

Sistemas de base nanotecnológica em oncologia: desafios e oportunidades

Sumário da lição de síntese

Coimbra | 2013

João Nuno Sereno de Almeida Moreira

Sistemas de base nanotecnológica em oncologia: desafios e oportunidades

Sumário da lição de síntese

Coimbra | 2013

Sumário pormenorizado da lição síntese apresentada para apreciação na prestação de provas para atribuição do título académico de Agregado em Ciências Farmacêuticas, especialidade de Tecnologia Farmacêutica, nos termos do Art. 5.º, alínea c, Decreto de Lei n.º 239/2007 de 19 de junho.

João Nuno Sereno de Almeida Moreira

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. Contextualização | 1 |
| 2. Sumário pormenorizado da lição de síntese..... | 7 |
| 3. Referências bibliográficas..... | 9 |
| 3.1. Referências bibliográficas recomendadas..... | 9 |
| 3.2. Referências bibliográficas complementares da coautoria do proponente | 11 |
| 3.3. Referências bibliográficas complementares de outros autores | 15 |

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A conferência intitulada *There's plenty of room at the bottom* apresentada na Sociedade Americana de Física, pelo Físico Americano e Prémio Nobel, Richard Feynman, em dezembro de 1959, marca o início da Nanotecnologia como uma nova área científica. À data, Richard Feynman preconizava a possibilidade de manipulação da matéria ao nível atômico, abrindo espaço para o desenvolvimento de circuitos mais pequenos para computador, para o desenvolvimento de microscópios com maior capacidade de resolução do que os existentes ou para a possibilidade de poder escrever a página de um livro numa superfície 25000 vezes mais pequena.

Aquilo que no final da década de 60 do século XX mais não parecia do que pura ficção científica, proferida por um cientista de renome mundial, extravasou, rapidamente, o domínio da ficção, constituindo-se uma realidade no momento presente. Na linha direta de algumas das ideias enunciadas por Richard Feynman, temos hoje ao nosso dispor o microscópio de força atômica, com um poder de resolução ao nível da nanoescala. A capacidade que hoje existe disponível de armazenar um grande volume de informação em computadores portáteis, cada vez mais pequenos, ou num simples disco amovível (*pen drive*), constituem realidades exemplificativas de algumas das ideias preconizadas por Richard Feynman. Atualmente, a Nanotecnologia poderá encontrar aplicações em áreas tão diversas como a dessalinização de água, fabrico de materiais para aplicação militar com elevada resistência ao choque ou na impressão de textos ou imagens em embalagens comerciais. A utilização da Nanotecnologia no tratamento de doenças humanas, particularmente no campo da oncologia, atingiu já uma maturidade

assinálável, tanto na perspectiva da tecnologia como do ponto de vista de mercado.

Uma das primeiras oportunidades de utilização da Nanotecnologia no tratamento das doenças humanas foi precisamente na área da quimioterapia convencional. Um dos grandes problemas associado à utilização clínica daquela classe de fármacos, reside na sua falta de especificidade tumoral. Moléculas como a doxorrubicina, a vincristina ou o paclitaxel, caracterizam-se por possuir um elevado volume de distribuição, mediante administração intravenosa. Daqui decorre, por um lado, uma extensa acumulação em tecidos sãos, sobretudo naqueles com elevada taxa de proliferação celular, caso da medula espinal, trato gastro-intestinal e folículos pilosos, e, por outro lado, uma reduzida acumulação tumoral. A falta de seletividade destes fármacos, justifica assim que os doentes oncológicos apresentem efeitos secundários como neutropenia, emese ou alopecia. Este tipo de efeitos condiciona de forma acentuada as doses daqueles fármacos suscetíveis de serem administradas e, conseqüentemente, o sucesso da terapêutica e a esperança de vida dos doentes.

O aumento da seletividade de um citostático pode ser alcançada, quer pelo aumento da dose que atinge o tumor, quer pela diminuição da dose que se acumula no tecido são ou, idealmente, pela ocorrência simultânea destes dois fatores. Neste contexto, a encapsulação de fármacos em sistemas de base nanotecnológica, como sejam os de base lipídica, com um diâmetro aproximado de 100 nm, tem-se revelado uma solução eficaz no ultrapassar de algumas das limitações associadas ao uso clínico de citostáticos, em particular, no que diz respeito à redução da extensão de manifestação dos efeitos secundários correspondentes.

