

저독성의 새로운 양이온성 리포솜을 이용한 유전자의 전달

강현구 · 도경오¹ · 서영배*

경북대학교 미생물학과, ¹동국대학교 의과대학 생리학교실

Gene Delivery using a Novel Cationic Liposome with Low Toxicity. Kang, Hyungu¹, Kyung-Oh Doh¹, and Young-Bae Seu*. Department of Microbiology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, South Korea, ¹Department of Physiology, College of Medicine, Dongguk University, Kyungju, Kyungpook 780-714, South Korea – Cationic liposome has been studied as one of the most promising non-viral gene delivery systems. In this report, we describe a new synthesized cholesterolic cationic lipid (2-aminoethylcarbamate-cholesterol) and dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) improve the cellular uptake properties of antisense ODNs, as well as plasmid DNA with low toxicity. This formulation of cholesterolic cationic lipid termed Chol-E, efficiently transfects ODNs and plasmids into many cell types in the presence or absence of 10% serum in the medium.

Key words: Cationic liposome, cholesterolic cationic lipid, low toxicity transfection, DOPE

질화에 대한 유전적 원인 규명과 치료제 개발을 위해 유전자 연구에 대한 중요성이 부각되고 있다. 그에 따라 유전자 치료 연구 분야가 활발하게 진행되면서 유전자와 관련된 다양한 핵산체들이 개발되었다. 이러한 핵산체는 세포 및 조직 내에서 목적 유전자를 발현시키는 비교적 큰 plasmid DNA, 목적 유전자의 발현을 억제 및 제거하기 위한 핵산체, 발현성 RNA 등으로 나눌 수 있다[1, 2]. 이들 핵산체들은 주로 세포내로 전달되어서 유전자 발현 또는 억제를 통해서 그 기능을 발휘하게 된다[3]. 따라서 이러한 핵산체들을 세포내로 효율적으로 전달할 수 있는 핵산체 전달기술의 개발이 병행되어야 할 것이다.

질화와 관련된 유전자들의 기능을 밝히거나 그와 관련된 핵산 치료제들의 개발로 다양해진 핵산체들은 그 자체로 표적 세포 및 조직 내로 전달하기는 어렵다. 따라서 전달효율성, 안정성, *in vitro* 및 *in vivo* 상태에서의 안정성, 표적지향성, 비면역성과 생분해성 등을 개선하기 위한 연구가 활발히 진행 중에 있다[4-7]. 이상적인 핵산 전달체는 독성이 적어야 하며 선택적, 효과적으로 표적에 전달할 수 있어야 한다. 핵산체가 혈청에 의해 분해 되지 않고, 세포 및 조직 세포막을 효율적으로 통과하여 세포 내의 엔도솜 또는 라이소솜 내에서 분해 되지 않고, 핵막을 용이하게 통과할 수 있어야 한다. 유전자 치료 목적으로 동물모델에 적용되는 전달체는 주로 아데노바이러스와 레트로바이러스 등의 바이러스성 전달체가 이용되어 왔다. 유전자치료를 위한 임상시험

에서 가장 많이 사용되어 온 레트로바이러스 벡터는 안전성과 바이러스 생산의 어려움 등의 문제가 있어 매우 제한적이다[8]. 바이러스 벡터를 사용할 때 불활성화된 바이러스를 사용하지만 recombination competent virus (RCV)의 출현 가능성이 있어 위험성이 따르며 바이러스의 표피 단백질에 대한 면역 반응이 유발되어 재투여(반복사용)가 어려우며, 바이러스의 위험성 및 멸균 문제 등의 시설적인 면과 경제적 측면, 대량생산의 난점 등에 의해 상업화가 어려운 실정이다[9]. 반면에 비바이러스성 전달체는 생분해성이 높고, 비교적 독성이 낮으며, 비면역원성, 사용상의 간편함, 제작과 대량생산이 용이한 장점을 가지고 있지만 바이러스성 전달체보다 핵산체 전달 효율이 다소 낮은 것이 단점으로 나타남으로 유전자 검색 및 기능분석 분야와 유전자 치료를 위한 치료제 개발 분야에 있어서 핵산체를 효율적으로 전달할 수 있는 전달체의 개발은 매우 중요하다[10]. 따라서 안전한 핵산체 전달 리피드 개발이 요구되는 상황으로 본논문에서는 리피드성분으로 생체내의 세포구성물질인 콜레스테롤을 기본골격으로하여 그의 유도체를 리피드응용의 일환으로 하여 2-aminoethylcarbamate-cholesterol 합성하여 이를 중성지방과 다양한 비율로 혼합된 새로운 양이온성 리포솜을 제조하여 물리 화학적 특성을 규명하고 이를 이용한 plasmid와 oligonucleotide 유전자의 전달 효율성, 세포독성 등에 관한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

