

GENOVÁ TERAPIE: KATIONOVÉ LIPIDY PRO KONSTRUKCI NEVIRÁLNÍCH VEKTORŮ NUKLEOVÝCH KYSELIN

LUKÁŠ DRAŠAR^a a MIROSLAV LEDVINA^b

^a Ústav chemie přírodních látek, Fakulta potravinářské chemie a biochemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Ústav organické chemie a biochemie AVČR, v.v.i., Flemingovo nám. 1, 166 28 Praha 6
drasar@gmail.com

Došlo 11.2.12, přijato 13.4.12.

Klíčová slova: genová terapie, vektory, liposom, transfekce, lipoplex, kationové lipidy

Obsah

1. Úvod
2. Genová terapie
3. Liposomy
3. Kationové lipidy
 - 3.1. Hydrofóbní doména
 - 3.2. Kationová doména
 - 3.3. Větvící doména
 - 3.4. Spojka
 - 3.5. Ostatní skupiny ovlivňující vlastnosti liposomů
4. Závěr

1. Úvod

Dosažená úroveň poznatků v oblasti genomiky položila základy k výzkumu zaměřenému na využití technologie genových manipulací pro léčbu závažných onemocnění (vrozené nebo získané metabolické poruchy, nádorová, autoimunitní a infekční onemocnění) obecně nazývanou jako genová terapie. Problém, který v současnosti nejvíce limituje zavedení genové terapie do běžné klinické praxe, je nedostatečná účinnost transportu fragmentů nukleových kyselin (NK) přes buněčnou stěnu a jejich následná internalizace do buněčného jádra, tj. tzv. transfekce¹. Zásadní úlohu zde hraje proces penetrace negativně nabitého fragmentu NK přes fosfolipidovou dvojvrstvu tvořící buněčnou stěnu. Tento problém vyvolal v posledním desetiletí rozsáhlý výzkum zaměřený na vývoj nosičů (tzv. vektorů), které by byly schopny efektivně transportovat fragment NK přes buněčnou membránu. Tyto vektory musí současně zajistit ochranu NK před její enzymatickou degradací *in vivo*. S problémem efektivnosti transportu přes buněčnou membránu se rovněž setkáváme v případě nukleotidových a oligonukleotidových antineoplastik a antivirotik². Vektory NK se dělí na virové a nevirové. Ačkoliv virové vek-

tory představují v současné době nejefektivnější transfekční systém, je v současné době kladen zvýšený důraz na vývoj nevirových vektorů s ohledem k možným biologickým rizikům virových vektorů. Jako nejperspektivnější nevirové vektory se v současnosti jeví polykationové samoskladné lipidní struktury (tzv. polykationové liposomy) (cit.^{3,4}). Ty jsou tvořeny kationovým lipidem⁵ a neutrálním kolipidem (odvozeným od přírodních lipidů).

2. Genová terapie

Počátky genové terapie se datují do první poloviny 90. let 20. století. Princip genové terapie spočívá v korekci genové aktivity tím, že se zavede nový gen (např. v podobě plasmidové DNA – pDNA) do buňky. Vnitřní buněčný mechanismus použije tento fragment nukleové kyseliny k produkci specifického proteinu, který napravuje určitý patologický stav. Případně za pomoci části nukleové kyseliny (antimediátorový nukleotid nebo siRNA) dojde k utlumení aktivity nevhodného genu. Zvláštní kapitolou genové terapie je genetická vakcinace, kde se do cílové buňky (dendritické buňky nebo myocyty) zavede plasmidová DNA, která kóduje antigenní protein. Ten se prezentuje dalším buňkám imunitního systému, což následně vyvolá specifickou antigenní odpověď. Genová terapie byla již ve vybraných případech úspěšně použita, např. pro léčbu určitého typu těžké imunodeficiency, nicméně stále se jedná spíše o experimentální metodu⁶.

Převážná většina současného výzkumu se zaměřuje na získané choroby, a to zejména na ty, které mají těžký resp. letální průběh a kde zavedené léčebné postupy selhávají. Do této kategorie spadají bezesporu nádorová onemocnění, a proto výzkum v oblasti genové terapie zhoubných nádorů zaujímá čelné postavení. Dalším neméně významným faktorem je skutečnost, že je technicky mnohem jednodušší buňku s transformovaným genomem genetickou manipulací zničit, než opravit, a že ke zničení nádorové buňky stačí zpravidla krátkodobá exprese destruuujícího genu (tzv. molekulárního destruktoru nebo kladiva). K rozvoji výzkumu určitě přispívá ochota onkologických pacientů podstupovat nové experimentální terapeutické postupy⁷.