O estabelecimento da correlação entre os tempos de circulação sanguínea prolongados e o aumento da acumulação em tumores sólidos de formulações lipossômicas, constitui uma das bases principais da utilização clínica de

nanopartículas *peguiladas* de base lipídica e contendo doxorubicina^{1,2}. Deste princípio decorre que, numa perspectiva mais genérica, mediante a encapsulação de um fármaco num sistema de base nanotecnológica, é possível alterar a biodistribuição e farmacocinética daquele. Estes parâmetros passam a ser função das características físico-químicas da nanotecnologia (e não do fármaco a ela associada), o que diminui a extensão de acumulação em tecidos sãos (como no cardíaco, no caso da doxorubicina) e, por conseguinte, a extensão de manifestação dos efeitos secundários. Desta maneira, é possível tornar mais segura a utilização clínica daqueles fármacos. Este é, sem dúvida, um dos princípios mais importantes estabelecidos até à data na área da Nanomedicina. Todavia, existe uma reconhecida necessidade de desenvolver estratégias que, a par de uma maior segurança, possam também proporcionar uma maior eficácia terapêutica.

O sucesso clínico de uma primeira geração de nanotecnologias, e em particular dos lipossomas *peguilados* acima descritos, decorre também, de entre outros fatores, da sua capacidade para tirar partido de algumas debilidades de tumores sólidos, como sejam, a existência de fenestrações ao nível dos vasos sanguíneos que os nutrem e a drenagem linfática em extensão reduzida.

O conhecimento atual acerca da biologia de tumores permite perceber que a sua sobrevivência e, por conseguinte, agressividade, é função da interação das células cancerígenas com outras células do microambiente tumoral, como sejam, por exemplo, as células dos vasos sanguíneos tumorais, as quais estão ativamente envolvidas no processo de proliferação tumoral e de metastização. Em particular, as células endoteliais dos vasos sanguíneos

¹ Papahadjopoulos, D., Allen, T. M., Gabizon, A., Mayhew, E., Matthey, K., Huang, S. K., Lee, K. D., Woodle, M. C., Lasic, D. D., Redemann, C., Martin, F. J. (1991). Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 11460-11464.

² Gabizon, A., Catane, R., Uziely, B., Kaufman, B., Safra, T., Cohen, R., Martin, F., Huang, A., Barenholz, Y. (1994). Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res* 54, 987-992.

constituem um excelente alvo terapêutico na medida em que, estando em contacto direto com o compartimento vascular, são de fácil acesso a qualquer terapia administrada por via sistémica, evitando-se os problemas associados à diminuta penetração intratumoral decorrente da elevada pressão intersticial existente em tumores sólidos. É igualmente de acrescentar que a sobre-expressão de recetores específicos ao nível das células endoteliais de vasos sanguíneos tumorais, como elemento diferenciador de vasos sanguíneos de tecidos sãos, oferece a oportunidade de desenvolvimento de estratégias antitumorais com crescente seletividade.

Em face do exposto, a lição *Sistemas de base nanotecnológica em oncologia: desafios e oportunidades* visa, em primeira instância, partilhar com os estudantes estratégias nanotecnológicas, de base lipídica, direcionadas para diferentes populações celulares do microambiente tumoral, e veiculando fármacos de natureza tão diversa como doxorrubicina ou ácidos nucleicos (como os silenciadores de genes). Os exemplos mencionados serão apresentados numa perspetiva de desenvolvimento de uma nova geração de nanotecnologias. Estas, mediante funcionalização com ligandos suscetíveis de interagirem com recetores sobre-expressos à superfície de células alvo, poderão aumentar os níveis de endocitose daquelas e assim conduzir ao aumento da eficácia terapêutica dos fármacos associados. Será também salientado o facto deste tipo de nanotecnologias, com base na versatilidade com que podem ser concebidas, e que proporciona uma constante melhoria em função do novo conhecimento sobre a biologia de tumores, poderem constituir uma forma eficaz de satisfazer necessidades médicas ainda sem resposta, como seja na área oncológica.

Com a análise dos exemplos apresentados, e numa perspetiva mais abrangente, procurar-se-á também mostrar aos estudantes a importância de uma atitude reflexiva e crítica permanente sobre os resultados gerados, como fator primordial para o avanço do conhecimento.