본 연구에서 디자인한 후보 양이온 리피드는 cholesterol을 기본골격으로 하여 후보 유도체를 합성하였다(Fig. 1). 먼

*Corresponding author

Tel: 82-53-950-5380, Fax: 82-53-955-5522

E-mail: ybseu@knu.ac.kr

저 2-neck round flask에 과량의 ethylenediamine ① 6.07 g (100 mmol)을 5% trifluoroacetic acid(TFA)가 포함된 methanol 200 ml에 넣고 얼음 속에서 교반하면서 아미노기 보호시약인 di-tert-butyl dicarbonate 2.18 g(10 mmol)을 50 ml methanol에 녹여 천천히 적하 투입시켰다. 6시간 후 감압 농축하고 EtOAc 200 ml로 희석한 후 50 ml NaCl 수용액으로 2회 세척하였다. MgSO₄로 건조하고 감압 농축하여 1.36 g(0.85 mmol)의 두 아미노기 중 한쪽만이 보호기를 가진 mono-Boc 생성물 ②를 얻었다. 이구 round flask에 정제된 ② 생성물 1.36 g(0.85 mmol)을 dichloromethane 100 ml에 녹이고 cholesterol로부터 합성한 cholesterol chloroformate ③ 4.49 g(10 mmol)을 dichloromethane 30 ml에 녹여 천천히 적하하였다. 교반 3시간 후 감압 농축을 거쳐 EtOAc 200 ml로 희석한 후 50 ml NaCl 포화수용액으로 2회 세척하였다. MgSO₄로 건조 후 감압농축하고 silica gel column (Hex: EtOAc=10:1)으로 정제하여 3.40 g(5.9 mmol)의 cholesterol에 2-Boc-aminoethylcarbamate가 도입된 반응 생성물 ④를 얻었다. 아미노 그룹의 Boc보호기를 제거하기 위하여 Boc-protected 생성물 ④ 340 mg(0.59 mmol)을 dichloromethane 10 ml에 녹여 trifluoroacetic acid 3 ml로 처리하였다. 1시간 교반 후, ethanol 10 ml를 넣고 감압 농축을 거쳐 C-18 reverse-phase column에서 10% methanol이 포함된 acetonitrile로 정제하여 212 mg(0.45 mmol)의 양이온 리피드(cationic lipid)인 2-aminoethylcarbamate-cholesterol 생성물 ⑤를 정제하여 Chol-E로 명명하였다(Fig. 1). 합성된 후보 양이온성 리피드는 중성 리피드인 DOPE(Dioleoylphosphatidylethanolamine, Avanti Polar Lipids, U.S.A.)와 다양한 농도로 혼합하여 아래의 방법과 유사한 방법으로 최종의 양이온 리포솜을 제작하여 비교 실험하였다. Chloroform에 녹아 있는 5 mg/ml 농도의 Chol-E를 각각 10, 20, 30 mg씩 분주한 round flask에 5 mg/ml 농도의 DOPE 10 mg씩 혼합한 다음, evaporator로 건조시켜 리피드 필름을 형성시켰다. 건조된 지질 필름을 10 ml의 생리식염수로 용해시켜 리포솜이 형성되도록 하였다. 상기의 리포솜을 vortex mixer로 혼합한 후 sonicator로 균질화하고, 100 nm, 200 nm의 직경을 가지는 polycarbonate membrane(Pall, U.S.A.)을 이용하여 Mini-Extruder(Avanti Polar Lipids, U.S.A.)에서 10회 통과하여 리포솜의 크기를 조절하였다. FITC-합성 Oligos의 제작은 Expedite™8909(Applied biosystems, U.S.A.)를 이용하여 합성하였다. FITC-합성 oligos는 nuclease에 매우 불안정하기 때문에 5 prime에 인산화 시킨 후 T₄ DNA ligase(Takara, Japan)를 사용하여 양쪽 끝을 공유결합으로 연결시켜 사용하였다. 그 외 5' labelled PS-oligos도 실험에 사용하였다. 양이온 리피드의 핵산체 전달 효율을 측정하기 위하여 2종류의 reporter 유전자(luciferase, GFP)를 포함하는 재조합 plasmid는 pcDNA3 vector에 cloning하여 사용하였다.

