



PROLİPOZOM TEKNOLOJİSİNDEKİ GÜNCEL GELİŞMELER VE UYGULAMALAR

RECENT DEVELOPMENTS ON PROLIPOSOME TECHNOLOGY AND APPLICATIONS

Nadir DERELİ¹, Zerrin SEZGİN BAYINDIR^{2,*}

¹Nadir Dereli Eczanesi, Gazi Mahallesi, Celal Bayar Caddesi, No: 7/C, Silifke, Mersin, Türkiye

²Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Yenimahalle, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Lipozomlar, ilaç taşıyıcı sistemler arasında en umut verici ve uygulanabilir olanıdır. Ancak, lipozomların fiziksel ve kimyasal stabilite problemleri kullanımlarını sınırlamaktadır. Bu problemlerin üstesinden gelmek için 1986 yılında prolipozomal sistemler geliştirilmiştir. Bu derleme kapsamında prolipozomal ilaç taşıyıcı sistemler ve uygulamaları ile ilgili yapılmış olan bilimsel araştırmalar akademik veri tabanları taranarak sunulmuştur.

Sonuç ve Tartışma: Prolipozomlar etkin madde, suda çözünür taşıyıcı materyal ve fosfolipitlerden oluşan, su veya biyolojik sıvılar ile temas ettiğinde çok katmanlı lipozomal süspansiyon oluşturan toz veya sıvı lipit yapıdaki ürünlerdir. Bu derlemede, ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılan prolipozomlar hakkında genel bilgiler verilmiştir. Prolipozomların hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve özellikleri tanımlanmıştır. Prolipozomların hazırlama teknolojileri, karakterizasyonu ve avantajlarına değinilmiştir. Derlemenin son bölümünde prolipozomların oral, parenteral, pulmoner, transdermal ve mukozal yollardan uygulanmaları ile ilgili çalışmalar özetlenmiştir. Prolipozomlar üstün in vivo etkinlikleri, yüksek stabiliteleri ve endüstriyel boyutta imal edilebilir olmaları nedeniyle umut verici ilaç taşıyıcı sistemlerdir.

Anahtar Kelimeler: ilaç taşıyıcı sistemler, lipozom, prolipozomlar, stabilite.

ABSTRACT

Objective: Liposomes are the most promising and feasible carriers among other drug delivery systems. However, physical and chemical stability problems of liposomes limit their use. In order to overcome these problems, proliposomal systems were developed in 1986. Within the scope of this review, scientific researches about proliposomal drug delivery systems and their applications were presented by searching academic databases.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Zerrin Sezgin Bayındır
e-posta / e-mail: zsezgin@pharmacy.ankara.edu.tr

Result and Discussion: *Proliposomes are powder or liquid lipid formulations of active agent, water-soluble carrier material and phospholipids, which form a multilamellar liposomal suspension upon contact with water or biological fluids. In this review, general information about proliposomes as drug delivery systems were given. The components used in the preparation of proliposomes and their properties were described. The preparation technologies, characterization and advantages of proliposomes were discussed. In the last part of the review, studies on the administration of proliposomes by oral, parenteral, pulmonary, transdermal and mucosal routes were summarized. Proliposomes are promising drug delivery systems because of their superior in vivo efficacy, high stability and industrial fabricability.*

Keywords: *drug delivery systems, liposome, proliposomes, stability.*

GİRİŞ

Lipozomlar, 1965 yılında Bangham ve arkadaşları tarafından keşfedilmelerinden bu yana etkin maddelerin terapötik etkilerini artırmak, yan etkilerini azaltmak ve kimyasal bozunmadan koruyarak stabilitelerini artırmak amacıyla üzerinde çok çalışılmış, ilaç taşıyıcı sistemler arasında en umut verici ve geniş uygulamaya sahip olanıdır [1]. Lipozomların ilaç pazarına girebilmesi için, raf ömrü boyunca stabil olmaları ve istenen etkiyi oluşturmak için hedef bölgelere ulaşmaya kadar bozunmadan kalabilmeleri gerekmektedir. Ancak, lipozomlar çeşitli kimyasal ve fiziksel stabilite problemleri olan, düşük stabiliteli kolloidal sistemlerdir. Fiziksel stabilite problemleri, vezikül agregasyonu ve füzyonu sonucu meydana gelen vezikül büyüklüğündeki değişiklikler ve enkapsüle maddenin vezikül dışına sızması ile ilgilidir. Kimyasal stabilite problemleri ise, fosfolipitlerde yağ asitlerini gliserol omurgaya bağlayan ester bağlarının hidrolizi ve doymamış açil zincirlerinin peroksidasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu problemler lipozomların parçalanmasını hızlandırır ve ilaç salım özelliklerini değiştirirler. Ayrıca, lipozomların *in vivo* performanslarını ve saklama koşullarını etkiler [2]. Bu nedenle lipozomlar için özel saklama koşullarına ihtiyaç duyulmaktadır. Stabilite problemlerine ek olarak lipozom formülasyonlarında kullanılan doğal fosfolipitlerin saflığı değişkenlik gösterebilmektedir. Lipozomların imalatı sırasında uygun olmayan çözücü kullanımı ve oluşturulan lipid filmin yetersiz hidrasyonu gibi problemler gözlenebilmektedir [3].

Lipozomlarla ilgili stabilite problemlerinin üstesinden gelmek için çeşitli yaklaşımlar uygulanmıştır. Partikül büyüklüğü ve tabakalanmanın kontrolü, lipozom bileşiminin değiştirilmesi elektrosterik stabilizasyon ve liyofilizasyon bu yaklaşımlara örnek olarak verilebilir. Prolipozomlar, lipozomlarla ilgili stabilite problemlerinin üstesinden gelmek için geliştirilmiş yeni ilaç taşıyıcı sistemlerdir. 1986 yılında Nicholas Payne ve arkadaşları tarafından geliştirilen prolipozomlar; etkin madde, fosfolipitler ve suda çözünen bir taşıyıcı materyalden oluşan, su ile temas halinde çok tabakalı lipozomal süspansiyona dönüşen, kuru, iyi akış özelliklerine sahip granüler ürünlerdir [2]. Prolipozom kavramı daha sonra 1991'de sulu fazın ilavesiyle lipozom oluşturabilen sıvı fosfolipit

formülasyonlarını da kapsayacak şekilde genişletilmiştir. Bu sıvı formülasyonlar fosfolipitlerin konsantre etanolik çözeltileridir. Bu nedenle, prolipozomlar sulu faz ilavesiyle lipozomları oluşturabilen toz veya sıvı lipit formülasyonlar olarak tanımlanabilir [4].

Prolipozom teknolojisi, ticari boyutta lipozomların üretimi için düşük maliyetli ve büyük ölçekte kullanılabilen bir yaklaşımdır. Kuru toz formunda olmaları, dağıtım, taşınma ve ölçümde avantaj sağlamaktadır. Lipozomlar, prolipozomların biyolojik sıvılarla *in vivo* koşullarda teması sonucu oluşturulabilir veya uygun bir hidrasyon sıvısı kullanılarak uygulanmadan önce *in vitro* olarak oluşturulabilir [2]. Prolipozomlar, lipozomlara göre daha iyi stabilite gösterirler ve büyük ölçekli üretimde sterilizasyonları kolaydır. Prolipozom teknolojisi, lipozom dispersiyonlarının büyük ölçekli üretimi için basit, doğru, tekrarlanabilir ve güvenilir bir üretim sağlamaktadır [1].

İlaç taşıyıcı sistemler olarak prolipozomlar şu avantajları sağlamaktadır [1, 4, 5, 6, 7]:

- ◆ Suda az çözünen maddelerin çözünürlüğünü ve biyoyararlanımlarını arttırlar
- ◆ Hem hidrofilik hem de lipofilik maddeler enkapsüle edilebilir
- ◆ Prolipozomlar, maddeleri hedef dokulara taşımak ve kontrollü, uzun süreli etkin madde salımı için kullanılabilirler
- ◆ Klasik lipozomlara göre daha stabildirler
- ◆ Etkin maddelerin permeabilitesini ve bağırsaktan emilimlerini arttırlar
- ◆ Etkin maddeleri gastrointestinal (GI) sistemde parçalanmaya karşı korurlar, ilk geçiş metabolizmasını azaltarak etkin maddelerin farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini değiştirebilirler
- ◆ Toksikiteyi azaltırlar ve istenmeyen tadı maskelerler
- ◆ Biyolojik olarak parçalanabilir ve biyoyumludurlar
- ◆ Hazırlanmaları kolay ve ucuzdur
- ◆ Kapsül, tablet gibi dozaj formları şeklinde hazırlanabilirler.

1. Prolipozomların Bileşimi

Klasik lipozomal formülasyonlara alternatif formlar olan prolipozomlar taşıyıcı materyal olarak suda çözünür bir poröz toz, fosfolipitler, kolesterol ve etkin maddeden oluşmaktadır.

Suda Çözünür Taşıyıcı Materyal: Prolipozom hazırlanmasında kullanılacak taşıyıcı materyal suda iyi çözünürlüğe, kloroform, metanol gibi organik çözücülerde zayıf çözünürlüğe sahip olmalıdır. Suda çözünebilir olmaları hidrasyon sonrası hızlı lipozomal dispersiyon oluşumunu

sağlamaktadır. Fosfolipitlerin adsorbe edileceği gerekli taşıyıcı miktarının kolayca ayarlanabilmesi için seçilen taşıyıcı materyalin yüksek yüzey alanına ve poroziteye sahip olması gerekmektedir. Taşıyıcının partiküler özellikleri (partikül büyüklüğü, akışı gibi) oluşacak lipozomların partikül büyüklüğünü ve homojenliğini etkilemektedir. Poröz tozun partikül büyüklüğünün kontrol edilmesiyle, nispeten partikül büyüklük dağılımı dar olan rekonstitüe lipozomlar elde edilebilmektedir [1,3]. Tablo 1’de prolipozom formülasyonlarında kullanılan taşıyıcı materyallerine örnekler verilmiştir [3, 5].