Nové poznatky získané v oblasti imunologie závažných infekčních a nádorových onemocnění umožnily aplikovat principy genové terapie do oblasti vakcinace. To odstartovalo rozsáhlý výzkum zaměřený na vývoj genetických, terapeutických a profylaktických vakcín⁸. Léčení nádorových onemocnění však zůstává nadále jedním z hlavních cílů výzkumu.

Metody pro vpravení části NK do cílových buněk se obecně dělí na metodiky využívající virové nebo nevirové vektory⁷.

Virové vektory představují v současnosti neefektivnější transfekční systém. Přenos genetického materiálu do nitra buňky je v tomto případě urychlen interakcí povrchových regulačních elementů virové částice s receptory na povrchu cílové buňky. Nicméně vzhledem k možným biologickým rizikům (zejména nepředvídatelným imunitním reakcím) je zavedení virových vektorů do běžné klinické praxe velice problematické⁹. Další komplikací je jejich náročná příprava. Viry využívané jako nosiče NK musejí být geneticky upravené tak, aby ztratily svou schopnost množit se. Mezi nejčastěji používané virové vektory patří retroviry, adenoviry, proxiviry, adeno-asociované viry a herpetické viry.

Nevirové vektory rozlišujeme podle způsobu, jakým je NK (oligonukleotid, antivirotikum) vpravována do intracelulárního prostoru, na vektory fyzikální a chemické.

Fyzikální vektory umožňují vpravení NK do intracelulárního prostoru pomocí mechanického narušení buněčné membrány. Nejčastěji používanými technikami jsou mikroinjekce, elektroporace a tzv. biobalistika¹⁰. V případě elektroporace se jedná o zvýšení prostupnosti buněčné membrány krátkými elektrickými pulzy a v případě biobalistiky je NK, navázaná na částice zlata, vstřelována do buňky pomocí tzv. genové pistole.

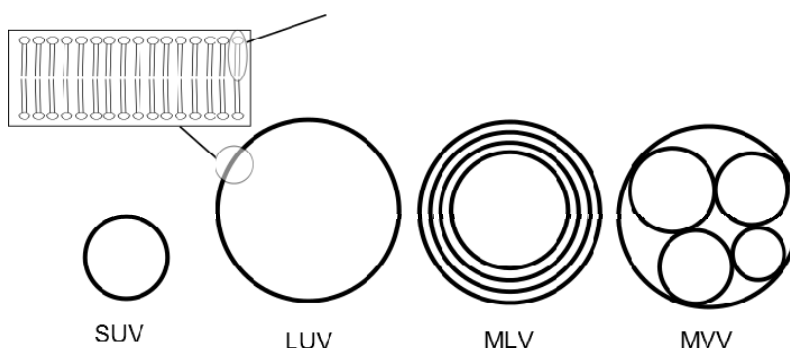
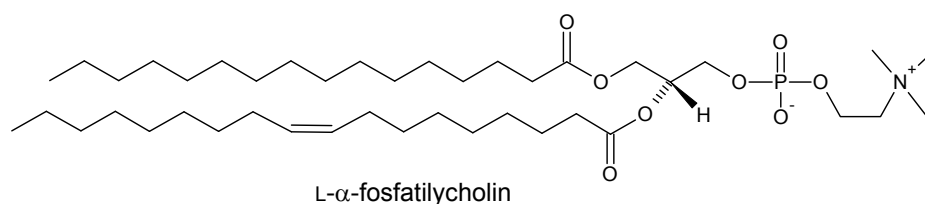
Chemické vektory jsou založeny na polykationových polymerech nebo na supramolekulárních samo se organizujících lipidních systémech (polykationových liposomech), které vytvoří s negativně nabitou NK komplex (tzv. polyplex, resp. lipoplex), schopný překonat buněčnou membránu a ve kterém je NK současně chráněna před enzymatickou degradací v krevním řečišti. Nejčastěji používanými kationovými polymery jsou DEAE-dextran, chitosan, polylysin, polyethylenimin a polyamindendrimery.

