

*Review Article***Development of Gene Delivery Methods**

Praneet Opanasopit

Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakornpathom 73000. Tel: 034-255-800; Fax: 034-255-801; E-mail: Praneet@email.pharm.su.ac.th

Abstract

Development of an efficient method of gene introduction to target cells is the key issue in treating genetic and acquired diseases by *in vivo* gene therapy. Many transfection techniques have been developed and can be classified into physical, chemical and biological methods. Vehicles for gene delivery, which have successfully delivered exogenous genes *in vivo* can be divided into two major groups: viral and nonviral vectors. In general, viral vectors which are very efficient gene-transfer vehicles also significantly provoke mutagenesis and carcinogenesis. Repeated administration of a viral vector induces an immune response which abolishes the transgene expression. Considering these limitations, nonviral vectors offer an attractive alternative. This review discusses transfection techniques that have been used for transferring gene into target cells, and recent developments in transfection technology that may improve the efficiency of transgene expression.

Key words

Gene delivery, Gene transfer, Gene therapy.

บทบรรณนิทัศน์

การพัฒนาวิธีนำส่งยีน

ปราณีต โอปณะโสภิต

ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม 73000

โทรศัพท์: 034-255-800 โทรสาร: 034-255-801 ที่อยู่อีเมลโทรนิค: Praneet@email.pharm.su.ac.th

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีนำส่งยีนที่มีประสิทธิภาพไปที่เซลล์เป้าหมายถือเป็นสิ่งสำคัญในการบำบัดรักษาโรคทางพันธุกรรม และโรคที่เป็นภายหลังโดยการบำบัดด้วยยีนในร่างกาย เทคนิคในการนำส่งและถ่ายยีนเข้าเซลล์นั้นมีหลายวิธีคือ ทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ ตัวพาที่ประสบความสำเร็จในการนำส่งยีนจากภายนอกเซลล์ให้ไปที่เซลล์เป้าหมายสามารถแบ่งได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ คือตัวพาที่เป็นไวรัสและไม่ใช่วirus โดยทั่วไปพบว่าตัวพาที่เป็นไวรัสจะมีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าเซลล์สูงกว่าแต่ก็เหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและก่อให้เกิดมะเร็ง พบว่าตัวพาที่เป็นไวรัสเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายทำให้ไม่มีการแสดงออกของยีนเมื่อบริหารยีนซ้ำ จากข้อจำกัดเหล่านี้ทำให้ตัวพาที่ไม่ใช่วirusเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจมากขึ้น บทความนี้กล่าวถึงเทคนิคในการถ่ายยีนเข้าเซลล์เป้าหมายที่ต้องการและการพัฒนาระบบนำส่งยีนทั้งหมดที่ใช้กันในปัจจุบันที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการแสดงออกของยีน

กุญแจคำ

ระบบนำส่งยีน, การถ่ายยีน, การทำยีนบำบัด

ปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพมีความก้าวหน้าอย่างมากมา ความรู้ความเข้าใจทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลก็เป็นอีกสาขาวิชาหนึ่งที่มีความเจริญรุดหน้าอย่างรวดเร็วมีการประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลายในหลากหลายสาขาวิชา ตลอดจนความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการเกิดโรคในระดับยีนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงวิธีการบำบัดรักษาโรค การบำบัดรักษาโรคโดยใช้โปรตีนที่ผลิตในหลอดทดลองก็ได้เข้าสู่ตลาดยาเป็นที่เรียบร้อยแล้ว ต่อมาได้มีการผลิตดีเอ็นเอสายผสมที่มาจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันนำมาต่อเข้าด้วยกัน (recombinant plasmid DNA) และได้นำมาใช้ในการทำยีนบำบัด (gene therapy) โดยนำส่งยีนที่มีรหัสของโปรตีนที่ผู้ป่วยขาดแคลนเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วย ตลอดจนการนำชิ้นส่วนของยีนหรืออนุพันธ์ของกรดนิวคลีอิกหรือสารอื่นๆที่สามารถยับยั้งการสร้างโปรตีนที่ไม่ต้องการ (antisense

therapy) แนวคิดนี้ได้เริ่มครั้งแรกประมาณปี ค.ศ. 1980 แต่ก็เป็นเพียงความฝันในการบำบัดรักษาผู้ป่วยที่บกพร่องทางพันธุกรรม ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส ผู้ป่วยที่เป็นมะเร็ง ฯลฯ (1) ความคิดนี้เริ่มเป็นจริงประมาณปี ค.ศ. 1990 จากความสำเร็จในการพยายามที่จะรักษาคนไข้ที่ขาดเอนไซม์ adenosine deaminase, cystic fibrosis, Gaucher's disease และ Duchenne muscular dystrophy โดยการทำยีนบำบัด หลังจากนั้นนักวิจัยทั่วโลกก็ตื่นตัวและทำวิจัยทางด้านนี้อย่างกว้างขวาง (2)

สิ่งสำคัญที่จะทำให้ประสบความสำเร็จในการทำยีนบำบัดได้นั้นคือ (i) การนำส่งและการถ่ายยีนเข้าได้อย่างเฉพาะเจาะจงที่เซลล์เป้าหมาย (ii) ประสิทธิภาพ (iii) ช่วงเวลาที่ยีนแสดงออก และ (iv) จำนวนเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นนั้น

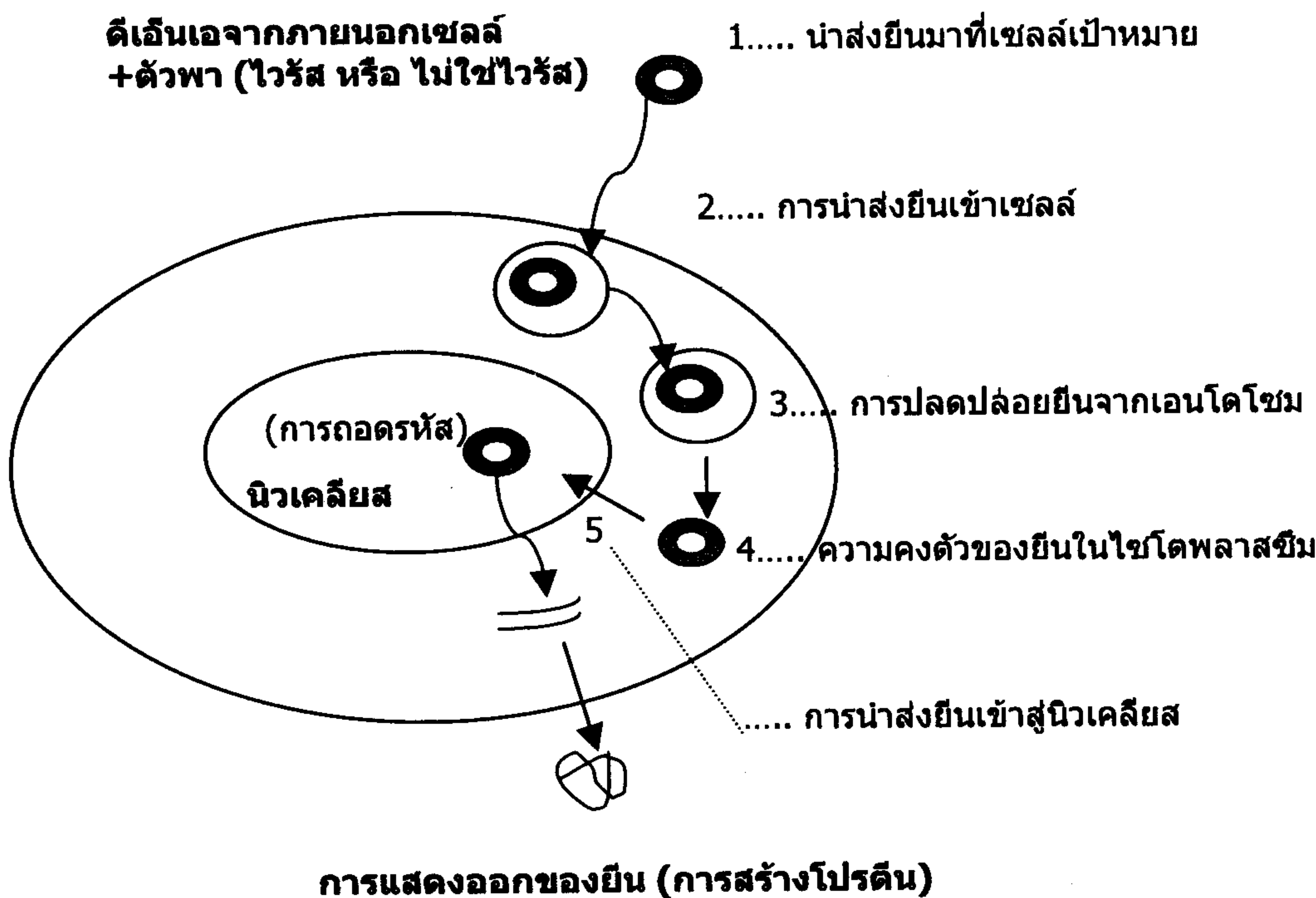
กำหนดโดยคุณสมบัติของระบบนำส่งยีนที่ใช้ ธรรมชาติของเซลล์ เป้าหมาย วิธีการบริหารยีน และเภสัชจลนศาสตร์ของระบบนำส่งยีน

การบริหารยีนเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วยนั้นสามารถบริหารทั้งแบบเฉพาะที่ (local administration) และแบบทั่วร่างกาย (systemic administration) ซึ่งคล้ายกับการให้ยาทั่วไป การพัฒนาประสิทธิภาพและความปลอดภัยในการนำส่งยีนเข้าสู่ร่างกายนั้นจะต้องพัฒนาตั้งแต่การออกแบบยีน ทั้งในแง่ประสิทธิภาพของความเฉพาะเจาะจงต่อเนื้อเยื่อของโปรโมเตอร์ และการพัฒนาตัวพา (carrier หรือ vector) การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์และแนวโน้มการรับ (disposition) ยีน ตัวพา หรือสารประกอบเชิงซ้อนของยีนกับตัวพา ในระดับร่างกาย อวัยวะ เซลล์ และระดับภายในเซลล์ จะช่วยในการพัฒนาและเข้าใจระบบนำส่งยีนมากขึ้น รูปที่ 1 แสดงขั้นตอนในการนำส่งยีนจากภายนอกเข้าไปในเซลล์

แม้ว่าการใช้ตัวพาชนิดไวรัส เช่น retrovirus, adenovirus และ adeno-associated virus โดยเฉพาะ

retrovirus-mediated ex vivo จะให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนที่สูงและวิธีนี้อยู่ในขั้นตอนการศึกษาวิจัยทางคลินิกแล้ว แต่ข้อจำกัดของวิธีนี้คือจำเป็นต้องมีขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์ซึ่งเสียค่าใช้จ่ายสูง ใช้ได้เฉพาะเซลล์ที่อยู่ในระยะไมโทซิส นอกจากนี้ตัวพาชนิดไวรัสยังมีพิษสูง ดังนั้นการใช้ตัวพาชนิดที่ไม่ใช่ไวรัสจึงมีแนวโน้มนิยมมากขึ้น แม้ว่าประสิทธิภาพในการถ่ายยีนจะต่ำกว่าตัวพาชนิดไวรัสก็ตาม ซึ่งในขณะนี้มีการพัฒนาอย่างมากจนบางระบบมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับตัวพาชนิดไวรัส ระบบตัวพาชนิดที่ไม่ใช่ไวรัส มีข้อดีเหนือตัวพาชนิดไวรัส ในแง่ที่มีพิษต่ำกว่า มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันน้อย เตรียมได้ง่ายกว่า น่าจะเป็นตัวพาในอุดมคติสำหรับการทำยีนบำบัด แม้ว่าระบบตัวพาชนิดที่ไม่ใช่ไวรัสจะได้รับการพัฒนาหลายรูปแบบ แต่จนถึงขณะนี้เฉพาะบางรูปแบบเท่านั้นที่สามารถเข้าสู่การศึกษาวิจัยทางคลินิก (3) ข้อเสียของตัวพาชนิดที่ไม่ใช่ไวรัสคือระยะเวลาการแสดงออกของยีนที่ต้องการนั้นสั้นกว่าระบบตัวพาชนิดไวรัส จึงต้องมีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องเพื่อหาตัวพาที่มีประสิทธิภาพที่ดีต่อไป

รูปที่ 1. ขั้นตอนในการนำส่งยีนจากภายนอกเข้าไปในเซลล์



ในที่นี้ขอกล่าวถึงงานวิจัยจากอดีตจนถึงปัจจุบันที่เกี่ยวข้องกับการค้นคว้าพัฒนาเทคนิคการนำส่งยีนจากนอกร่างกายเข้าไปในเซลล์เป้าหมาย โดยการให้ดีเอ็นเอเปล่า (naked DNA) และโดยอาศัยระบบนำส่งยีน

วิธีการบริหารยีนเข้าสู่ร่างกาย (Route of administration)

การแสดงออกของยีนเกิดขึ้นได้ทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในร่างกาย (*in vivo*) โดยในหลอดทดลองนั้นใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์และถ่ายยีนที่ต้องการเข้าไปในเซลล์เพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีนได้ ส่วนกรณีของการให้ยีนในร่างกายนั้น จะมีข้อจำกัดมากมายที่ทำให้ไม่ประสบความสำเร็จในการแสดงออกของยีน วิธีการบริหารยีนเข้าสู่ร่างกายสามารถแบ่งได้ 2 วิธีใหญ่ๆ คือ

1. การบริหารยีนเข้าสู่ร่างกายแบบเฉพาะที่ (Local administration)

การให้ยีนแบบเฉพาะที่เพื่อหวังผลการรักษาในร่างกายนั้น เป็นการหลีกเลี่ยงการจับกินโดยระบบ reticuloendothelial (RES) ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อบริหารแบบทั่วร่างกาย ในปี ค.ศ. 1990 Wolff และคณะ (4) ได้รายงานความสำเร็จในการแสดงออกของยีนในกล้ามเนื้อลาย เมื่อฉีดดีเอ็นเอเปล่าที่ถอดรหัสให้ chloramphenicol acetyltransferase, luciferase และ beta-galactosidase โดยตรงที่กล้ามเนื้อลาย หลังจากนั้นก็มีรายงานการแสดงออกของยีนที่อวัยวะอื่นๆ เช่น กล้ามเนื้อหัวใจ ตับ สมอง ผิวหนัง ต่อมไทรอยด์ และเซลล์มะเร็ง เมื่อฉีดดีเอ็นเอเปล่าเข้าไปที่ช่องว่างระหว่างเซลล์ของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะดังกล่าว พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนเมื่อให้ยีนแบบเฉพาะที่คือ โครงสร้างของเนื้อเยื่อ อัตราการไหลเวียนของโลหิต และปริมาตรของสารที่ฉีด เป็นต้น

นอกจากนี้ก็ยังมีการฉีดโดยตรงที่ช่องว่างต่างๆ เพื่อหวังผลการแสดงออกของยีนเฉพาะที่ เช่น การให้ภายในหน้าท้อง (intraperitoneal) การให้ภายในท่อลม (intratracheal) ซึ่งจะไม่ผ่านผนังหลอดเลือด พบว่ามีการแสดงออกของยีนที่เซลล์เนื้อเยื่อบุผิวของท่อทางเดินหายใจ

2. การบริหารยีนเข้าหลอดเลือด (Intra-vascular administration)

งานวิจัยของ Nicolau และคณะ (5) เป็นงานวิจัยแรกๆ ที่ประสบความสำเร็จในการแสดงออกของยีนแบบทั่วร่างกาย ในงานวิจัยนี้ใช้ยีนที่ถอดรหัสให้อินซูลินบรรจุภายในไลโปโซม ฉีดไลโปโซมดังกล่าวเข้าทางหลอดเลือดดำในหนูทดลอง พบว่าระดับอินซูลินในกระแสเลือดเพิ่มขึ้นและสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ นอกจากนี้งานวิจัยต่อๆ มาพบว่าถ้าใช้ไลโปโซมที่มี lactosylceramide เคลือบอยู่ที่ผิวไลโปโซมซึ่งเป็นลิแกนด์ที่เฉพาะเจาะจงกับ asialoglycoprotein receptor ที่เซลล์ตับ เมื่อใช้ไลโปโซมชนิดนี้บรรจุยีนไว้ภายในหรือนำมาทำปฏิกิริยาเชิงซ้อนกับยีน พบว่าจะเพิ่มการนำส่งยีนเฉพาะเจาะจงไปที่เซลล์ตับทำให้การแสดงออกของยีนที่ตับมากกว่าที่อวัยวะอื่น นอกจากนี้น้ำตาลก็มีการใช้แอนติบอดีควบคู่กับพอลิเมอร์ประจุบวก และประสบความสำเร็จในการแสดงออกของยีนที่เซลล์เป้าหมายเช่นกัน

การฉีดสารประกอบเชิงซ้อนดีเอ็นเอกับไลโปโซมประจุบวกทางหลอดเลือดดำ พบว่าให้การแสดงออกของยีนมากที่สุดที่ปอดและรองลงมาคือม้าม (6) การแสดงออกของยีนนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอ อัตราส่วนของดีเอ็นเอกับไลโปโซม นอกจากนี้ชนิดของโปรโมเตอร์ก็มีผลต่อประสิทธิภาพของการแสดงออกของยีน กลไกที่ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนมากที่สุดที่ปอดนั้นยังไม่ทราบแน่นอน แต่อาจเนื่องมาจากอนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า 6-7 ไมโครเมตร จะเกิดการอุดตันหรือติดที่เส้นเลือดฝอยที่ปอดก่อน ดังนั้นเมื่อให้สารประกอบเชิงซ้อนดีเอ็นเอกับไลโปโซมประจุบวกทางหลอดเลือดดำ เม็ดเลือดแดงหรือโปรตีนในกระแสเลือดจะมาจับกับสารประกอบเชิงซ้อนนี้ทำให้เกิดการรวมตัวกันเป็นอนุภาคขนาดใหญ่และไปอุดตันที่หลอดเลือดฝอยที่ปอดเป็นการเพิ่มเวลาที่ยีนอยู่ที่ปอดนานขึ้น ทำให้เกิดการปลดปล่อยยีนจากตัวพาเข้าสู่เซลล์ผนังหลอดเลือดฝอย (endothelial cells) ที่ปอด ผลลัพธ์คือเกิดการแสดงออกของยีนสูงที่สุดที่ปอด (7)