핵산체 (plasmid DNA 또는 FITC-oligos)를 리피드와 다

양한 비율로 혼합하여 사용하였다. 복합체는 혈청이 없는 TOM 배지(WelGENE, Korea)에서 제작하였으며, 이때 사용한 DNA의 양은 0.3 µg/well(48-well plate)의 DNA를 다양한 양의 리피드와 혼합하였다. 혼합된 각각의 복합체는 실온에서 15분간 방치한 후 세포에 처리하여 전달 효율을 확인하였다. MCF7, A293, AGS 등세포주의 배양액은 RPMI 1640, EMEM, DMEM 등(WELGENE, Korea)이며, 배양액에 10% heat-inactivated FBS(WELGENE, Korea)와 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (WELGENE, Korea)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂세포 배양기에서 배양하였다. 실험 하루 전날 세포수가 2 × 10⁵ 개/ml이 되도록 조정된 후, well 당 5 × 10⁴ cells이 되도록 48-well 플레이트에 분주하였다. 세포수의 조정에는 TOM 배지를 사용하였다. Luciferase 활성 측정은 다음과 같이 하였다. 세포들을 PBS 완충액으로 2번 세척하고, 100 µl의 1 × CCLR(cell culture lysis reagent, 25 mM Tris-phosphate(pH 7.8), 2 mM DTT, 2 mM 1,2-diaminocyclohexane-N'N'-tetraacetic acid, 10% glycerol, 1% Triton X-100) 용액으로 용해하였다. 세포 용해액을 12,000g에서 1분간 원심분리한 후, BCA™ Protein Assay(PIERCE, U.S.A.)로 단백질 정량하여 Luciferase 활성을 측정하였다. 세포 용해액에 luciferase assay buffer (25 mM Glycylglycine pH 7.8, 15 mM Potassium Phosphate pH 7.8, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, 2 mM ATP, 1 mM DTT)를 100 µl가한 후, 20 µl의 luciferin을 첨가하였다. Luciferase 활성은 Luminometer(Berthold Detection Systems, Germany)로 10초간 측정하였다.

길이가 짧은 합성올리고(18~120 mer)의 전달은 길이가 긴 plasmid vector(3 kb 이상)의 전달과 다르다. 즉 세포주에 따라서 핵산체의 길이에 따라서 양이온 리피드의 전달 효율이 다르게 나타난다는 다수의 실험 결과들이 있다. 따라서 양이온 리피드에 의한 짧은 길이의 합성 올리고 전달 효율을 알아보기 위해 primary 세포주인 분화된 adipocytes (differentiated adipocytes) 세포주를 대상으로 실험하였다. GFP 및 FITC-oligos의 검출은 세포주를 PBS 완충액으로 2번 세척한 후, 형광 도립현미경으로 세포 내 GFP 유전자 발현 양상 및 세포 내의 FITC-oligos의 존재 여부를 관찰하였다.

