tehostui.

Orita et al. [57] tutkivat superkriittisellä hiilidioksidilla (scCO_2) syntetisoitujen liposomien lääkeaineen vapauttamista käyttäen ultraääntä ulkoisena ärsykkeenä. Ilmiötä tarkasteltiin kolmella erilaisella liposomilla: CO_2 ladatuilla, ionisoidulla CO_2 ladatuilla sekä klassisilla liposomeilla. Vapautumistehokkuus CO_2 ja ionisoidulla CO_2 ladatuilla liposomeilla oli suurempi verrattuna klassisiin liposomeihin. Ionisoitu CO_2 liposomi vapautti sisältönsä tehokkaammin verrattuna CO_2 ladattuihin liposomeihin.

6.6 Magneettisesti aktivoituvat liposomit

Magneettisesti aktivoituvien liposomien rakenteeseen lisätään usein ferromagneettinen aine, kuten magnetiittia (Fe_3O_4) tai nanomaghemiittia (γ-Fe_2O_3) [20]. Magneettisesti aktivoituvia liposomeja voidaan ulkoisen magneettikentän avulla ohjata kasvaimen kohdalle. Lisäksi ferromagneettisten aineiden liikehdinnällä voidaan saada liposomin rakenne hajoamaan, jolloin lääkeaine vapautuu. [40]

Song et al. [58] tutkivat emodiinia sisältävien magneettisesti aktivoituvien liposomien tehokkuutta rintasyövän hoidossa. Ferromagneettisena aineena käytettiin rautaoksidinanokuutioita. Magneettisesti aktivoituvien liposomien tehokkuutta verrattiin hiirillä suoritetussa *in vivo* -tutkimuksessa vapaaseen emodiiniin sekä kontrollina käytettyyn fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen. Magneettisesti aktivoituvilla emodiinia sisältävillä liposomeilla saavutettiin merkittävästi paremmat tulokset verrattuna kontrolliin ja vapaaseen emodiiniin. Kasvainten koko emodiini- ja kontrolliryhmällä oli noin 12 kertaa suuremmat verrattuna magneettisesti aktivoituihin emodiinia sisältäviin liposomeihin.

7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämän työn tavoitteena oli tarkastella liposomien soveltuvuutta lääkeainekuljettimiksi syövän hoidossa. Työssä selvitettiin, miten liposomit muodostuvat ja millaisia ominaisuuksia niillä on. Lisäksi tutustuttiin yleisimpiin liposomien valmistusmenetelmiin ja lääkeaineen lataamista liposomeihin passiivisella ja aktiivisella latauksella. Lopuksi tarkasteltiin, millaisia menetelmiä hyödyntäen liposomeja voidaan kohdentaa spesifimmin syöpäkudoksiin ja kuinka lääkeaine saadaan vapautettua liposomista.

Liposomit muodostuvat yhdestä tai useammasta fosfolipidikaksoiskerroksesta. Fosfolipideillä on keskenään erilaisia ominaisuuksia esimerkiksi pintavarauksen tai faasitransitiolämpötilan suhteen. Liposomeissa voidaan hyödyntää samoja fosfolipidejä, joista myös elimistön solukalvot muodostuvat. Liposomit siis muistuttavat rakenteeltaan elimistön solukalvoja. Liposomien vähäisen toksisuuden, biohajoavuuden ja bioyhteensopivuuden vuoksi niiden käyttöä lääkeainekuljetuksessa voidaan pitää turvallisina. Lisäksi liposomien rakenteen vuoksi ne voivat kuljettaa liukoisuudeltaan erilaisia lääkeaineita. Hydrofiiliset lääkeaineet hakeutuvat liposomin vesiytimeen ja hydrofobiset fosfolipidikaksoiskerrokseen.

