

Applicazioni farmaceutiche dei liposomi

di Rita Cortesi

I liposomi rappresentano 'drug delivery systems' innovativi, capaci di veicolare farmaci di diversa natura e di migliorarne l'indice terapeutico specialmente nel caso di sostanze labili, quali oligonucleotidi, anticorpi monoclonali, peptidi e proteine biologicamente attivi. Tuttavia il numero di formulazioni entrate in terapia è ancora estremamente ridotto. Questo fenomeno, principalmente dovuto a problemi di stabilità dei preparati e a difficoltà di produzione su larga scala, sembra comunque destinato ad una rapida inversione di tendenza.



Con il termine "liposomi" si intendono vescicole di forma sferoidale con caratteristiche chimico-fisiche e strutturali simili a quelle delle membrane cellulari. I liposomi, come le membrane cellulari, sono costituiti principalmente da glicerofosfolipidi (Figura 1). La struttura molecolare dei fosfolipidi è costituita da una porzione a carattere idrofilo (in genere gruppi carichi come l'azoto quaternario carico positivamente della fosfatidilcolina) e porzioni lipofile (in genere esteri di acidi grassi). Le caratteristiche delle catene aciliche presenti nelle molecole fosfolipidiche, quali lunghezza della catena, presenza e posizione di eventuali doppi legami, determinano le proprietà delle biomembrane. Questo tipo di molecole vengono definite "molecole anfipatiche" per la loro capacità di instaurare contatti di varia natura (ad esempio legami idrogeno, interazioni elettrostatiche o di tipo idrofobico) con ambienti sia acquosi sia costituiti da solventi apolari [1-2].

Altri costituenti chimici dei liposomi sono il colesterolo e gli sfingolipidi identificati in sfingomieline, ceramidi e gangliolipidi tra cui gangliosidi, sulfatidi e cerebrosidi (Figura 1). In particolare, il colesterolo ha la caratteristica di modulare le proprietà chimico-fisiche e le caratteristiche morfologico-funzionali delle biomembrane in quanto incrementa la rigidità e l'idrofobicità della membrana, diminuendone la permeabilità [3]. Anche le sfingomieline, che si trovano raramente nei liposomi, tendono a conferire particolare rigidità al doppio strato fosfolipidico. I glicolipidi, a differenza dei glicero- e sfingo-lipidi, non presentano il fosforo nella loro struttura. L'aggiunta di queste o altre molecole specifiche (i.e. il ganglioside GM1, il fosfatidilinositolo o il polietilenglicole) ai liposomi ha permesso di aumentare la loro stabilità nei fluidi biologici e al contempo di ridurre la reattività nei confronti di recettori presenti sulle superfici cellulari e di protei-

ne plasmatiche. Questi liposomi, definiti "stericamente stabilizzati", possiedono la capacità di produrre sistemi vescicolari con caratteristiche di lunga circolazione (Stealth liposomes) specialmente nel caso in cui il polietilenglicole (PEG) rientri nella loro composizione [4]. Lo strato polimerico di PEG che "circonda" la vescicola liposomiale è infatti in grado di prevenire l'associazione e il legame con le opsonine del plasma inibendo i processi di riconoscimento molecolare dei liposomi come "corpo estraneo". In questo modo il successivo "uptake" cellulare dei liposomi e la loro rimozione da parte delle cellule del reticolo endoteliale, specialmente quelle epatiche, risulta aggirato.

I fosfolipidi, se posti in soluzione acquosa, tendono ad aggregarsi spontaneamente orientando la porzione idrofila della molecola verso le fasi acquose e la porzione lipofila formando strutture a doppio strato lipidico (*bilayer*) che racchiudono nel loro interno una fase acquosa. In questo modo viene a formarsi un sistema a doppio strato responsabile della relativa, ma selettiva impermeabilità dei liposomi agli ioni e alle molecole idrosolubili. Grazie alla loro struttura (Figura 2), i liposomi possono veicolare molti farmaci la cui localizzazione è determinata dalle loro caratteristiche chimico-fisiche. Una molecola idrofila tenderà quindi ad occupare gli spazi acquosi interlamellari, una idrofoba si intercalerà tra le catene idrocarburiche dei lipidi all'interno del doppio strato mentre una molecola anfipatica si disporrà con la porzione idrofila verso il mezzo acquoso e la parte idrofoba protesa verso il bilayer. I liposomi possono essere quindi utilizzati per veicolare farmaci con diverse caratteristiche chimico-fisiche.