Interakci negativně nabitě NK s polykationovým liposomem dochází k její enkapsulaci za vzniku tzv. lipoplexu. Tvorba lipoplexu je spontánní velice rychlý proces, ve kterém se uplatňují především elektrostatické interakce. Mezi další faktory ovlivňující tento proces patří koncentrace nukleové kyseliny a kationových lipidů, iontová síla prostředí, pH a teplota. Lipoplex se v procesu transfekce (lipofexy) asociuje s fosfolipidovou buněčnou membránou a vstupuje do vnitrobuněčného prostoru ve formě tzv. raného endosomu. Ten se následně v cytoplasmě destabilizuje a dojde k uvolnění aktivní látky, která pak může splnit svou terapeutickou funkci.

3. Liposomy

Liposomy jsou definovány jako sférické vesikuly, které jsou vytvořeny z jedné nebo více lipidových dvojvrstev. Mezi jednotlivými dvojvrstvami je uzavřena vodná fáze. Lze je dělit podle velikosti a počtu lipidových dvojvrstev/lamel na malé unilamelární vesikuly (SUV) o průměru částic v rozmezí 15–50 nm, velké unilamelární vesikuly (LUV) o průměru částic 100 nm, multilamelární vesikuly (MLV) o průměru částic 100–200 nm a multivesikulární vesikuly (MVV), které obsahují několik vesikul o různém počtu lamel (obr. 1). Struktura a velikost liposomů je závislá na jejich chemickém složení a způsobu přípravy.

Liposomy vytvářejí amfifilní molekuly, které se skládají ze dvou částí, tj. hydrofobní a hydrofilní. V přírodě se tyto molekuly nacházejí zejména jako základní stavební složky biologických membrán tvořící lipidní dvojvrstvu. Reprezentanty těchto přirozených amfifilů jsou různé gly-



Obr. 1. Složení a dělení liposomů podle velikosti, struktury a počtu lamel

cerofosfolipidy a sfingolipidy. Jejich molekuly vesměs tvoří dvě hydrofobní domény uhlovodíkového typu a hydrofilní doména (neutrální, negativně nabitá, pozitivně nabitá nebo zwitterintová), prezentované na glycerolové větvičce doméně. Nejčastěji se vyskytujícími hydrofobními doménami jsou acylové zbytky odvozené od přirozených nasycených (lauryl, myristyl, palmitoyl a stearyl) a nenasyčených mastných kyselin (oleyl, linoleyl nebo linoleoyl), připojených na větvičce domény esterovou vazbou¹¹. Nejčastějšími hydrofilními doménami jsou fosfát připojený na větvičce domény fosfoesterovou vazbou, ethanolamin, cholin a hydroxy-aminokyseliny připojené na větvičce domény fosfodiesterovou spojkou a glykosidovou vazbou vázané sacharidy. V případě glycerofosfolipidů je větvičce domény tvořena glycerolem. Struktura sfingolipidů je založena na větvené molekule sfingosinu. Sfingosin je jediný přirozený pozitivně nabitý amfifil.

Liposomy stály na počátku cesty k moderním cíleným lékům a liposomální technologie patří k nejpropracovanějším v oblasti nanostrukturovaných nosičů léků¹². Tvorba samoskladných lipidních vesikul (liposomů) byla poprvé popsána v roce 1965 A. D. Banghamem¹³, který pozoroval, že fosfolipidy kombinované s vodou vytvářejí spontánně sférické útvary. Na rozdíl od mnoha jiných nanosystémů jsou liposomy schopny enkapsulovat současně látky různých fyzikálně-chemických vlastností, jako jsou nízkomolekulární hydrofilní nebo hydrofobní léčiva či biopolymery (proteiny, polysacharidy, nukleové kyseliny). Hydrofilní látky lze enkapsulovat do vnitřního, vodou vyplněného prostoru, hydrofobní látky je možné zabudovat do lipidní dvojvrstvy. V současnosti je v klinickém použití nebo v různých fázích klinického vývoje poměrně široká paleta liposomálních preparátů (cytostatik, antibiotik, subjednotkových a rekombinantních vakcín).

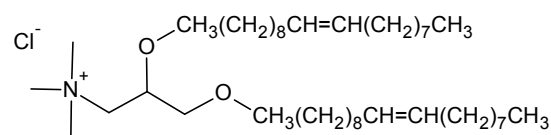
3. Kationové lipidy

V roce 1987 Flenger a spol.¹⁴ připravili první kationový transfekční lipid DOTMA, který byl úspěšně použit pro *in vitro* zavedení plasmidu do buňky (obr. 2).

