

روش‌های نوین انتقال ژن با رویکرد ایجاد ایمنی زیستی در ژن درمانی

فاطمه اکبریان^{۱*}، امیر موسوی^۲، محمد حسین صنعتی^۳، فرزانه خانی^۱، نغمه قلی پور^۱، سیمین نافیان دهکردی^۱

^{۱-} دانشجوی دکتری پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

^{۲-} استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

^{۳-} استاد پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

f.akbarian1@gmail.com

چکیده

ژن درمانی، یک روش امید بخش برای درمان بیماری‌های لاعلاج از جمله سرطان و نقص‌های ژنتیکی به شمار می‌آید. اصلی‌ترین مساله محدودکننده کارایی این روش درون موجود زنده، دشواری در انتقال مولکول‌های بزرگ، آسیب‌پذیر و دارای بار منفی دی.ان.ا به داخل هسته سلول‌ها است که جنبه‌های ایمنی زیستی استفاده از این روش را با مخاطره مواجه می‌کند. کلید موفقیت در ژن درمانی ابداع ابزارهای حمل‌کننده مطمئن و کارآمد از لحاظ ایمنی زیستی برای انتقال ماده وراثتی است. حامل‌های ویروسی به علت راندمان بالا در انتقال ماده وراثتی، از پرکاربردترین حامل‌ها در ژن درمانی بشمار می‌آیند، اما این ناقلین می‌توانند جرقه واکنش‌های ایمنی خطرناکی را در بدن موجود زنده بزنند. در حال حاضر پژوهشگران تلاش می‌کنند جایگزین‌های مطمئن‌تر و ارزان‌تری را ایجاد کنند. در این مقاله مسیرها و روش‌های حمل‌ژن‌ها همراه با مزیت‌ها و معایب هر کدام به قصد ژن درمانی، مرور شده و همچنین جدیدترین اصلاحات لازم برای بهبود هر کدام از روش‌ها ذکر می‌شود.

واژگان کلیدی: ژن درمانی، ایمنی زیستی، روش‌های تحویل ژن، حامل‌های غیر ویروسی، حامل‌های ویروسی.

مقدمه

متمرکز شود (۷).

ژن درمانی یک روش درمانگر برای تصحیح نقص‌های ژنتیکی است که می‌تواند با استفاده از دستکاری‌های ژنومی، نارسایی‌های ژنتیکی را تصحیح کرده و قدم اساسی را جهت مداخله پزشکی در درمان بیماری‌های توارثی تک‌ژنی/چندژنی بردارد. مطالعه حاضر قصد دارد بر روی انواع مختلف روش‌های تحویل ژنی استفاده شده در اقدامات ژن درمانی

جرقه اولیه درمان توسط ژن‌ها در سال ۱۹۶۳ در ذهن دانشمندان ایجاد شد، در حالی که شروع مطالعات مرتبط با ژنتیک انسانی در این زمینه تا سال ۱۹۸۰ به طول انجامید (۲۱). مجوز اولین درمان ژنتیکی کلینیکی در سال ۱۹۹۰ توسط سازمان غذا و دارو آمریکا صادر شد که طی آن یک دختر ۴ ساله با نقص آدنوزین دآمیناز (ADA) توسط انتقال ژن *ada* درون

سلول‌های سفید خونی وی درمان شد (۲). در همان سال نیز روزنبرگ از حامل‌های رتروویروسی برای وارد کردن ژن مقاومت به نئومایسین در ۵ بیمار با ملانوما جابجا شونده استفاده کرد که موفقیت آمیز بود. از این سال بود که جرات درمان توسط ژن در سطح بالینی بوجود آمد. از سال ۱۹۹۰ تا به امروز بیش از ۷۰۰ آزمایش بالینی با بکارگیری روش‌های مختلف ژن درمانی انجام شده است (۲۶، ۳).

ژن درمانی به پیشرفت‌های قابل توجهی در دو دهه گذشته دست یافته است، که از مهمترین این پیشرفت‌ها می‌توان به فن‌آوری انتقال و بیان ژن اشاره کرد. در حال حاضر طراحی ناقل‌هایی ایمن با بیان ژنی طولانی مدت و همچنین ایجاد روشی دارای اختصاصیت بالا از لحاظ شناسایی نوع سلول برای تحویل ژن و تنظیم بیان آن ژن‌ها توسط ریز مولکول‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. ماده ژنتیکی بیگانه می‌تواند بسته به طبیعت بیماری در سه شرایط درون آزمایشگاه (In vitro)، درون موجود زنده (In vivo) و خارج از موجود زنده (Ex vivo) مورد استفاده قرار گیرد (۲۶).

یک روش ژن درمانی موفق باید چندین عملکرد مجزا داشته باشد. در تمامی موارد، ژن درمانگر باید در مرحله اول از غشای سلولی عبور کند. به محض ورود به داخل سلول، این ژن می‌تواند یا بصورت اپی‌زوم باقی بماند و یا بنا بر ماهیت ناقل ژن در ژنوم میزبان ادغام شود. علاوه بر این موارد، یک موضوع مهم، همانندسازی ژن درمانگر در طول تقسیم سلولی است تا به این وسیله بیان ژنی ماندگاری فراهم شود (۷). امروزه روش‌هایی که با استفاده از ناقلین ویروسی و

غیر ویروسی قابلیت انتقال ژنی را به نقطه هدف دارند، سیستم‌های تحویل ژن نامیده می‌شوند. مطلوب‌ترین سیستم تحویل ژن سه ضابطه را در بردارد: ناقل باید دی.ان.ای خارجی را از دسترسی آنزیم‌های هسته‌ای حفظ کند، باید دی.ان.ای خارجی را از غشا سلولی به سمت هسته سلول هدف منتقل کند و همچنین نباید اثر سمی بر روی سلول موجود زنده داشته باشد (۱۶).

در این مقاله‌ی مروری، انواع روش‌های تحویل ژن را در ژن درمانی به دو دسته روش‌های دارای ناقلین ویروسی و روش‌های دارای ناقلین غیر ویروسی مورد بحث قرار خواهیم داد. در حالی که عوامل ویروسی دارای قابلیت انتقال بالایی هستند، اما بکارگیری آن‌ها به علت ایجاد سمیت در سیستم‌های بیولوژیکی مشکل و دچار چالش است. در عین حال عوامل غیر ویروسی دارای سمیت بسیار پایین و از طرفی قابلیت انتقال پایینی هستند. بنابراین امروزه هدف اصلی مطالعات در حیطه ژن درمانی تمرکز بر چگونگی ایجاد حامل‌های ویروسی با سمیت کم و راندمان بالای از دست نرفته در آن‌ها، و حامل‌های غیرویروسی با حداکثر قابلیت انتقال و حفظ ایمنی‌زایی کم و سمیت پایین در آن‌ها است.