Le caratteristiche chimico-fisiche del farmaco tuttavia risultano

R. Cortesi, Consorzio Interuniversitario Tefarco Innova - Università di Ferrara - Via Fossato di Mortara, 17/19 - 44100 Ferrara. crt@unife.it

Articolo presentato all'incontro "Le micro/nanotecnologie nei settori biomedicale, farmaceutico, biotecnologico: la rivoluzione industriale appena iniziata?" (Federchimica - Cnr), Milano, maggio 2001.

importanti nella scelta della metodica di preparazione dei liposomi. La tecnica di preparazione prescelta darà la possibilità di ottenere particolari sospensioni liposomali caratterizzate da concentrazioni relative di fosfolipidi e farmaco e dimensioni riproducibili. Inoltre la determinazione delle caratteristiche principali dei liposomi prodotti, quali dimensioni, distribuzione dimensionale, lamellarità e stabilità, risulta di fondamentale importanza per un corretto utilizzo farmaceutico di questo tipo di veicolo. Le caratteristiche sopra citate possono essere determinate mediante diversi metodi tra cui microscopia elettronica, ultracentrifugazione analitica, spettroscopia NMR, cromatografia di gel-filtrazione e tecniche di *light scattering* statico o dinamico [5].

In generale è possibile classificare i liposomi in funzione delle loro dimensioni e lamellarità o in base al metodo di preparazione adottato. Il criterio più semplice suddivide i liposomi in due grandi categorie in funzione della dimensione: i *large multi-unilamellar vesicles* (MLV e LUV) con diametro compreso tra 0,4 e 5 μm e gli *small unilamellar vesicles* (SUV) con diametro compreso tra 0,02 e 0,08 μm .

I MultiLamellar Vesicles (MLV) [6] sono costituiti da più lamelle concentriche, ognuna formata da uno strato lipidico bimolecolare, divise tra loro da spazi di fase acquosa. Se gli MLV vengono sottoposti a trattamento con ultrasuoni, si trasformano in monolamellari originando i LUV o i SUV, a seconda della potenza e lunghezza del trattamento. Rispetto ai multilamellari, i liposomi monolamellari presentano un volume di soluzione inglobato per mole di lipide piuttosto limitato, tuttavia hanno dimensioni minori e più omogenee garantendo, dopo somministrazione, attività più riproducibili.

I liposomi trovano impiego nella ricerca di base come modelli per lo studio delle membrane cellulari [7], delle modalità di fusione e dei meccanismi di trasporto tra queste. I liposomi sono inoltre utilizzati per ricerche sulle proteine di membrana in quanto queste ultime possono essere ricostituite nelle vescicole (proteo-liposomi) [8].

Per quanto riguarda le applicazioni tecnologiche, i liposomi vengono utilizzati come carrier per molecole ad attività biologica. I liposomi sono infatti *drug delivery systems* flessibili e ben caratterizzati [1, 9] che possono essere utilizzati per il trasporto di una vasta gamma di composti (i.e. farmaci di sintesi, acidi nucleici, enzimi ed anticorpi) all'interno di cellule e tessuti.

Le varie tipologie di liposomi (Figura 3) hanno trovato applicazione in farmacologia, medicina, ingegneria genetica, biotecnologia, cosmetologia, industria farmaceutica, chimica ed alimentare.

I vantaggi in campo farmaceutico di questo tipo di formulazioni sono molteplici e possono essere riassunti nei seguenti punti:

- liposomi costituiti da fosfolipidi naturali sono completamente biocompatibili e non causano reazioni indesiderate nell'organismo;
- per mezzo dei liposomi possono essere veicolate sia molecole idrofile (solubilizzate all'interno della fase acquosa) sia molecole lipofile (intercalate nel *bilayer*) [2];
- le sostanze incapsulate risultano protette dall'azione di enzimi litici quali proteasi o nucleasi o da ambienti denaturanti (pH bassi);
- i liposomi possono essere utilizzati come "sistema mimetico" di funzioni cellulari (per esempio globuli rossi sintetici);
- i liposomi sono in grado di rilasciare specificatamente un farmaco all'interno di cellule ad attività fagocitica (macrofagi) e di concentrarsi a livello di tessuti ed organi specifici [9];

