

## Viry jako nanotransportéry léčiv

Simona Dostálová<sup>a,b,c</sup>, Markéta Vaculovičová<sup>b</sup>, Vojtěch Adam<sup>a,b</sup> René Kizek<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

<sup>c</sup> Ústav biomedicínského inženýrství, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Vysoké učení technické v Brně, Antonínská 1, 602 00 Brno, Česká republika

### Viral drug nanocarriers

In this study we reviewed the use of viral vectors for delivery of drugs and genes. Viruses are monouniformic and they can be easily produced in high yield. The drug encapsulation into viral capsid differs based on the viral species used. Some viruses undergo pH dependent swelling due to the change in pH or ions concentration of surrounding solution. In others, drug can intercalate into viral nucleic acid. This work was focused on often studied viruses, adenoviruses, plant viruses (CPMV, CCMV and RCNMV) or bacteriophages (MS2 or M13).

**Přijato k publikování:** 6. 3. 2014

**Klíčová slova:** doprava léčiv; enkapsulace léčiv; nanotransportéry; viry

### Úvod

V současné době se velmi rozvíjí použití nanomateriálů pro dopravu léčiv. Enkapsulací léčiva do nanotransportéru totiž dojde ke snížení jeho systémové toxicity<sup>1</sup>, je možné jej uvolňovat postupně a dopravit jej cíleně jen do požadovaného místa v těle pacienta<sup>2</sup>. Dojde tak ke zvýšení efektivity působení léčiva na nemocnou tkáň a snížení vedlejších účinků<sup>3</sup>.

Nanotransportéry je také možné použít jako platformu pro teranostiku a využít tak některých jejich vlastností pro zobrazování průběhu onemocnění a léčby, nebo umístění nádorového ložiska v těle pacienta<sup>1,2,4</sup>. Nanotransportéry pro teranostické aplikace se mohou skládat až ze 4 komponent, kterými jsou emitér signálu, terapeutický náklad, přenašeč nákladu a cílcí ligand<sup>5</sup>.

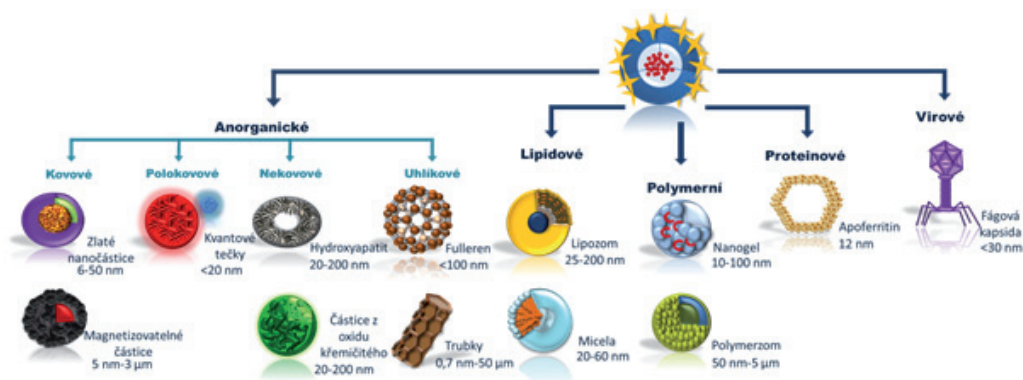
Nanočástice akumulují v nádorové tkáni více než ve zdravé kvůli EPR efektu (Enhanced Permeability and Retention Effect)<sup>6,7</sup>. Je způsoben abnormální transportní dynamikou molekul i tekutin. Nádorové buňky stimulují angiogenezi, ale nové cévy jsou často defektní, endoteliální buňky jsou špatně propojené a vznikají tak velké póry bez vrstvy hladkého svalstva. Často také postrádají lymfatické cévy<sup>8,9</sup>. Nanotransportéry mohou být sestaveny z různých materiálů, které je možné rozdělit do několika skupin (Obr. 1) – anorganické nanotransportéry, polymerní nanotransportéry, lipidové nanotransportéry a proteinové nanotransportéry, jejichž speciálním případem jsou virové kapsidy<sup>10</sup>.

