

Mateja Cegnar¹, Julijana Kristl²

Dostavni sistemi nanometrskih velikosti za vnos proteinov in genov

Nanosized Drug Delivery Systems for Proteins and Genes

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: zdravilo sproščanje sistemi, rekombinantne beljakovine, genetsko zdravljenje, nanotehnologija

V prispevku predstavljamo sisteme in možnosti vnosa proteinskih učinkovin in genov v telo. Dostavljanje učinkovin na mesto delovanja postaja vse bolj pomembno, saj so se z odkritjem genoma in s tem povezanim znanjem o gensko zasnovanih boleznih pojavile učinkovitejše in zelo specifične učinkovine. Novi sistemi so povečini nanometrskih velikosti (nanodelci, liposomi, nanokompleksi), zgrajeni iz določenih nosilnih snovi, in imajo širok spekter prednosti. Omogočijo ciljanje v tkivo/celico, povečajo biološko uporabnost učinkovine, ji podaljšajo delovanje na ciljnem mestu ter nudijo zaščito pred encimsko razgradnjo, še posebej proteinom in nukleinskim kislinam. Vektorji za vnos genskega materiala v celico so virusni in nevirusni. Zaradi velikih pomanjkljivosti virusnih vektorjev postajajo zanimivejši nevirusni vektorji, ki vključujejo nosilec s kationskim značajem, kar omogoča povezovanje z negativno nabitto molekulo DNK. Tvorba kompleksov pomeni zaščito genskega materiala in olajša vnos v celico. Za vodenje procesov v celici, kot so endocitoza, izstop iz lizosoma, razpad kompleksa, vstop v jedro in vključevanje v jedro DNK, pripnejo na nosilni sistem specifične molekule, ki povečajo ciljanje, zlitje z membranami, spremenijo mikrookolje v celici ali drugače vplivajo na celične funkcije, ki olajšajo vnos genskega materiala v jedro. S kombiniranjem virusnih in nevirusnih vektorjev so razvili hibridne vektorje, ki so varnejši od virusnih in učinkovitejši od nevirusnih.

447

ABSTRACT

KEY WORDS: drug delivery systems, recombinant proteins, gene therapy, nanotechnology

This article reviews most systems and approaches for delivery of protein drugs and therapeutic genes into the body. Issues in drug delivery are becoming more important as more potent and specific drugs become available, with knowledge about diseases available from the human genome project. To achieve optimal therapeutic efficacy, drug delivery systems should be customized and very innovative. Novel systems are often nanosized, prepared with the use of specific excipients, and they also have multifaceted advantages in drug delivery. These systems in general can be used to provide targeted (cellular/tissue) delivery of drugs, to improve oral bioavailability, to sustain drug/gene effect at target place, and to improve the stability of therapeutics agents against enzymatic degradation, especially of protein, peptide and nucleic acid drugs. Vectors for gene delivery can be divided into two major groups: viral and nonviral. Due to several limitations of viral vectors, nonviral vectors attract more attention; they consist of a carrier with cationic character that is able to associate with the negatively charged DNA molecule. Formation of this complex protects DNA against denaturation and enables its entry into cells. For specific processes that must take place, such as

¹ Asist. dr. Mateja Cegnar, mag. farm., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana.

² Prof. dr. Julijana Kristl, mag. farm., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana.

cell recognition, endocytosis, cytosolic trafficking, endosomal escape, dissociation of the complex, efficient nuclear uptake and gene expression, several specific molecules are attached to gene delivery devices enabling targeting, fusion with the membrane and changes in the microenvironment, or other ways of affecting cellular function for successful transgenic expression. Combinations of viral and nonviral components are hybrid vectors, which are safer than viral vectors and more efficient than nonviral ones.

UVOD

Prelomnico v razvoju moderne biotehnologije je v 70-ih letih postavila rekombinantna tehnologija DNK, ki je vpeljala izdelavo proteinskih učinkovin celo v industrijsko proizvodnjo. Prvi rekombinantni protein, ki se je pred 25 leti pojavil na tržišču, je bil inzulin, s čimer je začrtal strm vzpon tovrstnih učinkovin v medicinski uporabi. Danes je na tržišču Evropske unije odobrenih okoli 90 takšnih izdelkov. Hiter razvoj je v 80-ih letih botroval novodobnim t. i. biofarmaceutskim izdelkom, med katere danes uvrščajo proteinske učinkovine, izdelane z rekombinantno tehnologijo DNK, ter monoklonska protitelesa, pridobljena s hibridoma tehnologijo. Vzporedno prištevajo k biofarmaceutskim izdelkom tudi novejša zdravila, ki vključujejo fragmente nukleinskih kislin. Raziskave na področju molekularne genetike so namreč v 90-ih letih omogočile sekvenciranje človeškega genoma, kar je razjasnilo nekatere gensko zasnovane bolezni in prispevalo k boljšemu razumevanju njihove patogeneze. S tega vidika so oblikovali nov način zdravljenja, ki posega v genski ustroj celice. Razvili so koncept genskega zdravljenja, ki cilja na bolezni, kot so rak, vnetja, okužbe, bolezni krvožilnega in živčnega sistema ter druge genske napake (1-3).

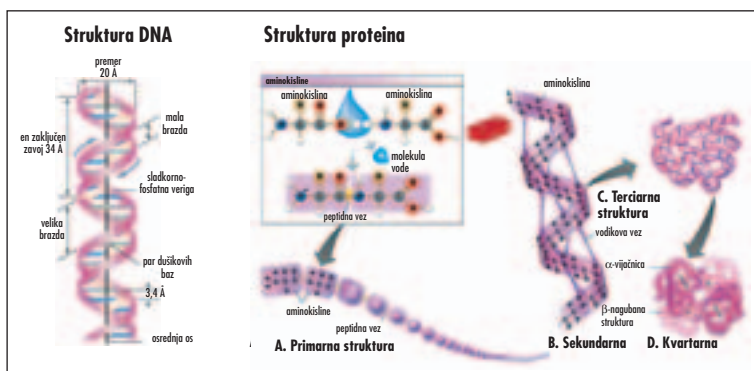
Prve učinkovine, ki delujejo na ravni nukleinskih kislin, so se pojavile v zdravljenju bakterijskih okužb, virusnih in rakavih obolenj. Delujejo tako, da onemogočijo delovanje ali sintezo nukleinskih kislin pri bakterijah ali hitrodelečih se virusih in rakavih celicah. Tovrstne učinkovine so kinoloni, alkilirajoči cistostatiki, antimetaboliti oz. analogi purinskih in pirimidinskih baz, antracinski antibiotiki, alkaloidi in druge spojine, ki delujejo bodisi kot kelatorji molekul DNK, zavirajo delovanje encimov ali drugače ustavijo procese celične delitve. Navedene učinkovine so predvsem v klasičnih farmacevtskih oblikah.

V peroralnih farmacevtskih oblikah (tabletah, kapsulah idr.) so največkrat majhne in stabilne molekule učinkovin, ki lahko difundirajo skozi biološke membrane, medtem ko so pri večjih molekulah pogostejše parenteralne oblike, kot so injekcije in infuzije. Ker so s parenteralnimi oblikami povezani večji stroški zdravljenja, manjša sprejemljivost pri bolnikih, sistemski toksični učinki, večkratno odmerjanje ter navsezadnje tržni interesi, razvijajo nove farmacevtske oblike, ki se vse bolj uveljavljajo.

Novejši nosilni sistemi za vnos učinkovin v telo imajo prednosti, kot so zaščita učinkovine v fizioloških pogojih, nadzorovano sproščanje učinkovine, zmanjšanje neželenih učinkov, manjše število odmerjanj ter pospešena dostava učinkovin s kratko razpolovno dobo (1, 2). Med slednjimi so predvsem proteini in genski fragmenti s svojo značilno zgradbo (slika 1). Njihova biološka uporabnost je skoraj vedno omejena zaradi fizioloških ovir v organizmu. Mednje prištevamo fizikalne ovire, kjer celične membrane ovirajo prehod velikim in hidrofilnim molekulam, kot so proteini in nukleinske kisline, ter encimske ovire, kjer med množico najrazličnejših encimov lahko izpostavimo proteaze in RNK-aze oziroma DNK-aze (3-5).

Metode in tehnologije, ki jih uporabljajo za izdelavo nosilnih sistemov za proteinske učinkovine in gene, so si v osnovi podobne, vendar se med seboj vseeno nekoliko razlikujejo. Proteini namreč obstajajo v nativni tridimenzionalni strukturi, ki pogojuje njihovo terapevtsko delovanje, zato proizvodnja njihovih nosilnih sistemov prvotno temelji na zagotovitvi najugodnejših pogojev izdelave, ki ohrani popolnost proteina. Denaturirani protein ima poleg neučinkovitosti še dodatne slabosti, kot so neželeni stranski učinki in imunski odziv.