Liposomien ominaisuuksiin vaikuttavat myös rakenteeseen liitetyt muut aineet, kuten kolesteroli ja polyetyleeniglykoli. Kolesterolia lisätään usein liposomien rakenteeseen, sillä se muun muassa vakauttaa liposomin rakennetta ja vähentää lääkeaineen passiivista vuotoa liposomista. Polyetyleeniglykoli puolestaan suojaa liposomin pintaa veren proteiinien kiinnittymiseltä. Proteiinien kiinnittymisen myötä elimistön puolustusjärjestelmä tunnistaa ja lopulta tuhoaa liposomit. Polyetyleeniglykolilla on siis tärkeä rooli pidentäessä liposomien kiertoaikaa elimistössä. Polyetyleeniglykoli heikentää kuitenkin liposomien soluun ottoa sekä lääkeaineen vapauttamista liposomista.

Yleisimpiä valmistusmenetelmiä ovat ohutkalvon hydraatio ja käänteisfaasin haihdutus. Esimerkiksi ohutkalvon hydraatiossa fosfolipidit liuotetaan orgaaniseen faasiin, jonka jälkeen orgaaninen faasi haihdutetaan pois, jolloin muodostuu ohut lipidikalvo. Lipidikalvoon lisätään vesifaasi, josta vorteksoinnin jälkeen muodostuu multilamellaarisia liposomeja. Liposomien kokoa voidaan pienentää mekaanisilla menetelmillä, kuten ekstruusiolla tai sonikaatiolla. Yleisesti liposomien valmistus on tällä hetkellä haasteellista suuressa mittakaavassa. Se voi muodostua haasteeksi, jos liposomaalisten valmisteiden käyttö lisääntyy.

Lääkeaine voidaan ladata passiivisesti liposomeihin valmistuksen yhteydessä tai aktiivisesti liposomien valmistuksen jälkeen esimerkiksi pH- tai ionigradienttia hyödyntäen. Aktiivisella lataamisella lääkeainetta saadaan kapseloitua enemmän liposomiin verrattuna passiiviseen lataamiseen. Tuoreimmissa tutkimuksissa hyödynnettiin juuri aktiivista lataamista. Sen sijaan passiivista lataamista ei aktiivisesti käytetä tutkimuksissa. Todennäköisesti huonomman kapselointitehokkuuden vuoksi.

Liposomien passiivinen kohdentaminen syöpäkudokseen perustuu syöpäkudoksen poikkeavaan verisuonitukseen. Verisuonten endoteelisolujen soluvälit ovat laajentuneet, jonka seurauksena liposomit pääsevät kulkeutumaan syöpäkudokseen. Syöpäkudoksessa imunestekierto on heikentynyt, jolloin liposomit kertyvät niihin. Aktiivisella kohdennuksella pyritään parantamaan liposomien spesifiä kohdentumista syöpäkudoksiin. Aktiivinen kohdennus hyödyntää syöpäsolujen taipumusta yli-ilmentää tiettyä reseptorityyppiä. Liposomin rakenteeseen voidaan liittää reseptoria vastaava kohdeligandi, joka tunnistaa reseptorin. Kohdentamisen lisäksi spesifien kohdeligandien käyttö parantaa liposomien soluun ottoa reseptorivälitteisellä endosytoosilla. Liposomien kohdentamiseen liittyvät tutkimukset ovat keskittyneet viime vuosina aktiiviseen kohdennukseen. Tämä viittaisi siihen, että liposomeja ei saada riittävän tehokkaasti passiivisesti kohdistumaan syöpäkudokseen. Syöpäsolujen yli-ilmentävät reseptorityypit ovat sellaisia, että niitä esiintyy usein myös jossain määrin terveissä soluissa. Tämä tuo omat haasteensa myös aktiivisen kohdennuksen tehokkuuteen.