### Vlastnosti virových nanotransportérů

Virové kapsidy jsou často používaným typem proteinových klecí. Virová částice je obvykle tvořena několika stovkami až tisíci proteinových molekul, které jsou sebesestavující a tvoří dutou kostru pro nukleovou kyselinu. Jejich velikost se pohybuje od 10 nm až po 1 μm a mohou mít různý tvar, nejčastěji sférický nebo ikozahedrální (tvořený 20 trojúhelníkovými plochami a 12 rohy), ale i tyčinkovitý a další. Jako nanotransportéry jsou nejvíce používány adenovirus, virus chlorotické skvrnitosti vigny, virus mozaiky vigny, virus nekrotické mozaiky jetele lučňáho, bakteriofágy MS2, M13 nebo Qβ, nebo virus tabákové mozaiky<sup>11</sup>.

Velkou výhodou virových nanotransportérů je to, že jsou geneticky naprogramovány tak, aby byly sebesestavující a tvořily morfologicky uniformní struktury o přesně definované velikosti a tvaru. Struktura mnoha virů je navíc známa na atomární úrovni a je možné je na této úrovni modifikovat funkčními skupinami mnohem snadněji než v případě syntetických nanočástic. Snadná je i jejich genetická modifikace. Během evoluce byly navíc viry vyvinuty právě pro dopravu nákladu, kterým je genetická informace, do hostitelské buňky<sup>12</sup>.

Na rozdíl od některých nanotransportérů, které jsou tělu vlastní, virové kapsidy mohou způsobovat imunitní odpověď organismu pacienta. To i přesto, že jejich hostitelem jsou nejčastěji rostlinné buňky nebo bakterie. Příkladem může být rostlinný virus CCMV, jehož přítomnost zvyšuje produkci IgG a IgM



Obr. 1: Rozdělení nanotransportérů

protilátek v myších, což bylo prokázáno imunologickými studiemi<sup>13</sup>. Tato imunogenicita může být snížena pokrytím povrchu viru polyethylenglykolem<sup>14</sup>. Tyčinkovité fágy jsou imunogenní v organismu myši<sup>15</sup> ani člověka<sup>16</sup>.

U virů dochází k rychlému vyloučení z organismu, do 24 hodin po aplikaci vyloučily sledované myši močí 57-73 % aplikovaného viru CCMV<sup>13,17</sup>. Některé viry jsou po aplikaci rovnoměrně distribuovány v celém organismu pacienta (CCMV<sup>13</sup>), jiné se koncentrují jen v některých tkáních (CPMV v játrech a slezině a díky povrchovému vimentinu v nádorových buňkách<sup>17</sup>).

Léčivo je ve virových kapsidách vázáno pevně, ať již díky supramolekulární chemii, kovalentní vazbě nebo elektrostatickými silami. Častá je například interkalace léčiva do nukleové kyseliny viru<sup>11</sup>. Nedochozí tak k úniku léčiva póry ve struktuře nanotransportéru, jako je tomu například v případě apoferritinu, kde se léčivo pouze volně nachází v jeho dutině<sup>18</sup>.

Purifikace funkčních virových kapsid probíhá nejčastěji centrifugací pro odstranění hostitelských buněk a následnou ultracentrifugací v sacharózovém gradientu<sup>19</sup>. Nevyžaduje tedy složité separační metody jako některé jiné nanotransportéry. Při enkapsulaci léčiva do viru je neuzavřené léčivo odstraněno dialýzou podobně jako u jiných nanotransportérů<sup>20,21</sup>.

## Nejvíce používané viry

### Adenovirus

Adenovirus je savčí DNA virus z rodiny *Adenoviridae*. Lidské hostitele má 6 druhů adenovirů (označují se jako A-F a rozdělují se do sérotypů), které se odlišují podílem cytozinů a guaninů v molekule DNA a

schopností aglutinovat červené krvinky<sup>22</sup>. Kapsida adenovirů je neobalená, má ikozahedrální tvar a průměr 70-90 nm. Stěny ikozahedronu jsou tvořeny 12 kopiemi trimerů proteinu a každý vrchol je tvořen pentamery proteinu spojenými s trimery vláknitého proteinu<sup>22</sup>. Obsahuje 13 strukturních proteinů, které se podílejí na infekci a umožňují vstup viru do hostitelských buněk i jeho rozmnožování. Indukují také imunitní systém<sup>23</sup>. Kapsida slouží jako ochrana adenovirálního genomu před vnějšími podmínkami v hostiteli a způsobuje jeho infektivitu<sup>24</sup>. Genom je dlouhý 36 kb<sup>25</sup>.