Za razliko od proteinskih učinkovin zahtevajo geni za svoje delovanje le kemijsko



Slika 1. Strukturna zgradba DNA fragmenta in proteina je eden najpomembnejših dejavnikov, ki vpliva na izbiro ustrezne farmacevtske oblike.

celovitost fragmentov nukleinskih kislin, vendar je sposobnost za doseganje učinkovitega izražanja genskega materiala v celici pogojena s povsem drugačnimi dejavniki. Če je mesto delovanja proteinskih učinkovin bodisi zunaj ali znotraj celice, je tarča genskih fragmentov vedno znotraj celice oz. še dlje – v samem jedru celice. Zato morajo sistemi za vnos genov premostiti mnogo več encimskih in fizikalnih ovir, preden dosežejo svojo tarčo. Šele po uspešni vključitvi gena v jedro DNK pride do transgenskega izražanja in terapevtskega odziva, kar je odvisno predvsem od lastnosti genskega vektorja (npr. plazmida) ter stanja celice.

V prispevku bomo predstavili pristope in dostavne sisteme za vnos proteinskih učinkovin in genov, od katerih so slednji šele v eksperimentalni fazi, medtem ko sistemi s proteini že stopajo na tržno področje.

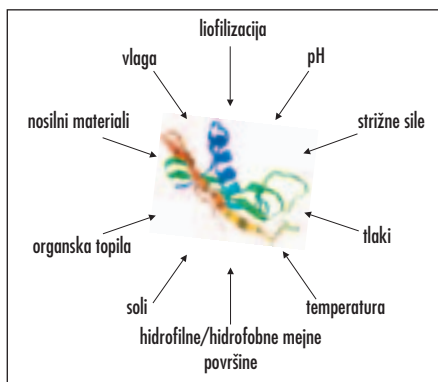
SISTEMI ZA VNOS REKOMBINANTNIH PROTEINSKIH UČINKOVIN

Prve proteinske učinkovine, ki so utrle pot v klinično uporabo, so uporabljali za nadomestno zdravljenje. Z razvojem biotehnoloških metod in sekvenciranja genov je postalo proteinsko inženirstvo učinkovito orodje za sintezo novih proteinskih učinkovin: rekombinantnih krvnih faktorjev, rekombinantnih hormonov, citokinov, cepiv, monoklonskih protiteles in terapevtskih encimov (1, 2). Zaradi slabosti, ki jih imajo proteinske učinkovine v fizioloških

kih pogojih, uveljavljajo različne pristope, s katerimi lahko izboljšajo biološko uporabnost proteinov, spremenijo njihovo imunogenost, razpolovno dobo, hitrost delovanja idr. V ta namen raziskujejo različne kemijske spremembe proteinov, ki zakrijejo njihove neželene lastnosti, ter nove možnosti dostave glede na mesto njihovega vnosa ali farmacevtsko obliko, ki jo vnesejo v organizem. Vse spremembe, ki jih izvajajo s proteini, so možne šele ob dobrem poznavanju fizikalno-kemijskih lastnosti proteinov (npr. velikosti, molekulske mase, konformacijske stabilnosti idr.), njegove farmakokinetike (razpolovne dobe) in farmakodinamike (farmakološkega delovanja, imunogenosti idr.) ter njegove klinične uporabe (želeni odmerek, mesto vnosa) (6). Klasične parenteralne oblike skušajo vse bolj nadomestiti z novimi pristopi, metodami in sistemi za dostavo proteinskih učinkovin, vendar je mnogokrat njihov prehod iz bazičnih raziskav v stopnjo razvoja še vedno omejen s ključnimi

Tabela 1. Ključni dejavniki pri oblikovanju nosilnih sistemov s proteinskimi učinkovinami (1).

Področje	Težave in slabosti
proizvodnja	stroški proizvodnje, prenos v večje merilo, izkoristek
stabilnost	vpliv proizvodnje in nosilnega sistema na proteinsko učinkovino
biološka uporabnost	delež učinkovine v sistemskem obtoku
varnost/toksičnost	vpliv nosilnega sistema na mesto aplikacije in njegova toksičnost



Slika 2. Aktivna tridimenzionalna zgradba proteinske učinkovine in dejavniki, ki vplivajo na konformacijsko stabilnost pri oblikovanju.

vprašanji o proizvodnji, stabilnosti proteina (slika 2), biološki uporabnosti, varnosti oz. toksičnosti končnega izdelka idr. (tabela 1) (1, 2).

Nanodelci za parenteralni vnos

Večino danes dostopnih proteinov na tržišču dajejo parenteralno. Proizvajalci so zato usmerili razvoj novjših farmacevtskih oblik k takšnim injektabilnim sistemom in pripomočkom, ki olajšajo vnos v organizem in povečajo sprejemljivost pri bolnikih. To so injekcije v ovojnini, ki si jih bolniki lahko dajejo kar sami, taki so npr. avtoinjektorji oz. injekcijske brizge v obliki peresa za inzulin, rekombinantni rastni hormon idr. (1, 7).

Ker ima večina proteinskih učinkovin kratko razpolovno dobo, jih je treba večkrat injicirati. Da bi se izognili pogostemu dajanju, že

razvijajo 'depo' oblike ali pa proteine kemijsko modificirajo. Med slednjimi postopki je pogosto pegiliranje oz. kovalentno vezanje polietilenglikolnih (PEG) verig na proteinsko učinkovino. Tako proteinu povečajo biološko uporabnost, podaljšajo razpolovno dobo, zmanjšajo imunogenost in proteolitsko razgradnjo ter obenem povečajo stabilnost ali topnost. Med pegiliranimi proteini najdemo na tržišču PEG-adenozin deaminazo (Adagen® – Enzon/NPS Pharmaceuticals), PEG-asparaginazo (Oncaspar® – Rhone-Poulenc Rorer), PEG-interferon alfa-2b (PEG-INTRON® – Schering-Plough) in PEG-interferon alfa-2a (PEGASYS® – Roche) (7).

Druga možnost za podaljšanje delovanje proteinske učinkovine so depo oblike. V to skupino uvrščajo vsadke, mikrosfere, nanodelce ter injektabilne gele. Med vsadke uvrščajo tudi novejše osmotske črpalke, ki jih največkrat vstavijo podkožno s kirurškim posegom. Nekateri med temi sistemi omogočajo tudi ponovno polnjenje že vnesenih črpalk, s čimer lahko prilagodijo odmerjanje proteinske učinkovine za posameznega bolnika ali določeno zdravljenje (1, 7).

Trenutno je razvoj na področju depo oblik usmerjen v uporabo biopolimerov, ki se v organizmu razgradijo na biološko skladne in razgradljive spojine. Izmed naravnih polimerov uporabljajo peptide (kolagen, želatino, albumin idr.) in polisaharide (hitosan, alginat, škrob, dekstran, celulozo, hialuronsko kislino idr.), od sinteznih pa najpogosteje poliestre (polilaktide (PLA), poliglikolide (PGA),

Tabela 2. Biorazgradljivi polimeri za nadzorovano sproščanje proteinov.

Polimeri	Mehanizem razgradnje
Naravni	
proteini: albumin, globulin, želatino, kolagen, kazein	encimska razgradnja (proteaze, kolagenaze ...)
polisaharidi: škrob, celuloza, hitosan, dekstran, alginat	encimska razgradnja (amilaze, alginaze), kislinska hidroliza
Sintezni	
poliortoestri	esterska hidroliza, esteraze
polianhidridi	hidroliza
poliamidi	hidroliza
polialkcianoakrilati	hidroliza
poliestri (laktidi/glikolidi, polikaprolaktoni)	esterska hidroliza, esteraze
polifosfateni	hidroliza, raztapljanje
pseudopoliaminokisliline	encimi, proteaze

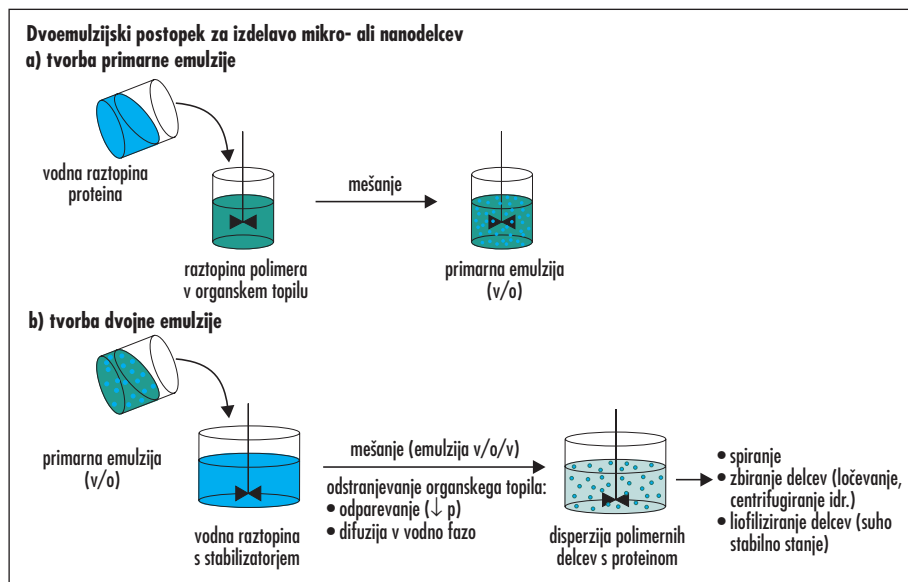
polikaprolaktone), polianhidride, poliortoe- stre, polifosfazene ter poliaminokislina (tabela 2) (1, 5, 7).