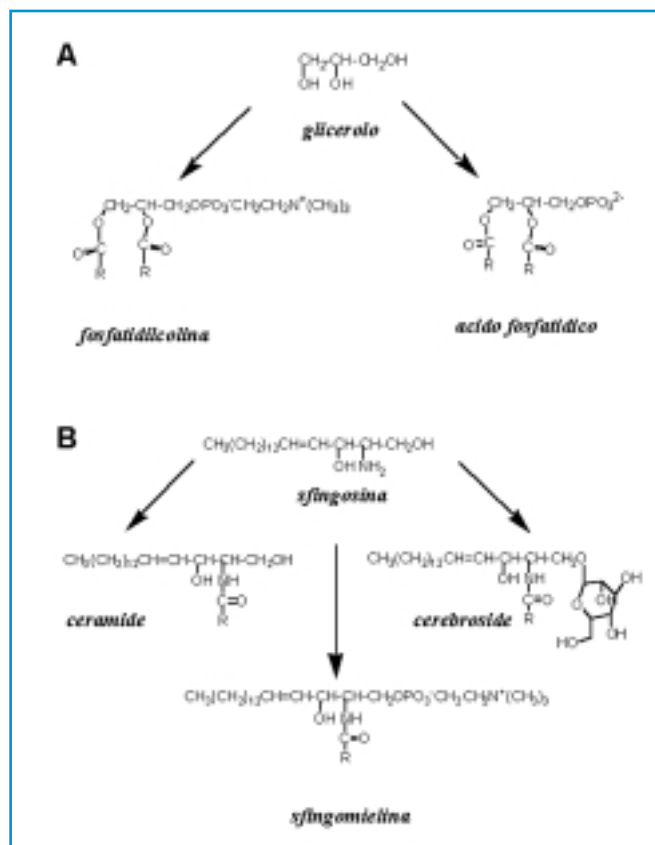


Figura 1 - Fosfolipidi utilizzati nella formulazione di liposomi

- i liposomi possono facilitare il passaggio di sostanze attive all'interno delle cellule anche se i meccanismi di interazione tra liposoma e cellula e le modalità con cui avviene il rilascio delle sostanze incapsulate non sono stati ancora completamente chiariti [1, 10];
- la tossicità di alcuni principi attivi, ad esempio farmaci cardiotossici (per esempio adriamicina o doxorubicina) o nefrotossici (per esempio amfotericina B), risulta ridotta se veicolati con liposomi [10].

Da quanto sopra riportato, risulta evidente che potendo accoppiare il concetto di *drug targeting* e le intrinseche caratteristiche dei liposomi si possono ottenere formulazioni dagli indubbi vantaggi terapeutici. L'utilizzo di liposomi ha dimostrato infatti di apportare notevoli vantaggi nella veicolazione di composti ad attività terapeutica, tra cui a) l'aumento di *uptake* cellulare di sostanze che presentano bassi coefficienti di permeabilità nei confronti della membrana cellulare [10], b) la solubilizzazione di composti altrimenti insolubili in fasi acquose [11], c) il rilascio controllato delle sostanze incapsulate [12-13], d) il rilascio mirato al sistema reticolo endoteliale, e infine e) il possibile rilascio sito-specifico tramite coniugazione dei liposomi con molecole vettrici (ad esempio anticorpi o fattori di crescita) [14]. Nonostante i vantaggi descritti, per un effettivo utilizzo dei liposomi quali carrier di farmaci, è necessario che le formulazioni mantengano le loro caratteristiche nel tempo. Le sospensioni liposomali presentano infatti numerosi problemi di stabilità fisica e chimica, riguardanti sia il doppio strato lipidico sia il principio attivo veicolato. Non sono rari fenomeni di instabilità quali ossidazione dei fosfolipidi, la degradazione del principio attivo o la sua fuoriuscita dal liposoma, la sedimentazione, seguita da aggregazione e/o fusione dei liposomi con conseguente

