

رویکردهای
نـوین
ژن درمانی
سرطان

مترجم:

امین صادقی علیکلایه

نویسنده:

ولفگانگ والتر

سرشناسه : والتر، ولفگانگ

Walther, Wolfgang

عنوان و نام پدیدآور : رویکردهای نوین ژن درمانی سرطان/نوشته ولفگانگ والتر؛ مترجم امین صادقی علیکلایه.

مشخصات نشر : تهران: انتشارات صالحیان، ۱۳۹۷.

مشخصات ظاهری : ۲۱۰ص.

شابک : ۹۷۸-۶۲۲-۲۱۴-۰۰۷-۶

وضعیت فهرست نویسی : فیپا

یادداشت : عنوان اصلی: (2016), Current strategies in cancer gene therapy

موضوع : سرطان -- ژن درمانی

موضوع : Cancer -- Gene therapy

شناسه افزوده : صادقی، امین، ۱۳۶۸ مهر - ، مترجم

رده بندی کنگره : ۱۳۹۷ و ۲/۹۷۱/۲۷۱ RC

رده بندی دیویی : ۶۱۶/۹۹۴۰۶۹۵

شماره کتابشناسی ملی : ۵۳۸۰۵۲۷



رویکردهای نوین ژن درمانی سرطان

مؤلف: ولفگانگ والتر

مترجم: امین صادقی علیکلایه

ناشر: صالحیان

ویراستاری: معصومه اسفندیاری

سال و نوبت چاپ: ۱۳۹۷ - اول

شمارگان: ۱۰۰۰ نسخه

شابک: ۹۷۸-۶۲۲-۲۱۴-۰۰۷-۶

قیمت: ۱۵۰۰۰ تومان

حق چاپ محفوظ است.

دفتر مرکزی نشر صالحیان

میدان انقلاب-کارگر جنوبی-کوچه شهدای ژاندارمری-پلاک ۱۲۷-واحد ۳

تلفن: ۰۹۱۹۰۸۱۰۱۴۲-۶۶۹۷۹۳۰۰

سایت انتشارات: www.pubsalehiyan.com

تقدیم بہ

پدر و مادر عزیزم

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

پیشگفتار مترجم ۹

فصل اول ♦ ۱۱

جایگزینی فاکتور نسخه‌برداری P53 برای درمان سرطان

چکیده	۱۱
مقدمه	۱۳
بقا سلولی و مسیرهای پیام‌رسانی مرگ سلولی با واسطه p53	۱۶
درمان جایگزینی p53	۱۸
کمپلکس لیپوزوم کاتیونی به همراه پلاسمید DNA	۱۸
ناقل آدنوویروس با نقص همانندسازی	۱۹
ناقل آدنوویروس مستعد همانندسازی	۲۳
درمان انتقال پروتئین	۲۶
اثرات انحرافی درمان جایگزینی p53	۲۷
نتیجه‌گیری	۳۰
منابع	۳۲

فصل دوم ♦ ۳۹

ناقلین رترو ویروسی در ژن‌درمانی سرطان

چکیده	۳۹
-------------	----

۴۱	 مقدمه
۴۵	 رویکردهای ضد سرطان بر اساس CARs و TCR
۴۶	 سلولهای T
۴۹	 سلولهای پیش ساز T
۵۰	 سلولهای NK
۵۱	 O-۶-متیل گوانین DNA متیل ترانسفراز (MGMT)
۵۳	 نتیجه گیری
۵۴	 منابع

فصل سوم ♦ ۶۹

RNAهای غیر کد کننده جهت ژن درمانی سرطان

۶۹	 چکیده
۷۰	 مقدمه
۷۱	 مکانیزم و عمل RNA غیر کد کننده
۷۶	 طراحی و سنتز RNA غیر کد کننده برای ژن درمانی سرطان
۷۸	 انتقال RNA غیر کد کننده برای ژن درمانی سرطان
۸۳	 نتیجه گیری
۸۴	 منابع

فصل چهارم ♦ ۹۱

واکسن های mRNA سرطان

۹۱	 چکیده
۹۳	 واکسن های mRNA سرطان
۹۳	 مقدمه
۹۴	 واکسن های RNActive®
۹۷	 القا پاسخ های ضد تومور با واکسن های RNActive®
۹۹	 مطالعات کلینیکی با واکسن های RNActive®

۱۰۳.....	ترکیب واکسن RNActive® با شیمی درمانی یا پرتودرمانی
۱۰۶.....	مطالعه کلینیکی با واکسن های RNActive® در ترکیب با پرتودرمانی
۱۰۶.....	ترکیب واکسن های RNActive® با مهارکننده های ایمنی
۱۰۷.....	واکسن های mRNA فردی
۱۱۲.....	سلول های CAR T
۱۱۴.....	نتیجه گیری
۱۱۵.....	منابع

فصل پنجم ♦ ۱۳۱

روش های ژن درمانی برای غلبه بر مقاومت دارویی به ABCB1

۱۳۱.....	چکیده
۱۳۳.....	مقدمه
۱۳۷.....	مقاومتی که بر رویکردهای ژن درمانی غلبه می کند
۱۳۷.....	انتقال به روش ترانسفکسیون
۱۳۹.....	انتقال با استفاده از نانوذرات
۱۴۰.....	انتقال ویروسی
۱۴۰.....	انتقال باکتریایی
۱۴۲.....	انتقال با تزریق جت
۱۴۴.....	نتیجه گیری
۱۴۵.....	منابع

فصل ششم ♦ ۱۵۱

سموم باکتریایی برای ژن درمانی خودکشی اونکولیکینگ سرطان

۱۵۱.....	چکیده
۱۵۳.....	مقدمه
۱۵۷.....	ژن درمانی خودکشی برای درمان سرطان
۱۵۹.....	سموم باکتریایی در درمان سرطان

سم دیفتری	۱۶۰
ژن درمانی خود کشی بر اساس DT	۱۶۲
استرپتولیزین O	۱۶۵
SLO باعث ژن درمانی خود کشی سیتوسولی می شود	۱۶۷
Clostridium perfringens	۱۶۹
انکولیکینگ ژن درمانی خود کشی بر اساس CPE	۱۷۰
نتیجه گیری	۱۷۳
منابع	۱۷۵

فصل هفتم ♦ ۱۸۵

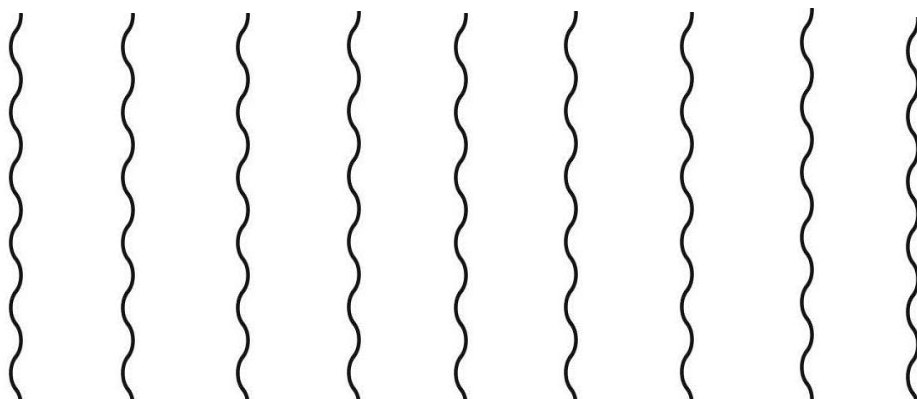
استفاده از باکتری ها در درمان سرطان

چکیده	۱۸۵
مقدمه	۱۸۷
تاریخچه استفاده از باکتری ها در سرطان	۱۸۹
باکتری های هدف گیرنده تومور	۱۹۰
بیان عوامل ضدسرطانی	۱۹۲
باکتری های نو ترکیب	۱۹۴
درمان پیش داروی آنزیم هدایت شده توسط باکتری	۱۹۶
درمان انکولیتیک باکتریایی	۱۹۹
سموم باکتریایی	۲۰۰
باکتری ها به عنوان عوامل ایمنی درمانی	۲۰۲
باکتری ها در درمان ترکیبی	۲۰۵
نتیجه گیری و چشم انداز آینده	۲۰۷
منابع	۲۰۹

○ پیشگفتار مترجم

● طبق اعلام سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۸ بیماری "سرطان" دومین عامل مرگ و میر در سطح جهان بشمار می‌رود. این سازمان بیان نمود، فقط در سال ۲۰۱۵ حدود ۸/۸ میلیون نفر در سراسر جهان، یعنی از هر ۶ نفر یک نفر در اثر ابتلا به سرطان جان خود را از دست است. این در حالیست که حدود ۷۰ درصد مبتلایان به سرطان در کشورهایی با درآمد متوسط و کم ساکن هستند. اثرات منفی اقتصادی ابتلا به سرطان روز به روز و در حال افزایش است. کل هزینه درمانی سالانه سرطان در سال ۲۰۱۰ حدود ۱/۱۶ تریلیون دلار تخمین زده شده است. طبق تحقیقات صورت گرفته، حدود یک سوم مرگ و میر ناشی از سرطان به دلیل تغییر در سبک زندگی و رژیم‌های غذایی مانند: افزایش وزن بدن، کاهش مصرف میوه‌ها و سبزیجات، کم تحرکی، مصرف انواع دخانیات، مصرف مشروبات الکلی و مصرف سموم شیمیایی کشاورزی می‌باشد.

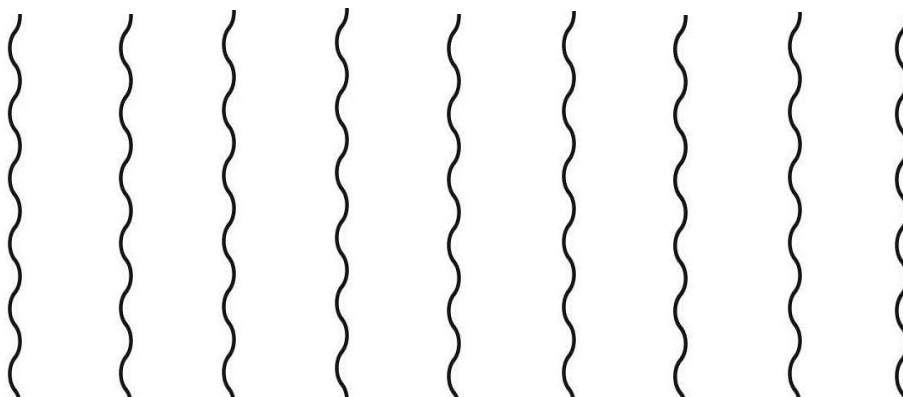
● گسترش روزافزون این بیماری مهلک و نگاه منتظر بیماران به تحقیقات دانشمندان در حوزه سلامت، ما را بر آن داشت تا با بررسی تحقیقات علمی جدید و معرفی آن‌ها، روزنه امید را در دل‌های بیماران زنده کنیم. لذا ترجمه کتاب حاضر با عنوان "رویکردهای نوین ژن درمانی سرطان" که در سال ۲۰۱۶ در نشریه معتبر علمی اشپرینگر به چاپ رسیده است را تقدیم حضورتان نموده‌ایم.



● این کتاب منبع ارزشمندی در زمینه ژن درمانی سرطان برای محققین، اساتید و دانشجویان حوزه ژنتیک، پزشکی، دارویی و علوم زیستی فراهم نموده است. در ترجمه کتاب حاضر سعی بر رعایت امانت داری و استفاده از واژگان تخصصی و ساده مطالب بوده است. با این وجود، هیچ اثری خالی از ایراد نیست، لذا از همه اساتید و دانشجویان عزیز تقاضا داریم در جهت رفع نقایص، ما را در چاپ های بعدی یاری نمایند.

با تشکر

امین صادقی

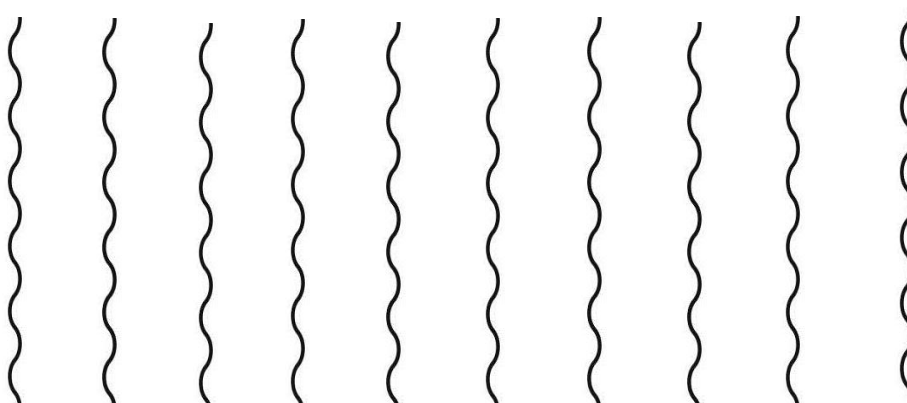


○ فصل اول

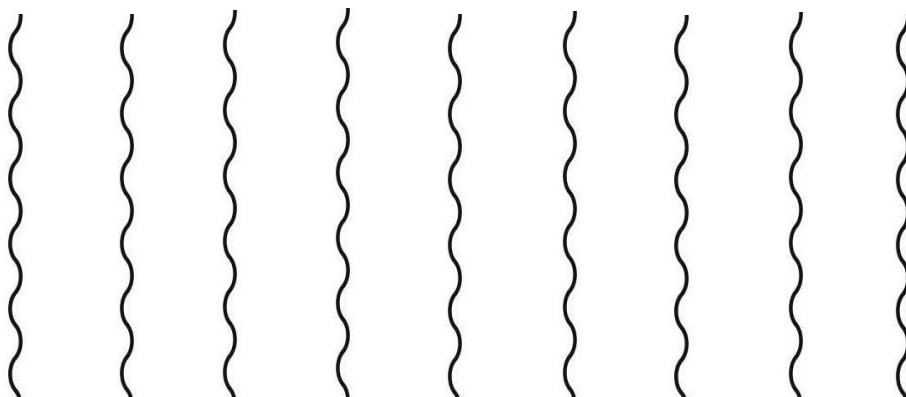
جایگزینی فاکتور نسخه‌برداری p53 برای درمان سرطان

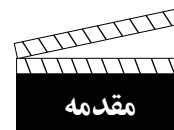


امروزه درمان جایگزینی ژن سرکوبگر تومور (TSG) که شامل انواع مختلفی از سیستم‌های انتقالی می‌باشد، به عنوان یک رویکرد درمانی ضد تومور ظهور یافته است، زیرا تومورهای بدخیم از طریق تغییرات ژنتیکی در TSG ها توسعه می‌یابند. بهترین TSG درمانی برای سرکوب تومور، فاکتور نسخه‌برداری ژن p53 است که چندین پدیده سلولی مانند: توقف چرخه سلولی، پیری، آپوپتوز و خودخواری را تنظیم می‌کند. از زمانی که ژن p53 توسط تنظیم مکانیسم ژنتیکی در سلول‌های سرطانی انسان غیرفعال شده است، درمان جایگزینی p53 به صورت گسترده به عنوان یک رویکرد ضد تومور استفاده شده است تا عمل ژن وحشی p53 را در تومورهای غیرفعال شده p53 بازیابی کند. این فصل بر چهار نوع سیستم انتقال p53 تمرکز دارد که شامل: کمپلکس‌های پلاسמיד



لیپوزوم کاتیونی-DNA، ناقل آدنووایروس با نقص همانندسازی، ناقل آدنووایروس مستعد همانندسازی، و سیستم انتقال پروتئین می باشد. به علاوه، ما در مورد پیشرفت های اخیر در درک مولکولی مسیر پیام رسانی مرگ سلولی با واسطه p53 و روش های درمانی برای افزایش مرگ سلولی تومور و القا اثرات محیطی درون بافت تومور در درمان جایگزینی p53 بحث می کنیم. کشف مکانیزم مولکولی تحت سیستم شبکه سرکوبگر تومور با واسطه p53 و ایجاد رویکرد مؤثر برای افزایش مسیرهای پیام رسانی مرگ سلولی با واسطه p53 به بهبود در خروجی کلینیکی بیماران با سرطان های غیرفعال شده p53 منجر شده است.

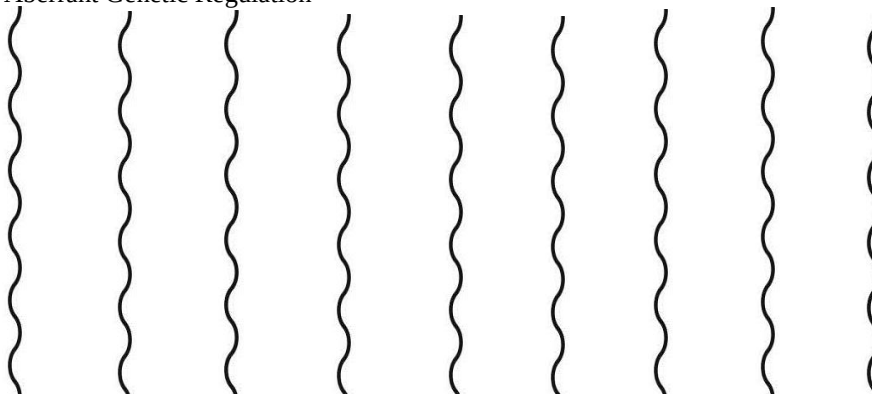




درمان جایگزینی ژن سرکوبگر تومور (TSG)^۱ به عنوان یک روش درمانی ضد تومور برای القا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول از طریق وارد کردن یک TSG درمانی، ظهور یافته است (۳۶). در بین TSG‌های درمانی برای القای سرکوب تومور، بهترین TSG ژن p53 است که به عنوان فاکتور نسخه‌برداری چندکاره برای تنظیم چند ویژگی سلولی مانند توقف چرخه سلولی، پیری، آپوپتوز^۲ و خودخواری^۳ عمل می‌کند (۴۵). پایگاه داده IARC TP53 (<http://www-p53.iarc.fr/>) نشان داد که انواع مختلفی از تومورهای بدخیم حاوی جهش‌های سوماتیکی در ژن p53 حضور دارند (۳۳). ژن p53، توسط تنظیم ژنتیکی نابجا^۴ در سرطان‌های انسانی غیرفعال می‌شود و پیشنهاد شده است که ژن p53 نقش اساسی در شبکه سرکوب تومور ایفا می‌کند (۳۲، ۳۴). بنابراین، بازیابی عمل p53 نوع وحشی یک رویکرد ضد تومور امیدبخش است که به شدت رشد تومورهای غیرفعال شده p53 را سرکوب می‌کند.

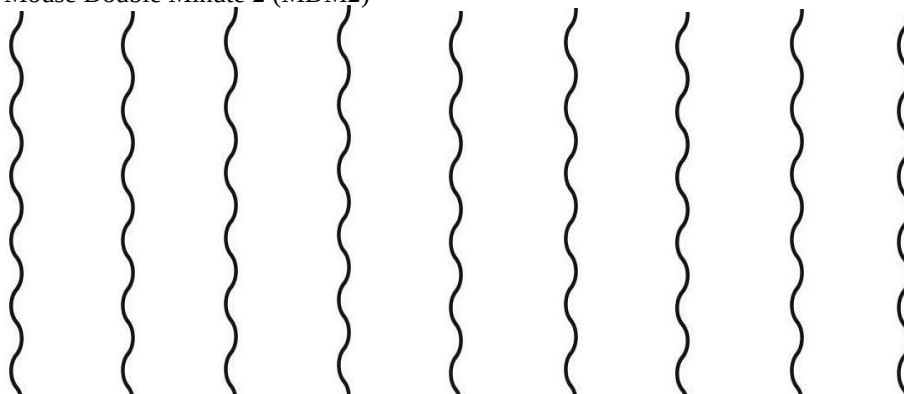
درمان جایگزینی p53 به صورت گسترده و فراوان به عنوان رویکرد ضد تومور بالقوه استفاده شده است تا بیان ژن p53 و در ادامه مرگ سلولی بسیاری از انواع تومورهای بدخیم را با حالت غیرفعال شده p53، القا کند (۸، ۳۷). برای القای بیان نابجای یک ژن خارجی p53

1. Tumor Suppressor Gene (TSG)
2. Apoptosis
3. Autophagy
4. Aberrant Genetic Regulation



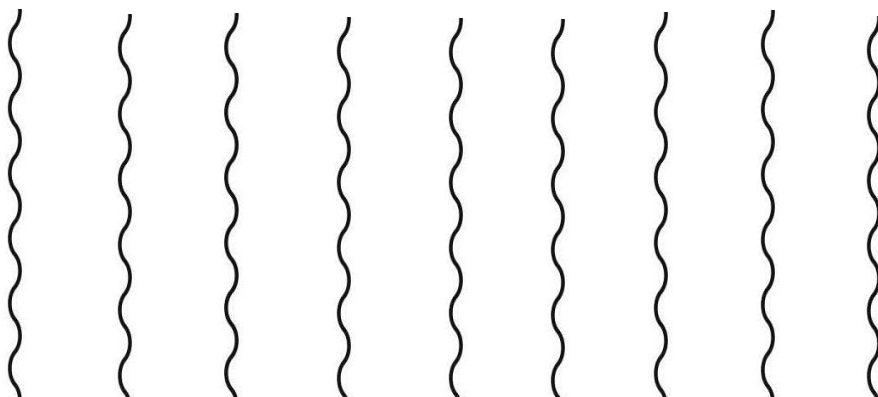
یا پروتئین p53، چهار نوع سیستم انتقال p53 وجود دارد که شامل: کمپلکس‌های پلاسمید لیپوزوم کاتیونی-DNA^۱، ناقل آدنووایروس با نقص همانندسازی، ناقل آدنووایروس مستعد همانندسازی، و سیستم انتقال پروتئین می‌باشد. فعال‌سازی بیان p53 خارجی به صورت مناسبی مسیرهای پیام‌رسانی مرگ سلولی با واسطه p53 را در سلول‌های تومور غیرفعال شده با p53 القا می‌کند. در مقابل، بازفعال‌سازی بیان p53 داخلی توسط درمان با ترکیبات شیمیایی مانند: نوتلین-۳^۲ یا PRIMA-1 نوع دیگری از رویکرد بازبازی عمل p53 نوع وحشی است. نوتلین-۳ تثبیت p53 را در سلول‌های توموری القا می‌کند و با افزایش بیان^۳ MDM2 مانع از برهمکنش MDM2-P53 می‌شود زیرا که MDM2^۴ به عنوان سرکوبگر ژن p53 نقش ایفا می‌کند (۳، ۳۹). PRIMA-1 آپوپتوز را به وسیله بازبازی فعالیت اتصال به DNA و بازبازی عملکردی در پروتئین جهش‌یافته p53 در سلول‌های سرطانی انسان، القا می‌کند (۴۴). از زمانی که پتانسیل درمانی نوتلین-۳ و PRIMA-1 به ترتیب به تومورهایی با افزایش بیان MDM2 و جهش‌های ژن p53 (R175H و R273H) محدود شده است، سیستم‌های انتقال p53 برای القا خارجی بیان p53 رویکردهای ضد تومور مفیدی را فراهم می‌کند و به صورت فراوانی در درمان جایگزینی p53 استفاده می‌شود (۴).

1. Cationic Liposome-DNA Plasmid Complexes
2. Nutlin-3
3. Overexpress
4. Mouse Double Minute 2 (MDM2)





این فصل بر پیشرفت‌های اخیر در درمان جایگزینی p53 برای القا بیان بیش از حد ژن p53 خارجی یا پروتئین p53 با استفاده از یکی از چهار نوع سیستم انتقال P53 تمرکز دارد که شامل: انتقال پلاسمید DNAp53 بر اساس لیپوزوم، انتقال ژن p53 بر اساس آدنووایروس با نقص همانندسازی، انتقال ژن p53 بر اساس آدنووایروس مستعد همانندسازی، و انتقال پروتئین p53 بر اساس پپتید نفوذپذیر به غشا است. به علاوه، ما در مورد پیشرفت‌های اخیر در درک اساس مولکولی مسیرهای پیام‌رسانی مرگ سلولی با واسطه p53 که توسط ناقل آدنووایروس القا می‌شود و مکانیزم مولکولی تحت یک رویکرد ترکیبی مؤثر برای افزایش مرگ سلولی با واسطه p53 علیه سلول‌های تومور بحث خواهیم نمود.



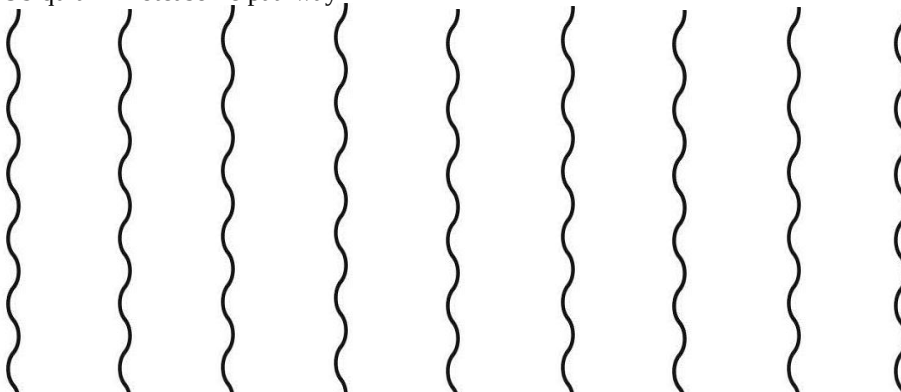
بقا سلولی و مسیرهای پیام رسانی مرگ سلولی با واسطه p53

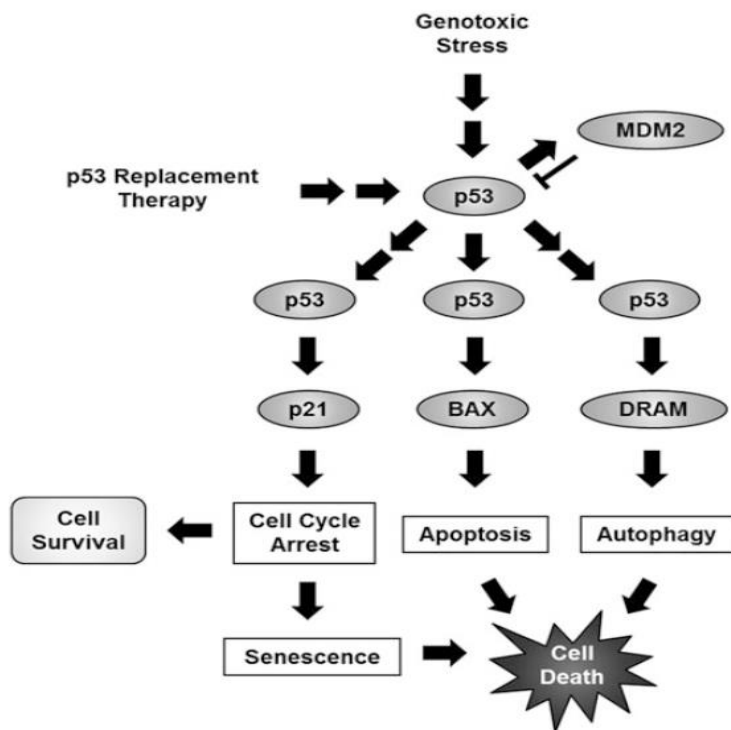
در حالت کلی، چندین نوع مسیر پیام مرگ سلولی با واسطه p53 وجود دارند، که شامل پیری، آپوپتوز و خودخواری می‌شوند (شکل ۱). وقتی سلول‌های تومور با عمل p53 سالم تحت تنش ژنوتوکسیک^۱ قرار میگیرند، p53 فعال می‌شود تا از لحاظ نسخه‌برداری بسیاری از انواع ژن‌های هدف تحت کنترل p53 را مانند: p21WAF1 (p21)، BAX و یا DRAM (تعدیل‌کننده خودخواری تنظیم شده)^۲ القا کند (۶، ۷، ۲۵). تحت تنش ژنوتوکسی ملایم، p53 اساساً بیان p21 را برای القا توقف چرخه سلولی افزایش می‌دهد تا مجوز ترمیم DNA آسیب دیده را بدهد که این عمل سبب بقای سلول می‌شود. اما توقف چرخه سلولی به صورت مداوم توسط فعال‌سازی p21 به القا مرگ سلولی مرتبط با پیری منجر می‌شود. در مقابل، تنش ژنوتوکسی شدید تجمع بیشتری از p53 را القا می‌کند، که مسیرهای پیام رسانی BAX و DRAM را فعال می‌سازد که به ترتیب منجر به آپوپتوز و خودخواری می‌شود، و منجر به القا مرگ سلولی می‌گردد. ولی، وقتی ژن هدف p53MDM2، که تنظیم‌کننده منفی p53 از طریق مسیر یوبی کوئیتین-پروتئوزوم^۳ است، پس از فعال‌سازی p53 افزایش بیان می‌یابد، از فعال‌سازی MDM2 در مسیر پیام رسانی با واسطه p53، مانند یک حلقه بازخورد منفی p53، ممانعت می‌کند (۱). بنابراین، بقا سلولی با واسطه p53 و مسیرهای مرگ سلولی به شدت با بسیاری از انواع ژن‌های هدف تحت کنترل p53 تنظیم می‌شوند.

1. Genotoxic Stress

2. Damage-Regulated Autophagy Modulator (DRAM)

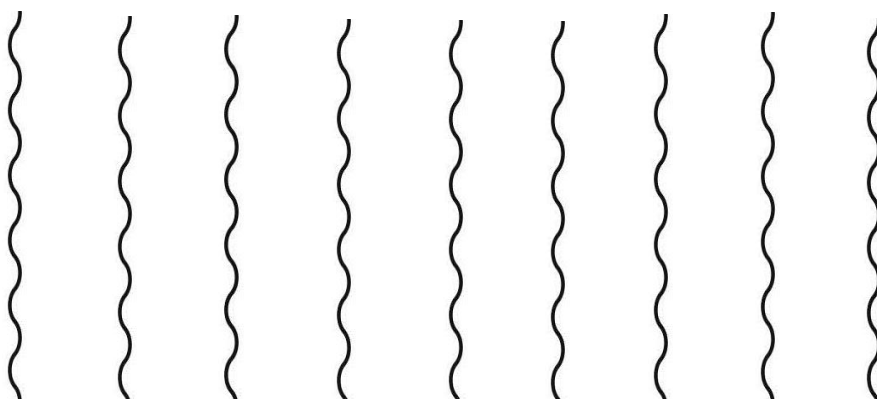
3. Ubiquitin-Proteasome pathway





شکل ۱- طرح مسیرهای مرگ سلولی و بقا سلول القا شده توسط تنش ژنوتوکسی یا درمان جایگزینی p53

تنش ژنوتوکسی باعث توقف چرخه سلولی، آپوپتوز، یا خودخواری به ترتیب از طریق فعال‌سازی ژن‌های هدف p53 شامل: p21، BAX، یا DRAM می‌شود. تنش ژنوتوکسی ملایم باعث تجمع مقدار کوچکی از p53 می‌شود، که به توقف چرخه سلولی وابسته به p21 و بقا سلول مربوط می‌شود. ولی تنش ژنوتوکسی شدید باعث تجمع بزرگی از p53 می‌شود که منجر به فعال‌سازی سه مسیر مرگ سلولی مجزا می‌شود: پیری، آپوپتوز و خودخواری. به علاوه، فعال‌سازی MDM2 القا شده توسط p53 به صورت حلقه بازخورد منفی p53 از طریق تجزیه p53 با واسطه یوبی کوئیتین عمل



می‌کند. در مقابل، درمان جایگزینی p53، مسیرهای مرگ سلولی با واسطه p53 را از طریق بیان نابجای ژن خارجی p53 یا پروتئین p53 القا می‌کند.

درمان جایگزینی p53

برای بازیابی عمل p53 نوع وحشی در انواعی از سلول‌های تومور غیرفعال شده p53، بیان بیش از حد ژن p53 خارجی یا پروتئین p53 با استفاده از یکی از چند روش انتقال یک رویکرد مؤثر در تنظیمات پیش کلینیکی و کلینیکی است. انتقال پلاسمید DNAp53 بر روش لیپوزوم یا انتقال ژن p53 به روش ویروس از نظر رونویسی، بیان نابجای ژن p53 خارجی را فعال می‌کند، درحالی که انتقال پروتئین p53 به روش پپتید نفوذپذیر غشا مستقیماً سبب بیان نابجای پروتئین p53 خارجی می‌گردد. در بخش‌های بعدی، ما پتانسیل درمانی، روش درمان جایگزینی p53 را بیان می‌کنیم که شامل کمپلکس پلاسمید DNA-لیپوزوم، ناقل ویروس با نقص همانندسازی، ناقل ویروس مستعد همانندسازی و یا یک روش انتقال پروتئین، در تنظیمات پیش کلینیکی و کلینیکی است.