리포솜(양이온 리피드)의 물리화학적 특징은 zeta potential analyzer인 ELS-8000(Japan/OtasukaElectronics)로 측정하였다. 동적광산란법(Dynamic Light Scattering)의 원리로 분산 상태의 입자 크기 및 분포도를 측정하고 레이저 도플러법(Electrophoretic Light Scattering)의 원리로 분산상태에 있는 리포솜 입자의 제타전위를 측정하였다. 제타전위는 분산계의 분산, 응집, 안정성과 입자 기능성의 제어 지표가 된다. 1 mg/ml 농도로 100 nm와 200 nm의 polycarbonate membrane을 통과하여 각각 만들어진 양이온성 리포솜 용액을 증류수에 10%로 희석한 다음 분석용 cell에 넣어 측정하

였다. 리포솜 크기는 50회 반복으로 측정하고, 제타전위는 3 회 반복으로 측정하여 평균치를 입력하였다. 추가로 안티센스 oligonucleotide와 plasmid를 각각 1 mg/ml 농도로 양이온 리피드와 섞은 후 리포솜 크기 및 제타전위를 측정하였다.

96 well plate 상에서 전달체의 농도를 2-fold dilution 방법으로 희석한 후 5×10^3 세포를 각각의 well에 주입하고 WelCount™ Cell Proliferation Assay Kit(WELGENE, Korea)를 이용하여 제공된 protocol을 세포 독성을 실험하였다. 또한 FITC-합성 올리고 및 reporter plasmid를 transfection한 후 현미경을 통해 세포의 변형이나 괴사 등을 육안으로 검사하였다.

결과 및 고찰

양이온성 리피드를 세단계의 합성을 통하여 cholesterol chloroformate로부터 85%의 수율로 2-aminoethylcarbamate-cholesterol, Chol-E를 합성하였다(Fig. 1). Cholesterol chloroformate는 cholesterol을 다양한 amine group과 결합이 용이하도록 반응성이 좋아 여러가지 유도체를 합성하는데 유용하다. 합성 및 정제 과정을 거친 최종의 양이온 리피드들을 확인하기 위하여 다양한 분석법(MALDI-TOF, FAB-MASS, GC-MASS, NMR)을 통해 알아보았다.

¹H-NMR (Chol-E) δ: 0.69 (3H, s, CH₃-18), 0.86-0.89 (6H, d, CH₃, 26-27), 0.91-0.94 (3H, d, CH₃-21), 1.03 (3H, s, CH₃-19), 1.11-1.15 (2H, s, NH₂), 2.78-2.81 (2H, t, CH₂NH₂), 3.45-3.48 (2H, m, CH₂NH), 4.60-4.64 (1H, m, H-3), 5.04-5.08 (1H, m, NH), 5.37-5.40 (1H, d, H-6).

Chol-E 양이온성 리피드는 TFA salt 형태로 존재하여 리포솜을 제작시 물이나 buffer에서 이중막을 형성하도록 한다. 이때 DOPE와 같은 중성지방이 양이온성 리피드와 일정 비율로 섞어서 리포솜을 제작하면 유전자 전달을 더욱 증가시키는데 이는 리포솜의 물성을 증가시키고 세포막과 결합력을 향상시키는 것이 보고되어 있으므로 합성된 Chol-E와 DOPE를 유기용매에 녹여서 다양한 무게비로 감압건조하여

리포드 필름을 제조한다. 다시 생리식염수를 넣어 분산시킨 후 extruder를 이용하여 100 nm, 200 nm크기의 리포솜을 제작하였다. 이들 양이온 리포솜들의 크기는 핵산체 전달에 있어 매우 중요한 요소이다. 핵산체들은 양이온 리포솜이 너무 크면 세포막을 통과하기가 어렵고, 너무 작으면 핵산체와 결합한 후 세포막과의 결합력이 떨어져 전달효율이 저하된다. 따라서 본 연구에서는 100과 200 nm 이하의 다양한 pore 크기를 갖는 extruder를 사용하여 리포솜의 크기를 균질화 하였다. 제작된 각각의 리포솜의 크기와 일정한 크기로 균질화가 되었는지를 알아본 결과로 대부분의 리포솜 크기가 200 nm 이하였다. 핵산체와 혼합했을 때 혼합체의 크기가 증가된 것으로 보아 핵산체와 결합이 잘 이루어지는 것으로 나타났으며, 크기 또한 세포막을 용이하게 통과할 수 있는 크기인 것으로 확인되었다(Table 1).

