

انتقال سازه ژن درمانی توسط نانوذرات پلی پلکسی (نوع پلی اتیلن ایمینی هدفمندشده) به سلول‌های سرطانی روده بزرگ

دانشور
پزشکی

نویسندگان: فاطمه رهبری زاده*^۱، نگار اصل رسولی^۲، فریوش جعفری ایری سفلی^۲، داود احمدوند^۳

۱. دانشیار - گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲. دانشجوی - گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳. استادیار - دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

E-mail: Rahbarif@modares.ac.ir

*نویسنده مسئول: فاطمه رهبری زاده

چکیده

مقدمه و هدف: هدف از این تحقیق، تهیه نانوذرات پلی اتیلن ایمینی هدفمندشده بانانوبادی ضد TAG-72 برای انتقال سازه کدکننده ژن کشنده t-Bid به سلول‌های سرطان روده بزرگ (کولون) انسانی است.

مواد و روش‌ها: ابتدا نانوبادی نو ترکیب تخلیص شده با SDS-PAGE، وسترن بلاتینگ و الیزا تأیید شد. پلی اتیلن گلیکول روی نانوذرات پلی اتیلن ایمین (PEI) سوار شد و در نهایت با اتصال کووالان نانوبادی بر سطح نانوذرات، ناقل پلی پلکسی هدفمند ساخته شد. بار سطحی و اندازه نانوذرات با استفاده از دستگاه مالورن و دستگاه نانو سایت بررسی و کارایی حامل ژنی ساخته شده در انتقال ژن کشنده به رده های سلولی آدنوکارسینوما روده بزرگ با آزمون Real Time PCR بررسی شد.

نتایج: نتایج دستگاه مالورن، ساخت نانوذرات هدفمند با اندازه ۱۶۸ نانومتر و پتانسیل سطحی ۷.۱۸+ میلی ولت را نشان داد. با استفاده از آزمون تاخیر حرکت در ژل، در برگیری و فشردگی سازی صحیح و مناسب سازه ژنی را تأیید کردیم. نتایج Real Time PCR هدایت بیان ژن هدف به سلول‌های توموری روده بزرگ را تأیید کردند.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق، کارایی نانوذرات پلی پلکسی هدفمندشده بانانوبادی در انتقال ژن و قابلیت آنها برای هدفمند سازی انتقال ژن به سلول را تأیید می‌کند.

واژگان کلیدی: نانوذرات، نانوبادی، پلی اتیلن ایمین، پلی اتیلن گلیکول ، TAG-72

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیستم - شماره ۱۰۱
آبان ۱۳۹۱

دریافت: ۹۱/۶/۲۲

آخرین اصلاح‌ها: ۹۱/۹/۲۹

پذیرش: ۹۱/۱۰/۹

مقدمه

مؤثرترین روش‌های درمانی سرطان، روش‌هایی هستند که توانایی کاهش اندازه تومور بدون آسیب به بافت سالم را داشته باشند. یکی از مؤثرترین و کارآمدترین روش‌هایی که به منظور درمان هدفمند سرطان به کار می‌رود، استفاده از نانوذرات حامل داروهای ضد-سرطان یا حامل ژن‌های درمانی هستند؛ نانوذرات، موجبات پیشرفت‌های زیادی را در درمان سرطان از جمله اختصاص و انتقال مؤثر ژن یا دارو به محل تومور فراهم کرده‌اند (۱)؛ همچنین این ذرات در مقایسه با وکتورهای ویروسی از مزایایی ویژه مانند ظرفیت بالای حمل ژن بهره‌مندند (۳ و ۲). امروزه نانو ذراتی متنوع برای درمان سرطان ابداع شده‌اند که از مهم‌ترین این ذرات، پلیمرهای کاتیونی پلی اتیلن ایمین (PEI) هستند که در این تحقیق از این پلیمرها برای انتقال ژن به سلول‌های سرطانی روده بزرگ استفاده شده است. پلیمرهای PEI در محلول‌های اسیدی بار مثبت پیدا می‌کنند و توسط این بار مثبت می‌توانند قطعات DNA را که دارای بار منفی هستند، به دام بیندازند که در این حالت به آنها پلی پلکسی گفته می‌شود (۴). پلی پلکسی‌های ایجاد شده از اثر نوکلئازها محافظت می‌شوند و از طریق اندوسیتوز، موجبات انتقال قطعه ژنی مربوط به داخل سلول فراهم می‌شود (۵).

بار مثبت پلی پلکسی‌های PEI/DNA باعث واکنش‌های ناخواسته با سلول‌های غیرهدف، ترکیب‌های خون و اندوتلیال عروق می‌شود؛ این واکنش‌ها باعث کاهش نیمه عمر آنها به دلیل اپسونیزه شدن و گیرکردن در عروق باریک و همچنین کاهش اختصاص تخصیص آنها برای تومور به دنبال تجمع آنها در کبد، طحال و شش‌ها می‌شود (۶)؛ برای رفع این موانع از پوشش‌های هیدروفیل مانند پلی اتیلن گلیکول (PEG) استفاده می‌شود. پوشاندن سطح نانوذرات پلیمری با زنجیره‌های (PEG) از طریق ایجاد نوعی پوشش استری، باعث

افزایش حلالیت، پایداری و زمان گردش در خون و کاهش تجمع و سمیت این ذرات می‌شود (۷) ولی با کاهش بار سطحی، میزان کارایی انتقال ژن نیز کاهش می‌یابد که با اتصال لیگاندهای اختصاصی سلول هدف به سطح نانوذره از طریق PEG، کارایی انتقال ژن و اختصاص آن را افزایش می‌دهند (۸)؛ برای افزایش اختصاص پلی پلکسی‌ها از مولکول‌های هدف‌گیر متصل شده به پلی پلکسی‌ها استفاده می‌شود که این مولکول‌ها ریسپتورهای اختصاصی سطح سلول‌ها را می‌شناسند، بنابراین باعث هدایت این پلی پلکسی‌ها به بافت‌هایی خاص می‌شوند. لیگاندهایی متعدد مانند ترکیب‌های شیمیایی کوچک، لیگاندهای پپتیدی، ویتامین‌ها، کربوهیدرات‌ها، فاکتورهای رشد، آنتی‌بادی‌ها و ... وجود دارند. از آنجاکه آنتی‌بادی‌ها در مقایسه با لیگاندهای دیگر، اختصاصی‌تر عمل می‌کنند (۹)، در این مطالعه نیز، از ناحیه متغیر آنتی‌بادی‌های شتری استفاده شده است که نسبت به آنتی‌بادی‌های کلاسیک مزایایی دارند. نانوبادی یا VHH (Variable heavy chain of heavy chain antibodies) کوچک‌ترین دومن متصل شونده به آنتی‌ژن از آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین خانواده Camelidae است که در اینجا به عنوان دنباله هدف‌گیر در پلی پلکسی‌ها به کاررفته و آنتی‌ژن‌های سطح سلول‌های توموری را هدف‌گیری می‌کند؛ این آنتی‌بادی‌ها، کوچکترین آنتی‌بادی‌های طبیعی با اندازه حدود ۱۵KDa هستند که بدون داشتن زنجیره سبک، به طور کامل، دارای عملکرد هستند (۱۰). آنتی‌ژنی که در این مطالعه مورد هدف قرار گرفته است، آنتی‌ژن Tumor (TAG-72) associated glycoprotein-72 است که یک گلیکو پروتئین غشایی با وزن مولکولی ۲۲۰-۴۰۰ KDa است؛ بیان این آنتی‌ژن در سرطان‌هایی مختلف از جمله آدنوکارسینومای کلون افزایش می‌یابد و در حالت نرمال، فقط در بافت‌های اندومتر در حال تکثیر یا اندومتر در حال استراحت در زنان یائسه و بافت‌هایی خاص از جنین بیان می‌شود؛

(MAL) با وزن مولکولی ۳۵۰۰ دالتون از شرکت JenKem تهیه شد.