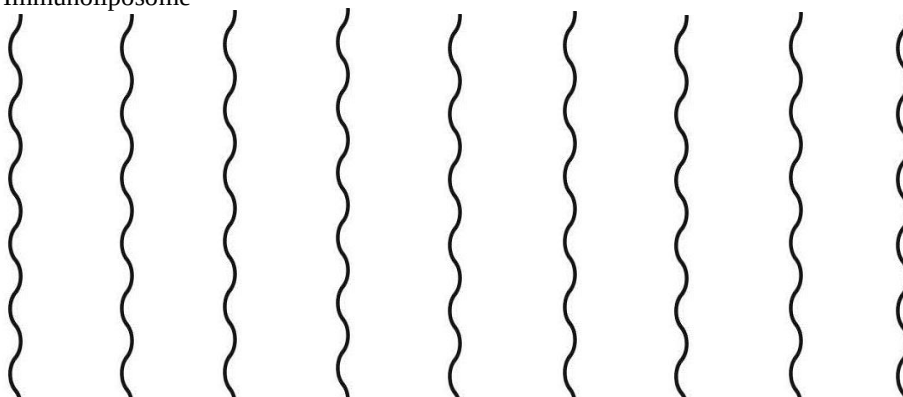
کمپلکس لیپوزوم کاتیونی به همراه پلاسمید DNA

لیپوزوم کاتیونی سیستم‌های انتقال مفیدی برای ترانسفیکاسیون^۱ ناقلین پلاسمید DNA هستند که p53 نابجا را در سلول‌های سرطان انسان در آزمایشات درون شیشه‌ای^۲ رمز می‌کنند (۲۸، ۳۵، ۴۹، ۵۱). اخیراً برای افزایش راندمان ترانسفیکاسیون و انتقال اختصاصی تومور ناقلین پلاسمید، یک ایمینولیپوزوم^۳ متصل به آنتی‌بادی برای درمان سرطان ایجاد شده است (۹، ۱۰، ۴۷، ۴۸). ولی راندمان‌های

1. Transfection

2. In vitro

3. Immunoliposome



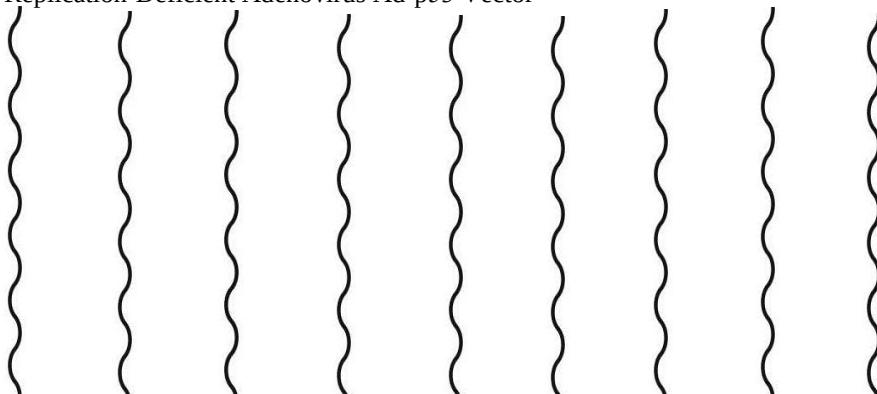


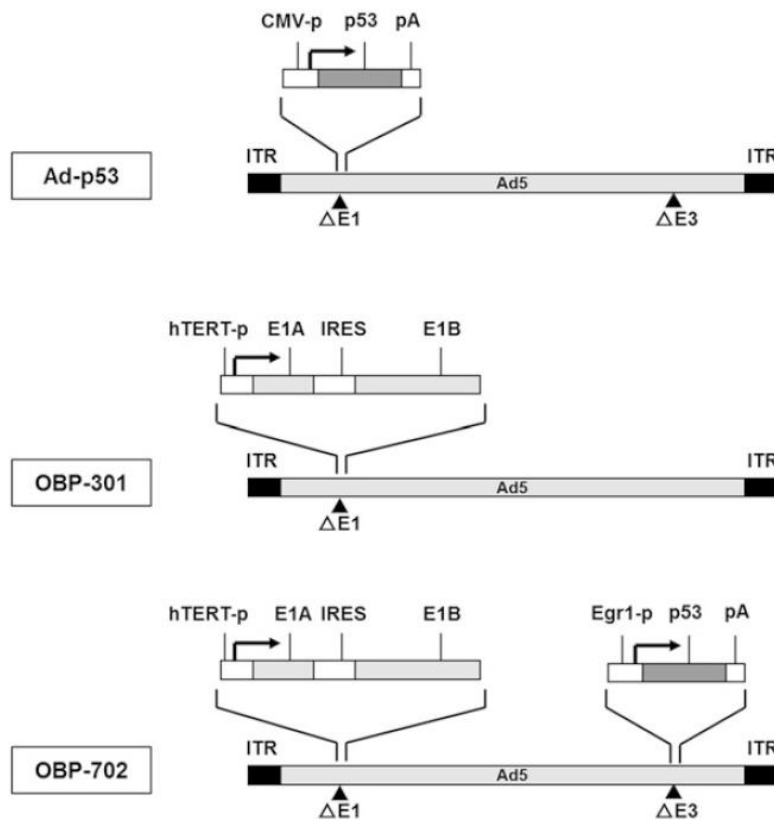
ترانسفیکاسیون با استفاده از روش لیپوزوم هنوز پایین است و برای القا مرگ سلولی به خصوص در بافت‌های تومور *in vivo* نامناسب است. بنابراین، بهبود سیستم‌های انتقال بر اساس لیپوزوم لازم است تا به صورت مؤثر مرگ سلولی با واسطه p53 را درون بافت‌های تومور القا کند.

ناقل آدنوویروس با نقص همانندسازی

در مقایسه با راندمان پایین ترانسفیکاسیون، یک ناقل آدنوویروس با نقص همانندسازی^۱ Ad-p53 نشان داده است که به صورت مؤثری بیان یک ژن p53 خارجی را القا نموده و اثرات ضد تومور را در مطالعات پیش‌کلینیکی به صورت *in vitro* و *in vivo* اعمال می‌کند (شکل ۲) (۸ و ۳۷). سیستم سرکوبگر تومور با واسطه Ad-p53 سه مسیر پیری، آپوپتوز و خودخواری را شامل می‌شود (۴۵). این مسیرهای مرگ سلولی با القا چند ژن هدف تحت کنترل p53 مانند: BAX، p21 یا DRAM تعیین می‌شوند (شکل ۲).

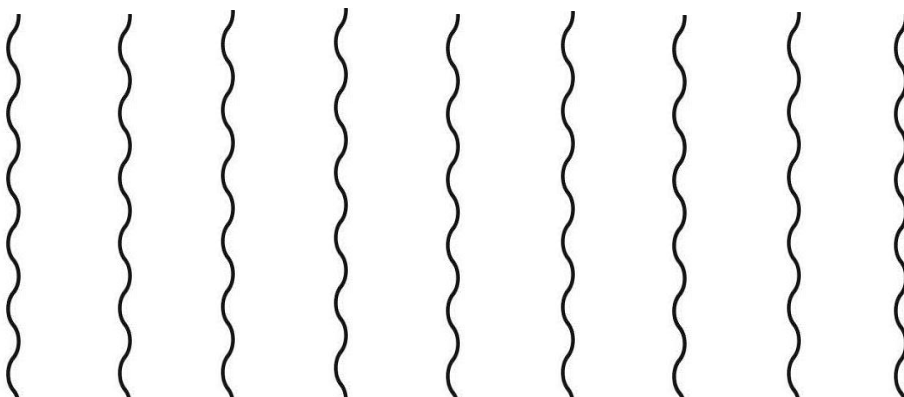
1. Replication-Deficient Adenovirus Ad-p53 Vector





شکل ۲- ساختارهای DNA ناقلین Ad-p53، OBP-301 و OBP-702

ناقل Ad-p53 یک آدنووایروس با نقص همانندسازی بیان کننده p53 است، یک کاست بیان ژن p53 که تحت تنظیم پروموتور سیتومگالوویروس (CMV-p) است درون ناحیه E1 وارد می‌شود، ناحیه E3 حذف شد. ناقل OBP-301 یک آدنووایروس انکولیتیک مستعد همانندسازی اختصاصی تلومراز است؛ عنصر پروموتور ژن hTERT (hTERT-p) بیان دو ژن آدنووایروس E1A و E1B را القا می‌کند که به ناحیه ورود ریبوزوم داخلی (IRES) متصل هستند. ناقل OBP-702 یک آدنووایروس همانندسازی





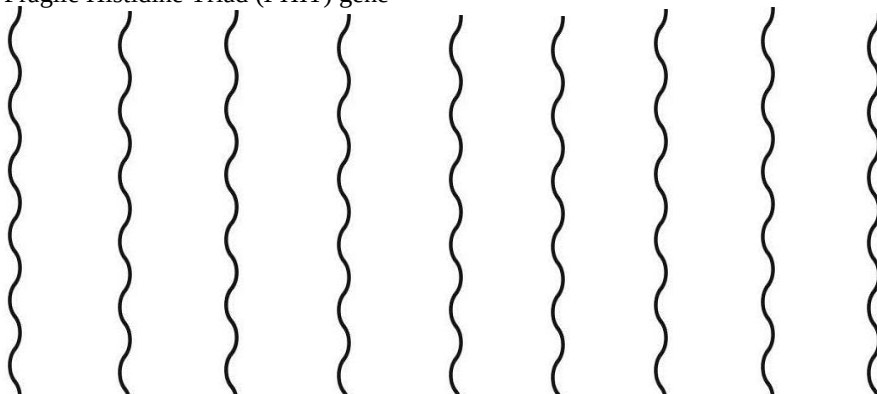
شرطی بیان کننده p53 است. در OBP-702، کاست ژنی p53 که با پروموتور Egr1 کنترل می‌شود (Egr1-p) درون ناحیه E3 از OBP-301 اضافه شده است.

برای القا بیشتر مسیرهای مرگ سلولی با واسطه Ad-p53، بعضی رویکردهای ترکیبی برای افزایش تکثیر ویروسی، بیان p53 و مرگ سلولی با واسطه p53 در سلول‌های تومور آلوده شده با p53 وجود دارد (شکل ۳). اولین رویکرد استفاده از آدنوویروس بیان کننده انکولیتیک E1A^۱ در درمان ترکیبی است، زیرا Ad-p53 یک ناقل آدنوویروس با نقص همانندسازی حذف شده E1A است (۳۸). به عنوان مثال، ما قبلاً یک آدنوویروس انکولیتیک مستعد همانندسازی اختصاصی تلومراز OBP-301 (تلوملیسین)^۲ تولید کرده‌ایم که تجزیه سلول انتخابی تومور را در حالت وابسته به تلومراز القا می‌کند (شکل ۲) (۱۲، ۱۸، ۲۲). OBP-301 بیان p53 القا شده توسط Ad-p53 را در درمان ترکیبی افزایش داد، که منجر به اثر ضد تومور قوی‌تری شد و مرگ سلولی آپوپتوزی را در مقایسه با تک‌درمانی با Ad-p53 افزایش داد (۱۶، ۴۱). تجمع E1A آدنوویروسی القا شده توسط OBP-301 برای همانندسازی Ad-p53 استفاده شد که بیان p53 با واسطه Ad-p53 را افزایش داد. رویکرد دوم سرکوبی بیان MDM2 است زیرا فعال‌سازی MDM2 تحت کنترل p53 از عمل p53 از طریق تجزیه p53 با یوبی کوئیتین ممانعت می‌کند. درمان با ترکیب مولکول کوچک، نوتلین-۳، یا آلودگی با ژن سرکوبگر تومور هیستیدین شکننده (FHIT)^۳، بیان p53 با واسطه Ad-p53 و مرگ سلولی آپوپتوزی را با سرکوبی MDM2 در سلول‌های سرطان انسان افزایش داد (۳۰). به علاوه، بیان بیش از حد ژن ARF با آلودگی با

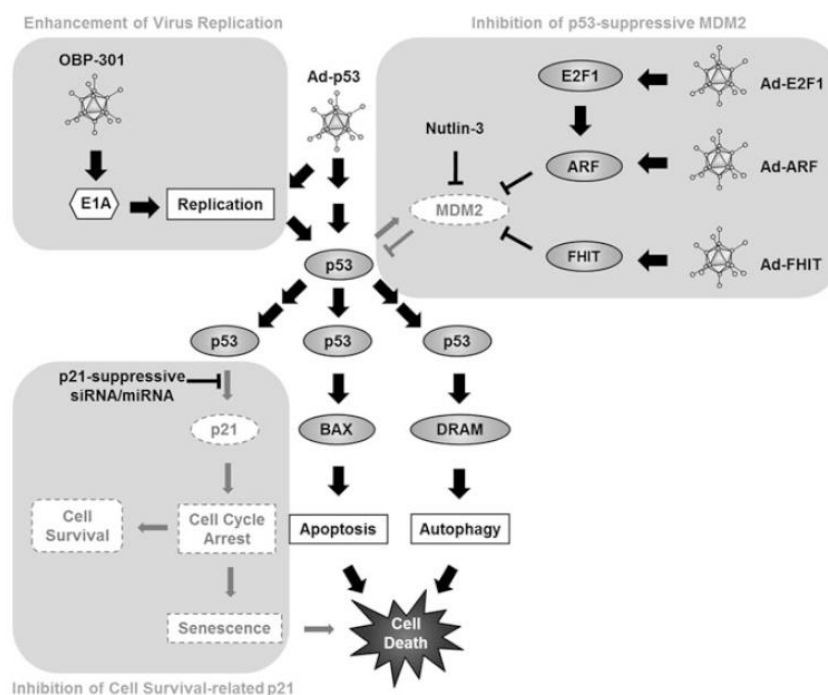
1. E1A-Expressing Oncolytic Adenovirus

2. Telomelysin

3. Fragile Histidine Triad (FHIT) gene

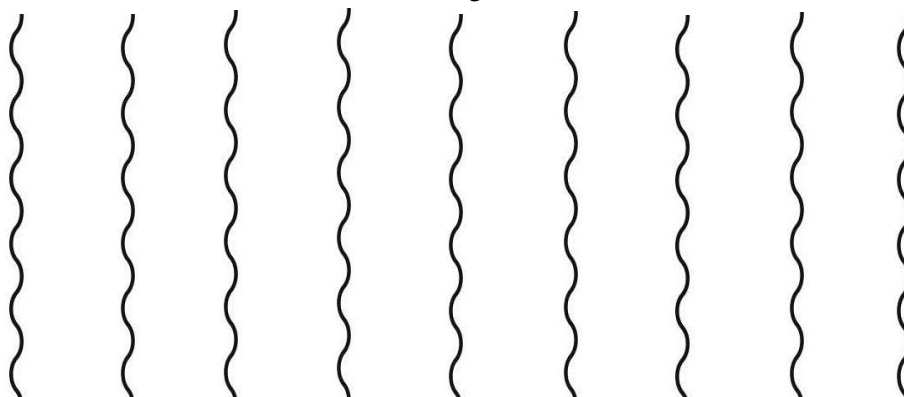


Ad-ARF یا Ad-E2F1 بیان p53 و اثر ضد تومور که توسط Ad-p53 از طریق سرکوبی MDM2 با واسطه ARF القا شد را افزایش داد (۲۰). رویکرد سوم سرکوبی بیان p21 است زیرا فعال سازی p21 تحت کنترل p53، توقف چرخه سلولی و در ادامه بقا سلول را القا می کند. سرکوب بیان p21 با حذف ژنتیکی یا یک siRNA خارجی که p21 را مورد هدف قرار می دهد، آپوپتوز القا شده توسط Ad-p53 را افزایش می دهد (۱۷). به علاوه، miRNA هدف گیری p21، p21، miR-93 و miR-106b، می توانند آپوپتوز با واسطه Ad-p53 و خودخواری را افزایش دهند زیرا p21 به عنوان سرکوبگر آپوپتوز و خودخواری عمل می کند. بنابراین، این سه رویکرد برای افزایش مسیر مرگ سلولی با واسطه Ad-p53 برای بهبود پتانسیل درمانی روش درمان جایگزینی ژن p53 بر اساس Ad-p53 مفید هستند (۱۵).



شکل ۳- طرحی از القا با واسطه Ad-p53 از مسیرهای مرگ سلولی و افزایش درمان جایگزینی p53 بر

اساس Ad-p53



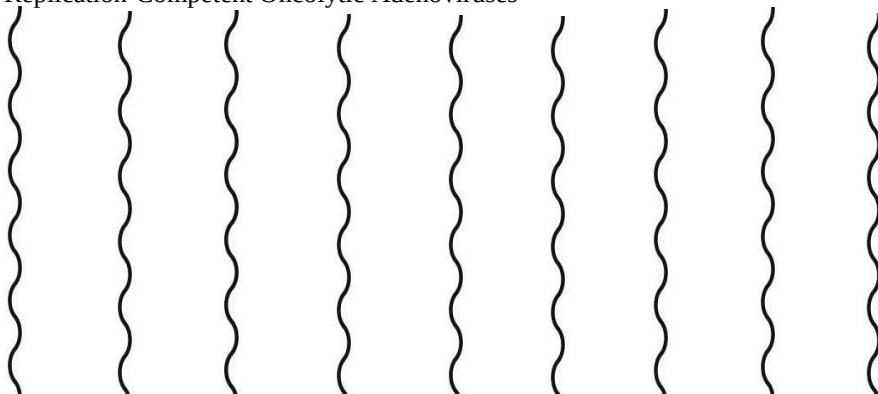


ناقل Ad-p53 به ترتیب آپوپتوز و خودخواری با واسطه BAX و DRAM را القا می‌کند، که در نتیجه مرگ سلولی رخ می‌دهد. توقف چرخه و بقا سلولی وابسته به p21 وقتی اتفاق می‌افتد که با OBP-301 مستعد همانندسازی بیان کننده E1A، چند ناقل آدنووایروس با نقص همانندسازی (Ad-FHIT، Ad-ARF، Ad-E2F1)، نوکلین-3، یا siRNA/miRNA سرکوبگر p21، ترکیب می‌شود.

ناقل آدنووایروس مستعد همانندسازی

اگرچه یک ناقل Ad-p53 با نقص همانندسازی نشان داده است که ایمن، مناسب و متحمل در بیماران دارای انواع سرطان‌ها در بسیاری از مطالعات کلینیکی است، ولی ممکن است به سختی، بیان خارجی بالای p53 را در همه سلول‌های تومور در اثر درمان با Ad-p53، القا کند زیرا یک دارای نقص همانندسازی است. بنابراین، نرخ انتقال پایین انتقال ژن p53 با این ناقل Ad-p53 با نقص همانندسازی مشکل اصلی بهبود خروجی کلینیکی در بیماران با سرطان‌های پیشرفته است (۱۲). برای بهبود راندمان انتقال درمان جایگزینی ژن p53، آدنووایروس‌های انکولیتیک مستعد همانندسازی^۱ اختصاصی تومور به عنوان ناقلین جدید برای درمان ژن ضد سرطان ایجاد شده‌اند. برای مثال، پروموتورهای ژن‌های مرتبط با سرطان برای تنظیم همانندسازی ویروس در حالت وابسته به تومور استفاده شدند. ما قبلاً یک آدنووایروس انکولیتیک مستعد همانندسازی اختصاصی تلومراز OBP-301 ایجاد کردیم، که پروموتور نسخه‌برداری تلومراز انسانی (hTERT) و بیان دو ژن آدنووایروس، E1A و E1B، را ایجاد نموده است که به ناحیه ورود ریبوزوم داخلی متصل هستند (شکل ۲).

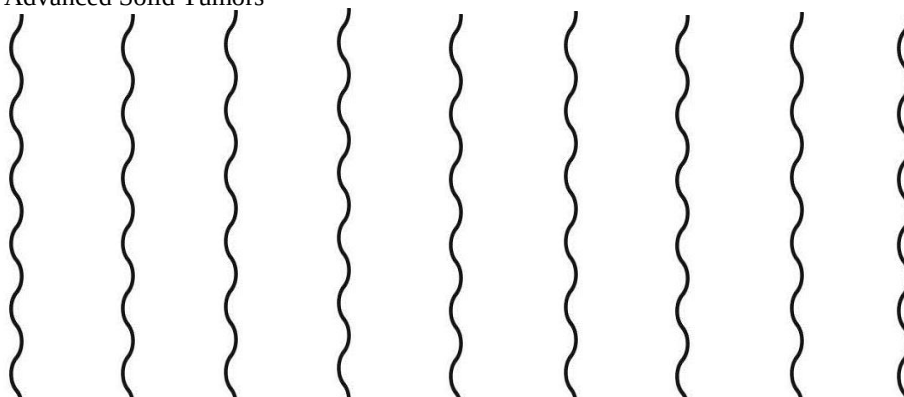
1. Replication-Competent Oncolytic Adenoviruses



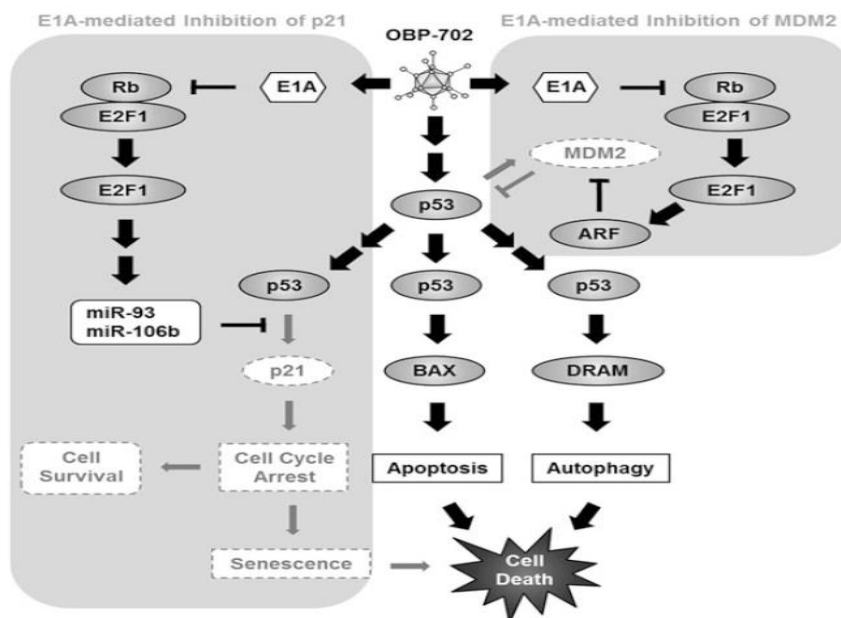
OBP-301 می‌تواند تجزیه سلول اختصاصی تومور را در حالت وابسته به تلومراز القا کند. مطالعه کلینیکی فاز I از OBP-301 توسط بیماران با تومور جامد پیشرفته^۱ در آمریکا به خوبی تحمل شدند (۴۲). وقتی Ad-p53 با OBP-301 ترکیب شد، بیان p53 و اثر ضد تومور القا شده توسط Ad-p53 افزایش یافت (شکل ۳). بر اساس این شواهد، ما یک رقم OBP-301 را تولید کردیم (OBP-702) که ژن p53 نوع وحشی را تحت کنترل پروموتور Egr1 بیان می‌کند (شکل ۲) (۲۹). OBP-702 زیستایی هر دو نوع سلول، حساس به OBP-301 و مقاوم به OBP-301 را بهتر از Ad-p53 یا OBP-301 در انواع سلول‌های تومور بدخیم اپی‌تلیال و مزونشی می‌سرکوب کرد (۱۷). Ad-p53 و OBP-301 اصولاً به ترتیب مرگ سلولی آپوپتوزی و خودخواری را القا می‌کنند، در حالی که OBP-702 باعث هر دو مرگ سلولی آپوپتوزی و خودخواری از طریق بیان بیش از حد p53 خارجی در سلول‌های تومور می‌شود (۵۰). این نتایج پیشنهاد می‌کند که OBP-702 هر دو حالت مرگ سلولی آپوپتوزی و خودخواری را با بیان بیش از حد p53 القا می‌کند.

علیرغم برتری مکانیزم مولکولی OBP-702 نسبت به Ad-p53 در القا مرگ سلولی، اخیراً دریافتیم که افزایش مسیر پیام‌رسانی مرگ سلولی وابسته به E1A، با واسطه p53 در اثرات ضد توموری القا شده OBP-702 دخیل بوده است (شکل ۴). وقتی سلول‌های تومور با دز مشابهی از Ad-p53 یا OBP-702 آلوده شدند، OBP-702 سطح بالاتری از بیان p53 را نسبت به Ad-p53 داشت (۳۳). بیان بیشتر p53 به دلیل همانندسازی ویروسی OBP-702 است زیرا Ad-p53 دارای یک نوع نقص همانندسازی ویروسی است. ولی بر خلاف بیان بیشتر p53، سطوح بیان p21 و MDM2 در سلول‌های تومور آلوده به OBP-702 نسبت به سلول‌های تومور آلوده به Ad-p53 کمتر بود (۶). این تفاوت بین سطوح بیان p53 و آنهایی که تحت کنترل

1. Advanced Solid Tumors



p53 هستند، شامل p21 و MDM2 بودند که به دلیل تجمع E1A آدنوویروسی است. تجمع E1A افزایش بیان miR-93 و miR-106b القا شده توسط E2F1 را القا کرد، که بیان p21 را سرکوب کرد و منجر به افزایش آپوپتوز و خودخواری با واسطه p53 شد (۱۷). در مقابل، افزایش بیان E2F1 با واسطه E1A منجر به سرکوبی بیان MDM2 از طریق فعال‌سازی ARF شد. این شواهد پیشنهاد می‌کند که OBP-702 اثر ضد تومور را بهتر از Ad-p53 القا می‌کند، که از طریق افزایش وابسته به E1A مسیرهای پیام‌رسانی مرگ سلولی با واسطه p53 صورت می‌گیرد.



شکل ۴- طرح القا مسیرهای مرگ سلولی با واسطه OBP-702

ناقل OBP-702 آپوپتوز و خودخواری را به ترتیب با BAX و DRAM القا نمود که حاصل مرگ سلولی است، این اثرات به سرکوبی بیان p21 با واسطه E1A از طریق فعال‌سازی miR-93 و miR-106b القا شونده توسط E2F1 وابسته هستند. به علاوه، سرکوبی با واسطه E1A از MDM2،

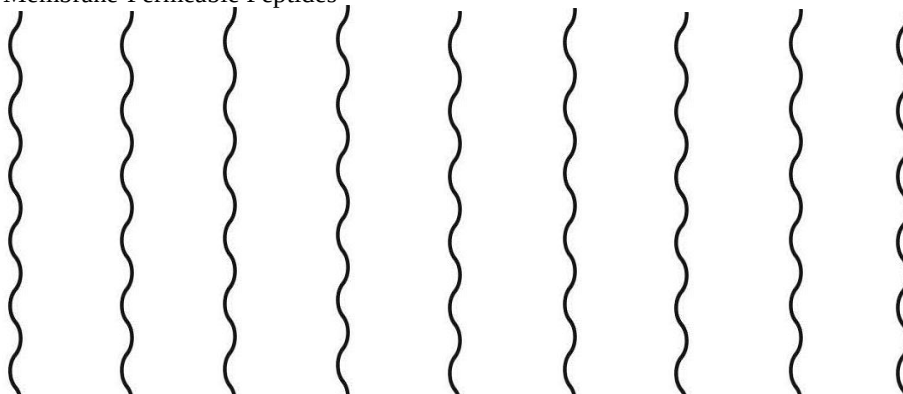
احتمالاً با فعال سازی ARF القا شده توسط E2F1، نیز مرگ سلولی را با واسطه p53 افزایش می دهد.

درمان انتقال پروتئین

روش درمان جایگزینی p53 با استفاده از ناقلین آدنوویروس می تواند بیان نابجای یک ژن p53 خارجی را در انواعی از سرطان های انسان قوی تر از سیستم انتقال بر اساس پلاسمید، ایجاد کند. از آنجا که آدنوویروس ها می توانند به سلول های سرطان انسان از طریق برهمکنش مستقیم با اجزای ویروسی و کوکساکسی^۱ و ویروس ها و گیرنده های آدنوویروس (CAR)^۲ وارد شوند، سلول های تومور بیان کننده CAR^۳ سلول های هدف اصلی برای درمان جایگزینی ژن p53 بر اساس آدنوویروس هستند. ولی، سلول های تومور فاقد CAR^۴ می توانند توسط درمان جایگزینی p53 بر اساس آدنوویروس حذف شوند (۲۴).

برای هدف گیری سلول های تومور فاقد CAR، درمان انتقال پروتئین با استفاده از پپتیدهای نفوذپذیر به غشا^۵ برای ورود پروتئین خارجی p53 به سلول های تومور، ممکن است مفید باشند. به عنوان مثال، ۱۱ پپتید پلی آرژینین که به پروتئین p53 متصل شدند، نشان داده اند که پروتئین p53 را به سلول ها وارد می کنند، که در ادامه فعالیت پروموتور ژن p21 را القا می کند که مشابه رخداد پروتئین p53 تغییر یافته ژنتیکی است که نسبت به یوبی کوئیناسیون با واسطه MDM-2 مقاوم هستند و منجر به اثر ضد تومور بهتری در مقایسه با پروتئین p53 نوع وحشی (۴۰) می شود. در مقابل، ورود پروتئین p53 نوع وحشی متصل به سه پپتید پلی آرژینین به سلول ها که با

1. Cocksackie
2. Adenovirus Receptors (CAR)
3. CAR-expressing Tumor Cells
4. CAR-negative Tumor Cells
5. Membrane-Permeable Peptides



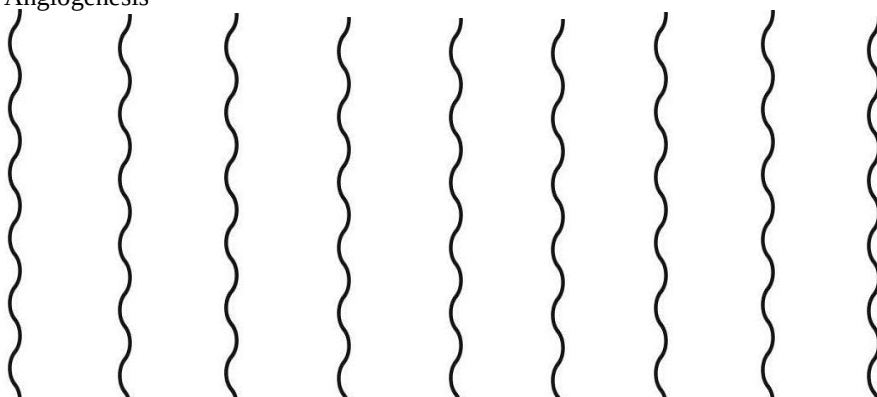


پایرن‌بوتیرات^۱ تیمار شده بودند برای القا فعال‌سازی رونویسی ژن‌های هدف تحت کنترل p53 مفید بودند (۲۴). به علاوه، با استفاده از این سیستم انتقال پروتئین، ناحیه انتهایی کربوکسی پروتئین p53 نشان داده بود که به صورت مناسبی آپوپتوز و خودخواری را در سلول‌های سرطان انسان القا می‌کند (۲۳ و ۴۳). این شواهد جمع‌آوری شده پیشنهاد می‌کند که درمان انتقال پروتئین که از پپتیدهای پلی‌آرژنین استفاده می‌کنند یک درمان امیدبخش جایگزینی p53 به خصوص برای سلول‌های تومور فاقد CAR است.

