

Received: 2014.12.01
Accepted: 2015.09.22
Published: 2016.03.??

Liposomy jako niewirusowe systemy dostarczania leków genetycznych*

Liposomes as non-viral carriers for genetic drugs

Justyna M. Meissner¹, Monika Toporkiewicz¹, Lucyna Matusiewicz¹, Beata Machnicka²

¹ Zakład Cytobiochemii, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski

² Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Zielonogórski

Streszczenie

Metody leczenia chorób nowotworowych, zwłaszcza w ostatnich latach, dynamicznie się zmieniają, co wynika z potrzeby projektowania nowych, skuteczniejszych strategii terapeutycznych. Bardzo obiecująca w leczeniu chorób nowotworowych jest antysensowa terapia genowa. Dostarczenie terapeutycznego fragmentu DNA lub RNA do komórek docelowych w organizmie pacjenta wymaga zastosowania systemów wektorowych. Niewirusowe nośniki leków znajdują coraz szersze zastosowanie w nowych systemach terapeutycznych. W pracy przedstawiono niewirusowe nośniki nowej generacji, skupiając się szczególnie na immunoliposomach znajdujących potencjalne zastosowanie w celowanej terapii genowej.

Słowa kluczowe:

terapia genowa • niewirusowe nośniki leków • liposomy • immunoliposomy

Summary

Methods in cancer therapy particularly in recent years, are rapidly changing, due to the need of design of new, more effective therapeutic strategies. Very promising approach to treatment of the neoplastic diseases is antisense gene therapy. Due to the low toxicity of treatment and eliminating not only the symptoms but also the molecular causes of the disease it may represent a breakthrough in cancer therapies. Delivery of a therapeutic DNA or RNA oligonucleotides to the target cells *in vivo* requires suitable carrier system. Non-viral drug carriers are increasingly used in new systems of targeted gene therapy. This review presents new generation of non-viral carriers, and is focused on immunoliposomes finding potential application in targeted gene therapy.

Keywords:

gene therapy • non-viral drug carriers • liposomes • immunoliposomes

*Praca finansowana przez Wrocławskie Centrum Badań EIT+ w ramach projektu „Biotechnologie i zaawansowane technologie medyczne” - BioMed (POIG.01.01.02-02-003/08) co-financed by the European Regional Development Found (Operational Programme Innovative Economy, 1.1.2).

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1197371>

Word count: 2777

Tables: 1

Figures: 1

References: 114

Adres autorki: dr Justyna M. Meissner, Zakład Cytobiochemii, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Joliot-Curie 14a, 50-383 Wrocław; e-mail: justyna-meissner@wp.pl

Wykaz skrótów: **asODN** – oligonukleotydy antysensowe (antisense oligonucleotides), **EPR** – zwiększona przepuszczalność naczyń i retencji (enhanced vascular permeability and retention), **mAb** – przeciwciało monoklonalne (monoclonal antibody), **miRNA** – mikro RNA (micro RNA), **PEG** – glikol polietylenowy (polyethylene glycol), **siRNA** – małe interferujące RNA (small interfering RNA).

WPROWADZENIE

Idea terapii genowej narodziła się 50 lat temu, dzięki wynikom pionierskich eksperymentów W. Szybalskiego dokumentujących pierwszy transfer genów do komórek ssaków [90]. Obecnie terapia genowa jest innowacyjną metodą leczenia chorych ze schorzeniami o podłożu genetycznym, umożliwiającą usunięcie lub naprawę defektu genetycznego, dzięki czemu stwarza nowe możliwości leczenia różnych typów nowotworów.

