



لیپوزوم‌های هدف‌گیری شده (قسمت اول)

دکتر مجتبی سرکندی

افزایش ۴۷ درصدی نسبت به سال ۲۰۲۰ است. در سال ۲۰۲۰، IARC ۱۹/۳ میلیون مورد جدید و ۱۰ میلیون مرگ ناشی از سرطان را در سراسر جهان تخمین زد. در حال حاضر، سرطان سینه زنان شایع‌ترین نوع سرطان تشخیص داده شده (۲/۳) ۲ میلیون مورد جدید، ۱۱/۷ درصد از کل موارد، پس از آن سرطان ریه (۱۱/۴ درصد) و سرطان پروستات (۷/۳ درصد) قرار دارند. تعداد بیشتری از موارد جدید در سال ۲۰۲۰ در آسیا (۵۸/۳ درصد از کل موارد در سراسر جهان) و پس از آن اروپا

سرطان اصطلاح پزشکی است که برای توصیف گروهی از بیماری‌های ناهمگن با افزایش بروز و بار جهانی بر سلامت استفاده می‌شود و دومین علت شایع مرگ‌ومیر در جهان پس از بیماری‌های قلبی-عروقی است که میزان بروز آن در دهه‌های آینده حدود ۶۰ درصد افزایش می‌یابد. براساس گزارش GLOBOCAN 2020 آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (IARC)، انتظار می‌رود ۲۸/۴ میلیون مورد جدید سرطان تا سال ۲۰۴۰ ایجاد شود که نشان‌دهنده

بیان ژن های خاص به عنوان راهی جهت دور زدن شرایط بالینی خاص می باشد (۳). بنابراین، طیف وسیعی از درمان های ژنتیکی در دهه های گذشته برای درمان سرطان گزارش شده است. ژن درمانی برای ایجاد واکسن های سرطان، تعدیل سیستم ایمنی برای دستیابی به حذف سلول های سرطانی و برنامه ریزی مجدد سلول های سرطانی استفاده شده است. اگرچه ژن درمانی نوآورانه و کارآمد است، می تواند اثرات نامطلوب قابل توجهی، به ویژه در پاسخ ایمنی ایجاد کند. به دلیل موانع بیولوژیک و سیستم ایمنی میزبان، رساندن مواد ژنتیکی اگزوزن می تواند چالش برانگیز باشد و کارایی تحویل کم را نشان می دهد.

نانوسیستم های دارورسانی قادر به غلبه بر این مسایل هستند و اثر ژن درمانی را از طریق تحویل هدفمند و انتخابی مواد ژنتیکی به سلول های آسیب دیده تقویت می کنند. در این میان، نانوسیستم های مبتنی بر لیپید، بیشترین استفاده را از حامل غیروپروسی برای بیان ژن و خاموش کردن آن ها به ویژه لیپوزوم های کاتیونی دارند (۴). در دهه های گذشته، مقالات چند لیگاند هدف گیری (مانند آنتی بادی ها، قطعات آنتی بادی، اسید فولیک، پپتیدها، آپتامرها و کربوهیدرات ها) را گزارش می کنند که به دلیل شناسایی و اتصال خاص آن ها توسط گیرنده های بیش از حد بیان شده برای ترویج هدف گیری فعال به نانو حامل ها سلول های تومور استفاده

(۲۲/۸ درصد) و آمریکا (۲۰/۹ درصد) رخ داده است (۱). درک فعلی از علایم سرطان، توسعه چند مرحله ای این بیماری را به شش ویژگی بیولوژیک ذاتی سلول های تومور نسبت می دهد، مانند: (۱) سیگنال دهی تکثیر پایدار، (۲) افزایش رگ زایی، (۳) مقاومت در برابر مرگ سلولی، (۴) فرار از عوامل رشد، (۵) نامیرایی مبتنی بر تکثیر و (۶) تهاجم فعال و متاستاز (۲).

تلاش های جهانی بر درک مکانیسم های مولکولی سرطان و کشف اهداف درمانی جدید متمرکز شده است. علی رغم پیشرفت های فراوان در یافتن جایگزین های کارآمدتر برای درمان سرطان و مراقبت از بیمار، هنوز جنبه های زیادی وجود دارند که باید بهبود یابند تا درمان ضد سرطان کارآمد شود. در حال حاضر، مشکل اصلی در درمان سرطان، اثرات نامطلوب مضر ناشی از عوامل شیمی درمانی، ناهمگونی سرطان است که ویژگی های ژنتیکی متفاوت و پاسخ های متفاوت به درمان ها را نشان می دهد و وجود مکانیسم های مقاومت چند دارویی می باشد. بنابراین، هدف اصلی علوم دارویی تولید داروهایی است که سمیت کمتری داشته و کارآمدتر باشند.

به عنوان یک جایگزین امیدوارکننده برای درمان سرطان، ژن درمانی برجسته گردیده است. این رویکرد شامل تحویل مواد ژنتیکی *in vitro* یا *in vivo* به سلول هایی با اختلال عملکرد ژنتیکی خاص برای اصلاح

شده‌اند. بنابراین، پیشرفت قابل توجهی در تحویل پلاسمید DNA، mRNA، microRNA، small interfering RNA (siRNA)، (miRNA)، short hairpin RNA (shRNA) و درمان‌های الیگونوکلیوتیدی آنتی‌سنس برای درمان سرطان با نتایج امیدوارکننده صورت گرفته است. در این زمینه، مرور حاضر به جدیدترین مقالات تحقیقاتی که از لیپوزوم‌ها به‌عنوان یک حامل غیرویروسی برای ژن درمانی سرطان استفاده می‌کنند، می‌پردازد و نتایج اصلی به‌دست‌آمده با استفاده از مطالعات *in vivo* و *in vitro* مورد بحث قرار می‌گیرد.