Pri naravnih polimerih najpogosteje uporabljajo metodo premreženja makromolekul v sisteme različnih geometrij. Vendar imajo tudi ti svoje pomanjkljivosti: slabo ohranjajo obliko zaradi nabrekanja, imajo majhno trdnost, njihova sestava niha in je slabše razložena, lahko so prisotni različni kontaminanti ali preostanki reagentov, dodanih pri izdelavi. Vse več uporabljajo sintezne polimere, ki so čistejši in imajo znano sestavo. S spreminjanjem njihove molekulske mase, stereokemije monomerov, razmerja komonomerov ter oblike polimernih verig lahko dobijo širok spekter polimerov z različnimi tehnološkimi lastnostmi in obnašanjem *in vitro* ter *in vivo* pogojih (6).

Izdelava nosilnih sistemov iz sinteznih polimerov poteka največkrat z emulzijskimi metodami, ki vključujejo uporabo organskih topil in fizikalno tehnoloških postopkov. Oboje ima velik vpliv tako na lastnosti farmacevtske oblike, ki jo želijo izdelati, kot na celovitost oz. stabilnost proteinske učinkovine, ki jo med postopkom vgrajujejo (1, 6, 8, 9, 10). Uporabljajo organska topila, ki raztapljajo polimer, vendar minimalno vplivajo na stabilnost proteina in jih po izdelavi enostavno

odstranijo. Slika 3 prikazuje postopek za izdelavo mikrosfer ali nanodelcev. Tudi vsadke pogosto izdelujejo z emulzijskimi metodami, le da uporabijo drugačne tehnike vlitja v kalupe določenih geometrij (1, 6). Izbira večstopenjskega emulzijskega postopka je odvisna od stabilnosti proteina. Če je protein v kristalni obliki stabilen tudi v organskem topilu, ga lahko dispergirajo v polimerno organsko fazo kar v suhi obliki (enoemulzijski postopek). V večini primerov pa protein najprej raztopijo v vodni fazi, ga šele nato emulgirajo v organsko fazo s polimerom in tvorijo predemulzijo (slika 3). Naslednje stopnje izvedejo pri obeh postopkih podobno. Z dodatkom zunanje vodne faze, ki vsebuje stabilizator, pripravijo emulzijo oz. dvojno emulzijo. Z velikostjo vnosa fizikalnih obremenitev med emulgiranjem definirajo sistem, bodisi mikrosfere ali nanodelce. V končni stopnji organsko topilo odstranijo iz nastalih mikrosfer ali nanodelcev pod znižanim tlakom ali z dodatkom zunanje vodne faze, ki povzroči difuzijo organskega topila iz nastalih delcev. Slednje je možno le v primeru, ko je organsko topilo delno topno v vodi in njegova topnost hitro narašča z večanjem deleža vodne faze (6, 8).

Za izdelavo večjih delcev, mikrosfer, pogosto uporabljajo tehnologijo sušenja z razprševanjem, kjer za razliko od zgoraj omenjenega



Slika 3. Dvoemulzijski postopek za izdelavo mikrosfer ali nanodelcev. v – voda, o – olje.

postopka disperzijo polimera z učinkovino razpršijo v toku vročega zraka, ki sproti od strani uporabljena topila (6). Novejši je postopek, kjer proteinsko učinkovino dispergirajo v raztopino polimera, nato pa disperzijo razpršijo v tekočem dušiku, ki od nastalih delcev odtegne topilo (7). Lupron Depot® je prvi dostavni sistem na tržišču, ki vsebuje učinkovino levoprolid acetat, vgrajeno v mikrosfere PLGA, katerega dajanje je enkrat mesečno in je namenjen zdravljenju raka na prostati (11). Podobne oblike s proteinskimi učinkovinami, ki jih najdemo na tržišču, so predstavljene v tabeli 3 (6, 7, 12).

Omejite pri izdelavi mikrosfer ali nanodelcev sta kompleksnost proizvodnega postopka in delež oz. izguba učinkovine pri vgrajevanju (1). Alternativa omenjenim oblikam so injektabilni geli ali *in situ* parenteralni dostavni sistemi, ki so manj zahtevni za izdelavo in omogočajo vnos večjih koncentracij proteinske učinkovine (1, 5). V ta namen uporabljajo tekočo obliko različnih polimerov, ki po injiciranju v telesu ustvarijo depo sistem, v katerega je ujeta učinkovina. Med tovrstne sisteme uvrščajo: termoplastične polimere, ki so pri povišani temperaturi tekoči, po injiciranju se v telesu strdijo in tvorijo depo obliko; *in situ* premreževalne polimere, ki imajo pripete funkcionalne skupine za medsebojno premreženje v telesu; *in situ* obarjalne sisteme, kjer polimer raztopijo v organskem topilu, ki se po injiciranju zmeša s telesnimi tekočinami in zapusti polimer v trdni obliki; ter sisteme, ki pri telesni temperaturi gelirajo in nadzorovano sproščajo učinkovino (5, 13). Primer dostavnega sistema na tržišču je SABER™. To je dostavni sistem oz. biorazgradljivi gel, sestavljen iz polimera sahara acetatizobutirata v fiziološko sprejemljivem topilu (etanol, benil benzoat idr.), ki po injiciranju

difundira in zapusti polimer v poltrdnem stanju (1, 7).

Sproščanje proteinske učinkovine, ki se vključí v nastali sistem, je odvisno od njene difuzije skozi gelsko rešetko. Poglavitni dejavniki so velikost molekul proteinske učinkovine, količina vgrajenega proteina, njegova topnost in molekulska masa, sestava polimernega nosilca ter velikost in oblika nastalega ogrodja (11).

Novejši so dostavni sistemi, ki sproščajo učinkovino glede na spremembo v telesu oz. mikrookolju. Razvijajo jih z učinkovinami, ki ne zahtevajo konstantnih plazemskih koncentracij, temveč se sproščajo glede na dražljaje, bodisi notranje, ki so odvisni od potreb organizma (t. i. sistemi z zaprto zanko), ali zunanje, ki jih po potrebi izvajajo na sistem (t. i. sistemi z odprto zanko) (4, 14).

Sistemi z zaprto zanko so najbolj raziskani za zdravljenje sladkorne bolezni, kjer se inzulin sprošča glede na spremembe v koncentraciji glukoze. Taki so pH-odvisni sistemi in sistemi kompetitivne desorpcije. Pri prvem vgradijo v nosilni polimer inzulin in encim glukoza-oksidoza, ki pretvarja glukozo v glukonsko kislino. Zaradi nastanka kisline se zniža pH v nosilcu, kar omogoči sproščanje inzulina. Do sproščanja pride zaradi povečane topnosti inzulina pri nizkem pH ali zaradi pH-odvisnega polimera, ki pri nizkem pH nabreka in omogoči sproščanje inzulina zaradi porušene strukture polimernega ogrodja. Pri kompetitivni desorpciji izkoriščajo večjo afiniteto glukoze za določen ligand, ki zato sprosti inzulin. Primera sta kompeticija glukoze, ki ima večjo afiniteto, in glikozilirane inzulina s konkavalinom A, ali fazni prehod polimera premreženega s konkavalinom iz gel stanja v sol stanje, kjer se z vezavo glukoze na konkavalin zmanjša premreženost. Podobni

Tabela 3. Tržno dostopni polimeri dostavni sistemi s proteinskimi učinkovinami (odobreni od ameriške Agencije za hrano in zdravila – FDA). PLA – polimer mlečne kisline, PLGA – kopolimer mlečne in glikolne kisline, sc. (subkutano) – v podkožje, im. (intramuskularno) – v mišico.