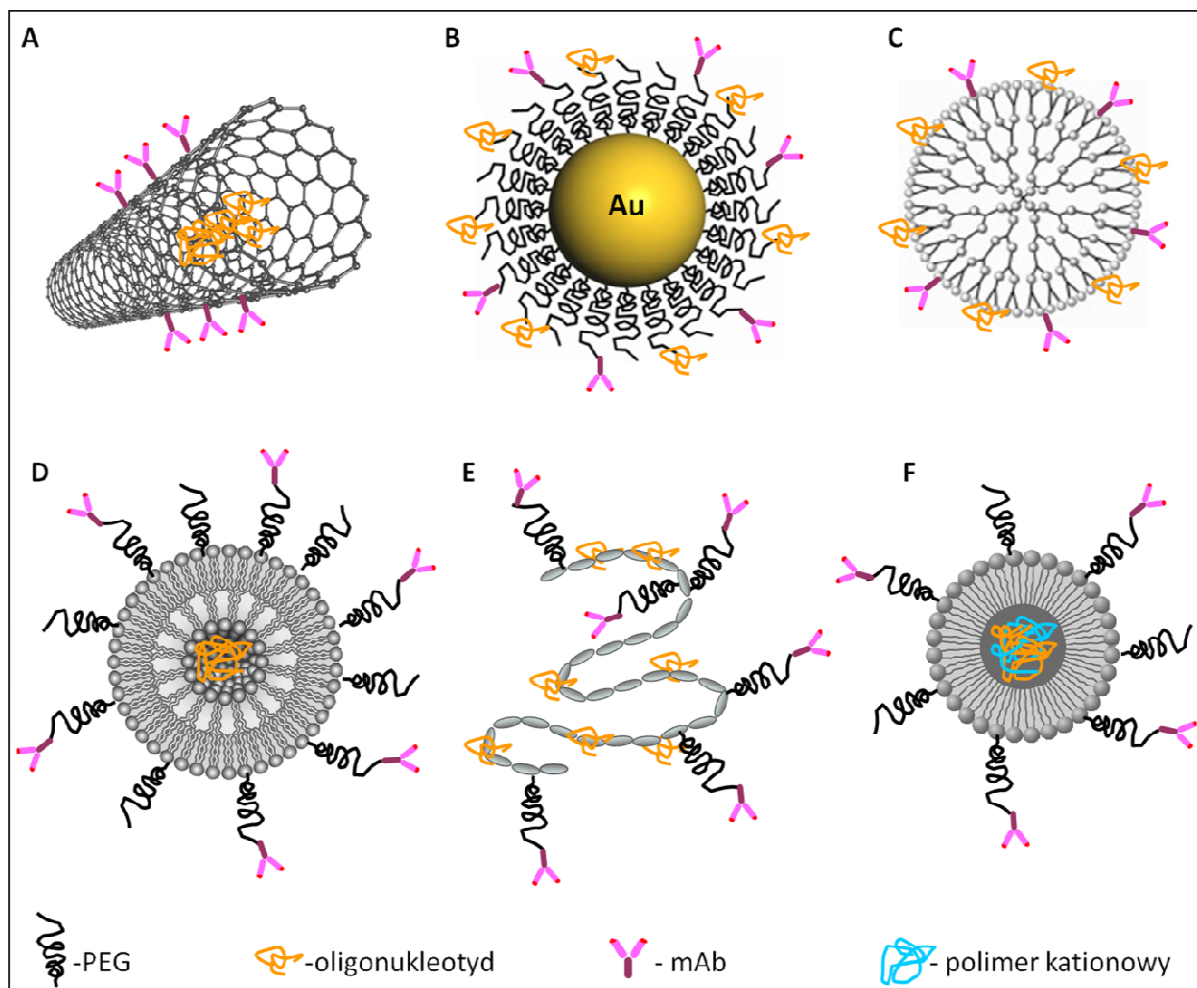
NIEWIRUSOWE NOŚNIKI LEKÓW W CELOWANEJ TERAPII GENOWEJ

Jedną z głównych trudności terapii genowej jest dostarczenie leków do wnętrza komórek docelowych (nowotworowych) i brak stabilności konstrukcji niemodyfikowanych oligonukleotydów w krwiobiegu pacjentów. Kwasy nukleinowe są bardzo wrażliwe na degradację przez nukleazy aktywne w płynach biologicznych, nie są zdolne do przekroczenia bariery śródbłonna oraz bariery krew-mózg, a ładunek ujemny tych cząstek utrudnia ich endocytozę do wnętrza komórek. Podstawowym ograniczeniem w zastosowaniu wolnych kwasów nukleinowych jako leków genetycznych w terapii jest także brak swoistości komórkowej. Zaprojektowanie skutecznej terapii genowej wymaga opracowania systemu nośnika, który powinien zapewniać skuteczne i precyzyjne dostarczenie leku do wnętrza komórek oraz ochronę przed degradacją enzymatyczną, nie wpływając na właściwości fizykochemiczne samego leku. Za najbardziej kluczowe dla skutecznego działania leków genetycznych są uważane interakcje z błoną komórkową oraz ucieczka endosomalna/lizosomalna [3,18,52,55,81,100]. Idealne nośniki powinny być przede wszystkim bezpieczne, trwałe, łatwe i tanie w produkcji w wymaganych ilościach oraz swoiste w stosunku do określonych typów komórek. Wiadomo od dawna, że najbardziej skuteczne w transfekcji komórek są wektory wirusowe. Jednak mimo ogromnej skuteczności mają liczne wady: duże ryzyko immunogenności i wprowadzenia mutacji insercyjnych. Obiecującą alternatywą

są niewirusowe nośniki w nanoskali (<1000 nm), które znajdują coraz szersze zastosowanie w badaniach nad skutecznym dostarczaniem leków genetycznych do komórek. Podczas projektowania syntetycznego wektora jest możliwy bardzo szeroki zakres modyfikacji właściwości fizykochemicznych, m.in. w celu zwiększenia stabilności niesionych leków, nadania komórkowej swoistości i zmniejszenia działań niepożądanych [44,61,62]. Przykładami syntetycznych wektorów leków genetycznych, obecnie intensywnie badanych w zakresie leczenia ludzkich nowotworów krwi, są m.in. immunoliposomy, polimery kationowe, dendrymery, nanorurki węglowe, nanocząstki złota oraz hybrydy lipid-polimer łączące cechy dwóch wymienionych nośników (ryc. 1) [83].

LIPOSOMY JAKO NARZĘDZIA DO TRANSFERU GENÓW W LECZENIU NOWOTWORÓW

Od 1987 r., gdy liposomy kationowe zostały po raz pierwszy wykorzystane do transfekcji komórek przez Felgnera i wsp. dokonano znacznych postępów w rozwoju technologii liposomowej, jako źródła syntetycznych systemów nośników leków przeciwnowotworowych [25,27,87,94]. Obecnie prace nad poprawą ich potencjału terapeutycznego w onkologii skupiają się przede wszystkim na rozwijaniu sposobu aktywnego kierowania do komórek nowotworowych, a także do swoistych wewnątrzkomórkowych organelli oraz kontrolowanego uwalniania terapeutycznego z wykorzystaniem różnic w mikrośrodowisku guza [21]. Liposomy to pęcherzyki zbudowane najczęściej z jednej, rzadziej kilku lub kilkunastu przestrzeni wodnych oddzielonych od siebie zamkniętymi koncentrycznie dwuwarstwami lipidów naturalnych i/lub syntetycznych (ryc. 1D). Cząsteczki, takie jak: białka, enzymy, leki chemioterapeutyczne, kwasy nukleinowe oraz sondy obrazowe mogą być zamykane wewnątrz pęcherzyków (leki hydrofilowe), wbudowywane do dwuwarstwy (leki hydrofobowe) lub rzadziej przyłączane do powierzchni dwuwarstwy lipidowej. Powszechnie wiadomo, że wolne leki genetyczne o polianionowej naturze apli-



Ryc. 1. Przykłady głównych klas nowej generacji niewirusowych wektorów oligonukleotydowych leków genetycznych zawierających reszty glikolu poetylenowego (PEG) w celu sterycznej stabilizacji i/lub jako wysięgnika oraz przeciwciał monoklonalnych (mAb) jako cząsteczek kierujących, A – nanorurka węglowa (CNT), B – nanocząsteczka złota (GNP), C – dendrymer, D – immunoliposom, E – polimer kationowy, F – hybryda polimerowo-lipidowa (LPN)

kowane dożylnie *in vivo* ulegają akumulacji, a następnie w bardzo krótkim czasie degradacji w narządach z rozwiniętym układem siateczkowo-śródbłonkowym. Zamykanie kwasów nukleinowych w pęcherzykach lub micellach lipidowych umożliwia poprawę ich właściwości farmakokinetycznych i biodystrybucji w organizmie. Liposomy składające się z naturalnych lipidów są biodegradowalne, biologicznie obojętne, słabo immunogenne, wykazują niewielką toksyczność oraz bardzo dobrą zdolność transfekcji wszystkich typów komórek i tkanek [1,6,34,69,91,97,98]. Przez odpowiednie zaprojektowanie kompozycji komercyjnie dostępnych lipidów można łatwo kontrolować właściwości fizykochemiczne liposomów. Jest to ogromna zaleta w porównaniu z innymi typami nośników wymagającymi wieloetapowej syntezy i dodatkowych modyfikacji chemicznych. Główna zasada przygotowania lipidowych wektorów leków genetycznych polega na tworzeniu kompleksów kwasów nukleinowych z kationowymi lipidami (lipopleksów) lub syntetycznymi poli-

kationami w celu ułatwienia dostępu do komórek przez elektrostyczne oddziaływania dodatnich ładunków z ujemnie naładowaną błoną komórkową. Jednak fragment RNA lub DNA w kompleksie z lipidem kationowym lub polikationem jest w dalszym ciągu wrażliwy na degradację przez nukleazy obecne w płynach biologicznych oraz nie wykazuje komórkowej swoistości, dlatego połączenie tego typu kompleksów z fuzjogennymi liposomami z przyłączonym ligandem kierującym nośnik do komórek docelowych jest obecnie dominującym przedmiotem badań. Ponadto, jak powszechnie wiadomo, integralną część konstrukcji m.in. oligonukleotydów antysensowych (asODN) oraz krótkich interferujących RNA (np. siRNA, miRNA) stanowią motywy CpG, którym według nowych badań klinicznych przypisuje się immunostymulujące działanie za pośrednictwem receptorów TLR. Zamykanie krótkich sekwencji oligonukleotydowych w kierowanych liposomach może zminimalizować działanie prozapalne [2,31,103,104]. Lipidy najczęściej używane do przygotowania liposo-