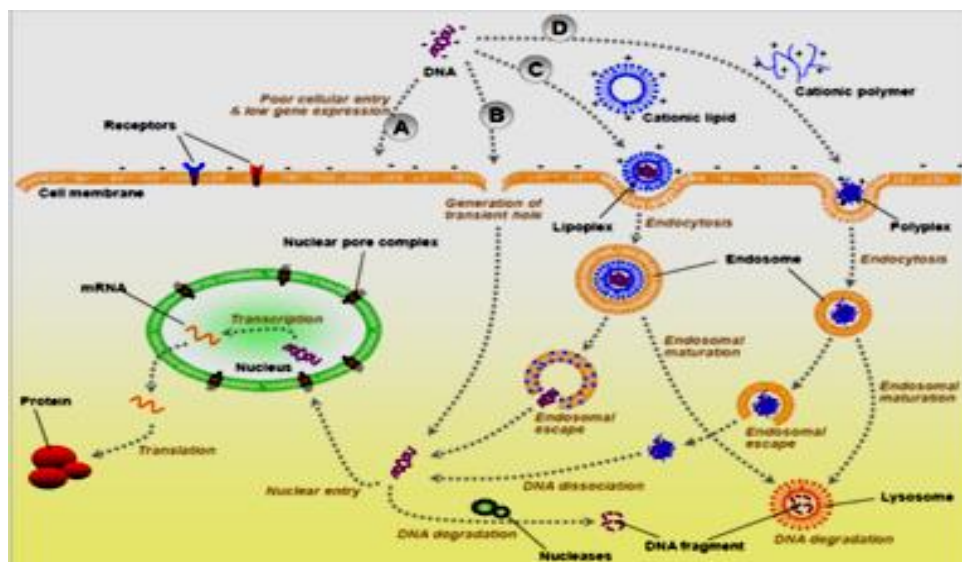
۱- روش‌های تحویل ژنی توسط حامل‌های غیر ویروسی

عموما روش‌های انتقال ژن توسط حامل‌های غیر ویروسی به دو دسته فیزیکی و شیمیایی رده‌بندی می‌شوند. روش‌های فیزیکی به گونه‌ای است که دی.ان.ای برهنه و یا پلاسمید، بدون استفاده از ناقل و به وسیله نیروهای فیزیکی جهت نفوذپذیر کردن غشا

"اکبریان و همکاران، روش‌های نوین انتقال ژن..."

فعل و انفعالات شیمیایی حاصل از ناقلین شیمیایی است (۱۸،۳۰). شکل ۱ انتقال ژن از طریق هر کدام از این روش‌ها را به تصویر کشیده است.

سلولی دی.ان.ای خارجی را به سلول هدف منتقل می‌کنند، در حالی که اساس روش‌های شیمیایی انتقال دی.ان.ای برهنه یا پلاسمید به درون هسته به واسطه



شکل ۱- روش‌های انتقال ژن از طریق حامل‌های غیر ویروسی. دی.ان.ای برهنه توانایی بسیار کمی جهت عبور از غشا سلولی دارد (A). اما به واسطه روش‌های فیزیکی و ایجاد منافذی در سطح غشا این امکان بوجود می‌آید (B). همچنین از طریق روش‌های شیمیایی مثل لیپیدهای کاتیونی (C) و یا بسپارهای کاتیونی (D) می‌توان ماده وراثتی را وارد سلول موردنظر کرد. بعد از ورود به سلول، دی.ان.ای باید از هضم لیروزیمی توسط آندوزوم‌ها فرار کند و همچنین از آسیب نوکلئازهای سیتوپلاسمی نیز حفظ شود. سپس وارد هسته شده و در نهایت موجب بیان پروتئین موردنظر شود (۳۰).

۱-۲- روش‌های فیزیکی انتقال ژن

اصولا پلاسمیدها به علت ایمنی‌زایی پایین و کم بودن خطر ایجاد جهش‌زایی الحاقی به عنوان نوعی از دی.ان.ای برهنه در عرصه ژن درمانی متداول باقی مانده‌اند. اما، بیان ژنی گذرا که ناشی از ویژگی‌های اپیزومی است، آن‌ها را به عنوان ناقلین ژن درمانی نامناسب کرده است، زیرا بیان ژنی طولانی مدت برای معالجه لازم است. در عوض ترانسپوزون‌ها علاوه بر این‌که ویژگی‌های دی.ان.ای برهنه و پلاسمیدها را دارند، همچنین قادر به الحاق ژن انتقالی در کروموزوم

میزبان جهت بیان طولانی مدت هستند (۱۸). جهت تبدیل آن‌ها به یک ابزار جهت تحویل ژن از روش دو پلاسمیدی، شامل یک پلاسمید کمکی بیان کننده آنزیم ترانسپوزاز و یک پلاسمید دهنده دارای توالی‌های انتهایی تکراری واقع شده در کنار ژن مورد نظر، استفاده شده است. با استفاده از این روش، ترانسپوزون‌ها بطور وسیعی به عنوان ابزارهای ژنتیکی در بی‌مهرگان و گیاهان برای انتقال ژن استفاده شده‌اند (۶).

البته ناقلین پلاسمیدی به علت وجود نقص‌های نامبرده از لحاظ بیان ژنی ضعیف، با بکارگیری

اهداف توسط بسته‌بندی دی.ان.ا به واسطه تعاملات الکترواستاتیکی بین دی.ان.ا آنیونی و کاتیون‌ها و یا در کپسول قرار دادن توسط بسپارهای زیست‌سازگار صورت می‌پذیرد (۷).

۱-۲-۲- لیپوزوم‌ها

طبیعت دوگانه دوست (Amphiphilic) لیپوزوم‌ها، سهولت تغییرات سطحی آن‌ها و ویژگی‌های زیست سازگاری در آن‌ها، لیپوزوم‌ها را تبدیل به راه‌حلی جذاب برای افزایش نیمه عمر گردشی پپتیدها، پروتئین‌ها، cDNA ها و SiRNA ها می‌کند (۱).

طراحی لیپوزوم‌ها می‌تواند طوری صورت گیرد که به غشای سلولی چسبیده و داروها یا cDNA را بعد از بلعیده شدگی به داخل سلول تحویل دهند (۱). لیپوزوم‌ها به واسطه تطبیق‌پذیری، بار و عملکردهای متنوع سطحی که موجب بهبود تاثیر آن‌ها در شرایط درون موجود زنده می‌شود، به عنوان روش‌های تحویلی استفاده می‌شوند. احتمالاً عدم تاثیر گسترده آن‌ها در پزشکی به واسطه پایداری زیستی محدود آن‌ها است. ایجاد لیپوزوم‌هایی با مدت زمان طولانی شده جهت گردش در بدن با عامل‌دار کردن آن‌ها توسط پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG) فراهم می‌شود. افزایش نیمه عمر گردش در لیپوزوم‌های پوشیده شده توسط PEG موجب کنترل بهتر تحویل داروهای درمانی به سلول‌ها می‌شود (۴).

البته انواع منحصر بفردی از ساختارهای لیپیدها در اثر چند ریختی ساختار آن‌ها ایجاد شده که شامل فازهای مکعبی، شش وجهی و اسفنجی می‌باشد (۲۵). این ساختارها برای تحویل ژن، واکسن و دارو استفاده شده است و مزیت‌هایی از جمله پایداری و عملی

روش‌های فیزیکی برای بهبود دادن این ضعف می‌توانند به عنوان جایگزینی برای دیگر روش‌های انتقال ژن استفاده شوند. روش‌های فیزیکی شامل فن‌آوری تفنگ ژنی، فراصوت و تزریق هیدرودینامیک و از همه معمول‌تر شوک الکتریکی است (۱۸). شوک الکتریکی یک فن‌آوری تثبیت شده است که با نفوذپذیر کردن موقت غشای سلولی به واسطه ضربان‌های ولتاژ کوتاه، اجازه جذب طیف وسیعی از مولکول‌های زیستی را می‌دهد (۲۳).

پایداری ناقلین دی.ان.ا با وزن مولکولی بالا، نقطه کلیدی بهبود روش‌های تحویل ژنی است. تمام ناقلین دی.ان.ا با وزن مولکولی بالا، مستعد آسیب هستند. ستون فقرات دی.ان.ا با بار منفی فسفات موجب خود تدافعی بودن آن شده و منطقی است که تصور شود تعدادی نقاط چسبنده (Sticky points) پراکنده در سطح دی.ان.ا، به دام افتادن دی.ان.ا را تسهیل می‌کنند (۲۹). البته لازم به ذکر است که انتقال از طریق دی.ان.ا برهنه در عرصه‌های مختلف از جمله تزریق درون ماهیچه‌ای جهت واکسیناسیون دی.ان.ا، درمان ژنی ژن کد کننده فاکتور رشد درون پوششی عروقی (vegf) در کم‌خونی موضعی عضله قلب و تزریق داخل غده‌ای در برخی درمان‌های سرطان موفقیت آمیز بوده است (۱۸).