۲. ژن درمانی

انجمن ژن و سلول درمانی آمریکا ژن درمانی را به‌عنوان «معرفی، حذف یا تغییر در محتوای کد ژنتیکی فرد با هدف درمان یا درمان بیماری» تعریف کرده است. این یک رویکرد درمانی امیدوارکننده است که در درمان اختلالات عفونی و ژنتیکی استفاده می‌شود (۵)، که از اسیدهای نوکلئیک مختلف (NAS) مانند siRNA، shRNA، miRNA سیستم CRISPR و الیگونوکلیوتیدهای آنتی‌سنس استفاده می‌کند. برخلاف درمان‌های سنتی، که می‌توانند پاسخ کوتاهی را بدون دوزهای مداوم ارایه دهند، ژن درمانی حتی پس از تجویز در دوزهای منفرد، اثرات پایدار بالقوه‌ای دارد. با این حال، در مقایسه با داروهای سنتی، هزینه‌های بالای ژن درمانی را می‌توان با فرآیند ساخت تخصصی، دشواری در آزمایشات

بالینی و الزامات تحویل بالینی توضیح داد. اولین کارآزمایی بالینی با استفاده از ژن درمانی در دهه ۱۹۹۰ روی بیمار مبتلا به کمبود آدنوزین دآمیناز و نقص ایمنی ترکیبی شدید انجام شد. با این حال، در سال ۱۹۹۹، اولین مورد مرگ با استفاده از ژن درمانی در یک بیمار مبتلا به کمبود اورنیتین ترانس کاربامیلاز در نتیجه یک پاسخ التهابی سیستمیک قوی به دلیل درمان با سلول‌های بنیادی خونساز اصلاح شده با حامل‌های رتروویروسی گزارش شد (۶). در نتیجه این مرگ، تحقیقات مرتبط با ژن درمانی تا سال ۲۰۱۰، به ویژه در ایالات متحده و اروپا، کاهش یافت. در این دوره، تنها چهار محصول در آسیا، از جمله (۱۹۹۸) Vitravene - سیتومگالوویروس رتینیت برای بیماران مبتلا به سیستم ایمنی، (۲۰۰۳) ژندیسن - سرطان سر و گردن، (۲۰۰۵) Oncorine - سرطان نازوفارنکس و (۲۰۱۱) Neovasculgen - بیماری عروق محیطی و ایسکمی اندام برای ژن درمانی تایید شدند (۷). در دهه‌های گذشته، تحقیقات شدید و مطالعات ایمنی پیش بالینی انجام شده که منجر به کاربردهای بالینی موفق گردیده است. از آن زمان، چند محصول مبتنی بر ژن درمانی تایید شده‌اند، از جمله محصولات مبتنی بر تداخل RNA (RNAi) (Patisiran، Lumasiran و Givosiran)، الیگونوکلیوتیدهای آنتی‌سنس (Golodirsen، Nusinersen و Mipomersen، Etablirsen)

۳۸/۳ درصد در فاز I، ۱۴/۲ درصد در فاز II، ۴/۴ درصد در فاز III و تنها ۲/۲ درصد در فاز IV قرار دارند (۹). در میان آن‌ها، آزمایش‌های بالینی برای درمان سرطان، ۶۷ درصد از کل تحقیقات را نشان می‌دهند که با افزایش بروز آن در سراسر جهان و عدم وجود درمان‌های درمانی مؤثر توجیه می‌شوند. برخی از آزمایشات بالینی با ژن درمانی برای درمان سرطان در جدول (۱) فهرست شده است.

ژن درمانی را می‌توان به دو مکانیسم اصلی طبقه‌بندی کرد. اولین مکانیسم (که «ژن درمانی سنتی» نیز نامیده می‌شود) مربوط به افزودن مستقیم کپی ژنی است که محصول صحیح را به ژنوم سلول کد می‌کند. در این مکانیسم، ژن می‌تواند مستقیماً در ژنوم ادغام شود یا می‌تواند به‌عنوان یک بخش مستقل از DNA وجود داشته باشد.

حامل‌های ویروسی مرتبط با آدنو نوترکیب. Onasemnogene abeparvovec، Alipogene tiparvovec و Voretigene neparvovec-rzyl و سلول‌های انتقال یافته با لنتی ویروس Axicabtagene ciloleucel سلول‌های CD34+ اتولوگ ترانسدود شده با یک حامل لنتی ویروسی حاوی ژن ADA انسانی و Brexucicel (۵).

تخمین زده می‌شود که از سال ۲۰۱۵ بیش از ۲۲۰۰ کارآزمایی بالینی مرتبط با ژن درمانی در سراسر جهان انجام شده است. آزمایشات بالینی اصلی در ایالات متحده (۶۵ درصد) و پس از آن اروپا (۲۳/۲ درصد) و آسیا (۶/۵ درصد) انجام می‌گیرد (۸). سایر کشورها از جمله استرالیا، کانادا، روسیه و جمهوری کره مسؤول درصد کمی از تحقیقات هستند (۹). درصد آزمایشات بالینی با ژن درمانی حدود

جدول ۱- کارآزمایی‌های بالینی برای ژن درمانی سرطان

Disease	Vector/Gene	Phase	Status	Company	Identifier
Ovarian Cancer and Peritoneal Cavity Cancer	Ad5CMV-p53 gene	I	Completed	University of Texas Southwestern Medical Center	NCT00003450
Pancreatic cancer	Rexin-gene	I	Completed	Epeius Biotechnologies	NCT00121745
Prostate cancer	Ad5-yCD/mutTKSR39rep-hIL12	I	Unknown	Henry Ford Health System Detroit	NCT02555397
Non-Small Cell Lung Cancer	AdV-IL-12	I	Incomplete	Houston Methodist Cancer Center	NCT04911166
Triple-Negative Breast Cancer	AdV-IL-12	II	Incomplete	Houston Methodist Cancer Center	NCT04095689
Breast Cancer	Ad5CMV-p53 gene	I	Completed	Fox Chase Cancer Center Philadelphia	NCT00004038
Ovarian Cancer and Primary Peritoneal Cancer	Ad5CMV-p53	I	Completed	Simmons Cancer Center—Dallas	NCT00003450
Prostate Cancer	Ad5-CMV-NIS	I	Completed	Mayo Clinic Rochester	NCT00788307

و سیستم‌های دارورسانی استفاده کرد(۹). در روش *ex vivo*، سلول‌های خاص از میزبان خارج می‌شوند، کشت داده می‌شوند و با ترانسفکشن *in vitro* اصلاح ژنتیکی می‌شوند و متعاقباً دوباره به بیماران پیوند داده می‌شوند (شکل ۱).

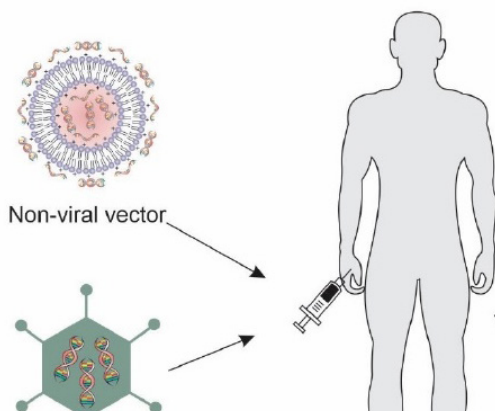
علاوه بر تکنیک‌های *in vivo* و *ex vivo*، ملاحظات مختلفی در ژن درمانی مانند اندازه ژن معرفی شده، پایداری بیان ژن، نوع سلول هدف، ایمنی و کارایی سیستم تحویل ژن مورد نیاز است (۶). علاوه بر این، یکی از چالش‌های اصلی، انجام یک هدف‌گیری خاص از ژن‌ها به سلول‌های تومور، اجتناب از سلول‌های طبیعی است. در این راه از سیستم‌های انتقال ژن به نام "حامل‌ها (vectors)" استفاده شده است(۱۲).