기존의 리포솜은 혈청 내의 단백질과 결합하여 전달 효과에 영향을 주는 것으로 보고된 바 있다[11]. 그러나 Chol-E/DOPE리포솜은 혈청이 있어도 전달효과에 아무런 영향을 주지 않음을 확인하였으며 세포에 따라서 오히려 증가하는 양상도 보여준다. 양이온 리포솜으로 처리된 세포에서는 비교적 높은 형광 단백질이 발현되었으며, 특히 혈청이 있는 조건에서 좀 더 안정되게 형광 단백질이 발현되었다(Fig. 2). GFP 발현 비교와 함께 또 다른 reporter 유전

Table 1. Size and zeta potential of Chol-E cationic liposome.

Extrusion size (nm)	DNA type	Diameter±SD (nm) ^a	Zeta-potential±SD (mV) ^b
100	No	118± 3	16.81+1.05
200	No	187±13	21.19+1.21
100	oligonucleotide	146± 5	-43.7±0.86
100	Plasmid	223± 7	-30.7±0.86

Particle size and zeta potential of vesicles were measured by electrophoretic light scattering spectrophotometer. a. Diameter of liposome extrusion by 100, 200 nm polycarbonate membrane and its DNA complex. b. Zeta potential of liposome extrusion by 100, 200 nm polycarbonate membrane and its DNA complex.

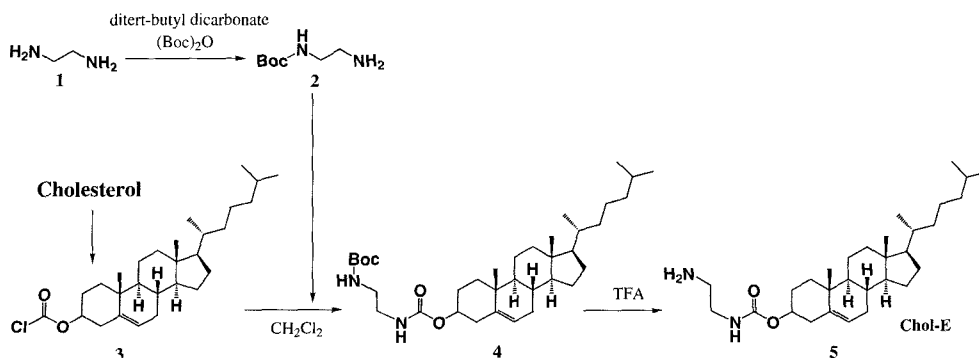


Fig. 1. Synthetic scheme of cholesterolic cationic lipid Chol-E. Cationic cholesterol was synthesized using ethylenediamine and cholesterol chloroformate.

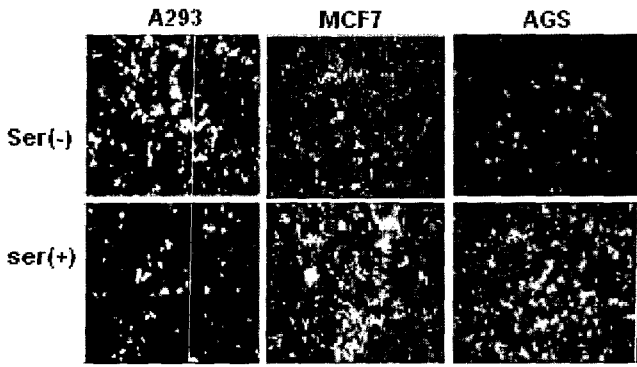


Fig. 2. Confocal microscopy of GFP expression of DNA delivered with selected formulation in the absence or presence of serum. Cells were seeded at a density of 2×10^5 cells/well in a 48 well plate usually 18–24 h before transfection. 0.30 μ g of plasmid DNA was complexed with 0.90 μ g of cationic lipids. Before transfection, growth medium was replaced to TOM medium for transfection without serum or was used directly in the presence of 10% serum. After incubation at 37 under 5% CO_2 for 5h, the medium replaced with complete growth medium in case of without serum. The transfected cells were incubated 24h and examined by fluorescence microscopy.

