مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۷۲/هفته اول فروردین ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲۲

# موانع و محدودیت‌های کلینیکی انجام Small interfering RNA delivery (siRNA delivery) بر پایه‌ی وکتورهای غیر ویروسی

رضا قویمی[۱]، دکتر معراج پورحسین[۲]

مقاله مروری

## چکیده

در سال‌های اخیر، ژن درمانی از طریق siRNA (Small interfering RNA) توجهات زیادی را معطوف خود ساخته است. این پدیده بر اساس PTGS (Post transcriptional gene silencing) استوار است. به دلیل نقایص وکتورهای ویروسی، استفاده از وکتورهای Non viral برای انتقال نوکلئیک اسید مورد توجه قرار گرفته است. درست است که وکتورهای Non viral نسبت به انواع ویروسی، میزان ترانسفکشن کمی دارند، اما Safety وکتورهای غیر ویروسی بسیار بیشتر می‌باشد. قابلیت‌های کلیدی siRNA مثل انطباق پذیری بالا، کاربرد در دوزهای کم و همه کاره بودن آن، سبب استفاده از siRNA در روش‌های انتقال ژن شده است. با این حال، دارای نقایصی مثل تحریک سیستم ایمنی و Off target silencing نیز می‌باشد. در این مقاله، بیشتر سعی بر این بود تا مشکلاتی که در سر راه انتقال siRNA به سلول وجود دارد، بررسی شود. با توجه به اطلاعاتی که در دست است، گفته می‌شود که پیشرفت هر چه بیشتر siRNA delivery می‌تواند در آینده به یک روش قابل اتکا جهت درمان بیماری‌هایی که پایه‌ی ژنتیکی دارند، مبدل گردد.

**واژگان کلیدی:** انتقال Small interfering RNA، ژن درمانی، وکتورهای غیر ویروسی

**ارجاع:** قویمی رضا، پورحسین معراج. **موانع و محدودیت‌های کلینیکی انجام Small interfering RNA delivery (siRNA delivery) بر پایه‌ی وکتورهای غیر ویروسی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۷۲): ۴۹-۳۴

## مقدمه

Nucleic acid gene therapy نوید بخش درمان بسیاری از بیماری‌های حاد و مزمن می‌باشد. این استراتژی بر پایه‌ی دو الگوی متفاوت برقرار است: الف) وارد کردن ژن هدف به صورت‌های اولیگونوکلئوتید و یا به صورت پلازمید به منظور بازیابی و یا تحریک بیان پروتئین‌های درمانی، ب) ایجاد کردن اولیگونوکلئوتیدهای آنتی‌سنس یا siRNA (Small interfering RNA) که جهت مداخله در عملکرد ژن‌های هدف و شروع فرایند Silencing می‌باشد. اگر چه وکتورهای ویروسی میزان بالایی از Transduction را دارند، اما خاصیت Immunogenicity در هنگام کاربرد آن‌ها پیشرفت و استفاده از وکتورهای ویروسی را با مشکل مواجه کرده است (۱).

در سپتامبر ۱۹۹۹ در دانشگاه Pensylvania محققان یک آزمایش ژن درمانی بر پایه‌ی آدنوویروس‌ها انجام دادند و بیمار یک پسر ۱۸ ساله دارای مشکل

۱- کارشناس ارشد، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
**نویسنده‌ی مسؤول:** دکتر معراج پورحسین
Email: pourhossein@med.mui.ac.ir

Ornithine transcarbamylase deficiency بود. به علت واکنش‌های شدید ایمونولوژیکی نسبت به دوزهای بالای وکتور آدنوویروسی، این آزمایش ژن درمانی سبب مرگ این فرد شد. بعد از این حادثه بود که Safety وکتورهای ویروسی در کاربردهای ژن درمانی مورد تجدید نظر قرار گرفت (۲). در سیستم‌های انتقال ژن به صورت Non viral تلاش بر این بود که پروفایل‌های مربوط به Safety آن‌ها افزایش پیدا کند، اما کارایی فرایند Transfection در وکتورهای غیر ویروسی نسبت به انواع ویروس، کاهش قابل ملاحظه‌ای نشان می‌دهند (۳).

## انتقال ژن به صورت غیر ویروسی از طریق مکانیسم (RNAi) RNA interference

استفاده از تکنولوژی RNAi (RNA interference) در روش‌های Functional genomics از طریق Genetic screening بر پایه‌ی DNAی سنتتیک برای اولین بار در Caenorhabditis elegans و دروزوفیلا نشان داده شد. محققان دریافتند که سلول‌ها می‌توانند از طریق یک مکانیسم جدید سنتز پروتئین را کنترل کنند که از طریق اتصال مولکول‌های کوچک RNA دو رشته‌ای به سکانس‌های ویژه‌ای از mRNA صورت می‌گیرد و در نتیجه، بیان پروتئین در ژن مربوط مهار می‌شود (۴). Elbashir و همکاران نشان دادند که طی فرایند RNAi، siRNAهایی با توالی ۲۱ نوکلئوتید در سلول‌های کشت داده شده‌ی پستانداران می‌توانند مداخله کنند (۵). آزمایش‌های پایه‌ای روی فرایند RNAi، منجر به اعطای جایزه‌ی نوبل در زمینه‌ی پزشکی و فیزیولوژی به دو دانشمند انجام دهنده‌ی تحقیقات شد (۶).

توانایی استفاده از dsRNA (Double-stranded RNA) جهت خاموش‌سازی بیان ژن با Specificity بالا، در مورد گیاهان و دروزوفیلا هم انجام شده است. دانشمندان دریافتند که در سلول‌های پستانداران، dsRNAهای طولانی‌تر از ۳۰ bp سبب شروع یک پاسخ ضد ویروسی شدید به نام پاسخ اینترفرون (IFN یا Interferon) می‌شوند که در نهایت می‌تواند از طریق فعال‌سازی RNaseL و تجزیه‌ی کلی مولکول RNA منجر به سرکوب بیان ژن شود. siRNAهای سنتتیک کمتر از ۳۰ bp که دارای سکانس مکمل با ژن هدف هستند، می‌توانند به جای dsRNAهای طویل‌تر به داخل سلول منتقل شوند (۷).

siRNA، کلیدی‌ترین مولکول در مسیر RNAi می‌باشد که ۲۵-۲۱ نوکلئوتید طول دارد و حاوی ۲ نوکلئوتید به صورت آویزان (Overhang) در دو انتهای '۳ می‌باشد. در داخل سیتوپلاسم، siRNA در داخل یک کمپلکس پروتئینی به نام RISC (RNA induced silencing complex) قرار می‌گیرد. سپس کمپلکس RISC تمام mRNA (Messenger RNA)های داخل سلولی را اسکن می‌نماید تا بتواند mRNAیی را که دارای سکانس مکمل با siRNA است، پیدا کند.

اگر mRNA هدف توسط کمپلکس RISC پیدا شد، بلافاصله برش می‌خورد و تجزیه می‌شود و در نتیجه، به طور موفقیت‌آمیزی از ترجمه‌ی ژن هدف جلوگیری به عمل می‌آید. بعد از مشارکت و قرارگیری siRNA در داخل کمپلکس RISC یکی از رشته‌های siRNA (رشته‌ی Sense) در بیرون از کمپلکس قرار می‌گیرد. در حالی که رشته‌ی دیگر

(رشته‌ی آنتی سنس) همچنان به کمپلکس RISC فعال شده، متصل باقی می‌ماند. سپس این رشته‌ی آنتی سنس به عنوان الگو (Template) جهت اتصال mRNA عمل می‌نماید.