Nejčastěji jsou adenoviry, zejména adenovirus typu 5, studovány pro dopravování genů do lidských buněk. Gen je obvykle integrován do virového genomu a adenovirální infekci se dostane do požadovaných hostitelských buněk. Aby nebyly adenoviry toxické pro pacienta, je možné odstranit některé jejich geny a znemožnit tak jejich replikaci<sup>26,27</sup>. I přesto často adenoviry způsobují záněty v těle pacienta<sup>28</sup>. Do těchto vektorů je možné uzavřít i 7,5 kb cizorodé DNA<sup>22</sup>. Adenoviry byly použity pro dopravu tumor supresorových genů p53<sup>29</sup> a p16<sup>30</sup>, antisense DNA, ribozymů a protilátek<sup>31</sup>.

Prázdňá kapsida adenoviru (proteiny exprimované v bakteriálním plazmidu), jejíž průměr je za fyziologických podmínek 110 nm, se v pH 4 zvětší až na 1637 nm, a po návratu pH na fyziologickou hodnotu (7,4) se opět zmenší na 60 nm. Tímto postupem byly do kapsidy uzavřeny 20 nm nanočástice, fluorescenční značky nebo siRNA a dopraveny do HEK buněk. siRNA byly uzavřením do kapsidy ochráněny před degradací<sup>32</sup>. Pro cílenou dopravu byl povrch adenovirů modifikován malými molekulami,

proteiny nebo nanosystémy<sup>33</sup>. Kovové nanočástice na povrchu adenovirů byly použity pro fototermální terapii<sup>34</sup> a kombinovanou terapii při současně dopravě genů<sup>35</sup>.

### CCMV

Virus chlorotické skvrnitosti vigny (CCMV – cowpea chlorotic mottle virus) je rostlinný RNA virus z rodiny bromovirů 36. Z infikovaných rostlin je možné získat velké koncentrace tohoto viru (1-2 mg/g) a expresí v kvasinkách je možné produkovat proteiny CCMV kapsidy, které jsou sebestavující do prázdných částic bez genetického materiálu<sup>37</sup>.

CCMV se skládá ze 180 identických podjednotek kapsidy, které jsou uspořádány jako 20 hexamerů a 12 pentamerů, a tvoří ikozahedron o průměru 28 nm, s vnitřní dutinou o průměru 18 nm. Každý z proteinů virové kapsidy obsahuje 190 aminokyselin, jejichž N-konec je orientován směrem do nitra virové kapsidy. Na N-konci jsou převážně bazické skupiny z aminokyselin argininu a lyzinu, interagující se záporně nabitou RNA. Při zkrácení N-konce se vytvoří částice o průměru 18 nebo 22 nm, které mají tvar dvanáctistěnu<sup>36</sup>.

Struktura CCMV je dynamická, dochází u něj k reverzibilnímu jevu, kdy se za určitých podmínek (pH 7,5 nebo zvýšená iontová síla) zvětší průměr viru až o 10 % v důsledku vytvoření<sup>60</sup> 2 nm pórů ve virové kapsidě. Díky tomu může být jednoduše odstraněna virová RNA a díky kladně nabitému vnitřnímu povrchu kapsidy je možné do viru uzavřít především záporně nabitá léčiva<sup>38</sup>.

CCMV virus byl využit pro uzavření ftalocyaninu zinku, který je vhodný pro fotodynamickou terapii rakoviny. Toto záporně nabitá léčivo bylo úspěšně dopraveno do makrofágových buněk, které následně umřely po ozáření červeným světlem<sup>39</sup>. Pro dopravu kladně nabitých léčiv je možné genetickou modifikací upravit vnitřní povrch CCMV kapsidy<sup>40</sup>. Na vnější povrch CCMV byly navázány fluorescenční molekuly a peptidy přes karboxylové skupiny nebo aminoskupiny CCMV<sup>40</sup>. V kapsidě CCMV byly také mineralizací syntetizovány anorganické částice<sup>38</sup>.