Lääkeaineen oikea-aikaiseen vapauttamiseen liittyy tällä hetkellä eniten haasteita liposomien hyödyntämisessä lääkeainekuljettimina. Lääkeaineiden vapauttamiseksi voidaan käyttää sisäisiä tai ulkoisia ärsykkeitä. Sisäisiä ärsykkeitä ovat esimerkiksi syöpäkudoksen luontaisesti korkeampi lämpötila tai matalampi pH-arvo verrattuna normaaliin kudokseen. Ulkoisia ärsykkeitä ovat muun muassa valo, ultraääni ja magneettikentän muutokset. Ulkoista valonlähdettä hyödyntämällä on saatu lupaavia tuloksia käyttämällä kultananopartikkeleita ja indosyaniinivihreää valoaktivoituvana aineena. Kultananopartikkeleiden kohdalla tulee ottaa huomioon mahdolliset haittavaikutukset, joita kultapartikkeleista voi etenkin pitkäaikaiskäytössä aiheutua. Indosyaniinivihreä on kliinisesti hyväksytty kuvantamisaine, joten sen käyttöön liittyvää turvallisuutta ja mahdollisia pitkäaikaiskäyttöön liittyviä haittavaikutuksia on tutkittu. Ulkoisen valonlähteen käyttöön liittyy kuitenkin haasteita valon tunkeutumiskyvyssä syvälle kudoksiin, joten sitä ei välttämättä voida helposti soveltaa kaikkiin syöpätyyppeihin.

Ultraääntä ja magneettikentän muutoksia hyödyntämällä saatiin myös lupaavia tuloksia lääkeaineen vapauttamisessa. Ultraäänen etuna voidaan pitää sen kykyä tunkeutua sy-

vällekin kudoksiin. Lisäksi sen kyky vaikuttaa liposomien stabiilisuuteen lämmön ja mekaanisten vaikutusten kautta lisäävät ultraäänen monimuotoisuutta ja mahdollisia sovelluksia. Magneettisesti aktivoituvia liposomeja voidaan myös kohdentaa syöpäkudokseen magneettikentän muutosten avulla. Magneettisesti aktivoituvat liposomit sisältävät usein jonkin ferromagneettisen aineen, joiden turvallisuutta tulee tarkastella ennen kliinistä käyttöä.

Työn tavoitteena oli selvittää liposomien soveltuvuutta lääkeainekuljettimiksi syövän hoidossa. Liposomit soveltuvat rakenteensa ja ominaisuuksiensa vuoksi hyvin lääkeainekuljettimiksi. Vaikka liposomaalisia valmisteita on jo kliinisessä käytössä, lisää tutkimuksia tarvitaan etenkin lääkeaineen vapauttamiseen liposomista. Lääkeaineen vapauttaminen liposomista tulisi tapahtua ainoastaan syöpäsoluissa, jolloin syöpälääkkeiden sytotoksiset haittavaikutukset eivät kohdistuisi terveisiin soluihin. Tämän vuoksi myös liposomien stabiilisuuteen tulisi kiinnittää huomiota, jotta lääkeainetta ei vuotaisi passiivisesti liposomeista. Lisäksi tutkimuksissa tulisi tarkastella myös lääkehoidon vaikutuksia muihin soluihin. Liposomit ovat lupaavia lääkeainekuljettimia, mutta lisää *in vivo* -tutkimuksia tarvitaan ennen kuin liposomien todellinen potentiaali pystytään hyödyntämään.

LÄHTEET

[1] WHO: Cancer. Saatavissa: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer (viitattu 1.4.2025).

[2] Koulu M ja Mervaala E. Farmakologia ja toksikologia. 10. uudistettu painos. Kuopio: Kustannusosakeyhtiö Medicina; 2018.

[3] Needham D, Dewhirst MW. The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors. Adv Drug Deliv Rev 2001;53:285–305. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00233-2.

[4] Guimarães D, Cavaco-Paulo A, Nogueira E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. Int J Pharm 2021;601:120571. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120571.

[5] Large DE, Abdelmessih RG, Fink EA, Auguste DT. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. Adv Drug Deliv Rev 2021;176:113851. https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113851.

[6] Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, Wu SY, Sood AK, Hua S. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. Front Pharmacol 2015;6. https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286.

[7] Cheng Z, Huang H, Yin M, Liu H. Applications of liposomes and lipid nanoparticles in cancer therapy: current advances and prospects. Exp Hematol Oncol 2025;14:11. https://doi.org/10.1186/s40164-025-00602-1.