۲-۲- روش‌های شیمیایی انتقال ژن

ناقلین شیمیایی به سه علت انتقال ژن به هسته سلول را بهبود می‌دهند: آن‌ها بارهای منفی دی.ان.ا را می‌پوشانند، مولکول دی.ان.ا را فشرده می‌کنند تا اندازه کوچکتری داشته باشد و آن را از هضم شدن توسط آنزیم‌های نوکلئاز داخل سلولی حفظ می‌کنند. این

بودن تولید را در اختیار می‌گذارند (۷، ۳۰).

پروتئین‌های حاوی چربی (Lipoprotein) ترکیب شده با دی.ان.ا که لیپوپلکس نام دارند می‌توانند به انواع کاتیونی، آنیونی، خنثی و یا ترکیبی از سه حالت اصلاح شوند (۱۸). محدودیت اصلی لیپوپلکس‌ها در شرایط درون آزمایشگاه سمیت سلولی است که در اثر بار مثبت آن‌ها ایجاد می‌شود. در حال حاضر لیپیدهای کاتیونی که بصورت خنثی در می‌آیند، بیشترین قابلیت را در انتقال نشان داده و به راحتی می‌توانند پلاسمیدها را درگیر کنند (۷).

یکی از پیشرفت‌های مهم در مطالعات مربوط به لیپوزوم‌ها، شامل افزایش طول عمر آن‌ها به واسطه کاهش فعالیت سلول‌های فاگوسیتی بر روی آن‌ها بوده است. همچنین پیشرفت‌های اخیر در تحویل ژنی به واسطه لیپوزوم‌ها شامل شیمی درمانی سرطان، لیپوزوم‌های نانو ذره‌ای که بسیار نوید بخش‌اند و تحویل ژن به مغز می‌باشند (۱۸).

۲-۲-۲- بسپارها (Polymers)

بسپارها می‌توانند به دو صورت طبیعی (مثل کیتوسان و دکستران) و یا مصنوعی آب دوست (مثل پلی‌وینیل الکل، پلی‌اکریلیک اسید و پلی‌اتیلن گلیکول) و آب گریز (مثل سیلیکون‌ها) باشند (۷).

بسپارهای بسته‌بندی کننده دی.ان.ا همزمان با افزایش پایداری دی.ان.ا و بالا بردن جذب سلولی، دی.ان.ا را

درون هسته آزاد می‌کنند. از بسپارهای کاتیونی در pH فیزیولوژیک جهت متراکم‌سازی دی.ان.ا به ابعاد نانو استفاده می‌شود، که در نتیجه‌ی برهمکنش‌های الکتروستاتیک آن‌ها، پلی‌پلکس‌ها ایجاد می‌شوند. برهمکنش‌های پایدار الکتریکی بین دی.ان.ا با بار منفی و بسپارها برای تشکیل مجموعه‌های نانو، علاوه بر این که جذب دی.ان.ا را افزایش می‌دهد، فعالیت آنزیم‌های نوکلئاز را بر روی دی.ان.ا کاهش می‌دهد. در حالی که متراکم کردن دی.ان.ا توسط این روش، قابلیت‌های نقل و انتقالی آن را بسیار بهبود می‌دهد، اما برای استفاده از این روش در شرایط درون موجود زنده، محدودیت‌های بسیاری از جمله سمیت، کارآمدی پایین و نبود آگاهی راجع به راهکارهای انتقال ژن توسط این روش باید مورد توجه قرار گیرد (۷).

اخیرا دانشمندان جهت رفع کردن این موانع با طراحی ساختارهای بسپاری زیست‌سازگار متفرق تکی (Mono-dispersed)، سمیت را توسط پوشاندن بار مثبت کاهش داده‌اند. تا به امروز انواع مختلف ساختارهای پلی‌پلکس در هر دو شرایط درون آزمایشگاه و درون موجود زنده، از جمله پلی‌ال-لازین، پلی‌اتیلن‌ایمین و پلی‌آمیدوآمین و پلی‌پروپیلن‌ایمین جهت انتقال ژن بکار برده شده‌اند. جدول شماره ۱ به اختصار به توضیح مزیت‌ها و معایب انواع روش‌های فیزیکی و شیمیایی می‌پردازد (۱۸).

جدول ۱- مزیت‌ها و معایب روش‌های انتقال ژن توسط حامل‌های غیر ویروسی

روش	مزیت‌ها	معایب
تفنگ ژنی	مطمین، موثر	ایجاد آسیب در بافت‌ها
تزریق	آسان، تکرار پذیر، به شدت موثر	حجم تزریقی بالایی لازم دارد که کاربردهای پزشکی آن‌ها را محدود می‌کند.
هیدرودینامیک		
لیپیدهای کاتیونی	آماده سازی آسان، هزینه کم، به شدت موثر در شرایط درون آزمایشگاه	سمیت، راندمان پایین در شرایط درون موجود زنده
بسپارهای کاتیونی	آماده سازی آسان و قابل دستکاری از لحاظ شیمیایی، هزینه‌های پایین، به شدت موثر	سمیت، بعضی بسپارها زیست ناسازگار اند

۲-۳- فن آوری نانو

فن آوری نانو در علم پزشکی برای تحویل داروهای درمانی و توسعه درمان انواع بیماری‌ها و اختلالات بکار می‌رود. ذرات نانو درون سلولی به عنوان مخزنی از دارو عمل کرده و پناهگاهی را برای حفاظت ترکیبات دارویی از انتشار به خارج سلول و یا هضم فراهم می‌کنند. تحویل مبتنی بر نانو ذرات به عنوان یک روش امیدبخش برای بهبود کارایی و توسعه درمان‌های جدید پدید آمده است (۱۹).

۱-۲-۳- نقاط کوانتومی (Qdots)

نقاط کوانتومی، ذرات نانوی نورانی هستند که بطور معمول جهت تصویربرداری در روش‌های زیست‌شناسی بکار می‌روند. نقاط کوانتومی قابلیت عظیمی را جهت فراهم کردن مکانیزم‌هایی برای مشاهده انتشار، تجزیه، آزادسازی دارو و پاکسازی ناقلین درون سلولی و سیستمی ارائه می‌دهند (۳۱). در حالی که استفاده مستقیم از نقاط کوانتومی برای تحویل دارو ظرفیت ایجاد سمیت طولانی مدت دارد، اما می‌توان به مزیت‌هایی از جمله قابلیت جایگزین شدن آسان آن‌ها با ناقلین داروهای آلی و یا عوامل انتقالی زیست سازگار معدنی، و همچنین فراهم کردن

عملکردهای درمانی دیگری مثل درمان‌های نوری-حرارتی و انتقال مغناطیسی (Magneto-transfection) اشاره کرد (۲۰).

۲-۲-۳- نانوذرات مغناطیسی (Magnetic nanoparticles)

علم اصول انتقال مغناطیسی اولین بار در اوایل سال ۲۰۰۰ توسعه یافت (۲۴). اساس آن مبنی بر ارتباط نانو ذرات مغناطیسی با ناقلین ویروسی و غیرو ویروسی جهت بهینه‌سازی تحویل ژن در حضور میدان مغناطیسی و همچنین تمرکز اجتماعات درمانی در مناطق مورد نظر است. ارتباط روش‌های تحویل ژنی مبتنی بر ناقلین ویروسی با فن‌آوری نانو در حال حاضر ارائه کننده توسعه راهبردهایی دقیق‌تر با سمیت کمتر می‌باشند (۸).