اثرات انحرافی درمان جایگزینی p53

روش درمان جایگزینی p53 نه تنها باعث مرگ سلولی در سلول‌های توموری که p53 به آن‌ها وارد شده است، بلکه در سلول‌های تومور اطراف نیز از طریق فعال‌سازی اثرات انحرافی ایجاد می‌شود (۲). اثرات انحرافی^۲ یک پدیده زیستی است که سلول‌های تومور تیمار نشده اثرات ضدتومور را نشان می‌دهند که مشابه سلول‌های تومور تیمار شده است. در روش‌های مرسوم درمان ضد تومور، یک اثر انحرافی القا شده توسط پرتوتابی با فعال‌سازی سیستم ایمنی، رادیکال‌های آزاد و پاسخ التهابی ایجاد می‌شد (۲۶). در روش درمان جایگزینی p53، درمان Ad-p53 نشان داده است که یک اثر انحرافی را روی سلول‌های تومور مجاور از طریق مکانیزم چندگانه در مطالعات آزمایشات پیش‌کلینیکی القا می‌کند (شکل ۵). برای مثال، آلودگی Ad-p53 بیان عوامل آنژیوژنز^۳ (رگ‌زایی) را کاهش می‌دهد که این عامل سبب افزایش رشد اندوتلیال رگی و بیان عوامل ضد آنژیوژنز می‌گردد و نهایتاً منجر به سرکوب آنژیوژنز، درون بافت‌های تومور خواهد شد (۴۶ و ۵۱). در مقابل، فعال‌سازی پاسخ ایمنی نیز

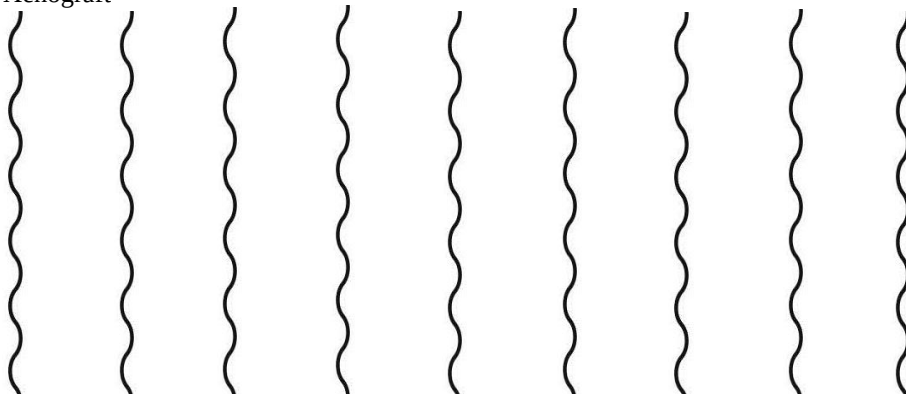
-
1. Pyrenebutyrate
 2. Bystander Effect
 3. Angiogenesis

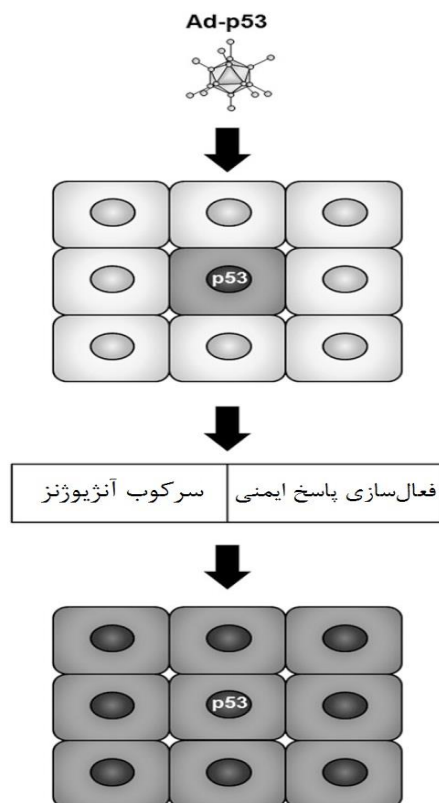


در اثرات انحرافی القا شده توسط Ad-p53 دخیل می‌باشد. آلودگی Ad-p53 بیان بیش از حد لیگاند CD95 را القا نموده، که هم باعث آپوپتوز از طریق سیستم گیرنده/لیگاند Fas در سلول‌های تومور آلوده گردید و هم تراوش نوتروفیل‌ها درون بافت‌های تومور که حاوی سلول‌های تومور آلوده و غیرآلوده را سبب شد. وقتی سلول‌های دندرون مشتق شده از مغز استخوان (DCs)^۱ به عنوان سلول حامل برای انتقال Ad-p53 استفاده شد، تزریق برون توموری با Ad-p53 تلفیق شده با DCs باعث اثر ضد تومور در هر دو نوع بافت تومور تزریق شده DC و تزریق نشده در مدل‌های تومور زئوگرافت^۲ (پیوند) زیرپوستی شد (۳۹). سلول‌های کشنده طبیعی نشان داده‌اند که واسطه ایمنولوژیک اثرات انحرافی القا شده توسط Ad-p53 هستند (۲۶). این شواهد پیشنهاد می‌کنند که درمان جایگزینی p53 یک رویکرد ضد تومور برای ایجاد افزایش مرگ سلولی از طریق تغییر با واسطه اثرات انحرافی محیط تومور است.

1. Bone Marrow-Derived Dendritic Cells (DCs)

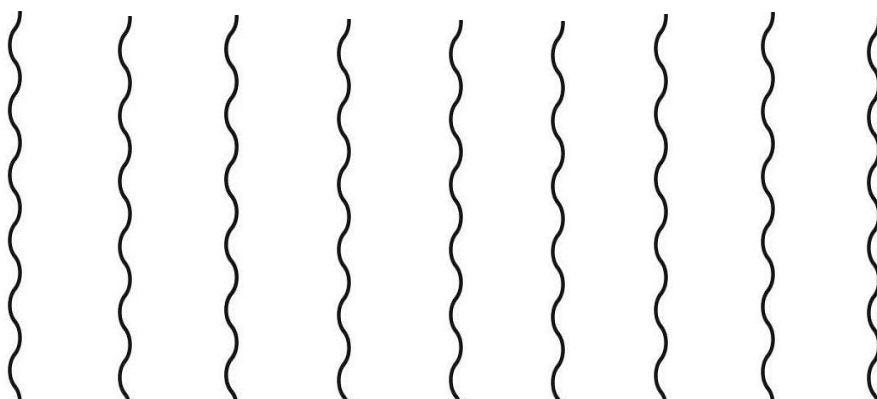
2. Xenograft





شکل ۵- طرحی شماتیک القا اثرات انحرافی درون بافت تومور توسط Ad-p53

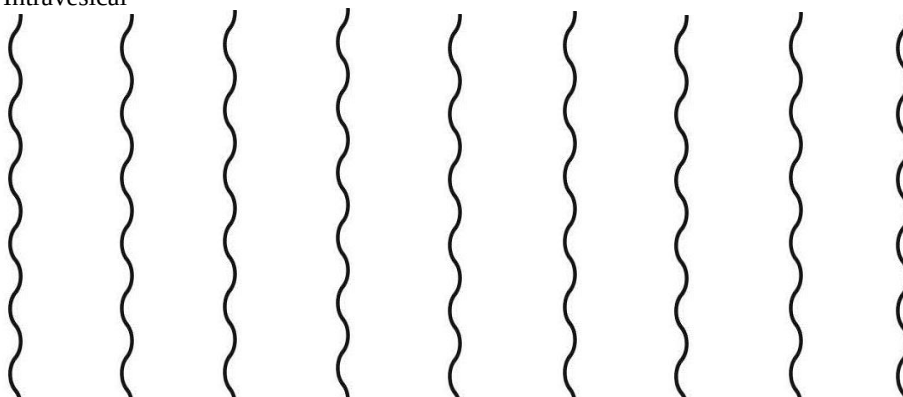
زمانیکه سلول‌های تومور با ناقل Ad-p53 آلوده می‌شوند، بیان نابجای p53 مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده را در سلول‌های تومور آلوده به Ad-p53 القا می‌کند. همچنین، سلول‌های تومور آلوده نشده اطراف هم با القا اثرات انحرافی حذف می‌شوند، که شامل سرکوب آنژیوژنز و فعال‌سازی پاسخ ایمنی در ریزمحیط تومور می‌شود.



روش درمان جایگزینی p53 به عنوان رویکرد امیدبخش ضد تومور برای القا مسیرهای پیام رسان مرگ سلولی با واسطه p53 در سلول‌های تومور ظهور یافته است. اگرچه، یک سیستم انتقال بر اساس لیپوزوم روش مفیدی برای آزمایشات درون شیشه‌ای است ولی راندمان انتقال هنوز کمتر از یک سیستم انتقال بر اساس ویروس است. بسیاری از مطالعات کلینیکی که از ناقلین Ad-p53 با نقص همانندسازی استفاده می‌کنند، بیان کرده‌اند که اداره ناقل Ad-p53 با یکی از چند رویکرد، شامل تزریق درون توموری، درون صفاقی^۱ و درون مثانه‌ای^۲ یک رویکرد ضد تومور ایمن، مناسب و مؤثر برای بیماران با انواعی از سرطان است (۲۰۱۳). اگرچه یک ناقل Ad-p53 باعث اثرات انحرافی درون بافت‌های تومور می‌شود، ولی فعال‌سازی p53 با واسطه Ad-p53 ممکن است برای القا مرگ سلولی در کل بافت تومور مناسب نباشد زیرا این ویروس یک ویروس با نقص همانندسازی است. برای بهبود راندمان کم انتقال درمان جایگزینی p53 بر اساس آدنوویروس، یک آدنوویروس انکولیتیک مستعد همانندسازی که p53 را بیان می‌کرد با نام OBP-702 اخیراً ایجاد شده است. در مقابل، یک درمان انتقال پروتئین که از پپتیدهای پلی‌آرژنین نفوذپذیر به غشا استفاده می‌کند ممکن است رویکرد مفیدی برای ورود p53 به سلول‌های تومور مقاوم به

1. Intraperitoneal

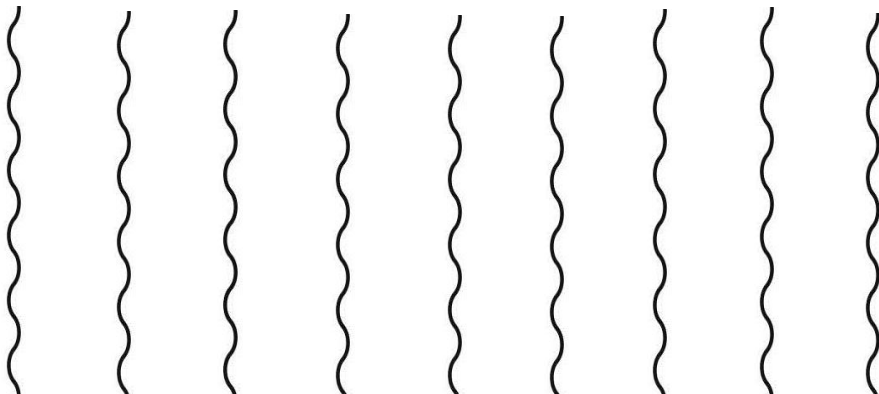
2. Intravesical





جایگزینی فاکتور نسخه‌برداری p53 برای درمان سرطان

انتقال ویروس باشد. بنابراین، با توجه به مکانیزم مولکولی تحت مسیرهای پیام رسان مرگ سلولی با واسطه p53 که با رویکردهای انتقال p53 القا می‌شوند، امکان ایجاد درمان جایگزینی p53 ایمن‌تر و مؤثرتر وجود دارد.



1. Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M. (1993). mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* 12(2): 461-468.
2. Bouvet M, Ellis LM, Nishizaki M, Fujiwara T, Liu W, Bucana CD, Fang B, Lee JJ, Roth JA. (1998). Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Res.* 58 (11): 2288-2292.
3. Bykov VJ, Wiman KG. (2014). Mutant p53 reactivation by small molecules makes its way to the clinic. *FEBS Lett.* 588(16): 2622-2627.
4. Bykov VJ, Issaeva N, Shilov A, Hultcrantz M, Pugacheva E, Chumakov P, Bergman J, Wiman KG, Selivanova G. (2002). Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat Med.* 8(3): 282-288.
5. Carroll JL, Nielsen LL, Pruett SB, Mathis JM. (2001). The role of natural killer cells in adenovirus-mediated p53 gene therapy. *Mol Cancer Ther.* 1(1):49-60
6. Crichton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T, Ryan KM. (2006). DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell.* 126(1): 121-134.
7. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 75(4): 817-825.
8. Fang B, Roth JA. (2003). Tumor-suppressing gene therapy. *Cancer Biol Ther.* 2(4 Suppl 1): S115-S121.
9. Feng B, Tomizawa K, Michiue H, Miyatake S, Han XJ, Fujimura A, Seno M, Kirihaata M, Matsui H. (2009). Delivery of sodium borocaptate to glioma cells using immunoliposome



conjugated with anti-EGFR antibodies by ZZ-His. *Biomaterials*. 30(9): 1746-1755.

10. Feng B, Tomizawa K, Michiue H, Han XJ, Miyatake S, Matsui H. (2010). Development of a bifunctional immunoliposome system for combined drug delivery and imaging in vivo. *Biomaterials*. 31(14): 4139-4145.

11. Frank DK, Frederick MJ, Liu TJ, Clayman GL. (1998). Bystander effect in the adenovirus-mediated wild-type p53 gene therapy model of human squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*. 4(10): 2521-2528.

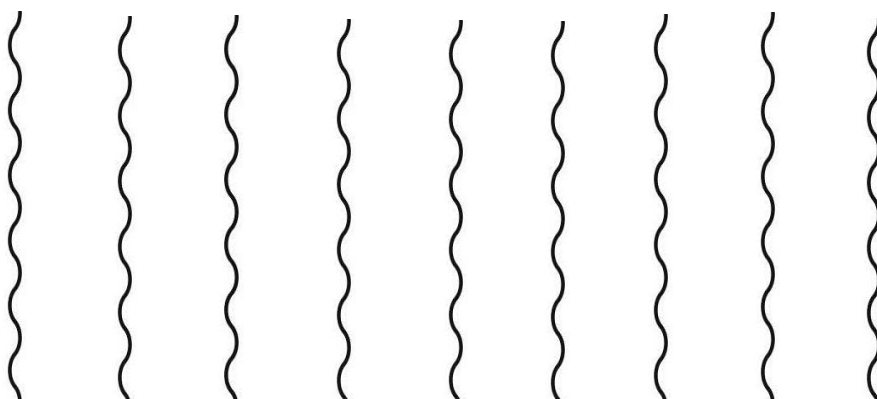
12. Fujiwara T, Urata Y, Tanaka N. (2007). Telomerase-specific oncolytic virotherapy for human cancer with the hTERT promoter. *Curr Cancer Drug Targets*. 7(2): 191-201.

13. Fujiwara K, Daido S, Yamamoto A, Kobayashi R, Yokoyama T, Aoki H, Iwado E, Shinojima N, Kondo Y, Kondo S. (2008). Pivotal role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in apoptosis and autophagy. *J Biol Chem*. 283(1): 388-397.

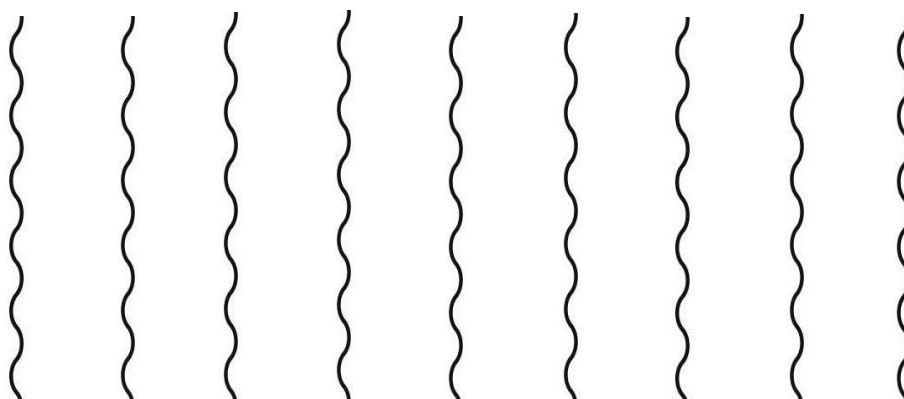
14. Fukazawa T, Fujiwara T, Morimoto Y, Shao J, Nishizaki M, Kadowaki Y, Hizuta A, Owen-Schaub LB, Roth JA, Tanaka N. (1999). Differential involvement of the CD95 (Fas/APO-1) receptor/ligand system on apoptosis induced by the wild-type p53 gene transfer in human cancer cells. *Oncogene*. 18(13): 2189-2199.

15. Gorospe M, Cirielli C, Wang X, Seth P, Capogrossi MC, Holbrook NJ. (1997). p21(Waf1/Cip1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene*. 14(8): 929-935.

16. Graat HC, Carette JE, Schagen FH, Vassilev LT, Gerritsen WR, Kaspers GJ, Wuisman PI, van Beusechem VW. (2007). Enhanced tumor cell kill by combined treatment with a small-molecule antagonist of mouse double minute 2 and adenoviruses encoding p53. *Mol Cancer Ther*. 6 (5): 1552-1561.



17. Hasei J, Sasaki T, Tazawa H, Osaki S, Yamakawa Y, Kunisada T, Yoshida A, Hashimoto Y, Onishi T, Uno F, Kagawa S, Urata Y, Ozaki T, Fujiwara T. (2013). Dual programmed cell death pathways induced by p53 transactivation overcome resistance to oncolytic adenovirus in human osteosarcoma cells. *Mol Cancer Ther.* 12(3): 314-325.
18. Hashimoto Y, Watanabe Y, Shirakiya Y, Uno F, Kagawa S, Kawamura H, Nagai K, Tanaka N, Kumon H, Urata Y, Fujiwara T. (2008). Establishment of biological and pharmacokinetic assays of telomerase-specific replication-selective adenovirus. *Cancer Sci.* 99(2): 385-390.
19. Hitsuda T, Michiue H, Kitamatsu M, Fujimura A, Wang F, Yamamoto T, Han XJ, Tazawa H, Uneda A, Ohmori I, Nishiki T, Tomizawa K, Matsui H. (2012). A protein transduction method using oligo-arginine (3R) for the delivery of transcription factors into cell nuclei. *Biomaterials.* 33(18): 4665-4672.
20. Idogawa M, Sasaki Y, Suzuki H, Mita H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. (2009). A single recombinant adenovirus expressing p53 and p21-targeting artificial microRNAs efficiently induces apoptosis in human cancer cells. *Clin Cancer Res.* 15(11): 3725-3732.
21. Itoshima T, Fujiwara T, Waku T, Shao J, Kataoka M, Yarbrough WG, Liu TJ, Roth JA, Tanaka N, Kodama M. (2000). Induction of apoptosis in human esophageal cancer cells by sequential transfer of the wild-type p53 and E2F-1 genes: involvement of p53 accumulation via ARF-mediated MDM2 down-regulation. *Clin Cancer Res.* 6(7): 2851-2859.
22. Kawashima T, Kagawa S, Kobayashi N, Shirakiya Y, Umeoka T, Teraishi F, Taki M, Kyo S, Tanaka N, Fujiwara T. (2004). Telomerase-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin Cancer Res.* 10(1 Pt 1): 285-292.
23. Li Y, Mao Y, Rosal RV, Dinnen RD, Williams AC, Brandt-Rauf PW, Fine RL. (2005). Selective induction of





apoptosis through the FADD/caspase-8 pathway by a p53 c-terminal peptide in human pre-malignant and malignant cells. *Int J Cancer*. 115(1): 55-64.

24. Michiue H, Tomizawa K, Matsushita M, Tamiya T, Lu YF, Ichikawa T, Date I, Matsui H. (2005). Ubiquitination-resistant p53 protein transduction therapy facilitates anti-cancer effect on the growth of human malignant glioma cells. *FEBS Lett*. 579(18): 3965-3969.

25. Miyashita T, Reed JC. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*. 80(2): 293-299.

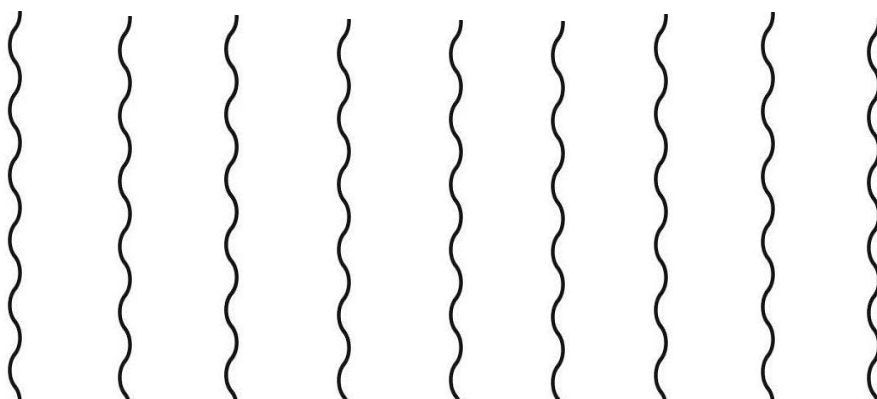
26. Murakami T, Tokunaga N, Waku T, Gomi S, Kagawa S, Tanaka N, Fujiwara T. (2004). Antitumor effect of intratumoral administration of bone marrow-derived dendritic cells transduced with wild-type p53 gene. *Clin Cancer Res*. 10(11): 3871-3880.

27. Najafi M, Fardid R, Hadadi G, Fardid M. (2014). The mechanisms of radiation-induced bystander effect. *J Biomed Phys Eng*. 4(4): 163-172.

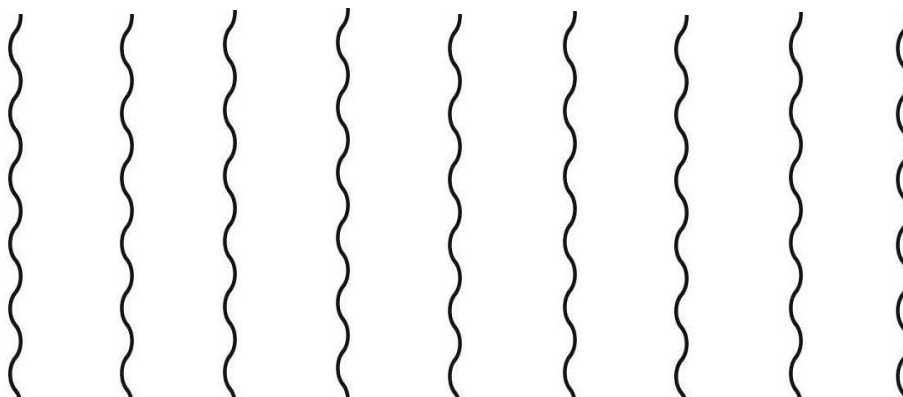
28. Nakase M, Inui M, Okumura K, Kamei T, Nakamura S, Tagawa T. (2005). p53 gene therapy of human osteosarcoma using a transferrin-modified cationic liposome. *Mol Cancer Ther*. 4 (4): 625-631.

29. Nemunaitis J, Tong AW, Nemunaitis M, Senzer N, Phadke AP, Bedell C, Adams N, Zhang YA, Maples PB, Chen S, Pappen B, Burke J, Ichimaru D, Urata Y, Fujiwara T. (2010). A phase I study of telomerase-specific replication competent oncolytic adenovirus (telomelysin) for various solid tumors. *Mol Ther*. 18(2): 429-434.

30. Nishizaki M, Fujiwara T, Tanida T, Hizuta A, Nishimori H, Tokino T, Nakamura Y, Bouvet M, Roth JA, Tanaka N. (1999). Recombinant adenovirus expressing wild-type p53 is antiangiogenic: a proposed mechanism for bystander effect. *Clin Cancer Res*. 5(5): 1015-1023.

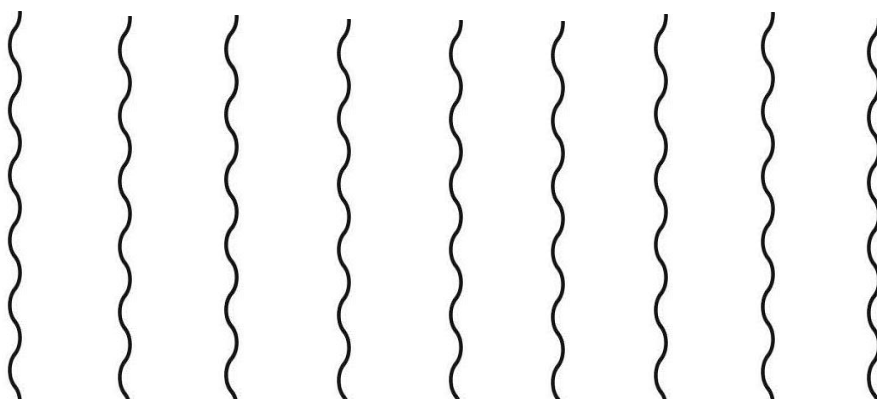


31. Nishizaki M, Meyn RE, Levy LB, Atkinson EN, White RA, Roth JA, Ji L. (2001). Synergistic inhibition of human lung cancer cell growth by adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in combination with docetaxel and radiation therapeutics in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 7(9):2887-2897.
32. Ognjanovic S, Olivier M, Bergemann TL, Hainaut P. (2012). Sarcomas in TP53 germline mutation carriers: a review of the IARC TP53 database. *Cancer.* 118(5): 1387-1396.
33. Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. (2002). The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat.* 19(6): 607-614.
34. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2(1): a001008.
35. Ramesh R, Saeki T, Templeton NS, Ji L, Stephens LC, Ito I, Wilson DR, Wu Z, Branch CD, Minna JD, Roth JA. (2001). Successful treatment of primary and disseminated human lung cancers by systemic delivery of tumor suppressor genes using an improved liposome vector. *Mol Ther.* 3(3): 337-350.
36. Roth JA, Cristiano RJ. (1997). Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J Natl Cancer Inst.* 89(1): 21-39.
37. Roth JA, Swisher SG, Meyn RE. (1999). p53 tumor suppressor gene therapy for cancer. *Oncology.* 13(10 Suppl 5): 148-154.
38. Sakai R, Kagawa S, Yamasaki Y, Kojima T, Uno F, Hashimoto Y, Watanabe Y, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T. (2010). Preclinical evaluation of differentially targeting dual virotherapy for human solid cancer. *Mol Cancer Ther.* 9(6): 1884-1893.
39. Selivanova G. (2014). Wild type p53 reactivation: from lab bench to clinic. *FEBS Lett.* 588 (16): 2628-2638.





40. Takenobu T, Tomizawa K, Matsushita M, Li ST, Moriwaki A, Lu YF, Matsui H. (2002). Development of p53 protein transduction therapy using membrane-permeable peptides and the application to oral cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 1(12): 1043-1049.
41. Tango Y, Fujiwara T, Itoshima T, Takata Y, Katsuda K, Uno F, Ohtani S, Tani T, Roth JA, Tanaka N. (2002). Adenovirus-mediated p14ARF gene transfer cooperates with Ad5CMV-p53 to induce apoptosis in human cancer cells. *Hum Gene Ther.* 13(11): 1373-1382.
42. Tazawa H, Kagawa S, Fujiwara T. (2013). Advances in adenovirus-mediated p53 cancer gene therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 13(11): 1569-1583.
43. Ueda Y, Wei FY, Hide T, Michiue H, Takayama K, Kaitsuka T, Nakamura H, Makino K, Kuratsu J, Futaki S, Tomizawa K. (2012). Induction of autophagic cell death of glioma-initiating cells by cell-penetrating D-isomer peptides consisting of Pas and the p53 C-terminus. *Biomaterials.* 33(35): 9061-9069.
44. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA. (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science.* 303(5659): 844-848.
45. Vousden KH, Prives C. (2009). Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell.* 137 (3): 413-431.
46. Waku T, Fujiwara T, Shao J, Itoshima T, Murakami T, Kataoka M, Gomi S, Roth JA, Tanaka N. (2000). Contribution of CD95 ligand-induced neutrophil infiltration to the bystander effect in p53 gene therapy for human cancer. *J Immunol.* 165(10): 5884-5890.
47. Xu L, Pirollo KF, Chang EH. (1997). Transferrin-liposome-mediated p53 sensitization of squamous cell



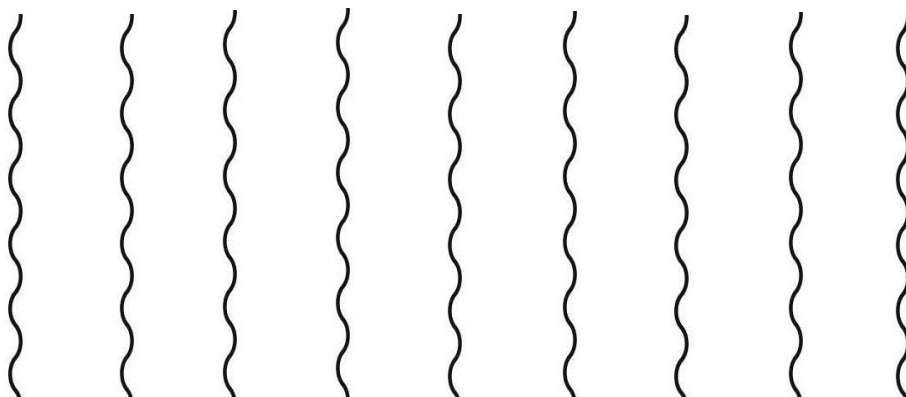
carcinoma of the head and neck to radiation in vitro. *Hum Gene Ther.* 8(4): 467-475.

48. Xu L, Tang WH, Huang CC, Alexander W, Xiang LM, Pirollo KF, Rait A, Chang EH. (2001). Systemic p53 gene therapy of cancer with immunolipoplexes targeted by anti-transferrin receptor scFv. *Mol Med.* 7(10): 723-734.

49. Xu L, Huang CC, Huang W, Tang WH, Rait A, Yin YZ, Cruz I, Xiang LM, Pirollo KF, Chang EH. (2002). Systemic tumor-targeted gene delivery by anti-transferrin receptor scFv-immunoliposomes. *Mol Cancer Ther.* 1(5): 337-346.

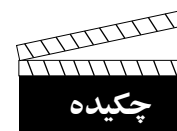
50. Yamasaki Y, Tazawa H, Hashimoto Y, Kojima T, Kuroda S, Yano S, Yoshida R, Uno F, Mizuguchi H, Ohtsuru A, Urata Y, Kagawa S, Fujiwara T. (2012). A novel apoptotic mechanism of genetically engineered adenovirus-mediated tumour-specific p53 overexpression through E1A-dependent p21 and MDM2 suppression. *Eur J Cancer.* 48(14): 2282-2291.

51. Zou Y, Zong G, Ling YH, Hao MM, Lozano G, Hong WK, Perez-Soler R. (1998). Effective treatment of early endobronchial cancer with regional administration of liposome-p53 complexes. *J Natl Cancer Inst.* 90(15): 1130-1137.

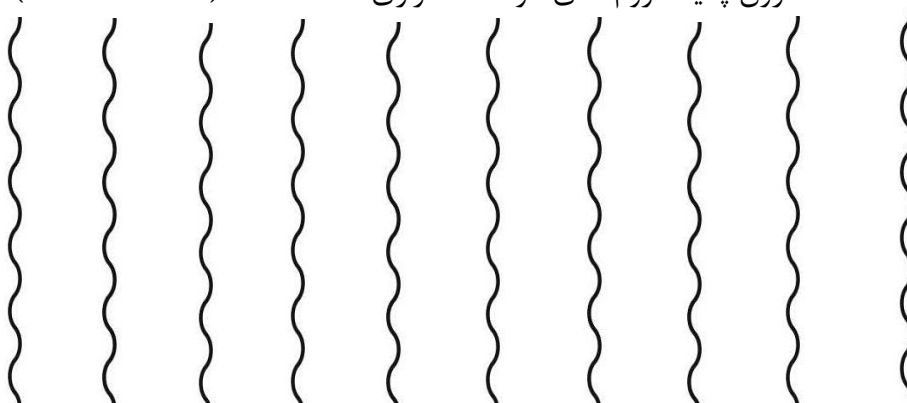


○ فصل دوم

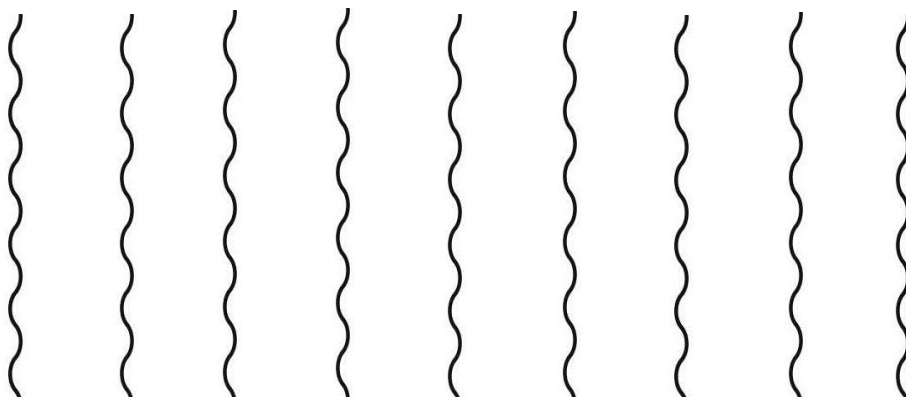
ناقلین رترو ویروسی در ژن درمانی سرطان

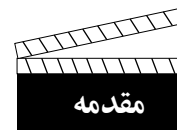


پیشرفت‌ها در فناوری‌های مولکولی، به کشف بسیاری از جهش‌های ژنتیکی و همچنین شفاف‌سازی الگوهای بیان تغییر یافته ژن و پروتئین، در بیماری‌های مختلف انسانی مانند سرطان، منجر شده است. این اطلاعات باعث ایجاد رویکردهای درمانی جدید، مانند استفاده از مولکول‌های کوچک برای هدف‌گیری مسیرهای سلولی اختصاصی و استفاده از ناقلین رترو ویروسی برای بازهدف‌گیری سلول‌های ایمنی جهت شناسایی و حذف سلول‌های تومور شده است. انتقال ژن با واسطه رترو ویروس باعث تولید مناسب سلول‌های T مهندسی شده با گیرنده‌های آنتی ژن شیمیری (CARs) شده است، که موفقیت مشخصی در درمان بدخیمی‌های هماتولوژیک داشته است. به عنوان یک نکته، این سلول‌های تغییر یافته را می‌توان با ژن‌های خودکشی سامان داد. ابزارهای ویرایش ژنومی، مانند نوکلئازهای مرتبط با خوشه‌ای منظم درون پالیندروم‌های کوتاه تکراری - CRISPR (CRISPR-Cas9)،



نوکلئازهای انگشت روی (ZFNs)، یا نوکلئازهای افکتور TAL (TALENs)، ممکن است با انتقال رتروویروس ترکیب شوند تا به صورت اختصاصی انکوژن‌ها را حذف کنند، مسیرهای پیام‌رسانی انکوژنی را غیرفعال کنند و یا ژن‌های نوع وحشی را انتقال دهند. به علاوه، سهولت رویکردهای انتقال ژن رتروویروسی برای محافظت از سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک (HSC) از اثرات سمی محدودکننده دزهای شیمی‌درمانی و پرتودرمانی بیان شده است. در حالی که بعضی از این رویکردها هنوز باید به کاربرد کلینیکی ترجمه شود، دلیل‌های بالقوه فراوانی برای درمان‌های جایگزینی سلولی بهبودیافته برای افزایش و یا حمایت از تغییرات درمانی جدید وجود دارد.