Tablo1. Prolipozom formülasyonlarında kullanılan taşıyıcı materyaller

• Sorbitol
• Mannitol <ul style="list-style-type: none"> ○ Püskürterek kurutulmuş mannitol (Pearlitol SD 200) ○ Granüle edilmiş mannitol (Pearlitol DC 300)
• Mikrokrystal Selüloz
• Laktoz <ul style="list-style-type: none"> ○ İnhalasyon için laktoz (Respitose) ○ Direkt basılabilir laktoz
• Eritritol
• Dekstroz
• Magnezyum Alüminyum Silikatlar
• Maltodekstrin

Fosfolipitler: Prolipozomların hazırlanmasında kullanılan fosfolipitler biyolojik membranların yapı taşlarıdır. En yaygın fosfatidilkolinler (yumurta sarısı ve soya fasulyesinden elde edilir) ve lesitin (farklı doymamışlık derecesine ve zincir uzunluklarına sahip çeşitli lipitlerden oluşan saflaştırılmamış fosfatidilkolin) kullanılır. Fosfatidilkolin molekülleri suda çözünmez ancak, sulu ortamda yağ asitlerinin uzun hidrokarbon zincirleri ve sulu faz kütlesi arasındaki etkileşimi en aza indirmek için birbirlerine yakın bir şekilde düzlemsel lipit çift tabaka halinde diziliş gösterirler [1]. Fosfolipitlerin stabilitesi yapılarındaki doymamış zincirlerin artmasıyla azalmaktadır, bu nedenle doymuş fosfolipitler doymamış olanlara göre daha çok tercih edilmektedir [5].

Fosfolipitler faz geçiş sıcaklığı (T_c) olarak adlandırılan bir sıcaklık aralığında karakteristik bir jel-sıvı kristal faz geçişine uğrar. Veziküller T_c 'nin altında katı (jel) olarak düşünülür, fakat bu sıcaklığın üstünde ise sıvı durumdadırlar. Düşük T_c değerlerine sahip ve yağ asidi alkil zincirlerinde doymamışlık içeren fosfolipitlerden oluşan prolipozomlar genellikle katı halde değildirler. Bu gibi fosfolipitler enkapsüle ettikleri etkin maddeyi sızdırma eğilimindedir [5].

Prolipozomların hazırlanmasında kullanılan fosfolipitler toksikolojik güvenlik, saflık, stabilite ve maliyet nedeniyle fosfatidilkolin ve fosfatidilgliserollerle sınırlıdır [5]. Tablo 2’de prolipozom formülasyonlarında kullanılan fosfolipitler verilmiştir [3, 5].

Tablo 2. Prolipozom formülasyonlarında kullanılan fosfolipitler

• Yumurta Lesitini
• Soya Lesitin
• Soya Fosfatidilkolin
• Hidrojenlenmiş Soya Fosfatidilkolin (HSPC)
• Disteroil fosfatidilkolin (DSPC)
• Dimiristoil fosfatidilkolin(DMPC)
• Dipalmitoil fosfatidilkolin (DPPC)
• Fosfolipon 90H (Yüksek Saflıkta Hidrojenlenmiş Soya Fosfatidilkolin)
• Lipoid E80 (%80-85 fosfatidilkolin içeren yumurta lesitini)
• Dimiristoil fosfatidilgliserol (DMPG)

Kolesterol: Kolesterol lipozomların çifte tabaka özelliklerinin korunması için lipozom formülasyonlarında kullanılan bir steroidtir. Kolesterol, çift tabakalı membranın akıcılığını düzeltir, membran boyunca suda çözünür maddelerin permeabilitesini azaltır ve kan/plazma gibi biyolojik sıvılar varlığında çift tabakalı membranın stabilitesini artırır. Kolesterol içermeyen lipozomlar albümin, m-transferrin ve makro-globulin gibi lipozom stabilitesini bozan kan proteinleri ile reaksiyona girme eğilimindedir. Kolesterol kan proteinleri ile etkileşimi azaltmaktadır [6].

Yük verici ajanlar: Prolipozomlardan oluşan lipozomların istenilen yüzey yüküne sahip olması için stearilamin (SA), disetil fosfat (DCP) gibi yük verici maddeler kullanılabilir [3]. Negatif veya pozitif yüklü lipidlerin varlığı etkin maddenin yüklenmesi için daha fazla hacim sağlar ve agregasyon olasılığını azaltır. Dolayısıyla lipozom stabilitesinde bir artış sağlanabilir [6].

Bahsedilen temel prolipozom bileşenleri dışında etkin madde çıkış hızı, stabilite, *in vivo* etkinlik gibi çeşitli parametreleri düzenlemek için prolipozomların yapısına safra tuzları, noniyonik sürfaktanlar ve çeşitli polimerler ilave edilmektedir. Prolipozomlardan türetilmiş lipozomlardan etkin madde salım hızı prolipozom sistemine polisorbata 80 gibi noniyonik sürfaktanların katılması ile artırılabilir. Bunun yanı sıra, polisorbata 80 lipozomların partikül büyüklüğünü azaltarak fiziksel stabilitesini artırabilir. Safra tuzları, biyolojik membranlardan lipozomların penetrasyonunu artırarak prolipozomların biyolojik performansını artırmak için kullanılmaktadır. Prolipozom imalatında, hedef dokulara spesifik çeşitli yapılar prolipozom formülasyonlarına eklenebilmektedir.

Örneğin retiküloendotelyal sistem açısından zengin organların ters hedeflemesi prolipozomlara poloksamer 407 eklenmesiyle sağlanmıştır [3].

Prolipozom formülasyonlarına oleik asidin sodyum tuzu ve gliserin gibi maddelerin katılmasıyla lipozomların partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliği modifiye edilebilir. Şelat yapıcı ajanların eklenmesi (etilen diamin tetra asetik asit-EDTA) yüklenmiş etkin maddeyi *in vitro* bozunmaya karşı koruyabilir. Kriyoprotektanlar, dondurarak kurutma işlemi sırasında prolipozomları korumak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Toz formundaki prolipozomların akış ve aerodinamik özellikleri antiadherent maddeler kullanılarak modifiye edilebilmektedir. Örneğin lösin benzeri antiadherentlerin toz partiküllerin arasındaki bağlanmayı azalttığı ve agregasyonu önlediği belirtilmiştir [3].

2. Prolipozomların Sınıflandırılması

Prolipozomal sistemler genellikle üç fiziksel formda bulunmaktadır:

- a. Kuru Granüler Form
- b. Karışık Miseller Form
- c. Sıvı Kristal Form

Kuru Granüler Form: Kuru granüler tipteki prolipozomlar, organik çözücü içerisinde suda çözünür taşıyıcı materyallerin (glukoz, fruktoz, laktöz, sorbitol veya maltodekstrin) fosfolipitler ile film tabakası şeklinde kaplanmasıyla oluşturulmaktadır. Kaplama işlemi sonundaki sonuç ürün kuru bir formülasyondur. Kuru granüler tipteki prolipozomlar istendiği şekilde porsiyonlara bölünür ve doz ayarlaması yapılabilir. Uygulamadan hemen önce birkaç dakika su ile karıştırıldıktan sonra lipozom dispersiyonu kendiliğinden oluşmaktadır. Oluşmuş veziküller homojen bir partikül büyüklük dağılımı gösterir. Kuru veziküler sistemler toz formda saklanabilmekte ve sterilize edilebilmektedir. Kuru tozlar, oral, IV veya diğer yollarla uygulanabilmektedir [3, 7].

Karışık Miseller Form: Bu formlar, safra tuzları, kolesterol ve fosfolipit içermektedir ve karışık misel yapısının suyla seyrelmesi neticesinde miseller yapı lipozomal forma dönüşmektedir. Safra tuzları içermeleri nedeniyle amfifilik özelliktedirler. Suyla seyreltilmelerine karşın lipofilik etkin maddelerin çökmemesi bu sistemin en önemli avantajıdır. Sıvı formda olmalarından dolayı IV veya diğer yollarla uygulanabilmektedirler [7].

Sıvı Kristal Form: Bu formda, çift tabakalı sıvı kristaller, yüksek sıcaklık altında lipit-alkol-su varlığında oluşturulmaktadır. Fosfolipit molekülleri, su molekülleri ile temas ettiğinde lipofilik

zincirleri üç muhtemel yolla “iyotropik sıvı kristal durum (düzenli faz)” olarak bilinen sıvı faza dönüştürülebilir:

- 1- Sıcaklığın T_c 'nin üstüne yükseltilmesi
- 2- Lipit çözen çözücü ilavesi
- 3- Sıcaklık ve çözücünün birlikte kullanımı

Düzenli faz sulu ortamda birbiri üzerine sıralanmış çifte tabakalardan oluşmaktadır. Çifte tabakalı sıvı kristaller yüksek sıcaklıkta lipit-alkol-su varlığında oluşur. Bu lameller sıvı kristal faz su veya tampona maruz bırakılarak oda sıcaklığına soğutulduğunda jel yapısı meydana gelir. Çifte tabakalı kristal faz su içeriği arttıkça veziküler dispersiyona dönüşür. Sıvı kristal formlar genellikle transdermal ilaç uygulamalarında kullanılmaktadır. Sıvı kristal yapı hidrokortizon gibi etkin maddelerin daha iyi difüze olmasını ve çözünürlüklerinin artmasını sağlamaktadır. Bu sistem termodinamik olarak stabildir. Sıvı kristal fazda etkin maddenin difüzyon katsayısı derideki değerine göre dört kat daha yüksektir. Jel yapısı stabilizasyonu sağlarken deride iritan etki oluşturmaz [3, 7].

Katı granüler form ile karşılaştırıldığında, sıvı kristal yapıdaki prolipozomların formülasyonu daha basittir ve özel bir cihaz gerektirmez. Ek olarak, sıvı kristal yapı sulu ortamla temas ettiğinde sonikasyon veya ekstrüderler gibi ekstra bir güç uygulamaksızın kısa sürede etkin madde yüklü lipozomları kendiliğinden oluşturulabilir. Sıvı prolipozomlardan hidrate edilmiş lipozomların ortalama partikül büyüklüğü daha küçük olup dar monodispers bir dağılım gösterme eğilimindedir [4, 8].