mów mających akceptację Amerykańskiej (Federalnej) Agencji Żywności i Leków (FDA) do stosowania *in vivo* to: DSPE (disterylofosfatydyloetanolamina), HSPC (uwodniona fosfatydylocholina z lecytyny sojowej), EPG (fosfatydyloglicerol z żółtka jaja) i DSPC (disteryloglicerofosfatydylocholina). Każdy z wymienionych lipidów, szczególnie DSPE jest dostępny w postaci skoniugowanej za pomocą różnego typu łączników z resztami glikolu polietylenowego (PEG) używanymi do modyfikacji powierzchni projektowanych liposomów w celu zwiększenia stabilności kompleksów nośnika z DNA w krwiobiegu [4]. Mechanizm, według którego PEG zapobiega opsonizacji nawet przy zastosowaniu stosunkowo niskich stężeń polimeru polega na tworzeniu na powierzchni liposomu ochronnej warstwy, która maskuje ładunek powierzchniowy, jest nieprzepuszczalna dla dużych cząsteczek i opsonin oraz zapobiega agregacji i nieswoistemu oddziaływaniu ze składnikami krwi. Dodatek polimerów typu PEG do powierzchni liposomów utrudnia ich rozpoznawanie przez komórki układu fagocytów jednojądrzastych, a przez to wydłuża czas przebywania liposomów we krwi [7,43,66,95,99]. Liposomy o powierzchniowym ładunku dodatnim są najpowszechniejszym systemem dostarczania materiału genetycznego. Spontaniczne tworzenie kompleksów lipidów kationowych z kwasem nukleinowym jest główną zasadą tworzenia tego typu liposomów [30,105]. Jednak obdarzone dodatnim ładunkiem powierzchniowym agregaty lipidowe zawierające kwasy nukleinowe są toksyczne dla organizmu i cechuje je krótki czas półtrwania w krwiobiegu. Kompleksy nośnik-DNA o wypadkowym ładunku dodatnim *in vivo* mają utrudniony dostęp do tkanek docelowych oraz szybko tracą stabilność koloidalną. Wynika to z agregacji nośników w układzie krwionośnym oraz nieswoistych interakcji z macierzą zewnątrzkomórkową (np. z fibronektyną), powierzchnią wielu komórek oraz z ujemnie naładowanymi składnikami krwi (np. białka i enzymy surowicy), co może uaktywnić układ dopełniacza i wyeliminować terapeutyk [26,49,65,68,106,108,110]. Niektóre z lipidów kationowych charakteryzuje wyraźna toksyczność [23,24,59,78]. W celu poprawy wydajności transfekcji i redukcji cytotoksyczności liposomów wiele uwagi poświęca się syntetycznym modyfikacjom obdarzonych dodatnim ładunkiem głów lipidów. Na przykład, w celu obniżenia ładunku dodatniego, do otoczki kationowych liposomów wprowadzono imidazoliny, pirymidyniowe pierścienie heterocykliczne i protonowane grupy poliamin [22,56,70,112]. Ponadto cytotoksyczność kationowych liposomów wynika również z rodzaju grup funkcyjnych łącznika [46,58]. Liposomy z łącznikami estrowymi i amidowymi są mniej cytotoksyczne, jednak szybciej usuwane z krwiobiegu. Alternatywą są lipidy z łącznikiem karbaminianowym charakteryzujące się niewielką toksycznością [85,102]. Karbaminiany zachowują stabilność lipidów w krwiobiegu, natomiast w endosomie mogą spowodować rozpad otoczki i uwolnienie DNA [46,57]. Znacznie mniej toksyczne dla komórek organizmu są liposomy anionowe. Charakteryzują się dłuższym czasem półtrwania

w krwiobiegu, ale przez swój wypadkowy ładunek unie-możliwiają zamykanie nagiego DNA [73]. Obiecującą alternatywę stanowią również liposomy pozbawione ładunku powierzchniowego. Jednak neutralny ładunek utrudnia zamykanie cząsteczek o ładunku ujemnym wewnątrz tego typu liposomów oraz swobodne interakcje z ujemnie naładowaną błoną komórkową. W celu wydajnego zamykania leków genetycznych w liposomach pozbawionych ładunku stosuje się m.in. metodę odparowania techniką faz odwróconych, odwadniania-uwadniania oraz zamrażania-rozmrażania (FAT freezing and thawing), [14,20,89]. Wiadomo, że liposomy na bazie PC (fosfatydylocholina) o neutralnym ładunku dostarczają siRNA do różnych myślich modeli nowotworów z wielokrotnie wyższą skutecznością niż liposomy kationowe [71]. Zaletą tego typu nośników jest brak ładunku dodatniego, który mógłby indukować opsonizację oraz wychwytywanie przez układ fagocytarny MPS (Mononuclear Phagocyte System) w warunkach *in vivo*. Wykazano, że dodatek 2-5 mol% PEG-DSPE do błony neutralnych liposomów powoduje wzrost wydajności pasywnego zamykania kwasów nukleinowych [88]

BIERNE KIEROWANIE LIPOSOMÓW DO TKANEK NOWOTWOROWYCH

Pożądaną cechą nośnika w przeciwnowotworowej terapii genowej jest selektywne dostarczenie leków genetycznych do komórek docelowych. Leki przeciwnowotworowe zamknięte w liposomach łatwo przemieszczają się do miejsca przeznaczenia ze względu na zwiększoną przepuszczalność śródbłonka w obrębie tkanki guzów litych. Wielkość przestrzeni międzykomórkowych w śródbłonku naczyń włosowatych guza wynosi 100-780 nm w zależności od typu nowotworu, podczas gdy w niezmiennym śródbłonku przestrzenie te nie przekraczają 5-10 nm [35]. Guzy lite charakteryzuje również brak odpowiedniego drenażu limfatycznego, co powoduje akumulację liposomów w obrębie nowotworu [47,59,60,93]. Wykorzystanie tego efektu zwanego EPR (Enhanced Permeability and Retention) jest skuteczną metodą biernego kierowania do guza nośników, takich jak liposomy. Tego typu pasywne kierowanie leków polega na wykorzystaniu wyłącznie właściwości patofizjologicznych tkanek nowotworowych i tkanek otaczających guz. W przeciwieństwie do liposomów, leki o małej masie cząsteczkowej nie są zdolne do długotrwałej akumulacji w obrębie guza i w bardzo krótkim czasie są ponownie wprowadzane do krwiobiegu [54,96]. Ważnym parametrem wpływającym na bierne kierowanie przez EPR jest średnica nośników. Akumulacja liposomów w obrębie guza jest bardzo zależna od wielkości przestrzeni w śródbłonku naczyń włosowatych nowotworu, dlatego przyjęto, że liposomy projektowane w celu zastosowania *in vivo* powinny zachowywać średnicę mniejszą niż 400 nm [19]. Wykazano, że najskuteczniej do mikrośrodowiska guza docierają liposomy o średnicy mniejszej niż 200 nm [82]. Ponadto kompozycja lipidowa i ładunek powierzchni liposomu to bardzo istotne parametry wpływające na efektywność kierowania.