تأیید خصوصیات نانوبادی (SR-1) ضد آنتی ژن TAG-72: محلول دیالیز شده حاوی نانوبادی SR-1 با استفاده از روش SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis) و وسترن بلاتینگ تأیید شد. واکنش اتصال نانوبادی SR-1 به آنتی ژن TAG-72 به روش الایزا بررسی شد؛ بدین ترتیب که ابتدا چاهک‌های پلیت الایزا با مولکول‌های BSA (Bovine Serum Albumin)، BSM (Bovine Submaxillary Mucin)، PSM (Porcine Submaxillary Mucin)، شیر خشک بدون چربی (Skim-Milk)، کازئین یا موسین^۱ (MUC1) به عنوان کنترل منفی و همچنین با آنتی ژن TAG-72 (همگی با غلظت ۵۰ ng) پوشانده شد و برای مدت یک شب در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از دو بار شستشو با PBS، بافر بلاکینگ (۴٪ BSA) به آن افزوده شد و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس نانوبادی SR-1 به چاهک‌ها اضافه شده، به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شد. بعد از شستشو با PBS-Tween و PBS به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه با آنتی‌بادی anti-C-Myc متصل به HRP که در بافر فسفات حاوی ۱ درصد BSA رقیق شده است، انکوبه شد؛ سپس شستشو با PBS-Tween و PBS انجام گرفت و سوبسترای TMB به چاهک‌ها افزوده شد و تا زمان آبی شدن، در تاریکی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس برای توقف واکنش از HCl ۲۰ درصد استفاده شد.

مقدار ۰٫۸ میکروگرم PEI و ۶۵ میکروگرم Mal-PEG3500-NHS در ۵۰۰ میکرولیتر DMSO حل شد و یک ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با هم زدن مخلوط شد. با استفاده از فیلترهای اولترافیلتراسیون آمیکون (Millipore) دارای cut off= 10 kDa مولکول‌های PEG کونژوگه نشده با PEI از محلول خارج شدند. ۵۰ میکرولیتر از این مخلوط با ۵۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی

بنابراین هدفی مناسب برای درمان سرطان با آنتی‌بادی به‌شمار می‌رود (۱۱)؛ درباره مزیت دیگر این آنتی‌ژن باید گفت که بیان آن در بیماری‌های التهابی و خوش‌خیم روده بزرگ افزایش نمی‌یابد (۱۲). در این تحقیق نانوبادی ضد آنتی‌ژن TAG-72، به روش نمایش فاژی جداسازی شد و به منظور هدف‌گیری سلول‌های سرطانی روده بزرگ انسانی، روی نانوذرات PEI/PEG به‌عنوان مولکول هدف‌گیر قرار گرفت.

سازه ژنی که در این مطالعه استفاده شد، حاوی ژن کدکننده پروتئین t-Bid (Truncated Bid) است که یکی از آخرین اجزای مسیر وابسته به میتوکندری آپوپتوز است و به دنبال بیان در سلول موجب خروج سیتوکروم C از فضای میان‌غشایی میتوکندری و در نتیجه، تشکیل کمپلکس آپوپتوزوم و در نهایت، مرگ سلول می‌شود. برای القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی، سازه ژنی بیان‌کننده پروتئین t-Bid توسط نانوذرات PEI/PEG هدف‌مند شده با نانوبادی ضد آنتی‌ژن TAG-72، به سلول‌های سرطانی روده بزرگ (LS174T) که واجد این آنتی‌ژن هستند، انتقال داده شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از آنزیم DNA پلیمراز Taq، DNA لیگاز T4 و آنزیم‌های هضم‌کننده محدودالایثر BbsI، BamHI، EcoRI (شرکت Fermentas) استفاده شده است. کیت‌های تخلیص از ژل (NucleoTrap)، تخلیص پلاسمید (NucleoSpin Plasmid) و تخلیص پروتئین دارای His-Tag (Protino® Ni-IDA Packed Columns) از شرکت MACHERY-NAGEL (MN) تهیه شده‌اند؛ همچنین کیت تخلیص RNA (RNX-Plus) از شرکت سیناژن، رده سلول یوکاریوتی آدنوکارسینوما روده بزرگ (LS174T) و رده سلول‌های فیروبلاست NIH3T3 (سلول‌های فیروبلاست موشی)، از انستیتو پاستور ایران، پلیمر PEI از شرکت Sigma و آن هیدورکسی سوکسینامید- پلی اتیلن گلیکول-مالثیمید (NHS-PEG)

سطحی در کارایی انتقال ژن به داخل سلول تأثیری بسزا دارد، بار سطحی نانوذره هدفمند به دست آمده (پلی پلکس PEI پگیله شده هدفمند با نانوبادی آنتی-TAG-72) توسط دستگاه زتاسایزر (Malvern) و اندازه نانوکمپلکس‌ها با کمک دستگاه نانو سایت (دانشگاه کوپنهاگ، دانشکده داروسازی، گروه نانومدیسنین و انتقال دارو) اندازه‌گیری شد.

سلول‌های رده LS174T (رده سلولی آدنوکارسینومای روده بزرگ انسان دارای بیان آنتی ژن TAG-72) به عنوان سلول هدف و رده NIH3T3 (رده سلولی فیروپلاست موشی) به عنوان شاهد، در محیط DMEM با ۱۰FCS درصد کشت و تعداد 6×10^4 سلول برای هر چاهک به پلیت ۲۴ خانه منتقل شدند تا به تراکم محیطی ۸۰ درصد برسند؛ سپس در محیط DMEM با مقادیر کاهشی FCS انکوبه شدند و ۱۴ ساعت پیش از ترانسفکشن به آنها محیط DMEM بدون آنتی بیوتیک با ۱ FCS درصد اضافه شد. نانوذرات PEI/PEG هدفمند شده با نانوبادی ضد TAG-72 که حاوی $0.5 \mu\text{g}$ پلاسمید HRE/ERE-pMUC1-t-Bid ($N/Pratio = 12/1$) بودند به صورت تازه تهیه شدند؛ سپس محیط کشت از روی سلول‌ها جمع و یکبار با محیط کشت خام که به دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد رسیده است، شسته شد. مواد زیر به ترتیب به سلول-ها افزوده شدند: $150 \mu\text{l}$ محیط DMEM بدون سرم و آنتی-بیوتیک برای هر چاهک از پلیت‌های ۲۴ خانه و $100 \mu\text{l}$ مخلوط ترانسفکشن حاوی 0.5 میکروگرم از DNA پلاسمیدی، که قطره قطره به هریک از خانه‌های پلیت ۲۴ خانه اضافه شد؛ سپس سلول‌ها ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO_2 کشت داده شد و سپس محلول ترانسفکشن از روی سلول‌ها برداشته شد و سلول‌ها یکبار با محیط DMEM خام که به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رسیده بود، شسته شدند؛ سپس داخل هر چاهک 1 ml محیط کشت کامل DMEM با ۱۰ FCS درصد اضافه شد و سلول‌ها برای ۶ تا ۱۶ ساعت در

(پپتید) مورد نظر با غلظت 0.5 mg/ml در PBS مخلوط شد و برای مدت دست‌کم ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با حرکت ۶۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. برای تهیه نانوذرات PEI/PEG غیرکونژوگه با نانوبادی، به جای نانوبادی در مرحله قبل، از اسید آمینه L-cysteine با غلظت 0.5 mg/ml استفاده شد. برای تخلیص نانوذرات تهیه شده، از فیلترهای اولترافیلتراسیون آمیکون با cut off = 20 kDa استفاده شد. برای اندازه‌گیری مقدار PEI/PEG و نانوبادی از فرمول Warburg استفاده شد.

$$C (\text{mg/ml}) = 1.55 \times (A_{280} - A_{320}) - 0.76 \times (A_{260} - A_{320})$$
 C در این فرمول، غلظت است که با استفاده از میزان جذب در طول موج‌های مشخص شده، محاسبه می‌شود.