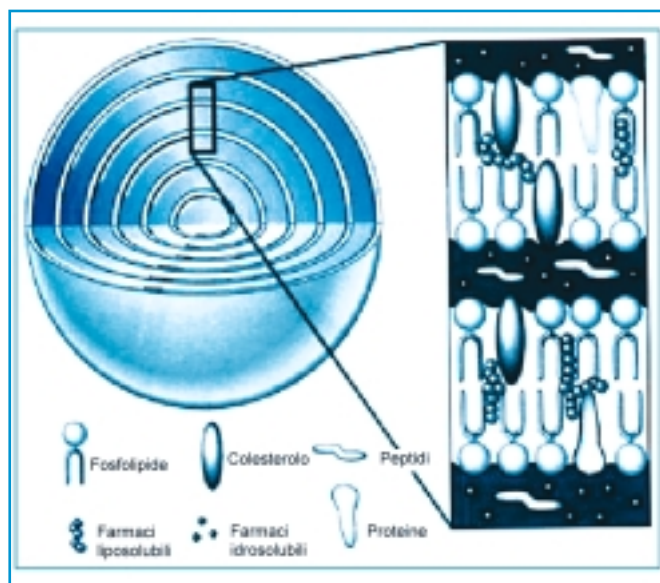


Figura 2 - Rappresentazione schematica di un liposoma multilamellare e dei suoi costituenti

perdita del contenuto e inglobamento di altre sostanze. Lo sviluppo a livello industriale di questa forma farmaceutica è quindi possibile solamente nel caso in cui si riescano a minimizzare i fenomeni degradativi che si manifestano durante la conservazione del prodotto, preservandone l'integrità per periodi sufficientemente prolungati.

Farmacocinetica e biodistribuzione dei liposomi

Il comportamento dei liposomi *in vivo* varia a seconda dell'ambiente con cui vengono a contatto. Grazie alle loro ridotte dimensioni (50-100 nm), i liposomi possono essere proposti per la somministrazione endovenosa, ad esempio di farmaci ad attività antitumorale in quanto sono in grado di raggiungere distretti corporei difficilmente accessibili (i.e. tumori solidi) passando attraverso gli epiteli fenestrati dei vasi [15]. Se iniettati per endovena, i liposomi si distribuiscono nel torrente circolatorio dal quale vengono eliminati o per interazione con componenti plasmatici (proteine ad alta densità, HDL) o per *uptake* da parte di diversi tessuti in funzione di alcune caratteristiche quali composizione, dimensioni e carica superficiale. I liposomi vengono sequestrati soprattutto da organi ricchi di cellule del sistema reticolo endoteliale, quali fegato e milza, e in misura minore da parte di altri organi come polmoni, tessuto ematopoietico, intestino e pelle.

Come precedentemente accennato, la biodistribuzione e le cinetiche di rilascio di principi attivi veicolati in liposomi sono fortemente influenzate da dimensioni, lamellarità e composizione lipidica delle vescicole. Nel caso dell'utilizzo di vescicole multilamellari (MLV), costituite da fosfatidilserina e colesterolo in rapporto molare 2:1, l'accumulo di farmaco avviene principalmente nel fegato (70-90%) [16] probabilmente a causa del ristagno a livello capillare dovuto alle dimensioni relativamente elevate di queste particelle. Nel caso invece di liposomi con dimensioni ridotte (SUV) l'accumulo a livello epatico riguarda solo il 30-40% della dose iniettata.

L'eliminazione e la distribuzione possono essere inoltre influenzate da variazioni della composizione lipidica delle vescicole. È stato infatti dimostrato che la presenza di colesterolo è

in grado di ritardare in parte il sequestro epatico dei liposomi. Al fine di diminuire l'*uptake* da parte del fegato e contemporaneamente aumentare la stabilità dei liposomi in circolo, sono state sviluppate metodologie volte a ridurre le dimensioni delle vescicole liposomali e ad aumentare la rigidità del *bilayer* lipidico [17]. La riduzione delle dimensioni può essere ottenuta preparando liposomi con la tecnica di estrusione attraverso membrane filtranti di policarbonato con pori calibrati che consentono la produzione di vescicole di dimensioni uniformi. Utilizzando questa metodica con opportune miscele di fosfolipidi (distearil-fosfatilcolina sintetica, fosfatilglicerolo e colesterolo) si ottengono liposomi in grado di permanere in circolo per diverse ore con ridotto accumulo epatico (dal 70 al 30%) [18].