PRZYŁĄCZENIE PRZECIWCIAŁ DO POWIERZCHNI IMMUNOLIPOSOMÓW PROMUJE DOCIERANIE NOŚNIKÓW DO KONKRETNÝCH KOMÓREK W ORGANIZMIE

Jedną ze strategii kierowania jest projektowanie liposomów, które w obecności określonego czynnika tracą stabilność, co doprowadza do kontrolowanego uwalniania leku. Takie liposomy są wrażliwe zarówno na czynniki wewnętrzne, czyli patologiczne zmiany w mikrośrodkowisku guza (obniżone pH, wyższa temperatura i nadmiar różnych enzymów proteolitycznych), jak i stosowane w obrębie docelowych tkanek nowotworowych czynniki zewnętrzne (najczęściej fizyczne), takie jak pole magnetyczne, ultradźwięki lub światło o różnej długości fali i intensywności [8,32,42,50,67,111,113]. Inne strategie kierowania obejmują przyłączenie do powierzchni liposomów ligandów kierujących wykazujących duże powinowactwo do zewnątrzkomórkowych markerów charakterystycznych dla różnych typów nowotworów. Celem swóistego kierowania do liposomów mogą być przyłączone przeciwciała monoklonalne [16,39,74], pochodne przeciwciał [40], peptydy [13,53], aptamery [107] i małe cząsteczki kierujące [28,109]. Ważną rolę w nowoczesnej terapii celowanej, czyli ukierunkowanej molekularnie, odgrywają przeciwciała monoklonalne. W celu zmniejszenia immunogenności i wydłużenia czasu półtrwania w surowicy przeciwciała terapeutyczne są zazwyczaj całkowicie humanizowane lub wytwarzane jako białka chimeryczne. Przeciwciała chimeryczne są zbudowane z mysich regionów zmiennych, odpowiadających za rozpoznanie antygenu przyłączonych do części stałej lub zmiennej ludzkiego przeciwciała. Natomiast w wyniku „humanizacji” powstają przeciwciała, w których tylko regiony determinujące komplementarność (CDR) w regionach zmiennych (V) to sekwencja pochodząca z organizmu myszy [92]. Mimo znacznie mniejszych działań niepożądanych oraz lepszej tolerancji w organizmie w porównaniu z terapią konwencjonalną, przeciwciała terapeutyczne są jednak przyczyną innych niepożądanych objawów, także mogących zagrażać życiu pacjentów [36,41,76,77]. Inną ważną alternatywą wydaje się zastosowanie przeciwciał jako czynników kierujących nośniki leków w terapii. Na przykład grupy końcowe PEG są najczęściej wykorzystywane w celu przyłączenia przeciwciał do powierzchni nośników liposomowych, zwanych immunoliposomami [51]. Tak ukierunkowane liposomy opisano po raz pierwszy w latach osiemdziesiątych ub.w. [9,38,64]. Przyłączenie do powierzchni liposomów przeciwciał swoístie rozpoznających markery/receptory ekspozowane na powierzchni komórek konkretnego typu nowotworu powoduje ich gromadzenie na powierzchni określonej komórki docelowej, zwiększenie endocytozy i przez to dostarczone do wnętrza komórki leków. Skuteczność dostarczania leków do komórek jest zależna m.in. od stopnia powinowactwa ligand-receptor oraz liczby receptorów ekspozowanych na powierzchni komórek docelowych. W przypadku immunoliposomów powinowactwo swoístych

przeciwciał jest zwykle bardzo duże [92]. Immunoliposomy umożliwiają dostarczenie do komórki dużej dawki leków przy jednoczesnym zastosowaniu bardzo wysokiego stosunku lek:przeciwciało [5,12,21]. Zadaniem liposomów jest dostarczenie leków genetycznych do konkretnych przedziałów wewnątrzkomórkowych, takich jak cytosol lub jądro komórkowe będących miejscem ich docelowego działania. W przeciwieństwie do małych cząsteczek, które przenikają przez błony w wyniku dyfuzji, dostarczanie leków do komórek za pośrednictwem struktur o średnicy ponad 10 nm (takich jak liposomy), zachodzi głównie za pośrednictwem endocytozy. Po wnikięciu do komórki liposomy trafiają do endosomów, które ulegają fuzji z lizosomami. Podczas szlaku endocytozy pH wewnątrz pęcherzyków systematycznie spada 6,0-6,5 we wczesnych endosomach, do <5,0 wewnątrz późnych endosomów i lizosomów [21,84,86]. W celu uniknięcia degradacji kwasu nukleinowego przez kwaśne hydrolazy i nukleazy, lek genetyczny powinien opuścić endosom zanim nastąpi fuzja z lizosomem. Liposomy opracowane tak, aby promowały destabilizację endosomu wydają się obiecującym układem transportującym m.in. oligonukleotydy. Najczęściej do otoczki lipidowej jest dodawana dioleilofosfatydyloetanolamina (DOPE) lub dioleilofosfatydylocholina (DOPC), czasami w kombinacji z cholesterolem. DOPE ma tendencję do przyjmowania fazy heksagonalnej II, która destabilizując błonę endosomu promuje uwalnianie leku genetycznego do cytosolu [37,45,62,63,75,79,114].

WYBRANE PRZYKŁADY ZASTOSOWANIA UKIERUNKOWANYCH LIPOSOMÓW JAKO POTENCJALNYCH NOŚNIKÓW LEKÓW W TERAPII GENOWEJ

W ostatnich latach opracowano ogromną liczbę nowych syntetycznych nośników lipidowych, które znajdują potencjalne zastosowanie jako bardzo skuteczne narzędzie w dostarczaniu kwasów nukleinowych do wnętrza komórek docelowych. Wykazano, że poprawa właściwości fizykochemicznych liposomów przez wprowadzenie różnych modyfikacji zwiększa stabilność leków genetycznych, nadaje im swoistość komórkową i tkankową oraz redukuje działania niepożądane, które bardzo często występują podczas terapii wolnymi lekami [61,62,63]. Potencjał terapeutyczny immunoliposomów jako nośników leków genetycznych nieprzerwanie wzrasta. Wybrane przykłady potencjalnego zastosowania ukierunkowanych liposomów jako nośników leków genetycznych zestawiono w tabeli 1.

Przykładem potencjalnego zastosowania niewirusowych nośników leków genetycznych w medycynie są liposomy ukierunkowane za pomocą scFv (krótkie fragmenty zmienne immunoglobulin, single-chain variable fragment) rozpoznających białko CD33 ekspozowane m.in. na powierzchni komórek ostrej białaczki szpikowej (AML). Po inkubacji z ukierunkowanymi liposomami niosącymi siRNA kompleksowane z polietylenoiminą

Tabela 1 Wybrane przykłady zastosowania ukierunkowanych liposomów jako nośników kwasów nukleinowych

Lek genetyczny	Docelowy antygen	Badania <i>in vitro</i>	Badania <i>in vivo</i>	Piśmiennictwo
siRNA (AML1/MTG8)	CD33	Komórki ostrej białaczki szpikowej (SKNO-1, Kasumi-1)	Nie	106
siRNA (PLK-1)	Nukleolina	Ludzkie komórki śródbłónka (HMEC-1), komórki raka prostaty (PC3)	Nie	105
asODN (c-MYB)	GD2 (disialogangliozyd)	Komórki neuroblastomy	Tak	108,109,110
siRNA (RhoA)	HER2	Komórki gruczolakoraka (SKBR3)	Nie	113
siRNA (CCR5)	LFA-1 (integryna limfocytarna)	Limfocyty T (CD4+)	Tak	111
siRNA i miRNA (c-Myc, MDM2 i VEGF)	Brak danych	Mysie komórki czerniaka (B16F10)	Tak	112