자인 luciferase 효소의 발현으로 핵산체 전달을 비교하여서 정상화 한 결과에서도 혈청이 있는 조건이 더욱 발현이 많이되며 중성지방으로 사용된 DOPE의 비율에 따라 세포별로 다른 양상으로 luciferase의 발현이 나타남을 알수 있다(Fig. 3).

길이가 짧은 합성올리고(18~120 mer)의 전달은 길이가 긴 plasmid vector(3 kb 이상)의 전달과 다르다[12]. 즉 세포주에 따라서 핵산체의 길이에 따라서 양이온 리포솜의 전달 효율이 다르게 나타난다는 다수의 실험 결과들이 있다. 따라서 양이온 리피드에 의한 짧은 길이의 합성 올리고 전달 효율을 알아보기 위해 primary 세포주인 분화된 adipocytes (differentiated adipocytes)와 HeLa 세포주를 대상으로 실험하였다. Pre-adipocytes를 분화시킨 후 15일된 세포에 FITC (형광화합물)가 부착된 합성 올리고를 세포에 처리한 결과로 FITC 합성 올리고가 세포의 핵 내로 전달되어 밝은 형광색

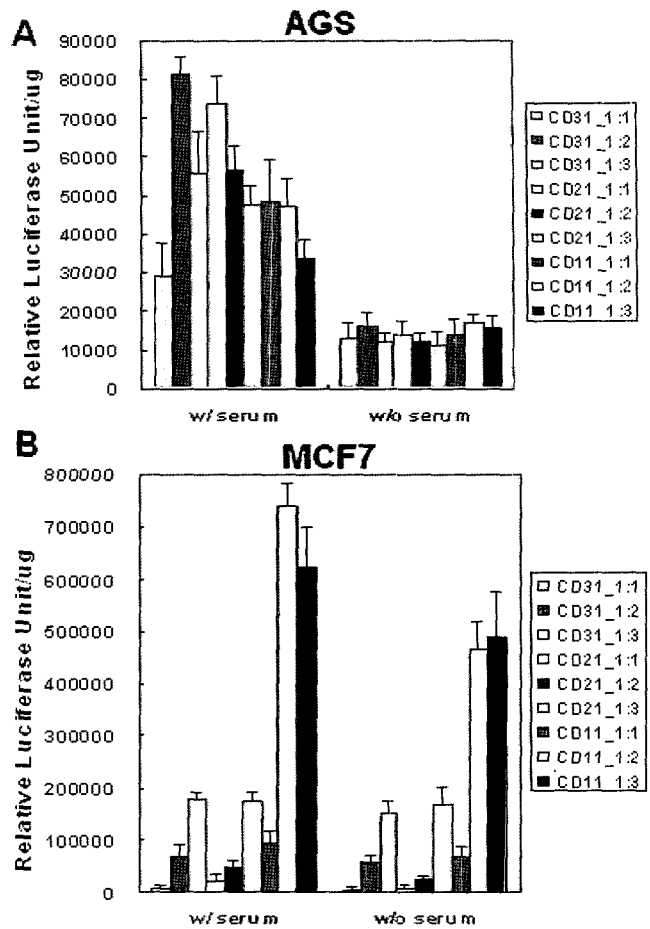


Fig. 3. Comparison of the influence of Chol-E/DOPE and DNA/liposome ratio on transfection efficiency. A: Transfection efficiency to AGS. B: Transfection efficiency to MCF7. Each cell line was incubated to 24-well plate at 6×10^5 cells per well. All cells were transfected with 0.3 μ g of a plasmid containing luciferase gene and 0.3 to 0.9 μ g Chole-E/DOPE (1:1 to 3:1) with or without replacement of TOM medium. Luciferase activity was assayed at 24 hours after transfection.