محلول پلاسمید حاوی ژن کشنده (HRE/ERE-) pMUC1-t-Bid با غلظت 100 میکروگرم DNA در هر میلی‌لیتر آب Ultrapure تهیه شد. 0.5 میکروگرم از DNA پلاسمیدی در 50 میکرولیتر محیط کشت بدون سرم حل-شد. PEI/PEG (SR-1), PEI/PEG ($3.2 \times 10^{-7} \text{M}$ PEI) و PEI (3.2×10^{-7}) به طور جداگانه در 50 میکرولیتر محیط کشت DMEM بدون سرم حل شد. محلول به دست آمده در مرحله پیشین، قطره قطره به محلول DNA اضافه شد. در تمام این مدت، مخلوط به آرامی ورتکس و برای ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد تا برای ترانسفکشن آماده شود.

به منظور اطمینان از آنکه پلاسمید حاوی سازه ژنی HRE/ERE-pMUC1-t-Bid در داخل نانوذرات ساخته شده، به خوبی فشرده شده است، پلی پلکس PEI/PEG هدفمند و پلی پلکس PEI/PEG غیرهدفمند با نانوبادی، با غلظت مشابه آنچه برای ترانسفکشن سلول‌ها به کار رفت، تهیه و پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، در کنار سازه ژنی کمپلکس نشده با PEI، به عنوان کنترل، روی ژل آگارز ۱ درصد در ولتاژ 100 V برای مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز شد. باندهای DNA با نور UV مشاهده شد (تست تاخیر حرکت DNA در ژل). از آنجا که بار

از فریز کردن سلول‌ها در فریزر ۷۰- (درجه سانتی‌گراد)، حجم ۱۰ میکرولیتر از آنها با حجم برابر از رنگ حیاتی تریپان بلو ترکیب و زیر میکروسکوپ، تعداد سلول‌های زنده و مرده شمارش شدند.

نتایج

غلظت محلول حاوی نانوبادی به روش برادفورد تعیین شد که با استفاده از پروتئین BSA برای غلظت‌های استاندارد، غلظت نانوبادی معادل ۰,۲۱ mg/L برآورد شد و سپس روی ژل ۱۵ درصد پلی‌اکریل آمید الکتروفورز شد؛ نتایج SDS-PAGE وجود نانوبادی را تأیید می‌کنند (شکل ۱).

برای اطمینان از اینکه باند دیده شده در ژل SDS-PAGE مربوط به نانوبادی است، وسترن بلاتینگ نیز انجام گرفت. در وسترن بلاتینگ با کاربرد آنتی‌بادی موشی ضد C-myc tag (مولکول tag موجود در انتهای نانوبادی نو ترکیب) حضور تک باند نانوبادی در ناحیه حدود ۲۰ کیلو دالتون تأیید شد (شکل ۲).

اختلاف OD450nm میان چاهک‌های کنترل منفی و آنتی‌ژن TAG-72 معرف واکنشگری نانوبادی به آنتی‌ژن مرتبط به صورت ویژه است (جدول ۱).

پس از تهیه پلی‌پلکس‌های حاوی سازه ژنی ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌های تازه تهیه شده در ژل آگارز ۱ درصد برای ۴۵ دقیقه الکتروفورز شد. توانایی نانوذرات برای دربرگیری و بسته‌بندی سازه ژنی و در نتیجه، جلوگیری از حرکت الکتروفورزی آن در جهت قطب مثبت (بار مثبت غالب در نانوذره حرکت آن را به- صورت معکوس یعنی از مثبت به منفی تغییر می‌دهد) در شکل ۳ نشان داده شده است. سازه ژنی به تنهایی (به عنوان کنترل) که به راحتی در ژل حرکت می‌کند، در این آزمون آورده شده است.

اندازه‌گیری بار سطحی نانوذرات PEI/PEG هدفمند- شده با نانوبادی که همگی با نسبت ۱۲ به ۱ (PEI) به

دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ انکوبه- شدند. تیمارهایی که روی هر دو سلول هدف و کنترل صورت گرفتند، شامل موارد زیرند: PE I به تنهایی، PEI حامل سازه ژنی، PEI/PEG حامل سازه ژنی، PEI/PEG/SR-1 حامل سازه ژنی و سلول‌های بدون تیمار (به عنوان کنترل).

۱۶ ساعت بعد از ترانسفکشن، تخلیص RNA از سلول‌ها توسط کیت تخلیص RNA از شرکت MN انجام شد و سپس واکنش سنتز cDNA روی آنها به کمک کیت سنتز cDNA از شرکت Fermentas صورت گرفت. به منظور بررسی کمی بیان ژن و با استفاده از دستگاه Real Time PCR (شرکت Applied Biosystem (Stepone) واکنش Real Time PCR روی تمام cDNAهای سنتز شده انجام شد. نسبت بیان ژن هدف (ژن tBid) در مقایسه با کنترل ژن بتا اکتین با کاربرد فرمول pfaffle برای تمام تیمارها محاسبه شد.

$$E = \frac{Ct - \text{کنترل} (هدف)}{Ct - \text{کنترل} (هدف)}$$
نسبت بیان

E (Efficiency) در این فرمول بیانگر کارایی تکثیر است و Ct (Cross threshold)، محل تقاطع منحنی تکثیر با خط آستانه است یا به عبارتی، نشان‌دهنده شماره چرخه‌ای از PCR است که در آن میزان فلورسنس به حد آستانه می‌رسد.

سازه ژنی حمل شده با نانوذرات PEI/PEG، بعد از ورود به سلول‌های سرطانی روده بزرگ به دلیل قرار- گرفتن پروموتور ژن MUC1 پیش از ژن t-Bid و بیان بالای MUC1 در سلول‌های سرطانی روده بزرگ باعث تولید پروتئین کشنده t-Bid در این سلول‌ها می‌شوند. برای مقایسه اثر نانوذرات هدفمند و غیرهدفمند بر سلول‌های سرطانی و سلول‌های کنترل، یکی از راه‌ها، شمارش سلول‌های زنده و مرده است؛ کنترل منفی در این آزمایش سلول‌های بدون تیمار هستند. پس از تریپسینه کردن سلول‌ها و جداسازی آنها از کف (پیش

گرفته شده است دال بر قدرت ایجاد آپوپتوز و توکسیسیتی توسط PEI بدون PEG (به علت قابلیت سوراخ کردن دیواره میتوکندری و خروج سیتوکروم c) است؛ از طرفی، تیمار سلول‌ها با نانوذرات بدون سازه ژنی مشاهده می‌شود که اثر این بر سلول‌های مورد آزمون خیلی نزدیک به کنترل منفی و نیز خیلی نزدیک به مرگ-ومیر در سلول بدون تیمار است که نشان‌دهنده سمیت پایین نانوذرات بر سلول‌های عادی است (در نمودار شماره SR-1،۲ معادل نانوبادی ضد TAG-72 و t-Bid معادل سازه ژنی HRE/ERE-pMUC1-t-Bid است)؛ از مقایسه این نمودارها مشخص است که پلی پلکس‌های پگیله و هدفمند با نانوبادی، در انتقال ژن کشنده t-Bid به سلول‌های سرطانی روده بزرگ موفق بوده‌اند و باعث کمترین میزان مرگ‌ومیر در سلول‌های فاقد آنتی‌ژن سطحی TAG-72 شده‌اند؛ همچنین اثر پگیلاسیون و هدفمند کردن پلی پلکس‌ها در کاهش اثر سمی نانوذرات PEI به‌طور کامل، مشهود است.