### CPMV

Dalším rostlinným ssRNA virem je virus mozaiky vigny (CPMV – cowpea mosaic virus) z rodiny *Comoviridae*, který také tvoří ikozahedron. Ve vysoké koncentraci je možné jej získat z listů nakažených rostlin

(0,8-1 mg/g)<sup>41</sup>. Jeho průměr je 30 nm a obsahuje 60 asymetrických jednotek složených vždy z malé a velké podjednotky. Je stabilní v širokém rozsahu teplot (do 60 °C) a pH (3-9) i v přítomnosti některých organických rozpouštědel<sup>42</sup>. Jeho genom je rozdělen na 2 segmenty, větší RNA1 kóduje procesy potřebné pro replikaci viru, menší RNA2 kóduje kapsidové proteiny a protein sloužící k pohybu viru<sup>43</sup>. CPMV nemůže vytvořit dospělé kapsidy in vitro<sup>44</sup>.

CPMV obsahuje 60 molekul lysinu na jedné virové částici<sup>45</sup>, může ale být geneticky modifikován, aby vytvářel víc reziduí lysinu a také cysteinu<sup>46</sup>, na která mohou být navázané fluorofory, kovové komplexy nebo celé proteiny<sup>47</sup>. Do CPMV byla úspěšně uzavřena fluorescenční barviva propidium jodid nebo akridinová oranž a léčivo proflavin, které bylo dopraveno do buněk nádorů prsu, děložního čípku a střeva. Je takto možné uzavřít léčiva, která interkalují do RNA, která tak v tomto případě slouží jako houba. Vstup do buněk byl umožněn molekulami vimentinu na povrchu CPMV<sup>48</sup>. Malé molekuly jsou schopny difundovat dovnitř kapsidy, pravděpodobně mezerou mezi osami kapsidy<sup>49</sup>.

Z CPMV byla alkalickou hydrolyzou odstraněna RNA, čímž byly vytvořeny prázdné kapsidy, a na cysteinová rezidua na vnitřní stěně kapsidy byla navázána fluorescenční barviva. Životnost takto vytvořených kapsid však byla pouze 7 – 10 dní<sup>50</sup>.

### RCNMV

Často používaný je i virus nekrotické mozaiky ječtele lučního (RCNMV – red clover necrotic mosaic virus), rostlinný RNA virus patřící do rodiny *Tomoviridae*. Skládá se ze 180 identických podjednotek (37 kDa) tvořících ikozahedron s vnějším průměrem 36 nm a dutinou o průměru 17 nm. V důsledku přítomnosti divalentních kationtů změní RCNMV svoji strukturu, vytvoří póry a uvolní genomovou RNA<sup>51</sup>. V 6,5 < pH < 8 se reverzibilně zvětší průměr RCNMV z 36 nm na 46 nm<sup>52</sup>.

Do tohoto viru byly uzavřeny 10 nm zlaté nanočástice<sup>53</sup>. Infúzí do něj byla enkapsulována léčiva a jeho povrch byl konjugován s cílicími peptidy přes propojující molekuly, jako je sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SSMCC) nebo succinimidyl-[(N-maleimido-propionamido)-hexaethyleneglycol]ester (SMPEG)<sup>54</sup>.

## MS2

Z virů napadajících bakterie se jako možný nano-transportér studuje MS2 bakteriofág, jehož hlava tvoří ikozahedron o průměru 27 nm. Kapsida obsahuje 180 identických monomerů, které mohou být nezávisle exprimovány v bakteriích a jsou sebesestavující. Nachází se v ní 32 pórů, jejichž průměr je 1,8 nm. Kapsida je stabilní v širokém rozsahu pH (3-10), teploty, iontové síly i za přítomnosti organických rozpouštědel<sup>41</sup>. Genom MS2 bakteriofága je tvořen ssRNA a má délku 3569 bází<sup>55</sup>. Z infikovaných bakterií *Escherichia coli* je možné jednoduše získat miligramy tohoto viru (30 mg z 1 litru kultury)<sup>56</sup>.

Je možné jednoduše odstranit genomovou RNA fosfátovou hydrolyzou při pH 11,8 po dobu 4 hod a vytvořit tak prázdné kapsidy<sup>57</sup> nebo exprimovat kapsidový protein v bakteriích, který je sebesestavující. Vnitřní i vnější povrch prázdné kapsidy MS2 bakteriofága jde modifikovat simultánně. Vnější povrch byl modifikován řetězci polyethylenglykolu s biotinem pro připojení cílicích ligandů a do jeho kapsidy bylo uzavřeno fluorescenční barvivo, přičemž kapsida zůstala v sestaveném stavu<sup>58</sup>. Cílení je umožněno i genetickou modifikací kapsidového proteinu pro vystavení cizorodých peptidů na povrchu kapsidy, které mají až 24 aminokyselin<sup>59</sup>.