การบริหารยีนโดยฉีดเข้าหลอดเลือดแดงใช้ในการฉีดดีเอ็นเอเพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีนที่อวัยวะเป้าหมายที่ต้องการได้ ตัวอย่างเช่นการฉีดเข้าหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงตับ

เช่น bupivacaine (15) ซึ่งพบว่าวิธีนี้ทำให้การแสดงออกของ ยีนอยู่ได้นานหลายเดือน ยังไม่ทราบแน่นอนถึงกลไกที่เพิ่มการ แสดงออกของยีน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเพิ่มแรงดัน ส่งผล ให้พลาสติกดีเอ็นเอเปลา่สัมผัสหรือเพิ่มโอกาสที่ดีเอ็นเอสัมผัส กับเซลล์กล้ามเนื้อและดันให้เข้าเซลล์มากขึ้นจึงเพิ่มประสิทธิภาพ ของการแสดงออกของยีน ส่วนการฉีดสารที่ทำให้กล้ามเนื้อคลาย เกิดการเจริญทดแทนเป็นที่ทราบกันอยู่แล้วว่าระหว่างที่มีการ เจริญของเซลล์ เซลล์จะสามารถรับสารต่างๆได้มากขึ้น ดังนั้น การแสดงออกของยีนจึงสูงในช่วงที่เซลล์กำลังเจริญทดแทน

ในกรณีที่บริหารยีนทางหลอดเลือด Mahato และคณะ (16) ได้ทดลองฉีดพลาสติกดีเอ็นเอเปลา่เข้าทางหลอดเลือดดำที่ ทางหนูถีบจักร ผลคือไม่พบการแสดงออกของยีนที่อวัยวะใดๆ เลย เนื่องจากว่า พลาสติกดีเอ็นเอถูกทำลายโดยเอนไซม์นิว- คลีเอสก่อนที่จะถึงเซลล์เป้าหมายและกำจัดโดยระบบภูมิคุ้มกัน ของร่างกายคือฟาโกไซท์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งมาโครฟาจที่อยู่ใน ตับ (Kupffer cells) โดยมีค่าครึ่งชีวิตน้อยกว่า 5 นาที จะเห็นว่าการ ให้พลาสติกดีเอ็นเอเปลา่แบบทั่วร่างกายนั้น พลาสติกดีเอ็นเอ- เปลา่ต้องการตัวพา เช่น ไลโปโซมหรือพอลิเมอร์ประจุบวก ที่ จะป้องกันการทำลาย นอกจากนี้ Liu (17) และ Kobayashi (18) ได้รายงานว่าการฉีดพลาสติกดีเอ็นเอเปลา่ปริมาณมาก (ดี- เอ็นเอ 5 ไมโครกรัม ละลายในน้ำเกลือ 1.6 มิลลิลิตร สำหรับหนู ถีบจักรหนัก 20 กรัม) เข้าหลอดเลือดดำที่ทางหนูทดลอง พบว่า เกิดการแสดงออกของยีนที่อวัยวะต่างๆ เช่น ปอด ตับอ่อน หัว- ใจ ไต และตับซึ่งเกิดการแสดงออกของยีนสูงสุด กลไกการเกิด การแสดงออกของยีนโดยวิธีนี้ยังคลุมเครืออยู่ อย่างไรก็ตาม สามารถอธิบายได้ว่าการฉีดดีเอ็นเอปริมาณมากนั้นดีเอ็นเอจะ สะสมอยู่ที่หลอดเลือด inferior vena cava และไหลกลับไป ที่ เนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่อยู่ติดกับหลอดเลือดนี้โดยตรงซึ่งก็คือตับ นอกจากนี้แรงดันน้ำที่เกิดขึ้นจากการฉีดสารละลายปริมาณมาก นี้มีผลช่วยดันให้ดีเอ็นเอเข้าเซลล์ตับก่อนที่จะผสมรวมกับส่วน ประกอบในกระแสเลือดที่จะทำให้ดีเอ็นเอเสื่อมสลาย

การให้ดีเอ็นเอเปลา่แบบปริมาณมากนี้ ได้นำมาประยุกต์ใช้ สำหรับการถ่ายยีนแบบเฉพาะที่ที่อวัยวะเป้าหมายที่ต้องการ Budker และคณะ (19) ได้ทดลองโดยการบริหารพลาสติกดี- เอ็นเอเปลา่ (ขนาด 100 ไมโครกรัม ละลายในสารละลายแมนนิ ทอล 20 % ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) ฉีดโดยตรงเข้าเส้นเลือดที่ไป

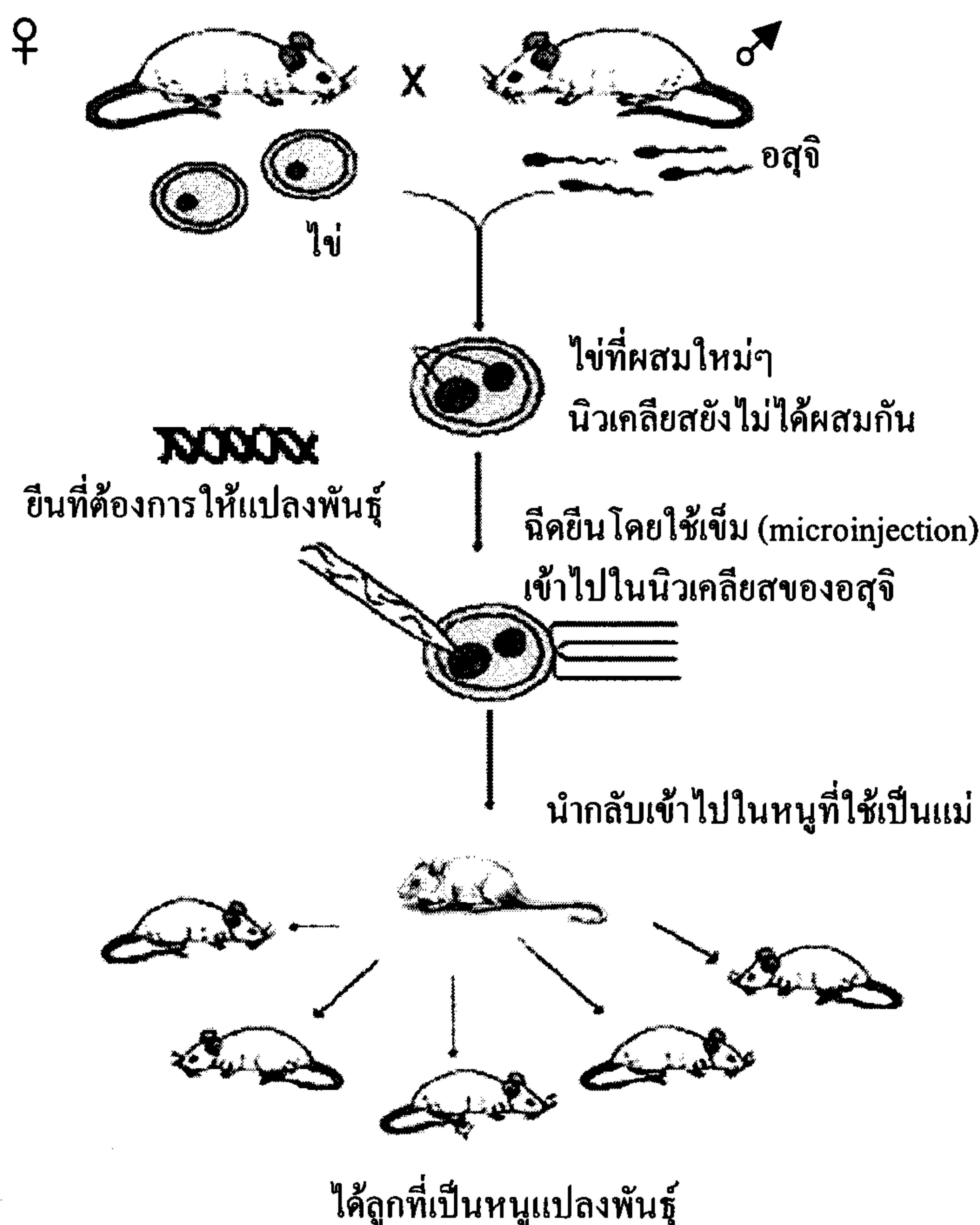
เลี้ยงตับ (portal vein) และปิดกั้นเส้นเลือดชั่วคราว พบว่าการ แสดงออกของยีนเกิดขึ้นประมาณ 1% ของเซลล์ตับทั้งหมด และ ถัดลดปริมาตรจาก 1 มิลลิลิตรเป็น 0.5 มิลลิลิตร การแสดงออก ของยีนจะลดลง 70 เท่า ได้นำหลักการนี้มาประยุกต์ใช้กับกล้ามเนื้อลาย พบว่าเมื่อฉีดพลาสติกดีเอ็นเอเปลา่ขนาด 475 ไมโครกรัมละลายในน้ำเกลือ 9.5 มิลลิลิตรภายในเวลา 10 วินาทีเข้าหลอดเลือดแดงที่ไปเลี้ยงขาหลังของหนูทดลองและปิด กั้นเส้นเลือดชั่วคราว พบว่าการแสดงออกของยีนโดยวิธีนี้มาก กว่าฉีดเข้ากล้ามเนื้อโดยตรงถึง 40 เท่า (20) จากงานวิจัยที่ กล่าวมาจะเห็นว่าช่วงเวลาที่พลาสติกดีเอ็นเออยู่ในอวัยวะใด เป็นปัจจัยสำคัญต่อการแสดงออกของยีนที่อวัยวะนั้นๆ นักวิจัย จึงทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยฉีดพลาสติกดีเอ็นเอเปลา่ขนาด 80 ไมโครกรัมละลายในน้ำเกลือปริมาตรน้อยคือ 100 ไมโครลิตร และปิดกั้นระบบการไหลเวียนโลหิตแบบชั่วคราว พบว่าการ แสดงออกของยีนใกล้เคียงกับวิธีฉีดปริมาณมาก จึงได้นำวิธีการ นี้มาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคกล้ามเนื้อกะบังลมผิดปกติทาง พันธุกรรมเนื่องจากขาดโปรตีนดิสโทรฟิน (dystrophin) โดยฉีด ดีเอ็นเอที่มีรหัสของโปรตีนดิสโทรฟินเข้าที่หลอดเลือดในหนูที่ ขาดโปรตีนนี้และปิดกั้นหลอดเลือดชั่วคราวเพื่อป้องกันการไหล เวียน พบการสร้างโปรตีนดิสโทรฟินที่กล้ามเนื้อกะบังลมโดย สามารถผลิตโปรตีนนี้ได้ประมาณ 15-20 % ของกล้ามเนื้อกะบัง ลมทั้งหมดและผลิตได้นาน 6 เดือน (21)