برش در mRNA مکمل در نهایت منجر به فرایند Knockdown در پروتئین کد شده توسط mRNA می‌شود. از هنگامی که تشکیلات موجود در RNAi در سیتوپلاسم قرار گرفت، Effector siRNA می‌تواند به سیتوپلاسم سلول دسترسی پیدا کند (۸).

مزیت اصلی در تمام روش‌های آنتی سنس، ویژگی اختصاصیت بالای آن‌ها است که در آن تفکیک بین ژن هدف و غیر هدف (Non target) از طریق اختصاصیت واکنش‌های جفت شدگی بازها به صورت Watson-Crick انجام می‌گیرد. پتانسیل بالای RNAi روش‌های جدیدی را جهت خاموش‌سازی ژن در مقیاس بزرگ در مورد ژن‌های کد کننده‌ی پروتئین در ژنوم انسان فراهم کرده است. اکنون این مطالعات، اطلاعات با ارزشی در مورد عملکرد ژن‌ها و تجزیه و تحلیل Pathwayها در اختیار ما قرار داده است. اختصاصیت بالا، حتی ممکن است این امکان را بدهد که بتوان آلل‌های ویژه‌ی مربوط به بیماری را که تفاوتشان با آلل‌های طبیعی تنها در موارد محدودی جایگزینی نوکلئوتیدی (Nucleotide substitution) است، هدف قرار داد (۹).

پتانسیل بالای RNAi به این معنا است که مولکول‌های Effector RNA در غلظت‌های بسیار کمی نسبت به اولیگونوکلئوتیدهای آنتی سنس و یا ریبوزایم‌ها عمل می‌کند (۱۰). تداخل RNA همچنین نوید بخش استراتژی‌های جدیدی برای ارزیابی یا Validation اهداف دارویی و مطالعات Functional genomics است. همچنین برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها مثل سرطان، بیماری‌های ژنتیکی و ویروسی کاربرد دارد (۱۱).

## ویژگی‌های siRNA

اندازه‌ی متوسط مولکول siRNA کمتر از ۱۰ nm می‌باشد. به علاوه، طبیعت پلی آنیونی مولکول RNA، نفوذ آن به دیواره‌ی سلول را با مشکل مواجه کرده است. مولکول siRNA از نظر فارماکوکینتیکی ضعیف است؛ به طوری که باعث شده است مدت زمانی که داخل جریان خون گردش می‌کند، کم باشد (۶). به منظور افزایش اندازه، siRNA باید به صورت یک قطعه و یا اتصال شیمیایی (مثل باندهای دی سولفیدی، استرپتو آویدین یا بیوتین) به سایر اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها یا سطوح اتصال یابد تا بتواند مولکول بزرگ‌تری را از نظر اندازه ایجاد کند (۱۲).

راهکار دیگر، افزایش همزمان اندازه‌ی مولکول و افزایش پایداری در محیط‌های داخل و خارج سلولی است. پلیمرها و لیپوزوم‌ها با اتصال به siRNA، می‌توانند سبب تشکیل یک Nano particle شوند که می‌تواند علاوه بر افزایش اندازه‌ی مولکول، آن را از تجزیه شدن حفظ کند. اندازه‌ی Nano particle نقش مهمی در انتقال siRNA به بافت سرطانی دارد. بسیاری از نویسندگان مقالات، پیشنهاد می‌کنند که ذرات دارای قطر بین ۱۰۰–۱۰ nm (۱۳) تا حداکثر ۲۰۰ nm (۱۴)، اندازه‌ی مناسب برای وکتورهای غیر ویروسی دارند؛ زیرا آن‌ها به اندازه‌ی کافی بزرگ هستند که داخل خون باقی بمانند یا به اصطلاح Retention (رسوب) داشته باشند. از طرفی، به اندازه‌ی کافی هم کوچکند تا بتوانند به رسپتورهای

سطح سلول دست یابند و وارد سلول شوند. با این وجود، Nano particleهای کمتر از ۱۰ nm، توانایی Retention ندارند و از طریق جریان خون شسته می‌شوند. همچنین آن‌هایی که قطر بیشتر از ۱۰۰ nm دارند، این امکان وجود دارد که توسط ماکروفاژها فاگوسیته شوند. ماکروفاژها عامل شناسایی، بلع و تجزیه شدن ذرات بزرگ از طریق فرایندهایی به نام Opsonization هستند. در این فرایند، اپسونین‌ها که از ماکروفاژهای بالغ منشأ می‌گیرند، ذراتی مثل باکتری‌ها و همچنین Nano particle را احاطه می‌کنند و از بین می‌برند. به عبارت دیگر، فرایند Opsonization توسط ماکروفاژها مسؤول Half life کم ذرات بزرگ‌تر از ۱۰۰ nm می‌باشد (۶).

پایداری siRNA در محدوده‌ی pH فیزیولوژیک و کم بودن پاسخ‌های آنتی بادی قابل شناسایی توسط سیستم ایمنی و قابلیت تطابق پذیری زیستی (Biocompatibility) سبب کاربرد ساختارهای RNA در ژن درمانی شده است. توزیع siRNA در داخل بدن به صورت غیر اختصاصی می‌باشد. به این صورت که بعد از تجویز سیستمیک، در طی مسیر تا سلول هدف به صورت تدریجی از غلظت اولیه‌ی siRNA کاسته می‌شود و در آخر دوز، کمی نسبت به دوز اولیه‌ی دارو به سلول هدف می‌رسد که این امر، به خاطر موانع موجود در مسیر مثل عروق اندوتلیال و سایر موانع بافتی است (۶).

در صورت انتقال siRNA به صورت برهنه به داخل سلول‌ها، فرایند Knockdown موقتی در طول دوره‌ی ۷-۳ روزه در Cell lineهایی که رشد سریع دارند، اتفاق می‌افتد که به خاطر کم شدن تدریجی غلظت siRNA کمتر از میزان مؤثر و همچنین به خاطر تکثیر این سلول‌ها است. اما در سلول‌هایی که تقسیم نمی‌شوند یا کند تکثیر می‌شوند، اثر درمانی siRNA می‌تواند تا ۳ هفته هم به طول انجامد (بعد از آن siRNA به صورت طبیعی تجزیه می‌شود) (۱۵).

## ویژگی‌های سیستم‌های انتقال غیر ویروسی

### الف- حفاظت از siRNA

بعد از تجویز سیستمیک Naked siRNA (تجویز شده بدون وکتور) به طور سریع توسط سرم و نوکلئازهای بافتی تجزیه می‌شود و از طریق کلیه دفع می‌گردد و یا این که توسط ماکروفاژهای سیستم فاگوسیت کننده‌ی تک هسته‌ای (MPS یا Mononuclear phagocyte system) به دام می‌افتد. نتیجه این است که آن‌ها وقت کافی برای رسیدن به موضع هدف و انجام عملکرد خود را نخواهند داشت. در نتیجه، فرایند Gene silencing با شکست مواجه می‌شود. چندین امکان وجود دارد که بتوان مدت زمان حضور سیستم انتقال را در جریان خون طولانی‌تر کرد و بتوان siRNA را از بی‌اثر شدن و تجزیه شدن حفظ نمود. به عنوان مثال، siRNA می‌تواند از طریق شیمیایی تغییر یابد (برای مثال از طریق Phosphodiester modification (۱۶) یا ' ۲Sugar modification (۱۷) و یا می‌توان از روش‌های Bioconjugation استفاده کرد (به عنوان مثال در یک یا هر دو رشته‌ی siRNA، ذرات لیپید اضافه کرد). روش دیگر، استفاده از یک وکتور سینتیک است که باید ویژگی پایدار بودن داشته باشد. به عنوان مثال، می‌توان siRNA را با لیپیدها یا پلیمرهای با بار مثبت ترکیب کرد و یا siRNA را داخل ذرات لیپیدی کپسوله کرد (۱۸).