MS2 bakteriofág byl použit pro dopravu porfyrinů pro fotodynamickou terapii<sup>60</sup> a pro cílenou dopravu nanočástic, doxorubicinu, cisplatiny a proteinových toxinů do buněk lidského hepatocelulárního karcinomu<sup>61</sup>. Po uzavření siRNA do MS2 bakteriofága je siRNA chráněna před degradací a, po modifikaci vnějšího povrchu MS2 bakteriofága transferinem, je možné ji dopravit do HeLa buněk<sup>62</sup>. Podobně byly dopraveny i různé miRNA do různých buněk<sup>63</sup> nebo do živých myší<sup>64</sup>.

## M13

M13 bakteriofág je DNA virus, tvořící trubičkovité útvary o délce 880 nm a šířce 6,6 nm. Jednořetězcová DNA je obklopená 2700 kopiemi hlavního kapsidového proteinu P8, který je možné geneticky modifikovat, a 5 kopiemi 4 různých minoritních kapsidových proteinů. Konce viru je možné modifikovat cílicími peptidy. Není stabilní v nízkém pH<sup>1</sup>.

Konec M13 bakteriofága byl modifikován pro cílené dopravení ftalocyaninu zinku uzavřeného v lipozomu do buněk nádoru prsu. Lipozomy byly na stěně

bakteriofága uchyceny elektrostatickou interakcí<sup>65</sup>. Povrch M13 bakteriofága byl konjugován s folátem pro cílenou dopravu doxorubicinu do nádorů a jeho uvolnění vlivem snížení pH<sup>66</sup>.

## Závěr

Viry jsou v současné době velmi používanými nano-transportéry pro dopravu genů, DNA vakcín nebo léčiv. Viry jsou strukturně uniformní a mohou být snadno produkovány ve velkých množstvích. Jsou také biokompatibilní a jde snadno modifikovat vnější i vnitřní povrch kapsidy funkčními skupinami. Proces uzavření léčiva do virové kapsidy se liší podle zvoleného druhu viru. Některé tvoří póry, kterými může léčivo procházet, v důsledku změny pH, jiné již póry ve své struktuře obsahují a léčivo může interkalovat do nukleové kyseliny viru. V této práci byly představeny nejčastěji studované viry a uvedeny příklady jejich použití.

*Tato práce byla financována ze zdrojů CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068.*

## Literatura

1. Sumer B., Gao J. M.: *Nanomedicine*, 3, 137 (2008).
2. Svenson S.: *Molecular Pharmaceutics*, 10, 848 (2013).
3. Park K.: *Acs Nano*, 7, 7442 (2013).
4. Leonard B., *Cancer Nanotechnology: Going Small for Big Advances: Using Nanotechnology to Advance Cancer Diagnosis, Prevention and Treatment*, DIANE Publishing Company, 2009.
5. Fang C., Zhang M. Q.: *Journal of Controlled Release*, 146, 2 (2010).
6. Duncan R., Sat Y. N.: *Annals of Oncology*, 9, 39 (1998).
7. Maeda H.: *Journal of Controlled Release*, 164, 138 (2012).
8. Matsumura Y., Maeda H.: *Cancer Research*, 46, 6387 (1986).
9. Vasey P. A., Kaye S. B., Morrison R., Twelves C., Wilson P., Duncan R., Thomson A. H., Murray L. S., Hilditch T. E., Murray T., Burtles S., Fraier D., Frigerio E., Cassidy J., *Canc Res Campaign Phase I. I. I. C.: Clinical Cancer Research*, 5, 83 (1999).
10. Peer D., Karp J. M., Hong S., FaroKhazad O. C., Margalit R., Langer R.: *Nature Nanotechnology*, 2, 751 (2007).
11. Ma Y. J., Nolte R. J. M., Cornelissen J.: *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 811 (2012).
12. Steinmetz N. F.: *Molecular Pharmaceutics*, 10, 1 (2013).
13. Kaiser C. R., Flenniken M. L., Gillitzer E., Harmsen A. L., Harmsen A. G., Jutila M. A., Douglas T., Young M. J.: *International Journal of Nanomedicine*, 2, 715 (2007).
14. Raja K. S., Wang Q., Gonzalez M. J., Manchester M., Johnson J. E., Finn M. G.: *Biomacromolecules*, 4, 472 (2003).
15. Manchester M., Singh P.: *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1505 (2006).
16. Kickhoefer V. A., Garcia Y., Mikyas Y., Johansson E.,