3. Prolipozom Formülasyonlarını Hazırlama Yöntemleri

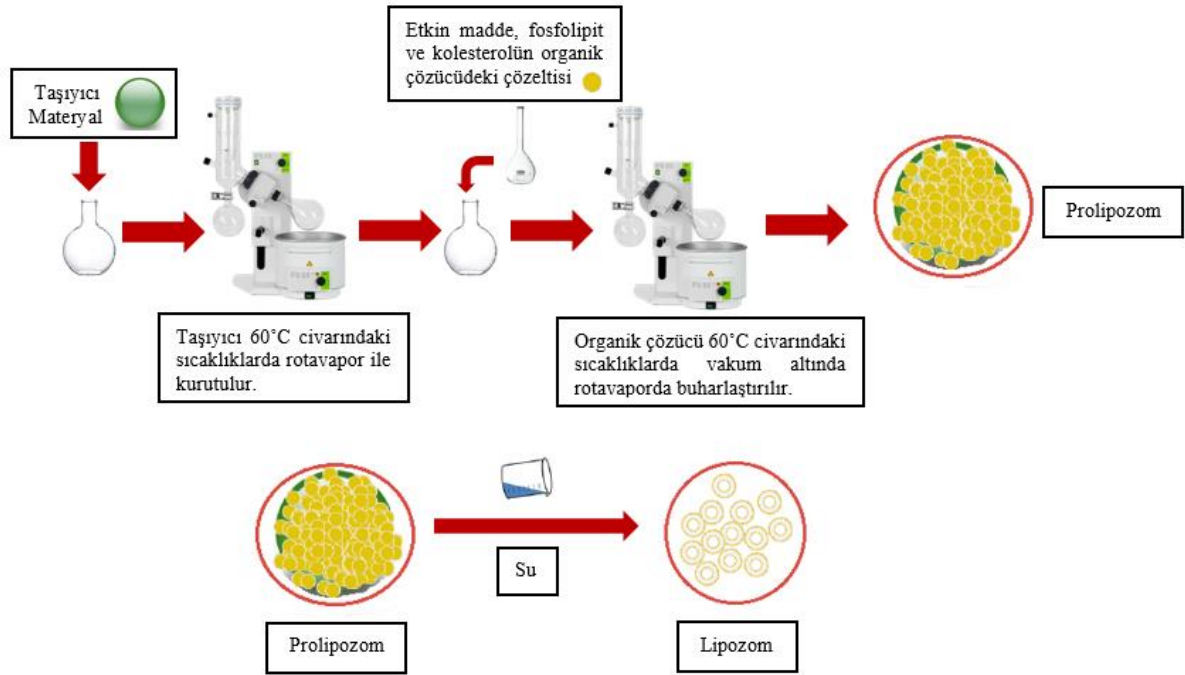
Prolipozomların hazırlanmasında farklı hazırlama yöntemleri kullanılmaktadır. Bu hazırlama yöntemleri aşağıda yer almaktadır.

Film Depozisyon Yöntemi (Bulamaç Yöntemi)

Prolipozomların hazırlanmasında çok yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Şekil 1). Bu yöntemde etkin madde, fosfolipitler ve kolesterol, suda çözünür poröz bir taşıyıcıya adsorbe edilir. Etkin madde ve fosfolipitler uçucu bir organik çözücü (kloroform, metanol veya karışımları) içinde çözülür ve bu çözelti bir bulamaç (slurry) elde etmek üzere 60°C civarındaki sıcaklıklarda rotavapor ile kurutulmuş taşıyıcı madde içeren yuvarlak tabanlı balona yerleştirilir. Organik çözücü 60°C civarındaki sıcaklıklarda vakum altında rotavaporda buharlaştırılır. Organik çözücünün tamamı uzaklaştırıldıktan sonra iyi akış özelliklerine sahip prolipozomal toz formülasyonu elde edilebilir. Çözücünün tamamen uzaklaştırılması sağlamak için ekstra vakum uygulaması uygundur [3, 9, 10].

Lipitlerin organik çözücü içindeki çözeltilerini küçük porsiyonlar halinde balon içindeki taşıyıcı materyal üzerine püskürterek veya enjekte ederek de prolipozomların hazırlanması mümkündür. Her bir ilaveden sonra, organik çözücünün buharlaştırılması gerekmektedir. Bazı araştırmacılar bulamaç oluştururken sonikasyon ve karıştırma işlemleri uygulamaktadır. Katı etkin madde miktarının yeterince yüksek olduğu durumlarda taşıyıcı maddeler kullanmaksızın bu yöntemi kullanmak mümkündür.

Çeşitli çalışmalarda bu yöntem tek başına veya diğer tekniklerle kombine edilerek kullanılmıştır. Taşıyıcı materyal olarak sitrik asit, hidrasyon çözeltisi olarak NaHCO_3 çözeltisi kullanılarak bu yöntem efervesan tekniği ile birleştirilmiştir. Organik çözücü buharlaştırma aşamasında, rotavapor yerine magnetik karıştırıcıya yerleştirilmiş üç boyunlu balon kullanarak yöntem modifiye etmiştir. Klasik ince film yöntemi ile oluşturulan lipozomların taşıyıcı üzerine adsorpsiyonu sağlandıktan sonra oda sıcaklığında formülasyonun kurutulmasıyla da serbest akan prolipozom formülasyonları elde edilmiştir [3].



Şekil 1. Film deposizyon yöntemiyle prolipozom hazırlama yöntemi

Püskürterek Kurutma Yöntemi

Püskürterek kurutma homojen partikül büyüklüğü ve şekline sahip partiküllerin hazırlanmasında kullanılan, büyük ölçekli üretim için elverişli ve uygun maliyetli bir yöntemdir.

Hem partikül oluşumu hem de kurutma işleminin tek bir adımda gerçekleştirilebilmesi bu yöntemin benzersiz bir özelliği olup kontrollü partikül oluşumunu sağlamaktadır. Püskürterek kurutma işleminin kullanımı sadece sulu çözeltilerle sınırlı olmayıp su içermeyen sistemlerle de partiküller hazırlanabilmektedir [1, 11, 12].

Püskürterek kurutma yönteminin prolipozom imalatında da yeri vardır. Bu amaçla etanol içindeki lipit ve kolesterolün berrak çözeltisi, katı taşıyıcı materyal veya taşıyıcı materyalin sulu çözeltisi ile karıştırılır. Karışım 60°C'ye kadar ısıtılır ve homojen çözelti/dispersiyon elde etmek için karıştırılır. Etkin maddenin etanolik çözeltisi de karışıma eklenir. Homojen bir karışım elde edildikten sonra bu karışım prolipozom elde etmek için püskürtülerek kurutulur [3].

Püskürterek kurutma ile ilgili başlıca dezavantaj etkin maddenin termal ve mekanik parçalanmasına neden olabilen yüksek çalışma sıcaklığı, kayma stresi ve absorpsiyon durumudur. Bu problemler, kurutucu hava sıcaklığı ve sıvı püskürtme hızı gibi işlem parametreleri optimize edilerek çözülebilmektedir. Disakkaritler, siklik oligosakkaritler ve polioller gibi stabilizatörler etkin maddenin bütünlüğünü korumak için kullanılabilir ve lipitlerin yüzey alanlarını artırarak hidrasyon etkinliğini artırmaktadır [1].

Akışkan Yatak Yöntemi

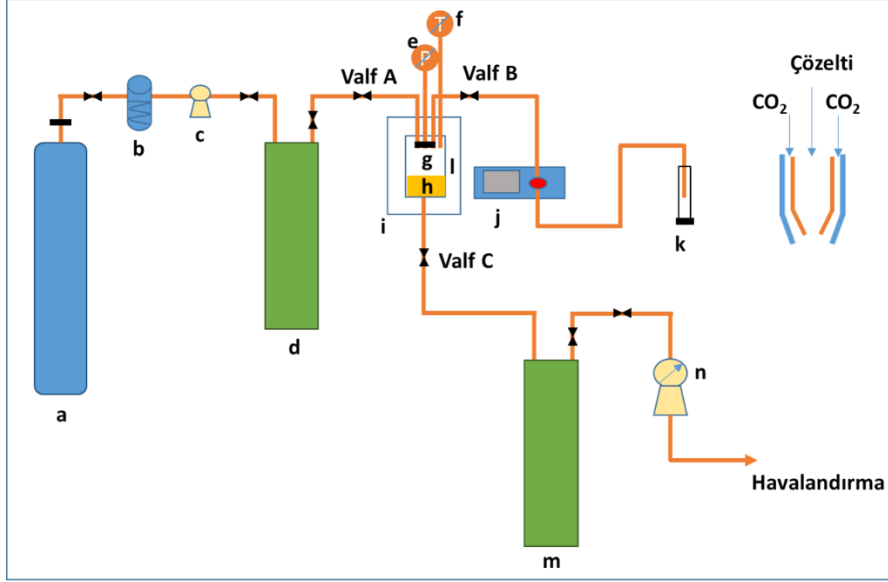
Bu yöntem, prolipozomların büyük ölçekli üretimi için uygulanabilir ve partikül kaplama teknolojisi prensibine göre çalışır. Taşıyıcı materyal üzerine etkin madde ve lipit çözeltisinin püskürtülmesiyle uygulanmaktadır. Burada kullanılan taşıyıcı materyal olarak kristal formdaki tozlar, inert boncuklar kullanılabilir. Akışkan yatak sisteminde organik çözücü içindeki etkin madde ve fosfolipit çözeltisi taşıyıcı materyal üzerine püskürtülür ve vakum uygulanarak organik çözücü buharlaştırılır. Eser miktardaki çözücü kalıntısını buharlaştırmak için elde edilen lipit kaplı toz/boncuklar gece boyunca vakum altında kurutulabilir. Böylece, taşıyıcı materyalin üzeri düzgün bir şekilde kaplanabilir. Taşıyıcı materyal olarak boncuklar kullanıldığında, fosfolipitlerin kaplanması için düzgün pürüzsüz bir yüzey sağlamak amacıyla boncuklara ön kaplama uygulanır. Böylece fosfolipitler çekirdeğin etrafını kaplar ve hidrasyonla küçük boyutlu lipozomların oluşumu sağlanır [1, 3, 13].