A lição, cujo sumário pormenorizado se apresenta a seguir, é uma das três palestras a proferir no âmbito do seminário sobre *Plataformas de base nanotecnológica para o transporte de agentes bioativos* da unidade curricular em Investigação e Desenvolvimento de Novos Medicamentos. No relatório da unidade curricular submetido no âmbito das presentes provas de Agregação, é proposto que a unidade curricular em Investigação e Desenvolvimento de Novos Medicamentos seja integrada no 3.º ciclo de estudos em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e, em particular, na unidade curricular de Avanços em Ciências Farmacêuticas I. No decurso da lição, procurar-se-á contextualizar os exemplos apresentados no âmbito do processo de Investigação e Desenvolvimento de Novos Medicamentos, sendo aqueles, na sua maioria, decorrentes da experiência do proponente como investigador da Faculdade de Farmácia e do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra.

Nos termos do descrito no seminário *Plataformas de base nanotecnológica para o transporte de agentes bioativos* da unidade curricular de Investigação e Desenvolvimento de Novos Medicamentos associada às presentes provas de Agregação, é proposto um conjunto de atividades de trabalho autónomo e orientação tutorial que antecede o seminário *Sistemas de base nanotecnológica em oncologia: desafios e oportunidades*. Estas atividades proporcionarão aos estudantes a aquisição dos conceitos elementares de utilização de plataformas de base nanotecnológica para o direcionamento de fármacos, em particular daquelas de base lipídica, não funcionalizadas por ligandos, e em utilização clínica. Desta forma, pretendem-se criar as condições para uma fácil compreensão da lição proposta no presente documento.

No final serão facultadas aos estudantes duas listas de referências bibliográficas - recomendada e complementar -, da coautoria do proponente e de outros autores. A primeira visa fundamentar de forma objetiva os temas tratados e assim ajudar os estudantes na preparação da avaliação a ter lugar no final da unidade curricular, independentemente de, no decurso da sua

atividade de preparação de tese de doutoramento, poderem vir a trabalhar na área científica abordada. As referências bibliográficas complementares visam facultar um suporte de informação mais detalhado e considerado de grande utilidade para os estudantes que decidam, em termos do seu projeto de doutoramento, enveredar por esta área científica.

2. SUMÁRIO PORMENORIZADO DA LIÇÃO DE SÍNTESE

- 1.** Apresentação dos objetivos da lição.
- 2.** Conceitos genéricos sobre nanotecnologia
 - 2.1. Definição
 - 2.2. Natureza dos materiais
- 3.** Nanotecnologias em uso clínico
 - 3.1. Vantagens
 - 3.2. Limitações
 - 3.3. Necessidade de maior eficácia
- 4.** Estratégias nanotecnológicas de base lipídica baseadas no direcionamento para células alvo: explicação da hipótese de trabalho
- 5.** Direcionamento de nanotecnologia de base lipídica para células cancerígenas em cancro de pequenas células do pulmão
 - 5.1. Apresentação dos pressupostos
 - 5.2. Direcionamento e atividade *in vitro*
 - 5.3. Atividade em modelo animal de cancro de pequenas células do pulmão
 - 5.4. Análise e reflexão sobre a estratégia utilizada
- 6.** Direcionamento de nanotecnologia de base lipídica para células cancerígenas e células do microambiente tumoral
 - 6.1. Apresentação dos pressupostos

- 6.2. Direcionamento e atividade *in vitro*
- 6.3. Atividade *in vivo* em modelo animal de cancro
- 6.4. Análise e reflexão sobre a estratégia utilizada

- 7. Utilização de nanotecnologias de base lipídica no direcionamento de ácidos nucleicos (moléculas silenciadoras de genes)
 - 7.1. Análise da necessidade
 - 7.2. Principais desafios
 - 7.3. Importância do direcionamento por recurso a nanotecnologias funcionalizadas com ligandos
 - 7.4. Nanosistemas em desenvolvimento clínico

- 8. Conclusão

- 9. Agradecimentos

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS RECOMENDADAS

Burgess, P., Hutt, P. B., Farokhzad, O. C., Langer, R., Minick, S., Zale, S. (2010). On firm ground: IP protection of therapeutic nanoparticles. *Nat Biotechnol* 28, 1267-1270.