จากที่กล่าวมา จะเห็นได้ว่าการบริหารพลาสติกดีเอ็นเอ เปลา่เข้าสู่ร่างกายโดยบริหารแบบเฉพาะที่และแบบทั่วร่างกาย สามารถประสบความสำเร็จได้โดยไม่ต้องอาศัยระบบนำส่งยีน เลย อาศัยเพียงวิธีทางกายภาพคือการฉีดแบบปริมาณมากซึ่ง อาศัยแรงดันที่จะนำส่งดีเอ็นเอเข้าเซลล์ หรือการปิดกั้นการไหล เวียนเลือดเพื่อให้ยีนอยู่ในอวัยวะนานขึ้น

2. การถ่ายยีนโดยใช้เข็มฉีด (Direct micro-injection)

วิธีนี้จะฉีดดีเอ็นเอเข้าไปในเซลล์หรือในนิวเคลียสของ เซลล์โดยตรง โดยใช้เข็มชนิดพิเศษที่เรียกว่า microelectrode needle และต้องฉีดเข้าเซลล์โดยฉีดที่ละเซลล์จึงเป็นวิธีที่ใช้เวลา มากในการฉีด ประสิทธิภาพของวิธีนี้ขึ้นกับทักษะในการฉีด วิธีนี้ จึงไม่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าเซลล์จำนวนมาก (22) โดย

รูปที่ 3. ขั้นตอนในการสร้างหนูแปลงพันธุ (transgenic mice)



มักจะใช้ในการฉีดดีเอ็นเอเข้าไปในเซลล์ต้นกำเนิดคือเซลล์ไข่หรืออสุจิ เช่นการสร้างหนูแปลงพันธุ (transgenic mice) วิธีทำคือฉีดดีเอ็นเอที่ต้องการเข้าไปในไข่ของหนู โดยใช้ไข่ที่เพิ่งผสมใหม่ๆ นิวเคลียสของอสุจิและนิวเคลียสของไข่ยังไม่ได้ผสมกัน โดยฉีดดีเอ็นเอเข้าไปในนิวเคลียสของอสุจิซึ่งจะมีขนาดใหญ่กว่านิวเคลียสของไข่ แล้วจึงนำกลับเข้าไปใส่ลงในหนูที่ใช้เป็นแม่ เพื่อให้มีการพัฒนาของไข่เจริญเป็นตัวที่สมบูรณ์ (รูปที่ 3)

3. การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องมือ Gene gun (Micro-projectile bombardment หรือ Biolistic technique)

วิธีนี้พัฒนาขึ้นโดย Sanford และคณะในปี ค.ศ. 1987 เป็นการนำส่งยีนเข้าเซลล์โดยอาศัยการยิงพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าไปในเนื้อเยื่อหรือเซลล์เป้าหมายด้วยเครื่องมือพิเศษที่เรียกว่า gene gun โดยอาศัยหลักการของความต่างศักย์ไฟฟ้าในการเร่งให้อนุภาคเคลื่อนที่ด้วยความเร็วสูงประมาณ 1,400 ฟุตต่อวินาที

ในการแทรกเข้าสู่อวัยวะ เนื้อเยื่อ หรือเซลล์เป้าหมายได้อย่างแม่นยำ โดยยีนนี้จะเคลือบบนอนุภาคเล็กๆ ซึ่งทำมาจากทองคำหรือทังสเตน (23) สามารถปรับความเร็วในการยิง ความหนาแน่นของอนุภาคทอง และขนาดของอนุภาค ให้เหมาะสมกับเซลล์เป้าหมาย วิธีนี้เริ่มต้นใช้กับการถ่ายยีนเข้าไปในผนังเซลล์ของเซลล์พืช และได้ประยุกต์ใช้วิธีนี้กับเซลล์สัตว์ ข้อดีของวิธีนี้คือแม่นยำและให้ประสิทธิภาพสูง ใช้เวลาสั้นในการนำส่งยีนเข้าเซลล์ ทำได้ง่ายกว่าวิธีแรกที่ใช้เข็มฉีด เพราะครั้งหนึ่ง ๆ สามารถยิงอนุภาคเข้าไปได้เป็นพันอนุภาค ข้อเสียของวิธีนี้คือราคาแพงและต้องใช้เครื่องมือพิเศษ พบว่าประสบความสำเร็จในการแสดงออกของยีนโดยวิธีนี้ที่ผิวหนัง ตับ และกล้ามเนื้อ ประสิทธิภาพการถ่ายยีนจะขึ้นกับชนิดของเนื้อเยื่อ พบว่ามีประสิทธิภาพการถ่ายยีน 10-20% สำหรับเซลล์ผิวหนัง และ 1-5 % สำหรับเซลล์กล้ามเนื้อ วิธีการนี้สามารถนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ไปที่ไซโตพลาสซึมหรือนิวเคลียสหรือออร์แกเนลล์อื่นๆ เช่น ไมโท-

คอนเดรียได้ โดยไม่ผ่านเอนโดโซมหรือไลโซโซม ดังนั้นจึงหลีกเลี่ยงการทำลายโดยเอนไซม์ อย่างไรก็ตาม การให้ในร่างกายยังให้ผลในระยะสั้นและมีการแสดงออกของยีนต่ำ แต่วิธีนี้ก็เหมาะสมสำหรับวัคซีนดีเอ็นเอ

4. การถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (Electroporation หรือ Electrotransfection)

วิธีนี้เริ่มใช้ในการถ่ายยีนตั้งแต่ปี ค.ศ. 1982 ในเซลล์เพาะเลี้ยง (24) และในร่างกาย (25) หลักการคือการให้กระแสไฟฟ้าไปที่เซลล์แล้วมีผลทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ดีเอ็นเอสามารถผ่านเข้าภายในเซลล์ได้ง่ายตามความแตกต่างของความเข้มข้นของดีเอ็นเอภายนอกและภายในเซลล์ จนถึงปัจจุบันได้มีการนำวิธีนี้มาใช้ในการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เนื้อเยื่อต่างๆ เช่น ผิวหนัง ตับ กล้ามเนื้อ ทำโดยฉีดพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าไปที่ช่องว่างระหว่างเซลล์ของเนื้อเยื่อ และให้กระแสไฟฟ้าที่มีค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าสูง (high voltage electrical discharge) ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพคือ ความต่างศักย์ไฟฟ้ามากขึ้นจะทำให้รูใหญ่ขึ้น แต่ความเป็นพิษก็สูงขึ้นด้วย ส่วนมากจะให้เป็นช่วง 150-350 โวลต์ อีกปัจจัยหนึ่งคือเวลาที่ให้กระแสไฟฟ้า ถ้าให้เวลานานจะมีผลทำให้มีรูเปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์นานด้วย ช่วงเวลาที่เหมาะสมคือประมาณ $10-40 \times 10^{-3}$ วินาที ซึ่งวิธีนี้จะเพิ่มการแสดงออกของยีน 1000 เท่าเทียบกับเมื่อไม่ให้กระแสไฟฟ้า ค่ากระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อ ข้อดีคือสะดวกรวดเร็ว ทำซ้ำได้ผลเหมือนเดิม สามารถใช้ได้กับเซลล์หลายชนิด และไม่จำกัดขนาดของดีเอ็นเอ แต่ข้อเสียคือต้องใช้เครื่องมือที่เฉพาะและมีความเป็นพิษสูง นอกจากยีนแล้ววิธีนี้ยังใช้สำหรับการพาพวกชีวโมเลกุลอื่นๆ เช่น อาร์เอ็นเอ antisense นิวคลีโอ-ไทด์สายสั้นๆ โปรตีน และยาต่างๆ การใช้วิธีนี้แบบให้ในร่างกายนั้นยังน้อยอยู่แต่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านวัคซีน ปัจจุบันนี้มักจะใช้วิธีนี้ร่วมกับการฉีดดีเอ็นเอเข้าสู่ร่างกาย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการถ่ายยีน เรียกวิธีนี้ว่า "electro-gene therapy" ซึ่งเทคนิคนี้ต้องการการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพสูงและปลอดภัยมากขึ้น

วิธีทางเคมี (Chemical methods)

1. DEAE-dextran

วิธีนี้เป็นวิธีทางเคมีวิธีแรกที่ใช้ในการถ่ายยีนเข้าเซลล์ DEAE-dextran เป็นพอลิเมอร์ประจุบวก ประกอบด้วย dextran เชื่อมต่อกับส่วนที่เป็นประจุบวกคือ diethylaminoethyl (DEAE) ซึ่ง DEAE-dextran จะทำปฏิกิริยากับประจุลบของดีเอ็นเอเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีประจุรวมทั้งหมดเป็นบวก ทำให้สามารถจับกับประจุลบของเยื่อหุ้มเซลล์และเข้าสู่เซลล์โดยวิธีเอนโดไซโตซิส วิธีนี้ประสบความสำเร็จในการนำส่งยีนเข้าเซลล์และเกิดการแสดงออกของยีนแบบชั่วคราว (transient expression) ให้ผลระยะสั้น ประมาณ 2-3 วัน ตัวอย่างที่ขายในท้องตลาดมีชื่อการค้า ProFection[®] Mammalian Transfection System-DEAE-Dextran

2. แคลเซียมฟอสเฟต (Calcium phosphate)

การตกตะกอนร่วมระหว่างแคลเซียมซึ่งมีประจุบวกกับฟอสเฟตซึ่งมีประจุลบนั้นเป็นที่นิยมแพร่หลาย เนื่องจากสารชนิดนี้หาง่ายและราคาถูก วิธีการเตรียมก็ง่าย ปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนด้วยระบบนี้คือความเข้มข้นของแคลเซียมและฟอสเฟต และค่าความเป็นกรดต่าง (pH) วิธีนี้ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าเซลล์และในการแสดงออกของยีนทั้งแบบชั่วคราว (transient expression) และแบบถาวร (stable expression) ได้หลายชนิด วิธีเตรียมคือนำยีนผสมกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ แล้วเติมสารละลายนี้ลงในสารละลายฟอสเฟต ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเกิดการตกตะกอนขึ้น แล้วจึงนำตะกอนที่ได้ไปใส่บนเซลล์ที่ต้องการถ่ายยีน ตะกอนจะเข้าเซลล์โดยวิธีเอนโดไซโตซิส แคลเซียมฟอสเฟตจะทำหน้าที่ป้องกันการทำลายดีเอ็นเอโดยเอนไซม์นิวคลีเอส ตัวอย่างที่ขายในท้องตลาดมีชื่อการค้า ProFection[®] Mammalian Transfection System-Calcium Phosphate

3. สารประกอบเชิงซ้อนไลโปโซมประจุบวกกับดีเอ็นเอ (Cationic liposome-DNA complex หรือ Lipoplex)

ประมาณปี ค.ศ. 1980 ได้เริ่มนำไลโปโซมมาใช้เป็นตัวพาถ่ายยีนเข้าเซลล์ วิธีนี้ต่างจากสองวิธีแรก (DEAE-dextran กับ calcium phosphate) ตรงที่สามารถให้ในร่างกายได้ ไขมันที่มีประจุบวกสามารถทำปฏิกิริยาเชิงซ้อนกับประจุลบของดีเอ็นเอทำให้รูปร่างและโครงสร้างของดีเอ็นเอแน่นขึ้น นอกจากนี้ก็ยังมีวิธี

หุ้มดีเอ็นเอไว้ภายในไลโปโซมเพื่อป้องกันการทำลายดีเอ็นเอโดยเอนไซม์นิวคลีเอส โดยทั่วไปจะเตรียมไลโปโซมโดยใช้ไขมันที่มีประจุบวกร่วมกับไขมันที่เป็นกลาง เช่น Dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE) หรือ คอเลสเทอรอล ซึ่ง DOPE จะทำหน้าที่ช่วยในการรวมตัวของสารประกอบเชิงซ้อนไลโปโซม/ดีเอ็นเอกับผนังของเอนโดโซม มีผลทำให้การปลดปล่อยยีนจากเอนโดโซมไปที่ไซโตพลาสซึมง่ายขึ้น รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ DOPE และ ไขมันที่มีประจุบวกชนิดอื่นๆ ที่นิยมใช้ในการเตรียมไลโปโซมประจุบวกเพื่อนำส่งยีน

นอกจากนี้ได้มีการนำแอนติบอดีหรือลิแกนด์มาควบคู่กับไลโปโซมประจุบวกเพื่อเพิ่มความเฉพาะเจาะจงไปที่อวัยวะหรือเซลล์เป้าหมาย ไลโปโซมเข้าเซลล์โดยกระบวนการเอนโดไซโตซิส สารประกอบเชิงซ้อนไลโปโซมและดีเอ็นเออาจถูกทำลายด้วยเอนไซม์ในไลโซโซม ดังนั้นเพื่อป้องกันการทำลายนี้จึงมีการนำไลโปโซมชนิดที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่าง (pH-sensitive liposome) มาพัฒนาใช้ในการนำส่งยีน โดยระบบนี้ไลโปโซมจะคงตัวที่พีเอชที่เป็นกลาง (pH 7.4) แต่ที่พีเอชที่เป็นกรด (pH 5) จะเกิดการหลอมรวมกับผนังเอนโดโซม ดังนั้นจึงปลดปล่อยดีเอ็นเอออกจากเอนโดโซมก่อนที่จะเข้าสู่ไลโซโซม (26) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างไลโปโซมชนิดที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างกับไลโปโซมประจุบวกคือ Lipofectin[®] พบว่า ไลโปโซมชนิดที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างมีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนเข้าเซลล์และเกิดการแสดงออกของยีนน้อยกว่า Lipofectin[®] 3-150 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากว่า Lipofectin[®] สามารถเข้าเซลล์ได้รวดเร็วกว่าไลโปโซมชนิดที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่าง

ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1987 เป็นต้นมา Felgner (27) ได้มีการพัฒนาไลโปโซมประจุบวกมากมายหลายชนิด สูตรตำรับที่ใช้มากที่สุดคือ DOTMA/DOPE (Lipofectin[®]) รองลงมาคือ DOGS (Transfectam[®]) DDAB/DOPE (LipofectACE[®]) DOSPA/DOPE (LipofectAMINE[®]) DOTAP DC-Chol และ DMRIE ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการถ่ายยีนของไลโปโซมประจุบวกแต่ละชนิด (28) ไลโปโซมประจุบวกบางสูตรตำรับได้ใช้เป็นตัวนำส่งยีนสำหรับการรักษามะเร็งหรือ cystic fibrosis และได้ทดลองในชั้นการศึกษา

วิจัยทางคลินิก (3) ระบบนี้ได้ใช้สำหรับการนำส่งยีนไปที่ปอดสมอง และเซลล์มะเร็งโดยบริหารยีนแบบทั่วร่างกายและแบบเฉพาะที่ที่ผิวหนัง