۳-۳- حامل‌های ویروسی جهت انتقال ژن

ذهنیت درمان بیماری‌های انسانی به واسطه انتقال ژن‌های درمانگر، اولین بار در سال ۱۹۸۰ شکل گرفت. در همان زمان بود که قابلیت ویروس‌ها به عنوان حاملین ژنی تشخیص داده شد. جهت استفاده از یک ویروس به عنوان حامل انتقال دهنده آن باید در

"اکبریان و همکاران، روش‌های نوین انتقال ژن..."

همچنان استفاده بیش از پیش آن‌ها را دچار تردید می‌کند، از جمله:

- اندازه محدود ژنی که می‌تواند توسط ویروس منتقل شود.

- تولید حامل‌های ویروسی در مقیاس بالا بسیار سخت و هزینه‌بر است.

- واکنش ایمنی حاد ایجاد شده توسط حامل‌های ویروسی که می‌تواند کشنده باشد.

ویروس‌هایی که بیشترین کاربرد را به عنوان حامل دارند، شامل رتروویروس‌ها، آدنوویروس‌ها، ویروس‌های مرتبط با آدنوها (Adeno-associated viruses) و سیمپلکس هرپس ویروس‌ها (Simplex herpes virus) هستند (۷، ۱۴). جدول ۲ ویروس‌های اصلی استفاده شده به عنوان سیستم انتقال ژن را همراه با توضیح کوتاهی از مزیت‌ها و معایب هر کدام از آن‌ها ذکر می‌کند.

جدول ۲- مزیت‌ها و معایب اصلی‌ترین حامل‌های ویروسی

محدودیت‌ها	مزیت‌ها	حامل ویروسی
ایمنی‌زایی بسیار بالا، القا واکنش‌های ایمنی سلولی و همورال مهمی که می‌توانند کشنده باشند.	آماده سازی آسان در تیتراهای بالا، آلوده کردن انواع سلول‌ها، الحاق قطعات بزرگ دی.ان.ا.	آدنوویروس‌ها
جهش‌زایی الحاقی	ایمنی‌زایی پایین، امکان الحاق قطعات بزرگ دی.ان.ا. (۸ کیلوباز)	رتروویروس‌ها لنتی ویروس‌ها
ظرفیت محدود برای الحاق قطعات بزرگ دی.ان.ا.	ایمنی‌زایی پایین، سهولت در آماده‌سازی در تیتراهای بالا، آلوده کردن انواع زیادی از سلول‌ها، بیان ژنی طولانی مدت	AAV

یکپارچه باقی می‌گذارند. ویروس‌های کشنده، شامل آدنوویروس‌های انسانی و خانواده سیمپلکس هرپس ویروس‌ها، موجب تخریب سلول عفونت یافته بعد از تکثیر و تولید اجزاء ویروسی می‌شوند. طبیعت ویروس‌ها در تشخیص و تعیین استفاده از هر کدام از

ابتدا مورد دستورزی ژنتیکی قرار گیرد. بدین صورت که بخش بیماری‌زای ژن آن توسط ژن درمانگر جایگزین شود، در عین حال ویروس همچنان ساختار غیر بیماری‌زای خود را حفظ کرده تا بتواند سلول را آلوده کند. در نهایت ویروس غیر بیماری‌زای حمل کننده ژن درمانگر با نام حامل ویروسی خوانده می‌شود. تعامل بین یک حامل و ژنوم سلول میزبان بطور کامل حذف نمی‌شود. حامل حاوی ژن درمانگر می‌تواند در ضمن فرآیند نوترکیبی، ژن ویروسی حذف شده را باز پس گیرد. سپس ژنوم نوترکیب فعال می‌شود. این حامل‌های رقابت کننده با تکثیر واکنش‌گر (Reactants) نام دارند که می‌توانند ژن درمانگر را طی نوترکیبی از دست دهند و بنابراین هدف بسیاری از مطالعات مربوط به عفونت‌ها هستند. امروزه حامل‌های ویروسی به علت راندمان انتقال بالایی که دارند از رایج‌ترین حامل‌های استفاده شده می‌باشند. اما در عین حال، ایمنی‌زایی بالایی دارند که

ویروس‌های بکار برده شده به عنوان حامل‌های انتقالی، بنابر روش‌های مختلف تکثیر و بقا در دو دسته قرار می‌گیرند. ویروس‌های غیرکشنده شامل رتروویرون‌ها و لنتی ویروس‌ها است که اجزاء ویروسی آن‌ها، سلول عفونت یافته را به طور نسبی

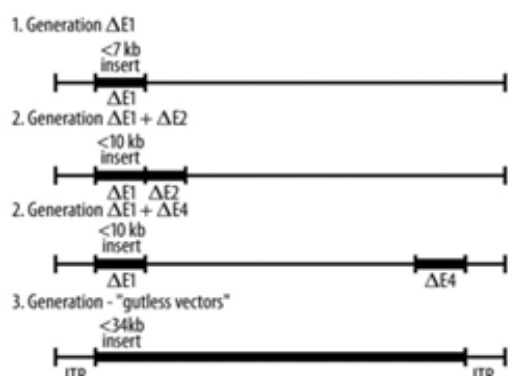
حامل‌های ویروسی نو ترکیب در کاربردهای پزشکی حائز اهمیت است. در حال حاضر هدف در طراحی حامل‌های ویروسی، کاهش دادن خطر سمیت آن‌ها تنها به واسطه استفاده از اجزاء ضروری ویروس جهت انتقال به سلول هدف و بیان ژن خارجی و با حفظ قابلیت تکثیر و تولید در آن‌ها است (۵).

۱-۳- آدنوویروس‌ها

آدنوویروس از جمله بهترین و پر کاربردترین سیستم‌های انتقال ژن است که می‌تواند بر محدودیت‌های موجود در رتروویروس‌ها غلبه کند. بیش از ۵۰ نوع از آدنوویروس‌ها تا به حال شناسایی شده است، که از جمله پرکاربردترین آن‌ها برای ژن-درمانی نوع ۲ و ۵ هستند. گروهی از آدنوویروس‌ها که با بیماری‌های انسانی ارتباط نشان داده‌اند، به علت قابلیت‌شان در عفونی کردن بافت‌ها، مستعد استفاده به عنوان حامل‌های انتقالی ژن‌ها هستند. آدنوویروس‌های نو ترکیب را می‌توان در غلظت‌های بسیار بالا (۱۰^{۱۱}- ۱۰^{۱۰} ذره ویروسی در میلی‌لیتر) در شرایط درون آزمایشگاه بدست آورد و به راحتی قابل دستکاری هستند. ظرفیت آن‌ها برای الحاق کردن دی.ان.ای خارجی تا ۸/۵ کیلوباز است که به‌طور معمول برای ژن‌های درمانی کفایت می‌کند (۱۱، ۲۰).

سه نسل از حامل‌های آدنوویروسی در گذشته جهت کاهش تاثیرات آلوده کنندگی سلولی و واکنش‌های ایمنی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (شکل ۲). اولین نسل شامل یک حذف در ناحیه E1 بوده، که کدکننده محصولات تنظیم کننده فعالیت سنتز دی.ان.ا و بیان دیر هنگام ویروسی است، که طی آن ۷ کیلوباز از دی.ان.ا در آن جای می‌گیرد. این نسل در تولید اجزاء

عفونی در سلول هدف ناتوان بوده و ایمنی‌زایی ویژه‌ای دارد. بنابراین برای تضعیف بیشتر ویروس، دیگر اجزاء ژنوم ویروسی نیز حذف شدند. نسل دوم نیز علاوه بر حذف ناحیه E1 حذف‌هایی در نواحی E2 و E4 دارد. البته در نسل دوم همچنان بیان طولانی مدت بدون تاثیرات آلوده کنندگی سلولی بدست نیامده است. سومین نسل حامل‌های آدنوویروسی، "حامل‌های گاتلس" نام دارند، که آن‌ها تنها شامل توالی‌های تکراری معکوس انتهایی (ITR) عمل کننده در ناحیه سیس (Cis- acting) و پیام‌های بسته‌بندی هستند.