- Zhou J. C., Raval-Fernandes S., Minoofar P., Zink J. I., Dunn B., Stewart P. L., Rome L. H.: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102, 4348 (2005).
17. Singh P., Prasuhn D., Yeh R. M., Destito G., Rae C. S., Osborn K., Finn M. G., Manchester M.: Journal of Controlled Release, 120, 41 (2007).
  18. Zhen Z. P., Tang W., Chen H. M., Lin X., Todd T., Wang G., Cowger T., Chen X. Y., Xie J.: *Acs Nano*, 7, 4830 (2013).
  19. Yang Q., Catalano C. E.: *Virology*, 305, 276 (2003).
  20. Blazkova I., Nguyen H. V., Dostalova S., Kopel P., Stanisavljevic M., Vaculovicova M., Stiborova M., Eckschlager T., Kizek R., Adam V.: *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 13391 (2013).
  21. Tmejova K., Hynek D., Kopel P., Dostalova S., Smerkova K., Stanisavljevic M., Nguyen H. V., Nejd L., Vaculovicova M., Krizkova S., Kizek R., Adam V.: *International Journal of Electrochemical Science*, 8, 12658 (2013).
  22. Douglas J. T.: *Molecular Biotechnology*, 36, 71 (2007).
  23. Russell W. C.: *Journal of General Virology*, 90, 1 (2009).
  24. Norrby E.: *Journal of General Virology*, 5, 221 (1969).
  25. Shenk T. E., *Adenoviridae: The Viruses and Their Replication*,
  26. Marienfeld U., Haack A., Thalheimer P., Schneider-Rasp S., Brackmann H. H., Poller W.: *Gene Therapy*, 6, 1101 (1999).
  27. Schaack J.: *Frontiers in Bioscience*, 10, 1146 (2005).
  28. Morsy M. A., Gu M. C., Motzel S., Zhao J., Su Q., Allen H., Franklin L., Parks R. J., Graham F. L., Kochanek S., Bett A. J., Caskey C. T.: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95, 7866 (1998).
  29. Roth J. A.: *Expert Opinion on Biological Therapy*, 6, 55 (2006).
  30. Ma J., He X., Wang W., Huang Y., Chen L., Cong W., Gu J., Hu H., Shi J., Li L., Su C.: *Digestive Diseases and Sciences*, 54, 1425 (2009).
  31. Alvarez R. D., Barnes M. N., Gomez-Navarro J., Wang M. H., Strong T. V., Arafat W., Arani R. B., Johnson M. R., Roberts B. L., Siegal G. P., Curiel D. T.: *Clinical Cancer Research*, 6, 3081 (2000).
  32. Rao V. R., Upadhyay A. K., Kompella U. B.: *Journal of Controlled Release*, 172, 341 (2013).
  33. Singh R., Kostarelos K.: *Trends in Biotechnology*, 27, 220 (2009).
  34. Zharov V. P., Kim J.-W., Curiel D. T., Everts M.: *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 1, 326 (2005).
  35. Everts M., Saini V., Leddon J. L., Kok R. J., Stoff-Khalili M., Preuss M. A., Millican C. L., Perkins G., Brown J. M., Bagaria H., Nikles D. E., Johnson D. T., Zharov V. P., Curiel D. T.: *Nano Letters*, 6, 587 (2006).
  36. Speir J. A., Munshi S., Wang G. J., Baker T. S., Johnson J. E.: *Structure*, 3, 63 (1995).
  37. Brumfield S., Willits D., Tang L., Johnson J. E., Douglas T., Young M.: *Journal of General Virology*, 85, 1049 (2004).
  38. Douglas T., Young M.: *Advanced Materials*, 11, 679 (1999).
  39. Brasch M., de la Escosura A., Ma Y. J., Uetrecht C., Heck A. J. R., Torres T., Cornelissen J.: *Journal of the American Chemical Society*, 133, 6878 (2011).
  40. Gillitzer E., Willits D., Young M., Douglas T.: *Chemical Communications*, 2390 (2002).