Süperkritik Anti-Solvan Yöntemi

Süperkritik anti-solvan (SAS) yöntemiyle prolipozom hazırlanmasında süperkritik karbon dioksit (SCCO₂) kullanılır. SCCO₂, kritik sıcaklık ve basınçta veya üzerinde tutulan karbondioksitin sıvı halidir. Anti-solvan teknolojisi gıda endüstrisinde geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Diğer yöntemlere ait karmaşık işlem basamakları, yüksek seviyelerde sıcaklık uygulama gerekliliği ve artık

çözücülerin varlığı gibi dezavantajlar elimine edilerek prolipozomların imalatı amacıyla geliştirilmiştir [1, 14].

SAS teknolojisi örnek taşıma, çöktürme ve ayırma ünitelerinden oluşan özel bir ekipman ile uygulanmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. Süperkritik Anti-solvan Yöntemi [6]

Örnek taşıma ünitesi iki pompadan oluşmaktadır: Biri CO₂, diğeri ise çözelti içindir. CO₂ tüpünden (a) temin edilen CO₂ dondurucuda (b) soğutulur ve yüksek basınçlı bir pompa (c) ile tampon tankına (d) gönderilerek burada ön ısıtmaya tabi tutulur. Etkin madde çözeltisi pompa (j) aracılığıyla ilave edilir. Etkin maddeyi çözmek için kullanılan çözücü CO₂ ile her oranda tamamen karışabilmelidir. A ve B vanalarının açılmasıyla hazne içine çözelti ve CO₂ girişi sağlanır. Şekil 2'de görüldüğü gibi püskürtücünün iç kanalından çözelti püskürtülürken dışından CO₂ püskürtülür [1]. Çöktürme ünitesi hava banyosu ile ısıtılmış bir haznedir (i) oluşmaktadır. Ayırma ünitesi ise bir ayrıştırıcı (m) ve gaz sayacından (n) oluşmaktadır. CO₂'in volumetrik akış hızı sayaç ile ölçülürken düşük basınç nedeniyle organik çözücü ayırma ünitesinde SCCO₂'den ayrılır. Ayırma ünitesinin sıcaklık ve basıncı önceden belirlenmiş değerlere ulaştıktan sonra, CO₂ girişini sağlamak için A vanası, ardından da çözelti girişini sağlamak için B vanası açılır. SCCO₂ ve çözelti püskürtüldüğü için birbiri içinde hızlıca difüze olur ve karışırlar. Organik çözücü içindeki maddenin çözünürlüğünün büyük ölçüde azalması nedeniyle çok kısa bir sürede madde organik çözücü içinde aşırı doymunluğa ulaşır. Sonuç olarak, prolipozomlar ünite içerisinde çökerler. Çözelti tamamen bittikten sonra A ve B vanaları kapatılır ve ünitedeki basıncı atmosfer basıncına düşürmek için C

vanası açılır. Örnekler ünitenin tabanındaki filtre (h) üzerinde toplanır. Prolipozomlara yüksek miktarda etkin madde yüklemek için etkin madde çözeltisinin basınç, sıcaklık ve akış hızının optimize edilmesi gerekmektedir [1].

Film Dispersiyon-Dondurarak Kurutma Yöntemi

Prolipozom elde etmek için ince film hidrasyon yöntemi ile elde edilen lipozomlar dondurularak kurutulabilir. Organik çözücü içindeki lipit çözeltisi yuvarlak tabanlı balon içerisine konular ve organik çözücü ince lipit bir film elde etmek için lipitlerin geçiş sıcaklığı (T_c) üstünde buharlaştırılır. Kriyoprotektan içeren etkin madde çözeltisi balona konular ve 60°C 'de film hidrate edilir. Taşıyıcıya yüklenmemiş etkin maddeyi ayırmak için yapılan ultrasantrifüj işleminden sonra elde edilen çökelti distile su ile rekonstitüe edilir ve prolipozomal toz eldesi için dondurularak kurutulur [15].

Etanol Enjeksiyon-Homojenizasyon-Dondurarak Kurutma Yöntemi

Etkin madde, fosfolipit ve kolesterolün etanolik çözeltisi yüksek sıcaklıkta (37°C) taşıyıcı materyalin sulu dispersiyonuna enjekte edilir. Etanolün buharlaştırılmasından sonra karışım homojenizatörden geçirilir ve örnekler dondurularak kurutulur [16].

Etanol enjeksiyon yöntemleri, fosfolipitlerin organik çözücüdeki çözeltilerinin suya ilavesiyle çözünürlüklerinin azaltılmasına bağlıdır. Sonuçta elde edilen yapı düşük su miktarı nedeniyle konsantre prolipozomal jeldir. Bu jel fazla miktarda su ile seyreltildiğinde lipozomal dispersiyonu oluşturur [3].

Modifiye Etanol Enjeksiyon Yöntemi

Bu yöntemin temelinde uzaktan (remote) yükleme teknolojisi ve etanol enjeksiyon yöntemi kullanılmaktadır. Fosfolipit, kolesterol ve oleik asitin sodyum tuzu etanol:gliserin karışımında çözülür ve etkin maddenin (doksorubisin) %0.9 NaCl içerisindeki sulu çözeltisi içerisine enjekte edilir. Oluşan lipozomlara etkin madde otomatik olarak yüklenmektedir [17].

Koaservasyon Yöntemi

Taşıyıcı materyal kullanılmadan prolipozom hazırlamak için kullanılan bir yöntemdir. Lipit, kolesterol ve etkin maddenin homojen, berrak etanolik çözeltisi bidistile su ile karıştırıldıktan sonra berrak veya şeffaf bir çözelti elde edilinceye kadar su banyosunda ısıtılır. Çözeltinin sıcaklığı düşürülerek prolipozomal jel oluşumu sağlanır [18].

4. Prolipozomların Karakterizasyonu

Uygulama açısından prolipozomların ve prolipozomlardan elde edilen lipozomal sistemlerin karakterize edilmesi çok önemlidir. Çeşitli fiziksel ve kimyasal parametrelerin kontrol ve takibi sağlanarak imalatın tekrarlanabilirliği ve prolipozomların istenen özelliklere sahip olduğu gösterilebilir. Kuru granüler formdaki prolipozomların karakterizasyonu için aşağıda yer alan parametreler kullanılmaktadır.

Morfolojik incelemeler

Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) çoğunlukla prolipozomal tozun yüzey morfolojisini görüntülemek için kullanılmaktadır. Bu teknik sayesinde, lipit ile kaplama işleminin öncesi ve sonrasında taşıyıcı materyalin poröz yüzey özellikleri incelenebilmekte ve prolipozomların oluşumu saptanabilmektedir [2, 5, 19]. Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM) çoğunlukla prolipozomların hidrasyonundan sonra oluşan lipozomların morfolojisini incelemek için kullanılmaktadır. Lipozom veziküllerinin tabakalanmasını ve şeklini gözlemek mümkün olmaktadır [2, 20].

Hidrasyon hızının tayini

Hidrasyon çalışması, prolipozomların hidrate olarak lipozomları oluşturma özelliklerini değerlendirmek için yapılır. Burada, lama alınan bir miktar prolipozomal toz üzerine damlalar halinde su eklenir ve veziküllerin oluşumu mikroskop altında gözlemlenir. Hidrasyonla lipozomlar 30 saniyeden daha az bir sürede hızlı bir şekilde oluşmalıdır [2].

Akış özelliklerinin değerlendirilmesi

Bir toz formülasyonunun akış özellikleri içerik tekdüzeliğini etkileyen, taşınma ve işleme sırasındaki en önemli mikromeritik özelliklerdendir. Formülasyonların doz ayarlamasından ambalajlanmasına kadar pek çok aşamada önemi vardır. Prolipozomların akış özelliği yığın açısı, Carr indeksi, Hausner oranı gibi parametreler ölçülerek değerlendirilmektedir [2, 21].

Birim Hacimdeki Vezikül Sayısı

Bu çalışma, hemositometrik olarak optik mikroskop altında hidrasyon sonrası oluşmuş lipozomların sayılmasıyla yapılmaktadır.

Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Ölçümü

Vezikül sistemler için önemli parametrelerden biri de vezikül büyüklüğü ve dağılımıdır. Bu işlem, prolipozomal tozun hidrasyonunu takiben uygun bir partikül büyüklüğü ölçüm cihazı

kullanılarak yapılmaktadır [22, 23]. Bu amaçla en çok dinamik ışık saçılımı (DLS) prensibi ile çalışan cihazlar kullanılmaktadır.

Zeta potansiyeli, çözeltinin elektro-nötral bölgesi ve sıkı bağlı tabaka yüzeyi (kayma düzlemi) arasındaki potansiyel fark olarak tanımlanmaktadır. Prolipozomal tozun hidrasyonunu takiben uygun bir zeta potansiyel tayin cihazı kullanılarak zeta potansiyel değeri ölçülmektedir [1, 22, 23].

Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçümleri hidrasyonla lipozomların oluşumu, partikül büyüklüğü üzerine lipit bileşiminin etkisi, lipozomların olası *in vivo* davranışlarının anlaşılması ve stabilite özelliklerinin değerlendirilmesini sağlar [5].

Yükleme Etkinliği Tayini

Yükleme etkinliği tayini için prolipozomal toz hidrate edildikten sonra lipozomlara yüklenmeyen etkin madde ultrasantrifüj veya ultrafiltrasyon gibi yöntemlerle uzaklaştırılır. Uygun bir analitik yöntem kullanılarak yükleme etkinliği tayin edilir [2, 19, 20].

Etkin Madde-Yardımcı Madde Etkileşimlerinin İncelenmesi

Saf etkin madde, taşıyıcı materyal, kolesterol ve lipitler arasındaki geçimlilik çalışmaları Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi (FTIR), diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ve X-ışını toz kırınımı (XRPD) ile yapılabilmektedir [1, 24].