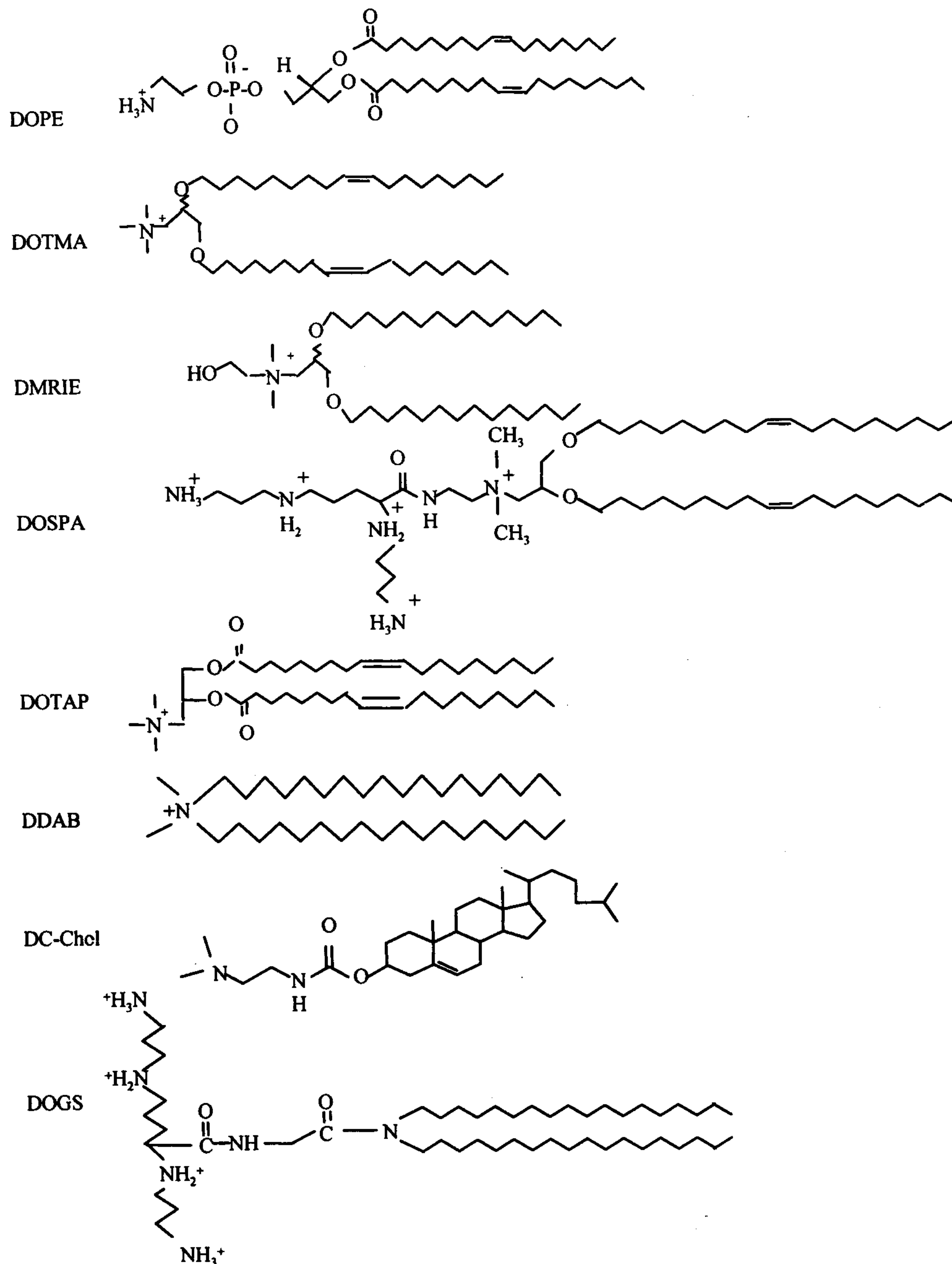
นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาประสิทธิภาพโดยการฉีดไลโปโซมประจุบวกก่อน แล้วหลังจากนั้น 5 นาทีจึงฉีดดีเอ็นเอเปล่า เรียกว่าวิธีฉีดแบบนี้ว่าการฉีดตามลำดับ (sequential injection) พบว่าไลโปโซมประจุบวกจะรวมตัวกับโปรตีนที่อยู่ในกระแสเลือดแล้วจับตัวกันเป็นก้อนอุดตันที่เส้นเลือดฝอยที่ปอด ดังนั้นเมื่อฉีดดีเอ็นเอเปล่าตามหลังมีผลให้เวลาที่ดีเอ็นเอเปล่าอยู่ที่ปอดนานขึ้น ส่งผลให้การแสดงออกของยีนที่ปอดสูงขึ้นกว่าการฉีดวิธีเดิม 2-5 เท่า พบว่าวิธีฉีดแบบนี้มีผลดีในการลดอาการข้างเคียงที่เกิดจากสารประกอบเชิงซ้อนไลโปโซมประจุบวกกับดีเอ็นเออีกด้วย ความเป็นพิษที่พบคือ การเหนี่ยวนำให้เกิดการปลดปล่อยสาร proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ) ซึ่งมีผลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (29) พบว่าการฉีดตามลำดับทำให้การหลั่งสาร proinflammatory cytokines ลดลง 70-90 % เมื่อเทียบกับการฉีดด้วยสารประกอบเชิงซ้อนไลโปโซมประจุบวกกับดีเอ็นเอ จนถึงปัจจุบันวิธีฉีดตามลำดับนี้มีความปลอดภัยมากที่สุด (30)

4. สารประกอบเชิงซ้อนพอลิเมอร์ประจุบวกกับดีเอ็นเอ (Cationic polymer-DNA complex หรือ Polyplex)

ปัจจุบันได้มีการค้นคว้าหาพอลิเมอร์ที่สามารถนำส่งยีนได้ ซึ่งก็น่าจะเป็นพอลิเมอร์ที่มีประจุบวกเพราะสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบได้ พอลิเมอร์ประจุบวกตัวแรกที่น่ามาใช้เป็นตัวพาดีเอ็นเอคือกลุ่ม polyamino acid ที่นิยมใช้คือ poly-L-lysine (PLL) สามารถเกิดปฏิกิริยาเชิงซ้อนกับดีเอ็นเอ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 50 นาโนเมตร (31) นอกจากนี้ยังได้มีการนำลิแกนด์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับตัวรับ (receptor) ที่อยู่ที่อวัยวะเป้าหมายที่ต้องการให้เกิดการแสดงออกของยีนมาควบคู่กับ PLL ทำให้สามารถนำส่งดีเอ็นเอไปยังอวัยวะเป้าหมายได้ ตัวอย่างลิแกนด์ที่ใช้เช่น asialoglycoprotein หรือ galactose สำหรับ asialoglycoprotein receptor ซึ่งอยู่ที่เซลล์ตับ นอกจากนี้ก็มีลิแกนด์อื่นๆ อีก เช่น transferrin, insulin, immunoglobulin, folate,

รูปที่ 4. สูตรโครงสร้างทางเคมีของ DOPE และไขมันประจุบวกอื่นๆ ที่นิยมใช้ในการเตรียมไลโปโซมประจุบวกสำหรับนำส่งยีน

DOPE = Dioleoylphosphatidylethanolamine; DOTMA = N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride; DMRIE = 1,2-Dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxyethylammonium bromide; DOSPA = 2,3-Dioleoyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanammonium trifluoroacetate; DOTAP = N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)]-N,N,N-trimethylammonium propane; DDAB = Dimethyldioctadecylammonium bromide; DC-Chol = 3β [N-(N',N'-Dimethylaminoethane)-carbamoyl cholesterol]; DOGS = Dioctadecylamidoglycylspermine



ตารางที่ 1. เปรียบเทียบส่วนประกอบของไลโปโซมประจุบวกชนิดต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนของสารประกอบเชิงซ้อนไลโปโซมประจุบวกกับพลาสมิดดีเอ็นเอในเซลล์เพาะเลี้ยง (28)

Cationic lipids	Co-lipid	Target cells	Plasmid DNA	Transfection efficiency
DOTMA	DOPE	CV1, COS-7	pCAT	> 5-100 × DEAE-dextran and calcium phosphate
DOGS	DOPE	Primary neurons	pCAT	> DDAB
DMRIE	DOPE	COS-7	pCMV-β-gal	> 2 × DOTMA
DOSPA	DOPE	HeLA, COS-7	pCAT	2-30 × DOTAP and DDAB
DC-Chol	DOPE	A431, L929	pCAT	> 2 × DOTMA
DOTAP	-	CV1, 3T3	pCAT	= DOTMA

lectin และ viral fusion peptide เป็นต้น การนำส่งยีนเข้าเซลล์อาศัยขบวนการที่เรียกว่า receptor-mediated gene delivery เพื่อช่วยเพิ่มความเฉพาะเจาะจงไปที่เซลล์เป้าหมายและเพิ่มการนำเข้าไปในเซลล์ พบว่าการแสดงออกของยีนเมื่อใช้พอลิเมอร์ประจุบวกเหล่านี้ทั้งในและนอกร่างกายยังต่ำกว่าการใช้ไลโปโซมประจุบวก (Lipoplex) ดังนั้นจึงมีการพัฒนาโดยการเติมสารที่ช่วยให้เกิดการปลดปล่อยยีนจากเอนโดโซม ตัวอย่างเช่นสารที่ได้จากไวรัส เปปไทด์ fusogenic ที่ได้จากไวรัส หรือเปปไทด์ที่มี RGD sequence พบว่าการเติมเปปไทด์ fusogenic มีผลเพิ่มการแสดงออกของยีนทั้งในและนอกร่างกาย (32)

พอลิเมอร์ประจุบวกกลุ่มอื่นๆ ที่มีรายงานใช้เป็นตัวพาเข้าเซลล์ได้ เช่น poly (N-alkyl-4-vinylpyridinium), poly-amidoamine dendrimers (PAMAM) หรือ starburst dendrimer, polyethylene imine (PEI), poly (2-dimethyl-aminoethyl methacrylate), poly-L-ornithine, โคโคซาน และ คอลลาเจน พบว่าพอลิเมอร์กลุ่มนี้แม้ว่าจะไม่มีลิแกนด์ ตัวพอลิเมอร์อย่างเดียวกันก็สามารถนำส่งยีนเข้าเซลล์และเกิดการแสดงออกของยีนได้ใกล้เคียงกับไลโปโซมประจุบวก นอกจากนี้มีการเพิ่มความคงตัวของพอลิเมอร์ประจุบวกและป้องกันการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนในกระแสเลือดโดยใช้โคพอลิเมอร์แบบบล็อกและแบบกราฟต์ที่มีส่วนของพอลิเมอร์ประจุบวกรวมอยู่ด้วย (33)