### ب- پایداری و دارا بودن ویژگی‌های مخفی ماندن

خاموش‌سازی ژن به صورت مؤثر نیازمند پایدار بودن وکتور بر ضد تجزیه شدن در داخل خون می‌باشد. همچنین سیستم انتقال باید در خون مخفی بماند تا ماکروفاژها نتوانند آن را شناسایی و فاگوسیته نمایند. بار سطحی وکتور عامل مهمی در پایداری آن به شمار می‌آید. در شرایط In vitro، مثبت بودن بار در سطح مزیت مهمی در مؤثر بودن انتقال به شمار می‌رود؛ زیرا می‌تواند سبب تسهیل اتصال به دیواره‌ی سلول حاوی بار منفی شود و در نتیجه، سبب تحریک Cell uptake می‌شود (۱۹). جهت کاربردهای in vivo بار سطحی مثبت یک نقص به شمار می‌رود؛ زیرا بر اثر واکنش با پروتئین‌های سرم مثل آلبومین و یا لیپوپروتئین‌ها یا پروتئین‌هایی مثل IgG که بار منفی دارند، مانع فرایند Cell uptake می‌شود.

Zelphati و همکاران نشان دادند که واکنش‌های غیر اختصاصی بین لیپیدهای با بار مثبت (Cationic lipids) و پروتئین‌های سرم، منجر به خنثی‌سازی بارهای مثبت و همچنین افزایش اندازه و در نتیجه سبب تجمع کمپلکس‌های خنثی‌سازی شده می‌شود. خنثی‌سازی بار، سبب کاهش واکنش با دیواره‌ی سلول می‌شود و افزایش اندازه باعث می‌شود که کمپلکس حاوی siRNA و لیپیدها نتوانند وارد سلول شوند و تجمع این ذرات در خون سبب آمبولی ریه خواهد شد (۲۰).

یک نکته‌ی مهم دیگر این است که کمپلکس‌های کاتیونی می‌تواند سبب فعال شدن سیستم کمپلمان شود که می‌تواند منجر به Opsonization و در نهایت پالایش کبدی گردد. برای محدود کردن این واکنش‌ها با پروتئین‌های باردار سرم، می‌توان دور تا دور وکتور را با پلیمرهای هیدروفیلیک مثل پلی اتیلن گلیکول (PEG یا Polyethylene glycol) یا پلی وینیل پرولیدون (PVP یا Polyvinylpyrrolidone) پوشاند که با تشکیل شبکه‌ای سخت و هیدروفیل در اطراف وکتور، سبب محدود کردن واکنش‌های هیدروفوبیک یا الکترواستاتیک با مایع خارج سلولی می‌شود. نتیجه‌ی این کار زمان طولانی‌تر برای گردش در داخل خون و همچنین جلوگیری از جذب شدن توسط MPS و ایجاد وکتوری پایدار و حاوی ویژگی‌های اختفا در جریان خون است (۲۱).

### ج- انجام فرایند Targeting

بعد از حضور سیستم انتقال در داخل جریان خون، این سیستم باید بتواند به سلول یا بافت هدف خود برسد. وقتی که بافت هدف یک تومور باشد، در کل Targeting ligandها غیر ضروری هستند. در مورد سلول‌های توموری در خارج از MPS، حالت Passive targeting می‌تواند ایجاد شود (۲۲).

انواع مختلفی از لیگاندها در این حالت قابل استفاده هستند: (مولکول‌های گلیکوزیله، پپتیدها، پروتئین‌ها یا آنتی بادی‌ها). استفاده از لیگاند به محل استقرار تومور و ویژگی‌های سلولی و بافتی آن بستگی دارد. Mannose receptors و گیرنده‌های وابسته به مانوز برای ماکروفاژها و یا دندریتیک سل‌ها به صورت Tissue specific هستند و مانوز را به عنوان لیگاند شناسایی می‌کنند. رسپتورهای ترانسفرین یا رسپتورهای فولات، بر عکس موارد قبل به صورت Tissue unspecific هستند؛ زیرا روی انواع مختلف سلول‌ها حضور دارند. اما نکته‌ی مهم این است که این دو دسته از رسپتورها بر روی خیلی از سلول‌های توموری Over express می‌شوند. بنابراین، اگر هدف

دسترسی به سلول‌های توموری باشد، بهترین لیگاندها می‌توانند فولات و یا ترانسفرین باشند. این لیگاندها اغلب روی زنجیره‌های PEG قرار می‌گیرند که این وضعیت سبب تسهیل اتصال سیستم انتقال و رسپتور قرار گرفته روی سطح سلول هدف می‌شود و می‌تواند به داخل شدن وکتور حامل siRNA کمک نماید (۲۳).

### د- انتقال siRNA به سیتوپلاسم و انجام عملکرد مربوط به siRNA

بعد از این که سیستم انتقال به صورت اولیه وارد سلول شد، اغلب توسط قطعات داخل سلولی با PHهای متفاوت (شامل اندوزوم اولیه، اندوزوم ثانویه و لیزوزوم) می‌توانند تجزیه شوند. برای رسیدن به سیتوپلاسم، سیستم انتقال یا حداقل siRNA مجبور است که از اندوزوم فرار کند. بعد از فرار از اندوزوم، سیستم انتقال، محموله‌ی خود (siRNA) را در داخل سیتوپلاسم آزاد می‌کند و سپس siRNA وارد هسته می‌شود و عملکرد gene silencing را انجام می‌دهد (۱۱).

## کاربردهای بالقوه‌ی siRNA در درمان سرطان

پیشرفت سرطان تدریجی و حاصل فرایندهای پیچیده است که اغلب با تجمع تغییرات و نقایص ژنتیکی همراه است و در نهایت منجر به تغییر عملکرد در انکوژن‌ها و عدم عملکرد Tumor suppressor geneها می‌شود. اغلب تغییرات ژنتیکی که سبب رفتار بدخیم تومور می‌شود، منجر به تکثیر سریع سلول، تهاجم به بافت‌های مجاور، متاستاز از محل اولیه‌ی تومور، تشکیل عروق خونی جدید و مقاومت به داروهای شیمی درمانی می‌شود. هدف ژن درمانی سرطان از طریق siRNA، در واقع تصحیح این تغییرات ژنتیکی از طریق سرکوب ژن‌های عامل سرطان یا بیان مجدد Gene tumor suppressorها است. به علاوه، ثابت شده است که کارآمدی Silencing در دوزهای یکسان در مورد siRNA نسبت به اولیگو نوکلئوتیدهای آنتی سنس و روش‌های ریبوزایم خیلی بیشتر است (۲۴).