در ژن درمانی، موفقیت درمان به حامل‌های ژن بستگی دارد، زیرا آن‌ها مسؤول

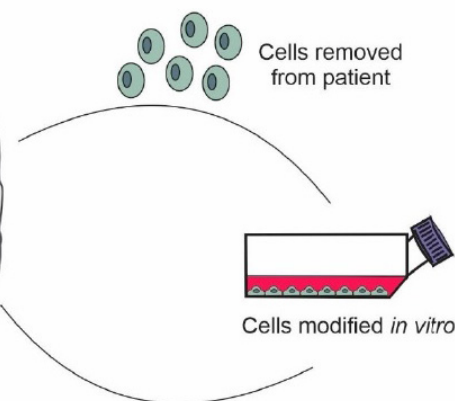
مکانیسم دوم به ویرایش ژن‌هایی با پتانسیل بالینی اشاره دارد که شامل اصلاح، جایگزینی، تقویت و انسداد نقص آن‌ها می‌شود (۱۰). اولین درمان ویرایش ژن برای جلوگیری از عفونت HIV در سلول‌های T در سال ۲۰۱۰ استفاده شد، در حالی که اصلاح ژن در سیستم CRISPR برای بتا تالاسمی و بیماری سلول داسی شکل مشاهده گردید (۱۱).

اساساً می‌توان از تکنیک‌های *in vivo* و *ex vivo* در ژن درمانی استفاده کرد. تکنیک *in vivo* پرکاربردترین رویکرد در ژن درمانی است که مبتنی بر معرفی مستقیم ماده ژنتیکی خاص به سلول‌ها یا بافت‌های هدف است. برای این منظور می‌توان از روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی مانند سونوپوراسیون (sonoporation)، الکتروپوراسیون (electroporation)، فتوپوراسیون (photoporation)، تفنگ ژنی (gene gun)

vivo gene therapy



Ex vivo gene therapy



شکل ۱- تکنیک‌های *in vivo* و *ex vivo* مربوط به رساندن ژن به سلول‌های هدف

تروپیسیم ویروسی (به عنوان مثال، ویروس هرپس سیمپلکس دارای یک تروپیسیم عصبی)، ناتوانی در انتقال سلول های غیر قابل تقسیم (به عنوان مثال، رتروویروس ها)، تولید تیترا پایین (به عنوان مثال، ویروس های مرتبط با آدنو)، پتانسیل التهابی (به عنوان مثال، آدنوویروس ها)، ظرفیت کم برای DNA خارجی وارد شده (به عنوان مثال، رتروویروس ها و ویروس های مرتبط با آدنو)، پاسخ ایمنی بالای میزبان (مانند ویروس های مرتبط با آدنو) و سمیت مرتبط با دوز بالا (مانند ویروس هرپس سیمپلکس) اشاره کرد (۱۴). همچنین پدیده جهش زایی درج وجود دارد که در آن ادغام کروموزومی نا به جا DNA ویروسی، بیان ژن سرکوبگر تومور را مختل می کند یا انکوژن های با پتانسیل تومورزایی را فعال می کند (مانند لتی ویروس و سیتومگالوویروس) (۱۴). چالش دیگر برای استفاده از یک حامل ویروسی مربوط به هزینه بالای پردازش پایین دستی است که در آن مراحل تصفیه نیاز به روش های موثر و قابل تکرار دارد. علاوه بر این، حامل های ویروسی برای تحویل کد NA و داروها در دسترس نیستند، زیرا کارایی ترانسفکشن وابسته به هدف نیست و مولکول های درمانی موجود برای درج در حامل ها فقط NA هستند (۱۳). سیستم های حامل غیر ویروسی، عمدتاً به دلیل ایمنی زیستی، ایمنی زایی کم و بیماری زایی کم، برای ژن درمانی سرطان امیدوار کننده هستند. آن ها یک طراحی

انتقال ژن های درمانی از طریق فرآیندی به نام ترانسفکشن (transfection) هستند. حامل ها وسایل نقلیه ای هستند که قادر به محافظت از ژن درمانی و انتقال آن به سلول ها، بافت ها و اندام ها می باشند. حامل می تواند به دلیل اندازه اسیدهای نوکلئیک (NA)، بار منفی و حساسیت به تخریب ناشی از هسته که از تحویل اسیدهای نوکلئیک برهنه جلوگیری می کند، در تحویل این ژن های درمانی واسطه شود. آن ها عمدتاً به عنوان حامل های ویروسی و غیر ویروسی طبقه بندی می شوند (۱۳).

حامل های ویروسی، ویروس های مصنوعی هستند که حاوی کاست های ژنی می باشند و ویژگی های مطلوب را به جای ژنوم ویروسی کد می کنند. در ژن درمانی از ویروس های رتروویروسی، آدنوویروسی، ویروس مرتبط با آدنو، حامل ویروسی تبخال و حامل های واکسن به عنوان وسیله نقلیه استفاده می شود. هر حامل دارای معایب و مزایایی است و بنابراین، انتخاب حامل ویروسی به نوع سرطان، استراتژی درمانی و گرایش ویروسی بستگی دارد. به طور کلی، حامل های ویروسی کارایی بالایی در انتقال و بیان ژن از طریق توانایی آن ها در آلوده کردن سلول ها به طور مولد، مانند یک ویروس نوع وحشی نشان داده اند. علیرغم کارآمدی بیشتر در انتقال نسبت به حاملان غیر ویروسی، استفاده از آن ها به دلیل ایمنی زایی و سمیت، محدودیت هایی دارند. از جمله مشکلات می توان به گرایش یا

شیمیایی انعطاف‌پذیر دارند که می‌توانند برای دستیابی به خواص فیزیکوشیمیایی مطلوب جهت رساندن NA به سلول‌های هدف اصلاح شوند. آن‌ها از ژن درمانی محافظت می‌کنند، جذب سلولی را افزایش می‌دهند و به دلیل ظرفیت بسته‌بندی بیشتر در مقایسه با همتایان ویروسی، می‌توانند NA با اندازه‌های مختلف (مانند DNA پلاسمید و الیگونوکلوئوتیدها) را متصل و متراکم کنند. علاوه بر حمایت از رساندن کد NA و داروها، مزایای دیگر عبارتند از: سهولت تولید و پتانسیل تجویز مجدد (۱۴). در سال‌های اخیر، حامل‌های غیرو ویروسی مختلف با نقش مهمی در درمان‌های جدید، مانند لیپوزوم‌ها، نانوذرات لیپیدی جامد، حامل‌های لیپیدی نانوساختار، نانوامولسیون، نانوذرات پلیمری، دندریمرها، نانوذرات طلا و نقاط کوانتومی توسعه یافته‌اند (۱۴).