PEI สามารถใช้เป็นตัวนำส่งยีนได้โดยไม่ต้องใช้ร่วมกับสารที่ทำให้เกิดการปลดปล่อยดีเอ็นเอจากเอนโดโซม ทั้งนี้เนื่องจาก PEI สามารถต้านการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างได้สูง

(strong buffer capacity) เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด PEI อยู่ในรูปโปรตอน (H^+) ทำให้คลอไรด์ไอออน (Cl^-) เข้าไปในเอนโดโซมมากขึ้น การสะสมคลอไรด์ไอออนและโปรตอนเป็นการเพิ่มแรงดันออสโมซิสในเอนโดโซม ส่งผลให้น้ำเข้าไปในเอนโดโซมมากขึ้น เอนโดโซมบวมและแตกในที่สุด ทำให้สารประกอบเชิงซ้อน PEI กับดีเอ็นเอออกจากเอนโดโซมได้ นอกจากนี้พบว่าประสิทธิภาพในการนำส่งยีนและการแสดงออกของยีนขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลและโครงสร้าง (สายตรงหรือแบบกิ่งก้าน) ของ PEI ด้วย (34)

นอกจากการใช้พอลิเมอร์ประจุบวกหรือไลโปโซมประจุบวกเชิงซ้อนกับดีเอ็นเอดังกล่าวข้างต้น ยังมีการพัฒนาโดยใช้พอลิเมอร์ประจุบวก เช่น polylysine หรือ protamine ร่วมกับไลโปโซมประจุบวกเชิงซ้อนกับดีเอ็นเอ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแสดงออกของยีนในร่างกาย (35-36)

ตัวพาที่เป็นไวรัส (Viral vectors)

ไวรัสมีความสามารถที่จะถ่ายยีนของตัวเองเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ได้ และมีการแสดงออกของยีนที่จะผลิตไวรัสตัวใหม่ ๆ จากคุณสมบัติของไวรัสนี้จึงเป็นไปได้ที่จะใช้ไวรัสเป็นตัวพาที่ต้องการไปยังเซลล์เป้าหมาย แต่เนื่องจากไวรัสเป็นสิ่งแปลกปลอมจึงถูกต่อต้านโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ดังนั้นจึงมีไวรัสเพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถใช้เป็นตัวถ่ายยีนได้ ในปัจจุบันไวรัสที่มีผู้นำมาใช้เป็นตัวถ่ายยีนมี 4 ชนิดคือ retroviruses, adenoviruses, adeno-associated viruses และ herpes simplex virus type 1 ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. Retroviruses

Retroviruses คือไวรัสชนิดที่มีแต่อาร์เอ็นเอในการเก็บข้อมูลทางพันธุกรรม แต่ในวัฏจักรชีวิตจะมีการถอดรหัสกลับจากอาร์เอ็นเอให้เป็นดีเอ็นเอโดยเอนไซม์ reverse transcriptase ดีเอ็นเอของไวรัสก็จะสอดแทรกเข้าไปในจีโนมของเซลล์เจ้าบ้านแบบสุ่ม แล้วจึงจำลองตัวเองไปพร้อม ๆ กับดีเอ็นเอของเซลล์เจ้าบ้านนั้น ไวรัสชนิดนี้อาจทำให้เกิดกลายพันธุ์ได้ อาร์เอ็นเอของไวรัสชนิดนี้ขนาดประมาณ 10 กิโลเบส ประกอบด้วยอย่างน้อยสามส่วนคือ gag (ถอดรหัสให้ core protein), pol (ถอดรหัสให้เอนไซม์ reverse transcriptase) และ env (ถอดรหัสให้ envelope protein) นิยมใช้สำหรับเป็นตัวพาหีนที่ต้องการรักษาแบบ *ex vivo* (นำเซลล์ที่ต้องการถ่ายยีนออกมาจากผู้ป่วย แล้วนำเซลล์ที่ถ่ายยีนเสร็จเรียบร้อยแล้วนำกลับเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วยอีกครั้ง) เนื่องจากไวรัสชนิดนี้จะเข้าไปในเซลล์ชนิดที่มีการแบ่งเซลล์เท่านั้น (37)

2. Adenoviruses

Adenoviruses (AV) คือไวรัสที่เก็บข้อมูลทางพันธุกรรมไว้โดยดีเอ็นเอ มีมากกว่า 40 serotype strains เฉพาะ subgroup C serotypes 2 หรือ 5 ที่ใช้เป็นตัวพาหีน จีโนมของไวรัสชนิดนี้มีขนาดประมาณ 35 กิโลเบส สามารถแทรกยีนจากภายนอกเข้าไปในจีโนมของไวรัสชนิดนี้ได้ประมาณ 2-7 กิโลเบส วัฏจักรชีวิตของไวรัสชนิดนี้จะไม่รวมดีเอ็นเอเข้ากับจีโนมของเซลล์เจ้าบ้าน ดังนั้นจึงไม่เกิดความเสี่ยงที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงยีนของเซลล์เจ้าบ้าน (mutagenesis) และการแสดงออกของยีนจะเกิดแบบชั่วคราวเท่านั้น อย่างไรก็ตามข้อเสียของไวรัสชนิดนี้คือร่างกายผู้ป่วยจะผลิตแอนติบอดีที่ต่อต้านไวรัสเมื่อให้ในครั้งที่สอง การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อไวรัสที่ขึ้นอยู่กับความไวของแต่ละบุคคล จึงมีการพัฒนาตัวพาหีนชนิดนี้โดยการจัดโปรตีนของไวรัสที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และเพิ่มประสิทธิภาพในการบรรจุยีนจากภายนอกโดยสามารถตัดต่อยีนและแทรกยีนจากภายนอกที่มีขนาดใหญ่ได้ประมาณ 30 กิโลเบส (38) ตัวพาหีนชนิดนี้เหมาะสำหรับบริหารแบบ *in situ* (in position) ซึ่งนิยมใช้สำหรับนำส่งยีนเพื่อรักษาโรคทางพันธุกรรม cystic fibrosis อวัยวะเป้าหมายคือปอดซึ่งเป็นเซลล์ชนิดไม่แบ่งตัว (39) ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงและใช้ได้กับเซลล์หลายชนิด

3. Adeno-associated viruses

Adeno-associated viruses (AAV) คือไวรัสที่เก็บข้อมูลทางพันธุกรรมไว้โดยดีเอ็นเอ เป็นไวรัสชนิดที่ไม่ก่อโรคในคน จะต้องอาศัยไวรัสชนิดอื่นเช่น adenovirus ในการแพร่พันธุ์ Dr. Samulski จากมหาวิทยาลัย North Carolina ที่ Chapel Hill เป็นคนแรกที่ใช้ AAV เป็นตัวพาหีนเข้าเซลล์ สามารถนำส่งยีนที่มีขนาดเล็กประมาณ 5 กิโลเบส ข้อดีในการใช้ไวรัสชนิดนี้คือยีนของไวรัสจะรวมตัวกับโครโมโซมที่ 19 ของเซลล์เจ้าบ้านซึ่งเป็นบริเวณที่ปลอดภัย ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนแบบยาวนานและไวรัสชนิดนี้จะเข้าไปในเซลล์ได้หลายชนิดรวมทั้งชนิดที่ไม่แบ่งตัว AAV จะให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนที่สูงที่สุด แต่ข้อเสียของตัวพาหีนชนิดนี้คือปัญหาในการผลิต AAV ที่ต้องอาศัยไวรัสชนิดอื่นเป็นตัวช่วยในการแพร่พันธุ์ (40)

4. Herpes simplex viruses

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) มีความชอบกับเซลล์ของระบบประสาท จึงเป็นไวรัสที่ใช้เป็นตัวพาหีนไปที่ระบบประสาท เป็น double-stranded DNA ขนาด 152 กิโลเบส มีการนำ HSV-1 มาใช้เป็นตัวพาหีนสำหรับรักษาโรคทางระบบประสาท มะเร็งที่สมอง ไวรัสชนิดนี้ประสบความสำเร็จในการใช้เป็นตัวพาหีนที่ถอดรหัสให้ tyrosine hydroxylase ในเซลล์เพาะเลี้ยง rat striatal cells (41) และในหนูขาวที่เป็นโรคพาร์คินสัน (42) อย่างไรก็ตามการใช้ HSV-1 เป็นตัวพาหีนพบว่าทำให้เกิดการสนองตอบโดยมีการอักเสบที่บริเวณที่ฉีดและที่เส้นประสาทที่มีจุดเริ่มต้นบริเวณที่ฉีด นอกจากนี้พบว่า HSV-1 ไม่สามารถรวมตัวกับโครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้านได้และยังทำให้เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ด้วย

สรุป

การนำส่งยีนและเกิดการแสดงออกของยีนที่อวัยวะเป้าหมายได้สำเร็จนั้นเกิดจากความเข้าใจถึงปัจจัยต่างๆ ที่เป็นตัวขวางกั้นการแสดงออกของยีน ทำให้สามารถพัฒนาตัวพาหีนที่มีประสิทธิภาพดีและมีความเป็นพิษน้อยที่สามารถเอาชนะสิ่งขวางกั้นดังกล่าวได้สำเร็จ งานวิจัยทางด้านนี้ใช้เวลาอันยาวนานในการพัฒนาเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพที่ดีที่สุด และเชื่อว่าการทำยีนบำบัดนี้จะเกิดขึ้นในทางคลินิกมากขึ้นเรื่อยๆ และให้ผลในการรักษาโรคซึ่งเกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมในอนาคตอันใกล้