شکل ۲- سه نسل ایجاد شده از حامل‌های آدنوویروسی. این نسل‌ها به ترتیب جهت پایین آوردن ایمنی‌زایی حامل‌ها و همچنین افزایش ظرفیت الحاق دی.ان.ا توسعه یافته‌اند (۵).

از ویژگی‌های این حامل‌ها، ایمنی‌زایی به شدت تقلیل یافته است که در صورت مکمل نبودن تکثیر نمی‌شوند. این حامل‌ها باید توسط آدنوویروس‌های کمکی حمایت شوند، تا تمام ژن‌های مربوط به تکثیر شدن را بصورت ترانس (Trans- acting) در اختیار آن‌ها بگذارد. در ضمن این حامل‌ها ظرفیت بسته‌بندی بالایی تا ۳۲ کیلوباز از دی.ان.ای خارجی را دارند که از مزیت‌های آن‌ها بشمار می‌آید (۵).

آدنوویروس‌ها قابلیت برابری جهت آلوده کردن

سلول‌های در حال تقسیم و سلول‌های خاموش با راندمان بالا دارند. بنابراین انتقال ژن درون سلول‌های هدف غیر تقسیم شونده با سطح بالایی از تمایز برای آن‌ها آسان است. از دیگر مزیت‌های آن‌ها می‌توان به پیچیدگی، پایداری و اختصاصیت سلولی وسیع آن‌ها اشاره کرد. این گونه از ویروس‌ها در ژنوم میزبان الحاق نمی‌شوند و توالی‌های ویروسی در دودمان سلول‌های میزبان حضور ندارند. نتیجه طبیعت ملحق نشونده حامل‌های آدنوویروسی، بیان گذرای ژن‌های خارجی منتقل شده است. البته محدودیت این‌گونه حامل‌ها، واکنش التهابی به واسطه سلول‌های B و T است که در نتیجه فعالیت زود هنگام سلول‌های ایمنی ایجاد می‌شود. بنابراین راندمان انتقال ژن و سلامت بیمار تحت تاثیر قرار می‌گیرند. از دیگر معایب آدنوویروس‌ها می‌توان به بیان کوتاه مدت آن‌ها (به خصوص در سلول‌های تقسیم شونده)، انتقال سخت و یا محدود سلول‌ها به واسطه بیان تقلیل یافته از گیرنده‌های مسئول اتصالات و درون قرارگیری ویروس‌ها، بیان گذرای ژن خارجی و همچنین ایمنی‌زایی اشاره کرد (۱۱، ۱۳).

کاربردهای متنوعی برای این حامل‌ها وجود دارد. از بیشترین مطالعات انجام شده می‌توان به ژن درمانی برای غده‌های پروستات، روده بزرگ، قفا، تخمدان و سیستم عصبی مرکزی و همچنین برای بیماری‌های ژنتیکی از جمله هموفیلی، دیابت خودایمنی برای تولید واکسن‌های ویروسی و همچنین تولید پروتئین‌های نو ترکیب اشاره کرد (۲۰).

یکی از نتایج منحصر به فرد توسط کیم و همکاران در سال ۲۰۰۱ در خصوص ژن‌درمانی با استفاده از

حامل‌های نسل سوم منتشر شد. آن‌ها یک آدنوویروس گاتلس حامل ژن *ApoE* برای درمان موش‌هایی با نقص آپولیپوپروتئین ای (Apolipoprotein E)، که ایجاد افزایش بیش از حد کلسترول (Hyper Cholestrolemia) بطور خودبخودی می‌کرد، استفاده کردند. این موش‌ها در دوازدهمین هفته زندگی خود یک تزریق درون رگی از حامل آدنوویروسی ژن *ApoE* دریافت کردند. این تزریق غلظت *ApoE* پلاسمای موش‌ها را به حد طبیعی رساند و بنابراین سطح کلسترول موجود در پلاسمای آن‌ها را به میزان موجود در موش‌های وحشی کاهش داد. البته مهمترین و چشمگیرترین نتیجه حاصل مربوط به مدت زمان اثر محافظتی این ژن درمانی بوده است که حداقل ۲/۵ سال گزارش شده، که این مقدار در واقع همان طول عمر موش‌ها بوده است (۱۰).

یک پیشرفت در این حیطه، استفاده از پروتئین‌های کاسپید مشتق شده از دیگر گونه‌های آدنوویروسی است. همچنین ایمنی‌زایی آن‌ها نیز می‌تواند در درمان سرطان‌ها موثر باشد، زیرا سیستم ایمنی بیمار را بر علیه سلول‌های غددی تحریک می‌کند (۱۰).

۳-۲- ویروس‌های مرتبط با آدنوها (AAV)

AAV یک پاروویروس درون ژن دپندوویروس است. دپندوویروس‌ها غیر خودبخودی‌اند بطوری که جهت تکثیر نیاز به همراهی ویروس‌های کمکی جهت عفونت دارند. ژنوم AAV شامل یک دی.ان.ای تک رشته‌ای در حدود ۴/۷ کیلو باز است که در دو انتهای ۳' و ۵' به واسطه توالی‌های تکراری معکوس انتهایی (ITR) احاطه شده است. تصور می‌شود که ITR یک ساختار سنجاق سری "T" شکل ایجاد کرده که به

عنوان مبدا شروع همانندسازی عمل می‌کند. سنتز رشته دوم که در سلول میزبان رخ می‌دهد، به چندین آنزیم سلولی احتیاج دارد. پروتئین‌های همانندسازی ویروسی نیز جهت همانندسازی و بسته‌بندی ژنوم لازم هستند. در فقدان ویروس‌های کمکی، ژنوم فاز پنهان (Latent) بصورت اپی‌زوم باقی می‌ماند (۲۸).

هیچ بیماری انسانی با عفونت‌های AAV ارتباط نشان نداده‌اند، که می‌تواند از ویژگی‌های قابل تامل آن‌ها به عنوان حامل‌های ژنی بشمار بیاید. شش سروتیپ از AAV شناسایی شده که در میان آن‌ها AAV2 بیشترین کارایی را در مطالعات انتقال ژنی داشته است. ورود AAV2 به داخل سلول به واسطه اتصال آن به هپارین سولفات پروتئوگلیکان همراهی می‌شود. البته رسپتور فاکتور رشد فیبروبلاستی نیز می‌تواند در این فرآیند دخیل باشد. توزیع این مولکول‌های نام برده بر روی انواع مختلف سلول‌ها می‌تواند بیان امتداد یافته در موجود زنده را توضیح دهد. به همین علت درمان توسط AAV تا به حال در بافت‌های کبد، مغز، ماهیچه اسکلتی، ریه و سلول‌های خونساز بنیادی مدل‌های حیوانی مشاهده شده است (۱۸).

حامل‌های AAV هیچ‌گونه ژن‌های ویروسی ندارند که بتواند واکنش‌های التهابی و ایمنی ناخواسته را ایجاد کند. اولین واکنش میزبان که ممکن است تأثیرات ناخواسته‌ای ایجاد کند، تولید آنتی‌بادی‌های خنثی کننده علیه اجزاء ویروسی است (۲۰).