Stosowane skróty: AML1/MTG8 - białko fuzyjne powstałe na skutek translokacji t(8;21), Plk1- kinaza serynowo-treoninowa, c-MYB - czynnik transkrypcyjny biorący udział w regulacji podziałów komórkowych, Rho - małe białko G z rodziny GTPaz, CCR5- chemokina, c-Myc (produkt onkogenu *c-MYC* stymuluje proces dojrzewania i proliferacji komórek transformowanych), MDM2 - ligaza ubikwitynowa E3 i VEGF - czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego, HER2 - receptor naskórkowego czynnika wzrostu typu 2

skierowane przeciwko AML1/MTG8 (białko fuzyjne powstałe na skutek translokacji t(8;21) obserwowano znaczne obniżenie stężenia mRNA oraz białka docelowego i zmniejszenie klonogenności komórek docelowych w warunkach *in vitro* [80]. Gomes-da-Silva i wsp. opracowali liposomy ukierunkowane za pośrednictwem F3 (tumor-homing peptide) do komórek raka gruczołu krokowego oraz śródbłónka [105]. Białko F3 swoiście rozpoznaje i wiąże nukleolinę - białko ekspozowane na powierzchni komórek nowotworowych oraz komórek śródbłónka angiogennych naczyń krwionośnych w obrębie guzów nowotworowych [17,33]. Plk1 (Polo-like kinase 1) jest kinazą serynowo-treoninową, która bierze udział w regulacji komórkowych podziałów mitotycznych. W komórkach raka stercza (PC3) oraz śródbłónka (HMEC-1) po inkubacji z ukierunkowanymi przez F3 liposomami niosącymi siRNA przeciwko *PLK-1* obserwowano znaczny spadek żywotności skorelowany ze spadkiem stężenia mRNA i białka Plk-1 oraz zatrzymanie komórek w fazie G2 mitozy. Ponadto odnotowano trzykrotny wzrost skuteczności cytostatyku, paklitakselu w połączeniu z przedstawionym preparatem liposomowym

W celu dostarczenia oligonukleotydów antysenso- wych skierowanych przeciwko białku c-MYB (czynnika transkrypcyjnego biorącego udział w regulacji podziałów komórkowych) do komórek ludzkiej neuroblastomy, lek genetyczny zamknięto w kationowych liposomach, do powierzchni których kowalencyjnie przyłączono przeciwciała monoklonalne rozpoznające disialogangliozyd nadekspozowany na powierzchni komórek docelowych. Oligonukleotydy zamknięte w ukierunkowanych liposomach skutecznie reduko-

wały stężenie docelowego białka, charakteryzowały się swoistością docierania do komórek docelowych oraz przedłużonym czasem przebywania w krwiobiegu. Po 24 h od podania zwierzętom doświadczalnym immunoliposomy lokalizowały się głównie w śledzionie. Ponadto, w doświadczeniach *in vivo* obserwowano wydłużony czas przeżycia myszy z indukowanym nowotworem oraz znaczny wzrost skuteczności działania asODN zamkniętych w liposomach w porównaniu z wolnymi lekami [10,11,72].

W badaniach innego zespołu obserwowano wyciszenie ekspresji białka RhoA w komórkach gruczolakoraka po inkubacji z siRNA zamkniętym w immunoliposomach kierowanych przez przeciwciała trastuzumab (herceptyna) skierowane przeciwko HER 2 (receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (Human Growth Factor Receptor)) [29]. Przykład potencjalnego zastosowania immunoliposomów w terapii HIV stanowi zamknięcie siRNA przeciwko mRNA chemokiny CCR5 w liposomach ukierunkowanych za pośrednictwem przeciwciał rozpoznających LFA-1 (integryna występująca na powierzchni leukocytów, Lymphocyte Function-Associated Antigen-1). W modelu zwierzęcym po podaniu ukierunkowanych liposomów niosących siRNA obserwowano zwiększoną odporność na zakażenie, ocenianą przez zmniejszenie miana wirusa w osoczu po zakażeniu oraz zahamowanie związanego z chorobą spadku liczby pomocniczych limfocytów T (CD4+) [48].

Bardzo ważnym podejściem jest również system nano- cząstek LPH (liposom-polikation-kwas hialuronowy) ukierunkowany przez scFv dostarczający jednocze-

śnie miRNA i siRNA w celu ogólnoustrojowego leczenia nowotworów. Hamowanie ekspresji białka c-Myc (produkt onkogenu c-MYC stymuluje proces dojrzewania i proliferacji komórek transformowanych), MDM2 (ligaza ubikwitynowa E3) i VEGF (czynn timer wzrostu śródbłnka naczyniowego) przez miRNA i siRNA zamkniętych w immunoliposomach LPH znacznie ograniczało przerzutowy wzrost guza płuc w badaniach *in vivo* [15].

Niedawno porównano również skuteczność terapeutyczną opracowanych przez nasz zespół liposomów niekierowanych oraz immunoliposomów ukierunkowanych z wykorzystaniem przeciwciał anty CD20 względem ludzkich limfocytów B w warunkach *in vivo*. Czynn timer terapeutycznym były krótkie osiemnastonukleotydowe oligonukleotydy antysensowe skierowane przeciwko sześciu pierwszym kodonom mRNA białka Bcl-2 kompleksowane z lipidem kationowym (DOTAP) lub polimerem kationowym (polietylenoimina, PEI) zamknięte w otocze liposomowej. W czasie badań zaobserwowano zahamowanie wzrostu i całkowitą remisję guzów w grupach myszy NOD/SCID obarczonych ludzkim chłoniakiem Burkitta (Daudi CD20+) traktowanych ukierunkowanymi liposomami (Meissner J.M., Toporkiewicz M., Czogalla A., Matusewicz L., Kuliczowski K., Sikorski A.F.: Novel antisense therapeutics delivery systems: In vitro and in vivo studies of liposomes targeted with anti-CD20 antibody. *J. Control. Release.* 2015; 220: 515-528) oraz średnio 30% zahamowanie wzrostu guzów w grupach traktowanych liposomami niekierowanymi [101]. Otrzymane wyniki jednoznacznie wskazują, że nośniki

liposomowe, dzięki przyłączonym przeciwciałom, są kierowane do komórek docelowych, przez co działają znacznie skuteczniej niż preparaty niekierowane. Ponadto, badane immunoliposomy charakteryzowały się bardzo dużą swoistością docierania do komórek docelowych w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* w przeciwieństwie do liposomów niekierowanych (zgłoszenia patentowe P.407947 oraz P.407949).