Liposomi e terapia genica

Per esplicare la propria attività biologica un acido nucleico, sia esso un oligonucleotide antisense o DNA plasmidico o frammento di DNA, deve giungere inalterato all'interno della cellula. Affinché ciò possa accadere occorre che l'acido nucleico sia stabile nei confronti di nucleasi extra- o intracellulari e sia in grado di penetrare attraverso la membrana cellulare. Inoltre, una volta giunto nel citoplasma, l'acido nucleico deve legarsi in maniera specifica e con sufficiente affinità al suo bersaglio. L'attività terapeutica di un oligonucleotide antisense o di un frammento di DNA dipende essenzialmente da quanto essi riescano a raggiungere il loro sito bersaglio nella forma attiva. L'esatto meccanismo con cui questi acidi nucleici riescano ad entrare nelle cellule rimane ancora poco chiaro ed è influenzato da molti fattori tra cui il tipo di linea cellulare utilizzata [19] e il tipo di modificazione chimica a livello strutturale a carico dell'oligonucleotide [20].

Studi recenti suggeriscono che il processo di internalizzazione degli oligonucleotidi potrebbe essere mediato da un recettore [20]. Altri studi [21-22] dimostrano che esistono anche altre proteine in grado di legare gli acidi nucleici giocando un ruolo molto importante nel processo di *uptake* cellulare.

Da un punto di vista applicativo, questa tecnica apre nuove prospettive per lo sviluppo di farmaci ad attività antivirale e antitumorale poiché ha reso possibile l'interferenza con l'espressione genica in diversi sistemi biologici. Ciò ha permesso di studiare l'effetto che si ottiene *in vivo* bloccando l'azione di un determinato gene, come ad esempio l'effetto di una mutazione. Nell'ambito della terapia genica, la possibilità di veicolare materiale genetico, è rappresentata da diverse strategie tra cui la coniugazione di oligomeri con altre molecole e polipeptidi sintetici quali polilisina, acridina, colesterolo, transferrina [20], oppure la coniugazione covalente dell'oligonucleotide in esame a virus o a proteine virali che presentano attività endosmolitica [20], quali retrovirus e adenovirus. L'utilizzo di tali vettori risulta però particolarmente svantaggioso a causa della loro tendenza a scatenare rischiose reazioni immunitarie. Per ovviare a questo inconveniente è stata valutata la possibilità di associare le molecole di DNA (oligonucleotidico o plasmidico) a liposomi carichi positivamente (vedi Figura 3), con lo scopo di introdurre gli acidi nucleici all'interno delle cellule [20].

La formazione dei complessi tra i liposomi cationici preformati e il DNA avviene per interazione elettrostatica tra le cariche positive presenti sulla superficie del liposoma e quelle negative presenti sulla molecola di acido nucleico. Questi complessi permettono a) la protezione del materiale genetico da parte dell'attacco delle eso ed endo nucleasi presenti nell'*environ-*

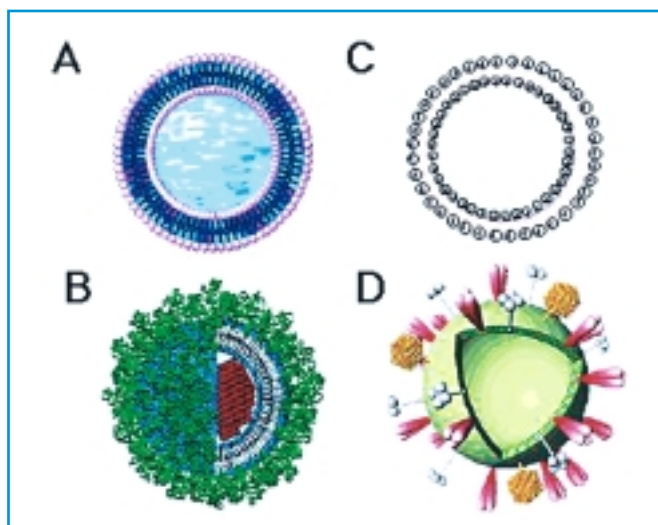


Figura 3 - Tipologie di liposomi. A: liposomi convenzionali. B: liposomi Stealth o a lunga circolazione. C: liposomi cationici. D: liposomi immunoconiugati

ment biologico, b) la protezione degli acidi nucleici dagli stress preparativi (per esempio solventi organici, temperatura) che denaturerebbero tali molecole durante la formulazione di liposomi contenenti DNA e c) la riduzione della carica netta negativa del DNA che ne limita l'internalizzazione da parte della cellula bersaglio, a causa della repulsione elettrostatica nei confronti della membrana biologica.