Zdravilo	Protein	Polimer	Vnos	Bolezniški znaki
Lupron Depot®	levoprolid acetat	PLA	sc./im.	rak na prostati
Nutropin Depot®	rekomb. čl. rastni hormon	PLGA	sc./im.	pomanjkanje ravnega hormona
Zoladex®	goserelin acetat	PLA	sc.	rak na prostati
Sandostatatin LAR®	okreotid acetat	PLGA	sc./im.	akromegalija, rak v prebavnem traktu
Trelstar Depo®	triptorelin pamoat	PLGA	sc./im.	agonist gonadoliberina

so sistemi, ki izrabljajo še druge interakcije, kot so antigen-protitelo, encim-substrat idr.

Sistemi z odprto zanko omogočijo sproščanje proteinske učinkovine glede na spremembe, ki jih povzročijo od zunaj. Na vnešeni sistem delujejo z magnetnim poljem, ultrazvokom, električnim poljem, temperaturo, svetlobo ali mehansko silo, zaradi česar nastanejo v njem fizikalne spremembe, ki povečajo sproščanje učinkovine iz nosilca (14).

Neparenteralne farmacevtske oblike

Vse več je raziskav, kjer kot alternativo parenteralnim oblikam razvijajo neinvazivne dostavne sisteme. Najpogostejše poti vnosa neparenteralnih oblik so skozi pljuča, skozi kožo ter skozi usta. Vsaka izmed njih ima svoje ovire, ki jih prikazuje tabela 4 (1).

Ker se biološka uporabnost proteinskih učinkovin po neparenteralnem vnosu zmanjša za več kot polovico, morajo pri sistemskem zdravljenju ob visokih koncentracijah proteina še vedno uporabljati parenteralno pot. Obratno pa je lahko lokalno zdravljenje z dostavo proteinske učinkovine na mesto delovanja veliko učinkovitejše že pri majhnih odmerkih v primerjavi s parenteralnim vnosom (1, 6).

Dostavni sistemi skozi pljuča

Pljuča predstavljajo obetajočo pot vnosa učinkovine v telo ne le za lokalno, temveč tudi sistemsko delovanje. Absorpcija je hitra zaradi velike specifične površine pljuč in tesnega stika med alveolarnim epitelijem in krvnim obtokom (1, 7, 15). Vendar so v študijah dokazali, da je sistemska absorpcija inzulina skozi pljuča le 10 do 15% v primerjavi s podkož-

no injekcijo, ki znaša 20 do 30% intravenskega odmerka (1). Razliko pripisujejo množici encimov, ki so prisotni v pljučih in zato zmanjšajo biološko uporabnost inzulina. Druga težava je odziv pljuč. Odvisno od posamezne proteinske učinkovine lahko ta izzove različne lokalne učinke na pljučno tkivo oz. je lahko njen odmev za sistemsko delovanje prevelik, da bi jo vnesli skozi pljuča. Proizvajalci vse več uvažajo nove pristope in ovojnine, ki olajšajo in izboljšajo dostavo proteinske učinkovine in pljučne alveole, kjer je absorpcija najintenzivnejša. Načrtujejo takšne oblike, ki tvorijo aerosole z želenimi lastnosti, bodisi disperzijo trdih delcev ali vodnih kapljic v zračnem toku. Najpomembnejša lastnost tovrstnih oblik, ki določa mesto dostave v pljučih, je povprečni masni aerodinamični premer delca. Ta parameter vključuje velikost, obliko in gostoto delca, ki naj bi za dostavo globoko v pljučni sistem znašal 1 do 3 μm (7, 15). Z vidika stabilnosti proteina so najprimernejša farmacevtska oblika praški za inhaliranje. Za izdelavo praškov, ki morajo imeti veliko disperzibilnost in pretočnost, pogosto uporabljajo tehnologijo sušenja z razprševanjem ali novejšo tehnologijo z uporabo superkritičnih tekočin. Inhalacijske farmacevtske oblike imajo prednost, da ne zahtevajo sterilnosti, ki je za parenteralne oblike obvezna, pač pa natančno določeno največje število nepatogenih mikroorganizmov (17). Kljub temu izdelujejo tovrstne farmacevtske oblike večinoma v brezkužnih pogojih z nadzorovano vsebnostjo vlage v zraku. Pogosto dodajo proteinski učinkovini še spojine, ki ščitijo njeno strukturo med razprševanjem ali preprečijo vezavo vlage na delce in tvorbo agregatov. Zaščito pred encimi lahko dosežejo z vključevanjem proteinske učinkovine v biorazgradljive nanodelce ali mikrosfere. Tovrstne sisteme lahko načrtujejo tudi tako, da zadržijo sproščanje proteina v pljučih daljše časovno obdobje. Namreč, poskusi na živalih so pokazali, da ima v porodne delce vgrajeni inzulin 12 ur daljše delovanje, kot če je v prosti obliki. Kljub potencialu omenjenih sistemov je dostava skozi pljuča omejena le na proteinske učinkovine, ki delujejo v nizkih oz. srednjih koncentracijah ter ne povzročajo stranskih učinkov niti lokalnega draženja pljučnega tkiva (1, 2, 7).

Tabela 4. Težave in slabosti pri neinvazivni dostavi proteinskih učinkovin.

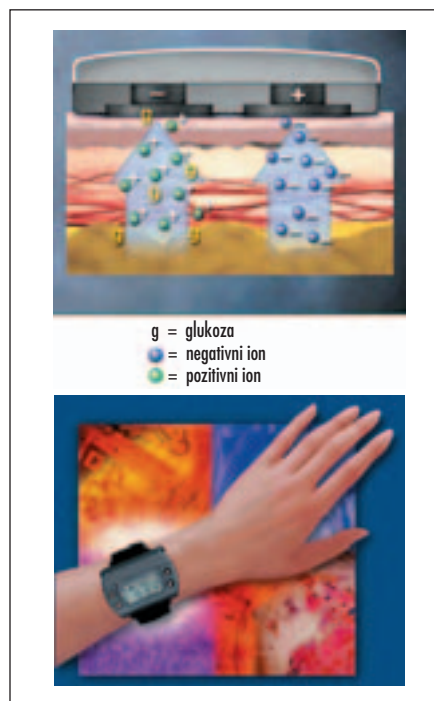
Mesto dostave	Težave in slabosti
dostava skozi pljuča	epitelijske celice, proteaze, alveolarni makrofagi, vprašljiva dostava učinkovine, definirani odmerki, hitra absorpcija
dostava skozi kožo	rožena plast kože, proteaze, makrofagi, absorptivna površina kože
dostava skozi usta	epitelijske celice prebavil (tesni stiki), proteaze, ekstremne vrednosti pH

Dostavni sistemi skozi kožo

Največja ovira pri dostavi proteinske učinkovine skozi kožo je rožena plast. Šele motnja v oviralni funkciji kože privede do absorpcije večjih molekul ali delcev skozi njo (liposomi, nanodelci idr.). Povečan prehod delcev v kožo dosežemo z iontoforezo, elektroporacijo, z uporabo ultrazvoka ali pospeševalca toka delcev v kožo.

Pri iontoforezi uporabljajo obližem podobne sisteme, ki jih po namestitvi na kožo priključijo na električni tok majhne jakosti (gotota toka = $500 \mu\text{A}/\text{cm}^2$). Transport molekul v kožo omogočata elektromigracijski (tok ionov v električnem polju) in elektroosmozni tok. Slednji nastopi pri uporabi električnega toka na negativno nabiti biološki membrani, kjer protiioni ustvarjajo dodaten pretok molekul od anode h katodi. Zaradi tega lahko z iontoforezo dostavljajo v kožo tudi nenabite in večje molekule, npr. proteine (16, 18, 21). Med testiranimi proteini (kot so inzulin, kalcitonin, paratireoidni hormon, vazopresin, somatostatini idr.) (16) so le redki primerni za dostavljanje z iontoforezo glede na odmerek, ki je potreben za doseg farmakološkega delovanja, in fizikalno-kemijske lastnosti proteina. Največjo uporabnost je iontoforeza dosegla z razvojem neinvazivnega diagnostičnega orodja, ki na podlagi nasprotnega elektroosmotskega toka iz kože izloči nenabite molekule, kot je glukoza. Sistem Glucowatch® (Cygnus Inc., ZDA), ki je namenjen bolnikom s sladkorno boleznijo, omogoča hitro in neinvazivno spremljanje ravnih glukoze v krvi (slika 4). Sistem ima v stiku s kožo dve identični hidrogelni ploščici z elektrodama, ki zbirata glukozo, ki jo nato prek encimsko katalizirane reakcije zazna biosenzor in pretvori v čitljiv signal. Z razvojem bioinženirstva in mikroelektronike je sistem v obliki ročne ure zelo priročen za uporabo; signalna opozorila še dodatno opomnijo bolnika na nastop kritičnih vrednosti glukoze v krvi (18, 19).