[8] Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. Nanoscale Res Lett 2013;8:102. https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102.

[9] Leppäluoto J, Rintamäki H, Vakkuri O, Vierimaa H, Lauri T. Anatomia ja fysiologia: Rakenteesta toimintaan. Kustantaja: Sanoma Pro Oy; 2019.

[10] Eugster R, Luciani P. Liposomes: Bridging the gap from lab to pharmaceuticals. Curr Opin Colloid Interface Sci 2025;75:101875. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2024.101875.

[11] Miller CR, Bondurant B, McLean SD, McGovern KA, O'Brien DF. Liposome−Cell Interactions in Vitro: Effect of Liposome Surface Charge on the Binding and Endocytosis of Conventional and Sterically Stabilized Liposomes. Biochemistry 1998;37:12875–83. https://doi.org/10.1021/bi980096y.

[12] The unique and different types of phospholipids. Phospholipid Res Cent n.d. https://www.phospholipid-research-center.com/phospholipid/types/ (viitattu 9.3.2025).

[13] van der Veen JN, Kennelly JP, Wan S, Vance JE, Vance DE, Jacobs RL. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr 2017;1859:1558–72. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.04.006.

[14] Bhaskarwar M, Joshi A, Bhaskarwar AN. Liposomes: Fundamentals, Properties, and Applications for Targeted Drug Delivery. New York, UNITED STATES: Momentum Press; 2018.

[15] Allahou LW, Madani SY, Seifalian A. Investigating the Application of Liposomes as Drug Delivery Systems for the Diagnosis and Treatment of Cancer. Int J Biomater 2021;2021:3041969. https://doi.org/10.1155/2021/3041969.

[16] Sriwidodo, Umar AbdK, Wathoni N, Zothantluanga JH, Das S, Luckanagul JA. Liposome-polymer complex for drug delivery system and vaccine stabilization. Heliyon 2022;8:e08934. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08934.

[17] Mastrotto F, Brazzale C, Bellato F, De Martin S, Grange G, Mahmoudzadeh M, et al. In Vitro and in Vivo Behavior of Liposomes Decorated with PEGs with Different Chemical Features. Mol Pharm 2020;17:472–87. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00887.

[18] Lombardo D, Calandra P, Barreca D, Magazù S, Kiselev MA. Soft Interaction in Liposome Nanocarriers for Therapeutic Drug Delivery. Nanomaterials 2016;6:125. https://doi.org/10.3390/nano6070125.

[19] Dzieciuch M, Rissanen S, Szydłowska N, Bunker A, Kumorek M, Jamróz D, et al. PEGylated Liposomes as Carriers of Hydrophobic Porphyrins. J Phys Chem B 2015;119:6646–57. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.5b01351.

[20] Deshpande PP, Biswas S, Torchilin VP. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. Nanomed 2013;8:1509–28. https://doi.org/10.2217/nnm.13.118.