Od té doby byla syntetizována řada kationových lipidů, vykazujících různě vysoké transfekční vlastnosti *in vitro* a *in vivo*. Mnohé z těchto kationových lipidů jsou již komerčně dostupné jako transfekční činidla a několik z nich připravených liposomálních formulací bylo použito v klinických testech pro léčení rakoviny a ostatních genetických poruch¹⁵.

Kationové lipidy se skládají z:

- hydrofobní domény, která prezentuje jeden nebo několik alifatických řetězců (nasycených, nenasyčených nebo fluorovaných) nebo steroidní zbytek.
- kationové domény interagující s negativně nabitou nukleovou kyselinou nejčastěji protonací jedné (monovalentní lipid) nebo více (multivalentní lipid) aminoskupin(y).
- spojky vytvářející vazbu mezi větvičce domény a hydrofobní doménou nebo větvičce domény a kationovou



Obr. 2. Lipid DOTMA

doménou anebo přímo mezi kationovou doménou a hydrofobní doménou. Většinou se jedná o amidovou, esterovou nebo etherovou vazbu.

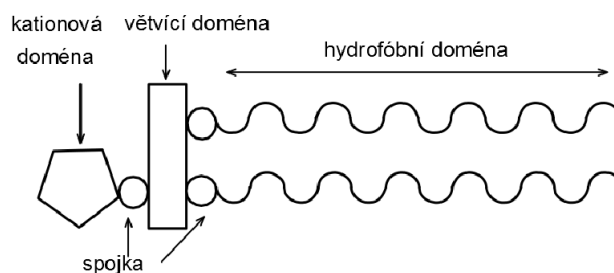
- větvičce domény, která odděluje kationovou doménou a hydrofobní doménou. Vytváří kostru, na které je kationový lipid postaven a rovněž umožňuje několikanásobnou prezentaci hydrofobního řetězce. Nejčastěji se jedná o glycerolovou větvičce domény nebo o sekundární amid (obr. 3). Větvičce domény může v některých případech chybět, kde kationická a hydrofobní doména je spojena přímo.

Následující přehled domén kationových lipidů se snaží identifikovat jejich vlastnosti ve vztahu mezi strukturou a transfekční aktivitou, které jsou společné pro rozdílné třídy kationových lipidů.

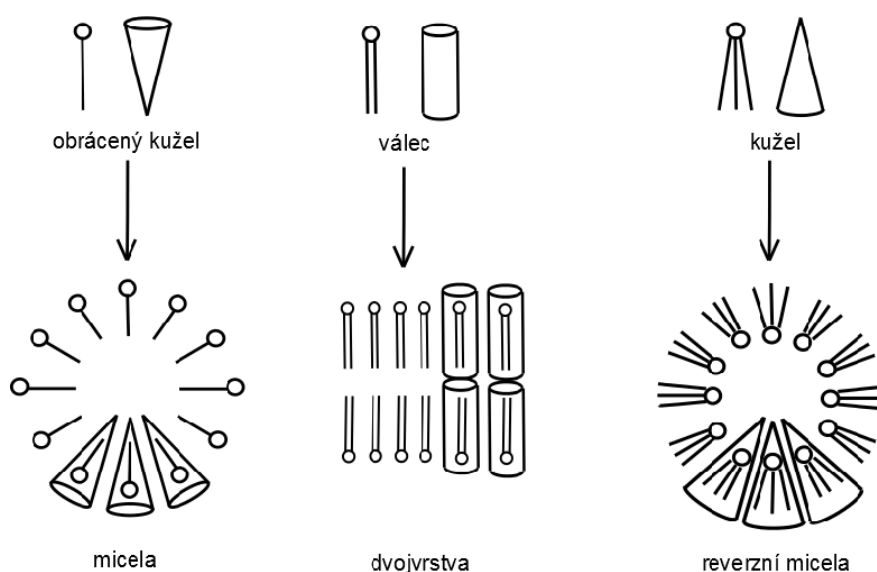
3.1. Hydrofobní doména

Hydrofobní doména je nejobemnější částí kationového lipidu, která nejvíce ovlivňuje celkový tvar molekuly, což má zásadní vliv na utváření strukturních fází v roztoku. Důležitou úlohu zde hraje vzájemný vztah geometrie hydrofobní a kationové domény. Pokud je polární konec širší než nepolární, molekuly mají zvýšenou tendenci tvořit micelární částice. Stejně tak lipidy s poměrně užšími polárními konci snáze vytvářejí reverzní micely. Obecně nejlepší transfekční aktivitu vykazují lipidy s podobnou geometrií a velikostí polární a nepolární části. Z tohoto důvodu jako hydrofobní doména je nejčastěji používána dvouřetězcová struktura, která nejsnáze vytváří lipidní dvojvrstvu a ve vodném roztoku se samy uzavírají do sférických struktur, liposomů (obr. 4).