۳. لیپوزوم‌ها به‌عنوان یک حامل غیرو ویروسی

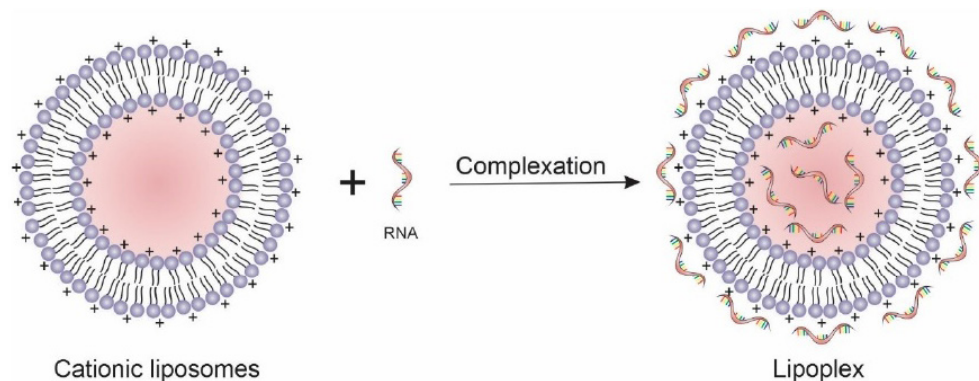
حامل‌های غیرو ویروسی مبتنی بر لیپید یک جایگزین امیدوارکننده برای حامل‌های ویروسی جهت رساندن ژن، به ویژه فرمول‌های لیپوزومی، هستند. تولید لیپوزوم‌ها یک استراتژی است که رساندن ژن‌های درمانی به سلول‌ها را تسهیل می‌کند، زیرا وزیکول‌های کروی هستند که از یک یا چند لایه دوگانه فسفولیپیدی، مشابه لیپیدهای موجود در غشاهای بیولوژیکی

تشکیل شده‌اند. علاوه بر این، لیپوزوم‌ها به دلیل تعدیل ترکیب، اندازه و بار، ایمنی و سمیت کمی دارند. این وزیکول‌ها را می‌توان براساس اندازه (کوچک، بزرگ و غول‌پیکر)، بار (کاتیونی، آنیونی و خنثی)، تعداد لایه‌ها (تک لایه، چند لایه و چند وزیکولی)، اصلاح سطح و ترکیب لیپیدی مشخص کرد (۴، ۱۵). لیپیدهای مورد استفاده برای تشکیل لیپوزوم‌ها می‌توانند کاتیونی، آنیونی، خنثی یا مخلوطی از آن‌ها باشند. لیپید مورد استفاده برای تهیه لیپوزوم‌ها می‌تواند روشی را که توسط آن NAS در فرمول وارد می‌شود، تحت تاثیر قرار دهد و می‌تواند با کمپلکس کردن NAS روی سطح لیپوزوم‌ها (لیپوزوم‌ها/NAS کمپلکس) یا محصور کردن NAS در هسته آن‌ها (NAS-encapsulated liposomes) باشد (۱۶). لیپیدهای آنیونی که معمولاً در توسعه لیپوزوم‌ها استفاده می‌شوند، فسفولیپیدهایی مانند اسید فسفاتیدیک، فسفاتیدیل گلیسرول و فسفاتیدیل سرین هستند که به‌طور طبیعی در غشای سلولی یافت می‌شوند. این لیپیدها می‌توانند خواص فیزیکی غشا را تعدیل کنند و با جلوگیری از غیرفعال شدن در حضور سرم، ثبات بیشتری را تضمین کنند. آن‌ها به دلیل حضور طبیعی در غشاهای بیولوژیک، زیست‌سازگاری مطلوب‌تری دارند. از آنجایی که این لیپیدها دارای بار منفی هستند، NAS نمی‌توانند کمپلکس شوند و باید در طول تشکیل وزیکول‌ها در لیپوزوم‌ها محصور شوند. بار منفی این لیپیدها از فشرده شدن

مثال، گنجاندن NA در محلول هیدراتاسیون در روش هیدراتاسیون لایه نازک). در هر دو روش انکپسوله، برهمکنش الکترواستاتیکی بین اسیدهای نوکلئیک منفی و لیپیدهای کاتیونی مسؤول افزایش توانایی لیپوزوم های کاتیونی برای حمل NA است (۱۸). جدول (۲) برخی از لیپیدهای کاتیونی مورد استفاده در انتقال ژن و ویژگی های آنها را خلاصه می کند.

در تشکیل لیپوپلکس، برهمکنش الکترواستاتیک اولین مرحله کمپلکس است و یک برهمکنش سریع را تشکیل می دهد. این مرحله با آزادسازی ۷۰ درصد ضدیون های DNA و ۹۰ درصد ضدیون های لیپیدی همراه است که در آن ساختار توسط یک فضای داخلی خنثی از طریق برهمکنش NAs و بارهای لیپید با ضدیون های خود در داخل کمپلکس تثبیت می شود و همزمان هیدراتاسیون کاهش می یابد. در این مرحله، نسبت بار بالاتر لیپید/

کارآمد DNA از طریق نیروهای الکترواستاتیک دافعه ای که بین گروه فسفات DNA و گروه های سر آنیونی لیپیدها رخ می دهد، جلوگیری می کند و بازده انتقال را کاهش می دهد. به همین دلیل، لیپیدهای کاتیونی برای انتقال ژن به لیپیدهای آنیونی ارجحیت دارند. کمپلکس بین لیپیدهای کاتیونی و اسیدهای نوکلئیک ساختارهای فازی منظمی را تشکیل می دهد که به عنوان لیپوپلکس (lipoplex) نیز شناخته می شوند (شکل ۲) (۱۷). لیپیدهای کاتیونی مولکول های آمفی فیلیک می باشند که ساختاری مشابه لیپیدهای طبیعی دارند، اما به دلیل وجود یک گروه سر کاتیونی دارای بار مثبت هستند (۱۳). اسیدهای نوکلئیک را می توان از طریق افزودن آنها در طول مرحله تشکیل لیپوزوم ها در لیپوزوم های کاتیونی یا با کمپلکس شدن اسیدهای نوکلئیک پس از تولید لیپوزوم ها محصور کرد (به عنوان



شکل ۲- نمایش شماتیک تشکیل لیپوپلکس

لحظه، بخش‌های آب‌گریز از لیپیدهای کاتیونی که در معرض محیط‌های آبی قرار گرفته‌اند، خود را به شکل‌های ناپایدار بازآرایی می‌کنند