WNIOSKI

Antysensowa terapia genowa jest jedną z najbardziej obiecujących metod leczenia chorych z nowotworami znajdujących się na etapie zaawansowanych badań klinicznych. Biorąc pod uwagę powszechnie dostępne w literaturze informacje na temat ograniczeń związanych z zastosowaniem wolnych oligonukleotydów antysensowych w terapii *in vivo*, wszelkie próby wzmocnienia skuteczności ich działania mogą się przyczynić do rejestracji nowych leków oraz rozwoju skuteczniejszych strategii terapeutycznych i postępu medycyny w walce z nowotworami. Coraz lepsze skutki leczenia przynosi stosowanie terapii celowanych, z wykorzystaniem immunoliposomów, w których lek działa precyzyjnie na nieprawidłowo funkcjonujące komórki nowotworowe, nie uszkadzając komórek zdrowych.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy pracy dziękują prof. dr hab. Aleksandrowi F. Sikorskiemu za cenne wskazówki i merytoryczną dyskusję podczas pisania pracy.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abu Lila A.S., Ishida T., Kiwada H.: Targeting anticancer drugs to tumor vasculature using cationic liposomes. *Pharm. Res.*, 2010; 27: 1171-1183
- [2] Agrawal S., Zhao Q.: Mixed backbone oligonucleotides: improvement in oligonucleotide-induced toxicity *in vivo*. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 1998; 8: 135-139
- [3] Al-Dosari M.S., Gao X.: Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *AAPS J.*, 2009; 11: 671-681
- [4] Alexis F., Pridgen E.M., Langer R., Farokhzad O.C.: Nanoparticle technologies for cancer therapy. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2010; 197: 55-86
- [5] Allen T.M.: Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 750-763
- [6] Allen T.M., Cullis P.R.: Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2013; 65: 36-48
- [7] Allen T.M., Mehra T., Hansen C., Chin Y.C.: Stealth liposomes: an improved sustained release system for 1-β-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res.*, 1992; 52: 2431-2439.
- [8] Arias J.L.: Drug targeting strategies in cancer treatment: an overview. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2011; 11: 1-17
- [9] Barbet J., Machy P., Leserman L.D.: Monoclonal antibody covalently coupled to liposomes: specific targeting to cells. *J. Supramol. Struct. Cell. Biochem.*, 1981; 16: 243-258
- [10] Brignole C., Marimpietri D., Pagnan G., Di Paolo D., Zancolli M., Pistoia V., Ponzoni M., Pastorino F.: Neuroblastoma targeting by c-myc-selective antisense oligonucleotides entrapped in anti-GD₂ immunoliposome: immune cell-mediated anti-tumor activities. *Cancer Lett.*, 2005; 228: 181-186
- [11] Brignole C., Pagnan G., Marimpietri D., Cosimo E., Allen T.M., Ponzoni M., Pastorino F.: Targeted delivery system for antisense oligonucleotides: a novel experimental strategy for neuroblastoma treatment. *Cancer Lett.*, 2003; 197: 231-235
- [12] Byrne J.D., Betancourt T., Brannon-Peppas L.: Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008; 60: 1615-1626
- [13] Chan J.M., Rhee J.W., Drum C.L., Bronson R.T., Golomb G., Langer R., Farokhzad O.C.: *In vivo* prevention of arterial restenosis with paclitaxel-encapsulated targeted lipid-polymeric nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 19347-19352
- [14] Chapman C.J., Erdahl W.L., Taylor R.W., Pfeiffer D.R.: Factors affecting solute entrapment in phospholipid vesicles prepared by the freeze-thaw extrusion method: a possible general method for improving the efficiency of entrapment. *Chem. Phys. Lipids*, 1990; 55: 73-83
- [15] Chen Y., Zhu X., Zhang X., Liu B., Huang L.: Nanoparticles modified with tumor-targeting scFv deliver siRNA and miRNA for cancer therapy. *Mol. Ther.*, 2010; 18: 1650-1656
- [16] Cheng W.W., Allen T.M.: Targeted delivery of anti-CD19 liposomal

- doxorubicin in B-cell lymphoma: a comparison of whole monoclonal antibody, Fab' fragments and single chain Fv. *J. Control. Release*, 2008; 126: 50-58
- [17] Christian S., Pilch J., Akerman M.E., Porkka K., Laakkonen P., Ruoslahti E.: Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *J. Cell Biol.*, 2003; 163: 871-878
- [18] Collet G., Grillon C., Nadim M., Kieda C.: Trojan horse at cellular level for tumor gene therapies. *Gene*, 2013; 525: 208-216
- [19] Danhier F., Feron O., Preat V.: To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J. Control. Release*, 2010; 148: 135-146
- [20] Deamer D.W., Barchfeld G.L.: Encapsulation of macromolecules by lipid vesicles under simulated prebiotic conditions. *J. Mol. Evol.*, 1982; 18: 203-206
- [21] Deshpande P.P., Biswas S., Torchilin V.P.: Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomedicine*, 2013; 8: 1509-1528
- [22] Dobbs W., Heinrich B., Bourgogne C., Donnio B., Terazzi E., Bonnet M.E., Stock F., Erbacher P., Bolcato-Bellemin A.L., Douce L.: Mesomorphic imidazolium salts: new vectors for efficient siRNA transfection. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009; 131: 13338-13346
- [23] Dokka S., Toledo D., Shi X., Castranova V., Rojanasakul Y.: Oxygen radical-mediated pulmonary toxicity induced by some cationic liposomes. *Pharm. Res.*, 2000; 17: 521-525
- [24] Eastman S.J., Siegel C., Tousignant J., Smith A.E., Cheng S.H., Scheule R.K.: Biophysical characterization of cationic lipid: DNA complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1997; 1325: 41-62
- [25] Elbayoumi T.A., Torchilin V.P.: Current trends in liposome research. *Methods Mol. Biol.*, 2010; 605: 1-27
- [26] Escriou V., Ciolina C., Lacroix F., Byk G., Scherman D., Wils P.: Cationic lipid-mediated gene transfer: effect of serum on cellular uptake and intracellular fate of lipopolyamine/DNA complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998; 1368: 276-288
- [27] Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M., Roman R., Chan H.W., Wenz M., Northrop J.P., Ringold G.M., Danielsen M.: Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987; 84: 7413-7417
- [28] Gabizon A., Horowitz A.T., Goren D., Tzemach D., Shmeeda H., Zalipsky S.: *In vivo* fate of folate-targeted polyethylene-glycol liposomes in tumor-bearing mice. *Clin. Cancer Res.*, 2003; 9: 6551-6559
- [29] Gao J., Sun J., Li H., Liu W., Zhang Y., Li B., Qian W., Wang H., Chen J., Guo Y.: Lyophilized HER2-specific PEGylated immunoliposomes for active siRNA gene silencing. *Biomaterials*, 2010; 31: 2655-2664
- [30] Gao K., Huang L.: Non-viral methods for siRNA delivery. *Mol. Pharm.*, 2009; 6: 651-658
- [31] Gao Y., McLuckey S.A.: Electron transfer followed by collision-induced dissociation (NET-CID) for generating sequence information from backbone-modified oligonucleotide anions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2013; 27: 249-257
- [32] Goldenbogen B., Brodersen N., Gramatica A., Loew M., Liebscher J., Herrmann A., Egger H., Budde B., Arbuzova A.: Reduction-sensitive liposomes from a multifunctional lipid conjugate and natural phospholipids: reduction and release kinetics and cellular uptake. *Langmuir*, 2011; 27: 10820-10829
- [33] Gomes-da-Silva L.C., Ramalho J.S., Pedroso de Lima M.C., Simoes S., Moreira J.N.: Impact of anti-PLK1 siRNA-containing F3-targeted liposomes on the viability of both cancer and endothelial cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2013; 85: 356-364
- [34] Goyal P., Goyal K., Vijaya Kumar S.G., Singh A., Katare O.P., Mishra D.N.: Liposomal drug delivery systems--clinical applications. *Acta Pharm.*, 2005; 55: 1-25
- [35] Haley B., Frenkel E.: Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol. Oncol.*, 2008; 26: 57-64
- [36] Harding F.A., Stickler M.M., Razo J., DuBridge R.B.: The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions. *MAbs*, 2010; 2: 256-265
- [37] Hayes M.E., Drummond D.C., Kirpotin D.B., Zheng W.W., Noble C.O., Park J.W., Marks J.D., Benz C.C., Hong K.: Genospheres: self-assembling nucleic acid-lipid nanoparticles suitable for targeted gene delivery. *Gene Ther.*, 2006; 13: 646-651
- [38] Heath T.D., Macher B.A., Papahadjopoulos D.: Covalent attachment of immunoglobulins to liposomes via glycosphingolipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1981; 640: 66-81
- [39] Hu C.M., Kaushal S., Tran Cao H.S., Aryal S., Sartor M., Esener S., Bouvet M., Zhang L.: Half-antibody functionalized lipid-polymer hybrid nanoparticles for targeted drug delivery to carcinoembryonic antigen (CEA) presenting pancreatic cancer cells. *Mol. Pharm.*, 2010; 7: 914-920
- [40] Huang G., Zhou Z., Srinivasan R., Penn M.S., Kottke-Marchant K., Marchant R.E., Gupta A.S.: Affinity manipulation of surface-conjugated RGD peptide to modulate binding of liposomes to activated platelets. *Biomaterials*, 2008; 29: 1676-1685
- [41] Hwang W.Y., Foote J.: Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods*, 2005; 36: 3-10
- [42] Ibsen S., Benchimol M., Simberg D., Esener S.: Ultrasound mediated localized drug delivery. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2012; 733: 145-153
- [43] Immordino M.L., Dosio F., Cattel L.: Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int. J. Nanomedicine*, 2006; 1: 297-315
- [44] Ishida T., Atobe K., Wang X., Kiwada H.: Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes upon repeated injections: effect of doxorubicin-encapsulation and high-dose first injection. *J. Control. Release*, 2006; 115: 251-258
- [45] Ito K., Chen J., Asano T., Vaughan E.D.Jr., Poppas D.P., Hayakawa M., Felsen D.: Liposome-mediated gene therapy in the kidney. *Hum. Cell*, 2004; 17: 17-28
- [46] Jin L., Zeng X., Liu M., Deng Y., He N.: Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. *Theranostics*, 2014; 4: 240-255
- [47] Kale A.A., Torchilin V.P.: Environment-responsive multifunctional liposomes. *Methods Mol. Biol.*, 2010; 605: 213-242
- [48] Kim S.S., Peer D., Kumar P., Subramanya S., Wu H., Asthana D., Habiro K., Yang Y.G., Manjunath N., Shimaoka M., Shankar P.: RNAi-mediated CCR5 silencing by LFA-1-targeted nanoparticles prevents HIV infection in BLT mice. *Mol. Ther.*, 2010; 18: 370-376
- [49] Klein E., Ciobanu M., Klein J., Machi V., Leborgne C., Vandamme T., Frisch B., Pons F., Kichler A., Zuber G., Lebeau L.: "HFP" fluorinated cationic lipids for enhanced lipoplex stability and gene delivery. *Bioconjug. Chem.*, 2010; 21: 360-371
- [50] Koren E., Apte A., Jani A., Torchilin V.P.: Multifunctional PEGylated 2C5-immunoliposomes containing pH-sensitive bonds and TAT peptide for enhanced tumor cell internalization and cytotoxicity. *J. Control. Release*, 2012; 160: 264-273
- [51] Kularatne S.A., Low P.S.: Targeting of nanoparticles: folate receptor. *Methods Mol. Biol.*, 2010; 624: 249-265
- [52] Kurreck J.: Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem.*, 2003; 270: 1628-1644
- [53] Laakkonen P., Vuorinen K.: Homing peptides as targeted delivery vehicles. *Integr. Biol.*, 2010; 2: 326-337
- [54] Lammers T., Kiessling F., Hennink W.E., Storm G.: Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *J. Control. Release*, 2012; 161: 175-187