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس پیشرفت‌های گزارش شده در دهه اخیر به-نظرمی‌رسد ژن‌درمانی راهکارهایی مؤثر در زمینه درمان سرطان ارائه خواهد کرد. تعریف دقیق از بافت هدف و یافتن یک حامل مؤثر برای انتقال ژن همچنان دو محدودیت بزرگ موجود در زمینه کاربرد درمانی ژن‌ها هستند. تاکنون دو روش عمده برای انتقال ژن به سلول-های یوکاریوتی به‌کاررفته‌اند که شامل ۱- به‌کارگیری حامل‌های ویروسی و ۲- حامل‌های برپایه لیپید، پپتید یا پلیمرهای کاتیونی (سیستم‌های غیرویروسی) می‌شوند. گرچه وکتورهای ویروسی هنوز هم کارآمدترین سیستم انتقال ژن به حساب می‌آیند القای پاسخ ایمنی و قابلیت نو ترکیبی آنها با ژنوم از جمله بزرگ‌ترین معایب این سیستم‌ها به‌شمار می‌رود (۱۳).

یکی از پلیمرهای کاتیونی مؤثر که به‌عنوان حامل ژنی غیرویروسی هم در آزمایشگاه و هم در بدن موجود

DNA یا N/P) تهیه شد به کمک دستگاه زتاسایزر Malvern انجام گرفت. میانگین پتانسیل زتا در سطح نانوذرات بعد از پگیله شدن $+18.7$ میلی‌ولت بود (جدول ۲).

اندازه نانوذرات پگیله هدفمند شده با نانوبادی به کمک دستگاه Nanosight با نرم‌افزار [Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) Version 2.0] تعیین شدند. میانگین اندازه نانوذرات 168 ± 69 nm و بخش اعظم نانوذرات اندازه‌گیری شده، 126 nm بودند (شکل ۴).

بعد از تخلیص RNA از سلول‌های تحت تیمار، cDNA ساخته شده از آنها به‌عنوان الگو در Real Time PCR استفاده شد. نتایج Real Time PCR پس از محاسبه نسبت بیان ژن t-Bid در مقایسه با ژن کنترل بتا اکتین در نمودار ۱ مشاهده می‌شود. نتایج به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده‌اند؛ این نمودار با مقایسه تیمارهای PEI/t-Bid و PEI/PEG/t-Bid نشان‌دهنده میزان کاهش ترانسفکشن غیرهدفمند، در نتیجه پگیلاسیون است؛ همچنین نمایان‌گر اثر مثبت نانوبادی SR-1 در انتقال سازه ژنی به سلول‌های دارای آنتی‌ژن سطحی TAG-72 است؛ این نمودار نشان می‌دهد که میزان انتقال ژن توسط نانوذرات غیرکونژوگه با نانوبادی، در سلول LS174T محدود است و اختصاصی‌ترین میزان بیان ژن t-Bid توسط نانوذرات پگیله و کونژوگه با نانوبادی SR-1 و به-صورت اختصاصی در سلول‌های LS174T دیده می‌شود.

میزان مرگ سلولی بر اثر تیمارهای مختلف در مقایسه با حالت تیمار نشده، راهی مناسب برای ارزیابی میزان سمیت سلولی و نیز کارایی حامل ژنی ساخته شده در انتقال ژن کشنده t-Bid است. نمودار شماره ۲ نتایج شمارش سلول‌های زنده و مرده را بر اساس نوع سلول و نوع تیمار به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان می‌دهد. در خصوص سمیت سلولی حاصل از خود ذرات PEI با توجه به اثر این نانوذرات بر سلول‌های NIH3T3 که به‌عنوان سلول غیربیان‌کننده آنتی‌ژن در نظر-

طراحی شده است متصل می شوند (۱۶).

تحقیقات نشان داده اند که کارایی انتقال ژن با اتصال آنتی بادی از طریق PEG بسیار بیشتر از مواردی است که آنتی بادی از طریق دیگر لینکرها به PEI متصل شود؛ بدین ترتیب هم سمیت سیستمیک پلی پلکس های PEI کم می شود و هم زمان گردش این نانوذرات در جریان خون افزایش می یابد (۱۷)؛ اما باعث کاهش اثربخشی آنها در تحویل ژن به سلول ها می شود. برای بهبود این نقص لیگاندهای هدف یاب به کمک آمدند تا مسیرهای اندوسیتوز وابسته به گیرنده را به کارگیرند و ژن را به سلول تحویل دهند؛ برای این منظور، مولکول های هدف یاب نانوبادی را روی پوشش PEG وارد کردیم.

در تلاش برای کوچک تر کردن اندازه آنتی بادی ها برای حذف ایمونوژنسیته و کاربردی کردن آنها در بالین، آنتی بادی های تک دومنی که فقط از بخش متغیر (VH) زنجیره سنگین آنتی بادی های معمولی تشکیل شده است، تولید شدند (۱۸)؛ این آنتی بادی ها چون زنجیره سبک را ندارند، افینیتیه پایینی نسبت به آنتی ژن خود دارند؛ به علاوه چون اسیدهای آمینه هیدروفوب VH در این شرایط در معرض قرار می گیرد باعث چسبیدن این آنتی بادی های تک دومنی به هم می شود (۱۹). مطالعات بعد نشان داد این آنتی بادی های تک دومنی به طور طبیعی در سرم شترها وجود دارد و ۵۰ درصد پاسخ ایمنی این حیوانات را شامل می شود. نانوبادی ها در شناسایی آنتی ژن مخصوص سرطان موفق بوده اند. در تحقیق حاضر از ناحیه متغیر آنتی بادی های شتری (نانوبادی یا VHH) برای هدف گیری سلول های سرطانی روده بزرگ استفاده شده است؛ در مطالعات پیشین گروه ما به کمک روش نمایش فاژی و پلاشویی، نانوبادی با بیشترین میل پیوندی برای آنتی ژن TAG-72، از میان کتابخانه ژنی جدا شده است. TAG-72 نوعی گلیکوپروتئین با وزن مولکولی بالا و شبیه خانواده موسین ها است؛ این گلیکوپروتئین ها در سلول های سالم بیان نمی شوند مگر در بافت هایی خاص از جنین که به