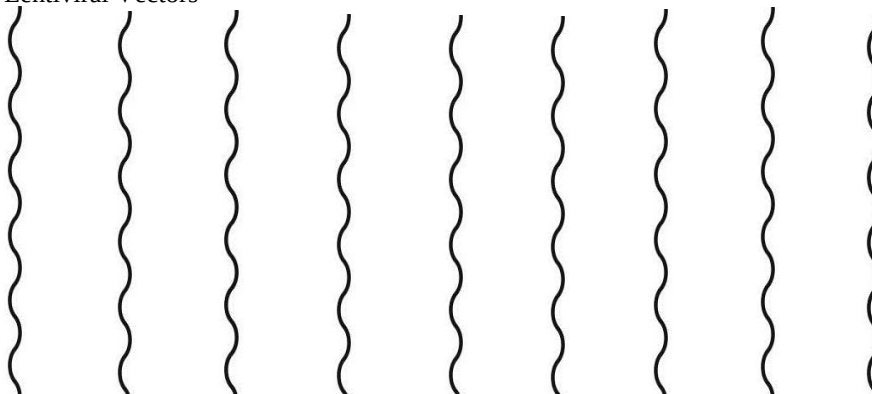




درمان سرطان یکی از بزرگترین چالش‌هایی است که در برابر رشته‌های پزشکی و بیوتکنولوژی قرار گرفته است. این وظیفه با ناهمگونی سرطان، با انواع مختلف تومور که ویژگی‌های ژنتیکی و فنوتیپی مختلف را نشان می‌دهند پیچیده شده است. برای مثال تخمین زده می‌شود که هر ژنوم میلوئید- لکومیا حاد (AML)^۱ حدود ۱۳ جهش کدکننده دارد در حالی که تومورهای جامد^۲ روده، سینه، مغز یا پانکراس حاوی ۳۳ تا ۶۶ جهش سوماتیکی^۳ هستند و تومورهای ملانوما (پوستی)^۴ و ریه حدود ۲۰۰ جهش دارند. مرز واقعی تومور بیماران اغلب از کلون‌های اصلی و فرعی مختلف تشکیل شده است که ممکن است با توجه به ظرفیت پیوند، تکثیر، تمایز، انتقال از مغز استخوان^۵ به خون محیطی و مقاومت نمو متفاوت باشند. این موارد شناسایی هدف (یا اهداف) درست برای کاربرد موفق درمان‌های مولکولی را ضروری می‌سازد.

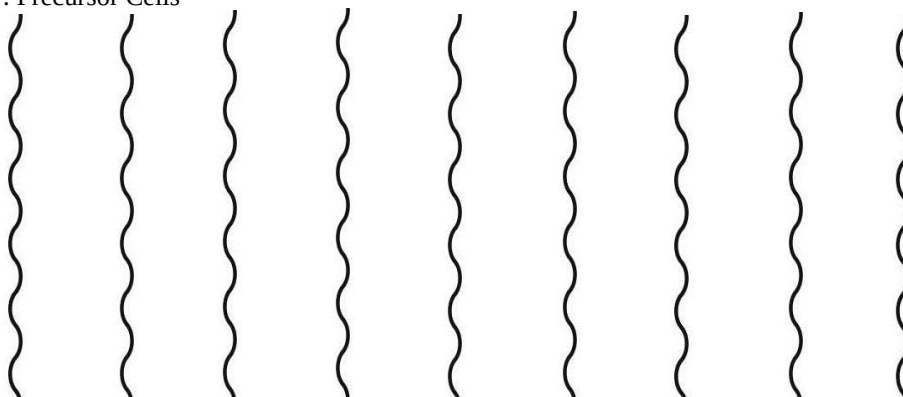
یک عامل کلیدی که اهمیت کلینیکی هر روش درمانی را معین می‌کند، انتقال موفق آن عامل درمانی است. در زمینه ژن درمانی^۶، انتقال مناسب فناوری ژن درمانی به جمعیت سلول هدف الزامی است. ناقلین رترو ویروسی^۷، شامل ناقلین لنتی ویروسی^۸، به خوبی برای

1. Acute Myeloid Leukemia (AML)
2. Solid Tumors
3. Somatic Mutations
4. Melanomas
5. Bone Marrow
6. Gene Therapy
7. Retroviral Vectors
8. Lentiviral Vectors



ظرفیت القا مناسب دامنه وسیعی از انواع سلول شناخته شده‌اند و به صورت موفقیت‌آمیزی در درمان‌های کلینیک استفاده شده‌اند. همانطور که مکانیزم عمل ناقلین رتروویروس مانند، ورود بار ویروسی به ژنوم سلول هدف است، درمان‌هایی که از ناقلین رتروویروسی استفاده می‌کنند خطر وقایع جهش‌زایی ورودی را دارند که ورود ویروسی ممکن است بیان انکوژن اولیه^۱ یا ژن‌های سرکوبگر تومور^۲ را از تنظیم خارج کند. در حالی که بعضی از مضرات جدی در زیرگروهی از شرکت‌کنندگان در آزمایشات اولیه ژن درمانی مشاهده شد، ولی این مضرات در آزمایشات اخیر که از ناقلین رتروویروس با ویژگی‌های ایمنی‌زیستی^۳ استفاده می‌کنند، مانند استفاده از ناقلین خودغیرفعال‌ساز (SIN)^۴ رخ نداده است که پروموتورها^۵ و افزایش‌دهنده‌های^۶ ویروسی از توالی‌های تکراری بلند انتهای (LTRs)^۷، حذف شده‌اند، و بیان تراژن^۸ با پروموتورهای فیزیولوژیکی ایجاد شده است. توجه کنید که پروفایل ایمنی هر روش ژن درمانی به جمعیت سلول هدف نیز بستگی دارد. برای مثال، سلول‌های اولیه^۹ مانند سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک (HSC)^{۱۰} و سلول‌های پیش‌ساز^{۱۱}، خطر بزرگتری از

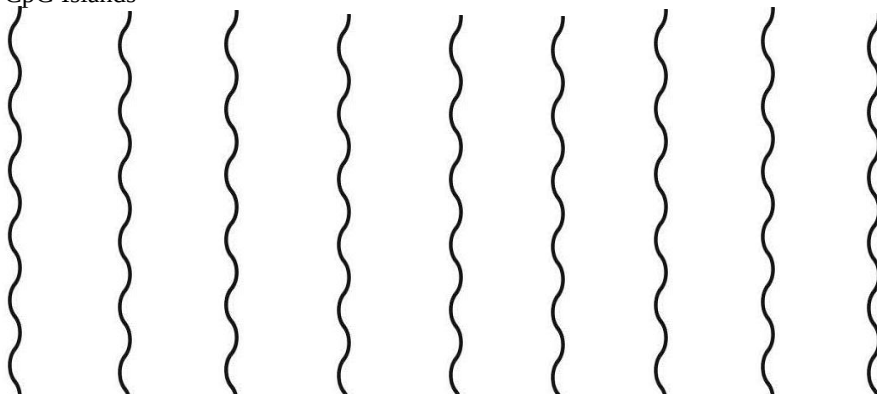
1. Proto-Oncogenes
2. Tumor Suppressor Genes
3. Biosafety
4. Self-Inactivating (SIN) Vectors
5. Promoters
6. Enhancers
7. Long-Terminal Repeats (LTRs)
8. Transgene
9. Primitive Cells
10. Hematopoietic Stem Cells (HSC)
11. Precursor Cells





ترانسفورماسیون^۱ نسبت به سلول‌های تمایز یافته مانند سلول‌های T نشان دادند. جالب اینکه، حتی استفاده از ناقلین گامارتروویروسی^۲ با LTRs دست نخورده، که به عنوان یکی از ترکیب‌های ناقل رتروویروسی خطر دارتر در نظر گرفته می‌شود، به دلیل جهش‌زایی ورودی^۳ برای انتقال سلول‌های T هنوز به نتیجه ترانسفورماسیون نرسیده است. انتقال و بیان موفق ژن‌های درمانی به چند متغیر بستگی دارد. به عنوان مثال، سیستم انتقال رتروویروسی به شدت بر ناحیه تلفیق ناقل اثر می‌گذارد. بر اساس تحلیل‌های ژنومی در سلول‌های HSC جوندگان و انسان در انتقال با ناقلین SIN آلفارتروویروس^۴ الگوی ناحیه ورود ژنومی، خنثی و سمیت ژنومی کمتری را در مقایسه با ناقلین گامارتروویروس یا لنتی‌ویروس نشان داد. ناقلین گامارتروویروس SIN شاخص‌های بزرگتری از تلفیق نزدیک ناحیه شروع رونویسی، جزایر CpG^۵ و ژن‌های مرتبط با سرطان نشان دادند، در حالی که انتقال لنتی‌ویروس SIN ترجیحاً درون ژن‌های رونویسی شده فعال تلفیق شدند. مهم اینکه، انتقال ژن رتروویروسی برای جمعیت‌های سلول خاصی با انتخاب پروتئین پوشش ویروسی سازگار با گیرنده‌هایی که توسط جمعیت سلول هدف بیان می‌شوند، بهینه می‌شوند. عوامل دیگر که در انتقال ژن درمانی بر سلول هدف اثر می‌گذارند شامل قدرت و موقعیت پروموتور، ویژگی‌های تراژن، شرایط کشت سلول و حالت تکثیری سلول‌های کشت شده، است.

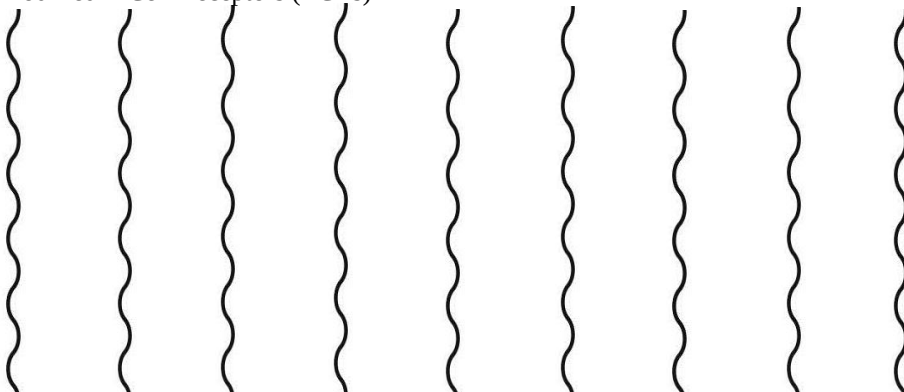
-
1. Transformation
 2. Gammaretroviral Vectors
 3. Insertional Mutagenesis
 4. Alpharetroviral SIN Vectors
 5. CpG Islands



در این فصل، ما در مورد گزینه‌های در دسترس بحث می‌کنیم که ناقلین رتروویروس را در رویکردهای درمان ژن درمانی ضدسرطان به کار می‌گیرند مانند: تغییر سلول‌های ایمنی با گیرنده‌های آنتی‌ژن شیمیری (CARs)^۱ یا گیرنده‌های سلول T تغییر یافته (TCRs)^۲ و رویکردهای محافظت سلول و جایگزینی (۱).

^۱- Chimeric Antigen Receptors (CARs)

^۲- Modified T Cell Receptors (TCRs)

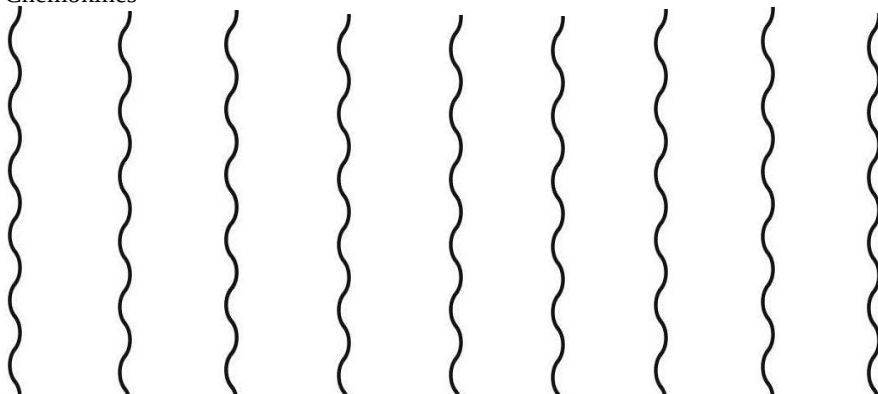




رویکردهای ضد سرطان بر اساس CARs و TCR

شناسایی آنتی‌ژن‌های مرتبط با تومور (TAA)^۱ همانند گسترش آنتی‌بادی‌های مونوکلونال^۲ به عنوان روش‌های درمان سرطان کمک کرده است. این رویکرد برای هدف‌گیری سلول‌های سرطان بعداً با سلول‌های ایمنی مهندسی شده (مانند سلول‌های T و سلول‌های NK) کشف شد تا گیرنده‌های آنتی‌ژن شیمیری (CARs) را بیان کنند، که شامل یک قطعه متغیر زنجیره تکی خارج سلولی (scFv)^۳ است که یک TAA اختصاصی را شناسایی می‌کند. scFv با دامین‌های پیام‌رسانی کاستیمولاتور^۴ درون سلولی (CD28، CD3f، 4-1BB، OX40، DAP1 و DAP12)، جفت می‌شود که عمل سمیت سلولی سلول ایمنی تغییر یافته را بعد از شناسایی آنتی‌ژن فعال می‌کند، که منجر به حذف اختصاصی سلول‌هایی می‌شود که TAA را بیان می‌کنند (مانند سلول سرطان). رویکرد دیگر برای ایجاد سلول‌های T اختصاصی تومور، استفاده از ناقلین رترو ویروس است که گیرنده‌های سلول T (TCRs) را انتقال دهند که مهندسی شده‌اند تا همبستگی پیوند بهبود یافته‌ای را نسبت به لیگاندی که به صورت اختصاصی روی جمعیت سلول سرطان هدف بیان می‌شود را نشان دهند. فعال‌سازی سلول T در پاسخ به تحریک آنتی‌ژن با مولکول‌های کاستیمولاتور، عوامل چسبندگی سلول و همبستگی گیرنده سلول T (TCR) انجام می‌شود. شناسایی آنتی‌ژن، توسط CARs یا TCRs و تجمع سلول T در بافت‌های اختصاصی، صورت می‌پذیرد. TCR ها را می‌توان مهندسی نمود تا سلول‌های T را به سمت بافت تومور از طریق شناسایی گیرنده کموکاین‌ها^۵ یا اجزای اختصاصی ریزمحیط تومور هدایت کنند. برای رویکردهای بر اساس CAR و TCR، آنتی‌ژن هدف‌گیری شده باید به

1. Tumor-Associated Antigens (TAA)
2. Monoclonal Antibodies
3. single-chain variable Fragment (scFv)
4. Costimulator
5. Chemokines

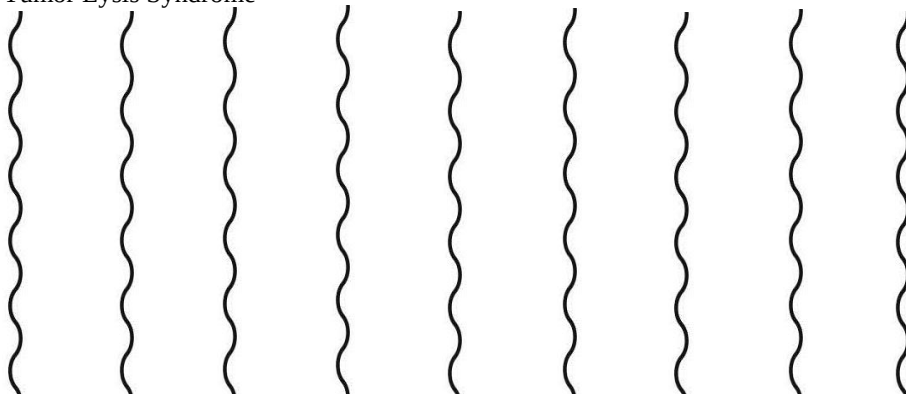


صورت ایده آل و اختصاصی توسط سلول تومور و نه در بافت سالم بیان شود، و آنتی ژن باید یک پاسخ ایمنوژنیک مناسب برای حذف تومور را القا کند.

سلول های T

طی مطالعاتی از ناقلین گامارتروویروس و لنتی ویروس استفاده شدند تا سلول های T تغییر یافته با CARs را تولید کنند تا CD19 را مورد هدف قرار دهند، و این سلول های T تغییر یافته (CART19 و CTL019) در آزمایشات کلینیکی بیماری های کودکان و بدخیمی های سلول B بالغ ارزیابی شدند. در کل، نتایج این آزمایشات امیدبخش بودند، که تا بیش از ۹۰ درصد (۲۷ تا از ۳۰ بیمار) میزان پاسخ کامل با نرخ بقا شش ماه معادل ۷۸ درصد در بیمارانی به دست آمد که لوکمیای لیمفوبلاستیک حاد^۱ (ALL) داشتند. در بیمارانی لوکمیای لیمفوسیت مزمن (CLL)^۲، ۵۷ درصد به تزریق وریدی CTP019 پاسخ دادند و ۲۹ درصد بیمارانی که پاسخ کامل طولانی را به دست آوردند. در حالی که CD19 همانطور که در سلول های B بدخیم در چند بیماری، شامل لوکمیای لیمفوسیت مزمن (CLL)، لوکمیای لیمفوبلاست حاد (ALL)، لیمفوما سلول بزرگ منتشر شده (DLBCL)^۳، لیمفوما فولیکولی (FL)^۴، و لیمفوما سلول مانتل (MCL)^۵ بیان می شود همچنین در سلول های سالم B هم بیان می شود. اثرات جانبی به خاطر درمان CTL019 شامل آپلاسیای (نقص) سلول B^۶، سندرم مرتبط با سیتوکین^۷، سندرم تجزیه تومور^۸ و

1. Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL)
2. Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL)
3. Diffuse Large-Cell Lymphoma (DLBCL)
4. Follicular Lymphoma (FL)
5. Mantle Cell Lymphoma (MCL)
6. B cell Aplasia
7. Cytokine-Release Syndrome
8. Tumor Lysis Syndrome





سمیت‌های عصب شناختی است. شدت این وقایع در زمینه‌های بیماری مختلف فرق می‌کند ولی از نظر کلینیکی قابل مدیریت است.

کنترل موفق بیماری در آزمایشاتی دیده شد که از سلول‌های T هدف‌گیری CD19، در بیماران با بدخیمی‌های سلول B استفاده شد، که منجر به ایجاد سلول‌های CAR T برای سایر سرطان‌ها شد. همچنین از ناقلین رترو ویروسی نیز استفاده شدند تا یک TCR اختصاصی NY-ESO-1 را به سلول‌های T انتقال دهند و در آزمایشات کلینیکی برای سارکوما (تومور بدخیم) سلول سینوسی متاستازی^۱، ملانوما (تومور پوستی)^۲ و میلوما (تومور استخوانی)^۳ آزمون شدند. آنتی ژن NY-ESO-1 در ۱۰ تا ۵۰ درصد ملانوماها، ۷۰ تا ۸۰ درصد سارکوماهای سلول سینوسی، و تا بیش از ۶۰ درصد میلوما پیشرفته بیان شد. غیاب بیان NY-ESO-1 روی بافت‌های انسان بالغ این مورد را یک هدف جالب برای سلول T درمانی می‌سازد. پاسخ‌های کلینیکی هدفمند اندازه‌گیری شده طبق راهنمای RECIST (ویژگی ارزیابی پاسخ در تومورهای جامد)^۴ ۶۱ درصد (۱۱ از ۱۸) در بیماران سارکومای سلول سینوسی و ۵۵ درصد (۱۱ از ۲۰) در بیماران ملانوما بود. پاسخ کامل یا پاسخ نزدیک به کامل در ۷۰ درصد (۱۴ از ۲۰) بیمار میلومای چندگانه پیشرفته در فاز آزمایش I/II از بیان TCR اختصاصی NY-ESO-1 با واسطه لنتی ویروس در سلول‌های T به دست آمد.

اخیراً بیان شده است که سلول‌های T با یک TCR محدود HLA-A2 تغییر کردند تا تلومراز^۵ (TERT) را با وابستگی بالا شناسایی کنند، که به صورت موفقیت‌آمیزی پیشرفت B-CLL انسان را در یک مدل جونده کنترل کنند. عمل

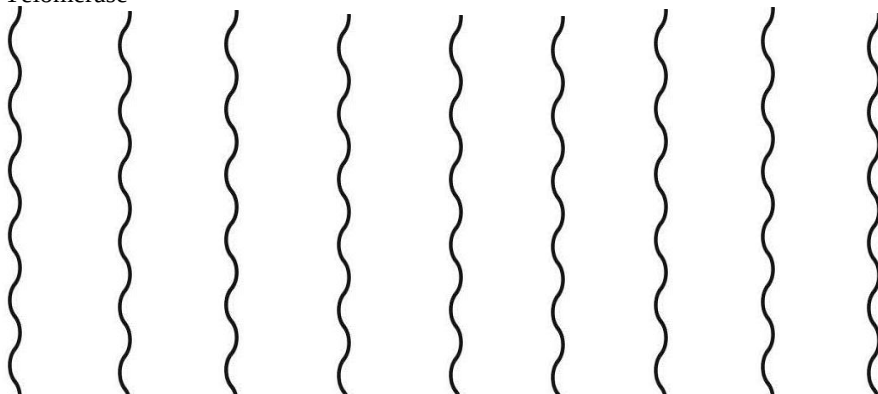
1. Metastatic Synovial Cell Sarcoma

2. Melanoma

3. Myeloma

4. RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)

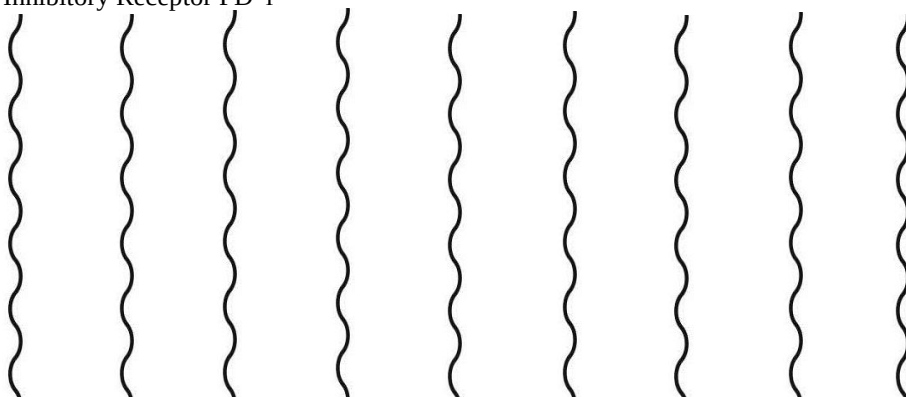
5. Telomerase



اصلی TERT حفظ انتهای تلومراز است. بیان TERT معمولاً در سلول‌های سوماتیک پس از تولد سرکوب می‌شود، که به پیری مرتبط است و در ادامه تقسیمات سلولی رخ می‌دهد. TERT اغلب در سلول‌های در حال تقسیم سریع مانند سلول‌های بنیادی جنینی^۱، سلول‌های بنیادی بالغ^۲ و بسیاری از انواع سلول‌های تومور بیان بالایی دارد. حدود ۸۰-۹۰ درصد تومورهای اولیه، بیان TERT بالایی را نشان می‌دهند که به نظر می‌رسد به فنوتیپ تغییر یافته مرتبط باشد. سمیت سلول‌های T هدایت شده با TERT اصولاً بوسیله گرانولوسیت‌های بالغ^۳ محدود می‌شوند (CD45+CD11b+CD16+).

کارایی ضد توموری سلول‌های T مهندسی شده، تا حدودی مربوط به توسعه و پیوند سلول‌های تغییر یافته است. یک آزمایش پیش‌کلینیکی در مدل‌های زئوگرافت (پیوندی)^۴ چونده ALL و CLL انسانی مقاوم به دارو بیان کرد که ترکیب سلول CAR T درمانی با اداره مهارکننده بروتون تیروزین کیناز Ibrutinib^۵، پیوند سلول CAR T و فعالیت ضدلکومیای را افزایش داد. تحلیل سلول‌های CD8+ T از بیماران CLL که با ۵ تا ۱۱ چرخه Ibrutinib درمان شده بودند کاهش بیان گیرنده مهارکننده PD-1^۶ را نشان داد، که پیشنهاد می‌کند که عدم برگشت عملکرد سلول T هم به فعالیت ضد لکومیای افزوده است.

1. Embryonic Stem Cells (ESCs)
2. Adult Stem Cells (ASCs)
3. Mature Granulocytes
4. Xenograft Models
5. Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib
6. Inhibitory Receptor PD-1



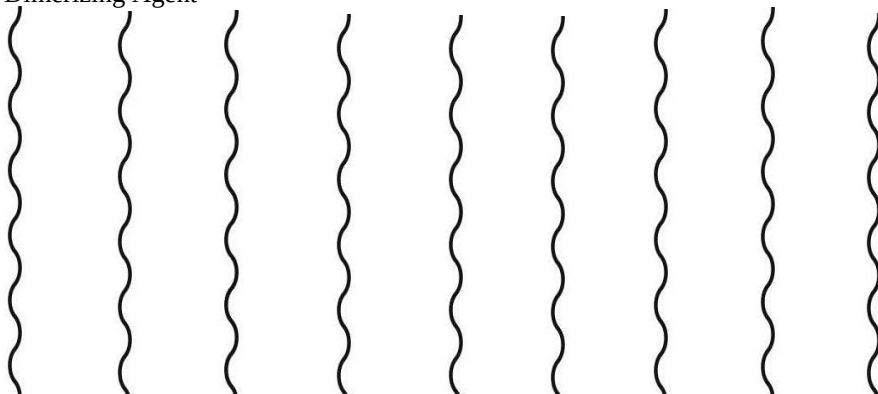


سلول‌های پیش‌ساز T^۱

ناقلین رترو ویروسی برای انتقال CARs یا TCRs به پیش‌سازهای تحت سلول T (preTs)^۲ استفاده شدند به عنوان رویکردی که اثرات ضد سرطان preTs را افزایش می‌دهد. درحالی که این رویکرد خطر بیماری پیوند در برابر میزبان در زمینه‌های پیوند آلوژنی^۳ را حذف می‌کند، استفاده از ایمن‌ترین ناقل رترو ویروس برای محدود کردن پتانسیل اثرات جانبی جدی به دلیل جهش‌زایی ورودی مهم است، به خصوص خطر وراثتی تراریختگی جمعیت سلول پیش‌ساز را باید در نظر گرفت. نسل سوم CAR که مهندسی شدند تا سلول‌هایی که CD123 را بیان می‌کنند مورد هدف قرار دهند، اخیراً به سلول‌های CD34⁺ مشتق از خون cord منتقل شدند، که نهایتاً درون preTs تمایز یافتند. ناقلین آلفا رترو ویروس SIN که با گلیکوپروتئین پوشش رترو ویروس داخلی گربه تغییر یافته (RD114/TR) شدند، استفاده شدند تا راندمان انتقال مناسبی را با خطر ژنوتوکسی^۴ به حداقل رسیده به دست آورند. به عنوان ویژگی ایمنی دیگر، محققین یک کاست کاسپاز قابل القا (iCasp9)^۵ را وارد کردند و آپوپتوز سلول‌های تغییر یافته را بعد از ورود عامل دایمرکننده^۶ AP20187 بیان کردند. سلول‌های CD123-CAR T که IFN γ را تولید کردند با سلول‌های هدف CD123⁺ هم‌کشت شدند و به صورت اختصاصی سلول‌های هدف CD123⁺ را تجزیه نمودند.

پیوند preTs مهندسی شده برای القا بیان یک TCR واکنشگر به لوکمیا، اخیراً نشان داد که از موش علیه چالش‌های لوکمیا مکرر از طریق تولید سلول‌های حافظه

-
1. T Precursor Cells
 2. T Cell-Committed progenitors (preTs)
 3. Allogeneic Transplantation
 4. Genotoxic
 5. inducible Caspase 9 (iCasp9)
 6. Dimerizing Agent

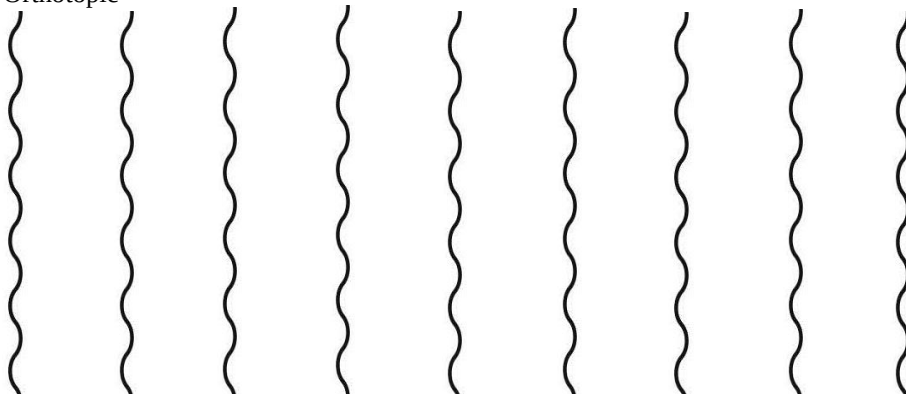


محافظت می‌کند. TCR تغییر یافته از طریق ناقل لنتی ویروس منتقل شد و preTs انتقال یافته با گزارشگر پروتئین فلورسنت سبز افزوده (EGFP)^۱ غنی شد. جالب اینکه، آزمایشاتی که کنترل بیان موقت TCR را از طریق القا دئوکسی سایکلین^۲ بررسی می‌کنند، بیان کردند که القا اولیه TCR تغییر یافته مناسب تمایز سلول preT به سلول‌های T⁺ CD8 است و منجر به انتخاب مثبت زیرگروه سلول T واکنشگر به لوکمیای می‌شود.

سلول‌های NK

انتقال با واسطه گامارتروویروس و لنتی ویروس از نسل دوم CARها به درون لاین‌های سلولی NK استفاده شده است تا تومورهای نوروبلاستوما (NB)^۳ و گلیوبلاستوما^۴ را مورد هدف قرار دهد. لاین‌های سلولی تومور بیان کننده GD-2 و سلول‌های NB اولیه به صورت انتخابی توسط کلون‌های CAR-NK-92 اختصاصی GD2 در آزمایشات هم‌کشتی حذف شدند. گیرنده فاکتور رشدی اپیدرمی (EGFR)^۵ در گلیوبلاستوما افزایش بیان یافتند، ولی در بافت مغز سالم رخ نداد. تزریق درون جمجمه‌ای سلول‌های NK-92 که با EGFR-CAR تغییر یافته طراحی شدند تا EGFR نوع وحشی را مورد هدف قرار دهند و موتانت EGFRvIII به صورت ایمن و مناسب سلول‌های تومور گلیوبلاستوما بیان کننده EGFR را در یک مدل زئوگرافت اورتوتوپیک (ناهمسان)^۶ حذف کردند. بیان ErbB2 (HER2)، یک گیرنده عامل رشد

1. Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) Reporter
2. Doxycycline
3. Neuroblastoma (NB)
4. Glioblastoma
5. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)
6. Orthotopic



تیروزین کیناز، در ۴۱ درصد گلیوبلاستوماهای اولیه و در چند لاین سلولی گلیوبلاستومای تثبیت شده، یافت شدند.

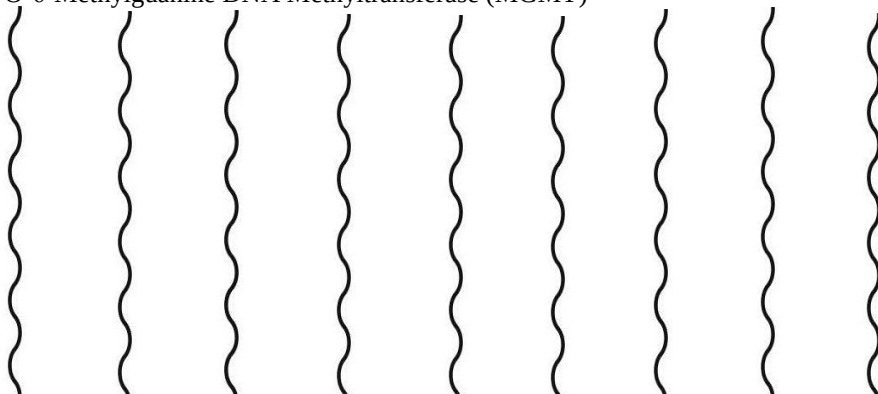
سلول های NK-92 که با انتقال ژن لنتی ویروس مهندسی شدند یک ErbB2-CAR را بیان کردند که فعالیت بالقوه علیه مدل های زئوگرافت سلول های گلیوبلاستوما و گلیوبلاستوما اورتوتاپیک نشان دادند. این محققین به دنبال طراحی آزمایش کلینیکی فاز I هستند تا کاربرد موضعی سلول های ErbB2-CAR-NK-92 در بیماران با گلیوبلاستومای ErbB2 مثبت را آزمایش کنند.