Gomes-da-Silva, L. C., Fernandez, Y., Abasolo, I., Schwartz, S. J., Ramalho, J. S., Pedroso de Lima, M. C., Simões, S., Moreira, J. N. (2012a). Efficient intracellular delivery of siRNA with a safe multitargeted lipid-based nanoplatform. *Nanomedicine, aceite para publicação*.

Gomes-da-Silva, L. C., Fonseca, N. A., Moura, V., Pedroso de Lima, M. C., Simões, S., Moreira, J. N. (2012b). Lipid-based nanoparticles for siRNA delivery in cancer therapy: paradigms and challenges. *Acc Chem Res* 45, 1163-1171.

Gomes-da-Silva, L. C., Santos, A. O., Bimbo, L. M., Moura, V., Ramalho, J. S., Pedroso de Lima, M. C., Simões, S., Moreira, J. N. (2012c). Toward a siRNA-containing nanoparticle targeted to breast cancer cells and the tumor microenvironment. *Int J Pharm* 434, 9-19.

Moreira, J. N., Gaspar, R., Allen, T. M. (2001). Targeting Stealth liposomes in a murine model of human small cell lung cancer. *Biochim Biophys Acta* 1515, 167-176.

Moura, V., Lacerda, M., Figueiredo, P., Corvo, M. L., Cruz, M. E., Soares, R., de Lima, M. C., Simões, S., Moreira, J. N. (2012). Targeted and intracellular triggered delivery of therapeutics to cancer cells and the tumor microenvironment: impact on the treatment of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 133, 61-73.

3.2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES DA COAUTORIA DO PROPONENTE

Allen, T. M., Sapra, P., Moase, E., Moreira, J., Iden, D. (2002). Adventures in targeting. *J Liposome Res* 12, 5-12.

Cardoso, A., Trabulo, S., Moreira, J. N., Duzgunes, N., de Lima, M. C. (2009). Targeted lipoplexes for siRNA delivery. *Methods Enzymol* 465, 267-287.

Gomes, C. P., Gomes-da-Silva, L. C., Ramalho, J. S., Pedroso de Lima, M. C., Simões, S., Moreira, J. N. (2012). Impact of *PLK-1* silencing on endothelial cells and cancer cells of diverse histological origin. *Submetido para publicação*.

Gomes-da-Silva, L. C., Ramalho, J. S., Pedroso de Lima, M. C., Simões, S., Moreira, J. N. (2012). F3-targeted liposomes encapsulating anti-*PLK1* siRNA for the treatment of prostate cancer. *Submetido para publicação*.

Mendonça, L., Moreira, J. N., Pedroso de Lima, M. C., Simões, S. (2011). Triple targeting with a single therapeutic system, WO2011PT00005 20110303, WO2011108955.

Mendonça, L. S., Firmino, F., Moreira, J. N., Pedroso de Lima, M. C., Simões, S. (2010a). Transferrin receptor-targeted liposomes encapsulating anti-BCR-ABL siRNA or asODN for chronic myeloid leukemia treatment. *Bioconjug Chem* 21, 157-168.

- Mendonça, L. S., Moreira, J. N., de Lima, M. C., Simões, S. (2010b). Co-encapsulation of anti-BCR-ABL siRNA and imatinib mesylate in transferrin receptor-targeted sterically stabilized liposomes for chronic myeloid leukemia treatment. *Biotechnol Bioeng* 107, 884-893.
- Moreira, J. N., Gaspar, R. (2004). Antagonist G-mediated targeting and cytotoxicity of liposomal doxorubicin in NCI-H82 variant small cell lung cancer. *Braz J Med Biol Res* 37, 1185-1192.
- Moreira, J. N., Gomes-da-Silva, L., Santos, A. O., Bimbo, L. M., Pedroso de Lima, M. C., Simões, S. (2011). F3-peptide targeted lipid-based nanoparticles useful for the treatment of angiogenic-dependent diseases, WO2011PT00008 20110322, WO2011119058.
- Moreira, J. N., Hansen, C. B., Gaspar, R., Allen, T. M. (2001). A growth factor antagonist as a targeting agent for sterically stabilized liposomes in human small cell lung cancer. *Biochim Biophys Acta* 1514, 303-317.
- Moreira, J. N., Ishida, T., Gaspar, R., Allen, T. M. (2002). Use of the post-insertion technique to insert peptide ligands into pre-formed stealth liposomes with retention of binding activity and cytotoxicity. *Pharm Res* 19, 265-269.
- Moreira, J. N., Moura, V., Pedroso de Lima, M. C., Simões, S. (2008a). Targeted delivery to human diseases and disorders USPTO, 8231895.
- Moreira, J. N., Santos, A., Moura, V., Pedroso de Lima, M. C., Simoes, S. (2008b). Non-viral lipid-based nanoparticles for targeted cancer systemic gene silencing. *J Nanosci Nanotechnol* 8, 2187-2204.