زنده استفاده می شود پلی اتیلن ایمین (PEI) است، اما باید این نانو حامل را برای تحویل ژن به بافت یا سلول مورد نظر هدفمند کرد. پلی پلکس های PEI تغییر نیافته، توانایی تمییز میان بافت هدف و غیرهدف را ندارند و به غشای هر سلولی که در مسیرشان قرار گیرد می چسبند؛ به همین دلیل، تزریق سیستمیک این پلی پلکس ها در موش (از طریق ورید دم) باعث بیان ژن در ریه ها (۱۴) و سمیت سیستمیک (۱۵) خواهد شد. برای جلوگیری از واکنش میان نانوذرات با ترکیب های خون و غشای سلول های غیرهدف، سطح نانوذرات را پگیله می کنند تا نانوذراتی با بار به طور تقریبی، خنثی به دست آید؛ پلی اتیلن گلیکول (PEG) علاوه بر این کار به عنوان spacer برای اتصال لیگاند و در نتیجه، هدفمند کردن نانوذرات اهمیت دارد. PEG برای اولین بار در سال ۱۹۹۰ برای پگیله کردن پروتئین آدنوزین دامیناز گاوی مجوز FDA گرفت و پس از آن از این پلیمر هیدروفوب استفاده های بسیاری در صنعت داروسازی به عمل آمده است. هدف از این مطالعه، القای آپوپتوز در رده های سلول های سرطانی روده بزرگ است؛ بدین منظور، سازه ژنی بیان کننده پروتئین t-Bid توسط نانوذرات PEI/PEG هدفمند شده با نانوبادی ضد آنتی ژن TAG-72 (آنتی ژن اختصاصی سلول های سرطانی روده بزرگ)، به سلول های سرطانی روده بزرگ (LS174T) که واجد این آنتی ژن هستند، انتقال داده شد. در این تحقیق از PEI شاخه دار ۲۵ کیلودالتونی که در میان وزن های مولکولی مختلف PEI به عنوان پرکاربردترین و دارای بیشترین کارایی انتقال ژن است، استفاده شده است؛ همچنین برای کاهش سمیت PEI و افزایش کارایی انتقال ژن، آن را به کمک مولکول های NHS-PEG-Mal (با دو سر واکنشگر مختلف) کونژوگه کردیم؛ این مولکول های PEG به خوبی امکان اتصال آنتی بادی به نانوذرات را فراهم می آورند؛ این مولکول ها از طرف NHS به گروه های آمین PEI و از طرف Mal به سیستمی (cys) که در انتهای کربوکسیل لیگاند یا آنتی بادی

پوشش PEG مانع از ورود پلی پلکس به سلول‌ها نمی‌شود، این نتیجه نشان‌دهنده اثر هدفمندسازی رونویسی با قراردادن پروموتور MUC1 پیش از ژن است. از مقایسه اثر پلی پلکس‌های پگیده ولی غیرهدفمند بر سلول‌های LS174T و سلول‌های NIHT3T (کنترل)، به کاهش میزان انتقال ژن به هر دو نوع سلول بر اثر پگیلاسیون پی‌می‌بریم؛ همچنین از مقایسه این نتایج با تیمار PEI/ t-Bid بر هر دو سلول متوجه می‌شویم که پگیلاسیون به‌خوبی توانسته مانع از اثر سمی و انتقال غیراختصاصی و غیرهدفمند به سلول‌های کنترل شود. بدون هدفمندسازی انتقال ژن، بیان ژن t-Bid تابعی از میزان بیان ژن MUC1 در سلول‌هاست و چون در این مطالعه، سلول‌ها از نظر بیان ژن t-Bid به صورت LS174T>NIH3T3 بودند، بنابراین افزایش ۵ برابری بیان ژن هدف در رده سلولی LS174T نسبت به حالت کنترل آن نشان‌دهنده فعالیت بالاتر پروموتور ژن MUC1 در همین رده سلولی است.

در بررسی نتایج پلی پلکس‌های t-PEI/PEG/SR-1/ Bid و از مقایسه آن با پلی پلکس‌های t-Bid/PEI/PEG هدف، متوجه تأثیر شایان نانوبادی در ورود نانوذرات به سلول‌های سرطان روده بزرگ که دارای آنتی‌ژن سطحی TAG-72 هستند، می‌شویم. اثر مثبت نانوبادی در هدفمندکردن نانوذره، از طریق مشاهده افزایش ۳۸ برابری بیان ژن t-Bid در سلول‌های LS174T در مقایسه با سلول‌های NIH3T3 (فاقد آنتی‌ژن سطحی TAG-72)، استنتاج می‌شود. از مقایسه اثر پلی پلکس‌های پگیده هدفمند و غیرهدفمند بر سلول‌های NIH3T3 اثر نانوبادی‌ها به‌عنوان یک مولکول نشانگر برای هدایت سازه درمانی به سلول‌های سرطانی و جلوگیری از انتقال سازه درمانی به سلول‌های نرمال و نیز یک پوشش مولکولی مضاعف و کاهش سمیت پلی پلکس مشاهده می‌شود.

در آزمایشگاه بیوتکنولوژی پزشکی تربیت مدرس،

این دلیل به آن آنتی‌ژن oncofetal نیز می‌گویند؛ همچنین سطحی از بیان این آنتی‌ژن بر سطح سلول‌های اندومتر نیز دیده می‌شود؛ بنابراین با توجه به اینکه این آنتی‌ژن به‌طور تقریبی، تنها روی سلول‌های سرطانی بیان می‌شود، هدفی مناسب برای انتقال ژن و دارو به سلول‌های سرطانی است. TAG-72 روی سطح ۸۰ درصد از انواع سلول‌های سرطانی روده بزرگ بیان می‌شود (۲۰). در این مطالعه از نانوبادی ضد آنتی‌ژن توموری TAG-72 استفاده شده است. رده‌های سلولی LS174T (رده سلولی دارای بیان آنتی‌ژن TAG-72) و NIH3T3 (رده سلولی کنترل فاقد بیان این آنتی‌ژن) به‌کارگرفته شدند تا توانایی هدفمندکردن نانوذرات با نانوبادی و کارایی انتقال ژن به سلول‌های سرطانی دارای TAG-72 توسط نانوذرات PEI/PEG در شرایط in-vitro تأیید شود.

درضمن، در این تحقیق از نوعی سازه ژنی کشنده اختصاصی تومور (HRE/ERE-pMUC1-t-Bid) که در آن پروموتور ژن MUC1 پیش از ژن t-Bid قرار داده شده است، استفاده کردیم (۲۱). بیان ژن MUC1 در تومورهای روده بزرگ و برخی تومورهای دیگر بیشتر از سلول‌های نرمال است؛ در نتیجه، پروموتور آن پیش از ژن پرو آپوپتوتیک t-Bid به بیان بالای آن و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی روده بزرگ منجر می‌شود. کارایی سازه ژنی کد-کننده ژن هدف t-Bid در القای مرگ سلول‌های توموری در مطالعات پیشین همین گروه با کاربرد لیپوفکتامین (۲۱) تأیید شده است. در این مطالعه برای انتقال هدفمند این سازه ژنی به سلول‌های یادشده در محیط آزمایشگاه از نانوذرات PEI پگیده شده استفاده شده است.