O-۶- متیل گوانین DNA متیل ترانسفراز (MGMT)^۱

یک مکانیزم که سلول های تومور می توانند نسبت به شیمی درمانی های آلکیل کننده، مقاوم شوند از طریق فعالیت ترمیم DNA، افزایش یافته است. O-۶ متیل گوانین DNA متیل ترانسفراز (MGMT) به حفظ پایداری ژنوم از طریق ترمیم ضایعه DNA جهش یافته O-۶ متیل گوانین به گوانین مرتبط است. جالب اینکه، بقا اندک در بیماران گلیوبلاستومایی مشاهده شد، که سلول های تومور فاقد متیلاسیون پروموتور برای ژن MGMT بودند، که شاید به دلیل افزایش بیان MGMT و فعالیت ترمیم DNA در سلول های تومور است.

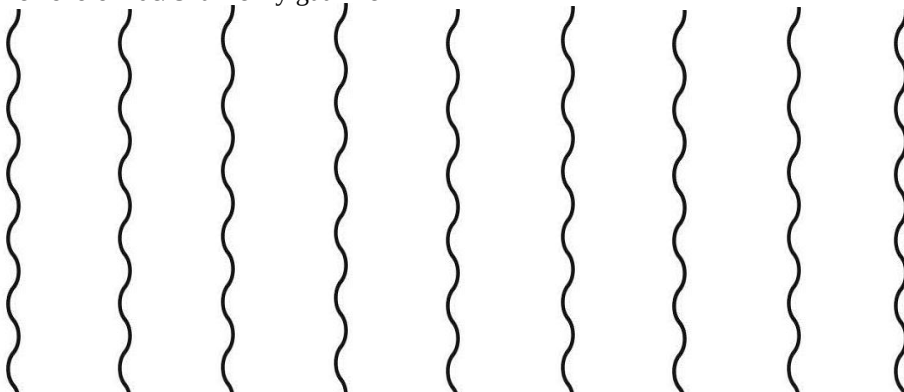
سطح بیان MGMT به میزان متیلاسیون در پروموتور ژن MGMT و ناحیه کد کننده مرتبط است. انتقال ناقل رترو ویروس موتانت MGMT^{140K} از سلول های مغز استخوان اولیه جوندگان در برابر عامل آلکیل کننده محافظت کرد.

1. O-6-Methylguanine DNA Methyltransferase (MGMT)



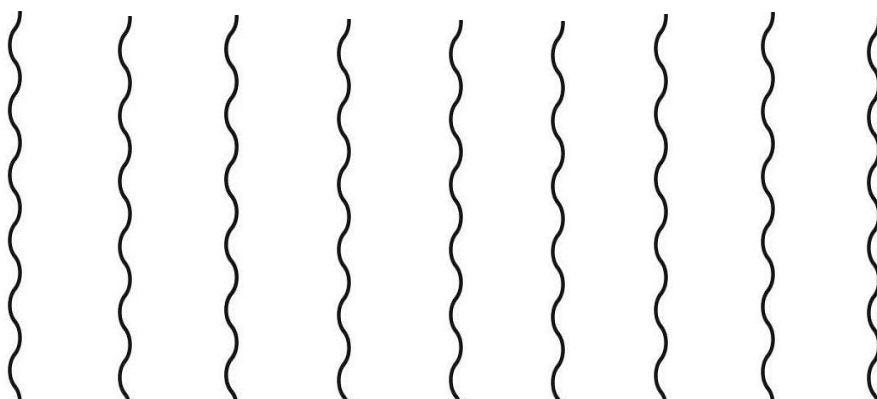
این مفهوم درمانی به بقا بهبود یافته در بیماران گلیوبلاستوما ترجمه شد. MGMTP140K باعث تغییر HSC شد که پیوند پلی کلونال را نشان داد و بیمارانی که این سلول‌های تغییر یافته را دریافت کردند به صورت معنی‌داری چرخه‌های بیشتری از درمان تموزولامید ۶ بنزیل گوانین^۱ را تحمل کردند.

1. Temozolomide/O-6-Benzylguanine





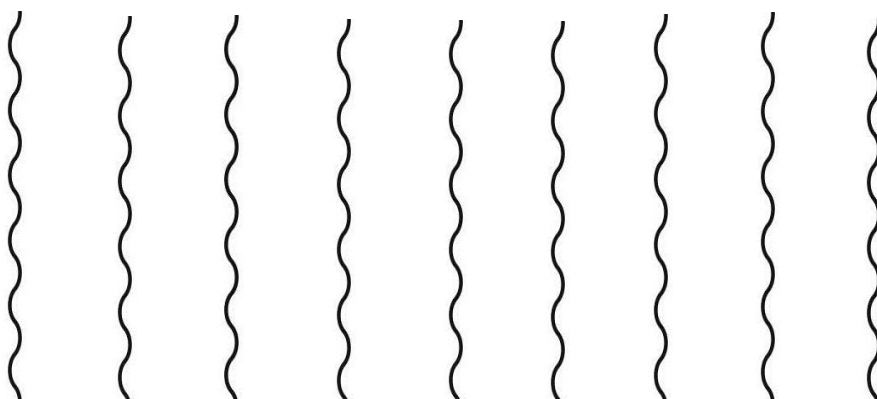
پیشرفت‌های اخیر در فناوری موجود به فهم بیشتری از ناهنجاری‌های ژنتیکی منجر شد که باعث درمان انواع فراوانی از سرطان می‌شوند. چالش کنونی ما استفاده از این اطلاعات برای طراحی رویکردهای درمانی بهتر برای کنترل یا درمان سرطان است. ناقلین رتروویروسی ابزار مناسبی برای تغییر سلول هستند و چند نوع از این سلول‌ها با این ناقلین، مهندسی شده‌اند و در آزمایشات مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند. طراحی‌های بهبودیافته ناقل رتروویروسی، ایمنی انتقال ژن را افزایش داده‌اند، و هیچ اثر جانبی جدی مرتبط با ناقل در هیچ بیماری که در آزمایشات کلینیکی با پلت فرم ناقل SIN تیمار شده‌اند، رخ نداده است. همانطور که در بالا تشریح شد، روش انتقال ژن بوسیله رتروویروس را می‌توان استفاده نمود تا سرنوشت سلول را تغییر دهیم، عملکرد را بهبود بخشیم، تکثیر را تغییر دهیم و نهایتاً رفتار سلول را تغییر دهیم. استفاده از ژن درمانی رتروویروسی بوسیله ویرایش ژنومی نیز یک پیشرفت فنی و مهم است که انتقال ژن مناسب با پتانسیل برای تغییر ژنتیکی اختصاصی مکان را ترکیب می‌کند. اگر ما بتوانیم به صورت ایمن قدرت بی حد این ابزار مولکولی را مهار کنیم، درمان‌های اختصاصی سلول و ژن یک واقعیت خواهد شد، که به درمان بهتر و احتمالاً حذف بسیاری از سرطان‌ها منجر می‌شوند.



1. Adair JE, Beard BC, Trobridge GD, Neff T, Rockhill JK, Silbergeld DL, Mrugala MM, Kiem HP (2012) Extended survival of glioblastoma patients after chemoprotective HSC gene therapy. *Sci Transl Med* 4(133):133ra57.
2. Adair JE, Johnston SK, Mrugala MM, Beard BC, Guyman LA, Baldock AL, Bridge CA, Hawkins-Daarud A, Gori JL, Born DE, Gonzalez-Cuyar LF, Silbergeld DL, Rockne RC, Storer BE, Rockhill JK, Swanson KR, Kiem HP (2014) Gene therapy enhances chemotherapy tolerance and efficacy in glioblastoma patients. *J Clin Invest* 124(9):4082–4092.
3. Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F, Deola S, Mortellaro A, Morecki S, Andolfi G, Tabucchi A, Carlucci F, Marinello E, Cattaneo F, Vai S, Servida P, Miniero R, Roncarolo MG, Bordignon C (2002) Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 296(5577):2410–2413.
4. Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, Ferrua F, Cicalese MP, Baricordi C, Dionisio F, Calabria A, Giannelli S, Castiello MC, Bosticardo M, Evangelio C, Assanelli A, Casiraghi M, Di Nunzio S, Callegaro L, Benati C, Rizzardi P, Pellin D, Di Serio C, Schmidt M, Von Kalle C, Gardner J, Mehta N, Neduva V, Dow DJ, Galy A, Miniero R, Finocchi A, Metin A, Banerjee PP, Orange JS, Galimberti S, Valsecchi MG, Biffi A, Montini E, Villa A, Ciceri F, Roncarolo MG, Naldini L (2013) Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science* 341(6148):1233151.
5. Amirache F, Lévy C, Costa C, Mangeot PE, Torbett BE, Wang CX, Nègre D, Cosset FL, Verhoeyen E (2014) Mystery solved: VSV-G-LVs do not allow efficient gene transfer into unstimulated T cells, B cells, and HSCs because they lack the LDL receptor. *Blood* 123 (9):1422–1424.



6. Atanackovic D, Arfsten J, Cao Y, Gnjatic S, Schnieders F, Bartels K, Schilling G, Faltz C, Wolschke C, Dierlamm J, Ritter G, Eiermann T, Hossfeld DK, Zander AR, Jungbluth AA, Old LJ, Bokemeyer C, Kröger N (2007) Cancer-testis antigens are commonly expressed in multiple myeloma and induce systemic immunity following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 109(3):1103–1112.
7. Belle JI, Petrov JC, Langlais D, Robert F, Cencic R, Shen S, Pelletier J, Gros P, Nijnik A (2016) Repression of p53-target gene Bbc3/PUMA by MYSM1 is essential for the survival of hematopoietic multipotent progenitors and contributes to stem cell maintenance. *Cell Death Differ* 23(5):759–775.
8. Berger C, Flowers ME, Warren EH, Riddell SR (2006) Analysis of transgene-specific immune responses that limit the in vivo persistence of adoptively transferred HSV-TK-modified donor T cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 107:2294–230.
9. Biffi A, Montini E, Lorioli L, Cesani M, Fumagalli F, Plati T, Baldoli C, Martino S, Calabria A, Canale S, Benedicenti F, Vallanti G, Biasco L, Leo S, Kabbara N, Zanetti G, Rizzo WB, Mehta NA, Cicalese MP, Casiraghi M, Boelens JJ, Del Carro U, Dow DJ, Schmidt Assanelli A, Neduva V, Di Serio C, Stupka E, Gardner J, von Kalle C, Bordignon C, Ciceri F, Rovelli A, Roncarolo MG, Aiuti A, Sessa M, Naldini L (2013) Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science* 341(6148):1233158.
10. Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, Servida P, Zappone E, Ruggieri L, Ponzoni M, Rossini S, Mavilio F, Traversari C, Bordignon C (1997) HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 276(5319):1719–1724.
11. Brenning S, Lachmann N, Buchegger T, Hetzel M, Schambach A, Moritz T (2015) Chemoprotection of murine hematopoietic cells by combined gene transfer of cytidine



deaminase (CDD) and multidrug resistance 1 gene (MDR1). *J Exp Clin Cancer Res* 34:148.

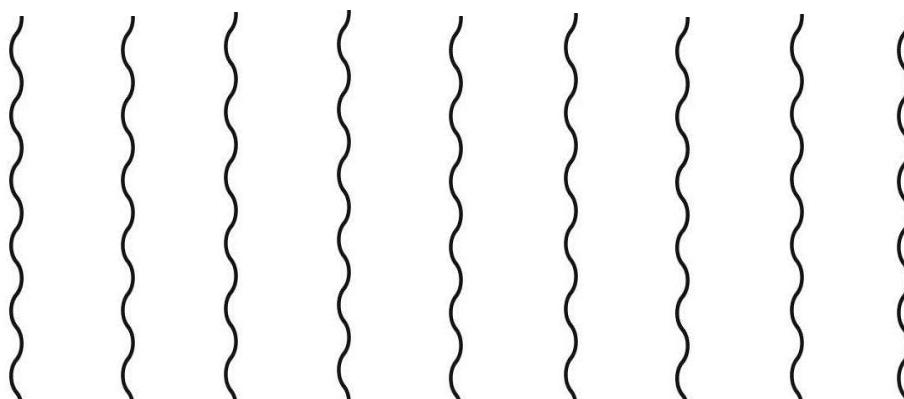
12. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, Bartido S, Stefanski J, Taylor C, Olszewska M, Borquez-Ojeda O, Qu J, Wasielewska T, He Q, Bernal Y, Rijo IV, Hedvat C, Kobos R, Curran K, Steinherz P, Jurcic J, Rosenblatt T, Maslak P, Frattini M, Sadelain M (2013) CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 5(177):177ra38.

13. Brudno JN, Somerville RP, Shi V, Rose JJ, Halverson DC, Fowler DH, Gea-Banacloche JC, Pavletic SZ, Hickstein DD, Lu TL, Feldman SA, Iwamoto AT, Kurlander R, Maric I, Goy A, Hansen BG, Wilder JS, Blacklock-Schuver B, Hakim FT, Rosenberg SA, Gress RE, Kochenderfer JN (2016) Allogeneic T Cells that express an anti-CD19 chimeric antigen receptor induce remissions of B-Cell malignancies that progress after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation without causing graft-versus-host disease. *J Clin Oncol* 34(10):1112–1121.

14. Büchner T, Schlenk RF, Schaich M, Döhner K, Krahel R, Krauter J, Heil G, Krug U, Sauerland MC, Heinecke A, Späth D, Kramer M, Scholl S, Berdel WE, Hiddemann W, Hoelzer D, Hehlmann R, Hasford J, Hoffmann VS, Döhner H, Ehninger G, Ganser A, Niederwieser DW, Pfirrmann M (2012) Acute Myeloid Leukemia (AML): different treatment strategies versus a common standard arm—combined prospective analysis by the German AML Intergroup. *J Clin Oncol* 30(29):3604–3610.

15. Cai Y, Bak RO, Mikkelsen JG (2014) Targeted genome editing by lentiviral protein transduction of zinc-finger and TAL-effector nucleases. *Elife* 3:e01911.

16. Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, Veres G, Schmidt M, Kutschera I, Vidaud M, Abel U, Dal-Cortivo L,





Caccavelli L, Mahlaoui N, Kiermer V, Mittelstaedt D, Bellesme C, Lahlou N, Lefrère F, Blanche S, Audit M, Payen E, Leboulch P, l'Homme B, Bougnères P, Von Kalle C, Fischer A, Cavazzana-Calvo M, Aubourg P (2009) Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 326(5954):818–823.

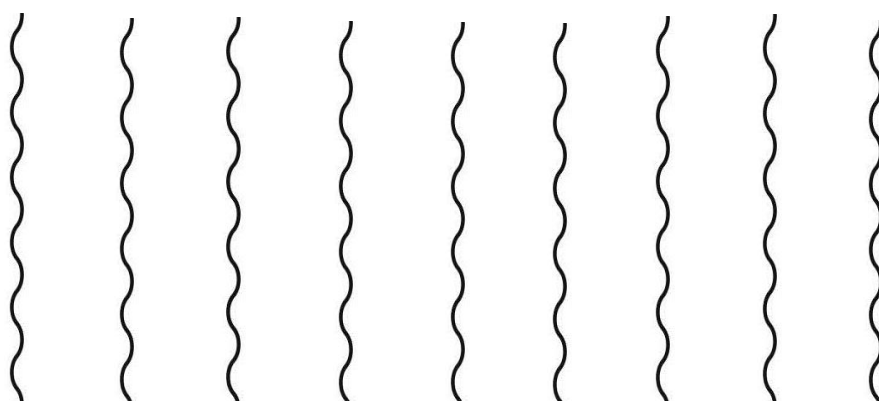
17. Costello JF, Futscher BW, Tano K, Graunke DM, Pieper RO (1994) Graded methylation in the promoter and body of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) gene correlates with MGMT expression in human glioma cells. *J Biol Chem* 269(25):17228–17237.

18. Esser R, Müller T, Stefes D, Kloess S, Seidel D, Gillies SD, Aperlo-Iffland C, Huston JS, Uherek C, Schönfeld K, Tonn T, Huebener N, Lode HN, Koehl U, Wels WS (2012) NK cells engineered to express a GD2-specific antigen receptor display built-in ADCC-like activity against tumour cells of neuroectodermal origin. *J Cell Mol Med* 16(3):569–581.

19. Fraietta JA, Beckwith KA, Patel PR, Ruella M, Zheng Z, Barrett DM, Lacey SF, Melenhorst JJ, McGettigan SE, Cook DR, Zhang C, Xu J, Do P, Hulitt J, Kudchodkar SB, Cogdill AP, Gill S, Porter DL, Woyach JA, Long M, Johnson AJ, Maddocks K, Muthusamy N, Levine BL, June CH, Byrd JC, Maus MV (2016) Ibrutinib enhances chimeric antigen receptor T-cell engraftment and efficacy in leukemia. *Blood* 127(9):1117–1127.

20. Frank O, Rudolph C, Heberlein C, von Neuhoff N, Schrock E, Schambach A, Schlegelberger B, Fehse B, Ostertag W, Stocking C, Baum C (2004) Tumor cells escape suicide gene therapy by genetic and epigenetic instability. *Blood* 104:3543–3549.

21. Gaspar HB, Cooray S, Gilmour KC, Parsley KL, Zhang F, Adams S, Bjorkegren E, Bayford J, Brown L, Davies EG, Veys P, Fairbanks L, Bordon V, Petropoulou T, Kinnon C, Thrasher AJ (2011) Hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine



deaminase-deficient severe combined immunodeficiency leads to long-term immunological recovery and metabolic correction. *Sci Transl Med* 3(97):97ra80.

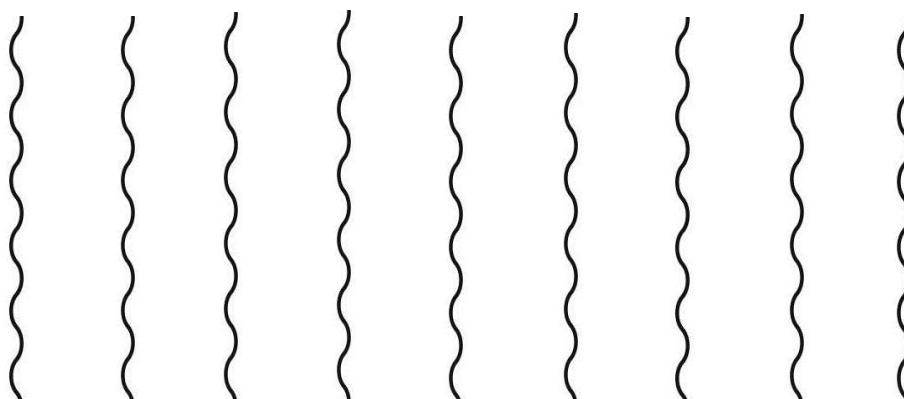
22. Geiger H, Pawar SA, Kerschen EJ, Nattamai KJ, Hernandez I, Liang HP, Fernández JÁ, Cancelas JA, Ryan MA, Kustikova O, Schambach A, Fu Q, Wang J, Fink LM, Petersen KU, Zhou D, Griffin JH, Baum C, Weiler H, Hauer-Jensen M (2012) Pharmacological targeting of the thrombomodulin-activated protein C pathway mitigates radiation toxicity. *Nat Med* 18 (7):1123–1129.

23. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, Teachey DT, Chew A, Hauck B, Wright JF, Milone MC, Levine BL, June CH (2013) Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 368(16):1509–1518.

24. Guven H, Konstantinidis KV, Alici E, Aints A, Abedi-Valugerdi M, Christensson B, Ljunggren HG, Dilber MS (2005) Efficient gene transfer into primary human natural killer cells by retroviral transduction. *Exp Hematol* 33:1320–1328.

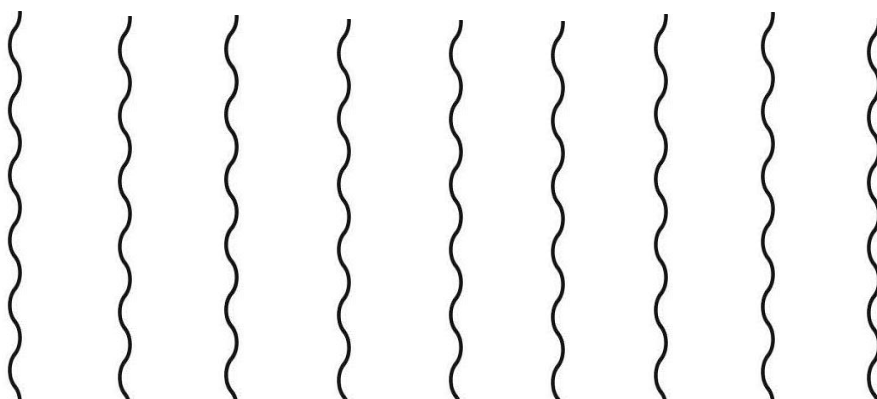
25. Hacein-Bey-Abina S, Pai SY, Gaspar HB, Armant M, Berry CC, Blanche S, Bleesing J, Blondeau J, de Boer H, Buckland KF, Caccavelli L, Cros G, De Oliveira S, Fernández KS, Guo D, Harris CE, Hopkins G, Lehmann LE, Lim A, London WB, van der Loo JC, Malani N, Male F, Malik P, Marinovic MA, McNicol AM, Moshous D, Neven B, Oleastro M, Picard C, Ritz J, Rivat C, Schambach A, Shaw KL, Sherman EA, Silberstein LE, Six E, Touzot F, Tsytsykova A, Xu-Bayford J, Baum C, Bushman FD, Fischer A, Kohn DB, Filipovich AH, Notarangelo LD, Cavazzana M, Williams DA, Thrasher AJ (2014) A modified c-retrovirus vector for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 371(15):1407–1417.

26. Han J, Chu J, Keung Chan W, Zhang J, Wang Y, Cohen JB, Victor A, Meisen WH, Kim SH, Grandi P, Wang QE, He





- X, Nakano I, Chiocca EA, Glorioso JC 3rd, Kaur B, Caligiuri MA, Yu J (2015) CAR-engineered NK cells targeting wild-type EGFR and EGFRvIII enhance killing of glioblastoma and patient-derived glioblastoma stem cells. *Sci Rep* 5:11483.
27. Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S, Otten P, Van Melle G, de Tribolet N, Stupp R (2004) Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res* 10(6):1871–1874.
28. Heinrich T, Rengstl B, Muik A, Petkova M, Schmid F, Wistinghausen R, Warner K, Crispatzu G, Hansmann ML, Herling M, von Laer D, Newrzela S (2013) Mature T-cell lymphomagenesis induced by retroviral insertional activation of Janus kinase 1. *Mol Ther* 21(6):1160–1168.
29. Hoffmann D, Göhring G, Heuser M, Ganser A, Schambach A, Morgan MA (2016) Letter to the Editor: production of mature healthy hematopoietic cells from induced pluripotent stem cells derived from an AML diagnostic sample containing the t(8;21) translocation. *Stem Cells* 34 (3):797–799.
30. Hoseini SS, Hapke M, Herbst J, Wedekind D, Baumann R, Heinz N, Schiedlmeier B, Vignali DA, van den Brink MR, Schambach A, Blazar BR, Sauer MG (2015) Inducible T-cell receptor expression in precursor T cells for leukemia control. *Leukemia* 29(7):1530–1542.
31. Hübner J, Hoseini SS, Suerth JD, Hoffmann D, Maluski M, Herbst J, Maul H, Ghosh A, Eiz-Vesper B, Yuan Q, Ott M, Heuser M, Schambach A, Sauer MG (2016) Generation of genetically engineered precursor T cells from human umbilical cord blood using an optimized alpharetroviral vector platform. *Mol Ther* 24(7):1216–1226.
32. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*



- 337:816–821 John LB, Devaud C, Duong CP, Yong CS, Beavis PA, Haynes NM, Chow MT, Smyth MJ, Kershaw MH, Darcy PK (2013) Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells. *Clin Cancer Res* 19(20):5636–5646.
33. Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, June CH (2011) T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* 3(95):95ra73.
34. Karlsson H, Svensson E, Gigg C, Jarvius M, Olsson-Strömberg U, Savoldo B, Dotti G, Loskog A (2015) Evaluation of intracellular signaling downstream chimeric antigen receptors. *PLoS ONE* 10(12):e0144787.
35. Kaufmann KB, Brendel C, Suerth JD, Mueller-Kuller U, Chen-Wichmann L, Schwäble J, Pahujani S, Kunkel H, Schambach A, Baum C, Grez M (2013) Alpharetroviral vector-mediated gene therapy for X-CGD: functional correction and lack of aberrant splicing. *Mol Ther* 21 (3):648–661.
36. Klco JM, Spencer DH, Miller CA, Griffith M, Lamprecht TL, O’Laughlin M, Fronick C, Magrini V, Demeter RT, Fulton RS, Eades WC, Link DC, Graubert TA, Walter MJ, Mardis ER, Dpersio JF, Wilson RK, Ley TJ (2014) Functional heterogeneity of genetically defined subclones in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 25(3):379–392.
37. Koike-Yusa H, Li Y, Tan EP, Velasco-Herrera Mdel C, Yusa K (2014) Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat Biotechnol* 32(3):267–273.
38. Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533(7603):420–424.
39. Labenski V, Suerth JD, Barczak E, Heckl D, Levy C, Bernadin O, Charpentier E, Williams DA, Fehse B, Verhoeven



E, Schambach A (2016) Alpharetroviral self-inactivating vectors produced 32 A. Schambach and M. Morgan by a superinfection-resistant stable packaging cell line allow genetic modification of primary human T lymphocytes. *Biomaterials* 97:97–109.

40. Laliberté J, Marquez VE, Momparler RL (1992) Potent inhibitors for the deamination of cytosine arabinoside and 5-aza-2'-deoxycytidine by human cytidine deaminase. *Cancer Chemother Pharmacol* 30(1):7–11.

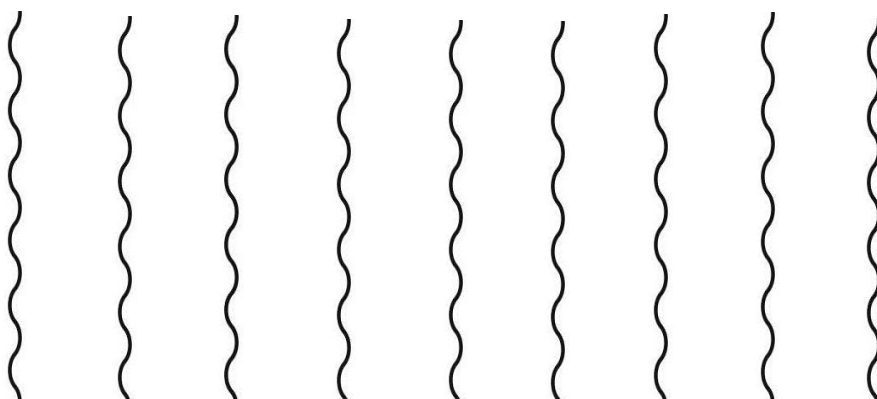
41. Mahfouz RZ, Jankowska A, Ebrahim Q, Gu X, Visconte V, Tabarroki A, Terse P, Covey J, Chan K, Ling Y, Engelke KJ, Sekeres MA, Tiu R, Maciejewski J, Radivoyevitch T, Sauntharajah Y (2013) Increased CDA expression/activity in males contributes to decreased cytidine analog half-life and likely contributes to worse outcomes with 5-azacytidine or decitabine therapy. *Clin Cancer Res* 19(4):938–948.

42. Maier P, Fleckenstein K, Li L, Laufs S, Zeller WJ, Baum C, Fruehauf S, Herskind C, Wenz F (2006) Overexpression of MDR1 using a retroviral vector differentially regulates genes involved in detoxification and apoptosis and confers radioprotection. *Radiat Res* 166(3):463–473.

43. Maier P, Herskind C, Fleckenstein K, Spier I, Laufs S, Zeller WJ, Fruehauf S, Wenz F (2008) MDR1 gene transfer using a lentiviral SIN vector confers radioprotection to human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Radiat Res* 169(3):301–310.

44. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, Chew A, Gonzalez VE, Zheng Z, Lacey SF, Mahnke YD, Melenhorst JJ, Rheingold SR, Shen A, Teachey DT, Levine BL, June CH, Porter DL, Grupp SA (2014) Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* 371(16):1507–1517.

45. Maze R, Kurpad C, Pegg AE, Erickson LC, Williams DA (1999) Retroviral-mediated expression of the P140A, but not



P140A/G156A, mutant form of O6-methylguanine DNA methyltransferase protects hematopoietic cells against O6-benzylguanine sensitization to chloroethylnitrosourea treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 290(3):1467–1474.

46. Micucci F, Zingoni A, Piccoli M, Frati L, Santoni A, Galandrini R (2006) High-efficient lentiviral vector-mediated gene transfer into primary human NK cells. *Exp Hematol* 34:1344–1352.

47. Mock U, Riecken K, Berdien B, Qasim W, Chan E, Cathomen T, Fehse B (2014) Novel lentiviral vectors with mutated reverse transcriptase for mRNA delivery of TALE nucleases. *Sci Rep* 4:6409.

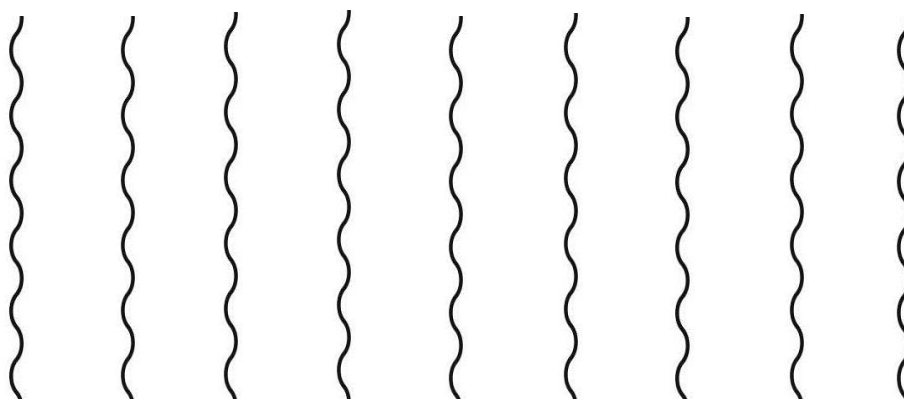
48. Moiani A, Suerth JD, Gandolfi F, Rizzi E, Severgnini M, De Bellis G, Schambach A, Mavilio F (2014) Genome-wide analysis of alpharetroviral integration in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Genes (Basel)* 5(2):415–429.

49. Moritz T, Mackay W, Glassner BJ, Williams DA, Samson L (1995) Retrovirus-mediated expression of a DNA repair protein in bone marrow protects hematopoietic cells from nitrosourea-induced toxicity in vitro and in vivo. *Cancer Res* 55(12):2608–2614.

50. Naldini L (2015) Gene therapy returns to centre stage. *Nature* 526(7573):351–360
Namuduri M, Brentjens RJ (2016) Medical management of side effects related to CAR T cell therapy in hematologic malignancies. *Expert Rev Hematol* 19:1–3 (Epub ahead of print).

51. Newrzela S, Cornils K, Heinrich T, Schläger J, Yi JH, Lysenko O, Kimpel J, Fehse B, von Laer D (2011) Retroviral insertional mutagenesis can contribute to immortalization of mature T lymphocytes. *Mol Med* 17(11–12):1223–1232.

52. Newrzela S, Al-Ghaili N, Heinrich T, Petkova M, Hartmann S, Rengstl B, Kumar A, Jäck HM, Gerdes S, Roeder I, Hansmann ML, von Laer D (2012) T-cell receptor diversity





prevents T-cell lymphoma development. *Leukemia* 26(12):2499–2507.

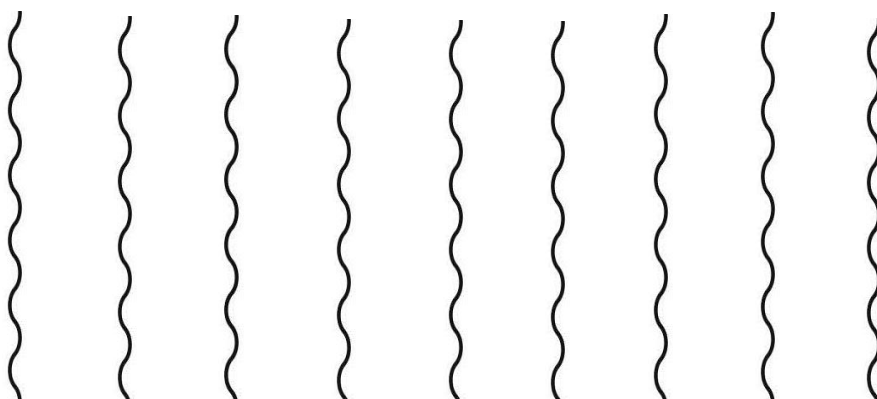
53. Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, Stein S, Siler U, Koehl U, Glimm H, Köhlcke K, Schilz A, Kunkel H, Naundorf S, Brinkmann A, Deichmann A, Fischer M, Ball C, Pilz I, Dunbar C, Du Y, Jenkins NA, Copeland NG, Lüthi U, Hassan M, Thrasher AJ, Hoelzer D, von Kalle C, Seger R, Grez M (2006) Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* 12(4):401–409.

54. Pardoll DM (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12(4):252–264.

55. Porter DL, Hwang WT, Frey NV, Lacey SF, Shaw PA, Loren AW, Bagg A, Marcucci KT, Shen A, Gonzalez V, Ambrose D, Grupp SA, Chew A, Zheng Z, Milone MC, Levine BL, Melenhorst JJ, June CH (2015) Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med* 7(303):303ra139.