İn Vitro Çözünme Hızı Tayini

In vitro çözünme hızı çalışmaları, prolipozom formülasyonlarının karakterizasyonunda önemli bir adımdır. Prolipozomlar, zayıf çözünürlüğe sahip etkin maddelerin çözünürlüğünü veya çözünme hızını artırmak için kullanılacak ideal ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Dolayısıyla, hazırlanan formülasyonların çözünme hızı profili *in vivo* salım davranışlarının ve derecesinin anlaşılmasına yardım etmektedir. Ayrıca, prolipozomal tozlar sonradan kapsül veya tablet gibi farklı bir final dozaj formuna yüklenecek ise incelenmesi gereken önemli bir parametredir. Çözünme hızı verileri, seçilen etkin madde için en iyi lipit ve lipit bileşiminin belirlenmesi için gerekli bilgileri sağlamaktadır [5].

Tablet formunda basıldıktan veya kapsül içine doldurulduktan sonra prolipozom formülasyonlarında *in vitro* çözünme hızı çalışmaları USP Apparatus 1 veya USP Apparatus 2 kullanılarak yapılabilmektedir. Eğer hidrasyon ile elde edilmiş lipozomal dispersiyon üzerinde çalışma yürütülecek ise diyaliz yöntemi tercih edilmektedir. Etkin maddenin diyaliz membrandan salınması etkin maddenin molekül ağırlığı, lipozom büyüklüğü, karıştırma hızı, çözünme ortamı ve diyaliz membranın geçirgenliğine bağlıdır [5, 20].

Permeabilite çalışmaları

Hücre kültüründe oluşturulan hücre tek tabakaları (Caco-2 gibi), etkin maddenin pasif difüzyonu, aktif taşınması ve hücreler arası permeabilitenin belirlenmesi için başarılı bir şekilde kullanılan *in vitro* permeabilite modelleridir. Prolipozomlara yüklü etkin maddenin *in vivo* absorpsiyon mekanizmalarının anlaşılmasını sağlamaktadır. Bunun yanısıra Paralel Yapay Membran Geçirgenlik Deneyi (PAMPA) gibi pasif transselüler etkin madde geçirgenliğini tahmin etmek için kullanılan hücre bazlı olmayan yapay olarak simüle edilmiş deneysel modeller de kullanılabilir. Ancak, bu yapay model taşıyıcı ve por aracılı geçirgenliğe sahip değildir. Hızlı (4-16 saat), ekonomik ve tekrar edilebilir sonuçlar veren *in vitro* bir tekniktir. Kan beyin bariyerinden, gastrointestinal membranlardan ve deriden geçişin çalışılabilirdiği modellerdir [5, 25].

5. İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Prolipozomların Uygulama Yolları

Prolipozomlar, etkin maddenin özelliklerine ve hastalığın kendisine bağlı olarak çeşitli yollarla uygulanmak üzere formüle edilmiştir. Başlıca oral, IV, pulmoner, transdermal ve mukozal uygulama yolları ile uygulanmışlardır. Prolipozomlar, uygulama şekline bağlı olarak alımlarından sonra gastrik sıvı, ter, vajinal sıvı gibi vücudun farklı sıvı ve salgıları ile hidrate olurlar. Hidrate olur olmaz *in situ* bir şekilde lipozomların oluşumu gerçekleşir ve uzun süreli etkin madde salımı elde edilir. Ayrıca, prolipozomlar uygulanmadan hemen önce su veya tampon gibi hidrasyon sıvıları ile hidrate edilerek de kullanılmaktadır. Bu yol, genellikle parenteral prolipozom uygulamaları için tercih edilmektedir [3].

Oral Uygulama

İlaçların oral yolla verilmesi en çok tercih edilen uygulama şeklidir. Lipozomların gastrointestinal sistem koşullarındaki stabilitesinin az olması ve düzensiz, öngörülemez absorpsiyon profilleri nedeniyle oral yolla uygulanmaları sınırlıdır. Bunun en temel nedenlerinden birisi lipozomların absorpsiyon bölgelerinde bütünlüklerini koruyamamalarıdır. Bu problemin üstesinden gelmek için prolipozom formülasyonları hazırlanarak, çözünürlüğü zayıf olan etkin maddelerin çözünürlüklerinin ve oral biyoyararlanımının artırılması amaçlanmıştır [26]. Prolipozomlar, sıvı ile temas ettiğinde çok tabakalı lipozomları oluştururlar ve lipozomal tabakalar içindeki hidrofobik alanların artışı sayesinde suda çözünmeyen etkin maddelerin lipozomlara daha fazla miktarlarda yüklenmesini sağlarlar. Ayrıca, biyoadhezif yapıları ve nispeten küçük partikül büyüklükleri sayesinde düşük absorpsiyonu olan etkin maddelerin endositoz aracılığıyla emilimini artırabilmektedirler. Prolipozomlar lenfatik alıma ve ilk geçiş metabolizmasına uğrayan etkin maddelerin biyoyararlanımını artırır [2]. Yapılan çalışmalarda vinposetin [27], zaleplon [28],

lovastatin [29] gibi çeşitli etkin maddelerin prolipozomal formülasyonları hazırlanarak oral biyoyararlanımları artırılmıştır. Konvansiyonel kaplama teknikleri ile hazırlanan PVP kaplı talk ve nişasta boncukları taşıyıcı olarak kullanılarak kromolin yüklü prolipozom formülasyonları hazırlanmıştır. Kromolinin transepitelyal geçişinde prolipozomal formül sayesinde 4-7 katlık bir artış sağlanmıştır [30]. Salmon Kalsitonin (sCT) prolipozom formülasyonları etkin maddenin Caco-2 hücrelerindeki permeabilitesini ve sıçanlardaki oral biyoyararlanımını 7.1 kat artırmıştır [31, 32]. Taşıyıcı olarak mikrokristal selülozun kullanıldığı dimristoilfosfatidilkolin, soya lesitin ve polisorbitat 80 kullanılarak hazırlanan Progesteron yüklü prolipozomlarının oral verilişteki etkinlikleri Caco-2 hücreleri ve ters çevirilmiş rat bağırsağı modelinde incelenmiştir. Etkin maddenin geçişinde bu modellerde sırasıyla 4 ila 6 katlık artışlar belirlenmiştir [33]. Taşıyıcı olarak mannitolün kullanıldığı silimarın yüklü prolipozomlar etkin maddenin beagle cinsi köpeklerdeki oral biyoyararlanımını saf etkin maddeye göre 3.7 kat artırmıştır [34]. Prolipozom formülasyonlarının oral yolla uygulanmasına yönelik yapılan diğer çalışmalar Tablo 3’de özetlenmiştir.

Tablo 3. Prolipozom formülasyonlarının oral yolla uygulanmasına yönelik yapılan çalışmalar

Formülasyon Bileşimi	Etkin Madde	Hazırlama Yöntemi	Sonuçlar	Ref.
Distearoil- fosfatidilkolin Dimristoil- fosfatidilgliserol Kolesterol	Eksemestan*	Film Depozisyon Yöntemi	PAMPA, sıçan bağırsağı ve Caco-2 hücreleri üzerinde yapılan permabilite çalışmaları, prolipozom formülasyonlarının çözünürlük ve permeabiliteyi artırarak oral absorpsiyonunu, dolayısıyla da biyoyararlanımı arttırdığı gösterilmiştir	[35]
Soya Fosfolipitleri Kolesterol İzoproil miristat Sodyum Kolat Mannitol*	Dehidrosilimarın	Film Dispersiyon Dondurarak Kurutma Yöntemi	Süspansiyon formülasyonları ile karşılaştırıldığında, tavşanlarda dehidrosilimarının oral biyoyararlanımı prolipozom formülasyonları ile artmıştır ve bu sonuç, prolipozomların küçük partikül boyutu, yapısındaki safra tuzları ve lipozomların biyolojik membranlara benzemesine dayandırılmıştır	[15]
Hidrojenlenmiş soya fosfatidilkolini Kolesterol Pearlitol SD 200*	İsradipin	Film Depozisyon Yöntemi	Wistar sıçanlar üzerinde yapılan <i>in vivo</i> oral biyoyararlanım çalışmaları sonucunda isradipinin oral süspansiyonuna göre prolipozom formülasyonları isradipinin biyoyararlanımını 2.4 kat artırmıştır	[36]
Fosfolipon 90H Disetil Fosfat Stearilamin Mannitol*	Raloksifen Hidroklorür	Film Depozisyon Yöntemi	İlaç taşınmasında yüzey yükünün GI absorpsiyon üzerine etkisinin önemli olduğu ve prolipozomların ilaç biyoyararlanımını 2-3 kat arttığı gösterilmiştir	[37]

Distearoil-fosfatidilkolin Dimristoil- fosfatidilgliserol Kolesterol Mikrokristal Selüloz*	Valsartan	Film Depozisyon Yöntemi	Prolipozom formülasyonları ile PAMPA, Caco-2 ve tersine çevrilmiş sıçan bağırsak kesesi modellerinde permeabilitenin, in vivo farmakokinetik çalışmalarda ise oral biyoyararlanımın saf maddeye göre arttığı gösterilmiştir	[38]
Yumurta Lesitin Cremophor RH40	Kuersetin	Etanol bazlı prolipozom hazırlama yöntemi	Kuersetin süspansiyonu ile karşılaştırıldığında prolipozom formülasyonları kuersetinin intestinal permeabilitesini ve oral biyoyararlanımını önemli derecede artırmıştır	[39]
Hidrojenlenmiş Soya Fosfatidilkolin Kolesterol Pearlitol® SD 200*	Lopinavir	Film Depozisyon Yöntemi	Wistar sıçanlar üzerinde yapılan <i>in vivo</i> çalışmalar sonucunda lopinavir içeren prolipozomların mevcut lopinavir preparatından ve saf etkin maddeden sırasıyla 1.16 ve 2.24 kat daha yüksek biyoyararlanım gösterdiği bulunmuştur	[26]

* Formülasyonda taşıyıcı olarak kullanılmıştır.

Parenteral Uygulama

Parenteral uygulama için hazırlanmış olan lipozomların sterilizasyonu zorunludur. Buhar ile sterilizasyon, radyasyonla sterilizasyon (γ -radyasyon), aseptik üretim ve filtrasyon farmasötik ilaç endüstrisinde kullanılan temel sterilizasyon teknikleridir. 121°C'deki buhar kullanılarak yapılan otoklav sterilizasyonu lipozomal formülasyonlar için uygun olmayabilir. Çünkü yüksek sıcaklık lipidlerin hidrolizine neden olarak lipozomların yapısını bozabilir. γ -radyasyon da doymamış lipidlerin peroksidasyonunu hızlandırarak ve hidrolizine neden olmasından dolayı lipozomal dispersiyonlar için uygun değildir. Aseptik üretim, validasyondaki zorluk ve maliyet nedeniyle yaygın bir şekilde kullanılmamaktadır. Final ürünlerin filtrasyon ile sterilizasyonu veziküllerin yapısal kompleksliği ve filtrelere absorpsiyon sonucu lipid kayıpları nedeniyle zor olabilir [2].