Lipidy s jedním nebo třemi alifatickými řetězci, které vytvářejí micely, proto všeobecně transfekují hůře. Lipidy s



Obr. 3. Obecné schéma kationového lipidu



Obr. 4. Vliv geometrie kationového lipidu na utváření strukturních fází

jedním alifatickým řetězcem navíc vykazují vyšší toxicitu.

U lipidů se dvěma uhlovodíkovými řetězci bylo provedeno mnoho studií vlivu délky alifatického řetězce na jejich transfekční aktivitu. Lze s jistým zjednodušením konstatovat, že nejlepší vlastnosti vykazují délky nasycených uhlovodíků v intervalu C_{12} až C_{18} . Nejpoužívanější jsou acylové zbytky kyselin olejové, laurylové, myristové, palmitové a stearové, z důvodu jejich snadné dostupnosti a biologické kompatibility⁵.

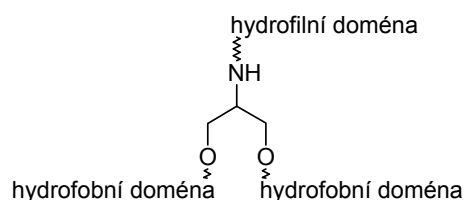
Na transfekční aktivitu má rovněž vliv stupeň nenasyčenosti alifatického řetězce, který vnáší pevnou geometrii do hydrofobní domény. Vložením nenasyčeného uhlovodíkového řetězce do polykationového lipidů se zvýší membránová fluidita vzniklého liposomu. Ta je důležitá k vytvoření vhodného lipoplexu, a předpokládá se, že zásadně ovlivňuje endozomální membránovou fúzi a uvolnění DNA z endozomu.

Taktéž geometrická izomerie dvojně vazby ovlivňuje transfekční účinnost kationových lipidů, ovšem je nutno podotknout, že obecně se předpokládá, že uspořádání *trans* je výhodnější.

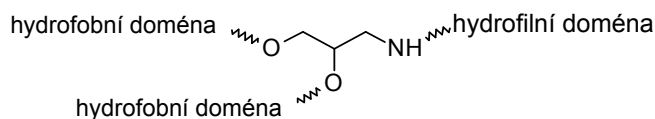
Celkově lepší transfekční účinnost vykazují kationové lipidy obsahující nenasyčené alifatické řetězce. Jistou nevýhodou je jejich snížená stabilita při skladování, kde může docházet k oxidaci dvojně vazby.

Dalším proměnným faktorem ovlivňujícím transfekční aktivitu kationových lipidů je asymetrie hydrofobní domény. Tu lze vytvořit použitím různých alifatických řetězců, nebo použitím asymetrické větvičky domény (obr. 5).

Ačkoliv se pro genovou transfekci používá mnoho symetrických kationových lipidů, obvykle asymetrické lipidy vykazují lepší transfekční aktivitu. Při velké asymetrii transfekční aktivita klesá. Jistou nevýhodou asymetrických

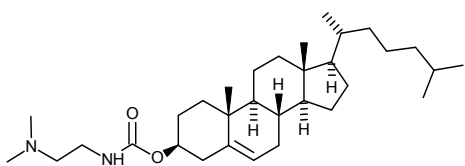


Symetrická větvička domény
symetrický glycerolového typu



Asymetrická větvička domény
glycerolového typu

Obr. 5. Symetrická a asymetrická větvička domény glycerolového typu



Obr. 6. DC-Chol

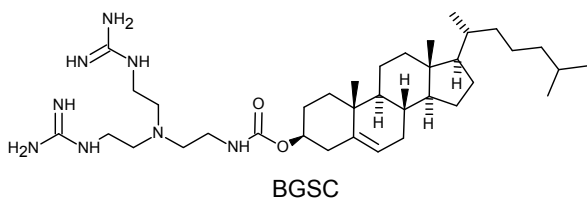
kých kationových lipidů může být jejich náročnější příprava.