Pri elektroporaciji povečajo vnos učinkovin v kožo tako, da nanjo dovajajo kratke električne impulze, ki lokalno povzročijo spremembe v membranah. Prenos molekul je odvisen od napetosti, trajanja, obsega in števila povzročenih impulzov (20). Kot učinkovito so dokazali kombinacijo elektroporacije in iontoforeze, ki sinergistično poveča vnos



Slika 4. Sistem Glucowatch® (Cygnus Inc., ZDA).

molekul v kožo. Z uporabo ultrazvočnih sond zmanjšajo barierno funkcijo kože zaradi kavitacije (velike lokalne tlačne razlike), ki moti urejenost lipidov med keratinociti v roženi plasti. Pri vseh naštetih pristopih lahko povečajo prehod molekul skozi kožo tudi s pospeševalci absorpcije, surfaktanti.

Slabost omenjenih pristopov je, da kožo poškodujejo, jo dražijo ali izzovejo imunski odgovor. Prav tako je vprašljiva tudi stabilnost proteinske učinkovine ob prisotnosti tako fizikalnih kot kemijskih pospeševalcev. Kljub povečani prepustnosti kože je dostava proteinskih učinkovin skozi njo z omenjenimi pristopi primerna le za primere, ki zahtevajo majhne odmerke. Namreč, absorptivna površina kože je omejena na majhen predel, protein pa po prehodu skozi roženo plast pričakajo tudi makrofagi in celice imunskega odziva, ki dodatno zmanjšajo njegovo biološko uporabnost (1, 2).

Dostavni sistemi skozi usta

Jemanje zdravila skozi usta je najbolj zaželeno pot vnosa učinkovine v telo, vendar je za

proteine skoraj nemogoče zaradi majhne biološke uporabnosti. Vendar so raziskovalci na področju dostavnih sistemov za proteinske učinkovine odkrili možnosti, s katerimi bi lahko vnašali proteine v telo tudi peroralno. Med omenjenimi pristopi so dostavni sistemi, ki zaščitijo proteinsko učinkovino pred agresivnim biološkim okoljem (pH, encimi ipd.), podaljšajo čas zadrževanja na sluznici prebavil in s tem povečajo možnost absorpcije. Eden zanimivejših pristopov so biorazgradljivi nanodelci, ki zaradi majhnih velikosti prehajajo v Peyerjevo pot, limfni sistem, kjer se absorbirajo skozi t. i. celice M. Zaradi tarčnega mesta se zdi tovrstna dostava z nanodelci primerna tudi za vnos cepiv (1, 5). Peroralni vnos nanodelcev obeta veliko pri lokalnem zdravljenju v prebavilih, npr. pri Cronovi bolezni, saj lahko delci zaradi nanometriških velikosti prodirajo globoko v obolelo tkivo in se tam zadržijo dalj časa.

NANOSISTEMI ZA VNOS TERAPEVTSKIH GENOV

Gensko zdravljenje je nova metoda, s katero bi lahko popravljali napake v genskem zapisu celic ali povečali izražanje genov, ki kodirajo določene terapevtske proteine. V gensko zdravljenje štejemo vsak poseg v genski zapis celice ob uporabi polinukleotidov oz. različnih fragmentov nukleinskih kislin. V to skupino uvrščajo protismiselne oligonukleotide, ki z vezavo onemogočijo izražanje določenega gena, in ribosome, molekule RNK z encimsko aktivnostjo (3, 22).

Vektorji so sistemi za vnos terapevtskih genov v telo. Zanje velja, da morajo biti varni, netoksični, neimunogeni, omogočiti morajo zaščito genskega materiala, prenos do tarčnih celic, ciljanje, ter vstop v celice in sprostitvev genskega materiala. Drugi vidiki, ki zadevajo vključevanje gena, transgeno izražanje in terapevtski odziv, so odvisni predvsem od učinkovitosti genskega fragmenta in njegove vloge v patogenezi določene bolezni.

Za uspešno gensko zdravljenje se mora v celici odviti vrsta zapletenih bioloških procesov: vnos vektorja z genskim materialom v telo bodisi lokalno v tkivo ali sistemsko v krvni obtok, prenos vektorja do tarčnega tkiva oz. celice in prepoznavnost receptorja, vstop vektorja v celico, njegov transport do celičnega jedra in sproščanje genskega materiala iz vektorja v jedro celice, prepisovanje genske informacije v jedru, prevajanje informacij iz nastale mRNK v ustrezen protein v citoplazmi, vezava in delovanje proteina na receptor, ki je lahko znotraj celice (intrakrini mehanizem) ali na njeni površini (avtokrini mehanizem) ali na sosednji tarčni celici (parakrini mehanizem). V nekaterih primerih protein vstopi v sistemski krvni obtok in deluje na oddaljene celice in tkiva (endokrini mehanizem) (npr. rastni faktor, eritropoetin, koagulacijski faktorji itd.), kjer prek receptorjev povzroča biološki učinek (3, 22).

Vektorji za vnos terapevtskih genov

K sistemom za vnos genov prištevamo virusne, nevirusne in hibridne vektorje ter *ex vivo*

Tabela 5. Gensko zdravljenje na stopnji kliničnih testiranj v svetovnem merilu (26).

Vektor	Število kliničnih testiranj	Bolezen
Virusni vektorji		
retrovirus	161	rak, aids, hemofilija idr.
adenovirus	135	rak, cistična fibroza, krvožilne bolezni idr.
poksvirus	37	rak
adenoasociacijski virus	9	cistična fibroza, hemofilija, rak na prostati
drugi virusi	6	rak
Nevirusni vektorji		
kompleks liposom-DNA	57	rak, cistična fibroza, bolezni koronark idr.
prosta DNA	59	rak, bolezni arterij idr.
vnos RNA	6	rak
pištola za vnos genov	5	kožni rak

spremenjene presajene celice (3, 8, 23–25). Najpogosteje uporabljeni vektorji, ki so na stopnji kliničnih testiranj, so prikazani v tabeli 5 (26).

Virusni vektorji

Na področju sistemov za vnos terapevtskih genov so kot prve razvili virusne vektorje. Virusi že v osnovi vključujejo princip prenosa genskega materiala. Vektorje izdelajo tako, da v virusu določene gene, ki kodirajo za virusne proteine, zamenjajo s terapevtskimi geni. V ta namen najpogosteje uporabljajo retrovirus in adenoviruse, sledijo jim herpes simpleks virus, adenoasociacijski virusi ter poksvirusi. Virusi se razlikujejo po velikosti, obliki verige DNK/RNK (enovijačna ali dvovijačna), kapaciteti dednega materiala ter učinkovitosti okuženja celic, ki so bodisi v stanju mirovanja ali celične delitve. Vsak virusni vektor ima svoje prednosti in slabosti. Npr. retrovirusi so neučinkoviti pri nedeležih se celicah, kar bi celo pomenilo ciljanje na hitrodeleče se rakave celice, vendar so tudi slednje lahko v stanju mirovanja. Obratno so adenovirusi učinkoviti pri delečih in nedeležih se celicah. Ker so le-ti tudi človeški naravni patogeni, fiziološko prisotna protitelesa v organizmu zmanjšajo njihovo učinkovitost. Poksvirusi uporabljajo za cepljenje, ker so manj toksični in imajo veliko

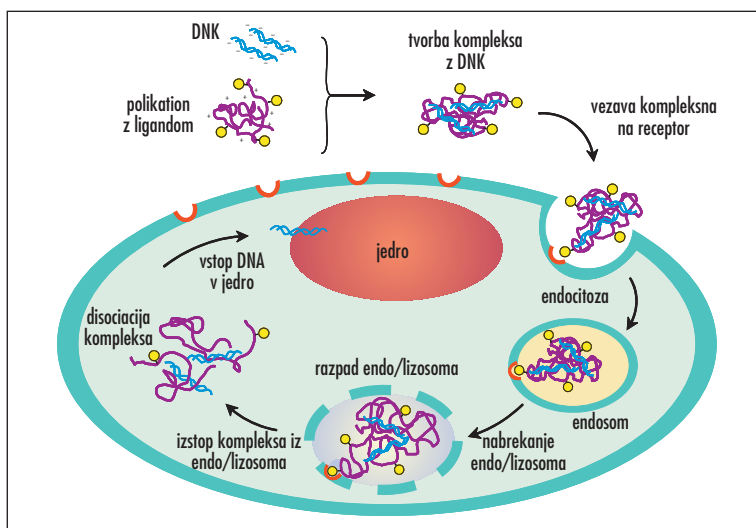
zmožnost za vnos tujega genskega materiala (3, 23, 24).