I liposomi cationici si ottengono utilizzando nella loro composizione tensidi cationici, la cui scelta si effettua cercando di ottenere contemporaneamente la massima attività di trasfezione e la minima tossicità. Tra i tensidi cationici più utilizzati per la trasfezione è possibile menzionare il tenside monocationico dioleoil-ossipropil-trimetilammonio cloruro (DOTMA) o tensidi policationici quali la dioctadecilamidoglicilspermina (DOGS) o la dipalmitoilfosfatidiletanolamilspermina (DPPES). Purtroppo però molti dei tensioattivi cationici utilizzati possiedono elevata citotossicità, per questa ragione sono stati sintetizzati una serie di sali di ammonio quaternario che, pur mantenendo una elevata efficienza di trasfezione, hanno notevolmente ridotto la tossicità cellulare. Tra questi si possono ricordare il dioleoil-trimetil-ammonio-propano (DOTAP), la polilisina lipofila (PLL), il cetil-trimetil-ammonio bromuro (CTAB), il dioctadecil-dimetil-ammonio bromuro (DDAB₁₈) ed il didodecil-dimetil-ammonio bromuro (DDAB₁₂). In Figura 4 sono riportate le strutture chimiche di alcuni tensidi cationici attualmente impiegati.

La trasfezione di DNA in cellule eucariotiche da parte dei liposomi cationici rappresenta un processo molto promettente per la risoluzione di numerose patologie, quali ad esempio cancro, disturbi

cardiovascolari e fibrosi cistica. Studi *in vivo* hanno infatti dimostrato che liposomi cationici iniettati per via intramuscolare possono transfettare cellule muscolari, mentre se iniettati per endovena possono transfettare cellule endoteliali, infine la somministrazione per via intratecale o polmonare ha permesso la trasfezione di cellule epiteliali [24]. La maggior parte di queste applicazioni utilizza come liposomi cationici la preparazione nota come Lipofectin (Gibco BRL) costituita dal tensioattivo monocationico dioleoil-ossipropil-trimetilammonio cloruro (DOTMA) e da dioleoil-fosfatidiletanol ammina (DOPE) in rapporto ponderale 1:1 [25]. Tuttavia, nonostante le numerose sperimentazioni sulla veicolazione di acidi nucleici con liposomi cationici, il numero di formulazioni entrate in terapia è al momento esiguo.

Formulazioni farmaceutiche commerciali a base di liposomi

La veicolazione con liposomi contribuisce indubbiamente a migliorare l'indice terapeutico di molti farmaci difficilmente utilizzabili a causa dell'elevata tossicità o di una sfavorevole biodistribuzione. Nel quadro di un utilizzo terapeutico sperimentale, i liposomi sono stati efficacemente utilizzati nel trattamento di infezioni batteriche e parassitarie dei macrofagi [9], di infezioni micotiche sistemiche [8], di neoplasie [10] e nella preparazione di vaccini [18]. Nonostante la via di somministrazione maggiormente utilizzata a livello sperimentale sia quella endovenosa, al momento si stanno studiando vie alternative quali la intraperitoneale, la sottocutanea, l'intramuscolare, l'intratecale, la sottocongiuntivale e la via orale.

Come già sottolineato, rispetto alla grande mole di sperimentazioni condotte a livello di laboratorio sulla veicolazione di farmaci con liposomi, il numero di formulazioni entrate in terapia è ancora estremamente ridotto. Le formulazioni a base di liposomi attualmente in vendita sono prevalentemente destinate ad un utilizzo topico (Tabella). Le formulazioni a base di fosfolipidi sono infatti in grado di aumentare l'assorbimento cutaneo