یکی از عوامل مهم برای ژن درمانی بر پایه‌ی RNA، انتخاب درست ژن هدف یا Target gene می‌باشد. تلاش‌های زیادی به منظور شناسایی ژن هدف در ژن درمانی صورت گرفته است. معمول‌ترین اهداف در این زمینه شامل موارد زیر است:

### الف- هدف قرار دادن ژن‌هایی که در چرخه‌ی سلول نقش دارند

$P_{۵۳}$ که به عنوان محافظ ژنوم عمل می‌کند، در بیش از ۵۰ درصد از سرطان‌های انسانی به وسیله‌ی Point mutation، غیر فعال می‌گردد. siRNA می‌تواند به منظور سرکوب بیان $P_{۵۳}$ موتانت استفاده گردد (۲۵).

مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول یا آپوپتوز در اغلب سرطان‌ها به خصوص در تومورهایی که به دارو مقاومند، مختل می‌شود. درمان با siRNA می‌تواند سبب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی از طریق هدف قرار دادن عوامل ضد آپوپتوز مثل $AKT_۱$، Survivin و $Bcl_۲$ شود. سرکوب این ژن‌های ضد آپوپتوز توسط siRNA در بسیاری از سرطان‌ها، سبب القای آپوپتوز در سلول و در نتیجه، سبب حساس شدن سلول‌های سرطانی به شیمی درمانی می‌شود (۲۶). به خصوص، Survivin از این نظر که فقط در بافت‌های جنینی و سرطانی وجود دارد و در بافت‌های طبیعی بالغ وجود ندارد، توجهات زیادی را

به خود معطوف کرده است. بنابراین، فرایند Silencing روی Survivin می‌تواند یک فرایند Tumor specific therapy بدون آسیب به بافت‌های طبیعی و سالم باشد (۶).

### ب- هدف قرار دادن ژن‌های دخیل در Signal transduction

افزایش دانسته‌های ما در مورد مسیرهای Cell signaling سلول‌های نئوپلاستیک منجر به کشف چندین داروی جدید ژن درمانی شده است که شامل مهار کننده‌های پروتئین تیروزین کیناز (Gleevec)، Bcr-ABL۱ و مونوکلونال Ab بر ضد رسپتور عصبی Her۲ (Herceptine) می‌باشند. ممانعت از عملکرد پروتئین‌های دخیل در فرایند Transduction signal به ویژه پروتئین کینازها، به طور موفقیت‌آمیزی می‌تواند از پیشرفت سرطان جلوگیری کند (۶).

### ج- هدف قرار دادن ژن‌های دخیل در آنژیوژنز

عامل رشد عروق اندوتلیال (VEGF یا Vascular endothelial growth factor) نقش کلیدی را در فرایند آنژیوژنز در طول توسعه‌ی سرطان ایفا می‌کند. در طول مطالعات اثبات گردیده است که siRNA تا حدودی به طور کامل می‌تواند سبب ممانعت از ترشح عامل رشد در رده‌ی سلول‌های سرطان پروستات در انسان شود. همچنین به صورت موفقیت‌آمیزی سبب سرکوب آنژیوژنز و رشد تومور در مدل موشی Xenograft شده است (۶).

### د- هدف قرار دادن ژن‌های دخیل در مقاومت دارویی

یکی از عوامل اصلی در شیمی درمانی ناموفق در بیماران سرطانی، گلیکوپروتئین P و مقاومت دارویی چندگانه‌ی وابسته به MDR۱ (Multi-drug resistance۱) می‌باشد. با کاربرد siRNA بر ضد ژن‌های MDR۱ و گلیکوپروتئین P، مشاهده شده است که بیان این دو ژن تا میزان ۹۰ درصد در شرایط In vitro و تا میزان ۷۵ درصد در مدل موشی کاهش یافته است (۲۴).

## مهم‌ترین محدودیت‌های siRNAها

### الف- تحریک سیستم ایمنی ذاتی

تحریک پاسخ‌های ایمنی وابسته به siRNA در مهره‌داران توسط (Double-stranded RNA) dsRNA، مکانیسمی جهت دفاع در مقابل عفونت‌های ویروسی است. dsRNAها در سیتوپلاسم توسط کیناز وابسته به RNA (PKR یا Protein kinase R) شناسایی می‌شوند و این امر سبب فعال‌سازی PKR می‌شود و فعال شدن PKR در نهایت منجر به تحریک پاسخ اینترفرون (IFN) می‌گردد (۶). طی تحقیقاتی که انجام گرفته است، مشخص شد که موتیف‌هایی از توالی‌های خاصی از siRNA که حاوی سکانس ۳'(GUCCUUCAA)۵' هستند، توسط TLR۷ (Toll-like receptor۷) شناسایی می‌شود و سبب فعال شدن پاسخ ایمنی می‌گردد (۲۷). در سال‌های بعد، این موتیف را Danger motif نام‌گذاری کردند که در واقع ناحیه‌ای غنی از GU است که با تحریک سیستم ایمنی ذاتی سبب آزاد شدن سیتوکین‌های التهابی می‌شود (۲۸).

### ب- Suppression of off targets

اثر Off Target در siRNA، در واقع مربوط به خاموش‌سازی ناخواسته‌ی ژن‌های دیگری به غیر از ژن مورد نظر می‌باشد. مطالعات زیاد روی Off target silencing انجام گرفته است، زیرا این پدیده می‌تواند منجر به عوارض جانبی غیر قابل

پیش‌بینی شود. بررسی فعالیت ژن‌ها در کل ژنوم توسط کلینیک Microarray نشان داده است که سلول‌های تیمار شده با siRNA در طیف وسیعی از ژن‌ها حالت Off target silencing را نشان می‌دهند (۲۹). این حالت پدیده‌ای ناخواسته است و اثرات سلولی حاصل از تغییر فعالیت ژن در آن نامشخص و غیر قابل پیش‌بینی است. مطالعه روی سلول‌های ترانسفکت شده در شرایط In vitro نشان می‌دهد که یک سوم از سلول‌های تیمار شده با siRNA که به صورت تصادفی انتخاب شده‌اند، زنده مانده‌اند. آنالیزهای اولیه نشان داده‌اند که در کمتر از ۱۱ نوکلئوتید بین siRNA و ژن هدف، مطابقت (Matching) وجود دارد که می‌تواند ناشی از Off target knockdown باشد. مطالعات بیشتر حاکی از آن است که اغلب پدیده‌های Off targeting که از نظر آزمایشگاهی تأیید شده‌اند، به تعداد ۷-۶ نوکلئوتید با siRNA مطابقت داشته‌اند که به این ناحیه در اصطلاح Seed region گفته می‌شود (۳۰).

تحقیقات اخیر پیشنهاد می‌کند که با انجام تغییرات شیمیایی به صورت ۲'O methylation، در باز دوم از رشته‌ی رهبر siRNA، می‌توان به صورت موفقیت‌آمیزی سبب کاهش پدیده‌ی Off targeting شد، بدون این که اثر سوئی روی خاموش‌سازی ژن هدف داشته باشد (۳۱).