- Moreira, J. N., Santos, A. O., Bimbo, L. M., Gomes da Silva, L. C., Pedroso de Lima, M. C., Simões, S. (2009). Gene silencing therapy in small cell lung cancer – which agents, targets, and delivery systems? In *Small-Cell Carcinomas: Causes, Diagnosis, and Treatment*, J.G. Maldonado, and M.K. Cervantes, eds. (New York: Nova Science Publishers, Inc.), pp. 1-51.
- Moura, V., Gomes da Silva, L. C., Fonseca, N. A., Pedroso de Lima, M. C., Simões, S., Moreira, J. N. (2011). Emerging targets and novel nanotechnology-based strategies: changing the treatment paradigm in oncology. In *Brain Cancer, Tumor Targeting and Cervical Cancer*, E.K. Salvatti, ed. (New York: Nova Science Publishers, Inc.), pp. 39-74.
- Pinto, A. C., Angelo, S., Moreira, J. N., Simões, S. (2012). Development, characterization and in vitro evaluation of single or co-loaded imatinib mesylate liposomal formulations. *J Nanosci Nanotechnol* 12, 2891-2900.
- Pinto, A. C., Moreira, J. N., Simões, S. (2011a). Combination chemotherapy in cancer: principles, evaluation and drug delivery strategies. In *Current Cancer Treatment - Novel Beyond Conventional Approaches*, Ö. Özdemir, ed. (Rijeka, Croatia: InTech), pp. 693-714.
- Pinto, A. C., Moreira, J. N., Simões, S. (2011b). Liposomal imatinib-mitoxantrone combination: formulation development and therapeutic evaluation in an animal model of prostate cancer. *Prostate* 71, 81-90.
- Santos, A., Sarmiento-Ribeiro, A. B., de Lima, M. C., Simões, S., Moreira, J. N. (2008). Simultaneous evaluation of viability and Bcl-2 in small-cell lung cancer. *Cytometry A* 73A, 1165-1172.

Santos, A. O., da Silva, L. C., Bimbo, L. M., de Lima, M. C., Simões, S.,
Moreira, J. N. (2010a). Design of peptide-targeted liposomes
containing nucleic acids. *Biochim Biophys Acta* 1798, 433-441.

Santos, A. O., Pereira, J. P., Pedroso de Lima, M. C., Simões, S., Moreira, J.
N. (2010b). In vitro modulation of Bcl-2 levels in small cell lung cancer
cells: effects on cell viability. *Braz J Med Biol Res* 43, 1001-1009.

Simões, S., Moreira, J. N., Fonseca, C., Düzgünes, N., de Lima, M. C. (2004).
On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation
times. *Adv Drug Deliv Rev* 56, 947-965.

3.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES DE OUTROS AUTORES

- Akinc, A., Querbes, W., De, S., Qin, J., Frank-Kamenetsky, M., Jayaprakash, K. N., Jayaraman, M., Rajeev, K. G., Cantley, W. L., Dorkin, J. R., Butler, J. S., Qin, L., Racie, T., Sprague, A., Fava, E., Zeigerer, A., Hope, M. J., Zerial, M., Sah, D. W., Fitzgerald, K., Tracy, M. A., Manoharan, M., Kotliansky, V., Fougerolles, A., Maier, M. A. (2010). Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Mol Ther* 18, 1357-1364.
- Allen, T. M. (2002). Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2, 750-763.
- Allen, T. M., Brandeis, E., Hansen, C. B., Kao, G. Y., Zalipsky, S. (1995). A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells [published erratum appears in *Biochim. Biophys. Acta* 1995 Dec 13;1240(2):285]. *Biochim Biophys Acta* 1237, 99-108.
- Allen, T. M., Cullis, P. R. (2004a). Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* 303, 1818-1822.
- Allen, T. M., Martin, F. J. (2004b). Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines. *Semin Oncol* 31, 5-15.
- Ambegia, E., Ansell, S., Cullis, P., Heyes, J., Palmer, L., MacLachlan, I. (2005). Stabilized plasmid-lipid particles containing PEG-

diacylglycerols exhibit extended circulation lifetimes and tumor selective gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1669, 155-163.