در مقایسه تیمار t-Bid/PEI روی سلول‌های سرطانی روده بزرگ (LS174T) و سلول‌های کنترل (NIH3T3)، بیان ژن t-Bid در سلول‌های LS174T به‌طور تقریبی، ۱۰ برابر بیشتر از بیان آن در سلول‌های کنترل (که ژن MUC1 انسانی را بیان نمی‌کنند) است؛ از آنجاکه در این نوع تیمار

هدف یاب بود (۲۴). در بررسی دیگری، CR16 را ضد گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF) به PEI متصل کردند و تأثیر مثبت این لیگاند را در انتقال ژن به داخل سلول‌های دارای این گیرنده چه در آزمایشگاه و چه در بدن موجود زنده نشان دادند (۲۵). پلی پلکس‌های PEI را با لیگاندهای دیگری نیز به کار برده‌اند: از جمله توالی RGD (۲۶)، گالاکتوز (برای هدف‌گیری سلول‌های کبدی) (۲۷)، آنتی CD4 (۲۸)، gp120 نوترکیب (پروتئین پوشش HIV) (۲۸)، فولات (۲۹)، ۳۰ و ۳۱، پپتیدهای صناعی (۳۲) و حتی LDL (۳۳): در همه‌ی این موارد برداشت انتخابی کمپلکس‌های حامل ژن بهبود یافته‌است و ژن به‌طور مؤثرتر به داخل سلول هدف منتقل شده‌است؛ اما اغلب مطالعات در زمینه هدف‌گیری با نانوذرات PEI، بر اساس پلی پلکس‌های PEI پگیله‌شده انجام شده‌است. اتصال فولات به کمپلکس PEI/PEG در انتقال هدفمند ژن‌ها به سلول‌های دارای گیرنده فولات تأثیر مثبت داشته‌است (۳۴ و ۳۵).

در یک بررسی فاکتور رشد اپیتلیالی (EGF) به PEI پگیله‌شده متصل شد تا سازه ژنی حاوی لوسیفراز را به رده سلولی Renca - EGFR وارد کند؛ میزان ورود ژن به داخل این رده سلولی در مقایسه با رده سلولی Renca بدون EGFR ۲ تا ۳ برابر بیشتر گزارش شده‌است (۳۶)؛ در مطالعه‌ای دیگر، ترانسفرین لیگاند پلی پلکس‌های PEI پگیله بود تا ژن لوسیفراز را به تومورهای نوروبلاستوما در موش‌های A/J منتقل کند. میزان بیان ژن در سلول‌های توموری ده تا صد برابر سلول‌های نرمال گزارش شد؛ در همین مطالعه، اتصال ترانسفرین (Tf) به پلی پلکس‌های PEI پگیله شده در انتقال ژن به سلول‌های هپاتوسلولار کارسینومای انسانی در موش‌های SCID، همان تأثیر را داشته‌است. تجویز مکرر کمپلکس PEI/PEG/Tf حاوی ژن فاکتور نکروز توموری α (TNF α) به نکروز سلول-های توموری انجامید (۳۷)؛ در مطالعه‌ای دیگر RGD به-عنوان لیگاند هدف‌یاب به کمپلکس‌های PEI/PEG

علاوه بر نانوذرات پلی اتیلن ایمینی از پلیمرهای کاتیونی PAMAM (پلی آمید و آمین) نیز به منظور انتقال هدفمند ژن کشنده به سلول‌های سرطان کولون استفاده شده‌است؛ بدین منظور این ذرات با نانوبادی علیه TAG-72 (آنتی-ژن اختصاصی سلول‌های سرطان روده بزرگ) هدفمند شده‌اند و نتایج کار به خوبی نمایانگر تأثیر قابل توجه مولکول نانوبادی ویژه آنتی‌ژن‌های توموری در فرایند انتقال ژن است؛ همچنین از ذرات پلیمری PEI نیز برای هدفمند کردن انتقال ژن به سمت سلول‌های سرطان سینه با به کار بردن نانوبادی ضد MUC1 و HER2 (آنتی‌ژن‌های اختصاصی سلول‌های سرطان سینه) استفاده شده‌است.

تاکنون پلی پلکس‌های بسیاری طراحی شده‌اند که از مسیر اندوسیتوز وابسته به گیرنده به سلول وارد شوند. در بسیاری از بیماری‌ها که ژن با هدف درمان باید به گروهی خاص از سلول‌ها وارد شود، وجود گیرنده‌هایی بر سطح برخی سلول‌ها ابزاری مؤثر در انتقال ژن به گروهی خاص از سلول‌ها خواهد بود؛ برای این منظور به حامل‌ها مولکول‌های هدف‌یاب متصل می‌کنند تا پس از شناسایی گیرنده‌های سطحی خود به سلول وارد شوند؛ در دو مطالعه آنتی‌بادی ضد رسپتور نوع ۲ فاکتور رشد اپیدرمی انسانی (HER2) یا همان هرسپتین را به PEI متصل کردند و نشان دادند با این کار میزان ورود ژن به سلول‌های رده SKBR3 (۲۲) و SKOV-3 (۲۳) که HER2 را بر سطح خود بیان می‌کنند، بیشتر از سلول‌هایی است که این آنتی‌ژن را بر سطح خود ندارند؛ در مطالعه‌ای دیگر، ترانسفرین، آنتی CD3 و فاکتور رشد اپیتلیال (EGF) را به‌طور جداگانه به پلی پلکس‌های PEI متصل کردند و تأثیر این مجموعه را بر انتقال به‌طور تقریبی، اختصاصی ژن به ترتیب به سلول‌های توموری مختلف، سلول‌های jurkat و سلول‌های رده آدنوکارسینومای روده بزرگ (KB) بررسی و اثبات کردند؛ در همه موارد سرعت ورود ژن به سلول هدف بسیار بیشتر از انتقال ژن با واسطه حامل‌های فاقد لیگاند

به‌طورکلی، این مطالعه تأییدی بر کارایی نانوذرات پلی پلکسی PEI/PEG/SR-1/t-Bid در انتقال ژن و نیز تأثیر مثبت پگیله‌کردن و اتصال نانوبادی ضد TAG-72 به این نانوذره حامل ژنی (برای هدفمندسازی انتقال ژن به سلول) است.

متصل شد؛ در این بررسی در ورود اختصاصی ژن به سلول‌های آنژیوژنیک، تغییری مثبت مشاهده نشده است و دلیل آن به احتمال، پوشانده شدن این لیگاندها با PEI/PEG هیدروفیل است. درحالی‌که اگر فاکتور رشد اندوتلیوم عروقی (VEGF) به‌عنوان لیگاند به‌کاربرده شود، ورود ژن به سلول‌های اندوتلیال عروق کوچک پوست انسان (HDMEC) پنج برابر بیش از زمانی است که PEI شاخه‌دار به‌عنوان حامل ژن به‌کار رود (۳۸، ۳۹ و ۴۰).

جدول ۱. نتایج الیزا در OD450 نانومتر

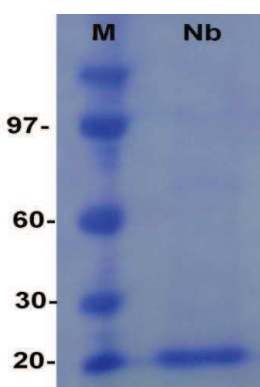
نتایج به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است.