의 핵 모양을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

세포주의 독성은 96 well plate 상에서 전달체의 농도를 2-fold dilution 방법으로 희석한 후 XTT assay 방법을 이용

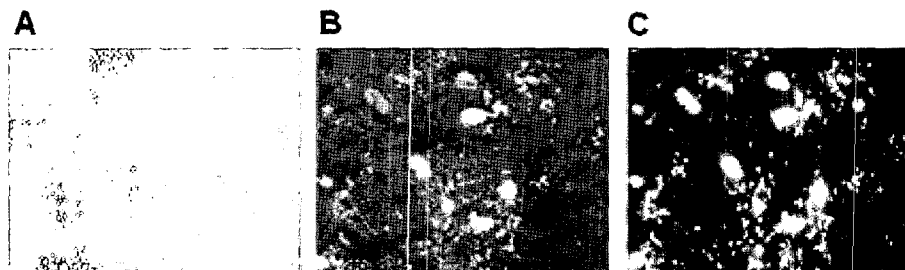


Fig. 4. Confocal microscopy of FITC-ODNs delivered with selected formulation in the presence of serum. A: Light imaging of transfected adipocytes. B: Light and fluorescence imaging of transfected adipocytes. C: Fluorescence imaging of transfected adipocytes. For transfection of FITC-ODNs to adipocytes, 2.5×10^5 primary adipocytes in 0.25 mL of DMEM supplemented with 10% FBS were incubated with 0.2 μ g ODN and 0.6 μ g Chol-E/DOPE (w:w=3:1) complex at 37°C in a 5% CO_2 incubator for 18 h.

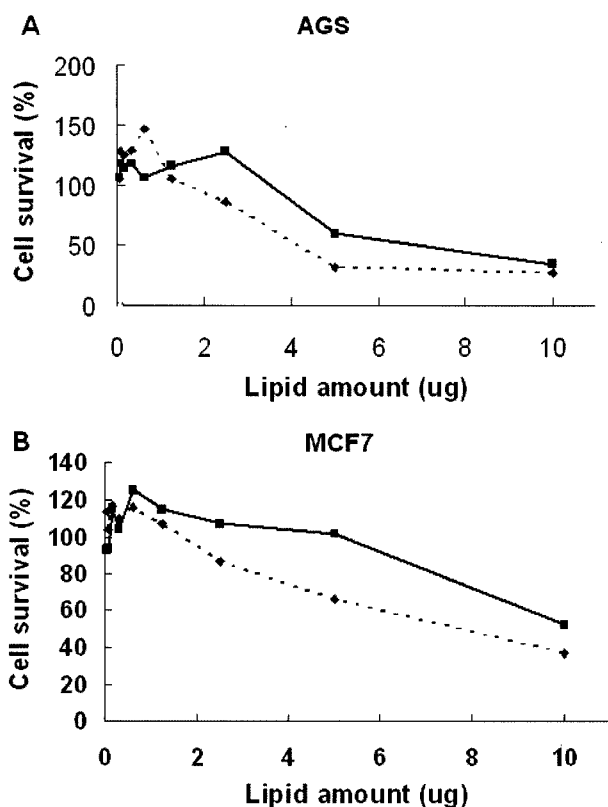


Fig. 5. Cytotoxicity of DNA/cationic liposome complexes in the presence of serum. A: Comparison of cytotoxicity to AGS cell line. B: Comparison of cytotoxicity to MCF7 cell line. Cells were cultured for 72 h, and numbers of viable cells were measured by the sodium 3-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene sulfonic acid hydrate colorimetric assay using the WelCount™ Cell Proliferation Assay Kit.

하여 세포 독성을 실험한 결과는 대조군으로 사용된 DC-cholesterol은 동물실험에도 사용되는 독성이 비교적 적은 것으로 알려진 리피드보다 독성이 비슷하거나 낮은 결과를 나타내었다(Fig. 5).