یکی از اصلی‌ترین نگرانی‌ها برای توسعه بکارگیری حامل‌های AAV برای انتقال ژن، بسته‌بندی نشدن مناسب توالی‌های دی.ان.ا. بزرگتر از ۴/۷ کیلوباز است

و همچنین تیتراژ حامل‌ها به شدت کاهش می‌یابد، که در نتیجه محدودیت الحاقی برای cDNAها ایجاد می‌کند. یکی دیگر از موارد حائز اهمیت الحاق نسبتاً مکرر ژنوم AAV داخل کروموزوم سلول میزبان است. البته شواهد موجود بیان کننده این است که الحاق AAV نوع وحشی در شرایط درون موجود زنده، منعکس کننده مشاهدات آزمایش‌ها درون آزمایشگاه نبوده، بلکه در این شرایط یک اتفاق نادر رخ داده و ژنوم AAV بیشتر به صورت اپی‌زوم باقی می‌ماند، همان‌طوری که برای حامل‌های AAV نیز نشان داده شده است. یکی دیگر از محدودیت‌های این حامل‌ها، وابستگی بیان ژن منتقل شده به سنتز رشته ثانویه است، که باعث کاهش سرعت انتقال سلولی می‌شود. حامل‌های خود تکمیلی sCAAV (Self-complementary) در سال ۲۰۰۱ جهت حذف وابستگی به سنتز رشته دوم توسعه یافتند. این حامل‌ها دارای یک ITR جهش یافته‌اند که در مرکز دو رونوشت از توالی ژن منتقل شده مقرر شدند. این دو توالی بصورت معکوس و مکمل یکدیگر قرار دارند که به ژنوم اجازه می‌دهد خودبخود متصل شده و یک مولکول دو رشته‌ای ایجاد کند. این نوع حامل‌ها باعث بیان زودهنگام و بیشتر ژن منتقل شده می‌شوند، اما اندازه کاست آن ژن را با اندازه ۲/۲ کیلوباز محدود می‌کند (۱۵).

محدودیت ظرفیت حامل‌های sCAAV و ssAAV برای انتقال ژن‌های بیش از ۵ کیلوباز باعث ایجاد نسل جدیدی از حامل‌ها در سال ۲۰۰۹ شده است که بتوانند تا ۸ کیلوباز ژن را انتقال دهند. در این روش، کاست ژنی بین دو حامل توزیع می‌شود که بازیابی ساختار اولیه ژن پس از بیان در گرو نوترکیبی است

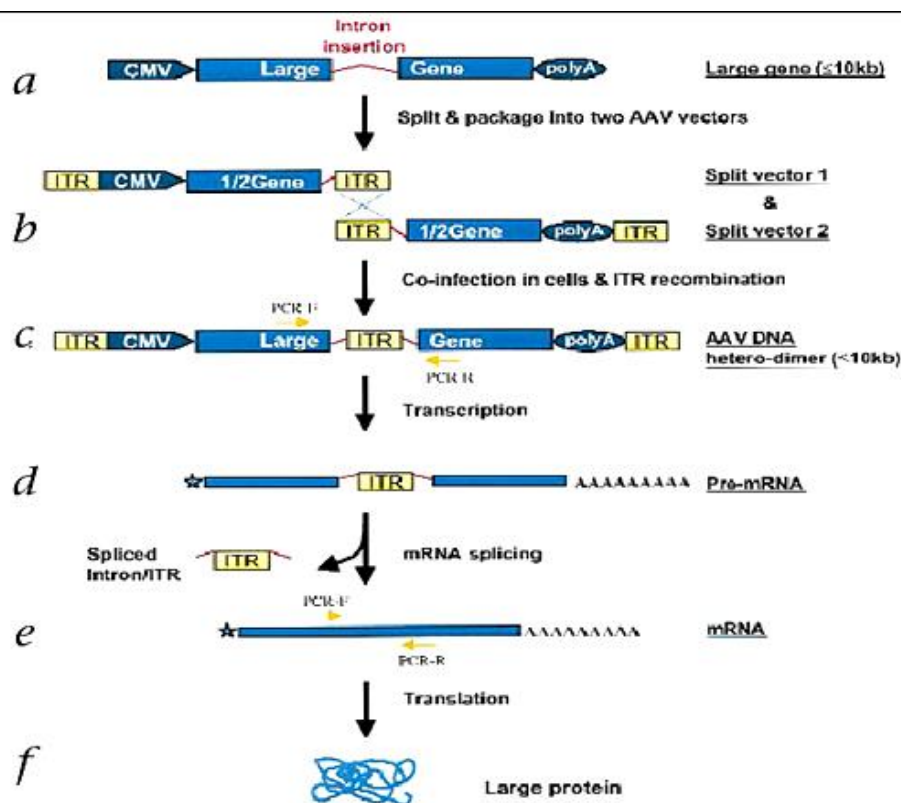
"اکبریان و همکاران، روش‌های نوین انتقال ژن..."

هموفیلی B موفقیت آمیز بوده است. کاربردهای بالینی حامل‌های AAV توسعه امیدبخشی را در درمان بیماری‌های انسانی مثل انفارکتوس ماهیچه قلبی، سیروز کبدی و غدد پانکراس و روده نوید می‌دهند (۱۸).

با توجه به این یافته‌ها و همچنین مشاهده نشدن هیچ گونه از واکنش‌های ایمنی سلولی در میزبان، به نظر می‌رسد این گونه از حامل‌ها از روش‌های بسیار موثر در ژن درمانی انسانی است (۱۷).

(شکل ۳). این حامل‌ها دوبخشی (Split) نام دارند. طراحی این حامل‌ها به صورتی است که یک جایگاه دهنده در حامل دارای نیمه ۵' ژن و یک جایگاه گیرنده در حامل دارای نیمه ۳' ژن قرار دارند. که نوترکیبی بین این دو داخل یک اینترون رخ می‌دهد. با وجود این که اندازه‌های بزرگتری از ژن در این نوع حامل‌ها نسبت به دو نوع حامل دیگر قرار می‌گیرد، اما سطح بیان ژن کاهش می‌یابد (۱۸، ۱۷، ۵).

آزمایش‌های بالینی فاز I توسط حامل‌های AAV تا به حال برای ژن درمانی بیماری‌های سیستمیک فیروز و



شکل ۳- نمایش عملکرد حامل‌های دوبخشی. در این حامل‌ها ژن‌های بزرگ در دو حامل توزیع می‌شوند که بدین وسیله در سیستم منتقل شده بر روی ژن‌های خارجی نوترکیبی رخ داده، ام.آر.ان.ا. آن‌ها ویرایش شده و بیان صورت می‌پذیرد (۱۵).

حامل‌های دو رگه (Hybrid vectors)

با توجه به مباحث مطرح شده، هر کدام از روش‌های نامبرده جهت حمل و انتقال ژن شامل حامل‌های غیر ویروسی و حامل‌های ویروسی، دارای ضعف‌ها و محدودیت‌هایی بوده‌اند. به این منظور پشت سرگذاشتن این معایب و بهره برداری از فواید و مزیت‌های تمام انواع حامل‌ها، ساخت انواع جدیدی از حامل‌های ترکیبی با نام حامل‌های دو رگه مورد توجه قرار گرفته است (۹). انواعی از این‌گونه حامل‌های دو رگه شناخته شده‌اند که به ذکر آن‌ها می‌پردازیم:

a- ویروزم‌ها: به وسیله ادغام لیوپلکس‌ها با ویروس آنفولانزا تولید می‌شوند. این نوع حامل‌ها در انتقال ژنی به داخل مجاری تنفسی توانمند شناخته شده‌اند، زیرا که راندمان انتقال آن‌ها بسیار بالاتر از لیپوزوم‌های کاتیونی و یا حامل‌های ویروسی است. همچنین، این‌گونه حامل‌ها از منظر ایمنی به خوبی تطابق‌پذیر بوده‌اند و حتی تزریق‌های متمادی آن‌ها راندمان و ایمنی انتقال را تحت تاثیر قرار نمی‌دهد (۲۲).