56. Rapoport AP, Stadtmauer EA, Binder-Scholl GK, Goloubeva O, Vogl DT, Lacey SF, Badros AZ, Garfall A, Weiss B, Finklestein J, Kulikovskaya I, Sinha SK, Kronsberg S, Gupta M, Bond S, Melchiori L, Brewer JE, Bennett AD, Gerry AB, Pumphrey NJ, Williams D, Tayton-Martin HK, Ribeiro L, Holdich T, Yanovich S, Hardy N, Yared J, Kerr N, Philip S, Westphal S, Siegel DL, Levine BL, Jakobsen BK, Kalos M, June CH (2015) NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med* 21(8):914–921.

57. Robbins PF, Kassim SH, Tran TL, Crystal JS, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Dudley ME, Wunderlich JR, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Restifo NP, Raffeld M, Lee CC, Li YF, El-Gamil M, Rosenberg SA (2015) A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-



reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response. Clin Cancer Res 21(5):1019–10127.

58. Ruan H, Qiu S, Beard BC, Black ME (2016) Creation of zebularine-resistant human cytidine deaminase mutants to enhance the chemoprotection of hematopoietic stem cells. Protein Eng Des Sel May 8. pii: gzw012 (Epub ahead of print).

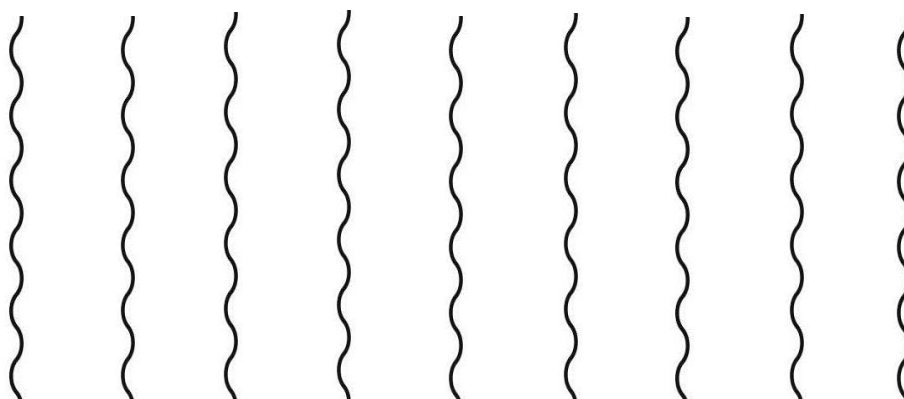
59. Salci KR, Lee JH, Laronde S, Dingwall S, Kushwah R, Fiebig-Comyn A, Leber B, Foley R, Dal Cin A, Bhatia M (2015) Cellular reprogramming allows generation of autologous hematopoietic progenitors from AML patients that are devoid of patient-specific genomic aberrations. Stem Cells 33(6):1839–1849.

60. Sánchez-Rivera FJ, Papagiannakopoulos T, Romero R, Tammela T, Bauer MR, Bhutkar A, Joshi NS, Subbaraj L, Bronson RT, Xue W, Jacks T (2014) Rapid modelling of cooperating genetic events in cancer through somatic genome editing. Nature 516(7531):428–431.

61. Sancho-Martinez I, Nivet E, Xia Y, Hishida T, Aguirre A, Ocampo A, Ma L, Morey R, Krause MN, Zembrzycki A, Ansorge O, Vazquez-Ferrer E, Dubova I, Reddy P, Lam D, Hishida Y, Wu MZ, Esteban CR, O’Leary D, Wahl GM, Verma IM, Laurent LC, Izpisua Belmonte JC (2016) Establishment of human iPSC-based models for the study and targeting of glioma initiating cells. Nat Commun 7:10743.

62. Sandri S, Bobisse S, Moxley K, Lamolinara A, De Sanctis F, Boschi F, Sbarbati A, Fracasso G, Ferrarini G, Hendriks RW, Cavallini C, Scupoli MT, Sartoris S, Iezzi M, Nishimura MI, Bronte V, Ugel S (2016) Feasibility of telomerase-specific adoptive T-cell therapy for B-cell chronic lymphocytic leukemia and solid malignancies. Cancer Res 76(9):2540–2551.

63. Schambach A, Schiedlmeier B, Kühlcke K, Verstegen M, Margison GP, Li Z, Kamino K, Bohne J, Alexandrov A, Hermann FG, von Laer D, Baum C (2006) Towards





hematopoietic stem cell-mediated protection against infection with human immunodeficiency virus. *Gene Ther* 13 (13):1037–1047.

64. Schröder JK, Kirch C, Seeber S, Schütte J (1998) Structural and functional analysis of the cytidine deaminase gene in patients with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 103(4):1096–1103.

65. Scott AM, Wolchok JD, Old LJ (2012) Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 12(4):278–287.

66. Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F (2014) Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 343(6166):84–87.

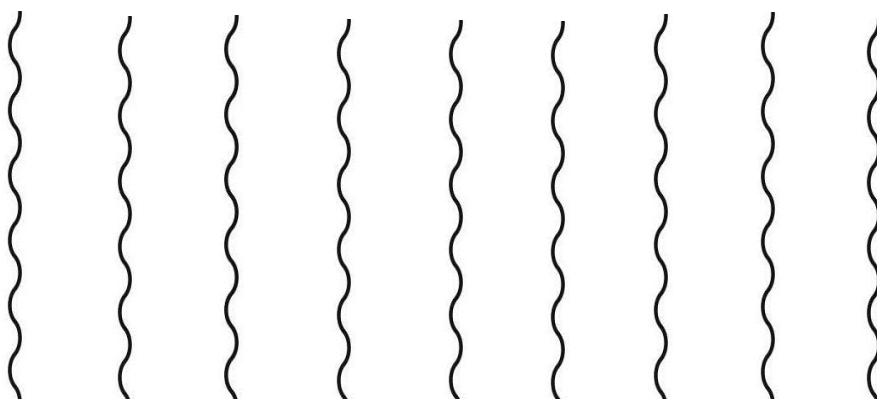
67. Shen DW, Fojo A, Chin JE, Roninson IB, Richert N, Pastan I, Gottesman MM (1986) Human multidrug-resistant cell lines: increased *mdr1* expression can precede gene amplification. *Science* 232(4750):643–645.

68. Singh N, Frey NV, Grupp SA, Maude SL (2016) CAR T cell therapy in acute lymphoblastic leukemia and potential for chronic lymphocytic leukemia. *Curr Treat Options Oncol* 17(6):28.

69. Spary LK, Al-Taei S, Salimu J, Cook AD, Ager A, Watson HA, Clayton A, Staffurth J, Mason MD, Tabi Z (2014) Enhancement of T cell responses as a result of synergy between lower doses of radiation and T cell stimulation. *J Immunol* 192(7):3101–3110.

70. Straathof KC, Pule MA, Yotnda P, Dotti G, Vanin EF, Brenner MK, Heslop HE, Spencer DM, Rooney CM (2005) An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood* 105:4247–4254.

71. Suerth JD, Maetzig T, Brugman MH, Heinz N, Appelt JU, Kaufmann KB, Schmidt M, Grez M, Modlich U, Baum C, Schambach A (2012) Alpharetroviral self-inactivating vectors:



long-term transgene expression in murine hematopoietic cells and low genotoxicity. *Mol Ther* 20 (5):1022–1032.

72. Suerth JD, Morgan MA, Kloess S, Heckl D, Neudörfl C, Falk CS, Koehl U, Schambach A (2016) Efficient generation of gene-modified human natural killer cells via alpharetroviral vectors. *J Mol Med (Berl)* 94(1):83–93.

73. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663–676.

74. Tano K, Shiota S, Collier J, Foote RS, Mitra S (1990) Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O6-alkylguanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(2):686–690.

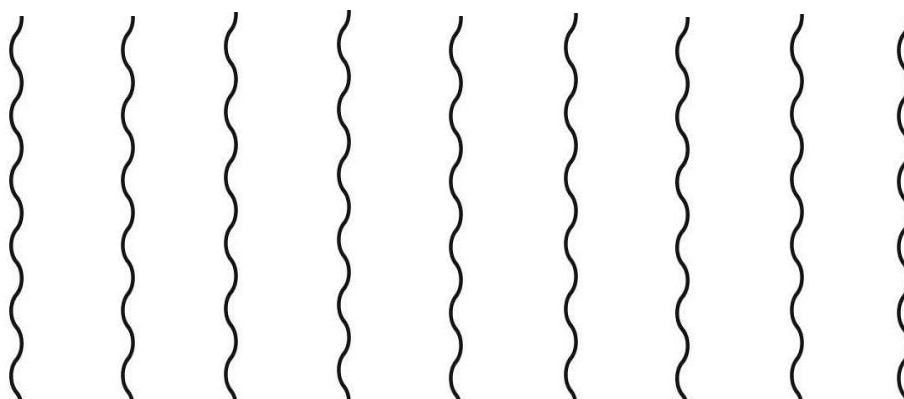
75. Töpfer K, Cartellieri M, Michen S, Wiedemuth R, Müller N, Lindemann D, Bachmann M, Füßel M, Schackert G, Temme A (2015) DAP12-based activating chimeric antigen receptor for NK cell tumor immunotherapy. *J Immunol* 194(7):3201–3212.

76. Uchiyama T, Adriani M, Jagadeesh GJ, Paine A, Candotti F (2012) Foamy virus vector-mediated gene correction of a mouse model of Wiskott-Aldrich syndrome. *Mol Ther* 20(6):1270–1279.

77. van der Merwe PA, Davis SJ (2003) Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol* 21:659–684.

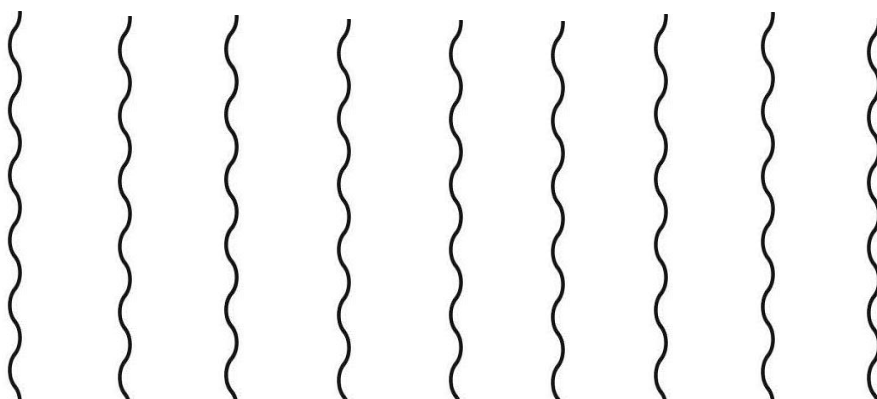
78. van Rhee F, Szmania SM, Zhan F, Gupta SK, Pomtree M, Lin P, Batchu RB, Moreno A, Spagnoli G, Shaughnessy J, Tricot G (2005) NY-ESO-1 is highly expressed in poor-prognosis multiple myeloma and induces spontaneous humoral and cellular immune responses. *Blood* 105(10):3939–3944.

79. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW (2013) Cancer genome landscapes. *Science* 339(6127):1546–1558.



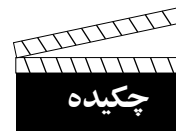


80. Vogler I, Newrzela S, Hartmann S, Schneider N, von Laer D, Koehl U, Grez M (2010) An improved bicistronic CD20/tCD34 vector for efficient purification and in vivo depletion of gene-modified T cells for adoptive immunotherapy. *Mol Ther* 18:1330–1338.
81. Wang X, Chang WC, Wong CW, Colcher D, Sherman M, Ostberg JR, Forman SJ, Riddell SR, Jensen MC (2011) A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells. *Blood* 118:1255–1263.
82. Wang J, Li T, Zhou M, Hu Z, Zhou X, Zhou S, Wang N, Huang L, Zhao L, Cao Y, Xiao M, Ma D, Zhou P, Shang Z, Zhou J (2015) TALENs-mediated gene disruption of FLT3 in leukemia cells: using genome-editing approach for exploring the molecular basis of gene abnormality. *Sci Rep* 5:18454.
83. Zhang C, Burger MC, Jennewein L, Genßler S, Schönfeld K, Zeiner P, Hattingen E, Harter PN, Mittelbronn M, Tonn T, Steinbach JP, Wels WS (2016) ErbB2/HER2-specific NK cells for targeted therapy of glioblastoma. *J Natl Cancer Inst* 108(5). pii: djv375.
84. Zhu Y, Tan Y, Ou R, Zhong Q, Zheng L, Du Y, Zhang Q, Huang J (2016) Anti-CD19 chimeric antigen receptor-modified T cells for B-cell malignancies: a systematic review of efficacy and safety in clinical trials. *Eur J Haematol* 96(4):389–396.

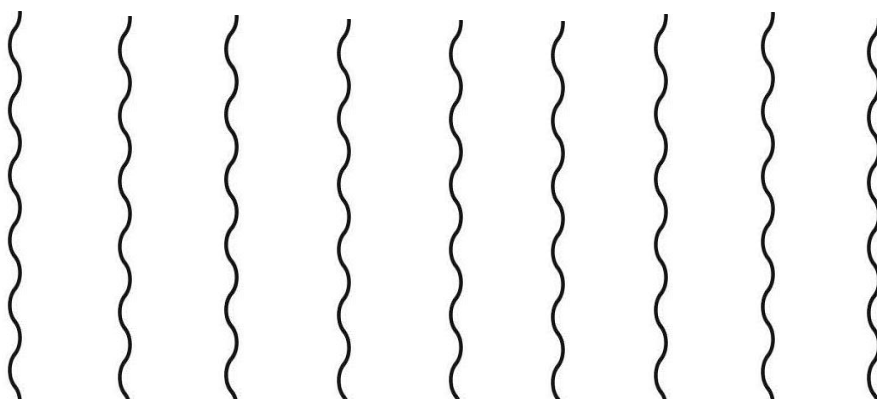


○ فصل سوم

RNAهای غیر کدکننده جهت ژن درمانی سرطان

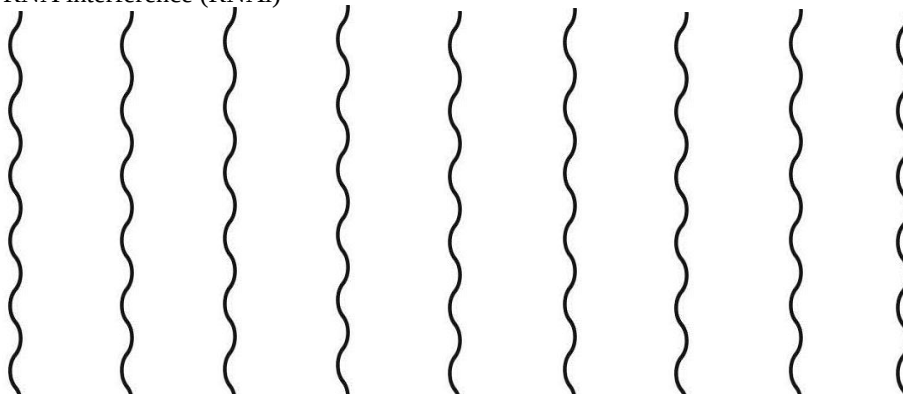


ژن درمانی یک رویکرد برای القا سطح بیان ژن در سلول‌های خاص جهت درمان بیماری‌های وراثتی انسان، انواع سرطان و نقص‌های اکتسابی است. زیرگروهی از RNAهای غیر کدکننده، میکروRNAها (miRNAs) و RNAهای کوچک مداخله‌گر (siRNAs)، رده مهمی از افکتورهای بسیار کاربردی برای ژن درمانی به خصوص در درمان سرطان را تشکیل می‌دهند. عملکرد از طریق مکانیزم RNA مداخله‌گر (RNAi)، miRNA و siRNA توانایی بالقوه‌ای را در خاموشی ژن عوامل سرطان‌زا برای ژن درمانی سرطان نشان می‌دهد. برای فهم بهتر این زمینه، ما مکانیزم و عملکرد زیستی، اصول طراحی و سنتز، و رویکردهای انتقال RNAهای غیر کدکننده به همراه پتانسیل‌های کلینیکی در ژن درمانی سرطان را مرور کرده‌ایم.



ژن درمانی^۱ روشی برای القا سطح بیان ژن، توسط مواد ژنتیکی خارجی وارد شده به سلول‌های خاص است تا انواع بیماری‌های انسانی مانند سرطان را درمان کنیم (۲۹). فراوان‌ترین ماده ژنتیکی مورد استفاده در ژن درمانی DNA و RNA است. مولکول‌های DNA که در ژن درمانی استفاده می‌شوند معمولاً ژن‌های مرتبط با بیماری (یا قطعات ژن) هستند که اثرات عملیاتی خاصی را کسب نموده‌اند، مانند الیگونوکلوئوتیدهای آنتی‌سنس^۲ جهت خاموش سازی ژن هدف. در مورد RNA، یک زیرگروه از RNA های غیر کدکننده^۳، میکرو RNA (miRNA)^۴ و RNA مداخله گر کوچک (siRNA)^۵، به عنوان فاکتورهای مشهور برای ژن درمانی ظهور یافته‌اند (جدول ۱) (۱، ۴۰). آن‌ها RNA هایی با وزن مولکولی کم هستند که پتانسیل کد کردن پروتئین را ندارند. آن‌ها نشان داده‌اند که اعمال زیستی بالقوه دارند که با مکانیزم تداخل RNA (RNAi)^۶ تکمیل می‌شود، که فرایندی است که با مولکول‌های RNA دورشته‌ای شروع می‌شود و امروزه تأیید شده است که روشی قوی برای کاهش بیان mRNA کدکننده عوامل بیماری‌زایی می‌باشد (۲۲).

-
1. Gene Therapy
 2. Antisense Oligonucleotides
 3. noncoding RNAs
 4. microRNA (miRNA)
 5. small interference RNA (siRNA)
 6. RNA interference (RNAi)





جدول ۱- ویژگی های RNA غیر کدکننده جهت ژن درمانی سرطان

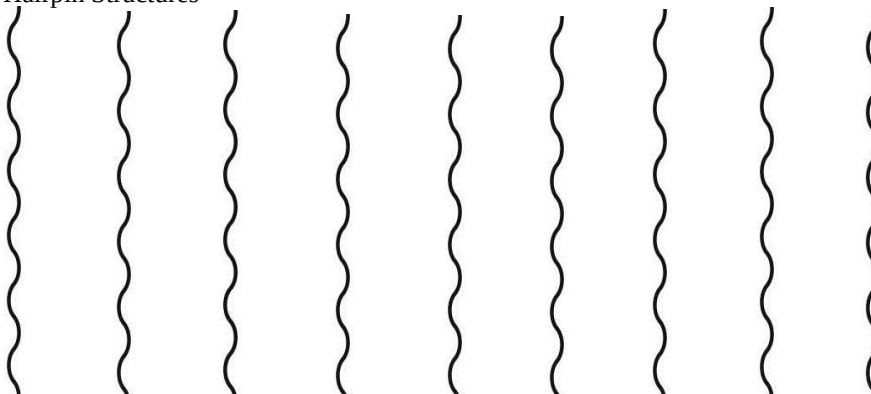
shRNA	siRNA	microRNA	
۲۷-۲۵ نوکلئوتید	۲۱ نوکلئوتید	اولیه (طویل)، پیشرو (۷۰ نوکلئوتید)، بالغ (۱۸-۲۵ نوکلئوتید)	طول
سنگاق سری	دورشته ای	اولیه (دارای یک سنگاق سر)، پیشرو (سنگاق سری)، بالغ (دورشته ای)	ساختار RNA
طراحی مصنوعی	طراحی مصنوعی	تعیین بوسیله توالی seed	هدف گیری اختصاصی
بیان ویروسی	سنتز شیمیایی	سنتز شیمیایی، بیان ویروسی، بیان ترانس ژن	محصول
ناقل ویروسی	ناقل غیر ویروسی	ناقلین ترانس ژن، ویروسی و غیر ویروسی	روش انتقال

مکانیزم و عمل RNA غیر کدکننده

miRNAها RNAهای کوچک غیر کدکننده داخلی با طول ۱۸-۲۵ نوکلئوتید هستند که بیان ژن را به صورت اختصاصی از طریق تجزیه mRNA هدف یا ممانعت از ترجمه پروتئین تنظیم می کنند (۸، ۱۴، ۲۷).

بیشتر ژن های miRNA توسط RNA Pol II نسخه برداری می شوند تا رونوشت اولیه miRNA (pri-miRNA)^۱ را تولید کنند که حاوی کلاهک ۵' و دم پلی A ۳' است. pri-miRNA ساختار سنگاق سری^۳ و توالی های احاطه کننده را دارد، که بعداً درون هسته توسط Drosha و DGCR8/Pasha تجزیه می شوند تا پیش ساختار سنگاق سری ۷۰ نوکلئوتیدی را تولید کنند که با نام pri-miRNA شناخته می شود.

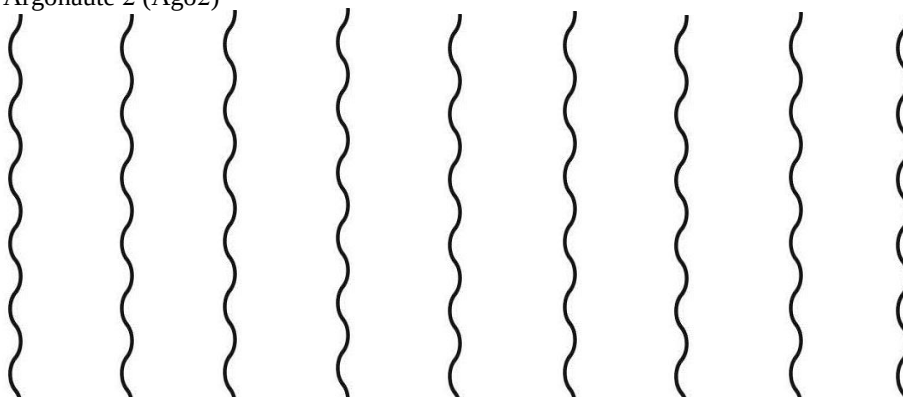
1. Primary-miRNA
2. 5'cap and a 3'poly(A) tail
3. Hairpin Structures

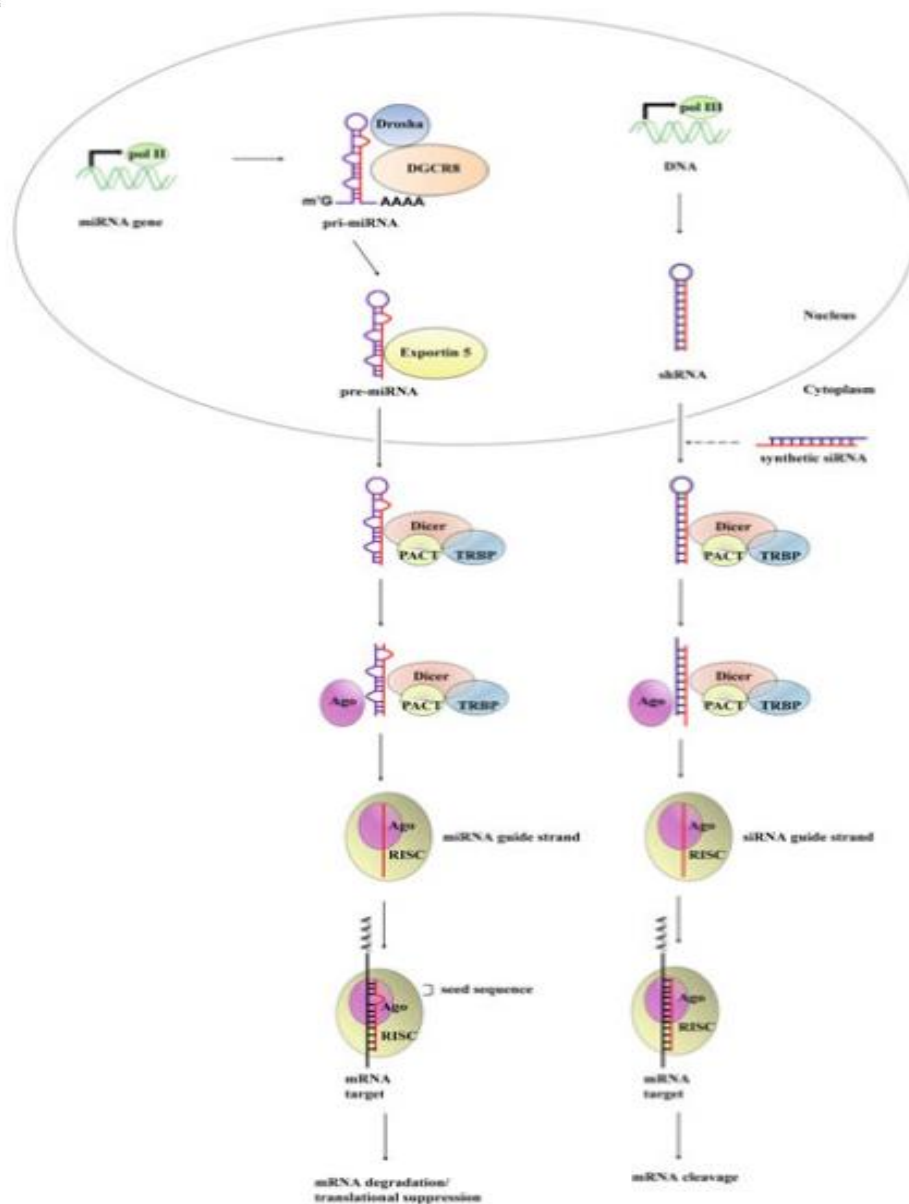


سپس، pri-miRNA توسط اکسپورتین-۵^۱ به سیتوپلاسم فرستاده شده و بعداً توسط آنزیم RNase III با نام Dicer، و TRBP (پروتئین متصل به TAR-RNA)^۲ یا لوکایوس^۳ و PACT (فعال کننده پروتئینی PKR)^۴ در سلول انسان به دوپلکس miRNA:miRNA*^{۲۲} نوکلئوتیدی بالغ، تجزیه می شود (۲۰، ۴۴، ۴۶، ۴۷).

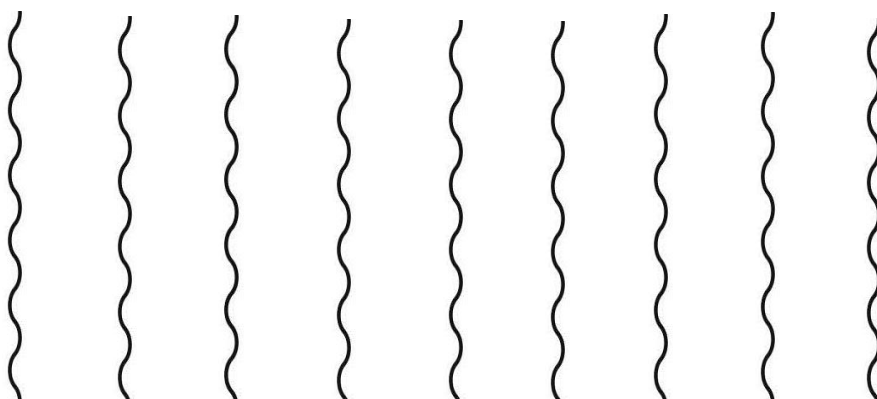
در نتیجه، یک کمپلکس خاموشی القا شده توسط RNA به نام RISC^۵ با پروتئین آرگونات ۲ (Ago)^۶ مونتاژ می شود. رشته miRNA به صورت انتخابی به کمپلکس RISC وارد شده و کمپلکس را به صورت اختصاصی به سمت اهداف mRNA خودش از طریق برهمکنش جفت شدن باز مکمل بین توالی های seed (باز ۲ تا ۸ نوکلئوتیدی موجود در انتهای ۵' miRNA بالغ) و ناحیه اتصال درون mRNA هدف هدایت می کند. از طریق این مکانیزم، آن ها اعمال خاموشی خودشان را یا با تجزیه mRNA یا ممانعت از ترجمه انجام می دهند (شکل ۱) (۳۴).

1. Exportin-5
2. TRBP (TAR-RNA Binding Protein)
3. Loquacious
4. PACT (Protein Activator of PKR)
5. RNA-induced Silencing Complex
6. Argonaute 2 (Ago2)





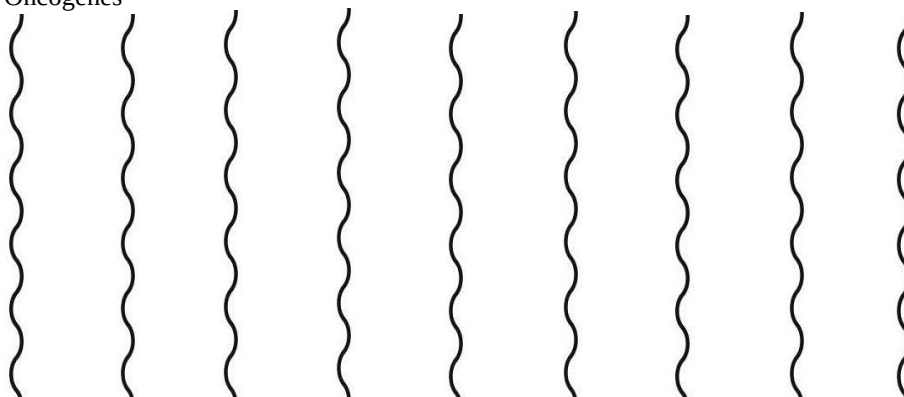
شکل ۱- فرایند بیوژنز و مکانیزم RNAi از miRNA و siRNA/shRNA.



بیشتر ژن‌های miRNA توسط RNA پلیمراز II (pol II) رونویسی می‌شوند تا رونوشت miRNA اولیه (pri-miRNAs) را تولید کنند که حاوی کلاهِک ۵' و دم پلی ۳'A است. pri-miRNA ها بعداً درون هسته توسط Drosha و DGCR/Pasha برش خورده تا پیش ساختار ۷۰ نوکلئوتیدی سنجاق سری را که pre-miRNA نام دارد را تولید کنند. Pre-miRNA توسط اکسپورتین-۵ به سیتوپلاسم فرستاده می‌شود و بعداً توسط Dicer و شریک‌های TRBP و PACT به دوپلکس * miRNA: ۲۲ نوکلئوتیدی برش می‌خورد. در نتیجه، یک کمپلکس خاموشی القا شده توسط RNA به نام RISC با پروتئین آرگونات (Ago) مونتاژ می‌شود. رشته miRNA (رشته راهنما) به صورت انتخابی درون کمپلکس RISC وارد شده و کمپلکس را به سمت اهداف mRNA از طریق برهمکنش‌های جفت بازی بین توالی seed (باز ۲ تا ۸ در انتهای ۵' miRNA بالغ) و ناحیه اتصال درون mRNA هدف هدایت می‌کند. mRNA هدف با تجزیه mRNA یا ممانعت از ترجمه خاموش می‌شود. در حالت مشابه، shRNA با ساختار ساقه-حلقه توسط RNA پلیمراز III رونویسی می‌شود. در سیتوپلاسم، shRNA و siRNA سنتزی مورد هدف فراوری توسط Dicer و شریک‌های TRBP و PACT هستند تا به siRNA ۲۱ نوکلئوتیدی دورشته‌ای تبدیل شوند. رشته راهنما siRNA برای برش هدف و خاموشی ژن توسط مکانیزم RNAi، درون RISC مونتاژ می‌شود. siRNA، miRNA، RNA مداخله‌گر کوچک، shRNA، RNA سنجاق سری کوتاه، RISC، کمپلکس خاموشی القا شده توسط RNA.

miRNA ها دامنه وسیعی از اعمال فیزیولوژیکی را به خصوص در زیست‌شناسی سرطان نشان می‌دهند (۲۱). بعضی از miRNA ها به عنوان انکوژن^۱ یا سرکوبگر

1. Oncogenes

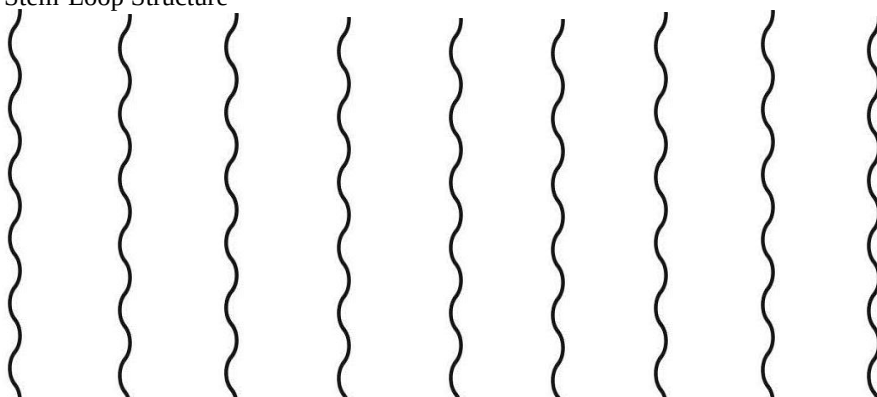




تومور^۱ عمل می کنند. برای مثال، انکوژن miR-21 در سلول های سرطانی افزایش بیان می یابد، رشد سلولی را القا می کند و آپوپتوز^۲ را سرکوب می کند (۱۹). خانواده سرکوبگر تومور let-7 معمولاً کاهش بیان می یابد یا در انواعی از سرطان حذف می شود، و بازیابی بیان let-7 به بازگشت تومور منجر می شود. خانواده miR-200 به خوبی شناخته شده است که با متاستاز^۳ و آپوپتوز سلول سرطانی مرتبط است. بر اساس دانش ما، تلاش هایی برای افزایش بیان miRNA سرکوبگر تومور صورت گرفته است و از miRNA های انکوژن ممانعت به عمل آمده تا سرطان ها را درمان کنند که نتایج مثبتی را به دست آورده اند (۷، ۱۷، ۳۳). اسلک و همکاران، انکوژن let-7 را به مدل های تثبیت شده موش با سلول سرطان ریه غیرکوچک^۴ منتقل کردند و به صورت معنی داری تکثیر تومور را کاهش دادند. نالدینی و همکاران، از لحاظ عملکردی بیان miR-233 را با ورود miRNA هدف به مدل های موش حذف کردند. روش های ورود موفق miRNA ها در شرایط in vivo امکان اینکه miRNA به عنوان کاندید خوبی برای درمان سرطان عمل کند را فراهم کرده اند (۴۴).