입체안정화 리포솜, 용해성 리포솜(fusogenic liposome), pH 감응성 리포솜, 온도 감응성 리포솜, 면역 리포솜 등으로 신규 양이온성 리포솜 유도체의 합성은 다양한 관점에서 이루어지고 있다. 다양한 리포솜의 개발을 통하여 추가적인 제품의 상용화가 이루어지고 현재 제품의 신뢰도가 향상되리라 본다. 특히 펩타이드가 conjugated된 양이온성 리피드 합성에 대한 연구가 지속되었으면 한다. 이러한 리피드는 동물실험을 통하여 조직별로 DNA를 전달하는 효율이 다양할 것으로 기대되기 때문이다. 또한 에멀전(emulsion) 제형에 비이온성 계면활성제를 첨가하여 생성된 안정한 양이온성 에멀전/DNA복합체는 양이온성 리포솜에 비해 transfection 효율이 증가되고 혈청이 있는 조건에서 transfection 효율이 거의 감소하지 않았다는 보고도 있어서 제형화 하는 방법도 변화를 가져보고자 한다. 궁극적으로는 인체에 대해서 효율이 높고, 독성이 적으며 특히 조직

특이적인 특징이 있는 리포솜의 합성에 목표를 두어야 할 것이다.

요 약

콜레스테롤 유래의 양이온성 리피드 2-aminoethylcarbamate-cholesterol(Chol-E) 를 합성하여 이의 리포솜을 제조하였다. 리포솜은 다양한 비율로 중성지방인 DOPE와 섞어서 만든 후 100~200 nm의 membrane으로 extrusion시켜 균일한 리포솜을 제작하여 크기 및 전위를 측정하였다. 형광 단백질 및 luciferase plasmid의 발현을 여러가지 세포에서 확인한 결과 우수한 발현양상을 보였으며 혈청이 있는 조건에서도 발현이 증가됨을 볼수 있었으며, 합성 ODNs의 전달도 adipocyte cell 에서도 잘 이루어 지는 것을 확인할 수 있었다. 임상실험에 쓰이는 저독성의 DC-chole에 비교하여도 독성이 적은 리포솜임을 알수 있으며 혈청하에서도 안정하게 유전자를 전달할수 있는 응용성이 기대 되는 새로운 리포솜을 제조하였음을 알 수 있다.

REFERENCES

1. Vasir, J. K. and V. Labhasetwar. 2006. Polymeric nanoparticles for gene delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 3: 325-344.
2. Gilmore, I. R., S. P. Fox, A. J. Hollins, and S. Akhtar. 2006. Delivery strategies for siRNA-mediated gene silencing. *Curr Drug Deliv.* 3: 147-155.
3. Khalil, I. A., K. Kogure, H. Akita, and H. Harashima. 2006. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol. Rev.* 58: 32-45.
4. Fishbein, I., S. J. Stachelek, J. M. Connolly, R. L. Wilensky, I. Alferiev, and R. J. Levy. 2005. Site specific gene delivery in the cardiovascular system. *J. Control. Release.* 109: 37-48.
5. Racz, Z. and P. Hamar. 2006. Can siRNA technology provide the tools for gene therapy of the future. *Curr. Med. Chem.* 13: 2299-2307.
6. Chon, H.S., W. Hu, and J. J. Kavanagh. 2006. Targeted therapies in gynecologic cancers. *Curr. Cancer Drug Targets.* 6: 333-363.
7. Louise, C. 2006. Nonviral vectors. *Methods Mol. Biol.* 333: 201-226.
8. Zhang, X. and W. T. Godbey. 2006. Viral vectors for gene delivery in tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006 58: 515-534.
9. Mastrobattista, E., M. A. van der Aa, W. E. Hennink, and D. J. Crommelin. 2006. Artificial viruses: a nanotechnological approach to gene delivery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 5: 115-121.
10. Simoes, S., A. Filipe, H. Faneca, M. Mano, N. Penacho, N. Duzgunes, and M. P. de Lima. 2005. Cationic liposomes for gene delivery. *Expert. Opin. Drug. Deliv.* 2: 237-254.
11. Konopka, K., N. Overlid, A. C. Nagaraj, and N. Duzgunes.

2006. Serum decreases the size of Metafectene-and Genejammer-DNA complexes but does not affect significantly their transfection activity in SCCVII murine squamous cell carcinoma cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **11**: 171-190.
12. Lindner. L. H., R. Brock, D. Arndt-Jovin, and H. Eibl. 2006.

Structural variation of cationic lipids: minimum requirement for improved oligonucleotide delivery into cells. *J. Control. Release.* **10**: 444-456.

(Received Sep. 8, 2006/Accepted Sep. 30, 2006)