Poslední významnou modifikací ovlivňující transfekční aktivitu amfifilů je zavedení fluorované části do alifatického řetězce. Fluorofilní část hydrofobní domény vytváří v liposomech vnitřní film, který zvětšuje trvanlivost liposomů, je rezistentní k detergentům a tudíž má dlouhý cirkulační čas *in vivo*.

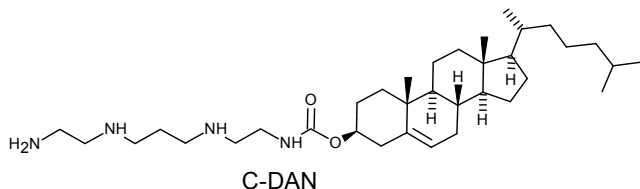
Ještě je nutno podotknout, že hydrofobní doména není prezentována pouze alifatickým řetězcem. Využíván je též steroidní zbytek, který je nejčastěji zastoupen cholesterolem. Ten je převážně použit z důvodů vysoké biokompatibility a cenové dostupnosti. Předpokládá se, že lipidy obsahující steroidní jednotku mají tendenci zpevňovat lipidní dvojvrstvu. Prvním připraveným steroidním kationovým lipidem byl DC-Chol¹⁶ (obr. 6).

Novými steroidními kationovými lipidy jsou např. BGTC nebo komerčně dostupný C-DAN, který se prodává pod značkou Avanti® Polar Lipids, Inc. (obr. 7).

Ve většině případů je použita jen jedna steroidní doména. Nicméně v několika případech bylo publikováno použití dvou steroidních zbytků. Taktéž byly úspěšně vyzkoušeny i jiné steroidní zbytky odvozené od cholestan-3 β -olu nebo kyseliny lithocholové, která je navázána amidovou vazbou na kationovou doménu.



BGSC



C-DAN

Obr. 7. Steroidní kationové lipidy

3.2. Kationová doména

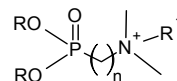
Kationová doména je velmi důležitou částí molekuly ovlivňující iontovou sílu kationového lipidu. Podle ní jsou klasifikovány všechny kationové lipidy používané pro transfekci (kvarterní amoniové lipidy, lipopolyaminy, guanidiniové lipidy, heterocyklické kationové lipidy atd.). Nejjednodušší a velice rozšířená kationiová doména v zavedených amfifilech je kvarterní amoniová sůl. Důležitý parametr k předpovědi transfekční efektivity takovýchto lipidů je sterické bránění kvarterního dusíkového atomu, které inhibuje interakci s negativně nabitou DNA s kationovým liposomem. Pokud ve fosfolipidu (obr. 8) obsahujícím trimethyl amoino skupinu nahradíme methyl za jinou skupinu, dosáhneme postupného snižování transfekční aktivity v řadě ethyl, isopropyl, allyl, kyanomethyl, methoxykarbonylmethyl.

Vyšší transfekční efektivity a nižší toxicity je možné dosáhnout záměnou dusíkového atomu za fosfor nebo dokonce arsen (tj. přechodem na fosfoniové nebo arseniové kationové domény).

Další významnou kationovou doménou jsou polyaminy, formálně odvozené od přirozených transfekčních polyaminů tj. sperminu nebo spermidinu. Lipopolyaminy patří mezi neúspěšnější třídu kationových lipidů, neboť účinně neutralizují a enkapsulují DNA. Délka polyaminu je důležitá pro transfekční aktivitu, kde delší řetězce transfekují lépe než řetězce kratší. Rostoucí délkou polyaminového řetězce ovšem stoupá počet možných protonovatelných aminoskupin v krevním řečišti, které snižují transfekční aktivitu. Polyaminová kationová doména je navázána na hydrofobní doménu amidovou vazbou přes primární aminoskupinu a nebo přes sekundární aminoskupinu sekundární amidovou vazbou, za tvorby tzv. „T-shaped“ kationových lipidů (obr. 6).

Pro transfekci genů byla taktéž použita guanidinová kationová doména vyskytující se v přírodním pojivu DNA histonu, která je schopna efektivně vázat DNA v závislosti na pH za tvorby silných paralelních vodíkových můstků s bázemi nukleových kyselin.