مشابه miRNA ها، siRNA و shRNA ها نیز واسطه های بالقوه خاموشی توالی ژن اختصاصی توسط مکانیزم RNAi هستند. siRNA یک RNA کوچک دورشته ای با طول ۲۱ نوکلئوتید است. به صورت خارجی به عنوان الیگونوکلئوتید سنتز می شود، یا توسط RNA سنجاق سری کوتاه ۲۵ تا ۲۷ نوکلئوتیدی (shRNA)^۵ از ناقل DNA بیان می شود. رونوشت shRNA یک ساختار ساقه-حلقه^۶ را تشکیل می دهد که بعداً توسط Dicer فراوری شده تا به siRNA ۲۱ نوکلئوتیدی دورشته ای تبدیل شود. در

1. Tumor Suppressors
2. Apoptosis
3. Metastasis
4. non-small Cell Lung Cancer
5. short hairpin RNA (shRNA)
6. Stem-Loop Structure

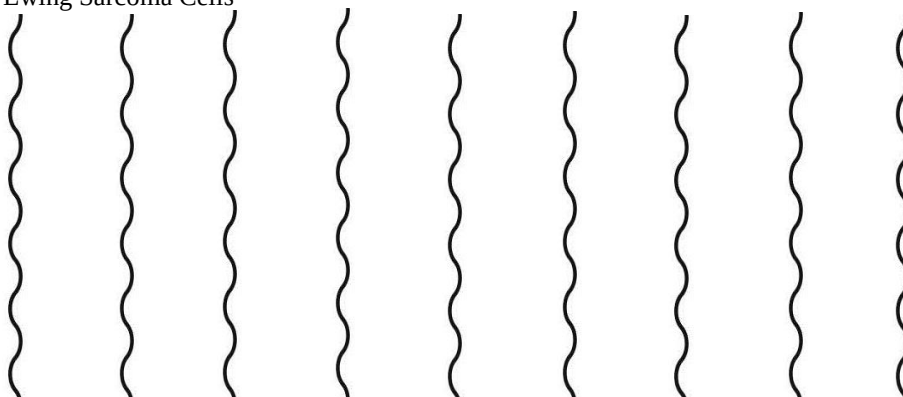


ادامه، رشته راهنما عملکردی siRNA درون RISC برای خاموشی هدف با مکانیزم RNAi مونتاژ می‌شود (شکل ۱) (۱۶، ۲۷، ۳۳، ۴۴). برهمکنش‌های siRNA و اهداف آن‌ها بر اساس مکمل شدن^۱ کامل جفت بازهاست، که از miRNA متفاوت است. اعمال زیستی siRNA ها اصولاً به ژن‌های هدفشان بستگی دارد، زیرا siRNA می‌تواند به صورت منعطفی طراحی و ساخته شود تا عمل هر کدام از رونوشت‌ها را از لحاظ نظری مورد هدف و القا قرار دهد (۱۱، ۲۶، ۱۰). تاکنون، siRNA به صورت گسترده در ژن درمانی سرطان با هدف‌گیری انکوژن مانند BCL-2 (در لوکمیا میلوئید حاد)^۲، گیرنده تیروزین کیناز^۳ ژن EphA2 (در سلول‌های سرطانی تخمدان)^۴، و اتصال ژن Ews-Fli1 (در سلول‌های سارکوما Ewing)^۵ استفاده شده است (۲۱، ۳۹، ۴۵).

طراحی و سنتز RNA غیرکدکننده برای ژن درمانی سرطان

برای ژن درمانی، راندمان بیشتر مواد ژنتیکی خارجی با سازگاری بوسیله ماشین سلول داخلی تعیین می‌شود تا اعمال خودشان را انجام دهند، مانند انواع روش‌های انتقال ژن. ولی چند اثر جانبی miRNA و siRNA در ژن درمانی سرطان گزارش شده است، که شامل اثرات غیرهدف، القا پاسخ‌های سیستم ایمنی و اشباع اجزای مسیر RNAi داخلی است (۴، ۱۶). اثرات جانبی گاهی می‌تواند باعث عوارض کلینیکی شدید شود، بنابراین کاربرد RNA های غیرکدکننده را در ژن درمانی محدود می‌کند. برای به حداکثر رساندن راندمان و حداقل کردن اثرات جانبی، زمانی که RNA غیرکدکننده را برای ژن درمانی سرطان طراحی می‌کنیم، لازم است که از بعضی قوانین پیروی

1. Complementarity
2. Chronic Myeloid Leukemia
3. Tyrosine Kinase Receptor
4. Ovarian Cancer Cells
5. Ewing Sarcoma Cells



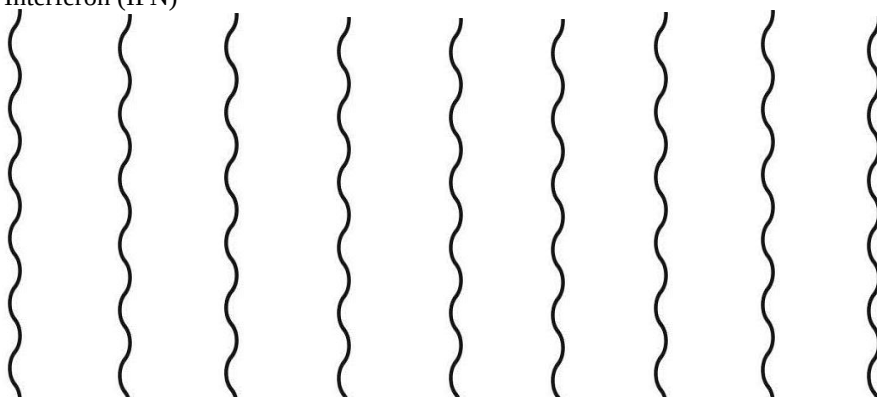


کنیم. عموماً، در نظر گرفتن توالی‌های هدف، طول، و تغییر شیمیایی انتهای ۳' و ۵' RNA غیر کدکننده عوامل بسیار مهمی می‌باشند (۴۳).

miRNA مصنوعی معمولاً به شکل pri-miRNA یا pre-miRNA^۱ هستند. توالی‌های هدف آن‌ها (یعنی توالی‌های seed) با طبیعت miRNA اختصاصی، تعیین می‌شوند. برای siRNA سنتزی و shRNA بیان شده، توالی‌های هدف‌گیری شده کاملاً با توالی‌های mRNA هدف مکمل هستند و توسط آن‌ها تعیین می‌شوند. پایگاه اطلاع رسانی TRC که توسط مؤسسه Broad ایجاد شده است (The RNAi Consortium, <http://www.broadinstitute.org/rnai/public/>) مانند بعضی از سازندگان siRNA تجاری، ابزار آنالینی را ایجاد کرده‌اند که به طراحی اختصاصی و توالی‌های هدف بالقوه siRNA بر اساس توالی هدف mRNA، ساختار ثانویه، پایداری siRNA و به حداقل رساندن اثرات غیرهدف وابسته به توالی کمک می‌کند (۲۳). به علاوه، هنگام طراحی توالی‌های هدف برای یک ژن مورد نظر، باید همیشه توجه کنید که از اثرات محرک ایمنی توالی‌های سنتزی ممانعت به عمل آورید. گزارش شده است که ترانسفکشن^۲ siRNA، پاسخ‌های اینترفرون (IFN)^۳ را برانگیخته است. رویکردی برای به حداقل رساندن این اثر جانبی ممانعت از توالی‌های محرک ایمنی در طراحی siRNA، مانند 5'-GUCCUCAA-3' و 5'-UGUGU-3' است (۶، ۲۰، ۲۸).

علاوه بر توالی‌های هدف‌گیری شده، طول و تغییر انتهای ۳' و ۵' RNA غیر کدکننده برای ژن درمانی سرطان هم به توجه نیاز دارد. گزارش شده است که RNAهای دورشته‌ای ۲۷ جفت بازی می‌توانند تا بیش از ۱۰۰ مرتبه نسبت به siRNA ۲۱ تایی پتانسیل بیشتری داشته باشند که به دلیل فراوری مناسب با Dicer

1. precursor-miRNA
2. Transfection
3. Interferon (IFN)

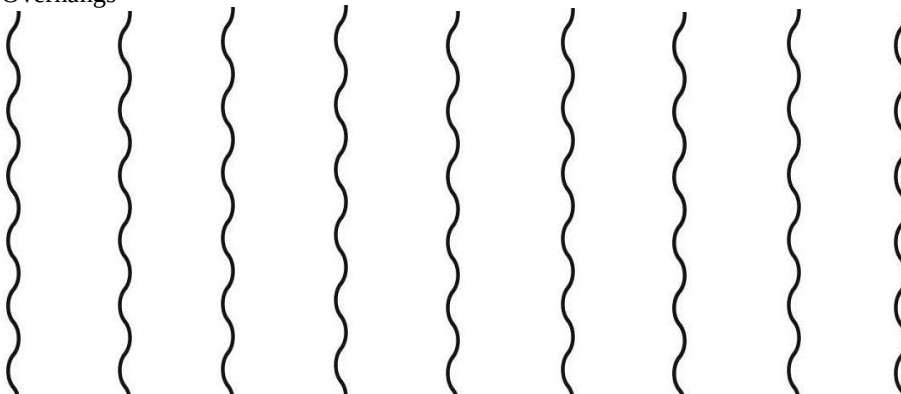


و شرکت نوکلئوتیدهای DNA در siRNA همچنین فراوری بیشتر Dicer است. برای کاهش تولید اینترفرون در سلول‌های هدف، ممانعت از تری فسفات ۵' siRNA با سنتز شیمیایی باید در نظر گرفته شود (۳، ۸، ۹، ۱۲). در حالت مشابه، دو نوکلئوتید پیش آویز ۳' اثر القا اینترفرون را با شباهت به محصولات داخلی که توسط Dicer فراوری می‌شود (مانند miRNA بالغ) کاهش می‌دهد. به علاوه، تغییر 2'-O-methyl از siRNA پایداری را افزایش می‌دهد و اختصاصیت هدف‌گیری را حفظ می‌کند، ولی تولید اینترفرون را کاهش می‌دهد. اتصال کلسترول به رشته سنس دوپلکس siRNA تغییر عمومی دیگری است که می‌تواند رویکرد موفق‌تری برای افزایش راندمان انتقال سیستمیک با ایجاد جذب siRNA توسط کبد باشد (۱۰، ۱۷، ۳۵، ۴۵).

انتقال RNA غیر کدکننده برای ژن‌درمانی سرطان

به جز ساختارهای شیمیایی (توالی RNA و تغییر انتهایی)، روش انتقال *in vivo* عامل ضروری دیگری است که بر راندمان RNA غیر کدکننده بر ژن‌درمانی سرطان اثر می‌گذارد. موانع انتقال *in vivo* شامل محافظت از هضم نوکلئازهای درونی، فرار از ردیابی ایمنی، و القاتراوش از رگ‌های خونی به بافت‌ها و سلول‌های هدف است (۹). برای غلبه بر این موانع، انواعی از روش‌های انتقال *in vivo* برای RNA غیر کدکننده ایجاد شده است (جدول ۲) (۱۱).

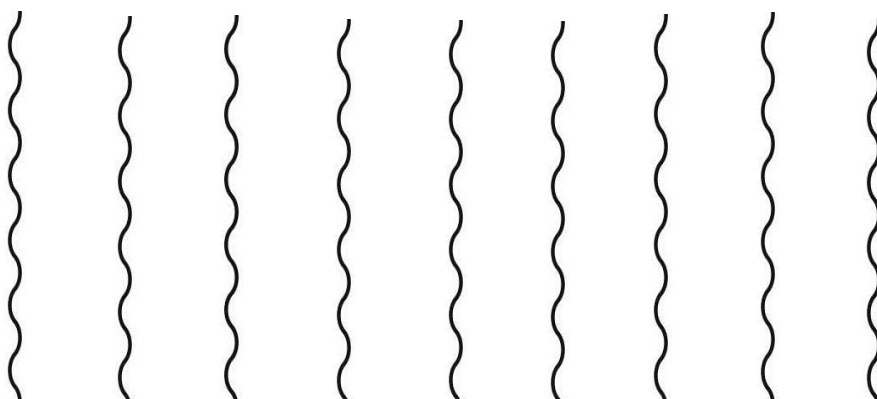
1. Overhangs





جدول ۲- روش های انتقال RNA غیر کدکننده جهت ژن درمانی سرطان

روش انتقال	نوع RNA منتقل شده	مزایا	معایب
لخت (بدون پوشش)	miRNA, siRNA	بدون نیاز به حامل	نیازمند به مقدار زیاد
حاملین بر پایه لیپید	miRNA, siRNA	انتقال انتخابی، قوی و موثر	مراحل آماده سازی پیچیده
پلیمرزوم	siRNA	انتقال انتخابی، قوی و موثر	مراحل آماده سازی پیچیده
پپتیدهای نفوذکننده به سلول	miRNA	انتقال انتخابی و موثر	هزینه بر و مراحل آماده سازی پیچیده
نانوذرات غیر آلی	siRNA	مراحل آماده سازی آسان	کارایی اندک و گاهی سمی
ناقلین ویروسی	miRNA, shRNA	انتقال موثر و بیان پایدار	خطر ایمنی زیستی و ایمنوژنیک
ترانس ژن	miRNA	بیان پایدار و غیرایمنوژنیک	فقط در جهت اهداف تحقیقاتی انجام می شود



مولکول‌های RNA غیرکدکننده به سادگی به شکل لخت (بدون پوشش)^۱ در دز نسبتاً بالا، قابل انتقال هستند؛ برای مثال، دز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با ممانعت‌کننده انکومیر^۲ miR-10b (آنتاگومیر-10b)^۳ از طریق رگ تزریق شد، و به صورت موفقیت‌آمیزی متاستاز سرطان سینه موش را با خاموش کردن miR-10b داخلی سرکوب کرد (۳۴، ۴۰). برای محافظت از RNA غیرکدکننده از تجزیه و افزایش راندمان انتقال، انواعی از ناقلین سنتزی ایجاد شده‌اند، مانند حاملین بر پایه لیپید^۴، پلیمرزوم‌ها^۵، پپتیدهای نفوذکننده به سلول^۶، و نانوذرات غیر آلی^۷. با استفاده از نانولیپوزوم‌ها 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DOPC)^۸، کالین و همکاران، انتقال موفق هر دو miR-520d-3p و siRNA هدف‌گیری EphA2 را به مدل موش بیان کردند و دریافتند که درمان دوگانه در راندمان ضد تومور نسبت به تک‌درمانی توان بیشتری دارد به این خاطر که به صورت همزمان هر دو ژن سرطانی EphA2 و EphB2 را مورد هدف قرار می‌دهند (Nishimura et al. 2013). (۶، ۱۱، ۴۸). ناقلین ویروسی هم به صورت گسترده برای بیان RNA غیرکدکننده در شرایط *in vivo* استفاده شده‌اند. معمولی‌ترین ناقلین ویروسی مورد استفاده برای این هدف شامل: رتروویروس‌ها^۹، لنتی‌ویروس‌ها^{۱۰}، آدنوویروس‌ها^{۱۱} و ویروس مرتبط با آدنو^{۱۲} است (۱۶). با استفاده از این ناقلین ویروس مرتبط با آدنو، اجرای سیستمیک

1. Naked Delivery

2. Oncomir

3. antagomiR-10b

4. Lipid-Based Carriers

5. Polymersomes

6. Cell-Penetrating Peptides

7. Inorganic nanoparticles

8. nanoliposomes 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DOPC)

9. Retrovirus

10. Lentivirus

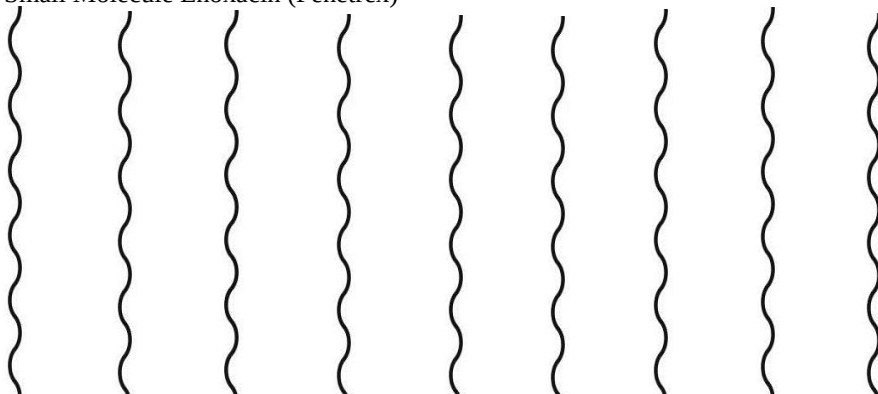
11. Adenovirus

12. Adeno-Associated Virus (AAV)

miR-26a در مدل مدش دارای سرطان کبد^۱ منجر به رشد با تأخیر و القا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی شد (۲۲). با یک ناقل آدنوویروس، اسلاک و همکاران به صورت موفقیت‌آمیزی let-7 خارجی را به مدل‌های موش تثبیت شده با سلول‌های سرطان ریه انتقال دادند و به صورت معنی‌داری تکثیر تومور را کاهش دادند (۲۱). نالدینی و همکاران فناوری‌هایی را برای حذف بیان miRNA به صورت عملی ارائه دادند به این ترتیب که اهداف miRNA مصنوعی را توسط ناقلین لنتی‌ویروس به مدل‌های موش وارد کردند (۲). به علاوه، روش‌های جدید برای انتقال *in vivo* از RNA غیرکدکننده به سرعت در حال توسعه هستند. مطالعه اخیر توسط اسلاک و همکاران، یک سازه جدید، اتصال ضد miR نوکلئیک‌اسید پپتیدی به یک پپتید با ساختار بین غشایی القا شونده توسط pH کم را گزارش کردند که می‌توانست یک anti-miR-155 را در عرض غشاهای پلاسمایی تحت شرایط اسیدی انتقال دهند و رشد تومور را کم کند (۴۳، ۴۷). این روش می‌تواند به صورت انتخابی anti-miR را به ریزمحیط تومور اسیدی مورد هدف قرار داده، از پاکسازی سیستمی توسط کبد فرار کرده، و ورود به سلول را از طریق مسیر غیر داخل سلولی تسهیل کند (۱۳). این کشف که یک انوکسازین کوچک (پنترکس)^۲ می‌تواند فعالیت مسیر RNAi را افزایش دهد می‌تواند به افزایش راندمان انتقال miRNA و siRNA در شرایط *in vivo* کمک کند (۵۰). در تحقیقات اخیر، از فناوری حیوانات تراریخته به فراوانی به کار گرفته شده است تا عمل RNA غیرکدکننده را در تیمار سرطان مطالعه کند.

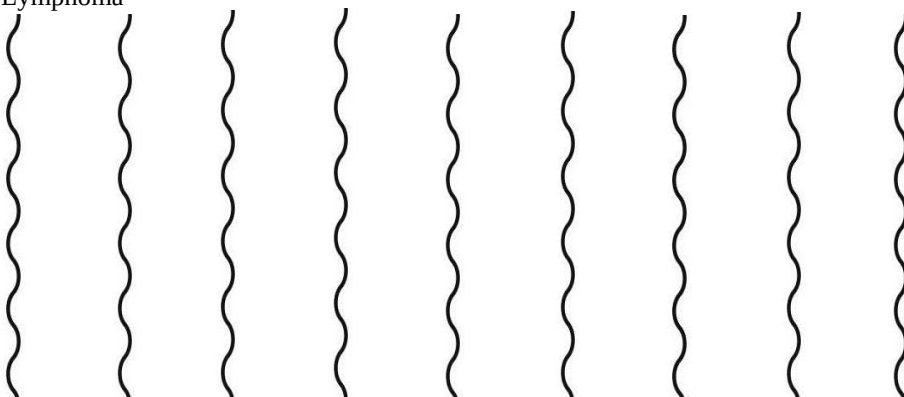
1. Liver cancer

2. Small Molecule Enoxacin (Penetrex)



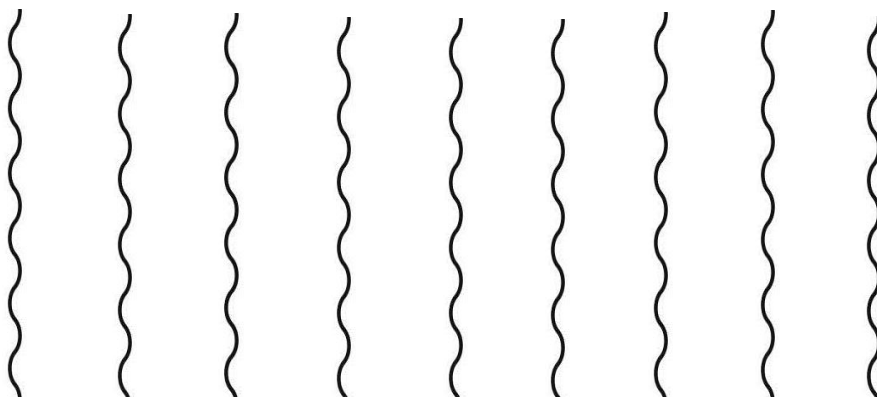
بیان قابل القا miR-21 در یک مدل موش تراریخته، نقش انکوژنی این miRNA را در لیمفوما^۱ پیش سلول B القاشده نشان داد و از تلاش‌های درمان سرطان انسان از طریق غیرفعالسازی دارویی miRNA مانند miR-21 حمایت کرد. روش تراریختی داده‌های تحقیق ارزشمند و تجربه کاربردی را برای آزمایشات کلینیکی مرتبط فراهم کرد (۳۴).

1. Lymphoma





miRNA و siRNA یک رده گسترده از افکتورهای غیرکدکننده برای ژن درمانی سرطان را ارائه می دهند. هر دو آن ها از مکانیزم RNAi استفاده می کنند تا اعمال زیستی خودشان را در درمان سرطان اجرا کنند. راندمان miRNA و siRNA به چند عامل مانند توالی هدف، تغییر انتهایی، و روش انتقال سیستمیک بستگی دارد. فهم برهمکنش بین RNA غیرکدکننده و اهدافشان در آزمایشات کلینیکی به کار رفته است (۳۹). تاکنون، siRNA هدف گیری شده برای BCL-2 (مانند لوکمیا میلوئید حاد)، VEGF (تومور جامد) و PLK1 (مانند تومور کبد) در حال بررسی یا آزمایش کلینیکی کامل (از ClinicalTrials.gov) هستند. با پیشرفت در این مطالعات، به نظر می رسد که RNA غیرکدکننده در زمینه ژن درمانی سرطان سهم بیشتری دارد.

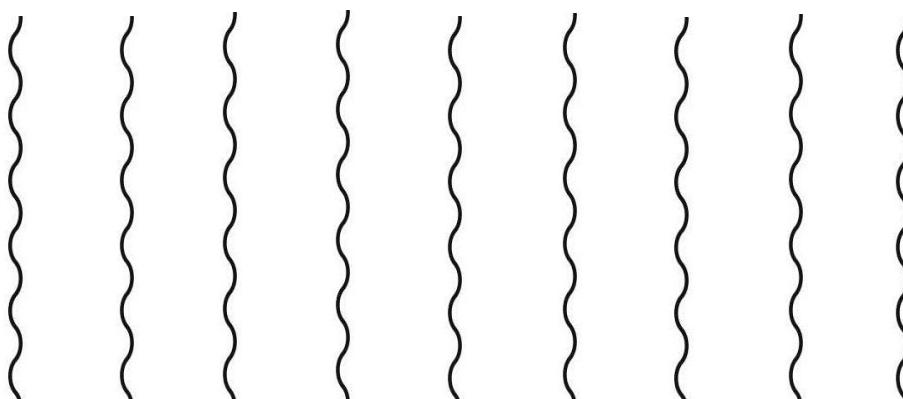


منابع

1. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10(12):1957–1966.
2. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS (2005) MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 65(14):6029–6033.
3. Cheng CJ, Bahal R, Babar IA et al (2015) MicroRNA silencing for cancer therapy targeted to the tumour microenvironment. *Nature* 518(7537):107–110.
4. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH et al (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432(7014):231–235.
5. Du T, Zamore PD (2005) microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 132(21):4645–4652
6. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W et al (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411(6836):494–498.
7. Esquela-Kerscher A, Trang P, Wiggins JF et al (2008) The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell Cycle* 7(6):759–764.
8. Fire A, Xu S, Montgomery MK et al (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669):806–811.
9. Gentner B, Schira G, Giustacchini A et al (2009) Stable knockdown of microRNA in vivo by lentiviral vectors. *Nat Methods* 6(1):63–66.

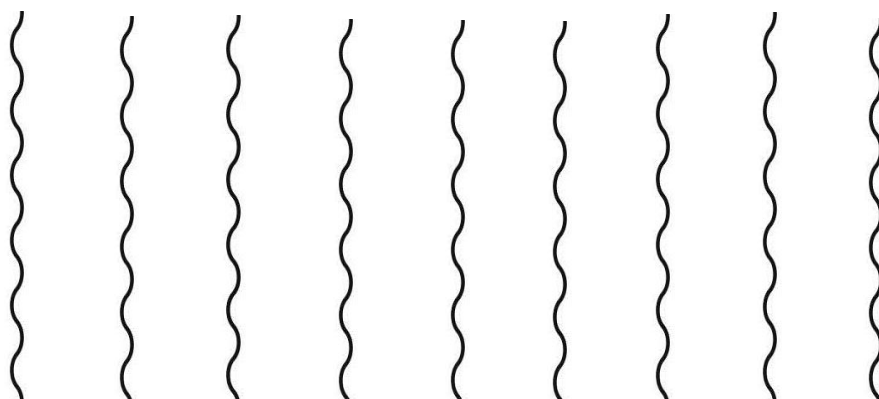
10. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G et al (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432(7014):235–240.
11. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N et al (2005) Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123(4):631–640.
12. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL et al (2008) The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 10(5):593–601.
13. Grimm D, Streetz KL, Jopling CL et al (2006) Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441(7092):537–541.
14. Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C et al (2005) Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 11 (3):263–270.
15. Hu-Lieskovan S, Heidel JD, Bartlett DW et al (2005) Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 65(19):8984–8992.
16. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE et al (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293(5531):834–838.
17. Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G et al (2007) The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res* 67(16):7713–7722.
18. Judge AD, Sood V, Shaw JR et al (2005) Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 23(4):457–462.

19. Judge AD, Bola G, Lee AC et al (2006) Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Mol Ther* 13(3):494–505.
20. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E et al (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15 (20):2654–2659.
21. Khan AA, Betel D, Miller ML et al (2009) Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nat Biotechnol* 27(6):549–555.
22. Kim DH, Longo M, Han Y et al (2004) Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nat Biotechnol* 22(3):321–325.
23. Kim DH, Behlke MA, Rose SD et al (2005) Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol* 23(2):222–226.
24. Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA et al (2009) Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* 137(6):1005–1017.
25. Krichevsky AM, Gabriely G (2009) miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med* 13 (1):39–53.
26. Kumar MS, Erkeland SJ, Pester RE et al (2008) Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(10):3903–3908.
27. Landen CN Jr, Chavez-Reyes A, Bucana C et al (2005) Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer Res* 65(15):6910–6918.
28. Lee Y, Ahn C, Han J et al (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425(6956):415–419.

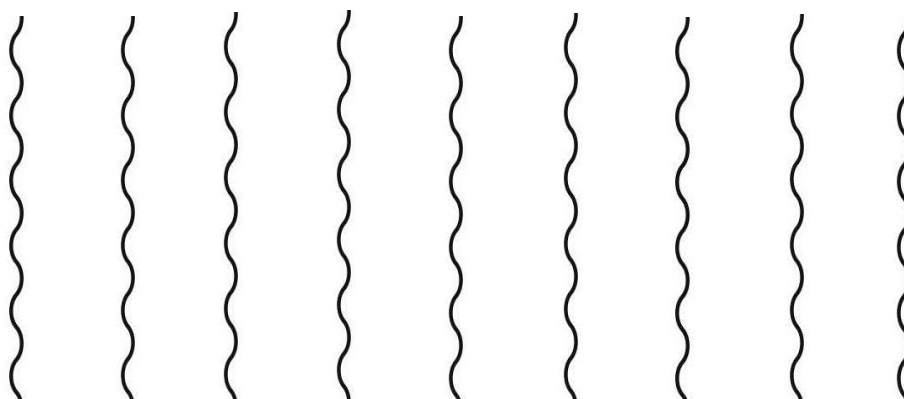




29. Lee Y, Kim M, Han J et al (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23(20):4051–4060.
30. Lee CC, MacKay JA, Frechet JM et al (2005) Designing dendrimers for biological applications. *Nat Biotechnol* 23(12):1517–1526.
31. Li W, Szoka FC Jr (2007) Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharm Res* 24 (3):438–449.
32. Ma L, Reinhardt F, Pan E et al (2010) Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat Biotechnol* 28(4):341–347.
33. Maniataki E, Mourelatos Z (2005) A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev* 19(24):2979–2990.
34. Marques JT, Devosse T, Wang D et al (2006) A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 24(5):559–565.
35. Martin ME, Rice KG (2007) Peptide-guided gene delivery. *AAPS J* 9(1):E18–E29.
36. Medina PP, Nolde M, Slack FJ (2010) OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature* 467(7311):86–90.
37. Morrissey DV, Lockridge JA, Shaw L et al (2005) Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* 23(8):1002–1007.
38. Nishimura M, Jung EJ, Shah MY et al (2013) Therapeutic synergy between microRNA and siRNA in ovarian cancer treatment. *Cancer Discov* 3(11):1302–1315.
39. Park SM, Gaur AB, Lengyel E et al (2008) The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* 22(7):894–907.

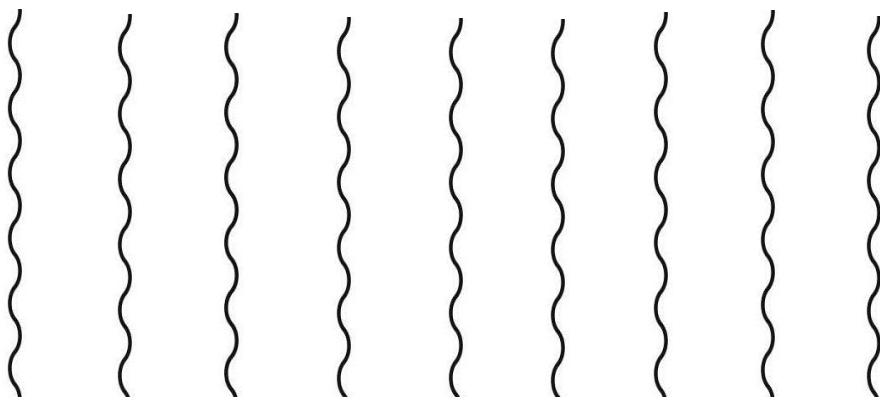


40. Robbins M, Judge A, MacLachlan I (2009) siRNA and innate immunity. *Oligonucleotides* 19 (2):89–102.
41. Schickel R, Park SM, Murmann AE et al (2010) miR-200c regulates induction of apoptosis through CD95 by targeting FAP-1. *Mol Cell* 38(6):908–915.
42. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T et al (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115(2):199–208.
43. Shan G, Li Y, Zhang J et al (2008) A small molecule enhances RNA interference and promotes microRNA processing. *Nat Biotechnol* 26(8):933–940.
44. Sledz CA, Holko M, de Veer MJ et al (2003) Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5(9):834–839.
45. Sokolova V, Eppler M (2008) Inorganic nanoparticles as carriers of nucleic acids into cells. *Angew Chem Int Ed Engl* 47(8):1382–1395.
46. Soutschek J, Akinc A, Bramlage B et al (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432(7014):173–178.
47. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K et al (2004) Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 64 (11):3753–3756.
48. Trang P, Medina PP, Wiggins JF et al (2010) Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene* 29(11):1580–1587.
49. Yang N, Kaur S, Volinia S et al (2008) MicroRNA microarray identifies Let-7i as a novel biomarker and therapeutic target in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 68 (24):10307–10314.
50. Zamecnik PC, Stephenson ML (1978) Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a



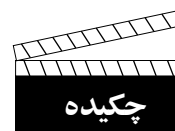


specific oligodeoxynucleotide. Proc Natl Acad Sci U S A
75(1):280–284.