Raziskave s tovrstnimi sistemi vse bolj upadajo zaradi slabih izidov nekaterih kliničnih testiranj. Sistemi so namreč problematični zaradi svoje varnosti, neželene virulence, mutagenoze in kancerogeneze, lahko izzovejo imunske reakcije, zahteven je izbor ustrezne celične linije za razmnoževanje virusa in s tem povezano težavno čiščenje. Zato iz omenjenih razlogov vse bolj razvijajo nevirusne vektorje (3, 25).

Nevirusni vektorji

Prednosti, ki jih imajo nevirusni vektorji pred virusnimi, so enostavnejša izdelava in prenos proizvodnje v večje merilo, večja prilagodljivost pri izdelavi in obsežnost dednega materiala, so varnejši in manj imunogeni v *in vivo* pogojih. Njihova slaba stran je manjša učinkovitost pri okuženju celic z dednim materialom (25).

Pri oblikovanju tovrstnih nevirusnih vektorjev je mogoče najti skupna izhodišča s sistemi za vnos proteinskih učinkovin v telo. Tako proteini kot geni so hidrofilni, pomembno razliko pa predstavlja struktura omenjenih spojin. Ker proteini zahtevajo za svoje delovanje nativno tridimenzionalno konformacijo, morajo ves čas izdelave ohraniti strukturo nespremenjeno. Obratno pa geni za svoje delovanje potre-



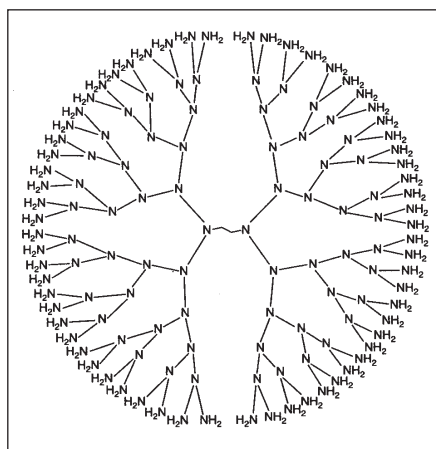
Slika 5: Vnos dednega materiala z nevirusnimi vektorji v celico: združevanje kationskega nosilca in liganda z molekulo DNA, vezava kompleksa na receptor celice, vstop kompleksa v celico – endocitoza, razpad endo/lizosoma z nabrekljivimi-endosomolitičnimi polimeri, izstop kompleksa iz vezikla in vstop molekule DNK v celično jedro.

bujejo le kemijsko celovitost fragmentov (8). Zato je možno tehnologijo izdelave sistemov za vnos proteinskih učinkovin z vidika stabilnosti prenesti tudi na tiste za vnos genov. Izbiira najustrežnejših pogojev izdelave je namreč že prilagojena za nestabilne učinkovine, bodisi proteine ali gene. Večji problem za vnos genov v celico je izbor pomožnih spojin. V ta namen so razvili ustrezne nosilce, ki omogočajo vgradnjo in zaščito DNK, jo ciljano dostavijo do celice in v celico ter jo na tarčnem mestu tudi sprostijo (slika 5). Nosilci, ki jih uporabljajo za vnos DNK v telo, imajo kationiski značaj in so bodisi polimeri, lipidi ali peptidi (3, 24, 30–33).

Polimerni nanodelci z DNK – polipeksi

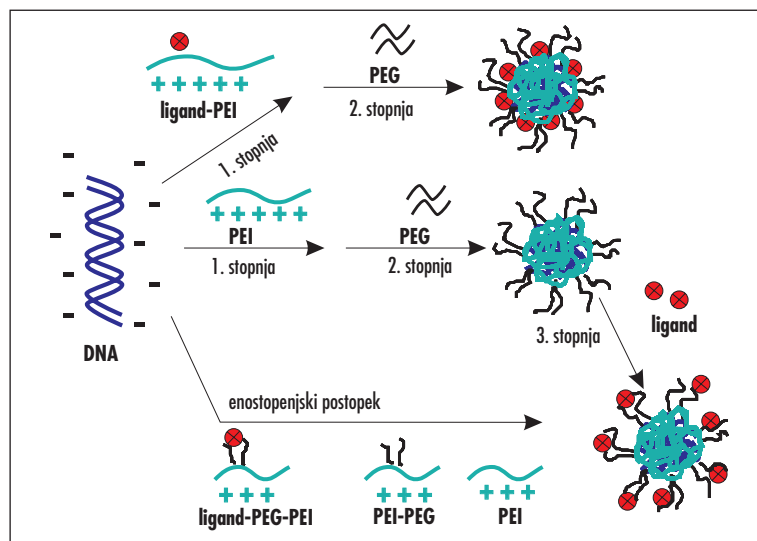
Od naravnih kationskih polimerov sta najpogostejša kolagen in hitosan, med sintezni pa so največkrat polilizin, polietilenimin, poliamidoamin in polimetakrilati, ki z DNK tvorijo komplekse, imenovane polipeksi. Polimeri so lahko linearni ali razvejani, dendrimeri, (slika 6), ki tvorijo različne komplekse z DNK.

Ugodna lastnost kationskih polimerov je velika pufrska kapaciteta, saj po vstopu v celico pride polimerni vektor v endosom ali lizosom. Zaradi nizkega pH veže polimer veliko protonov, pri čemer nabreka in destabilizira membrano lizosoma, ki posledično razpade.



Slika 6. Struktura kationskega dendrimera poliamidoamina.

Slednje omogoči sproščanje genskega materiala iz endosoma ali lizosoma, kar je ključno za ohranjanje njegove stabilnosti v neugodnem okolju in prenos v citoplazmo ter nadalje v celično jedro. Drugi način, ki vektorju omogoča destabilizacijo lizosomskih in endosomskih membran, je vključevanje fuzogenih peptidov v polimer. S pripetjem tarčnih ligandov na polimerno ogrodje lahko vektor usmerijo do ciljnih celic, obloga iz polietilen-glikolov (PEG) pa lahko dodatno stabilizira sistem v obtoku in zmanjša možnost, da bi



Slika 7. Različne strategije tvorbe pegiliranih (PEG) kompleksov molekule DNA s kationskim polimerom polietileniminom (PEI) ter dodanim ligandom.

celice imunskega odziva prepoznale vektor (slika 7) (24, 27, 31).

Liposomi in lipidni kompleksi z DNK - lipopleksi

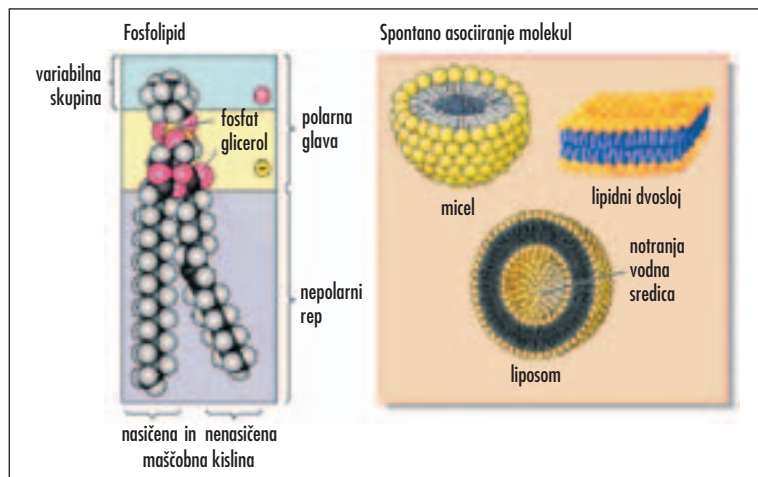
Najbolj znani lipidni nosilni sistemi so liposomi, ki so se tudi prvi pojavili v genskem zdravljenju (28, 34, 35). Razvili so nove lipidne nosilce, in sicer so anionske in nevtralne lipide, ki jih pogosto uporabljajo za izdelavo liposoma, zamenjali s kationskimi. Z vključevanjem kationskih skupin v lipide liposomov so dosegli ustrezno združevanje z molekulami DNK. Kationski lipidi so amfifilne molekule z dvema lipofilnima repoma in kationsko glavo. Pogosti kationski lipidi so DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamonijev propan), DOTMA (N-[1-(2,3-dioleil) propil]-N,N,N-trimetilamonijev klorid), ter drugi, ki lahko imajo v hidrofobnem delu holesterolski ostanek (24, 26, 32, 35). Njihova struktura je pomembna zato, ker tvorijo ustrezne lamelarne vezikle značilne za liposome (slika 8, 9).