NAS یک کمپلکس سریع‌تر و پایدارتر را تشکیل می‌دهد. مرحله دوم روند کندتر بازآرایی و تثبیت برگشت ناپذیر است. در این مرحله، در اولین

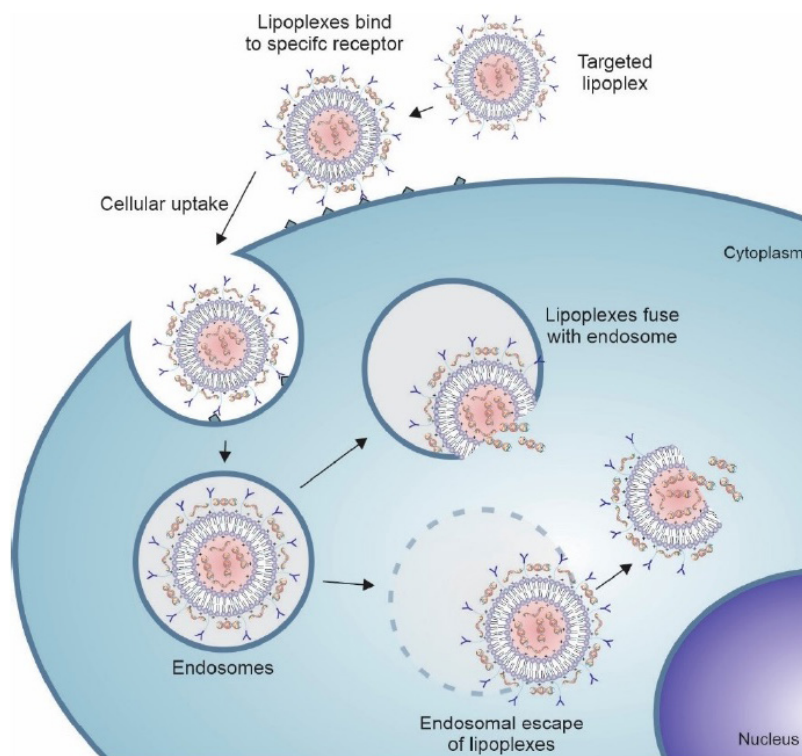
جدول ۲- لیپیدهایی که معمولاً در انتقال ژن استفاده می‌شوند.

Lipid	Abbreviation	Polar Domain	Nonpolar Domain	Feature
<i>N</i> -[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl] <i>N,N,N</i> -trimethylammonium chloride	DOTMA	Quaternary ammonium	Unsaturated aliphatic	Cationic lipid
1,2-Dioleoyloxy-3-trimethylammonium-propane	DOTAP	Quaternary ammonium	Unsaturated aliphatic	Cationic lipid
Diioctadecylamidoglycylspermine	DOGS	Polyamine	Aliphatic	Cationic lipid
Cetyltrimethylammonium bromide	CTAB	Quaternary ammonium	Single-tail aliphatic	Cationic lipid
2,3-Dioleoyloxy- <i>N</i> -[2(sperminecarboxamido)-ethyl]- <i>N,N</i> -dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate	DOSPA	Polyamine	Unsaturated aliphatic	Cationic lipid
1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propane	DOPA	Quaternary ammonium	Unsaturated aliphatic	Cationic lipid
Dimyristoxypropyl dimethyl hydroxyethyl ammonium bromide	DMRIE	Quaternary ammonium	Aliphatic	Cationic lipid
Dimethyldioctadecylammonium bromide	DDAB	Quaternary ammonium	Aliphatic	Cationic lipid
1,2-Distearyloxy- <i>N,N</i> -dimethyl-3-aminopropane	DSDMA	Secondary amine	Aliphatic	Cationic lipid
1,2-Dimyristoyl-trimethylammoniumpropane	DMTAP	Quaternary ammonium	Aliphatic	Cationic lipid
1,2-Distearyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine	DSEPC	Quaternary ammonium	Aliphatic	Cationic lipid
<i>N</i> -Palmitoyl D-erythro-sphingosyl carbamoyl-spermine	CCS	Spermine	Unsaturated aliphatic	Cationic lipid
1,3-Dioleoyl-2-(6-carboxy-spermyl)-propylamide	DOSPER	Polyamine	Unsaturated aliphatic	Cationic lipid
(1,2-dioleoyl-3-dimethyl-hydroxyethyl ammonium bromide)	DORIE	Quaternary ammonium	Unsaturated aliphatic	Cationic lipid
(1,2-dioleoyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxyethyl ammonium chloride)	DORI	Quaternary ammonium	Unsaturated aliphatic	Cationic lipid
<i>N,N</i> -dioleoyl- <i>N,N</i> -dimethylammonium Chloride	DODAC	Quaternary ammonium	Aliphatic	Cationic lipid
Bis-guanidium-tren-cholesterol	BGTC	Guanidinium-spermidine-	Steroid-based	Cationic lipid
3β-[<i>N</i> -(<i>N,N'</i> -Dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol	DC-Chol	Tertiary amine	Steroid-based	Cationic lipid
Octadecenyl-oxy[ethyl-2-heptadecenyl-3-hydroxyethyl] imidazolinium chloride	DOTIM	Heterocycle (imidazole)	Unsaturated aliphatic	Cationic lipid
1,2-dioleoyl-sn-glycerol-3-ethylphosphocholine	DOEPC	Ethylphosphocholine	Aliphatic	Cationic lipid
<i>O,O'</i> -Dimyristyl- <i>N</i> -lysyl aspartate	DMKE	Primary amine	Aliphatic	Cationic lipid
<i>O,O'</i> -dimyristyl <i>N</i> -lysylaspartate	DMKD	Primary amine	Aliphatic	Cationic lipid
<i>N</i> -t-Butyl-N0-tetradecyl-3-tetradecylaminopropionamide	diC14-amidine	Imine group	Aliphatic	Cationic lipid
<i>N</i> -(4-carboxybenzyl)- <i>N,N</i> -dimethyl-2,3-bis(oleoyloxy)propan-1-aminium	DOBAQ	Quaternary ammonium	Unsaturated aliphatic	Cationic lipid
1,2-dioleoyloxy-3-dimethylaminopropane	DODMA	Tertiary amine	Unsaturated aliphatic	Cationic lipid
6-Lauroxyhexyl ornithinate	LHON	Ornithine	Single-tail aliphatic	Cationic lipid
1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine	DOPC	-	Phosphatidylcholine	Helper lipid
1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine	DOPE	-	Phosphatidylcholine	Helper lipid
Cholesterol	CHOL	-	Steroid	Helper lipid

تولید کردند و افزایش قابل توجهی در انتقال ژن با واسطه لیپوپلکس مشاهده نمودند (۲۱). لیپوپلکس ها همچنین قادر به حمل مقدار زیادی NA با وزن های مولکولی مختلف، مانند DNAs پلاسمید بزرگ (وزن مولکولی کمتر از ۱۰ کیلو جفت باز) و RNAs پیام رسان (وزن مولکولی کمتر از ۱۰ کیلو جفت باز) و توالی های کوتاه ($Mw \approx 15-30$ mers) هستند.