[21] Noble GT, Stefanick JF, Ashley JD, Kiziltepe T, Bilgicer B. Ligand-targeted liposome design: challenges and fundamental considerations. Trends Biotechnol 2014;32:32–45. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.09.007.
[22] Muthu MS, and Feng S-S. Theranostic liposomes for cancer diagnosis and treatment: current development and pre-clinical success. Expert Opin Drug Deliv 2013;10:151–5. https://doi.org/10.1517/17425247.2013.729576.
[23] Nogueira E, Gomes AC, Preto A, Cavaco-Paulo A. Design of liposomal formulations for cell targeting. Colloids Surf B Biointerfaces 2015;136:514–26. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.09.034.
[24] Bunker A, Magarkar A, Viitala T. Rational design of liposomal drug delivery systems, a review: Combined experimental and computational studies of lipid membranes, liposomes and their PEGylation. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr 2016;1858:2334–52. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.02.025.
[25] Nogueira E, Gomes AC, Preto A, Cavaco-Paulo A. Design of liposomal formulations for cell targeting. Colloids Surf B Biointerfaces 2015;136:514–26. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.09.034.
[26] Jesorka A, Orwar O. Liposomes: technologies and analytical applications. Annu Rev Anal Chem Palo Alto Calif 2008;1:801–32. https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.1.031207.112747.
[27] Dangkoub F, Bemani Naeini M, Akar S, Badiee A, Jaafari MR, Sankian M, et al. Preparation of atorvastatin calcium-loaded liposomes using thin-film hydration and coaxial micromixing methods: A comparative study. Int J Pharm X 2024;8:100309. https://doi.org/10.1016/j.ijpx.2024.100309.
[28] Lombardo D, Kiselev MA. Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application. Pharmaceutics 2022;14:543. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030543.
[29] Ahmed KS, Hussein SA, Ali AH, Korma SA, Lipeng Q, Jinghua C. Liposome: composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical applications. J Drug Target 2019;27:742–61. https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1527337.
[30] Shah S, Dhawan V, Holm R, Nagarsenker MS, Perrie Y. Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process. Adv Drug Deliv Rev 2020;154–155:102–22. https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.002.
[31] A Comprehensive Review of Silymarin Extraction and Liposomal Encapsulation Techniques for Potential Applications in Food. ResearchGate 2025. https://doi.org/10.3390/app14188477.
[32] Chi-Ling C, Cheng M-H, Lin C-H. From Nanoparticles to Cancer Nanomedicine: Old Problems with New Solutions. Nanomaterials 2021;11:1727. https://doi.org/10.3390/nano11071727.
[33] Pathak P, Dhawan V, Magarkar A, Danne R, Govindarajan S, Ghosh S, et al. Design of cholesterol arabinogalactan anchored liposomes for asialoglycoprotein receptor mediated targeting to hepatocellular carcinoma: *In silic*o modeling, *in vitro* and *in vivo* evaluation. Int J Pharm 2016;509:149–58. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.05.041.
[34] Ghosh S, Lalani R, Maiti K, Banerjee S, Bhatt H, Bobde YS, et al. Synergistic co-loading of vincristine improved chemotherapeutic potential of pegylated liposomal doxorubicin against triple negative breast cancer and non-small cell lung cancer. Nanomedicine Nanotechnol Biol Med 2021;31:102320. https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.102320.
[35] Wikipedia: Vinkristiini. Saatavissa: https://fi.wikipedia.org/wiki/Vinkristiini (viitattu 24.4.2025).
[36] Wikipedia: Paclitaxel. Saatavissa: https://en.wikipedia.org/wiki/Paclitaxel (viitattu 31.3.2025).
[37] Liu Z, Liu Y, Wu Z, Liu B, Zhao L, Yin T, et al. Research on the loading and release kinetics of the vincristine sulfate liposomes and its anti-breast cancer activity. Int J Pharm X 2024;7:100258. https://doi.org/10.1016/j.ijpx.2024.100258.
[38] Pauli G, Tang W-L, Li S-D. Development and Characterization of the Solvent-Assisted Active Loading Technology (SALT) for Liposomal Loading of Poorly Water-Soluble Compounds. Pharmaceutics 2019;11:465. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11090465.
[39] Jain A, Jain SK. *In vitro* and cell uptake studies for targeting of ligand anchored nanoparticles for colon tumors. Eur J Pharm Sci 2008;35:404–16. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.08.008.
[40] Yang B, Song B, Shankar S, Guller A, Deng W. Recent advances in liposome formulations for breast cancer therapeutics. Cell Mol Life Sci 2021;78:5225–43. https://doi.org/10.1007/s00018-021-03850-6.