Specialità farmaceutiche a base di liposomi

Specialità	Farmaco	Indicazione	Clinical Trial	Società
Ambisome	amfotericina B	inf. micotiche	commercio	NeXtar Pharm.
Abelcet	amfotericina B	inf. micotiche	commercio	Elan Pharm.
Nyotran	nistatina	inf. fungine	fase III	Aronex Pharm.
Mikasome	amikacina	inf. micotiche e batteriche	fase I/II	Gilead Sci.
Doxil	doxorubicina	antitumorale sarcoma Kaposi	commercio	Alza Pharm.
Myocet	doxorubicina	antitumorale	fase III	Liposome Comp.
DaunoXome	daunorubicina	antitumorale	commercio	NeXtar Pharm.
Atragen	ATRA	antitumorale	fase II	Aronex Pharm.
Aroplatin	cisplatino	antitumorale	fase II	Aronex Pharm.
Annamycin	annamicina	chemioterapico	fase I/II	Aronex Pharm.
TLC-ELL-12	ether lipid	antitumorale	fase I	Liposome Comp.
Bromotaxane	paclitaxel	antitumorale	fase I	Liposome Comp.
Epaxal-Berna	HAV inattivato	vaccino antiHA	commercio	Berna
Inflexal-Berna	IV inattivato	antiinfluenzale	fase III	Berna
Novasomes	IV ucciso	antiinfluenzale	commercio uso veterinario	Novavax
Fluogen	IV ucciso	antiinfluenzale	fase I	Novavax Parkdale Ph.
	¹¹¹ Indium	agente diagnostico	commercio	VeXtar

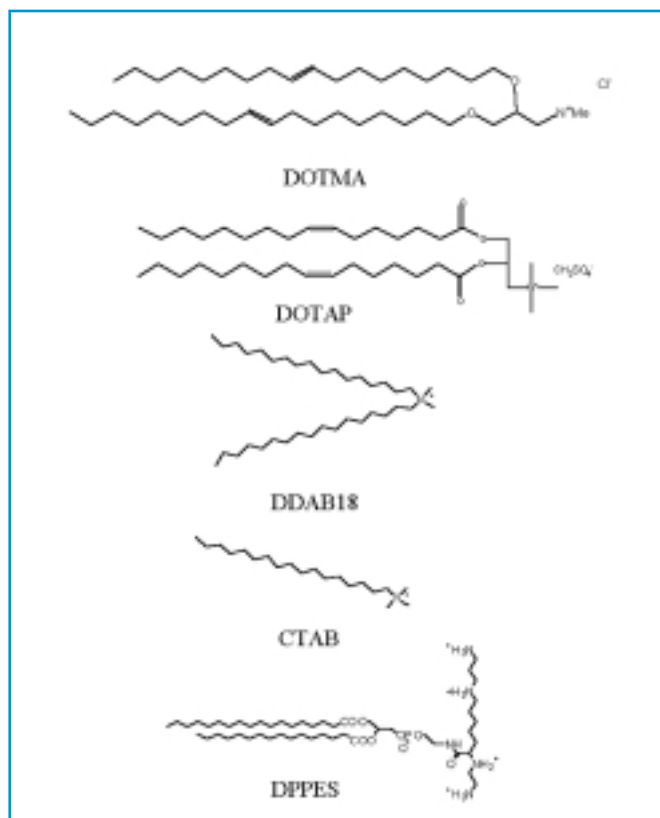


Figura 4 - Struttura chimica di alcuni tensioattivi cationici utilizzati per la produzione di liposomi per terapia genica

delle sostanze veicolate anche se non sono del tutto chiariti gli eventi molecolari capaci di giustificare la loro attività di "penetration enhancer" [26].

Tra le formulazioni commercializzate, si può menzionare il Pevaryl Lipogel (Cilag A.G.), un preparato a base di econazolo, un antimicotico di scelta per le dermatiti a base fungina. Questa formulazione presenta il vantaggio di diminuire la tossicità a livello sistemico e l'insorgenza di fenomeni allergici a carico del paziente. Altri antimicotici commerciali sono l'Ambisome (NeXtar Pharmaceutical) e Abelcet (Elan Pharm.) a base di amfotericina B. Antimicotici quali Nyotran (Aronex Pharm.) a base di nistatina, e Mikasome (Gilead sciences) a base di amikacina, sono invece in fase di sperimentazione clinica III e I/II, rispettivamente.

In commercio sono inoltre presenti formulazioni liposomali antitumorali a base di antracicline quali doxorubicina (Doxil, Alza Pharm.) e daunorubicina (DaunoXome (NeXtar Pharm.)). Altre formulazioni antitumorali a base di liposomi si trovano invece in fase II di sperimentazione clinica, quali Atragen e Aroplatin (Aronex Pharm.) rispettivamente a base di ATRA (*all trans retinoic acid*) e cisplatino.