لیپوپلکس ها ساختار مشترکی دارند، از جمله یک سر قطبی با بار مثبت (دامنه آبدوست) و یک دم آب گریز که از طریق یک پیوند دهنده و یک دامنه ستون فقرات (به عنوان مثال، گلیسرول) به هم متصل شده اند. حوزه های آب گریز و کاتیونی در ترکیب لیپوپلکس ها ضروری هستند (۱۳، ۱۴). سر گروه های قطبی لیپیدها تأثیر زیادی بر عملکرد کلی لیپوپلکس ها دارند. اندازه و چگالی بار این دامنه بر تعامل آن با NA، پایداری لیپوپلکس، برهمکنش با غشای سلولی، مکانیسم فرار آندوزومی، سمیت سلولی و تراکم NAS تأثیر می گذارد. براساس گروه شیمیایی، این دامنه می تواند آمونیم چهارتایی، یک آمین (اولیه، ثانویه، ترشیاری)، یک اسید آمینه یا پپتید، یک گوانیدین، گروه های سر هتروسیکلیک و برخی سر گروه های خاص باشد. آمونیم کواترنر به دلیل بار مثبت دائمی که حلالیت بالایی در محیط های آبی و برهمکنش قوی با NAS فراهم می کند، متداول ترین گروه است (۲۲).

و به طور خود به خود از طریق برهمکنش های آب گریز مطلوب ترمودینامیکی به یک کمپلکس لایه ای لیپید-DNA سازماندهی می شود (۱۰). لیپوپلکس ها می توانند انتقال ژن های درمانی به سلول ها را از طریق مکانیسم های مرتبط با ساختار شیمیایی آن ها افزایش دهند. علاوه بر تعامل با NA، گروه سر کاتیونی از طریق برهمکنش الکترواستاتیکی با گروه های آنیونی گلیکوپروتئین ها و پروتئوگلیکان های غشای سلولی، تعامل با غشای سلولی را تقویت می کند و جذب سلولی را بیشتر می سازد (۱۳، ۱۴). لیپوپلکس ها همچنین ممکن است کارایی ترانسفکشن NAS در هسته را از طریق فرار یا اختلال آندوزومی افزایش دهند. فرار از آندوزوم ها با برهمکنش و ادغام لیپوپلکس ها با غشای آندوزوم و به دنبال آن آزاد شدن NA به داخل سیتوزول رخ می دهد (۴). وجود یک مولکول بازی ضعیف در گروه سر می تواند باعث انفجار آندوزوم از طریق اثر اسفنج پروتون شود و NAS را در سیتوزول سلول هدف آزاد کند (شکل ۳) (۲۰). علاوه بر این، گنجاندن القاکننده های همجوشی غشایی (مانند کلرومازین و پروکایین آمید)، عوامل لیزوزوموتروپیک (مانند کلروکین) و پپتیدهای نافذ به سلول با حوزه های فرار آندوزومی در لیپوپلکس می تواند توانایی آن را برای فرار از آندوزوم افزایش دهد. وونگ بائزا (Wong-Baeza) و همکاران لیپوپلکس حاوی کلرومازین، پروکایین آمید، کلروکین و اسپرمیدین را



شکل ۳- نمایش شماتیک جذب سلولی لیپوپلکس هدفمند و آزادسازی NA در سلول‌های تومور. پس از درونی‌سازی، لیپوپلکس می‌تواند با آندوزوم‌ها ترکیب شود یا آن‌ها را بی‌ثبات کند و منجر به آزاد شدن NA در سیتوپلاسم گردد.

از لیپیدهای کاتیونی روی موش انجام شد. لیپوپلکس (۵ تا ۱۰۰ برابر) از روش ترانسفکشن کلسیم فسفات یا DEAE-دکستران مؤثرتر بود. برای کاهش سمیت سلولی و افزایش کارایی ترانسفکشن، تغییراتی در بخش‌های اصلی DOTMA ایجاد شد که اولین N,N,N -[۱-(۲,۳-دی‌تیلوئیلوکسی)پروپیل]- N -تری‌متیل آمونیوم متیل‌سولفات (DOTAP) اولین

اولین لیپوپلکس در سال ۱۹۸۷ برای افزودن پلاسמידها به سلول‌ها با استفاده از لیپید کاتیونی مصنوعی N,N,N -[۱-(۲,۳-دی‌تیلوئیلوکسی)پروپیل]- N -تری‌متیل آمونیوم کلرید (DOTMA) متشکل از آمونیم کواترنری در دامنه آب‌دوست و ستون فقرات گلیسرول به دست آمد. این اولین آزمایش *in vivo* بود که با استفاده

(DOPE) به طور موثر در طحال انباشته شده و mRNA را پس از تجویز سیستمیک به سلول های دندریتی می رساند. مرحله اول آزمایش افزایش دوز انجام گرفت. ابتدا، سه بیمار مبتلا به ملانوما با RNA-lipoplexes در سطح دوز پایین تحت درمان قرار گرفتند و قادر به تولید $IFN\alpha$ و پاسخ های سلول T خاص آنتی ژن قوی بودند. سپس، مرحله اول کارآزمایی افزایش دوز، واکسن هایی با RNA-lipoplexes تولید کردند که آنتی ژن های بدخیم مرتبط با ملانوم، از جمله نیویورک-ESO 1 (NY-ESO-1)، تیروزیناز، آنتی ژن A3 مرتبط با ملانوما (MAGE-A3) و فسفاتاز گذرنده با همولوژی تنسین (TPTE) را انکدینگ (encoding) کردند. گروه های سر هتروسیکلیک مانند پیریدین، ایمیدازول ها و مشتقات آن ها به دلیل ویژگی شیمیایی که می توانند آمین را به یک پایه قوی تر یا ضعیف تر تبدیل کنند، در تولید لیپوپلکس ها استفاده شده اند. لیو (Liu) و همکاران مجموعه ای از لیپید های کاتیونی مبتنی با پایه حلقوی را سنتز کردند. آن ها گزارش دادند که این لیپیدها می توانند اثر اسفنج پروتون را ایجاد کنند و زمانی که اثر اسفنج این بخش و اندوزوم نزدیک است، NAs را آزاد می نمایند و به پروتواسیون و فرار آندوزوم کمک می کنند (۲۳).