เอกสารอ้างอิง

1. J. A. Wolff and J. Lederberg. An early history of gene transfer and therapy. *Hum. Gene Ther.* **5**: 469-480 (1994).
2. K. W. Culver. Clinical applications of gene therapy for cancer. *Clin. Chem.* **40**: 510-512 (1994).
3. N. J. Caplen, E. W. Alton, P. G. Middleton, J. R. Dorin, B. J. Stevenson, X. Gao, S. R. Durham, P. K. Jeffery, M. E. Hodson, and C. Coutelle. Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat. Med.* **1**: 39-46 (1995).
4. J. A. Wolff, R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani, and P. L. Felgner. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* **247**: 1465-1468 (1990).
5. C. Nicolau, A. Le Pape, P. Soriano, F. Fargette and M. F. Juhel. *In vivo* expression of rat insulin after intravenous administration of the liposome-entrapped gene for rat insulin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**: 1068-1072 (1983).
6. Y. Liu, D. Liggitt, W. Zhong, G. Tu, K. Gaensler, and R. Debs. Cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. *J. Biol. Chem.* **270**: 24864-24870 (1995).
7. F. Sakurai, T. Nishioka, F. Yamashita, Y. Takakura, and M. Hashida. Effects of erythrocytes and serum proteins on lung accumulation of lipoplexes containing cholesterol or DOPE as a helper lipid in the single-pass rat lung perfusion system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **52**: 165-172 (2001).
8. M. Nishikawa and M. Hashida. Nonviral approaches satisfying various requirements for effective *in vivo* gene therapy. *Biol. Pharm. Bull.* **25**: 275-283 (2002).
9. M. A. Hickman, R. W. Malone, K. Lehmann-Bruinsma, T. R. Sih, D. Knoell, F. C. Szoka, R. Walzem, D. M. Carlson, and J. S. Powell. Gene expression following direct injection of DNA into liver. *Hum. Gene Ther.* **5**: 1477-1483 (1994).
10. M. L. Sikes, B. W. O'Malley Jr., M. J. Finegold, and F. D. Ledley. *In vivo* gene transfer into rabbit thyroid follicular cells by direct DNA injection. *Hum. Gene Ther.* **5**: 837-844 (1994).
11. A. Ardehali, A. Fyfe, H. Laks, D. C. Drinkwater Jr., J. H. Qiao, and A. J. Lusis. Direct gene transfer into donor hearts at the time of harvest. *J. Thorac. Cardiovas. Surg.* **109**: 716-720 (1995).
12. B. Schwartz, C. Benoist, B. Abdallah, R. Rangara, A. Hassan, D. Scherman, and B. A. Demeneix. Gene transfer by naked DNA into adult mouse brain. *Gene Ther.* **3**: 405-411(1996).
13. J. J. Yoo, S. Soker, L. F. Lin, K. Mehegan, P. D. Guthrie, and A. Atala. Direct *in vivo* gene transfer to urological organs. *J. Urol.* **162**: 1115-1118 (1999).
14. T. Nomura, K. Yasuda, T. Yamada, S. Okamoto, R. I. Mahato, Y. Watanabe, Y. Takakura, and M. Hashida. Gene expression and antitumor effects following direct interferon (IFN)-gamma gene transfer with naked plasmid DNA and DC-chol liposome complexes in mice. *Gene Ther.* **6**: 121-129 (1999).
15. I. Danko, J. D. Fritz, S. Jiao, K. Hogan, J. S. Latendresse, and J. A. Wolff. Pharmacological enhancement of *in vivo* foreign gene expression in muscle. *Gene Ther.* **1**: 114-121 (1994).
16. R. I. Mahato, K. Kawabata, Y. Takakura, and M. Hashida. *In vivo* disposition characteristics of plasmid DNA complexed with cationic liposomes. *J. Drug Target* **3**: 149-157 (1995).

17. F. Liu, Y. Song, and D. Liu. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* **6**: 1258-1266 (1999).
18. N. Kobayashi, T. Kuramoto, K. Yamaoka, M. Hashida, and Y. Takakura. Hepatic uptake and gene expression mechanisms following intravenous administration of plasmid DNA by conventional and hydrodynamics-based procedures. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **297**: 853-360 (2001).
19. V. Budker, G. Zhang, S. Knechtle, and J. A. Wolff. Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes. *Gene Ther.* **3**: 593-598 (1996).
20. V. Budker, G. Zhang, I. Danko, P. Williams, and J. Wolff. The efficient expression of intravascularly delivered DNA in rat muscle. *Gene Ther.* **5**: 272-276 (1998).
21. F. Liu, M. Nishikawa, P. R. Clemens, and L. Huang. Transfer of full-length Dmd to the diaphragm muscle of Dmd (mdx/mdx) mice through systemic administration of plasmid DNA. *Mol. Ther.* **4**: 45-51(2001).
22. J. W. Gordon, G. A. Scargos, D. J. Plotkin, J. A. Barbosa, and F. R. Ruddle. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**: 7380-7384 (1980).
23. N. S. Yang, J. Burkholder, B. Roberts, B. Martinell, and D. McCabe. *In vivo* and *in vitro* gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 9568-9572 (1990).
24. E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, and P. H. Hofschneider. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* **1**: 841-845 (1982).
25. S. Somiari, J. Glasspool-Malone, J. J. Drabick, R. A. Gilbert, R. Heller, M. J. Jaroszeski, and R. W. Malone. Theory and *in vivo* application of electroporative gene delivery. *Mol. Ther.* **2**: 178-187 (2000).
26. C. Y. Wang and L. Huang. pH-Sensitive immunoliposomes mediate target-cell-specific delivery and controlled expression of a foreign gene in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 7851-7855 (1987).
27. P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, and M. Danielsen. Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 7413-7417 (1987).
28. R. I. Mahato, Y. Takakura, and M. Hashida. Nonviral vectors for *in vivo* gene delivery: Physicochemical and pharmacokinetic considerations. *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.* **14**: 133-172 (1997).
29. J. D. Tousignant, A. L. Gates, L. A. Ingram, C. L. Johnson, J. B. Nietupski, S. H. Cheng, S. J. Eastman, and R. K. Scheule. Comprehensive analysis of the acute toxicities induced by systemic administration of cationic lipid: plasmid DNA complexes in mice. *Hum. Gene Ther.* **11**: 2493-2513 (2000).
30. F. Liu and L. Huang. Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. *J. Control. Res.* **78**: 259-266 (2002).
31. G. Y. Wu and C. H. Wu. Receptor-mediated gene delivery and expression *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **263**: 14621-14624 (1988).
32. M. Hashida, M. Nishikawa, F. Yamashita, and Y. Takakura. Cell-specific delivery of genes with glycosylated carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **52**: 187-196 (2001).

33. A. V. Kabanov. Taking polycation gene delivery systems from *in vitro* to *in vivo*. *Pharm. Sci. Technol. Today* **2**: 365-372 (1999).
34. W. T. Godbey, K. K. Wu, and A. G. Kikos. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *J. Control. Res.* **60**: 149-160 (1999).
35. X. Zhou and L. Huang. DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: Characterization and mechanism of action. *Biochim. Biophys. Acta* **1189**: 195-203 (1994).
36. S. Li, M. A. Rizzo, S. Bhattacharya, and L. Huang. Characterization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery. *Gene Ther.* **5**: 930-937 (1998).
37. G. L. Buchsacher Jr. Introduction to retroviruses and retroviral vectors. *Somat. Cell Mol. Genet.* **26**: 1-11 (2001).
38. A. E. Smith. Viral vectors in gene therapy. *Ann. Rev. Microbiol.* **49**: 807-838 (1995).
39. D. T. Klink, M. C. Glick, and T. F. Scanlin. Gene therapy of cystic fibrosis (CF) airways: A review emphasizing targeting with lactose. *Glycoconj. J.* **18**: 731-740 (2001).
40. J. P. Greelish, L. T. Su, E. B. Lankford, J. M. Burkman, H. Chen, S. K. Konig, I. M. Mercier, P. R. Desjardins, M. A. Mitchell, X. G. Zheng, J. Leferovich, G. P. Gao, R. J. Balice-Gordon, J. M. Wilson, and H. H. Stedman. Stable restoration of the sarcoglycan complex in dystrophic muscle perfused with histamine and a recombinant adeno-associated viral vector. *Nat. Med.* **5**: 439-443 (1999).
41. A. I. Geller, M. J. During, Y. J. Oh, A. Freese, and K. O'Malley. An HSV-1 vector expressing tyrosine hydroxylase causes production and release of L-dopa from cultured rat striatal cells. *J. Neurochem.* **64**: 487-496 (1995).
42. M. J. During, J. R. Naegele, K. L. O'Malley, and A. I. Geller. Long-term behavioral recovery in parkinsonian rats by an HSV vector expressing tyrosine hydroxylase. *Science* **266**: 1399-1403 (1994).