## مشکلات در راه دستیابی سیستم انتقال به هدف خود در سلول و چگونگی غلبه بر این مشکلات

### الف- نفوذ به دیواره‌ی سلول و فرار از سیستم Reticulo endothelial system) RES)

بعد از این که siRNA به سلول مورد نظر رسید، باید بتواند وارد سلول شود و سپس از سیستم RES فرار کند. اگر سیستم حاوی siRNA و وکتور آن حاوی بار مثبت باشند، با بار منفی سطح سلول هدف واکنش می‌دهد و یک وزیکول اندوسیتوزی تشکیل می‌شود. همچنین لیگاندها یا آنتی بادی‌ها می‌توانند روی سطح وکتور قرار گیرند تا حالت اندوسیتوز وابسته به رسپتور القا گردد. بعد از وارد شدن به این شیوه -که کمپلکس وارد اندوزوم می‌شود-، اگر کمپلکس حاوی siRNA قادر به فرار از اندوزوم نباشد، در نهایت الحاق لیزوزوم و اندوزوم اتفاق می‌افتد و به خاطر pH کم و تحت اثر آنزیم‌ها، این کمپلکس تجزیه خواهد شد (۳).

راهکارهایی جهت خلاصی از اندوزوم وجود دارد. پلیمرهایی مثل پلی اتیلین ایمین (PEI یا Polyethylenimine) قابلیت این را دارند که سبب القای شروع آزادسازی از اندوزوم شوند. فرضیه‌ی Proton sponge اشاره به این موضوع دارد که به خاطر ظرفیت PEI در محدوده‌ی وسیعی از pH، این پلیمر می‌تواند هنگامی که pH داخل اندوزوم پایین می‌آید، به حالت پروتونه در آید که سبب ورود یون کلرید و متعاقب آن ورود پروتون‌ها و آب به اندوزوم شود. به خاطر افزایش فشار اسمزی، اندوزوم پاره می‌شود و siRNA در سیتوپلاسم آزاد می‌گردد (۳۲).

یک مکانیسم دیگر در رابطه با فرار از اندوزوم وابسته به Lipoplexها است که از طریق بی‌ثبات کردن دیواره‌ی سلول انجام می‌پذیرد. در این فرضیه، کمپلکس از طریق اندوزوم وارد می‌شود که نتیجه‌ی این عمل، ایجاد حالت Flip Flop در لیپیدهای آنیونی دیواره‌ی اندوزوم است. این حالت می‌تواند از سمت سیتوپلاسمی به طرف لیپیدهای کاتیونی در کمپلکس

ادامه پیدا کند و سبب آزاد شدن siRNA در سیتوپلاسم شود (۳۳).

### ب- فعال کردن سیستم ایمنی ذاتی

انتقال کمپلکس حاوی لیپوزوم و siRNA می‌تواند منجر به فعال شدن سیستم ایمنی ذاتی پستانداران شود. در نتیجه، سیتوکین‌های التهابی تحریک می‌شوند و پاسخ‌های اینترفرون ایجاد می‌شود که در اصل، به خاطر RNA sensing toll like receptor (۸، ۷ و ۳ TLRs) می‌باشد. فعال شدن سیستم ایمنی ذاتی القا شده توسط siRNA می‌تواند منجر به نتایج مثبت کاذب شبه ویروسی شود. برای جلوگیری از فعال شدن سیستم ایمنی، مشخص شده است که در صورت انجام Chemical modification روی Long dsRNAهایی با طول ۳۰ نوکلئوتید و کاهش طول آن‌ها به ۲۱-۱۹ نوکلئوتید، پاسخ ایمنی کمتر تحریک خواهد شد (۸). همچنین Abrams و همکاران مشاهده کردند که کاربرد دگزامتازون، می‌تواند با مهار آزادسازی سیتوکین‌های التهابی، مانع فعال شدن سیستم ایمنی ذاتی گردد. در حالی که همچنان عملکرد Gene silencing حفظ می‌شود (۳۴).

### ج- انجام فرایند PEGylation به منظور مخفی ماندن لیپوزوم‌ها

استفاده از پوشش PEG، به منظور تسهیل گردش طولانی مدت لیپوزوم در جریان خون برای سال‌ها مطالعه شده است. مزیت اصلی پوشش PEG در این است که می‌تواند اتصال پروتئین‌ها به سطح لیپوزوم‌ها را کم کند و بنابراین، سبب کاهش Opsonization و حذف به وسیله‌ی ماکروفاژهای سیستم RES شود. برای به حداکثر رساندن عدم جذب توسط سیستم RES و اپسونیزاسیون به وسیله‌ی ماکروفاژها، یک سپر کامل از PEG باید دور تا دور وکتور ایجاد شود تا مؤثرترین مانع بر سر اتصال پروتئین‌ها شکل گیرد (۸). تراکم زیاد به میزان ۱۰-۸ درصد از PEG، لازمه‌ی مخفی ماندن مناسب لیپوزوم در خون است. به هر حال، تراکم خیلی بالای PEG مانع از رهاسازی محموله‌ی لیپوزوم -siRNA- خواهد شد (۳۵).

### د- پدیده‌ی حذف یا پالایش سریع از گردش خون (Accelerated blood clearance)

در صورت کاربرد لیپوزوم‌های طبیعی و پایدار، تزریقات مکرر این لیپوزوم‌ها، منجر به تغییر یافتن توزیع آن در بدن می‌شود. لیپوزوم‌هایی که با PEG پوشانده شده‌اند، بعد از مدتی از گردش خون حذف می‌شوند و در کبد تجمع می‌یابند. این پدیده به نام ABC phenomenon شناخته می‌شود (۳۶). بعد از تجویز دوز اول از لیپوزوم‌های پوشیده شده از PEG، در بدن IgM (Immunoglobulin M) بر ضد PEG توسط Bcellهای طحال ایجاد می‌شوند. بعد از تزریقات مکرر در چندین روز بعدتر، این امر سبب فعال شدن سیستم کمپلمان می‌شود که منجر به اپسونیزاسیون کمپلکس و به دام افتادن آن‌ها در سلول‌های کبدی می‌گردد (۸). فرایند ABC یک فرایند وابسته به اندازه‌ی کمپلکس می‌باشد. از این رو، اگر اندازه‌ی کمپلکس حاوی لیپوزوم و PEG بیشتر از ۳۰-۱۰ nm باشد، این پدیده رخ نخواهد داد (۳۷).

## وارد کردن این ساختارها به درون سلول از طریق وکتورهای غیر ویروسی

در حالت کلی دو روش تزریق local و Systemic جهت انتقال کمپلکس حاوی siRNA به درون بدن

وجود دارد. در حالت Local تزریق مستقیم در داخل مواضع هدف، ما را از این که دوز دقیقی وارد موضع هدف شده است، مطمئن می‌سازد. همچنین مشکل تجمع غیر اختصاصی که در روش تزریق داخل وریدی وجود دارد، در این روش برطرف می‌شود. تزریق مستقیم داخل توموری، یک روش شایع برای ایجاد پاسخ‌های ضد توموری توسط siRNA می‌باشد (۳۸). مزایای این روش در درجه‌ی اول فرمولاسیون ساده و سهولت تجویز جزء دارویی می‌باشد و در درجه‌ی دوم، دوزهای پایینی استفاده می‌شوند که سبب محدود شدن پاسخ‌های ایمنی سلولی وابسته به دوز می‌شوند؛ اما این روش تنها در مورد بافت‌هایی قابل انجام است که قابل دسترسی باشند (۱۱).

در روش تزریق سیستمیک جزء دارویی، مهم‌ترین مشکلی که پیش می‌آید، مشکل بودن انتقال siRNA است که به خاطر وجود موانع متعدد همچون سیستم گردش خون، سیستم رتیکلواندوتلیال و طولانی بودن مسیر انتقال می‌باشد.