- [55] Lee J.M., Yoon T.J., Cho Y.S.: Recent developments in nanoparticle-based siRNA delivery for cancer therapy. *Biomed Res. Int.*, 2013; 2013: 782041
- [56] Liberska A., Unciti-Broceta A., Bradley M.: Very long-chain fatty tails for enhanced transfection. *Org. Biomol. Chem.*, 2009; 7: 61-68
- [57] Liu D., Hu J., Qiao W., Li Z., Zhang S., Cheng L.: Synthesis of carbamate-linked lipids for gene delivery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005; 15: 3147-3150
- [58] Lv H., Zhang S., Wang B., Cui S., Yan J.: Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J. Control. Release*, 2006; 114: 100-109
- [59] Maeda H.: Macromolecular therapeutics in cancer treatment: the EPR effect and beyond. *J. Control. Release*, 2012; 164: 138-144
- [60] Maeda H., Nakamura H., Fang J.: The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging *in vivo*. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2013; 65: 71-79
- [61] Manjila S.B., Baby J.N., Bijin E.N., Constantine I., Pramod K., Valsalakumari J.: Novel gene delivery systems. *Int. J. Pharm. Investig.*, 2013; 3: 1-7
- [62] Markman J.L., Rekechenetskiy A., Holler E., Ljubimova J.Y.: Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2013; 65: 1866-1879
- [63] Martin B., Sainlos M., Aissaoui A., Oudrhiri N., Hauchecorne M., Vigneron J.P., Lehn J.M., Lehn P.: The design of cationic lipids for gene delivery. *Curr. Pharm. Des.*, 2005; 11: 375-394
- [64] Martin F.J., Hubbell W.L., Papahadjopoulos D.: Immunospecific targeting of liposomes to cells: a novel and efficient method for covalent attachment of Fab' fragments via disulfide bonds. *Biochemistry*, 1981; 20: 4229-4238
- [65] Mevel M., Kamaly N., Carmona S., Oliver M.H., Jorgensen M.R., Crowther C., Salazar F.H., Marion P.L., Fujino M., Natori Y., Thanou M., Arbuthnot P., Yaouanc J.J., Jaffres P.A., Miller A.D.: DODAG; a versatile new cationic lipid that mediates efficient delivery of pDNA and siRNA. *J. Control. Release*, 2010; 143: 222-232
- [66] Milla P., Dosio F., Cattel L.: PEGylation of proteins and liposomes: a powerful and flexible strategy to improve the drug delivery. *Curr. Drug. Metab.*, 2012; 13: 105-119
- [67] Mok H., Zhang M.: Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-based delivery systems for biotherapeutics. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2013; 10: 73-87
- [68] Morille M., Montier T., Legras P., Carmoy N., Brodin P., Pitard B., Benoit J.P., Passirani C.: Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting. *Biomaterials*, 2010; 31: 321-329
- [69] Mufamadi M.S., Pillay V., Choonara Y.E., Du Toit L.C., Modi G., Naidoo D., Ndesendo V.M.: A review on composite liposomal technologies for specialized drug delivery. *J. Drug Deliv.*, 2011; 2011: 939851
- [70] Nie Y., Ji L., Ding H., Xie L., Li L., He B., Wu Y., Gu Z.: Cholesterol derivatives based charged liposomes for doxorubicin delivery: preparation, *in vitro* and *in vivo* characterization. *Theranostics*, 2012; 2: 1092-1103
- [71] Ozpolat B., Sood A.K., Lopez-Berestein G.: Nanomedicine based approaches for the delivery of siRNA in cancer. *J. Intern. Med.*, 2010; 267: 44-53
- [72] Pastorino F., Brignole C., Loi M., Di Paolo D., Di Fiore A., Perri P., Pagnan G., Ponzoni M.: Nanocarrier-mediated targeting of tumor and tumor vascular cells improves uptake and penetration of drugs into neuroblastoma. *Front. Oncol.*, 2013; 3: 190
- [73] Patil S.D., Rhodes D.G., Burgess D.J.: Biophysical characterization of anionic lipoplexes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005; 1711: 1-11
- [74] Pirollo K.F., Zon G., Rait A., Zhou Q., Yu W., Hogrefe R., Chang E.H.: Tumor-targeting nanoimmunoliposome complex for short interfering RNA delivery. *Hum. Gene Ther.*, 2006; 17: 117-124
- [75] Pisani M., Mobbili G., Bruni P.: Neutral liposomes and DNA transfection. W: *Non-Viral Gene Therapy*, red.: X. Yuan. InTech., 2011: 319-348
- [76] Powożnik B., Kubowicz P., Pękala E.: Przeciwciała monoklonalne w terapii celowanej. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2012; 66: 663-673
- [77] Reichert J.M., Rosensweig C.J., Faden L.B., Dewitz M.C.: Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat. Biotechnol.*, 2005; 23: 1073-1078
- [78] Rolland A., Sullivan S.M.: *Pharmaceutical Gene Delivery Systems*. Marcel Dekker, New York 2003: 99-101
- [79] Ropert C.: Liposomes as a gene delivery system. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1999; 32: 163-169
- [80] Rothdiener M., Muller D., Castro P.G., Scholz A., Schwemmlin M., Fey G., Heidenreich O., Kontermann R.E.: Targeted delivery of siRNA to CD33-positive tumor cells with liposomal carrier systems. *J. Control. Release*, 2010; 144: 251-258
- [81] Sahu N.K., Shilakari G., Nayak A., Kohli D.V.: Antisense technology: a selective tool for gene expression regulation and gene targeting. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2007; 8: 291-304
- [82] Sawant R.R., Torchilin V.P.: Challenges in development of targeted liposomal therapeutics. *AAPS J.*, 2012; 14: 303-315
- [83] Shu Y., Pi F., Sharma A., Rajabi M., Haque F., Shu D., Leggas M., Evers B.M., Guo P.: Stable RNA nanoparticles as potential new generation drugs for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2014; 66: 74-89
- [84] Sorkin A., Von Zastrow M.: Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2002; 3: 600-614
- [85] Spelios M., Kearns M., Savva M.: From gene delivery to gene silencing: plasmid DNA-transfecting cationic lipid 1,3-dimyristoylamidopropane-2-[bis(2-dimethylaminoethane)] carbamate efficiently promotes small interfering RNA-induced RNA interference. *Biochemistry*, 2010; 49: 5753-5759
- [86] Stabelska K., Wyrozumska P., Grzybek M., Sikorski A.F.: Charakterystyka i medyczne zastosowania konstrukcji liposomowych. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2002; 11: 229-242
- [87] Streibhardt K., Ullrich A.: Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat. Rev. Cancer*, 2008; 8: 473-480
- [88] Stuart D.D., Allen T.M.: A new liposomal formulation for antisense oligodeoxynucleotides with small size, high incorporation efficiency and good stability. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000; 1463: 219-229
- [89] Szoka F.Jr., Papahadjopoulos D.: Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978; 75: 4194-4198
- [90] Szybalska E.H., Szybalski W.: Genetics of human cell line. IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1962; 48: 2026-2034
- [91] Thierry A.R., Lunardi-Iskandar Y., Bryant J.L., Rabinovich P., Gallo R.C., Mahan L.C.: Systemic gene therapy: biodistribution and long-term expression of a transgene in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 9742-9746
- [92] Toporkiewicz M., Meissner J., Matusiewicz L., Czogalla A., Sikorski A.F.: Toward a magic or imaginary bullet? Ligands for drug targeting to cancer cells: principles, hopes, and challenges. *Int. J. Nanomedicine*, 2015; 10: 1399-1414
- [93] Torchilin V.: Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2011; 63: 131-135
- [94] Torchilin V.P.: Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2005; 4: 145-160