مولکول واکنشگر	TAG-72	BSA	BSM	PSM	skimmed-milk	کازئین	MUC1
OD ₄₅₀	۱,۶ \pm ۰,۲۳	۰,۳ \pm ۰,۲	۰,۵ \pm ۰,۲	۰,۵ \pm ۰,۳	۰,۲ \pm ۰,۳	۰,۳ \pm ۰,۳	۰,۷ \pm ۰,۳

جدول ۲. نتیجه بررسی پتانسیل زتا نانوذرات PEI/PEG/SR-1/DNA در سه نوبت نشان داده شده است؛

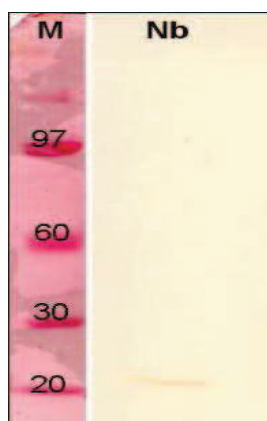
شماره نمونه	دما (سانتی-گراد)	پتانسیل زتا (میلی‌ولت)	تحرک الکتروفورزی (میکرومتر*سانتی‌متر/ولت*ثانیه)	هدایت‌کنندگی (میلی‌سیمن/سانتی‌متر)
۱	۲۵	+۶,۳۶	۰,۴۹۱۴	۲۱,۷
۲	۲۵	+۷,۵۶	۰,۵۹۳۹	۲۳,۲
۳	۲۵	+۷,۷۲	۰,۶۰۵۴	۲۴,۳
میانگین	۲۵	+۷,۱۸	۰,۵۶۳۵	۲۳,۰۶

میانگین پتانسیل زتای ذرات +۷,۱۸ میلی‌ولت است.



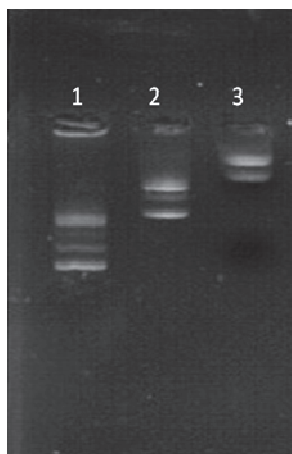
شکل ۱. نتیجه SDS-PAGE پروتئین تخلیص شده.

ستون اول از سمت چپ مربوط به مارکر پروتئینی و ستون دوم، باند در محدوده ۲۰ کیلودالتون مربوط به پروتئین نانوبادی را نشان می‌دهد.

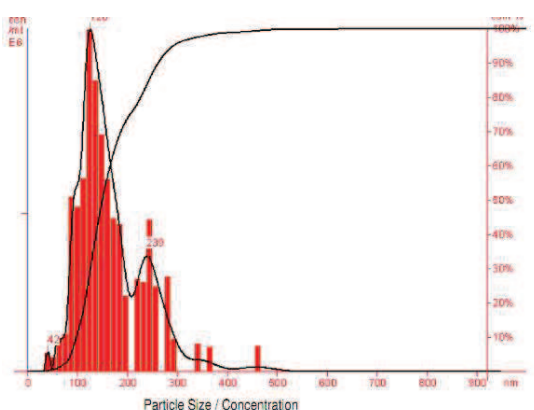


شکل ۲. نتیجه وسترن بلاتینگ

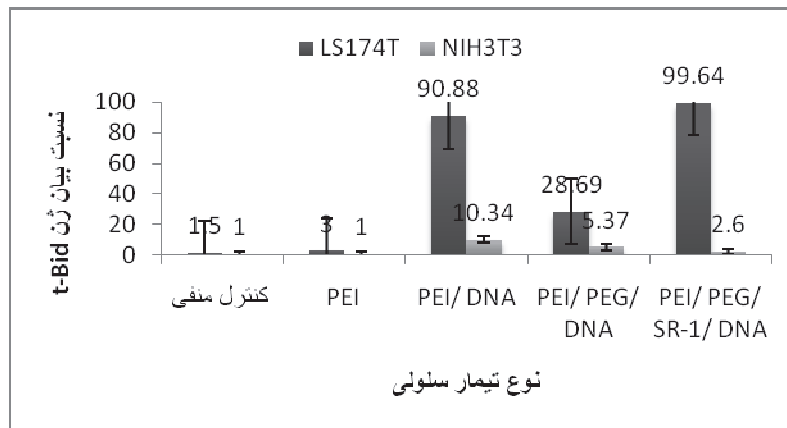
ستون اول از سمت چپ نشانگر مارکر پروتئینی است و ستون دوم تک‌باند نانوبادی SR-1 است.



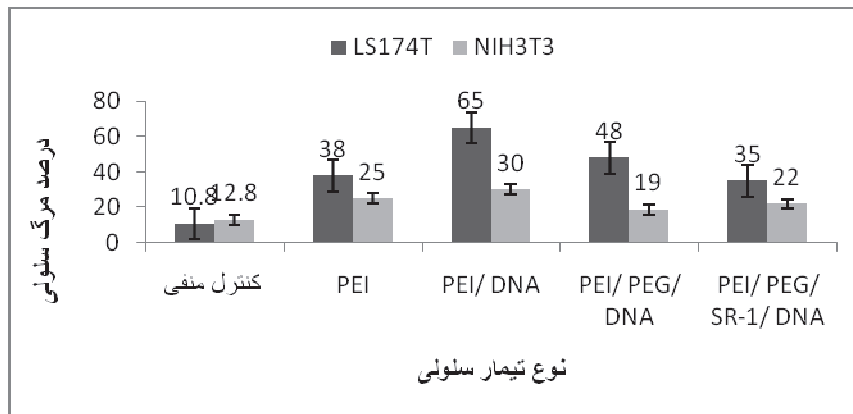
شکل ۳. نتیجه تأخیر حرکت در ژل: (۱) DNA پلاسمیدی حاوی ژن t-Bid (به‌تنهایی) (۲) PEI/PEG/DNA (۳) PEI/DNA (بار مثبت غالب در نانوذره حرکت آن را به‌صورت معکوس یعنی به سمت قطب منفی تغییر می‌دهد و پوشش PEG سبب کاهش بارهای مثبت سطحی نانوذره PEI و در نتیجه، حرکت بیشتر آن نسبت به PEI، به سمت قطب منفی می‌شود)



شکل ۴. نتایج بررسی اندازه نانوذرات PEI/PEG/SR-1/ DNA در نمودار نشان داده شده است. میانگین اندازه نانوذرات ۱۶۸ نانومتر با انحراف معیار ۶۹ نانومتر گزارش شده است. تصویر سمت راست، تشکیل نانوکمپلکس‌هایی با اشکال یکنواخت و عدم تشکیل تجمعات بین‌ذره‌ای را در نمونه مورد بررسی نمایش می‌دهد.



نمودار ۱. نسبت بیان ژن کشنده با Real Time PCR در مقایسه با ژن کنترل (بتا اکتین) در سلول‌های LS174T و NIH3T3 تحت تیمارهای مختلف. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است.



نمودار ۲. نتایج شمارش سلولی رده‌های LS174T و NIH3T3، درصد مرگ سلولی به صورت میانگین \pm انحراف معیار برای هر دو رده سلولی نشان داده شده است.

منابع

1. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv.* 2004; 56 (11): 1649–1659.
2. Mansouri S, Lavigne P, Corsi K, BENDERDOUR M, Beaumont E, Fernandes JC. Chitosan–DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 57(1):1–8.
3. Kreiss P, Cameron B, Rangara R, Mailhe P, Aguerre-Charril O, Airiau M. Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Res* 1999 1; 27(19):3792–8.
4. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethyleneimine. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 7297–7301.
5. Neu M. Modified Poly(ethylene imines) for plasmid delivery: Physico-chemical and in vitro/in vivo investigations. Doctor of Philosophy, Marburg, Philipps university, 2006.
6. Petersen H, Fechner PM, Martin AL, Kunath K, Stolnik S, Roberts CJ, Fischer D, Davies MC, Kissel T. Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) copolymers: influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system. *Bioconjug Chem* 2002; 13:845–54.
7. Banerjee P, Reichardt W, Weissleder R. Novel hyperbranched dendron for gene transfer in vitro and in vivo. *Bioconjugate Chem* 2004; 15: 960–968.
8. Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J, Edelstein RM. Gene therapy clinical trials worldwide 1989–2004 – an overview. *J Gene Med* 2004; 6(6):597–602.