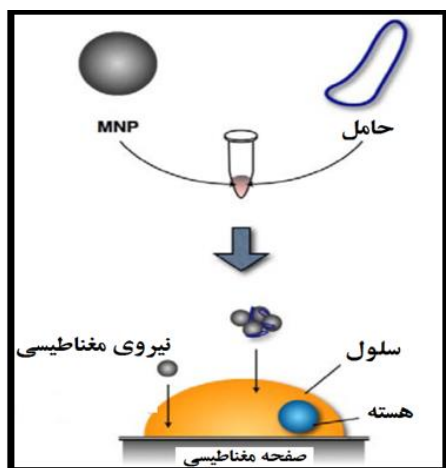
b- نوع دوم بواسطه دورگه‌سازی بسپارها و یا لیپوزوم‌های کاتیونی با حامل‌های آدنوویروسی ایجاد می‌شوند. این‌گونه حامل‌ها، بخصوص در انتقال به سلول‌های فاقد گیرنده‌های ویروسی موثراند. همچنین اثبات شده که اتصالات آدنوویروس‌های غیرفعال، راندمان انتقال را به کمک بسپارها و یا لیپوزوم‌های کاتیونی بهبود می‌دهند (۱۲).

c- ویروس‌های دو رگه نیز به واسطه ترکیب چندین نوع از حامل‌های ویروسی ایجاد می‌شوند. این‌گونه حامل‌ها از مزیت‌های اصلی ویروس‌های مجزای تشکیل دهنده خود بطور کامل بهره می‌برند. یک مثال

دورگه‌سازی آدنوویروس‌ها با ویروس اپستین- بار (EBV) است که همانند آدنوویروس‌ها تیتراهای بالایی داشته و مشابه EBV، در صورت وجود حالت اپی‌زوم پایدار، حضور طولانی مدتی در سلول دارند (۲۷).

استفاده از نانو ذرات مغناطیسی و میدان مغناطیسی جهت بهبود انتقال ژن توسط حامل‌های ژنی

امروزه ارتباط نوین بین حامل‌های انتقال ژنی ویروسی و غیر ویروسی با فن‌آوری نانو، احتمال توسعه راهبردهای انتقال ژنی دقیق‌تری را برای کاربردهای متعددی ارائه می‌دهد. مفهوم انتقال مغناطیسی، اولین بار در سال ۲۰۰۲ گزارش شد که طی آن، روش هدف قراردادن دارویی بصورت مغناطیسی جهت انتقال ژن استفاده شد (۱۸). بنابراین انتقال مغناطیسی براساس ارتباط نانو ذرات مغناطیسی (MNP) و حامل‌های ویروسی و غدد ویروسی است تا انتقال ژن را در حضور میدان مغناطیسی بهینه سازد (شکل ۴).

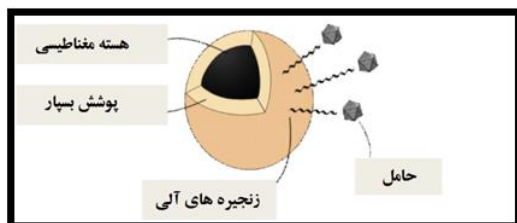


شکل ۴- روش انتقال مغناطیسی. طی این روش مجموعه‌های ایجاد شده از حامل‌های ویروسی و غیرویروسی مورد نظر با MNPها تحت تاثیر میدان مغناطیسی به طور اختصاصی وارد سلول‌های تثبیت شده بر روی بستر می‌شوند (۸).

"اکبریان و همکاران، روش‌های نوین انتقال ژن..."

زنجیره‌های زنجیره آلی اختصاصی بنابر ضرورت به این ساختار متصل می‌شوند تا جایگاه‌های اتصال جدیدی را برای حامل‌های ژنی ایجاد کنند (شکل ۵).

ساختار کلی MNP تشکیل شده از هسته مغناطیسی مگنتیت و یا ماگمیت که به وسیله بسپارهای مصنوعی پوشانده شده‌اند. وظیفه این بسپارها فراهم کردن حفاظت و عملکردهای زیستی است (۱۸).

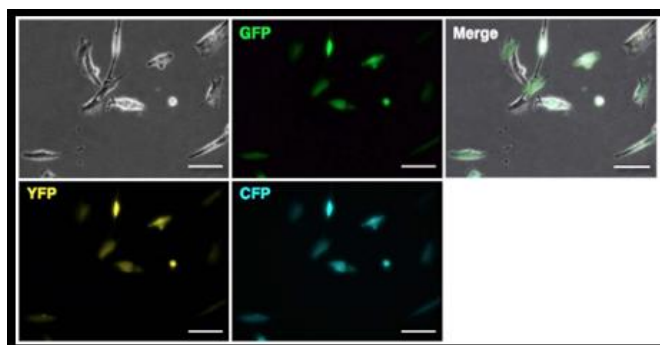


شکل ۵- ساختار نانو ذرات مغناطیسی. این نانو ذرات دارای یک هسته مغناطیسی پوشانده شده توسط بسپارها است که به واسطه زنجیره‌های آلی مجموعه‌هایی با حامل‌های مورد نظر ایجاد می‌کنند (۱۸).

مغناطیسی کنترل می‌کنند (۸).

تا به امروز پیشرفت‌های مهمی در زمینه انتقال مغناطیسی گزارش داده شده است. یکی از گروه‌ها برای بررسی امکان بیان چندین ژن که همزمان توسط این روش به سلول‌ها منتقل شده‌اند، سه پروتئین فلورسانتی همراه شده با MNP را به سلول‌ها القا کردند (۸). مطابق شکل ۶، نشان داده شد که هر سه ژن همزمان بیان شدند. به عبارتی انتقال ژنی توسط MNP می‌تواند مجوز بیان همزمان ژن‌های متعددی را در یک سلول بدهد. این مورد می‌تواند در درمان ژنی بیماری‌های چند ژنی و سرطان‌ها بسیار موثر باشد (۸).

بسیاری از پژوهشگران انواع مختلفی از روش‌های انتقال مغناطیسی را توضیح داده‌اند. آن‌ها سطح MNP مبتنی بر اکسید آهن را جهت افزایش بهبودی انتقال و کاهش سمیت سلولی اصلاح کردند. جهت این منظور، پژوهشگران از عوامل پوششی متعددی از جمله ذرات سیلیکا، بسپار، کربوهیدرات، پروتئین، فسفولیپید، پوشش ویروسی از ویروس‌های غیرفعال و ویروس‌هایی مثل آدنوویروس و رتروویروس استفاده کردند. این عوامل پوششی عموماً همراه با PEI، که یک ناقل ژنی کاتیونی با راندمان انتقالی بالا است استفاده می‌شوند. MNP های پوشانده شده توسط PEI در حالی که در آب پایدارند، به اسیدهای نوکلئیک متصل می‌شوند و رفتار MNP را در حضور نیروی



شکل ۶- قابلیت انتقال همزمان چند ژن در سلول‌ها به واسطه مجموعه‌های ایجاد شده با MNP. سه ژن نشانه GFP، YFP و CFP که بترتیب رنگ‌های سبز، زرد و آبی ساطع می‌کردند، درون پلاسمیدهایی قرار داده شدند، که با MNP ترکیب شده و توسط میدان مغناطیسی همزمان در معرض سلول‌های تثبیت شده به بستر قرار گرفتند. همان‌طور که مشاهده می‌شود همگی بیان شدند که روشن کننده قابلیت این روش بوده است (۸).

به امروز صورت گرفته، اما همچنان باید محدودیت‌های بسیاری برای معمول شدن ژن درمانی در پزشکی پشت سر گذاشته شود. با این وجود پیش‌بینی می‌شود تحقیقات آینده، استراتژی‌های انتقالی اختصاصی شده در سطح بافت و بیماری را ایجاد کرده و چالش‌های امروزه در ژن درمانی را پشت سر گذارد.

سپاسگذاری

نویسندگان از تمام کسانی که با آن‌ها در نوشتن این مقاله همکاری داشته‌اند، نهایت تشکر را دارند.