- [95] Torchilin V.P.: Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *AAPS J.*, 2007; 9: E128-E147
- [96] Torchilin V.P.: Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2010; 197: 3-53
- [97] Tyagi P., Kashyap M.P., Kawamorita N., Yoshizawa T., Chancellor M., Yoshimura N.: Intravesical liposome and antisense treatment for detrusor overactivity and interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *ISRN Pharmacol.*, 2014; 2014: 601653
- [98] van Rooijen N., van Nieuwmegen R.: Liposomes in immunology: multilamellar phosphatidylcholine liposomes as a simple, biodegradable and harmless adjuvant without any immunogenic activity of its own. *Immunol. Commun.*, 1980; 9: 243-256
- [99] Wang M., Thanou M.: Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacol. Res.*, 2010; 62: 90-99
- [100] Williford J.M., Wu J., Ren Y., Archang M.M., Leong K.W., Mao H.Q.: Recent advances in nanoparticle-mediated siRNA delivery. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2014; 16: 347-370
- [101] Wyrozumska P., Meissner J., Toporkiewicz M., Szarawarska M., Kuliczowski K., Ugorski M., Walasek M.A., Sikorski A.F.: Liposome-coated lipoplex-based carrier for antisense oligonucleotides. *Cancer Biol. Ther.*, 2015; 16: 66-76
- [102] Yang H.W., Yi J.W., Bang E.K., Jeon E.M., Kim B.H.: Cationic nucleolipids as efficient siRNA carriers. *Org. Biomol. Chem.*, 2011; 9: 291-296
- [103] Yu B., Mao Y., Bai L.Y., Herman S.E., Wang X., Ramanunni A., Jin Y., Mo X., Cheney C., Chan K.K., Jarjoura D., Marcucci G., Lee R.J., Byrd J.C., Lee L.J., Muthusamy N.: Targeted nanoparticle delivery overcomes off-target immunostimulatory effects of oligonucleotides and improves therapeutic efficacy in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2013; 121: 136-147
- [104] Yu R.Z., Grundy J.S., Geary R.S.: Clinical pharmacokinetics of second generation antisense oligonucleotides. *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 2013; 9: 169-182
- [105] Zelphati O., Nguyen C., Ferrari M., Felgner J., Tsai Y., Felgner P.L.: Stable and monodisperse lipoplex formulations for gene delivery. *Gene Ther.*, 1998; 5: 1272-1282
- [106] Zelphati O., Uyeche L.S., Barron L.G., Szoka F.C.Jr.: Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998; 1390: 119-133
- [107] Zhang L., Chan J.M., Gu F.X., Rhee J.W., Wang A.Z., Radovic-Moreno A.F., Alexis F., Langer R., Farokhzad O.C.: Self-assembled lipid-polymer hybrid nanoparticles: a robust drug delivery platform. *ACS Nano.*, 2008; 2: 1696-1702
- [108] Zhao W., Zhuang S., Qi X.R.: Comparative study of the *in vitro* and *in vivo* characteristics of cationic and neutral liposomes. *Int. J. Nanomedicine*, 2011; 6: 3087-3098
- [109] Zheng Y., Yu B., Weecharansan W., Piao L., Darby M., Mao Y., Koynova R., Yang X., Li H., Xu S., Lee L.J., Sugimoto Y., Brueggemeier R.W., Lee R.J.: Transferrin-conjugated lipid-coated PLGA nanoparticles for targeted delivery of aromatase inhibitor 7 α -APTADD to breast cancer cells. *Int. J. Pharm.*, 2010; 390: 234-241
- [110] Zhi D., Zhang S., Wang B., Zhao Y., Yang B., Yu S.: Transfection efficiency of cationic lipids with different hydrophobic domains in gene delivery. *Bioconjug. Chem.*, 2010; 21: 563-577
- [111] Zhu L., Kate P., Torchilin V.P.: Matrix metalloprotease 2-responsive multifunctional liposomal nanocarrier for enhanced tumor targeting. *ACS Nano.*, 2012; 6: 3491-3498
- [112] Zhu L., Lu Y., Miller D.D., Mahato R.I.: Structural and formulation factors influencing pyridinium lipid-based gene transfer. *Bioconjug. Chem.*, 2008; 19: 2499-2512
- [113] Zhu L., Torchilin V.P.: Stimulus-responsive nanopreparations for tumor targeting. *Integr. Biol.*, 2013; 5: 96-107
- [114] Zuhorn I.S., Engberts J.B., Hoekstra D.: Gene delivery by cationic lipid vectors: overcoming cellular barriers. *Eur. Biophys. J.*, 2007; 36: 349-362

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.