9. Ruponen M, Yla-Herttuala S, Urtti A. Interactions of polymeric and liposomal gene delivery systems with extracellular glycosaminoglycans: physicochemical and transfection studies. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1415: 331-41.
10. Muyltermans S, Baral TN, Cortez Retamozzo V, De Baetselier P, De Genst E, Kinne J, Leonhardt H, Magez S, Nguyen VK, Revets H, Rothbauer U, Stijlemans B, Tillib S, Wernery U, Wyns L, Hassanzadeh-Ghassabeh Gh, Saerens D. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2009;128:178-183
11. Thor A, Viglione MJ, Muraro R, Ohuchi N, Schlom J, Gorstein F. Monoclonal antibody B72.3 reactivity with human endometrium: a study of normal and malignant tissues. *Int J Gynecol Pathol* 1987; 6:235-247.
12. Paterson AJ, Schlom J, Sears HF, Bennett J, Colcher D. A radioimmunoassay for the detection of a human tumor-associated glycoprotein (TAG-72) using monoclonal antibody B72.3. *Int J Cancer* 1986 May 15; 37(5):659-66.
13. El Ouahabi A, Thiry M, Pector V, Fuks R, Ruyschaert JM, Vandenbranden M. The role of endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids. *FEBS Lett*, 1997; 414:187 - 192.
14. Goula D, Benoist D, Mantero S, Merlo G, Levi G, Demeneix BA. Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung. *Gene Ther*, 1998; 5:1291 - 1295.
15. Chollet P, Favrot MC, Hurbin A, Coll JL. Side effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. *J Gene Med*, 2002; 4:84 - 91.
16. Rao GA, Tsai R, Roura D, Hughes JA. Evaluation of the transfection property of a peptidoligand for the fibroblast growth factor receptor as part of PEGylated polyethylenimine polyplex. *Journal of drug targeting* 2008; 16(1):79-89.
17. Ogris M, Brunner S, Schuller S, Kircheis R, Wagner E. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther*, 1999; 6:595 - 605.
18. Ward ES, Gussow DH, Griffiths AD, Jones PT, Winter G. Binding activities of a single immunoglobulin variable domain secreted from E. coli. *Nature*, 1989; 341:544 - 546.
19. Borrebaeck CAK, Malmberg AC, Furebring C, et al. Kinetic analysis of recombinant antibody-antigen interactions: relation between structural domains and antigen binding. *Biotechnology*, 1992; 10:697 - 698.
20. Merdan T, Callahan J, Petersen H, Kunath K, Bakowsky U, Kopecková P, Kissel T, Kopecek J. Pegylated Polyethylenimine-Fab' Antibody Fragment Conjugates for Targeted Gene Delivery to Human Ovarian Carcinoma Cells. *Bioconjugate Chem.*, 2003; 14:989 - 996.
21. Farokhimanesh S, Rahbarizadeh F, Rasae MJ, Kamali A, Mashkani B. Hybrid promoters directed tBid gene expression to breast cancer cells by transcriptional targeting. *Biotechnol Prog*. 2010 Mar-Apr; 26(2):505-11.
22. Chiu SJ, Ueno NT, Lee RJ. Tumor-targeted gene delivery via anti-HER2 antibody (trastuzumab, Herceptin[®]) conjugated polyethylenimine. *Journal of Controlled Release*, 2004; 97:357- 369.
23. Strehblow C, Schuster M, Moritz T, Kirch HC, Opalka B, P. JB. Monoclonal antibody-polyethylenimine conjugates targeting Her-2/neu or CD90 allow cell type-specific nonviral gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 2005; 102:737-747.
24. Ogris M, Steinlein P, Carotta S, Brunner S, Wagner E. DNA/polyethylenimine transfection particles: Influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression. *AAPS PharmSci*, 2001; 3(3): article 21.
25. Li D, Wang Q, Tang G, Huang H, Shen F, Li J, Yu H. Receptor-mediated gene delivery using polyethylenimine (PEI) coupled with polypeptides targeting FGF receptors on cells surface. *J Zhejiang Univ SCIENCE B*, 2006; 7(11):906 - 911.
26. Erbacher P, Remy JS, Behr JP. Gene transfer with synthetic virus-like particles via the integrin-mediated endocytosis pathway. *Gene Ther*, 1999; 6:138 - 145.
27. Zanta MA, Bousif O, Adib A, Behr JP. In vitro gene delivery to hepatocytes with galactosylated polyethylenimine. *Bioconjug Chem*, 1997; 8:839 - 844.
28. Cotten M, Wagner E, Birnstiel ML. Receptor-mediated transport of DNA into eukaryotic cells. *Methods Enzymol*, 1993; 217:618-644.
29. Hofland HEJ, Masson C, Iginla S, Osetinsky L, Reddy JA, Leamon CP, Scherman D, Bessodes M, Wils P. Folate-targeted gene transfer in vivo. *Mol Ther*, 2002; 5:739 - 744.
30. Guo W, Lee RJ. Receptor-Targeted Gene Delivery Via Folate-Conjugated Polyethylenimine. *AAPS PharmSci*, 1999; 1(4): article 19.
31. Mislick KA, Baldeschwieler JD, Kayyem JF, Meade TJ. Transfection of folate-polylysine DNA complexes: evidence for lysosomal delivery. *Bioconjug Chem*, 1995; 6(5):512-515.
32. Shadidi M, Sioud M. Identification of novel carrier peptides for the specific delivery of therapeutics into cancer cells. *FASEB J*, 2002; 16: 478 -494.
33. Kim JS, Maruyama A, Akaike T, Kim SW. In vitro gene expression on smooth muscle cells using a Terplex delivery system. *J Control Release*, 1997; 47:51 - 59.
34. Guo W, Lee RJ. Efficient gene delivery via non-covalent complexes of folic acid and polyethylenimine. *J Control Release*, 2001; 77:131 - 138.
35. Bennis JM, Kim SW. Tailoring new gene delivery designs for specific targets. *J Drug Target*, 2000; 8:1 - 12.
36. von Gersdorff KF, PEG-Shielded and EGF Receptor Targeted DNA Polyplexes: Cellular Mechanisms, in Fakultät für Chemie und Pharmazie. 2006, Ludwig-Maximilians-Universität: Munchen.
37. Ogris M, Walker G, Blessing T, Kircheis R, Wolschek M, Wagner E. Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethylenimine /DNA complexes. *Journal of Controlled Release*, 2003; 91:173 - 181.

38. Suh W, Han SO, Yu L, Kim SW. An angiogenic, endothelial-cell-targeted polymeric gene carrier. *Mol Ther*, 2002; 6:664 - 672.
39. Kunath K, Merdan T, Hegener O, Haberlein H, Kissel T. Integrin targeting using RGD-PEI conjugates for in vitro gene transfer. *J Gene Med*, 2003; 5:588 - 599.
40. Guadagni F, Roselli M, Cosimelli M, Ferroni P, Spila A, Cavaliere F, Arcuri R, Carlini S, Mariotti S, Gandolfo GM, Casciani CU, Greiner JW, Schlom J. TAG-72 expression and its role in the biological evaluation of human colorectal cancer. *Anticancer Res*. 1996 - ;16(4B):2141-8