تجویز سیستمیک، یک روش مناسب برای درمان بیماری‌هایی نظیر سرطان و بیماری‌های متابولیکی است. جایی که ناحیه‌ی مورد نظر برای هدف قرار دادن سلول توموری به راحتی در دسترس نباشد و می‌تواند به وسیله‌ی روش‌های داخل وریدی، داخل پریتوئن و زیر جلدی انجام گیرد. در بین این روش‌ها، روش داخل وریدی بیشترین کاربرد را در درمان دارد. سهولت و سادگی این روش و همچنین سریع بودن نفوذ و توزیع جزء دارویی در مکان‌های متفاوتی از بافت از دلایل کاربرد بیشتر این روش می‌باشند (۳۹).

وکتورهای غیر ویروسی جهت انتقال siRNA به داخل سلول شامل انواع لیپیدی و پلیمری می‌باشد.

## سیستم‌های انتقال (Delivery vector) بر پایه‌ی لیپیدها شامل انواع مختلفی هستند

### الف- Liposome

لیپوزوم‌ها به طور وسیعی جهت انتقال جزء دارویی به سلول هدف استفاده می‌شوند. در بین وکتورهای غیر ویروسی، لیپوزوم‌ها جزء اولین گزینه‌هایی بودند که مورد مطالعه قرار گرفتند و بنابراین، ویژگی‌های آن‌ها به خوبی شناخته شده است (۴۰). مزیت لیپوزوم‌ها در این است که در اندازه‌ی حدود ۱۰۰ nm فرموله می‌شوند و محصولات ایجاد شده از آن‌ها، خاصیت Biocompatibility دارند. فرایند کپسوله کردن siRNA در داخل لیپوزوم ساده است و شامل ترکیب کردن siRNA و لیپوزوم و انکوبه کردن این دو می‌باشد (۶).

### ب- Lipoplex

به منظور حداکثر کردن پایداری و کارایی هر چه بهتر فرایند انتقال و کمتر کردن سمیت، باید ترکیب لیپیدها و میزان لیپید به siRNA تنظیم شود. Lipoplexها به خاطر دارا بودن ویژگی‌هایی مثل سادگی تولید، دارا بودن خاصیت Transfection بالا و تعامل خوب با بار منفی دیواره‌ی سلول، به طور معمول استفاده می‌شود. اما به هر حال معایبی هم دارند که شامل پایداری کم و خاصیت Reproducibility ضعیف است (۴۱).

### ج- PEGylated lipids

فرایند Pegylation به طور رایج در روش‌های Passive targeting مورد استفاده قرار می‌گیرد و در آن، PEG را روی سطح خارجی Nano vector وصل می‌کنند (۳).

به منظور دور زدن مشکل بار مثبت، پلیمرهای هیدروفیلیک مثل PEG به منظور ایجاد سپر و محافظی در مقابل بار سطحی لیپیدهای کاتیونی یا لیپوزوم‌ها استفاده می‌شوند و اتصال کوالان PEG و فسفولیپید، سبب افزایش مدت زمان حضور درجریان خون و کاهش اپسونیزاسیون و در نهایت فرار سلول از سیستم RES خواهد شد (۴۱).

**د- Neutral lipid**

به غیر از فرایند Pegylation، راه دیگر برای جلوگیری از Toxicity و پاسخ‌های التهابی وکتورها، استفاده از لیپیدهای خنثی است. اگر چه لیپیدهای خنثی Safety مطلوبی دارند، اما فقدان واکنش با بار منفی siRNA، استفاده از آن را محدود کرده است (۴۱). روشی برای غلبه بر این مشکل وجود داردکه شامل اتصال siRNA و لیپیدها به هم به صورت اتصال مستقیم به جای استفاده از واکنش الکترواستاتیک است. ثابت شده است که اتصال شیمیایی siRNA به کلسترول، می‌تواند سبب تسهیل Cell uptake گردد (۱۸).

## سیستم‌های انتقال بر پایه‌ی پلیمرها نیز انواع مختلفی دارند

**الف- PEI (پلی اتیلن ایمین)**

یک پلیمر سنتتیک بسیار شاخه‌دار و با بار مثبت می‌باشد. به خاطر توانایی بالای آن در متراکم کردن اسید نوکلئیک‌ها و تداخل در اندوسیتوز، PEI با وزن مولکولی کم و با درجات مختلف از شاخه‌دار بودن برای انتقال ژن استفاده می‌شود. در برخی مطالعات، سمیت بالای PEI در شرایط in vitro به اثبات رسیده است. برای کم کردن سمیت، ترکیبی از PEI و PEG استفاده می‌شود و با انجام فرایند Pegylation، از سمیت PEI به میزان قابل ملاحظه‌ای کم می‌شود. اما نکته‌ی مهم این است که با اتصال PEG روی PEI، اندازه‌ی مولکول بزرگ‌تر خواهد شد (۶). PEI به خاطر کارآمدی بالا در ترانسفکشن، درجات بالای شاخه‌دار بودن و دارا بودن وزن مولکولی پایین، به عنوان Gold standard در انتقال ژن در شرایط in vivo در نظر گرفته می‌شود (۴۱).

**ب- Chitosan**

یک پلیمر پلی ساکاریدی با بار مثبت که در طبیعت به وفور یافت می‌شود و کاربردهای پزشکی فراوانی از تهیه‌ی بانداژ پزشکی تا ژن درمانی دارد. کیتوزان به خاطر داشتن ویژگی‌هایی مثل طبیعی بودن، Biocompatibility، Biodegradability و سمیت خیلی کم، پتانسیل بالایی در روش‌های انتقال ژن دارد. به علاوه، ویژگی چسبیدن به موکوس و نفوذ راحت به داخل سطوح موکوسی در کیتوزان، سبب شده است که به صورت ویژه در روش‌های انتقال ژن به داخل ریه کاربرد داشته باشد. متأسفانه میزان ترانسفکشن کیتوزان در حد متوسطی است که به خاطر ضعف آن در فرار از اندوزوم می‌باشد (۶).

**ج- PLGA- (Poly(lactic-co-glycolic acid)) یا پلی لاکتیک گلیکولیک اسید)**

تطابق پذیری PLGA، سبب سهولت انجام تغییرات شیمیایی به منظور انتقال هر چه مؤثرتر ژن می‌شود. همچنین دارای خاصیت Biodegradability و Biocompatibility می‌باشد (۴۱).

## نمونه‌هایی از کاربردهای بالینی siRNA

استفاده از روش‌های غیر فعال‌سازی ژن مبتنی بر

siRNA در طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله انواع سرطان‌ها، بیماری‌های ویروسی، بیماری‌های چشمی و استخوانی با موفقیت انجام گرفته است. در تمامی این موارد، انجام درمان از طریق غیر فعال کردن عوامل و ژن‌های دخیل در فرایند بیماری‌زایی بوده است (۴۲).

### الف: کاربرد siRNA بر علیه سرطان

استفاده از شیمی درمانی با وجود از بین بردن سلول سرطانی، سبب نابودی سلول‌های سالم نیز می‌گردد. از این رو، می‌توان از siRNA، فقط جهت هدف قرار دادن سلول‌های سرطانی استفاده کرد. کاربرد موفق siRNA به منظور جلوگیری از تکثیر سلول‌های سرطانی در بسیاری از مطالعات گزارش شده است. به عنوان مثال، بیماران مبتلا به سرطان پروستات (۴۳) و تومور Ewing (۴۴) بدین صورت درمان شده‌اند. در دو مورد دیگر، siRNA بر علیه کیناز AKT۲ (۴۵) و عامل ABCC۴ (۴۶) استفاده شده است. این دو عامل به ترتیب در سرطان بدخیم گیلیوما و سرطان پانکراس بیان بالایی دارند. از این رو، در چنین مواردی از siRNA جهت کاهش بیان استفاده می‌شود.