Barenholz, Y. (2012). Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release* 160, 117-134.

Bumcrot, D., Manoharan, M., Koteliansky, V., Sah, D. W. (2006). RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol* 2, 711-719.

Chan, S. M., Olson, J. A., Utz, P. J. (2006). Single-cell analysis of siRNA-mediated gene silencing using multiparameter flow cytometry. *Cytometry A* 69, 59-65.

Davis, M. E. (2009). The first targeted delivery of siRNA in humans via a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: from concept to clinic. *Mol Pharm* 6, 659-668.

Davis, M. E., Zuckerman, J. E., Choi, C. H., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C. A., Yen, Y., Heidel, J. D., Ribas, A. (2010). Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 464, 1067-1070.

Duncan, R., Gaspar, R. (2011). Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol Pharm* 8, 2101-2141.

Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.

- Farokhzad, O. C., Langer, R. (2009). Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano* 3, 16-20.
- Feldman, E. J., Lancet, J. E., Kolitz, J. E., Ritchie, E. K., Roboz, G. J., List, A. F., Allen, S. L., Asatiani, E., Mayer, L. D., Swenson, C., Louie, A. C. (2011). First-in-man study of CPX-351: a liposomal carrier containing cytarabine and daunorubicin in a fixed 5:1 molar ratio for the treatment of relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 29, 979-985.
- Ferrari, M. (2005). Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer* 5, 161-171.
- Gottlieb, J. J., Washenik, K., Chachoua, A., Friedman-Kien, A. (1997). Treatment of classic Kaposi's sarcoma with liposomal encapsulated doxorubicin. *Lancet* 350, 1363-1364.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hrkach, J., Von Hoff, D., Mukkaram Ali, M., Andrianova, E., Auer, J., Campbell, T., De Witt, D., Figa, M., Figueiredo, M., Horhota, A., Low, S., McDonnell, K., Peeke, E., Retnarajan, B., Sabnis, A., Schnipper, E., Song, J. J., Song, Y. H., Summa, J., Tompsett, D., Troiano, G., Van Geen Hoven, T., Wright, J., LoRusso, P., Kantoff, P. W., Bander, N. H., Sweeney, C., Farokhzad, O. C., Langer, R., Zale, S. (2012). Preclinical development and clinical translation of a PSMA-targeted docetaxel

nanoparticle with a differentiated pharmacological profile. *Sci Transl Med* 4, 128ra139.

Judge, A. D., Robbins, M., Tavakoli, I., Levi, J., Hu, L., Fronda, A., Ambegia, E., McClintock, K., MacLachlan, I. (2009). Confirming the RNAi-mediated mechanism of action of siRNA-based cancer therapeutics in mice. *J Clin Invest* 119, 661-673.

Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P. M., Radovic-Moreno, A. F., Farokhzad, O. C. (2012). Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chem Soc Rev* 41, 2971-3010.

Lim, W. S., Tardi, P. G., Dos Santos, N., Xie, X., Fan, M., Liboiron, B. D., Huang, X., Harasym, T. O., Bermudes, D., Mayer, L. D. (2010). Leukemia-selective uptake and cytotoxicity of CPX-351, a synergistic fixed-ratio cytarabine:daunorubicin formulation, in bone marrow xenografts. *Leuk Res* 34, 1214-1223.

Maeda, H., Matsumura, Y. (2011). EPR effect based drug design and clinical outlook for enhanced cancer chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev* 63, 129-130.

Matsumura, Y., Gotoh, M., Muro, K., Yamada, Y., Shirao, K., Shimada, Y., Okuwa, M., Matsumoto, S., Miyata, Y., Ohkura, H., Chin, K., Baba, S., Yamao, T., Kannami, A., Takamatsu, Y., Ito, K., Takahashi, K. (2004). Phase I and pharmacokinetic study of MCC-465, a doxorubicin (DXR) encapsulated in PEG immunoliposome, in patients with metastatic stomach cancer. *Ann Oncol* 15, 517-525.