È attualmente oggetto di studio la possibilità di utilizzare i liposomi come coadiuvanti immunologici nella somministrazione di vaccini. Ciò consentirebbe non solo la diminuzione della quantità di antigene necessario per l'immunizzazione, ma anche l'eliminazione dei coadiuvanti attualmente impiegati (endotossine batteriche, coadiuvante di Freund) che spesso risultano tossici.

Vaccini commercializzati sono l'Epaxal-Berna contenente il virus dell'epatite A inattivato e il Novasomes (Novavax), un vaccino antiinfluenzale ad uso veterinario. Vaccini antiinfluenzali

ad uso umano (Inflexal-Berna) sono invece in fase III di sperimentazione clinica.

Infine la particolare biodistribuzione dei liposomi è stata sfruttata a scopi diagnostici. Liposomi radiopachi preparati con fosfolipidi iodurati o bromurati sono stati utilizzati quali mezzi di contrasto per aumentare l'accuratezza diagnostica della tomografia assiale computerizzata (TAC) del fegato e della milza [27].

Conclusioni

I progressi recentemente compiuti nella preparazione dei liposomi e nella conoscenza dei parametri che influenzano la loro stabilità e la cessione del farmaco, unitamente alla varietà di fosfolipidi e altri componenti in grado di conferire a questa forma farmaceutica particolari proprietà biologiche e strutturali, hanno permesso la sperimentazione clinica e la commercializzazione di nuovi carriers di farmaci ad attività antimicrobica, antibiotica, antitumorale e alla formulazione di nuovi vaccini.

Bibliografia

- [1] G. Storm, D.J.A. Crommelin, *PSTT*, 1998, **1**, 19.
- [2] G. Gregoriadis, *J. Antimicrob. Chemother.*, 1991, **28** (suppl. B), 39.
- [3] M.S. Webb *et al.*, *Br. J. Cancer*, 1995, **72**, 896.
- [4] A.A. Gabizon, *Clinical Cancer Research*, supplement 2000, 6.
- [5] R. Cortesi *et al.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 1994, **2**, 281.
- [6] A.D. Bangham *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1965, **13**, 238.
- [7] J.M. Driessen, W.N. Konings, *Meth. Enzymol.*, 1993, **221**, 394.
- [8] J.J. Bergers *et al.*, *J. Liposome Res.*, 1996, **6**, 339.
- [9] Drug Carrier System, F.H.D. Roerdink, A.M. Kroon (Eds.), J. Wiley and Sons Ltd., 1989.
- [10] Long Circulating Liposomes: Old Drugs, New Therapeutics, M.C. Woodle, G. Storm (Eds.), Springer-Verlag, 1998.
- [11] Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA, R.P. Erickson, I.G. Izant (Eds.), Raven Press Ltd, 1992.
- [12] C. Nastruzzi *et al.*, *FEBS Letters*, 1990, **259**, 293.
- [13] S.L. Law *et al.*, *Int. J. Pharm.*, 1994, **103**, 81.
- [14] T.D. Heath, *Meth. Enzymol.*, 1987, **149**, 111.
- [15] T.M. Allen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, **1150**, 9.
- [16] M.C. Woodle, *Chem. Phys. Lipids*, 1993, **64**, 249.
- [17] M.J. Hope *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, **812**, 55.
- [18] S.G. Htmisariis *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 1993, **166**, 271.
- [19] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem Rev.*, 1990, **90**, 543.
- [20] L. Neckers *et al.*, *Crit. Rev. Oncogenesis*, 1992, **3**, 175.
- [21] L.M. Neckers, in *Oligodeoxynucleotides: Antisense Inhibition of Gene Expression*, J. Cohen (Ed.), Macmillan Press, London, 1989, 211.
- [22] S.L. Loke *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1989, **86**, 3474.
- [23] R. Cortesi *et al.*, *Antisense Nucl. Acid Drug Develop.*, 2000, **10**(3) 205.
- [24] A.K. Tanswell *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 1998, **275**, L452.
- [25] P.L. Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1987, **84**, 7413.
- [26] C. Nastruzzi *et al.*, *J. Appl. Cosmetol.*, 1993, **11**, 77.
- [27] W.T. Phillips, *Adv. Drug Del. Rev.*, 1999, **37**, 13.

Ringraziamenti - L'autore desidera ringraziare Claudio Nastruzzi (Università di Perugia) e Elisabetta Esposito (Università di Ferrara) per la preziosa e costruttiva critica nell'impostazione e sviluppo del presente articolo.