### ب: کاربرد siRNA بر علیه بیماری‌های ویروسی

درمان بر پایه‌ی siRNA جهت جلوگیری از عفونت‌زایی و عملکرد غیر طبیعی انواع مختلفی از ویروس‌ها انجام می‌گیرد. عفونت‌های ناشی از ویروس‌هایی همچون ویروس آنفولانزا (۴۷)، کوکساکی (۴۸)، (Respiratory syncytial virus) RSV (۴۹) و هپاتیت B (۵۰) از طریق siRNA درمان شده‌اند. همچنین از مکانیسم siRNA به منظور هدف قرار دادن ترکیبات مهم و حیاتی در چرخه‌ی زندگی ویروس HIV (Human immunodeficiency virus) استفاده شده است. رسپتورهای HIV نظیر CD۴ و کورسپتورهایی همچون CXCR۴ (C-X-C chemokine receptor type۴) و CCR۵ (C-C chemokine receptor type۵) هدف‌های بالقوه‌ای در این جهت می‌باشند؛ زیرا ممانعت از عملکرد این عوامل، سبب جلوگیری از ورود ویروس به داخل سلول میزبان خواهد شد (۵۱).

### ج: کاربرد siRNA بر علیه بیماری‌های چشمی

برخی از بیماری‌های چشمی، مانند رتینوپاتی دیابتیک، بیماری (تحلیل رفتن عنبیه در اثر کهنسالی (AMD یا Age-related macular degeneration) و بیماری Herpetic Keratitis در اثر فرایند آنژیوژنز ایجاد می‌گردند. عامل VEGF نقش مهمی در این زمینه ایفا می‌کند. درمان با siRNA در مورد این دسته از بیماری‌های چشمی استفاده شده است (۵۲).

### د: کاربرد siRNA بر علیه بیماری‌های استخوانی

کاتپسین B که یک سایتوکاین است، در تخریب غضروف، در بیماری‌های Osteoarthritis و ایجاد پروتئولیز در آرتریت روماتوئید، نقش مهمی دارد. مطالعات نشان داده‌اند که هدف قرار دادن کاتپسین B می‌تواند سبب کاهش ۷۰ درصدی بیان این عامل شود. به این خاطر، کاهش بیان کاتپسین B به عنوان یک هدف جهت بهبود وضعیت این بیماران پیشنهاد می‌شود (۵۳).

## نتیجه‌گیری

به منظور انتقال ژن به داخل تومور، سیستم انتقال باید بتواند سلول هدف را بشناسد و از اتصال غیر اختصاصی و ورود به سلول‌های دیگر ممانعت نماید. همچنین باید نسبت به تجزیه شدن در هنگام قرار

گرفتن در جریان خون مقاوم باشد و هنگامی که به سلول هدف رسید، باید بتواند از دیواره عبور نماید و همچنین قابلیت فرار از سیستم اندوزوم و لیزوزوم را داشته باشد و در نهایت با رها کردن محموله‌ی خود –siRNA– بتواند عملکرد نهایی خود را انجام دهد.

Non specific gene silencing و اثر Off targeting می‌تواند از طریق تغییر در اندازه‌ی siRNA و دستکاری توالی‌های اولیه، کمتر شود. رشته‌ی Sense در siRNA، پتانسیل بالایی برای انجام تغییرات دارد؛ طوری که با انجام تغییرات روی رشته‌ی Sense، هیچ گونه اثر سوئی در فرایند Silencing به وجود نمی‌آید.

همان گونه که ذکر شد، اندازه‌ی مناسب برای سیستم انتقال بین ۱۰ nm تا حداکثر ۲۰۰ nm می‌باشد. نکته‌ی آخر، عملکرد صحیح siRNA می‌باشد که مشخصه‌ی نتیجه بخش بودن Gene silencing است. در تمام مقالات مربوط به siRNA delivery انتقال ژن صورت گرفته است، اما میزان خاموش‌سازی ژن در بین این تحقیقات متفاوت بوده است. هدف، انجام Gene silencing بدون تحریک سیستم ایمنی و کم کردن و یا حذف کردن اثر Off targeting است. به این منظور، سیستم‌های انتقال باید تا حد امکان پایدار باشند. پارامترهای دیگر مثل میزان دوز استفاده شده و دفعات تزریق نیز در رسیدن به نتیجه‌ی مطلوب موثر می‌باشند.

## References


1. Hoag H. Careers and Recruitment Gene therapy rising? Nature 2005; 435: 530-1.
2. Hollon T. Researchers and regulators reflect on first gene therapy death. Am J Ophthalmol 2000; 129(5): 701.
3. Xu J, Ganesh S, Amiji M. Non-condensing polymeric nanoparticles for targeted gene and siRNA delivery. Int J Pharm 2012; 427(1): 21-34.
4. Hannon GJ. RNA interference. Nature 2002; 418(6894): 244-51.
5. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 2001; 411(6836): 494-8.
6. Guo P, Coban O, Snead NM, Trebley J, Hoeprich S, Guo S, et al. Engineering RNA for targeted siRNA delivery and medical application. Adv Drug Deliv Rev 2010; 62(6): 650-66.
7. Gary DJ, Puri N, Won YY. Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. J Control Release 2007; 121(1-2): 64-73.
8. Buyens K, De Smedt SC, Braeckmans K, Demeester J, Peeters L, van Grunsven LA, et al. Liposome based systems for systemic siRNA delivery: stability in blood sets the requirements for optimal carrier design. J Control Release 2012; 158(3): 362-70.
9. Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. Adv Drug Deliv Rev 2007; 59(2-3): 75-86.
10. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. Cell 2003; 115(2): 199-208.
11. David S, Pitard B, Benoit JP, Passirani C. Non-viral nanosystems for systemic siRNA delivery. Pharmacol Res 2010; 62(2): 100-14.
12. Xu S, Dong M, Liu X, Howard KA, Kjems J, Besenbacher F. Direct force measurements between siRNA and chitosan molecules using force spectroscopy. Biophys J 2007; 93(3): 952-9.
13. Gao H, Shi W, Freund LB. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2005; 102(27): 9469-74.
14. Kim SH, Jeong JH, Lee SH, Kim SW, Park TG. PEG conjugated VEGF siRNA for anti-angiogenic gene therapy. J Control Release 2006; 116(2): 123-9.
15. Bartlett DW, Davis ME. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from