Prolipozomlar, lipozomların parenteral uygulanması için uygundur. İntrinsik özellikleri etkilenmeksizin sterilizasyona izin vermesi prolipozomların önemli bir avantajıdır. Ayrıca, prolipozomlar kuru sterilize formda saklanabilirler ve uygulamadan önce çok tabakalı lipozomal süspansiyonu oluşturmak üzere hidrate edilebilirler. Ek olarak, özellikle kuru halde γ -radyasyon ile sterilizasyona dayanıklıdır. Sulu lipozomal formülasyonlarda suyun radyasyona maruz kalmasından kaynaklanan hidroksil radikalleri hasara neden olan serbest radikallerin ana kaynağıdır. Dolayısıyla, kuru formda suyun olmaması nedeniyle prolipozomlar γ -radyasyon ile sterilize edilebilir [2].

Wang ve arkadaşları, IV yolla uygulamak üzere 7-Etil-10-hidroksikamptotesin (SN-38) içeren prolipozomlar hazırlamışlardır. Sıçanlarda yapılan *in vivo* çalışmalar sonucunda, IV uygulamadan sonra SN-38 çözeltisi ile karşılaştırıldığında SN-38 içeren prolipozomal formülasyonu ile SN-38'in dolaşımında daha fazla kaldığı ve etki süresinin uzadığı gösterilmiştir [40]. Parenteral yolla verilise uygun olarak farklı etkin madde ve imalat yöntemleri kullanılarak prolipozomal formülasyonlar geliştirilmiş *in vivo* etkinlikleri incelenmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. Prolipozom formülasyonlarının parenteral yolla uygulanmasına yönelik yapılan çalışmalar

Formülasyon	Etkin Madde	Hazırlama Yöntemi	Sonuçlar	Ref.
Soya Lesitin Kolesterol Stearilamin Disetil fosfat Efervesan Granül * (NaHCO ₃ , monohidrat sitrik asit ve Tartarik asitten oluşmaktadır.)	İndometazin	Akışkan Yatak Yöntemi	Sıçanlarda karragen ile indüklenmiş pençe ödeminde prolipozomlardan elde edilen lipozomların saf etkin maddeye göre antiinflamatuvar etkiyi arttırdığı bulunmuştur	[41]
Yumurta Fosfatidilkolin Poloksamer 407	Adriamisin	Film Depozisyon Yöntemi	Prolipozomların IV infüzyonu ile sıçanlarda adriamisinin terminal yarı ömrü ile ortalama kanda kalış süresi arttırılmış ve lenf noduna hedefleme yapılmıştır	[42, 43]
Soya Fosfatidilkolin Kolesterol Polietilenglikol- distearoil-fosfatidil etanolamin Oleik asit sodyum tuzu*	Doksorubisin	Modifiye Etanol Enjeksiyon Yöntemi	Prolipozom verilen deneklerde saf etkin madde ile karşılaştırıldığında eğri altında kalan alan (AUC) 22 kat artarken, akut toksisitenin azaldığı ve fareler üzerindeki antikanser etkinin arttığı bulunmuştur	[17]
Lipoid E80 Kolesterol Tween 80 EDTA Mannitol*	Breviskapin	Etanol Enjeksiyon- Homojenizasyon- Liyofilizasyon Yöntemi	Prolipozomların hidrate edilmesi ile elde edilen breviskapin lipozomlarının farelere bolus uygulaması etkin madde eliminasyon fazını 4 kat uzatmıştır ve geliştirilen formül kalp hedefli tedavi için faydalı bulunmuştur	[16]

* Formülasyonda taşıyıcı olarak kullanılmıştır.

Pulmoner Uygulama

Akciğer sürfaktanlarına benzer yapıdaki fosfolipitlerden hazırlanmaları nedeniyle pulmoner ilaç taşıyıcı sistemler olarak lipozomlar önemli bir yere sahiptir. Lipozomlara etkin madde enkapsülasyonu ile solunum yolunda lokalize ilaç taşınması, ilaç etkisinin artırılması ve sistemik yan etkilerin azaltılması sağlanır. Ancak lipozomların stabilite problemleri ve büyük ölçekli üretimindeki zorluklar üstesinden gelinmesi gereken problemlerdir [2, 44].

Prolipozomlar akciğer dokusuna ilaç taşınması ve solunum yolunda lokal etki sağlamak için yüksek afiniteye sahip fosfolipitlere sahip olması, stabilitelerinin yüksek olması, küçük partikül büyüklükleri nedeniyle pulmoner ilaç taşınmasında büyük bir öneme sahiptir [7].

Pulmoner yolla ilaç taşınması 3 tip tıbbi cihazla sağlanır:

a. Basınçlı Ölçülü Doz İnhalerler

Ölçülü doz inhalerler, sıvılaştırılmış itici gaz içinde etkin maddelerin çözelti ve süspansiyonundan oluşur. Fosfolipitler için zayıf çözücü özelliğine sahip olmasından dolayı hidrofloroalkanların lipozomal formülasyonlarda itici gaz olarak kullanımı sınırlıdır. Ancak, prolipozomlar bu itici gazlarda süspande edilebilir ve lipozomların basınçlı ölçülü inhalerlerle uygulanması için taşıyıcı olarak kullanılabilir [2].

b. Kuru Toz İnhalerler

Kuru toz inhalerler, ilacı inhalasyon sırasında ince bir toz halinde veren sistemlerdir. Kuru toz inhalerler ile lipozomların kontrollü bir şekilde taşınması, potans artışı, toksisite azalması, ilaçların lokal olarak homojen verilmesi, hasta uyuncu, stabilite ve yüksek doz taşıma kapasitesi sağlanır. Kuru toz formunda olmaları nedeniyle prolipozomlar kuru toz inhalerler aracılığıyla lipozomların taşınmasında en iyi alternatiftir [2].

Rojanarat ve arkadaşları, levofloksasini (LEV) tüberküloz tedavisi için pulmoner yolla uygulamak üzere püskürterek kurutma yöntemiyle LEV içeren prolipozomlar hazırlamışlardır. LEV içeren prolipozomların saf LEV'e göre solunumla ilgili hücrelerde daha az toksik olduğu ve ikinci bir enfeksiyona yol açan enflamatuvar mediyatörlerin üretimine yol açmadığı bulunmuştur. LEV içeren prolipozomların *Mycobacterium bovis*'e karşı etkisi saf etkin maddeden önemli derecede fazla bulunmuş ve sıçanlarda yapılan *in vivo* tekrarlanan doz toksisitesi çalışmasında herhangi bir toksisite gözlenmemiştir [45].

c. Nebulizörler

Nebulizörler, pulmoner ilaç taşınması için yaygın bir şekilde kullanılan inhalasyon cihazlarıdır. Bu cihazlarla, çok fazla işlem gereksiz etkin madde taşıyan lipozomlar yüksek dozlarda uygulanabilir. Fakat etkin maddenin lipozomlardan sızması ve düşük stabilite lipozomlarla ilgili karşılaşılan problemlerdir. Bu problemlerin üstesinden gelmek için kuru toz formülasyonlar hazırlanmıştır. Liyofilizasyon ve öğütme kuru toz elde etmek amacıyla kullanılabilir, fakat bu işlemlerde uygulanan stres lipozomlar üzerinde zararlı etki gösterebilir. Dolayısıyla, prolipozomlar nebulizasyonla lipozomların taşınması için stabil bir alternatif olarak kullanılabilir [2].

Prolipozomlar jet nebulizatör ve titreşimli mesh nebulizatörü kullanılarak küçük damlacıklar halinde aerosol formuna getirilebilmektedir [3]. Püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanan izoniazid yüklü fosfatidilkolin bazlı prolipozom formülasyonlarının solunumla ilgili hücrelere toksik olmadığı ve ikinci bir enfeksiyona yol açabilecek enflamatuvar mediyatörlerin üretimine neden olmadığı bulunmuştur. Prolipozomların *Mycobacterium bovis*'e karşı etkilerinin saf etkin maddeden önemli derecede fazla olduğu bulunmuştur ve sıçanlarda yapılan in vivo tekrarlanan doz toksisitesi çalışmasında herhangi bir toksisite gözlemlenmemiştir [46, 47]. Bir diğer çalışmada ise rifapentin yüklü prolipozomların saf etkin maddenin akciğerlerdeki yarılanma ömrünü ($t_{1/2}$) ve ortalama alıkonma süresini (MRT) 7 kat uzattığı gösterilmiştir [48].

Transdermal Uygulama

Lipozomal sistemlerin ana bileşeni olan fosfolipitler deri lipitleri ile kolayca kaynaşabilmektedir ve etkin madde permeasyonunu arttırmak için kullanılmaktadır. Prolipozomlar deri üzerinde mukozal membranlara uygulandığında, mukozal sıvılarla temas ederek lipozomları oluştururlar ve sonuçta oluşan lipozomlar uzun süreli salım yapan dozaj formları olarak davranır. Deri yüzeyi ile birleşerek bir konsantrasyon gradyanı oluşturur ve difüzyonla geçişi sağlayarak permeasyonu artırır. Derinin hücre içi lipit tabakalarına veziküllerin girişi derinin düzenli yapısının akışkanlaşmasına ve dağılmasına neden olur. Stratum korneumun bariyer fonksiyonu ortadan kalkar [2].

Steroid bir aromataz inaktivatörü olan eksemestan zayıf çözünürlüğü ve ilk geçiş metabolizmasına uğraması nedeniyle sınırlı biyoyararlanıma sahiptir (% 42). Jukanti ve arkadaşları eksemestanın transdermal olarak verilmesi için koaservasyon yöntemi ile prolipozomal sistemler geliştirmişlerdir. Oral süspansiyon ile karşılaştırıldığında prolipozomal jellerle biyoyararlanımda 2.4 kat artış sağlanmıştır [18]. Prolipozomların transdermal uygulamalarına yönelik çalışmalar Tablo 5'de verilmiştir.