[41] Bahutair WN, Abuwatfa WH, Husseini GA. Ultrasound Triggering of Liposomal Nanodrugs for Cancer Therapy: A Review. Nanomaterials 2022;12:3051. https://doi.org/10.3390/nano12173051.
[42] Lee RJ, Low PS. Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin in vitro. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr 1995;1233:134–44. https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)00235-H.
[43] Moghimipour E, Handali S. Functionalized liposomes as a potential drug delivery systems for colon cancer treatment: A systematic review. Int J Biol Macromol 2024;269:132023. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132023.
[44] Chen J, Hu S, Sun M, Shi J, Zhang H, Yu H, et al. Recent advances and clinical translation of liposomal delivery systems in cancer therapy. Eur J Pharm Sci 2024;193:106688. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106688.
[45] Gandek TB, van der Koog L, Nagelkerke A. A Comparison of Cellular Uptake Mechanisms, Delivery Efficacy, and Intracellular Fate between Liposomes and Extracellular Vesicles. Adv Healthc Mater 2023;12:2300319. https://doi.org/10.1002/adhm.202300319.
[46] Ranta Veli-Pekka ja Honkakoski Paavo. Farmakokinetiikan perusteet. 1. painos. Kuopio: Farmasian opiskelijayhdistys Fortis ry; 2017.
[47] Cellular pH Gradient in Tumor versus Normal Tissue: Potential Exploitation for the Treatment of Cancer1 | Cancer Research | American Association for Cancer Research n.d. https://aacrjournals.org/cancerres/article/56/6/1194/502986/Cellular-pH-Gradient-in-Tumor-versus-Normal-Tissue (viitattu 18.3.2025).
[48] Ashrafizadeh M, Delfi M, Zarrabi A, Bigham A, Sharifi E, Rabiee N, et al. Stimuli-responsive liposomal nanoformulations in cancer therapy: Pre-clinical & clinical approaches. J Controlled Release 2022;351:50–80. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.08.001.
[49] Kim I-Y, Kang Y-S, Lee DS, Park H-J, Choi E-K, Oh Y-K, et al. Antitumor activity of EGFR targeted pH-sensitive immunoliposomes encapsulating gemcitabine in A549 xenograft nude mice. J Controlled Release 2009;140:55–60. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.07.005.
[50] Paasonen L, Laaksonen T, Johans C, Yliperttula M, Kontturi K, Urtti A. Gold nanoparticles enable selective light-induced contents release from liposomes. J Controlled Release 2007;122:86–93. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.06.009.
[51] Paasonen L, Laaksonen T, Johans C, Yliperttula M, Kontturi K, Urtti A. Gold nanoparticles enable selective light-induced contents release from liposomes. J Controlled Release 2007;122:86–93. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.06.009.
[52] Needham D, Anyarambhatla G, Kong G, Dewhirst MW. A New Temperature-sensitive Liposome for Use with Mild Hyperthermia: Characterization and Testing in a Human Tumor Xenograft Model1. Cancer Res 2000;60:1197–201.
[53] Lajunen T, Viitala L, Kontturi L-S, Laaksonen T, Liang H, Vuorimaa-Laukkanen E, et al. Light induced cytosolic drug delivery from liposomes with gold nanoparticles. J Controlled Release 2015;203:85–98. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.02.028.
[54] Lajunen T, Kontturi L-S, Viitala L, Manna M, Cramariuc O, Róg T, et al. Indocyanine Green-Loaded Liposomes for Light-Triggered Drug Release. Mol Pharm 2016;13:2095–107. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00207.
[55] Schroeder A, Kost J, Barenholz Y. Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes. Chem Phys Lipids 2009;162:1–16. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2009.08.003.
[56] Hosseinikhah SM, Farhoudi L, Mirzavi F, Vahdat-Lasemi F, Arabi L, Gheybi F, et al. Ultrasound-assisted efficient targeting of doxorubicin to the tumor microenvironment by lyso-thermosensitive liposomes of varying phase transition temperatures. Eur J Pharm Sci 2025;206:107024. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2025.107024.
[57] Orita Y, Shimanuki S, Okada S, Nakamura K, Nakamura H, Kitamoto Y, et al. Acoustic-responsive carbon dioxide-loaded liposomes for efficient drug release. Ultrason Sonochem 2023;94:106326. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106326.
[58] Song Y, Sheng Z, Xu Y, Dong L, Xu W, Li F, et al. Magnetic liposomal emodin composite with enhanced killing efficiency against breast cancer. Biomater Sci 2019;7:867–75. https://doi.org/10.1039/C8BM01530A.