live-cell and live-animal bioluminescent imaging. Nucleic Acids Res 2006; 34(1): 322-33.
16. Braasch DA, Paroo Z, Constantinescu A, Ren G, Oz OK, Mason RP, et al. Biodistribution of phosphodiester and phosphorothioate siRNA. Bioorg Med Chem Lett 2004; 14(5): 1139-43.
17. Chiu YL, Rana TM. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. RNA 2003; 9(9): 1034-48.
18. Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. Nature 2004; 432(7014): 173-8.
19. Tong AW, Jay CM, Senzer N, Maples PB, Nemunaitis J. Systemic therapeutic gene delivery for cancer: crafting Paris' arrow. Curr Gene Ther 2009; 9(1): 45-60.
20. Zelphati O, Uyechi LS, Barron LG, Szoka FC, Jr. Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells. Biochim Biophys Acta 1998; 1390(2): 119-33.
21. Ogris M, Wagner E. Targeting tumors with non-viral gene delivery systems. Drug Discov Today 2002; 7(8): 479-85.
22. Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. Adv Enzyme Regul 2001; 41: 189-207.
23. Sato A, Takagi M, Shimamoto A, Kawakami S, Hashida M. Small interfering RNA delivery to the liver by intravenous administration of galactosylated cationic liposomes in mice. Biomaterials 2007; 28(7): 1434-42.
24. Pichler A, Zelcer N, Prior JL, Kuil AJ, Piwnica-Worms D. In vivo RNA interference-mediated ablation of MDR1 P-glycoprotein. Clin Cancer Res 2005; 11(12): 4487-94.
25. Yonesaka K, Tamura K, Kurata T, Satoh T, Ikeda M, Fukuoka M, et al. Small interfering RNA targeting survivin sensitizes lung cancer cell with mutant p53 to adriamycin. Int J Cancer 2006; 118(4): 812-20.
26. Ning S, Fuessel S, Kotzsch M, Kraemer K, Kappler M, Schmidt U, et al. siRNA-mediated down-regulation of survivin inhibits bladder cancer cell growth. Int J Oncol 2004; 25(4): 1065-71.
27. Hornung V, Guenthner-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, et al. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. Nat Med 2005; 11(3): 263-70.
28. Marques JT, Williams BR. Activation of the mammalian immune system by siRNAs. Nat Biotechnol 2005; 23(11): 1399-405.
29. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. Nat Biotechnol 2003; 21(6): 635-7.
30. Lin X, Ruan X, Anderson MG, McDowell JA, Kroeger PE, Fesik SW, et al. siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. Nucleic Acids Res 2005; 33(14): 4527-35.
31. Jackson AL, Burchard J, Leake D, Reynolds A, Schelter J, Guo J, et al. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. RNA 2006; 12(7): 1197-205.
32. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92(16): 7297-301.
33. Zelphati O, Szoka FC, Jr. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(21): 11493-8.
34. Abrams MT, Koser ML, Seitzer J, Williams SC, DiPietro MA, Wang W, et al. Evaluation of efficacy, biodistribution, and inflammation for a potent siRNA nanoparticle: effect of dexamethasone co-treatment. Mol Ther 2010; 18(1): 171-80.
35. Li SD, Huang L. Stealth nanoparticles: high density but sheddable PEG is a key for tumor targeting. J Control Release 2010; 145(3): 178-81.
36. Laverman P, Carstens MG, Boerman OC, Dams ET, Oyen WJ, van RN, et al. Factors affecting the accelerated blood clearance of polyethylene glycol-liposomes upon repeated injection. J Pharmacol Exp Ther 2001; 298(2): 607-12.
37. Koide H, Asai T, Hatanaka K, Urakami T, Ishii T, Kenjo E, et al. Particle size-dependent triggering of accelerated blood clearance phenomenon. Int J Pharm 2008; 362(1-2): 197-200.
38. Howard KA. Delivery of RNA interference therapeutics using polycation-based nanoparticles. Adv Drug Deliv Rev 2009; 61(9): 710-20.
39. Wu SY, McMillan NA. Lipidic systems for in vivo siRNA delivery. AAPS J 2009; 11(4): 639-52.
40. Li W, Szoka FC, Jr. Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. Pharm Res 2007; 24(3): 438-49.
41. Lam JK, Liang W, Chan HK. Pulmonary

delivery of therapeutic siRNA. Adv Drug Deliv Rev 2012; 64(1): 1-15.
**42.** Ramachandran PV, Ignacimuthu S. RNA interference--a silent but an efficient therapeutic tool. Appl Biochem Biotechnol 2013; 169(6): 1774-89.
**43.** McNamara JO, Andrechek ER, Wang Y, Viles KD, Rempel RE, Gilboa E, et al. Cell type–specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. Nature Biotechnology 2006; 24: 1005-15.
**44.** Hu-Lieskovan S, Heidel JD, Bartlett DW, Davis ME, Triche TJ. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. Cancer Res 2005; 65: 8984.
**45.** Cui Y, Wang Q, Wang J, Dong Y, Luo C, Hu G, et al. Knockdown of AKT2 expression by RNA interference inhibits proliferation, enhances apoptosis, and increases chemosensitivity to the anticancer drug VM-26 in U87 glioma cells. Brain Res 2012; 1469: 1-9.
**46.** Zhang Z, Wang J, Shen B, Peng C, Zheng M. The ABCC4 gene is a promising target for pancreatic cancer therapy. Gene 2012; 491(2): 194-9.
**47.** Ge Q, Filip L, Bai A, Nguyen T, Eisen HN, Chen J. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101(23): 8676-81.
**48.** Fechner H, Sipo I, Westermann D, Pinkert S, Wang X, Suckau L, et al. Cardiac-targeted RNA interference mediated by an AAV9 vector improves cardiac function in coxsackievirus B3 cardiomyopathy. J Mol Med (Berl) 2008; 86(9): 987-97.
**49.** DeVincenzo J, Lambkin-Williams R, Wilkinson T, Cehelsky J, Nochur S, Walsh E, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107(19): 8800-5.
**50.** McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, et al. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. Nat Biotechnol 2003; 21(6): 639-44.
**51.** Martinez MA, Clotet B, Este JA. RNA interference of HIV replication. Trends Immunol 2002; 23(12): 559-61.
**52.** Ng EW, Adamis AP. Targeting angiogenesis, the underlying disorder in neovascular age-related macular degeneration. Can J Ophthalmol 2005; 40(3): 352-68.
**53.** Zwicky R, Muntener K, Goldring MB, Baici A. Cathepsin B expression and down-regulation by gene silencing and antisense DNA in human chondrocytes. Biochem J 2002; 367(Pt 1): 209-17.

**Journal of Isfahan Medical School**

**Vol. 32, No. 272, 1st Week, April 2014**

Received: 28.11.2013

Accepted: 11.02.2014

# Bottlenecks in Clinical Application of siRNA Delivery Based on Non-Viral Vectors

Reza Ghavimi MSc[1], Meraj Pourhossein PhD[2]

**Review Article**

## Abstract

In recent years, much more attentions have been focused on siRNA-based gene therapy. This approach is based on PTGS (Post-transcriptional gene silencing). Due to some defects in viral vectors, non-viral vectors have been used to deliver nucleic acids into target cells. Although, transfection efficiency in non-viral vectors is less than viral ones, but safety of non-viral vectors is much more. Characteristic features of siRNA, such as high compatibility, application in low doses and its versatility make it suitable in the gene therapy field. However, some challenges, such as stimulating immune system and Off-target silencing will be remain. In this review article, we express bottlenecks existing in siRNA delivery into target cells. According to the information, with further development of siRNA delivery in the future, it could be a promising approach in treatment for a variety of genetic diseases.

**Keywords:** siRNA delivery, Non viral vector, Gene therapy

**Citation:** Ghavimi R, Pourhossein M. **Bottlenecks in Clinical Application of siRNA Delivery Based on Non-Viral Vectors.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(272): 34-49

1- Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
**Corresponding Author:** Meraj Pourhossein PhD, Email: pourhossein@med.mui.ac.ir