Ticari olarak "ProLipoTMNeo" isimli lesitin ve propandiol içeren prolipozom formülasyonu piyasada bulunmaktadır. Hidrofilik ve/veya lipofilik etkin maddeleri enkapsüle ederek biyoyararlanım ve deri penetrasyonunu arttırmak için tasarlanmıştır [3].

Tablo 5. Prolipozom formülasyonlarının transdermal yolla uygulanmasına yönelik yapılan çalışmalar

Formülasyon	Etkin Madde	Hazırlama Yöntemi	Sonuçlar	Ref.
Yumurta fosfatidilkolin Kolesterol Stearik Asit Etanol Bütanol İzopropil Alkol	Levonorgestrel	Koaservasyon Yöntemi	Levonorgestrelin transdermal yama formunda hazırlanan prolipozomal formülasyonlarının tavşanlar üzerindeki <i>in vivo</i> etkinliği incelenmiş krem formuna göre daha yüksek AUC değerleri elde edilmiştir	[49]
Soya Lesitin Kolesterol Sorbitol*	Glipizid	Film Depozisyon Yöntemi	Prolipozomal glipizid formülasyonu ile diyabetli sıçanlarda herhangi bir deri iritasyonu oluşmadan 24 saate kadar kontrollü etkin madde salımı sağlanmış ve yan etkiler önlenerek glukoz seviyesinde azalma gözlenmiştir	[50]
Fosfatidilkolin Kolesterol Mannitol*	Naproxen	Film Depozisyon Yöntemi	<i>In vitro</i> ve <i>ex vivo</i> çalışmalar prolipozomların etkin madde moleküllerinin deriye permeasyonunu arttırdığını gösterirken, <i>in vivo</i> çalışmalar pençe ödemi geliştirilen sıçanlarda prolipozomal jelin ticari preparata göre daha iyi antiinflamatuvar aktivite sağladığını göstermiştir	[51]
Soya Fosfatidilkolin Kolesterol	Lizinopril Dihidrat	Koaservasyon Yöntemi	Deride iritan etkileri olmadığı gösterilen prolipozomal jel formülasyonları <i>ex vivo</i> permeabilite çalışmalarında sürekli ve yüksek oranda deriden geçiş sağlamıştır	[52]

* Formülasyonda taşıyıcı olarak kullanılmıştır.

Mukozal Uygulama

Prolipozomlar mukozal sıvılara temas ettiklerinde veziküler yapıları oluştururlar. Yapılarında bulunan fosfolipitler biyolojik membranlar için doğal afiniteye sahiptir ve lipozomlar mukozada birikerek etkin maddenin kalış süresini artırırlar. Mukozal retansiyondaki artış ile biyoyararlanım da artar [2].

Vajinal taşıyıcı sistemler sıklıkla lokal mantar enfeksiyonlarının tedavi edilmesi için kullanılmaktadır. Klasik formülasyonlardaki antifungal ve steroid bileşenlerin zayıf çözünürlükleri moleküler olarak dağılımlarını sınırlar ve dolayısıyla etki bölgesinde yeterli konsantrasyon sağlanamaz [2]. Klotrimazol geniş ve etkili bir şekilde vulgovajinal kandidiazis tedavisi için kullanılmaktadır, fakat suda düşük çözünürlüğe sahiptir. Ticari olarak mevcut krem, merhem ve jel gibi klasik klotrimazol vajinal formülasyonlarla etkin maddelerin hedef bölgede nispeten kısa bir süre kaldığı düşünülmektedir. Ning ve arkadaşları klotrimazolün prolipozom formülasyonunu geliştirerek sıçanlarda standart merhem ile fungusidal etkisini karşılaştırmışlardır. Klotrimazol içeren vajinal prolipozomlar uzun süreli etkin madde salımı sağlamış ve mukozada kalma süresini

artırmıştır. Standart merhem ile karşılaştırıldığında antifungal etki daha yüksek bulunmuştur. Sistemin vajinal dokuların morfolojisini olumsuz bir şekilde etkilemediği gözlemlenmiştir [53].

Nazal yolla mukoadhezif formülasyon uygulaması, terapötik bileşiklerin lokal ve sistemik olarak taşınmasını arttırmaktadır. Nazal yol, oral absorpsiyonu düşük olan etkin maddelerin sistemik verilmesi için umut verici bir alternatiftir. Kısa yarılanma ömrüne sahip etkin maddelerin uzun süreli salımının olmaması ve nazal boşluktaki kalış sürelerini kısıtlayan mukosilyer klirensin varlığı nazal ilaç verilmesi ilgili sınırlamalardır. Prolipozomların hidrasyonu ile oluşan lipozomlar yüzey viskoziteleri nedeniyle mukosilyer klirensi azaltır ve mukus membranı ile uzun süreli etkileşim sağlar. Hidrasyon işlemi sistemik dolaşımında kısa yarılanma ömrüne sahip maddelerin daha uzun süre plazma konsantrasyonlarının sağlanmasında önemli rol oynamaktadır [2, 54].

Propranolol sulu bir çözelti olarak intranazal olarak uygulandığında hızlı absorbe olan bir beta blokördür. Sistemik dolaşımdan hızlı bir şekilde elimine edilir ve bu nedenle sık dozlama gerekmektedir. Ahn ve arkadaşları propranololün nazal uygulaması için prolipozomları kullanmıştır. Prolipozomların nazal boşluktaki yavaş hidrasyonu nedeniyle daha uzun süreli plazma konsantrasyonu sağlanmıştır. Prolipozomlar ve lipozomlar arasındaki ortalama alıkonma süresi farkı olarak tanımlanan prolipozomların ortalama hidrasyon süresi değerlendirilmiştir. Bu değer 80.4 dakika bulunmuştur ve prolipozomların nazal boşlukta çok yavaş bir şekilde hidrate olduğu böylece nazal boşlukta daha uzun süre kaldığını gösterilmiştir [55].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Prolipozomlar su veya biyolojik sıvılarla temas ettiğinde hidrate olarak lipozomları oluşturan formülasyonlardır. Özellikle çözünürlüğü düşük etkin maddelerin çözünürlük ve biyoyararlanımlarının artırılmasında ve lipozomlarla ilgili stabilite problemlerinin aşılmasında önemli bir rol oynarlar. Farmasötik alanda geniş bir kullanımı olan prolipozomlar başlıca oral, parenteral ve transdermal yollar ile uygulanmaktadır. Kontrollü etkin madde salımı sağlamalarından dolayı tanı ve tedavi amacıyla yüksek kullanım potansiyeline sahiptirler. Püskürterek kurutma ve alışkan yatak gibi yöntemler kullanılarak büyük ölçekte üretilebilmekte ve kuru toz formunda olmaları nedeniyle tablet, kapsül gibi dozaj formları haline getirilebilmektedirler. Yüksek fiziksel ve kimyasal stabiliteyi nedeniyle umut verici ilaç taşıyıcı sistemlerdir.

KAYNAKLAR

1. Kumara, B.C., Parthiban, S., Senthil kumar, G.P., Tamiz Mani, T. (2015). Proliposome: A novel approach to carrier drug delivery system. *International Journal of Biopharmaceutics*, 6(2), 98-106
2. Shaji, J., & Bhatia, V. (2013). Proliposomes: A brief overview of novel delivery system. *Int J Pharm Biosci*, 4, 150-160.
3. Sezgin Bayindir, Z., &Yuksel, N. (2015). Provesicles as novel drug delivery systems. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 16(4), 344-364
4. Moreira, A. R. S. (2015). Development of proliposomes as a vehicle to deliver new molecules with antitumor activity. Faculty of Medicine of University of Porto, Portugal.
5. Nekkanti, V., Venkatesan, N., Betageri, G. (2015). Proliposomes for oral delivery: progress and challenges. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 16(4), 303-312.
6. Veerapu, G., Gangadharappa, H. V., Nagashubba, B., Balamuralidhara, V. (2014). Review on novel carrier system: liposomes and proliposomes. *Drug Delivery Letters*, 4(2), 96-109
7. Manani, H., Prajapati, B., Patel, R. (2016). Review of Preliposomes as novel drug delivery system. *The Pharma Innovation*, 4(3), 61-67
8. Sun, C., Wang, J., Liu, J., Qui, L., Zhang, W., Zhang, L. (2013). Liquid proliposomes of nimodipine drug delivery system: preparation, characterization, and pharmacokinetics. *AAPS PharmSciTech*, 14(1), 332-338.
9. Tunsirikongkon, A., Pyo, Y.C., Kim, D.H., Lee, S.E., Park, J.S. (2019). Optimization of Polyarginine-Conjugated PEG Lipid Grafted Proliposome Formulation for Enhanced Cellular Association of a Protein Drug. *Pharmaceutics*. 11(6).
10. Khan, I., Yousaf, S., Subramanian, S., Korale, O., Alhnan, M.A., Ahmed, W., Taylor, K.M., Elhissi, A. (2015). Proliposome powders prepared using a slurry method for the generation of beclometasone dipropionate liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 496(2), 342-50.
11. Omer, H.K., Hussein, N.R., Ferraz, A., Najlah, M., Ahmed, W., Taylor, K.M.G., Elhissi, A.M.A. (2018). Spray-Dried Proliposome Microparticles for High-Performance Aerosol Delivery Using a Monodose Powder Inhaler. *AAPS PharmSciTech*. 19(5), 2434-2448.
12. Ye, T., Sun, S., Sugianto, T.D., Tang, P., Parumasivam, T., Chang, Y.K., Astudillo, A., Wang, S., Chan, H.K. (2018). Novel combination proliposomes containing tobramycin and clarithromycin effective against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Pharmaceutics*, 552(1-2), 130-138.
13. Katare, O.P., Vyas, S.P., Dixit, V.K. (1990). Effervescent granule based proliposomes of ibuprofen. *Journal of Microencapsulation*, 7(4), 455-62.