Je nutno poznamenat, že zde nelze vyjmenovat všechny typy kationových domén. Nicméně stojí za to ještě zmínit lipidy obsahující nasycené, nenasycené a aromatické heterocykly, např. morfolin, piperazin, imidazol, pyridin, dihydropyridin nebo nuklobáze. Jako kationová doména



R = hydrofobní řetězec

R¹ = Me, Et, iPr, allyl, CH₂CN, CH₂COOCH₃

n = 1–3

Obr. 8. Obecný vzorec lipidu s kvarterní amoniovou skupinou

byly použity aminokyseliny ornitin, lysin, arginin, histidin a tryptofan. V těchto případech se jako nejslibnější jeví lysin a arginin. Rovněž byly provedeny studie krátkých sekvencí polylysinů.

3.3. Větvící doména

Větvící doména („backbone“) vytváří kostru kationového lipidu, což především umožňuje vícenásobně prezentovat hydrofobní doménu. Jak u přírodních, tak i u syntetických amfifilů je nejrozšířenější glycerolová větvící doména, která vychází z nejčastěji se vyskytujícího motivu v biologických membránových lipidech, fosfatidylcholinu a fosfatidylethanolaminu.

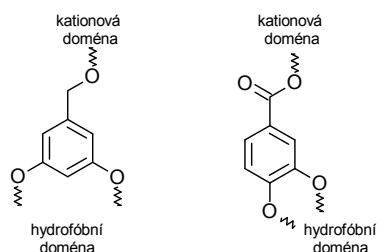
Krátké peptidy a aminokyseliny jsou rovněž používány díky vysoké strukturní variabilitě, která umožňuje vytváření vysoce větvených systémů a propracovanou syntézu¹⁷.

Jako větvící doména byly použity také substituované aromatické kruhy pro jejich strukturní univerzálnost. Příkladem mohou být kationové lipidy obsahující 3,5-dihydroxybenzylalkohol, nebo 3,4-dihydroxybenzoovou kyselinou (obr. 9).

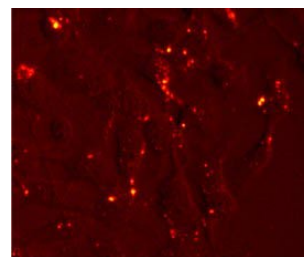
3.4. Spojka

Spojka („linker bonds“) je určitý strukturní motiv, který propojuje výše uvedené domény, jedná se například o karbamáty, karbonáty, amidové, etherové a esterové vazby. Pro lipid obsahující větvící doménu jsou typické dvě spojky. Jedna je mezi větvící doménou a kationovou doménou a druhá mezi větvící doménou a hydrofobní doménou. Vazba mezi větvící doménou a kationovou doménou určuje biodegradabilitu kationového lipidu, kde ovlivňuje odštěpení kationové domény *in vivo*.

Spojky lze klasifikovat podle jejich chemické stability a biodegradability. Karbamáty, karbonáty, amidové a esterové vazby jsou považovány za biodegradabilní a etherové vazby jsou nebiodegradabilní. Z hlediska chemické stability jsou karbamáty, amidy a ethery považovány za stabilní a estery a karbonáty jsou chemicky nestabilní. U ostatních chemických strukturních motivů to už není tak jednoznačné. Nejvíce studovaný aspekt je porovnávání esterové a etherové vazby.



Obr. 9. Lipidy s aromatickou větvící doménou



Obr. 10. Fluorescenčně značené liposomy v buňkách

Lipidy s esterovou vazbou jsou sice méně chemicky stabilní, ale na druhou stranu jsou více biokompatibilní, což vede ke snížení toxicity kationového lipidu. Další efekt esterového napojení spočívá ve zvýšení tuhosti lipidické dvojvrstvy. Bylo zjištěno, že esterově vázaný cholesterol indukce větší zakřivení dvojvrstvy než etherový protějšek. Tento efekt je pravděpodobně způsoben interakcemi dipól-dipól mezi karbonylovými vazbami esteru.

Funkci kationového lipidu ovlivňuje rovněž délka a polarita spojky, protože induktivní efekt esterové vazby snižuje bazicitu aminoskupiny kationové domény a tím i transfekční efektivitu. Tento jev je možno kompenzovat prodloužením spojky.