پیوند دهنده قسمتی بین حوزه آب دوست قطبی و دم (های) غیرقطبی لیپیدها می باشد. نقش مهمی در ویژگی های

را تولید کردند. از آن زمان، گروه سر آمونیم کوآترنری در توسعه لیپیدهای کاتیونی مانند ستیل تری متیل آمونیوم برومید (CTAB)، دی متیل دیوکتادسیل آمونیوم برمید (DDAB)، اسپرمین های دیوکتادکانوییل (DOTAP)، (DOGS) استفاده شده است.

در جستجو برای ارزیابی تأثیر دامنه آب دوست بر سمیت سلولی لیپیدهای کاتیونی، Cui و همکاران دو لیپید کاتیونی با سرگروه آمونیم کوآترنری (CDA14) و سرگروه تری پتیدی (CDO14) با پیوند دهنده و دامنه آب گریز یکسان سنتز کردند. $CDO14$ (IC₅₀ 109.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) از $CDA14$ (IC₅₀ 340.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) در سلول سرطان ریه سیتو توکسیک تر بود. گروه سر آمونیم کوآترنری سلول های آپوپتوتیک و گونه های اکسیژن فعال بیشتری را نسبت به سرگروه پتیدی القا می کند، که نشان می دهد سمیت لیپید کاتیونی رابطه نزدیکی با ساختارهای گروه سر آن ها دارد (۲۲).

کراز و همکاران پتانسیل لیپوپلکس های مبتنی بر آمونیم کوآترنری را در القای یک پاسخ ایمنی خاص برای استفاده به عنوان واکسن در ایمونوتراپی سرطان نشان دادند. DOTMA/ mRNA-lipoplexes متشکل از DOPE (1-2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine) یا لیپیدهای DOTAP/DOPE mRNA کدکننده آنتی ژن می باشند که از ریبونوکلازهای خارج سلولی محافظت می کنند. لیپوپلکس (DOTAP/

لیپیدهای کاتیونی مانند پایداری، تجزیه پذیری زیستی، کارایی انتقال و سمیت سلولی دارد. آن‌ها با برخی از گروه‌های شیمیایی رایج مانند اتر، استر، آمید، کاربامات، دی سولفید، اوره، آسیل هیدرازون و فسفات تولید می‌شوند. سایر انواع کمتر رایج، مانند کارنیتین، وینیل اتر، کتال، اسید گلوتامیک، اسید آسپارتیک، اسید مالونیک الماس و دی‌هیدروکسی بنزن نیز می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. در pH پایین، برخی از پیوندها (به‌عنوان مثال، پیوندهای ارتو- استر) مستعد هیدرولیز اسیدی هستند که منجر به تضعیف برهمکنش بین لیپیدهای کاتیونی و NAS و در نتیجه، آزاد شدن NA در سیتوزول می‌شود.

حوزه آب‌گریز لیپیدهای کاتیونی را می‌توان به‌عنوان زنجیره‌های آلیفاتیک و حلقوی (مبتنی بر استروئید) طبقه‌بندی کرد. دامنه دم لیپوپلکس‌ها بر انتقال فاز و سیالیت لیپیدهای کاتیونی و همچنین تأثیر بر پایداری، سمیت سلولی، محافظت از NAS، آزادسازی NAS، فرار آندوزومی و نفوذ هسته‌ای لیپوزوم‌های کاتیونی تأثیر دارند. به‌طور کلی، لیپیدهایی با دو زنجیره آب‌گریز (به‌عنوان مثال، DOTMA، DOTAP، DOPSA، DORIE، DOGS و...) در ترانسفکشن موثرتر هستند که احتمالاً به دلیل پتانسیل آن‌ها برای تشکیل دانه‌های پایدار در محلول‌های آبی

می‌باشد. با این حال، نتایج ترانسفکشن آن‌ها به ویژگی‌های شیمیایی بستگی دارد. در مقابل، یک دم منفرد ممکن است بسته به ویژگی‌های شیمیایی لیپیدهای کاتیونی، بازده انتقال پایین را نشان دهد. دم‌های غیراشباع می‌توانند بر انتقال تأثیر بگذارند، اما نقطه ضعف اصلی این حوزه‌ها کاهش پایداری به دلیل حساسیت به اکسیداسیون است. با توجه به این که ساختار شیمیایی لیپید راندمان ترانسفکشن را تحت تأثیر قرار می‌دهد، یک جایگزین می‌تواند ترکیب لیپیدهای تک و دو دم برای ارزیابی جذب لیپوپلکس و کارایی ترانسفکشن سلولی باشد.

لیپوپلکس‌ها به دلیل مزایایی که دارند کاربرد قابل توجهی برای ترانسفکشن *in vitro* پیدا کرده‌اند. با این حال، رساندن کارآمد مواد ژنتیکی به هسته و لیز آندوزوم پارامترهای مهمی هستند که مانع کارایی انتقال ژن از لیپوپلکس می‌شوند. برخی از پارامترهای لیپوزومی مانند اندازه، ترکیب و بار مثبت می‌توانند منجر به آزادسازی سریع پلاسما و فعال شدن سیستم ایمنی شوند و کاربرد در عمل بالینی را دشوار می‌کنند. علاوه بر این، موانع آناتومیک و سلولی مختلف (به‌عنوان مثال، پوشش‌های سلولی اپی تلیال و اندوتلیال و ماتریکس خارج سلولی اطراف سلول‌ها) از دسترسی مستقیم به سلول‌های هدف جلوگیری می‌کنند (۲۳). علیرغم محدودیت‌ها، برخی

جدول ۳- کارآزمایی های بالینی فعال دارورسانی مبتنی بر لیپوپلکس حاوی اسیدهای نوکلئیک برای درمان سرطان.

Lipid	Gene/Drug	Disease	Administration Route	Phase (Start Year)	Sponsors	Identifier
n.r.	mRNA encoding human OX40L	Advanced/metastatic solid tumors or lymphoma	Intratumoral	I/II recruiting (2017)	ModernaTX, Inc. (Cambridge, MA, USA)	NCT03323398
Lipo-MERIT	NY-ESO-1, MAGE-A3, and TPPE RNA	Melanoma	Intravenous	I recruiting (2015)	BioNTech SE (Mainz, Germany)	NCT02410733
DOTAP:Chol	Pbi-shRNA TM EWS/FLI1 Type 1	Ewing's sarcoma.	Intravenous	I recruiting (2016)	Gradalis, Inc. (New York, NY, USA)	NCT02736565
DOPC	EphA2 siRNA	Advanced Malignant Solid Neoplasm	Intravenous	I active (2012)	M.D. Anderson Cancer Center (Houston, TX, USA)	NCT01591356
DOTAP:Chol	TUSC2	Lung Cancer	Intravenous	I/II active (2011)	Genprex, Inc. (Houston, TX, USA)	NCT01455389
DOTAP:DOPE	SGT-53	Recurrent/refractory solid tumors in children	Intravenous	I active (2015)	SynerGene Therapeutics, Inc. (Houston, TX, USA)	NCT02354547
DOTAP:DOPE	SGT-53	Metastatic pancreatic cancer	Intravenous	II recruiting (2015)	SynerGene Therapeutics, Inc. (Houston, TX, USA)	NCT02340117

NY-ESO-1—New York-ESO 1; MAGE-A3—tyrosinase, Melanoma-associated antigen A3; TPPE—Transmembrane phosphatase with tensin homology; TUSC2—Tumor suppressor candidate 2; SGT-53—a complex of cationic liposome encapsulating a normal human wild type p53 cDNA sequence in a plasmid backbone; n.r.—not reported.