Lipopleksi so kompleksi iz liposomov in DNK, kjer je molekula DNK ujeta med več liposomi (slika 10, A). Tvorijo jih s postopkom hidratacije suhega lipidnega filma. Zaradi slabe stabilnosti in agregacije je treba tovrstne sisteme uporabiti takoj po njihovem nastanku. Za izboljšanje vnosa genov so liposomom dodali še nevtralne kolipide (holesterol, DOPE – dioleilfosfatidiletanolamin idr.), ki vplivajo na konformacijske spremembe oz.

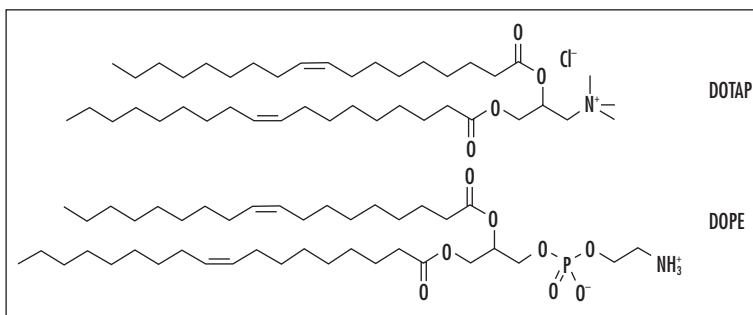
fluidnost membranskih sistemov in olajšajo vnos liposomov v celico oz. izstop DNK iz membrane lizosoma. Razvili so še novejšie sisteme, kjer je DNK vključena v notranjost liposoma (slika 10, B). Sistem izdelajo tako, da molekulo DNK najprej vežejo na pozitivno nabiti protamin in šele nato združijo v kompleks z liposomi. Zaradi preureditve liposomskih lipidov nastane kompakten sistem spontano (kompleks LPD). Tovrstni sistemi imajo večji učinek najverjetneje zaradi manjše velikosti kot navadni lipopleksi (22, 24, 32, 35, 36).

Nadalje so ugotovili, da lipidne komplekse z DNK lahko tvorijo tudi v odsotnosti membranskih lamelarnih struktur, značilnih za liposome. Tako so razvili lipidne nanodelce z DNK. Najprej naredijo mešane micelle kationskih lipidov in površinsko aktivnih spojin. Ko dodajo molekule DNK, spontano nastajajo kompleksi med lipidi in DNK, po čiščenju pa se lipidi in površinsko aktivne molekule prerazporedijo in tvorijo strukture v obliki polža, kamor se ujame molekula DNK. Dokazali so, da je vnašanje tuje DNK v celico s tovrstnimi sistemi boljše, kljub temu pa zelo pogojeno z velikostjo nastalih delcev, razmerjem nabojev med kationski lipidi in molekulami DNK, koncentracijo površinsko aktivne snovi, prisotnostjo kolipidov ter sestavo pufra, kjer nastajajo omenjeni delci (22).

458



Slika 8. Molekula fosfolipida in strukture, ki lahko nastanejo po spontanem organiziranju tovrstnih molekul.

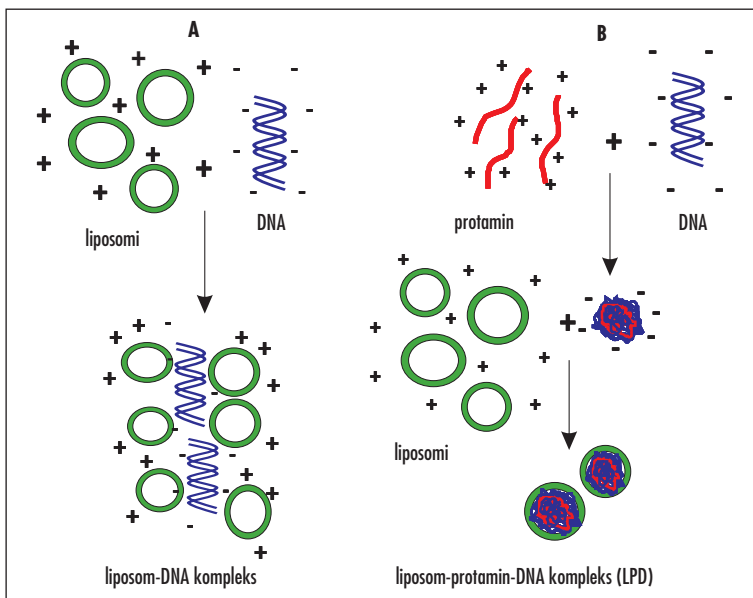


Slika 9. Kemijski strukturi kationskega in nevtralnega lipida in okrajšani imeni (26).

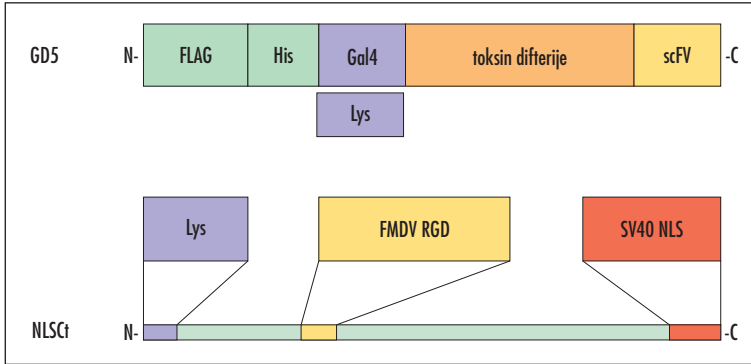
Peptidni nanodelci

S posnemanjem naravnih mehanizmov, ki jih izkoriščajo celice same, uporabljajo kot nosilce za DNK tudi kationske peptide, polilizin, protamin, histon in druge (24). Z vezavo različnih peptidov oz. ligandov na vektor so dokazali učinkovito ciljanje v različne celice ali tkiva, ki bolj ali manj specifično izražajo določene receptorje. Med naštetimi so receptorji za integrin, transferin, nevrotenzin, inzulin, manozo, laktozo, rastni faktor ter druge hormone. Tudi z monoklonskimi protitelesi ali določenimi fragmenti protiteles lahko učinkovito usmerijo vektor do tarče (37).

Nadalje uporabljajo domene določenih parazitnih peptidov, ki imajo fuzogene lastnosti in izboljšajo vključitev vektorja v celično membrano (ali zlitje vektorja s celično membrano). Ugotovili so tudi, da pri vnosu dednega materiala v jedro sodelujejo kratke peptidne molekule (t. i. NLSs-nuclear localisation signals), ki jih prepozna regulacijski sistem za prenos genskega materiala v jedro. Proteinsko inženirstvo je odprlo novo pot ideji o sintezi takega proteina, ki bi združeval različne vektorjeve lastnosti, potrebne za vsako fazo vnosa DNK v celično jedro. Razvili so t. i. multifunkcionalne proteine; dva sta prikazana na sliki 11. Proteini so kombinirani tako, da imajo domeno s kationskim



Slika 10. Primerjava različnih komplesov molekule DNK s kationskimi liposomi. A: tvorba lipopleksa, kjer je DNK ujeta med kationskimi liposomi. B: predhodno združevanje molekule DNK s kationskim protaminom in naknadno vgrajevanje v liposome (kompleks LPD).



Slika 11. Multifunkcionalna proteina GD5 in NLSCt kot vektorja za vnos genskega materiala v celico.

značajem za učinkovito vezanje DNK (pri GD5: Gal4 in Lys; pri NLSCt: Lys), domeno za ciljanje do tarčnih celic (pri GD5: fragment protitelesa scFV; pri NLSCt: ligand za receptor-integrin: FMDV RGD fragment) ter določeno domeno za vstop v celico oz. izstop iz lizosoma (pri GD5: fuzogeni peptid toksina difterije); ali prenos v jedro (pri NLSCt: SV40 NLSs) (37).