3.5. Ostatní skupiny ovlivňující vlastnosti liposomů

Na závěr je nutno poznamenat, že kationové lipidy mohou být modifikovány přidáním další funkční skupiny, která ovlivňuje vlastnosti liposomů, jako je třeba zavedení polyethylenglykolového motivu. Ten se váže na neutrální kolipid nebo je kovalentně navázán na kationovou doménu polykationového lipidu. Takováto modifikace vede k vytvoření „neviditelných“ liposomů¹⁸, u kterých je dramaticky navýšena doba cirkulace v krevním řečišti (navýšení cirkulačního poločasu) od několika minut do deseti hodin.

Tento přístup rovněž umožňuje připravit cílené liposomy k určitým tkáním (buňkám), a to zavedením vektorových domén, jako jsou např. glykoproteiny (transferin), sacharidové a peptidové epitopy, nebo různé protilátky⁵.

Stejný princip umožňuje přípravu fluorescenčně značených liposomů. Fluorescenční značka např. rhodamin může být zavedena postliposomální modifikací (bez kovalentní vazby na lipid), na kolipid, nebo na kationový lipid (obr. 10).

4. Závěr

Pochopení závislosti mezi strukturou kationového lipidů a jeho transfekční aktivitou a na jeho principu konstruovaných polykationových liposomů je nezbytným předpokladem ke konstrukci nových transfekčních systémů, které budou schopny efektivně konkurovat virovým vektorům.

LITERATURA

1. Miller A. D.: *ChemBioChem* 5, 53 (2004).
2. Korvasová Z., Drašar L., Mašek J., Knotigová P. T., Kulich P., Matiašovic J., Kovařík K., Bartheldyová E., Koudelka Š., Škrabalová M., Miller A. D., Holý A., Ledvina M., Turánek J.: *J. Controlled Release*, (2012); <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.031>
3. Miller A. D.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 37, 1769 (1998).
4. Donkuru M., Badea I., Wettig S., Verrall R., Elsabahy M., Foldvari M.: *Nanomedicine* 5, 1103 (2010).
5. Niculescu-Duvaz D., Heyes J., Springer C. J.: *Curr. Med. Chem.* 10, 1233 (2003).
6. Cartier N., Hacein-Bey-Abina S., Bartholomae C.C., Veres G., Schmidt M., Kutschera I., Vidaud M., Abel U., Dal-Cortivo L., Caccavelli L., Mahlaoui N., Kiermer V., Mittelstaedt D., Bellesme C., Lahlou N., Lefrere F., Blanche S., Audit M., Payen E., Leboulch P., l'Homme B., Bougneres P., Von Kalle C., Fischer A., Cavazzana-Calvo M., Aubourg P.: *Science* 326, 818 (2009).
7. Vonka V.: *Sanquis* 36, 32 (2004).
8. Saha R., Killian S., Donofrio R. S.: *Recent Pat. DNA Gene Sequences* 5, 92 (2011).
9. Miller A. D.: *Nature* 357, 455 (1992).
10. van Drunen Littel-van den Hurk, Hannaman D.: *Expert Rev. Vaccines* 9, 503 (2010).
11. Ulrich A. S.: *Biosci. Rep.* 22, 129 (2002).
12. Gregoriadis G.: *Liposome technology I, II and III*. Informa Healthcare, London 1993.
13. Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C.: *J. Mol. Biol.* 13, 238 (1965).
14. Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenz M., Northrop J. P., Ringold G. M., Danielsen M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 7413 (1987).
15. Zhi D. F., Zhang S. B., Wang B., Zhao Y. N., Yang B. L., Yu S. J.: *Bioconjugate Chem.* 21, 563 (2010).
16. Gao X., Huang L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 280 (1991).
17. Goodman M., Toniolo C., Moroder L., Felix A.: *Houben-Weyl Synthesis of Peptides and Peptidomimetics (Methods in Organic Chemistry)*. Thieme Publishing Group, New York 2001.
18. Woodle M. C.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 16, 249 (1995).

L. Drašar^a and M. Ledvina^b (^a *Department of Chemistry of Natural Compounds, Institute of Chemical Technology, Prague*, ^b *Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Gene Therapy: Cationic Lipids for Construction of Nonviral Vectors of Nucleic Acids**

Gene therapy is often used in clinical research. It is related to the delivery of nucleic acids and their components to patient by a vector. Most current vector techniques can be divided into viral and nonviral. Nonviral vectors, such as cationic liposomes, are less toxic, less immunogenic, and easier to prepare than viral vectors. Hence they are more attractive for clinical applications. This review focuses on the relations between the cationic lipid structure and its transfection activity. To understand the structure-activity relationships is of great importance for synthesis of novel cationic lipids.