بافت های تومور از طریق پدیده های به نام "نفوذپذیری و اثر احتباس تقویت شده" (اثر Enhanced Permeability and Retention effect:EPR) تجمع می یابند که در آن هیپرواسکولاریزاسیون و کاهش تخلیه لنفاوی در بافت تومور به وجود می آید. در مقابل، آن ها را می توان با هدف قرار دادن لیگاندها (یعنی پروتئین ها، مولکول های کوچک، پپتیدها و کربوهیدرات ها) اصلاح کرد که امکان هدف گیری خاص لیپوزوم ها را به سلول های سرطانی و اندوتلیوم تومور می دهد (جدول ۴: قسمت دوم مقاله). این بررسی به رایج ترین لیگاندهای هدف برای ترویج هدف گیری فعال لیپوپلکس ها در ژن درمانی سرطان و غلبه بر معایب، مانند آنتی بادی ها، پپتیدها، فولات و آپتامرها می پردازد.

از حاملان چربی غیریروسی در مرحله پیش بالینی امیدوارکننده هستند و در کلینیک مورد ارزیابی قرار می گیرند. جدول (۳) کارآزمایی های بالینی فعلی را با استفاده از لیپوپلکس در درمان ضدتومور خلاصه می کند. رویکردی که برای حل این چالش استفاده می شود، توسعه حامل های غیریروسی است که عملکردی دارند یا به سیگنال های بیولوژیک پاسخ می دهند و می توانند محتوای NA را به موقع و کارآمد رایه دهند.

یکی دیگر از مزایای بزرگ استفاده از لیپوزوم ها برای تحویل NA، توانایی آن ها برای تجمع در تومورها از طریق هدف گیری غیرفعال و فعال است. به دلیل خواص کلوییدی خود، آن ها به طور غیرفعال در

1. Sung H. Ferlay J. Siegel RL. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71: 209–249.
2. Hanahan D. Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011; 144: 646–674.
3. Cross D. Burmester JK. Gene therapy for cancer treatment: Past, present and future. *Clin Med Res* 2006; 4: 218–227.
4. Ponti F. Campolungo M. Melchiori C. Cationic lipids for gene delivery: Many players, one goal. *Chem Phys Lipids* 2021; 235: 105032.
5. Maestro S. Weber ND. Zabaleta N. Aldabe R. Gonzalez-Aseguinolaza G. Novel vectors and approaches for gene therapy in liver diseases. *JHEP Rep* 2021; 3: 100300.
6. Shinkuma S. Advances in gene therapy and their application to skin diseases: A review. *J Dermatol Sci* 2021; 103: 2–9.
7. Ma CC. Wang ZL. Xu T. He ZY. The approved gene therapy drugs worldwide: From 1998 to 2019. *Biotechnol Adv* 2020; 40: 107502.
8. Azevedo A. Farinha D. Galdes C. Faneca H. Combining gene therapy with other therapeutic strategies and imaging agents for cancer theranostics. *Int J Pharm* 2021; 606: 120905.
9. Alhakamy NA. Curiel DT. Berkland CJ. The era of gene therapy: From preclinical development to clinical application. *Drug Discov Today* 2021; 26: 1602–1619.
10. Shanahan MA. Aagaard KM. McCullough LB. Chervenak FA. Shamshirsaz AA. Society for Maternal-Fetal Medicine Special Statement: Beyond the scalpel: In utero fetal gene therapy and curative medicine. *Am J Obstet Gynecol* 2021; 225: B9–B18.
11. Bulaklak K. Gersbach CA. The once and future gene therapy. *Nat Commun* 2020; 11: 11–14.
12. Gonçalves GAR. Paiva RMA. Gene therapy: Advances, challenges and perspectives. *Einstein* 2017; 15: 369–375.
13. Al-Dosari MS. Gao X. Nonviral gene delivery: Principle, limitations, and recent Progress. *AAPS J* 2009; 11: 671–681.
14. Patil S. Gao YG. Lin X. Li Y. The development of functional non-viral vectors for gene delivery. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 5491.
15. Luiz MT. Viegas JSR. Abriata JP. Tofani LB. Docetaxel-loaded folate-modified TPGS-transfersomes for glioblastoma multiforme treatment. *Mater Sci Eng C* 2021; 124: 112033.
16. Dehkordi NG. Elahian F. Khosravian P. Mirzaei AA. Intelligent TAT-coupled anti-HER2 immunoliposomes knock down MDR1 to chemosensitize phenotype of multidrug resistant carcinoma. *J Cell Physiol* 2019; 234: 20769–20778.
17. Noack LC. Jaillais Y. Functions of Anionic Lipids in Plants. *Annu Rev Plant Biol* 2020; 71: 71–102.
18. Ho SY. Chen PR. Chen CH. Tsai NM. Lipoplex-based targeted gene therapy for the suppression of tumours with VEGFR expression by producing anti-angiogenic molecules. *J Nanobiotechnol* 2020; 18: 1–14.
19. Fujii S. Nishimura T. Sakurai K. Thermodynamics of lipoplex formation: Relationship between the lipid alkyl tail length and thermodynamic functions. *Chem Lett* 2012; 41: 501–503.
20. Freeman EC. Weiland LM. Meng WS. Modeling the proton sponge hypothesis: Examining proton sponge effectiveness for enhancing intracellular gene delivery through multiscale modeling. *J Biomater Sci Polym Ed* 2013; 24: 398–416.

21. Wong-Baeza C. Bustos I. Serna M. Tescucano A. Membrane fusion inducers, chloroquine and spermidine increase lipoplex-mediated gene transfection. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 396: 549–554.
22. Cui S. Wang Y. Gong Y. Lin X. Correlation of the cytotoxic effects of cationic lipids with their headgroups. *Toxicol Res* 2018; 7: 473–479.
23. Kulkarni JA. Cullis PR. Van Der Meel R. Lipid Nanoparticles Enabling Gene Therapies: From Concepts to Clinical Utility. *Nucleic Acid Ther* 2018; 28: 146–157.