  41. Porta C., Spall V. E., Findlay K. C., Gergerich R. C., Farrance C. E., Lomonosoff G. P.: *Virology*, 310, 50 (2003).
  42. Singh P., Gonzalez M. J., Manchester M.: *Drug Development Research*, 67, 23 (2006).
  43. Lomonosoff G. P., Johnson J. E.: *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 55, 107 (1991).
  44. Shanks M., Lomonosoff G. P.: *Journal of General Virology*, 81, 3093 (2000).
  45. Wang Q., Kaltgrad E., Lin T. W., Johnson J. E., Finn M. G.: *Chemistry & Biology*, 9, 805 (2002).
  46. Chatterji A., Ochoa W. F., Paine M., Ratna B. R., Johnson J. E., Lin T. W.: *Chemistry & Biology*, 11, 855 (2004).
  47. Chatterji A., Ochoa W., Shamieh L., Salakian S. P., Wong S. M., Clinton G., Ghosh P., Lin T. W., Johnson J. E.: *Bioconjugate Chemistry*, 15, 807 (2004).
  48. Yildiz I., Lee K. L., Chen K., Shukla S., Steinmetz N. F.: *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 172, 568 (2013).
  49. Wang Q., Lin T. W., Tang L., Johnson J. E., Finn M. G.: *Angewandte Chemie-International Edition*, 41, 459 (2002).
  50. Ochoa W. F., Chatterji A., Lin T. W., Johnson J. E.: *Chemistry & Biology*, 13, 771 (2006).
  51. Sherman M. B., Guenther R. H., Tama F., Sit T. L., Brooks C. L., Mikhailov A. M., Orlova E. V., Baker T. S., Lommel S. A.: *Journal of Virology*, 80, 10395 (2006).
  52. Loo L., Guenther R. H., Basnayake V. R., Lommel S. A., Franzen S.: *Journal of the American Chemical Society*, 128, 4502 (2006).
  53. Loo L. N., Guenther R., Lommel S., Franzen S.: *Biophysical Journal*, 88, 232A (2005).
  54. Wang R. Q., Lockney D. M., Goshe M. B., Franzen S.: *Bioconjugate Chemistry*, 22, 1970 (2011).
  55. Fiers W., *Structure and Function of Rna Bacteriophages*, Plenum Press, 1979.
  56. Cargile B. J., McLuckey S. A., Stephenson J. L.: *Analytical Chemistry*, 73, 1277 (2001).
  57. Hooker J. M., Kovacs E. W., Francis M. B.: *Journal of the American Chemical Society*, 126, 3718 (2004).
  58. Kovacs E. W., Hooker J. M., Romanini D. W., Holder P. G., Berry K. E., Francis M. B.: *Bioconjugate Chemistry*, 18, 1140 (2007).
  59. Mastico R. A., Talbot S. J., Stockley P. G.: *Journal of General Virology*, 74, 541 (1993).
  60. Cohen B. A., Kaloyeros A. E., Bergkvist M.: *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy* Xx, 7886, (2011).
  61. Ashley C. E., Carnes E. C., Phillips G. K., Durfee P. N., Buley M. D., Lino C. A., Padilla D. P., Phillips B., Carter M. B., Willman C. L., Brinker C. J., Caldeira J. D., Chackerian B., Wharton W., Peabody D. S.: *Acs Nano*, 5, 5729 (2011).
  62. Galaway F. A., Stockley P. G.: *Molecular Pharmaceutics*, 10, 59 (2013).
  63. Pan Y., Zhang Y., Jia T. T., Zhang K., Li J. M., Wang L. N.: *Febs Journal*, 279, 1198 (2012).
  64. Pan Y., Jia T. T., Zhang Y., Zhang K., Zhang R., Li J. M., Wang L. N.: *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5957 (2012).
  65. Ngweniform P., Abbineni G., Cao B. R., Mao C. B.: *Small*, 5, 1963 (2009).
  66. Suthiwangcharoen N., Li T., Li K., Thompson P., You S. J., Wang Q.: *Nano Research*, 4, 483 (2011).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND).

Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.