- Mayer, L. D., Harasym, T. O., Tardi, P. G., Harasym, N. L., Shew, C. R., Johnstone, S. A., Ramsay, E. C., Bally, M. B., Janoff, A. S. (2006). Ratiometric dosing of anticancer drug combinations: controlling drug ratios after systemic administration regulates therapeutic activity in tumor-bearing mice. *Mol Cancer Ther* 5, 1854-1863.
- Montana, M., Ducros, C., Verhaeghe, P., Terme, T., Vanelle, P., Rathelot, P. (2011). Albumin-bound paclitaxel: the benefit of this new formulation in the treatment of various cancers. *J Chemother* 23, 59-66.
- Needham, D., Anyarambhatla, G., Kong, G., Dewhirst, M. W. (2000). A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: characterization and testing in a human tumor xenograft model. *Cancer Res* 60, 1197-1201.
- Nogawa, M., Yuasa, T., Kimura, S., Tanaka, M., Kuroda, J., Sato, K., Yokota, A., Segawa, H., Toda, Y., Kageyama, S., Yoshiki, T., Okada, Y., Maekawa, T. (2005). Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. *J Clin Invest* 115, 978-985.
- Papahadjopoulos, D., Allen, T. M., Gabizon, A., Mayhew, E., Matthay, K., Huang, S. K., Lee, K. D., Woodle, M. C., Lasic, D. D., Redemann, C., Martin, F. J. (1991). Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 11460-11464.
- Park, J. W., Hong, K., Kirpotin, D. B., Colbern, G., Shalaby, R., Baselga, J., Shao, Y., Nielsen, U. B., Marks, J. D., Moore, D., Papahadjopoulos, D.,

- Benz, C. C. (2002). Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clin Cancer Res* 8, 1172-1181.
- Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., Langer, R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol* 2, 751-760.
- Sapra, P., Allen, T. M. (2002). Internalizing antibodies are necessary for improved therapeutic efficacy of antibody-targeted liposomal drugs. *Cancer Res* 62, 7190-7194.
- Sapra, P., Tyagi, P., Allen, T. M. (2005). Ligand-targeted liposomes for cancer treatment. *Curr Drug Deliv* 2, 369-381.
- Semple, S. C., Akinc, A., Chen, J., Sandhu, A. P., Mui, B. L., Cho, C. K., Sah, D. W., Stebbing, D., Crosley, E. J., Yaworski, E., Hafez, I. M., Dorkin, J. R., Qin, J., Lam, K., Rajeev, K. G., Wong, K. F., Jeffs, L. B., Nechev, L., Eisenhardt, M. L., Jayaraman, M., Kazem, M., Maier, M. A., Srinivasulu, M., Weinstein, M. J., Chen, Q., Alvarez, R., Barros, S. A., De, S., Klimuk, S. K., Borland, T., Kosovrasti, V., Cantley, W. L., Tam, Y. K., Manoharan, M., Ciufolini, M. A., Tracy, M. A., de Fougères, A., MacLachlan, I., Cullis, P. R., Madden, T. D., Hope, M. J. (2010). Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol* 28, 172-176.
- Semple, S. C., Harasym, T. O., Clow, K. A., Ansell, S. M., Klimuk, S. K., Hope, M. J. (2005). Immunogenicity and rapid blood clearance of liposomes containing polyethylene glycol-lipid conjugates and nucleic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 312, 1020-1026.

Yu, M. K., Park, J., Jon, S. (2012). Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging and therapy. *Theranostics* 2, 3-44.

Zimmermann, T. S., Lee, A. C., Akinc, A., Bramlage, B., Bumcrot, D., Fedoruk, M. N., Harborth, J., Heyes, J. A., Jeffs, L. B., John, M., Judge, A. D., Lam, K., McClintock, K., Nechev, L. V., Palmer, L. R., Racie, T., Rohl, I., Seiffert, S., Shanmugam, S., Sood, V., Soutschek, J., Toudjarska, I., Wheat, A. J., Yaworski, E., Zedalis, W., Koteliansky, V., Manoharan, M., Vornlocher, H. P., MacLachlan, I. (2006). RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 441, 111-114.