این مطالعات با ارتقاء و بهبود روش‌ها، راندمان انتقال را افزایش دادند. پیش‌بینی می‌شود در آینده استفاده از انتقال مغناطیسی در مطالعات پژوهشی با نوسانات MNP به عنوان یک روش شناسی نوین توسعه یابد.

نتیجه‌گیری

امروزه تعداد بسیار زیادی از روش‌های مطمئن و کارآمد برای انتقال ژن‌های درمانگر ابداع شده است. البته افزایش رو به رشد این تنوع در روش‌ها، بیانگر عدم وجود یک روش مطلوب و مشخص در این عرصه است. در حالی که آزمایشات بالینی متعددی تا

References

- 1- Bhavsar D, Subramanian K, Sethuraman S, Krishnan UM. (2012). Translational siRNA therapeutics using liposomal carriers: prospects & challenges. *Curr Gene Ther* 12(4): 315-32.
- 2- Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, Greenblatt JJ, Rosenberg SA, Klein H, Berger M.; Mullen CA, Ramsey WJ, Muul L, Morgan R, Anderson WF. (1995). "T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: Initial trial results after 4 years". *Science* 270 (5235): 475-480.

- 3- **Friedmann T. (1992).** A brief history of gene therapy. *Nat. Genet.*2: 93–98.
- 4- **Gabizon A, Papahadjopoulos D. (1988).** Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 85, pp. 6949-6953.
- 5- **Gardlik R, Pálffy R, Hodosy J, Lukács J, Turňa J, Celec P. (2005).** Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit* 11(4): 110-121.
- 6- **Hayes F. (2003).** Transposon-based strategies for microbial functional genomics and proteomics. *Annu Rev Genet* 37: 3-29.
- 7- **Ibraheema D, Elaissari A, Fessi H. (2013).** Gene therapy and DNA delivery systems. *Int .J. Pharmaceut*, online publication.
- 8- **Kami D, Takeda S, Itakura Y, Gojo S, Watanabe M, Toyoda M. (2011).** Application of Magnetic Nanoparticles to Gene Delivery. *Int. J. Mol. Sci* 12: 3705-3722.
- 9- **Keswani R, Su K, Pack DW. (2014).** Efficient in vitro gene delivery by hybrid biopolymer/virus nanobiovectors. *J Control Release* 192C:40-46.
- 10- **Kim IH, Jo´ zkowicz A, Piedra PA, Oka K, Chan L. (2001).** Lifetime correction of genetic deficiency in mice with a single injection of helper-dependent adenoviral vector. *PNAS* 98(23): 13282–13287.
- 11- **Kovesdi I, Brough DE, Bruder JT, Wickham TJ. (1997).** Adenoviral vectors for gene transfer. *Curr Opin Biotechnol* 8:583-9.
- 12- **Lam PY, Breakefi eld XO. (2000).** Hybrid vector designs to control the delivery, fate and expression of transgenes. *J Gene Med* 2: 395–408.
- 13- **Lentz TB, Gray SJ, Samulski RJ. (2012).** Viral Vectors for Gene Delivery to the Central Nervous System. *Neurobiol Dis.*; 48(2): 179–188.
- 14- **Manjila SB, Baby JN, Bijin EN, Constantine I, Pramod K, Valsalakumari J. (2013).** Novel gene delivery systems. *Int J Pharm Investig*; (1):1-7.
- 15- **McCarty DM. (2008).** Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther.*; 16(10):1648-56.
- 16- **Meir YJ, Wu SC. (2011).** Transposon-based vector systems for gene therapy clinical trials: challenges and considerations. *Chang Gung Med J* 34(6): 565-79.
- 17- **Mingozzi F, High K. (2013).** Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* 122(1): 23–36.
- 18- **Pereyra A, Hereñu C. (2013).** Gene Delivery Systems. *License Intech P*: 165-192.
- 19- **Probst CE, Zrazhevskiy P, Bagalkot V, Gao X. (2012).** Quantum dots as a platform for nanoparticle drug delivery vehicle design. *Advanced Drug Delivery Reviews*. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.036. [Epub ahead of print]
- 20- **Razi Soofiyan S, Baradaran B, Lotfipour F, Kazemi T, Mohammadnejad L. (2013).** Gene Therapy, Early Promises, Subsequent Problems, and Recent Breakthroughs. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 3(2): 249-255.
- 21- **Rogers S, New Scientist. (1970).** p. 194
- 22- **Saga K, Kaneda Y. (2013).** Virosome presents multimodel cancer therapy without viral replication. *Biomed Res Int*; 2013:764706.
- 23- **Sandri M, Bortoloso E, Nori A, Volpe P. (2003).** Electrotransfer in differentiated myotubes: a novel, efficient procedure for functional gene transfer. *Exp Cell Res* 286: 87–95.

- 24- Scherer F, Anton M, Schillinger U, Henke J, Bergemann C, Kruger A, Gansbacher B, Plank C. (2002). Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther* 9: 102–109.
- 25- Shanmugam T, Banerjee R. (2011). Nanostructured self assembled lipid materials for drug delivery and tissue engineering. *Ther Deliv*; 2(11): 1485-516.
- 26- Stribley JM, Rehman KS, Niu H, Christman GM. (2002). Gene therapy and reproductive medicine. *Fertil. Steril.* 77: 645–657.
- 27- Tan BT, Wu L, Berk AJ. (1999). An adenovirus -Epstein-Barr virus hybrid vector that stably transforms cultured cells with high efficiency. *J Virol* 73: 7582–89.
- 28- Tenenbaum L, Lehtonen E, Monahan PE. (2003). Evaluation of risks related to the use of adeno-associated virus-based vectors. *Curr Gene Ther* 3: 545–65.
- 29- Tolmachov O. (2012). Self-entanglement of long linear DNA vectors using transient non-BDNA attachment points: A new concept for improvement of non-viral therapeutic gene delivery. *Medical Hypotheses* 78: 632–635.
- 30- Wang W, Li W, Ma N, Steinhoff G. (2013). Non-Viral Gene Delivery Methods. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 14: 46-60.
- 31- Yum K, Na S, Xiang Y, Wang N, Yu MF. (2009). Mechanochemical delivery and dynamic tracking of fluorescent quantum dots in the cytoplasm and nucleus of living cells. *Nano Lett*; 9(5): 2193–2198.

Novel Gene Delivery Systems Considering Biosafety

Fatemeh Akbarian^{1*}, Amir Mousavi², Mohammad Hossein Sanati³, Naghmeh Gholipour¹, Simin Nafian Dehkordi¹, Farzaneh Khani¹

1- Ph.D. Student of National Institute of Genetics and Biotechnology, Tehran, Iran.

2- Assistant Professor of National Institute of Genetics and Biotechnology, Tehran, Iran.

3- Professor of National Institute of Genetics and Biotechnology, Tehran, Iran.

f.akbarian1@gmail.com

Abstract

Gene therapy is a promising approach for the treatment of incurable diseases, including cancer and genetic defects. The major problem limiting the effectiveness of this method within the organism is the difficulty in transporting vulnerable and negatively charged DNA macromolecules into the cell nucleus, in which risks the biosafety aspects of gene therapy. The major key to successful gene therapy is developing safe and efficient tools for carrying the genetic material. Due to their high efficiency in transferring the genetic material, viral vectors are among the most commonly used vectors in gene therapy; however, they can spark dangerous immune responses in the body of the living organisms. Currently, researchers are trying to develop cheaper and safer alternatives. In this paper, the pathways and gene transfer techniques, along with their advantages and disadvantages are reviewed for the means of gene therapy. Furthermore, the latest reforms necessary for the improvement of each method are mentioned.

Keywords: Gene therapy, biosafety, gene delivery systems, non- viral vectors, viral vectors.