Hibridni vektorji

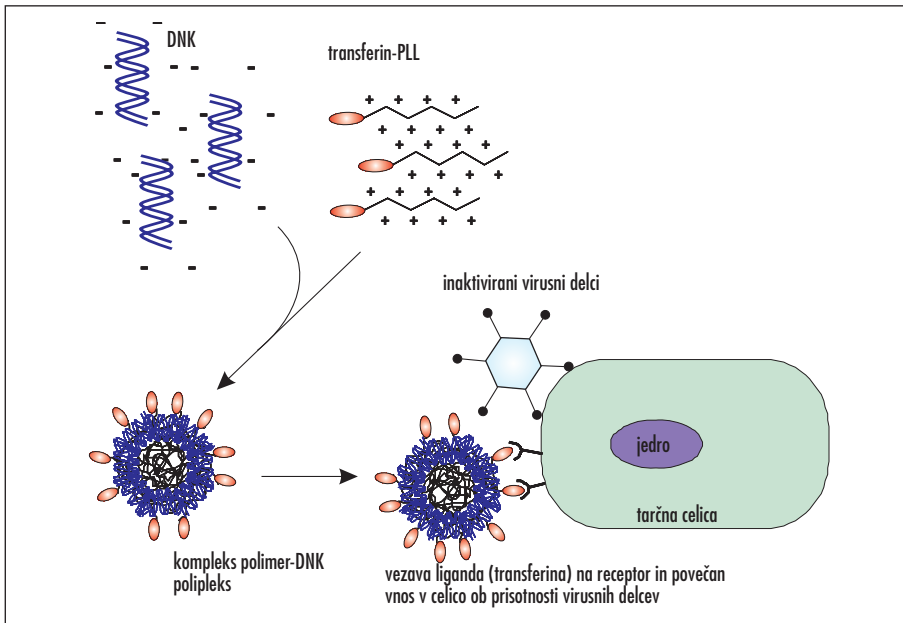
Hibridni vektorji so kombinacija nevirusnih vektorjev in določenih virusnih komponent. Sled-

nje so dodane zato, da bolje posnemajo lastnosti virusov, ki omogočajo učinkovitejšo transfekcijo kot nevirusni vektorji (slika 12) (25).

Vnos terapevtskih genov z ex vivo spremenjenimi celicami

Presajanje tkiv je že dolgo znana strategija nadomeščanja ali popravljanja bioloških nepravilnosti v organizmu (transfuzija krvi, presaditev kostnega mozga idr.). Gensko inženirstvo in celična biologija sta odprli možnost vnosa terapevtskega gena v odvzete celice in

460



Slika 12. Tvorba kompleksa med molekulo DNK in transferin-poliilizinom (PLL). Transferin omogoča vezavo na receptor tarčne celice, dodani inaktivirani virusni delci pa olajšajo vstop v celico.

njihovo gojenje *ex vivo*, ki jih nato ponovno vnesejo v organizem. Najustreznejše so hematopoetične in endotelijske celice, celice kostnega mozga in živčevja. Nekatere že testirajo za zdravljenje angiogeneze, Parkinsonove bolezni in aidsa (3, 8).

SKLEP

V prispevku smo predstavili najnovejše smernice na področju novih dostavnih sistemov, ki še zdaleč niso dosegli vrha svojih zmož-

nosti (38). Rezultati naših študij in drugih avtorjev kažejo, da novodobne učinkovine zahtevajo specifično izpopolnjene farmacevtske oblike in ovojnino za ciljani vnos v telo in prirejeno sproščanje. Vzporedno z razvojem biotehnologije, genskega inženiringa in nanotehnologije je treba razvijati in dograjevati tudi znanje iz farmacevtske tehnologije, edinega orodja, ki dejansko oblikuje veliko molekulo učinkovine v učinkovito in varno zdravilo. Začete raziskave kažejo, da je pomembno zlivanje izkušenj iz različnih področij.

LITERATURA

- Cleland JL, Daugherty A, Mrsny R. Emerging protein delivery methods. *Curr Opin Biotech* 2001; 12: 212-9.
- Walsh G. Pharmaceutical biotechnology products approved within European Union. *Eur J Pharm Biopharm* 2003; 55: 3-10.
- Rubanyi GM. The future of human gene therapy. *Mol Asp Med* 2001; 22: 113-42.
- Gantar M, Štrukelj B. Mehanizmi delovanja in oblikovanje biotehnoških produktov. *Farm Vest* 2000; 51: 491-8.
- Planinšek O, Srčič S. Kritične fizikalno-kemijske lastnosti peptidov in proteinov za načrtovanje farmacevtskih oblik. *Farmacevtska tehnologija na prelomu tisočletja*. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo 1998: 33-44.
- Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Rel* 2003; 90: 216-80.
- Banga AK. Delivery of protein therapeutics. *World Markets Series Business Briefing, Pharma Tech* 2003, p. 198-202.
- Whittlesey KJ, Shea LD. Delivery systems for small molecule drugs, proteins, and DNA: the neuroscience/biomaterial interface. *Exp Neurol* 2004; 190: 1-16.
- Cegnar M, Kos J, Kristl J. Cystatin incorporated in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: development and fundamental studies on preservation of its activity. *Eur J Pharm Sci* 2004; 22 (5): 357-64.
- Cegnar M, Premzl A, Zavašnik - Bergant V, et al. Poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles as a carrier system for delivering cysteine protease inhibitor cystatin into tumor cells. *Exp Cell Res* 2004; 301 (2): 223-31.
- Dai C, Wang B, Zhao H. Microencapsulation peptide and protein drugs delivery system. *Colloid Surface: Biointerface* 2005; 41: 117-20.
- Chaubal MV. Role of excipients in parenteral sustained-release formulations. *Drug Del Tech* 2003; 7.
- Packhaeuser CB, Schnieders J, Oster CG, et al. In situ forming parenteral drug delivery systems: an overview. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58: 445-55.
- Sershen S, West J. Implantable, polymeric systems for modulated drug delivery, *Adv Drug Del Rev* 2002; 54 (9): 1225-35.
- Kristl J, Zajc N, Gašperlin M. Inhalacijski aerosoli za lokalno in sistemsko dostavo učinkovin. *Med Razgl* 2001; 40 (4): 401-14.
- Kalia YN, Naik A, Garrison J, et al. Iontophoretic drug delivery. *Adv Drug Del Rev* 2004; 56: 619-58.
- European Pharmacopoeia 5th edition. Council of Europe, Strasbourg. *Ligugé: Aubin*; 2004.
- Panchagnula R, Pillai O, Nair VB, et al. Transdermal iontophoresis revisited. *Current Opin Chem Biol* 2000; 4: 468-73.
- Tierney MJ, Tamada JA, Potts RO, et al. Clinical evaluation of the GlucoWatch biographer: a continual, non-invasive glucose monitor for patients with diabetes. *Biosensor & Bioelectronics* 2001; 16: 621-9.
- Maček Lebar A, Serša G, Čemžar M, et al. Elektroporacija. *Med Razgl* 1998; 37: 339-54.
- Wang Y, Thakur R, Fan Q, et al. Transdermal iontophoresis: combination strategies to improve transdermal iontophoretic drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2005 (v tisku).
- Bally MB, Harvie P, Wong FMP, et al. Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers. *Adv Drug Del Rew* 1999; 38: 291-315.
- Pannier AK, Shea LD. Controlled release systems for DNA delivery. *Mol Ther* 2004; 10: 19-26.
- El-Anead A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J Control Rel* 2004; 94: 1-14.
- Schmidt-Wolf GD, Schmidt-Wolf GH. Non-viral and hybrid vectors in human gene therapy: an update. *Trend Mol Med* 2003; 9: 67-72.
- Ewert K, Slack NL, Ahmad A, et al. Cationic lipid-DNA complexes for gene therapy: understanding the relationship between complex structure and gene delivery pathways at the molecular level. *Curr Med Chem* 2004; 11: 133-49.

27. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Del Rev* 2004; 56 (11): 1649-59.
28. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Rev Drug Discov* 2005; 4: 145-65.
29. Spack EG, Sorgi FL. Developing non-viral DNA delivery systems for cancer and infectious disease. *Drug Discov Today* 2001; 6: 186-97.
30. Montier T, Delepine P, Pichon C, et al. Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: progress and challenges. *Trend Biotech* 2004; 22: 586-92.
31. Ogris M, Walker G, Blessing T, et al. Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes. *J Control Rel* 2003; 91: 173-81.
32. Liu F, Huang L. Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. *J Control Rel* 2002; 78: 259-66.
33. Podlogar F, Kristl J. Dendrimeri in njihova farmacevtska uporabnost v prihodnosti. *Farm Vestn* 2004; 55 (2): 197-205.
34. Kočevar N, Kristl J. Ciljana dostava učinkovin v tumorske celice z liposomi. *Farm Vestn* 2005 ; 56 (3): 202-6.
35. Abramovič Z, Kristl J. Intelligentni hidrogeli za dostavo zdravilnih učinkovin. *Farm Vestn* 2004; 55 (4): 555-63.
36. Lasic DD. Liposomes in gene therapy. In Petrarra P, Unger CL, editors. *Liposomes in gene therapy*. Boca Raton - Florida: CRC Press; 1996.
37. Aris A, Villaverde. Modular protein engineering for non-viral gene therapy. *Trend Biotech* 2004; 22: 371-7.
38. Cegnar M, Kristl J, Kos J. Nanoscale polymer carriers to deliver chemotherapeutics to tumours. *Exp Opin Biol Ther* 2005; 5 (12): 1557-69.

Prispelo 24. 5. 2005