14. Falconer, J.R., Svirskis, D., Adil, A.A., Wu, Z. (2015). Supercritical Fluid Technologies to Fabricate Proliposomes. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 18(5), 747-64.
15. Chu, C., Tong, S. S., Xu, Y., Wang, L., Fu, M., Ge, Y. R., Xu, X. M. (2011). Proliposomes for oral delivery of dehydrosilymarin: preparation and evaluation in vitro and in vivo, *Acta Pharmacologica Sinica*, 32(7), 973-980.
16. Fei, X., Chen, X., Liang, G., Yue-Jian, C., Hao, W., Ning, G., Jia-Bi, Z. (2009). Preparation, characterization, and biodistribution of breviscapine proliposomes in heart. *Journal of Drug Targeting*, 17(5), 408-414.
17. Junping, W., Maitani, Y., Takayama, K., Nagai, T. (2000). In vivo evaluation of doxorubicin carried with long circulating and remote loading proliposome. *International Journal of Pharmaceutics*, 203(1), 61-69.
18. Jukanti, R., Sheela, S., Bandari, S., Veerareddy, P. R. (2011). Enhanced bioavailability of exemestane via proliposomes based transdermal delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(8), 3208-3222.
19. Chaves, M.A., Pinho, S.C. (2019). Curcumin-loaded proliposomes produced by the coating of micronized sucrose: Influence of the type of phospholipid on the physicochemical characteristics of powders and on the liposomes obtained by hydration. *Food Chemistry*, 291, 7-15.
20. Weng, W., Wang, Q., Wei, C., Man, N., Zhang, K., Wei, Q., Adu-Frimpong, M., Toreniyazov, E., Ji, H., Yu, J., Xu, X. (2019). Preparation, characterization, pharmacokinetics and anti-hyperuricemia activity studies of myricitrin-loaded proliposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 572, 118735.
21. Ahn, B.N., Kim, S.K., Shim, C.K. (1995). Preparation and evaluation of proliposomes containing propranolol hydrochloride. *Journal of Microencapsulation*, 12(4), 363-75.
22. Zhang, M., Wang, Q., Wan, K.W., Ahmed, W., Sun, X. (2019). Liposome mediated-CYP1A1 gene silencing nanomedicine prepared using lipid film-coated proliposomes as a potential treatment strategy of lung cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 566, 185-193.
23. Jiao, Z., Wang, X., Han, S., Zha, X., Xia, J. (2019). Preparation of vitamin C liposomes by rapid expansion of supercritical solution process: Experiments and optimization. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, 1-6
24. Karn, P.R., Jin, S.E., Lee, B.J., Sun, B.K., Kim, M.S., Sung, J.H., Hwang, S.J. (2014). Preparation and evaluation of cyclosporin A-containing proliposomes: a comparison of the supercritical antisolvent process with the conventional film method. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 5079-91.
25. Nekkanti, V., Wang, Z., Betageri, G.V. (2016). Pharmacokinetic Evaluation of Improved Oral Bioavailability of Valsartan: Proliposomes Versus Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System. *AAPS PharmSciTech*, 17(4), 851-62.

26. Patel, G. M., Shelat, P. K., Lalwani, A. N. (2016). QbD based development of proliposome of lopinavir for improved oral bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108, 50-61.
27. Xu, H., He, L., Nie, S., Guan, J., Zhang, X., Yang, X., Pan, W. (2009). Optimized preparation of vincopocetine proliposomes by a novel method and in vivo evaluation of its pharmacokinetics in New Zealand rabbits. *Journal of Controlled Release*, 140(1), 61-68.
28. Janga, K. Y., Jukanti, R., Velpula, A., Sunkavalli, S., Bandari, S., Kandadi, P., Veerareddy, P. R. (2012). Bioavailability enhancement of zaleplon via proliposomes: Role of surface charge. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80(2), 347-357.
29. Yanamandra, S., Venkatesan, N., Kadajji, V. G., Wang, Z., Issar, M., Betageri, G. V. (2014). Proliposomes as drug delivery system to decrease the hepatic first-pass metabolism: case study using a model drug. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64, 26-36
30. Deshmukh, D., Revis, W. R., Betageri G. V. (2008). Improved delivery of cromolyn from oral proliposomal beads. *International Journal of Pharmaceutics*, 358(1), 128-136.
31. Song, K. H., Chung, S. J., Shim, C. K. (2002). Preparation and evaluation of proliposomes containing salmon calcitonin. *Journal of Controlled Release*, 84(1), 27-37.
32. Song, K. H., Chung, S. J., Shim, C. K. (2005). Enhanced intestinal absorption of salmon calcitonin (sCT) from proliposomes containing bile salts. *Journal of Controlled Release*, 106(3), 298-308.
33. Potluri, P., & Betageri, G. V. (2006). Mixed-micellar proliposomal systems for enhanced oral delivery of progesterone. *Drug Delivery*, 13(3), 227-232.
34. Yan-yu, X., Yun-mei, S., Zhi-peng, C., Qi-neng, P. (2006). Preparation of slymarin proliposome: a new way to increase oral bioavailability of slymarin in beagle dogs. *International Journal of Pharmaceutics*, 319(1), 162-168.
35. Hiremath, P. S., Soppimath, K. S., Betageri, G. V. (2009). Proliposomes of exemestane for improved oral delivery: formulation and in vitro evaluation using PAMPA, Caco-2 and rat intestine. *International Journal of Pharmaceutics*, 380(1), 96-104.
36. Bobbala, S. K. R., Veerareddy, P. R. (2012). Formulation, evaluation, and pharmacokinetics of isradipine proliposomes for oral delivery. *Journal of Liposome Research*, 22(4), 285-294.
37. Velpula, A., Jukanti, R., Janga, K. Y., Sunkavalli, S., Bandari, S., Kandadi, P., Veerareddy, P. R. (2013). Proliposome powders for enhanced intestinal absorption and bioavailability of raloxifene hydrochloride: effect of surface charge. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39(12), 1895-1906.
38. Nekkanti, V., Venkatesan, N., Wang, Z., Betageri, G. V. (2015). Improved oral bioavailability of valsartan using proliposomes: design, characterization and in vivo pharmacokinetics. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 41(12), 2077-2088.

39. Ren, J., Fang, Z., Jiang, L., Du, Q. (2017). Quercetin-containing self-assemble proliposome preparation and evaluation. *Journal of Liposome Research*, 27(4), 335-342.
40. Wang, S., Ye, T., Yang, B., Yi, X., Yao, H. (2013). 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin proliposomes with a novel preparation method: optimized formulation, characterization and in vivo evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39(2), 393-401.
41. Katare, O. P., Vyasx, S. P., Dixit, V. K. (1995). Enhanced in vivo performance of liposomal indomethacin derived from effervescent granule based proliposomes. *Journal of microencapsulation*, 12(5), 487-493.
42. Lee, H. J., Ahn, B. N., Yoon, E. J., Paik, W. H., Shim, C. K., Lee, M. G. (1995). Pharmacokinetics and tissue distribution of adriamycin and adriamycinol after intravenous administration of asriamycin-loaded neutral proliposomes to rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 121(1), 1-10.
43. Lee, H. J., Ahn, B. N., Paik, W. H., Shim, C. K., Lee, M. G. (1996). Inverse targeting of reticuloendothelial system-rich organs after intravenous administration of adriamycin-loaded neutral proliposomes containing poloxamer 407 to rats. *International Journal of Pharmaceutics*. 131(1), 91-96.
44. Elhissi, A., Gill, H., Ahmed, W., Taylor, K. (2011). Vibrating-mesh nebulization of liposomes generated using an ethanol-based proliposome technology. *Journal of Liposome Research*, 21(2), 173-180.
45. Rojanarat, W., Nakpheng, T., Thawithong, E., Yanyium, N., Srichana, T. (2012). Levofloxacin-proliposomes: opportunities for use in lung tuberculosis. *Pharmaceutics*, 4(3), 385-412.
46. Rojanarat, W., Changsan, N., Tawithong, E., Pinsuwan, S., Chan, H. K., Srichana, T. (2011). Isoniazid proliposome powders for inhalation-preparation, characterization and cell culture studies. *International journal of Molecular Sciences*, 12(7), 4414-4434.
47. Rojanarat, W., Nakpheng, T., Thawithong, E., Yanyium, N., Srichan, T. (2012). Inhaled pyrazinamide proliposome for targeting alveolar macrophaged. *Drug Delivery*, 19(7), 334-345.
48. Patil-Gadhe, A., Pokharkar, V. (2014). Single step spray drying method to develop proliposomes for inhalation: a systematic study based on quality by design approach. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 27(2), 197-207.
49. Deo, M. R., Sant, V. P., Parekh, S. R., Khopade, A. J., Banakar, U. V. (1997). Proliposome-based transdermal delivery of levonorgestrel. *Journal of Biomaterials Applications*, 12(1), 77-88.
50. Parthiban, S., Senthil Kumar, G. P. (2016). Development of Proliposomal Gel Containing Glipizide for Better Anti Diabetic Effect. *American Journal of PharmTech Research*, 6(4), 504-518.
51. Vure, P., Saritha, T., Prakash, D., Triveni, C. (2014). Pro-Vesicular (PV)-Based gel for the topical delivery of Naproxen: Preparation, characterization and in vivo evaluation. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 7(1), 195-200.

52. Bandari, S., Gangishetty, S., Eedara, B. B., Jukanti, R., Veerareddy, P. R. (2013). Proliposomes of lisinopril dihydrate for transdermal delivery: Formulation aspects and evaluation. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 30(8), 1659-1666.
53. Ning, M. Y., Guo, Y. Z., Pan, H. Z., Yu, H. M., Gu, Z. W. (2005). Preparation and evaluation of proliposomes containing clotrimazole. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53(6), 620-624.
54. Jung, B. H., Chung, B. C., Chung, S. J., Lee, M. H., Shim, C. K. (2000). Prolonged delivery of nicotine in rats via nasal administration of proliposomes. *Journal of Controlled Release*, 66(1), 73-79.
55. Ahn, B. N., Kim, S. K., Shim, C. K. (1995). Proliposomes as an intranasal dosage form for the sustained delivery of propranolol. *Journal of Controlled Release*, 34(3), 203-210.