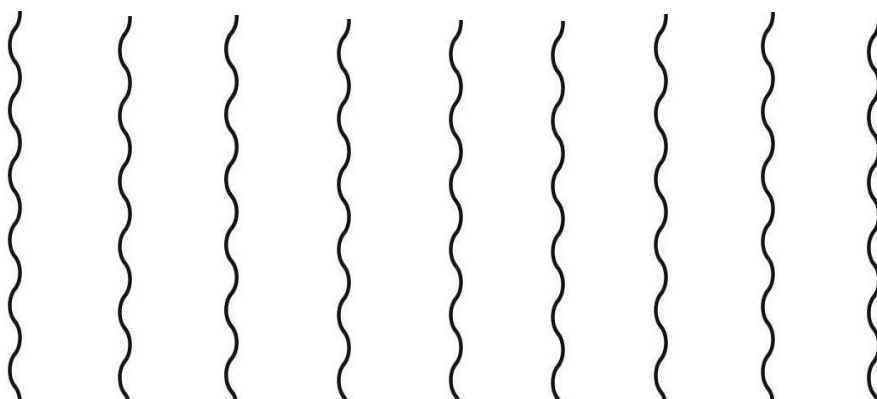


○ فصل چهارم

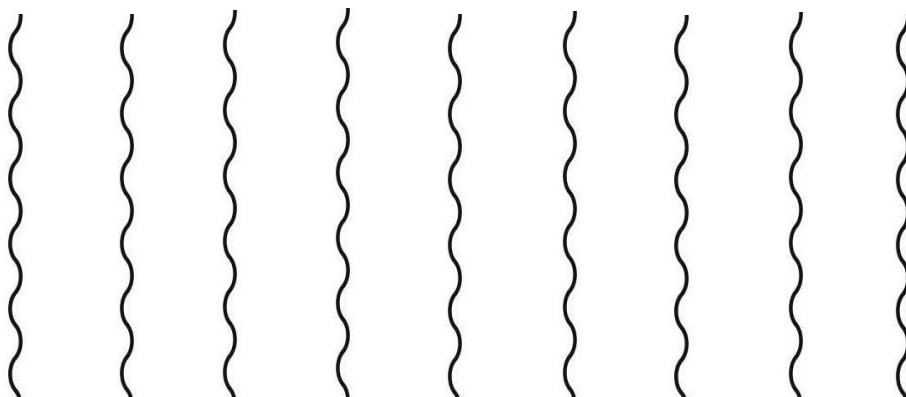
واکسن‌های mRNA سرطان



واکسن‌های mRNA سرطان گروه نسبتاً جدیدی از واکسن‌ها هستند، که قادرند mRNA را برای تقریباً هر پروتئین کد و با ایمنی بالا ترکیب نمایند. ساده‌ترین استفاده از واکسن‌های mRNA در زمینه‌های تومورشناسی، ایمن‌سازی بیماران با واکسن‌های mRNA است که آنتی‌ژن‌های مرتبط با تومور (TAAs) را کد می‌کنند. مثال برای این مورد استفاده از فناوری RNActive® می‌باشد، که پاسخ‌های ایمنی سلولی و هورمونی متعادل شده را در مدل‌های حیوانی القا کرده است و هم اکنون در چند آزمایش کلینیکی برای شاخص‌های تومورشناسی ارزیابی شده است. کاربرد دوم واکسن‌های mRNA در تولید واکسن‌های شخصی است. این واکسن‌های mRNA توسط فرایند ژنریک با تحلیل اگزوم تومور، شناسایی و تولید شده‌اند، و قادر به تولید سریع واکسن‌های mRNA اند تا آنتی‌ژن‌های جدید اختصاصی بیمار را



مورد هدف قرار دهند. علاوه بر استفاده مستقیم برای واکسن کردن بیماران، mRNA ها را می توان در درمان های سلولی استفاده نمود تا سلول های مشتق از بیمار را به صورت *in vitro* آلوده نموده و سلول های دستورزی شده را دوباره به بیمار تزریق کنیم. چنین کاربردی آلوده کردن سلول های دندرونی مشتق شده از بیمار (DCs) با mRNA است که TAAs را رمز می کند، که به نفوذ پپتیدهای مشتق شده از TAA روی DCs و فعال سازی سلول های T اختصاصی آنتی ژن در شرایط *in vivo* منجر می شود. کاربرد دوم آلوده کردن سلول های T مشتق شده از بیمار با mRNA است که گیرنده های آنتی ژن شیمیری را رمز می کند، که به سلول های T اجازه می دهد تا مستقیماً یک آنتی ژن اختصاصی را که روی تومور بیان شده است را شناسایی کنند. در این فصل، ما داده های پیش کلینیکی و کلینیکی را برای رویکردهای مختلف مرور می کنیم.





واکسن‌های mRNA سرطان

مقدمه

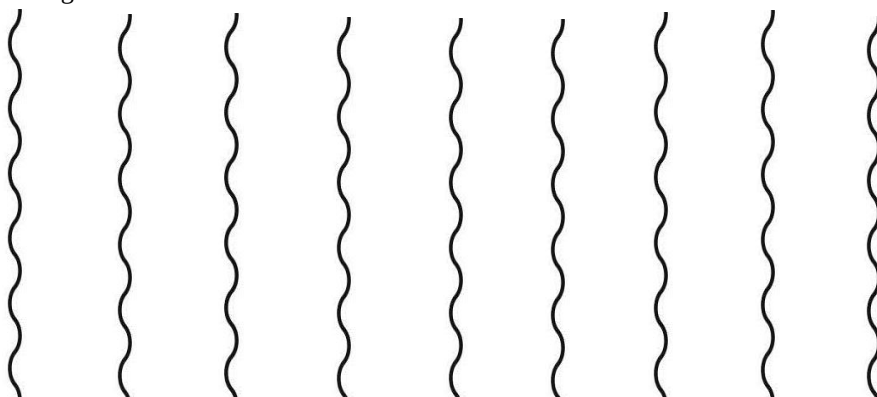
مفهوم واکسن‌های mRNA^۱ بر اساس تزریق RNA پیام‌رسان (mRNA)^۲ و بیان پروتئین و نهایتاً پاسخ‌های ایمنی علیه آنتی‌ژن، بنا شده‌اند. حضور مقدار فراوان آنزیم RNase در محتویات مایعات بدن و بر روی پوست بدن، که منجر به تجزیه سریع RNA می‌شود، غیرمنتظره بوده و به همین دلیل ساخت بیشتر واکسن‌ها بر اساس DNA تمرکز دارند تا بر اساس واکسن‌های RNA. این دیدگاه پتانسیل واکسن‌های mRNA را نشان می‌دهند که سبب بیان آنتی‌ژن شده و پاسخ‌های ایمنی سلولی و هورمونی را بر می‌انگیزد (۱۳).

با توجه به اینکه ساخت انواع واکسن‌های DNA یا mRNA ویژگی‌های فراوانی دارند، اما واکسن‌های mRNA دارای مزیت‌های بیشتری نسبت به فرم‌های DNA می‌باشند (جدول ۱). نخست اینکه، RNA فقط باید از غشای پلاسمایی عبور کند تا سنتز پروتئین را القا کند، که این عامل انتقال واکسن را در مقایسه با DNA که باید از غشا هسته نیز بگذرد، آسان می‌کند. دوماً، mRNA قادر به تلفیق در ژنوم نیست و بنابراین پتانسیل تومورزایی^۳ را ندارد (۱۴). در نهایت اینکه، بیان پروتئین رمز شده با mRNA ذاتاً موقت است، که با نیم عمر mRNA تعریف می‌شود. بنابراین، واکسن‌های mRNA پروفایل ایمنی بیشتری نسبت به DNA دارند (۶۲).

۱. mRNA Vaccines

۲. messenger RNA (mRNA)

۳. Oncogenic Potential



علاوه بر این، واکسن‌های mRNA فواید مهم دیگری نیز نسبت واکسن‌های پروتئینی دارند. تولید پروتئین درون سلول‌ها پس از تزریق mRNA با تغییرات پروتئینی مانند الگوهای گلیکوزیلاسیون^۱، همراه است و نیازی به پروتئین ساخته شده یا مراحل خالص‌سازی ذرات نیست (۶۹). بر خلاف واکسن‌های پروتئینی، واکسن‌های mRNA را می‌توان در یک فرایند سنتزی تولید نمود که می‌تواند هر نوع پروتئین یا ترکیبی از پروتئین‌های منتخب را کد کند و بنابراین فرایندهای ساخت واکسن را آسان می‌کند. به علاوه، قابلیت توالی‌یابی سریع، واکسن‌های RNA را بسیار متنوع می‌سازد، که اهمیت خاصی در درمان‌های فردی دارد.

واکسن‌های RNActive®

واکسن‌های RNActive® از چند mRNA فرموله شده تشکیل شده‌اند که پروتئین آنتی‌ژن مورد نظر را کد می‌کنند و سبب افزایش راندمان ترجمه شده، تجزیه mRNA را به تأخیر می‌اندازند و تحریک ایمنی را بهبود می‌بخشند. در سال ۲۰۰۰، هوئر و همکاران تشریح کردند که کاربرد mRNA در شرایط in vivo که آنتی‌ژن مدل بتاگالاکتوزیداز^۲ را رمز می‌کند به القا لمفوسیت T سمیت سلولی (CTLs)^۳ و آنتی بادی‌های اختصاصی منجر می‌شود (۴). RNA مورد استفاده برای این آزمایشات قالب شکل اولیه یک mRNA را داشت که از یک سو، دارای یک چارچوب خواندن باز (ORF)^۴ که بتاگالاکتوزیداز را کد می‌کرد که دو انتهای ۳ و ۵ بوسیله نواحی غیر قابل ترجمه (UTR)^۵ بتاگلوبین^۱ و یک توالی دم پلی A^۲، احاطه

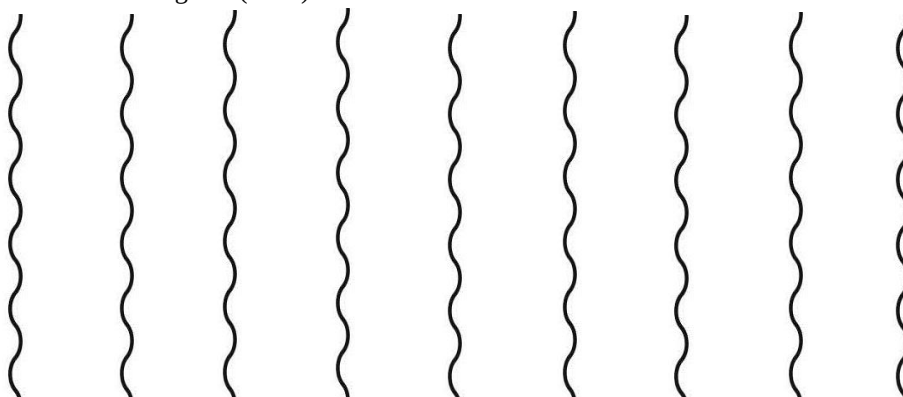
۱. Glycosylation

۲. β -Galactosidase

۳. Cytotoxic T Lymphocytes (CTLs)

۴. Open Reading Frame (ORF)

۵. Untranslated Regions (UTR)





شده است. امروزه در فناوری RNActive®، چندین قسمت از کاست mRNA تغییر کرده است تا طول و دوره بیان آنتی‌ژن را افزایش دهند (۴۱). طبق این روش، UTR بتاگلوبین، جهت افزایش راندمان ترجمه و پایداری mRNA، جایگزین UTR انتخاب شده شده‌اند، و ORF نیز برای بیان بیشتر پروتئین از طریق غنی‌سازی محتوای گوانین و سیتوزین، بهینه شده‌اند. این تغییرات به همراه استفاده از یک دم پلی A به افزایش بیان پروتئین از چهار تا پنج برابر در چند سیستم آزمایشی منجر شده است (۴۸). در این فناوری به صورت گسترده از نوکلئوتیدهای غیرتغییریافته استفاده می‌شود. مطالعات کاریکو و آندرسون بیان کرده است که نوکلئوتیدهای تغییریافته منجر به افزایش بیان پروتئین می‌شوند ولی، آن‌ها ایمنی‌زایی^۳ را کاهش می‌دهند (۹۱).

علاوه بر قابل دسترس بودن واکسن‌ها، برای القا پاسخ ایمنی قوی، نیازمند به یک عامل کمکی نیز لازم است. در واکسن‌های RNActive®، ظرفیت تحریک ایمنی با فرمولاسیون مطلوب به دست می‌آید، به عنوان مثال بکارگیری پروتامین^۴، که یک پپتید کاتیونی است و کمپلکس‌های پایدار را با نوکلئیک اسیدها تشکیل می‌دهد (۲۹). پروتامین به mRNA متصل شده و منجر به تشکیل ذرات بزرگتر می‌شود که سیستم ایمنی را در فرایندی فعال می‌سازند که شامل: اندوزوم-رزیدنت TLR7 (گیرنده شبه عبوری^۵) می‌شود (جدول ۱).

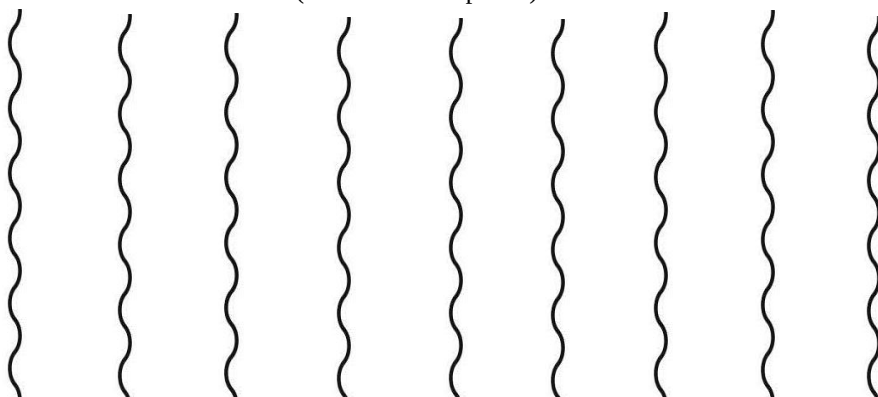
۱. β -Globin

۲. Poly (A) Tail

۳. Immunogenicity

۴. Protamine

۵. Endosome-Resident TLR7 (Toll-Like Receptor 7)



بنابراین، واکسن‌های RNActive® شامل دو جز می‌باشند که نقش مکمل را ایفا می‌کنند: ۱- mRNA لخت (بدون پوشش)^۱، که به عنوان الگوی ترجمه عمل می‌کند و مسئول بیان قوی آنتی‌ژن رمز شده است ۲- کمپلکس‌های mRNA- پروتامین^۲، که نقش آن افزایش ظرفیت تحریک ایمنی واکسن می‌باشد (۲۴). در واقع، واکسیناسیون با واکسن‌های RNActive® نشان داده است که پاسخ‌های ایمنی قوی و متعادل را القا می‌کنند، مانند: پاسخ‌های Th1، Th2، هورمونی، سلولی، افکتور و حافظه. امروزه نتایج امید بخشی در سیستم‌های مختلف مدل حیوانی شامل: موش، موش خرما^۳ و خوک‌ها، هم در زمینه ایمنی‌درمانی سرطان^۴ و هم واکسن‌های پیشگیری‌کننده^۵ به دست آمده است (۸۴).

جدول ۱- مزایای استفاده از واکسن‌های RNA نسبت به DNA

RNA	DNA	
RNA فقط نیازمند به وارد شدن به درون سیتوپلاسم است و در همان محل ترجمه و بیان پروتئین رخ می‌دهد	DNA نیازمند به عبور از دیواره سلولی و غشای هسته است و قبل از بیان پروتئین ابتدا باید در هسته نسخه‌برداری شود	انتقال
RNA قادر به تلفیق درون ژنوم نیست پس نمی‌تواند سبب تغییرات کروموزومی گردد	واکسن‌های DNA قادر به ادغام درون ژنوم میزبان هستند که ممکن است باعث جهش درونی و بی‌ثباتی کروموزومی گردد	تلفیق
بیان موقت	بیان طولانی مدت (ماه‌ها یا سال‌ها)	بیان

۱. Naked mRNA

۲. mRNA-Protamine Complexes

۳. Ferrets

۴. Cancer Immunotherapy

۵. Prophylactic Vaccines



القا پاسخ‌های ضد تومور با واکسن‌های RNActive®

کارایی ضدتوموری واکسن‌های RNActive® ابتدا در مدل تومور E. G7-OVA مطالعه شد. این سیستم از موش C57BL/6 استفاده می‌کند، که به صورت زیرپوستی با لاین سلولی سینرژنیک E. G7-OVA^۱ تلقیح شده است، یک کلون از لاین سلولی تایمومای سرطانی EL4^۲ موش که به صورت پایدار انتقال یافته تا اوالبومین^۳ را بیان کند (۲۲). در این مطالعه، واکسن در زمینه پیشگیری‌کننده مطالعه شد، به این صورت که ابتدا موش دو مرتبه به صورت درون پوستی با واکسن mRNA که اوالبومین را رمز می‌کند ایمن شد و یک هفته بعد با سلول‌های E.G7-OVA در چالش قرار گرفت (۴۶). در مقایسه با موش شاهد که واکسن mRNA را دریافت کرد و آنتی‌ژن غیرمرتبط را رمز می‌کرد، گروه تیمار شده با OVA-RNActive® تأخیر معنی‌داری در رشد تومور نشان دادند. به علاوه، واکسیناسیون با OVA-RNActive® محافظت از تومور را به شکل بهتری در مقایسه با واکسیناسیون با پروتئین اوالبومین یا OVA پپتید SIINFELK^۴، القا کرد (۵۴).

مطالعات بیشتر بیان کردند که واکسیناسیون اختصاصی توسط آنتی‌ژن، پاسخ‌های ایمنی هورمونی و سلولی را با بیان بالای آنتی‌بادی‌های اختصاصی اوالبومین IgG1 و IgG2a و سلول‌های سایتوتوکسین (سیمت سلولی) T^۵ القا کرد، که سبب ترشح آنتی‌بادی IFN- γ ^۶ در شرایط in vitro بعد از تحریک با یک پپتید مشتق از OVA، شد و در محیط in vivo سلول‌های بارگذاری شده پپتید OVA را نابود نمود.

۱. Syngeneic E.G7-OVA Cell Line

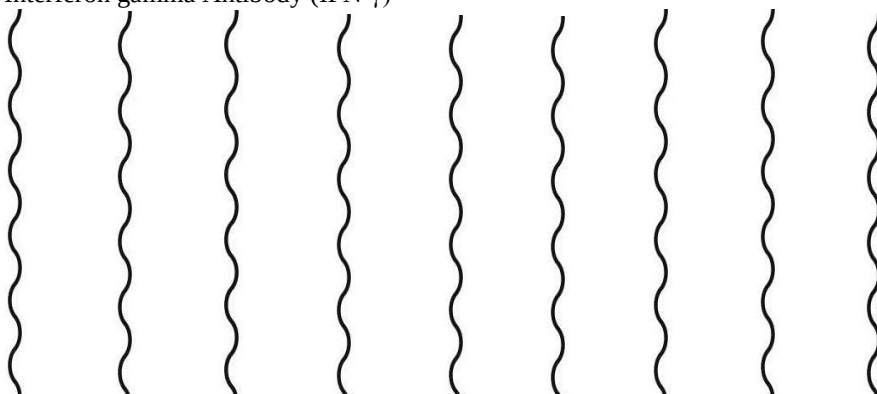
۲. Thymoma EL4 Cell Line

۳. Ovalbumin

۴. OVA-Peptide SIINFELK

۵. Cytotoxic T Cells

6. Interferon gamma Antibody (IFN- γ)

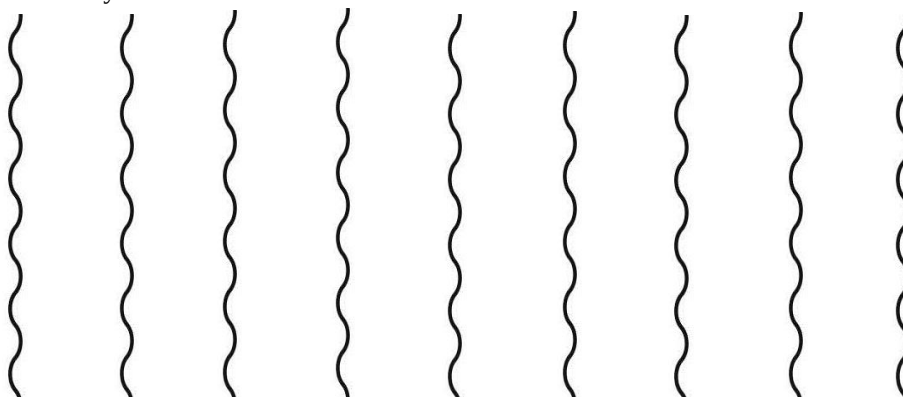


آزمایشات بعدی که از آنتی ژن PSMA استفاده کردند پاسخ سمیت سلولی را نشان داد و به تشکیل سلول‌های T خاطره^۱ منجر شد (۲۵). افزایش تعداد واکسیناسیون، دو بار در هفته با واکسن PSMA-RNActive® از ۲ تا ۴ واکسیناسیون افزایش معنی‌داری هم در تعداد سلول‌های CD8+ T ترشح‌کننده IFN- γ و هم سمیت سلولی در شرایط *in vivo* طی فاز *acute* القا کرد. وقتی که این موش‌ها را در هشت هفته پس از آخرین ایمنی‌سازی تحلیل نمودند، افزایش مشابهی را در تعداد سلول‌های CD8+ T ترشح‌کننده IFN- γ و هم سمیت *in vivo* با افزایش دفعات واکسیناسیون مشاهده نمودند (۹۹).

جهت بررسی راندمان این فناوری در زمینه درمانی، از مدل E. G7-OVA بکار گرفته شد. در این تحقیق تزریق واکسن به موش‌ها به صورت زیرپوستی با سلول‌های تومور مورد بررسی قرار گرفتند و واکسن OVA-RNActive® را دو بار در هفته دریافت کردند (۶۲). سلول‌های تیمار شده با واکسن به تأخیر معنی‌داری در رشد تومور منجر شد ولی نتوانست تومور را حذف کند (۱۳). تحلیل RT-PCR نشان داد که میزان بیان اوالبومین در تومورهای بزرگ شده همه موش‌ها که با واکسن mRNA کدکننده اوالبومین تیمار شده بودند، کاهش یافت یا حتی حذف شد، درحالی که این مورد فقط در یک پنجم موش‌های تیمار نشده بود (۴۸). این مورد نشان می‌دهد که تومورها، در موش‌های تیمار شده با واکسن ایمنی‌درمانی RNActive® به دلیل کاهش بیان اوالبومین از بین رفته‌اند (۶۰).

تحلیل ترکیب سلولی تومور در زمان‌های مختلف پس از انجام واکسیناسیون، پایداری را در سلول‌های CD8+ T فعال شده درون تومور، در موش‌ها نشان داد. مطالعات نشان دادند که حذف سلول‌های CD8+ T، به صورت کامل اثر ضد توموری

۱. T Memory Cells





واکسن را از بین می‌برد. همچنین، حذف سلول‌های TCD4+ طی واکسیناسیون به صورت معنی‌داری راندمان واکسن را کاهش می‌دهد (۵).

مطالعات کلینیکی با واکسن‌های RNActive®

بر اساس نتایج امیدبخش پیش‌کلینیکی، تصمیم گرفته شد تا این فناوری را به آزمایش کلینیکی در بیماران سرطانی پیشرفت دهند (جدول ۲). اولین آزمایش کلینیکی در اولین مرد با استفاده از mRNA با عنوان روش درمانی CV9103^۱، برای بیمارانی بود که سرطان پروستات داشتند (۷). CV9103 یک واکسن RNActive® است که چهار آنتی‌ژن مرتبط با تومور را مورد هدف قرار می‌دهد که شامل: آنتی‌ژن اختصاصی پروستات (PSA)^۲، آنتی‌ژن غشا اختصاصی پروستات (PSMA)^۳، آنتی‌ژن سلول بنیادی پروستات (PSCA)^۴، و شش آنتی‌ژن اپی‌تلیال بین‌غشایی پروستات ۱ (STEAP1)^۵ می‌باشند (۳۷). طی این مطالعه واکسن در یک مطالعه فاز I/IIa آزمایش شد که ۴۴ بیمار واجد شرایط با سرطان پروستات مقاوم به کاسترات (عقیمی)^۶ با افزایش سطح PSA (همه بیماران) بودند که از ۱۲ مرد در فاز I و ۳۲ مرد در فاز IIa تشکیل می‌شدند. مطالعه به صورت آزمایش باز، کنترل نشده، چند مرکزی، بین‌المللی و آینده‌نگر انجام شد که القا ایمنی و قابلیت تحمل به عنوان نقطه‌نهایی اول و القا پاسخ‌های ایمنی هورمونی و سلولی اختصاصی آنتی‌ژن به عنوان نقطه‌نهایی دوم تعریف شد (۴۲). مقدار دز توصیه شده از طریق افزایش تدریجی دز

۱. CV9103 Approach

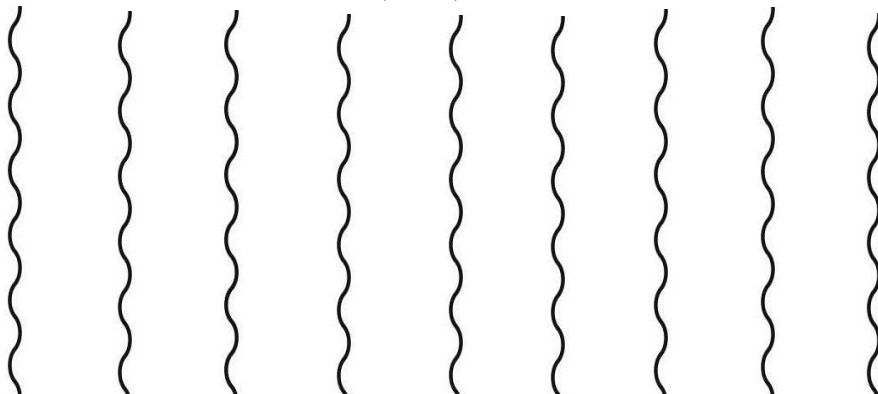
۲. Prostate-Specific Antigen (PSA)

۳. Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)

۴. Prostate Stem Cell Antigen (PSCA)

۵. Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 1 (STEAP1)

۶. Castrate-Resistant Prostate Cancer (CRPC)



در فاز I آزمایش تثبیت شد (۲۵۹، ۶۴۰ و ۱۲۸۰ میکروگرم از RNA کل آزمون شده)، همچنین مطالعه فاز IIa طراحی شد تا ایمنی را تأیید کند و القا پاسخهای ایمنی هورمونی و سلولی اختصاصی آنتیژن را در ادامه تزریق با بالاترین دز نشان دهد (۴۷). این مطالعه بیان کرد که CV9103 یک ابزار ایمنی مطلوب را به همراه برخی عواض جانبی معمول مانند: واکنشهای التهابی ناحیه تزریق، علائم خستگی، تب، لرز، خارش و شبه آنفولانزا، نشان می‌دهد (۶۹).

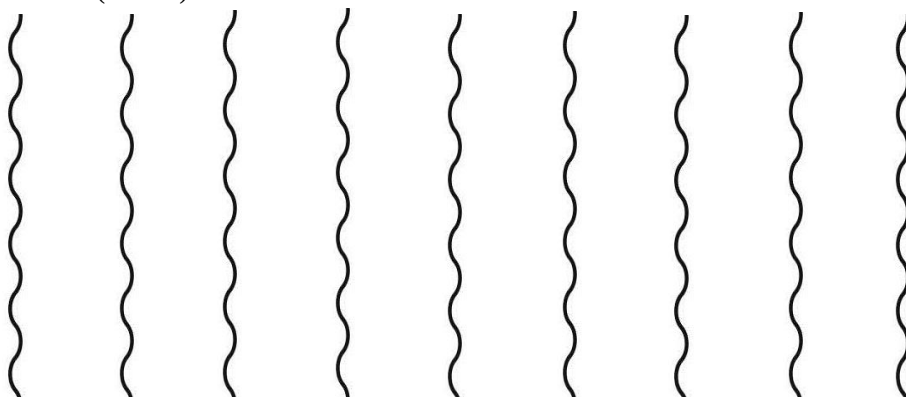
علاوه بر این، پاسخهای ایمنی علیه همه آنتیژنهای کد شده توسط mRNA، به جز موقعیت سلولی آنتیژن و زیرنوع HLA بیمار، قابل ردیابی بودند. به صورت اختصاصی‌تر، پاسخهای ایمنی سلولی اختصاصی آنتیژن در ۷۶ درصد همه بیماران تیمار شده با بالاترین دز ردیابی شدند. همچنین نتایج نشان دادند، ۵۸ درصد از بیماران مربوطه پاسخهایی را به چند آنتیژن نشان دادند (۳۹).

با این وجود، این نتایج امیدبخش بررسی واکسن‌های RNActive® را در یک آزمایش کلینیکی کنترل شده، تصدیق کرده است. بنابراین، ۱۹۷ بیمار با سرطان پروستات بدون علائم مقاومت به کاسترات تا سرطان مقاوم به کاسترات، در یک مطالعه فاز IIb کنترل شده-بی‌اثر^۱، به صورت تصادفی با واکسن CV9104 مورد تیمار قرار گرفتند. این واکسن بر اساس CV9103 است و دو آنتیژن مرتبط با تومور دیگر را کد می‌کند، که اسید فسفاتاز پروستاتی (PAP)^۲ و میوسین ۱ (MUC1)^۳ نام دارند (یک گلیکوپروتئین که بیش از حد بیان شده و به صورت نا به جا در سرطان پروستات، گلیکوزیله شده است) (۴۳). راندمان کلینیکی و ایمنی PAP به عنوان آنتیژن واکسن، قبلاً در آزمایش کلینیکی Sipuleucel-T بیان شده است، در حالی

۱. Placebo-Controlled Phase IIb Study

۲. Prostatic Acid Phosphatase (PAP)

۳. Mucin 1 (MUC1)





که MUC1 اصولاً در رویکردهای ایمنی‌درمانی علیه سرطان ریه^۱ با پروفایل ایمنی مطلوب، استفاده شده است.

در مطالعه دوم، CV9104 در بیماران با سرطان پروستات غیرمتاستازی با احتمال خطر بالا، بررسی شد (۴۹). برای این بیماران، برداشت کلی پروستات یک گزینه درمان استاندارد است اما پس از جراحی، احتمال برگشت خطر وجود دارد (۸۳). بنابراین، درمان‌های کمکی جدید که از برگشت پس از درمان اولیه ممانعت می‌کنند، بسیار ضروری هستند (۱۹).

از واکسن‌های RNActive® علاوه بر کاربرد آن در درمان سرطان پروستات به عنوان ایمنی‌درمانی علیه کارسینومای (رشد بدخیم سرطان) سلول‌های ریه (NSCLC)^۲ در یک فاز آزمایشی کلینیکی I/IIa بررسی شدند (۱۰).

طی این مطالعه، ایمنی‌درمانی CV9201 به صورت درون پوستی^۳ با سطوح دز مختلف بکار گرفته شدند تا ایمنی و تحمل‌پذیری در بیماران با NSCLC پیشرفته ارزیابی شود (۷۱). CV9201 پنج نوع آنتی‌ژن سرطان مرتبط با NSCLC را کد می‌کند که برای القا پاسخ‌های ایمنی سلولی و هورمونی انتخاب شده‌اند و شامل: ۱- کارسینومای ۱- سلول سنگفرشی مری (NY-ESO-1)^۴، ۲- خانواده آنتی‌ژن ملانوما C1 (MAGEC1)^۵، ۳- خانواده آنتی‌ژن ملانوما C2 (MAGEC2)^۶، ۴- سور وی وین^۷ و ۵- تروفوبلاست گلیکوپروتئین (TPBG مترادف 5T4)^۸. طی این آزمایش ۹

۱. Lung Cancer

۲. Non-Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC)

۳. Intradermally

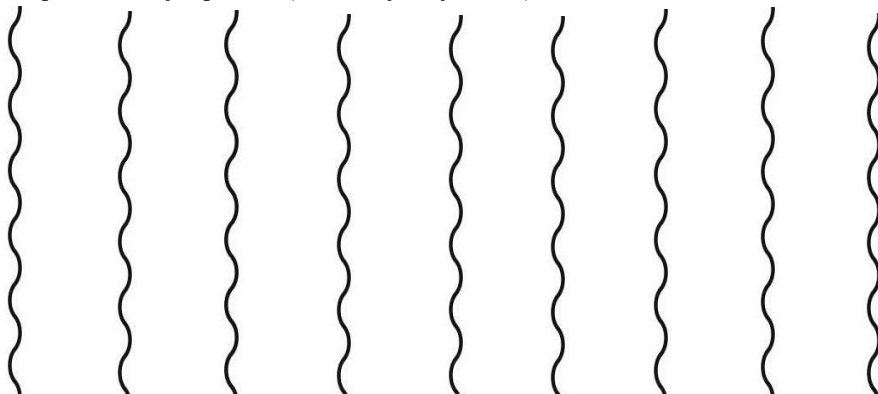
۴. New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma-1 (NY-ESO-1)

۵. Melanoma Antigen Family C1 (MAGEC1)

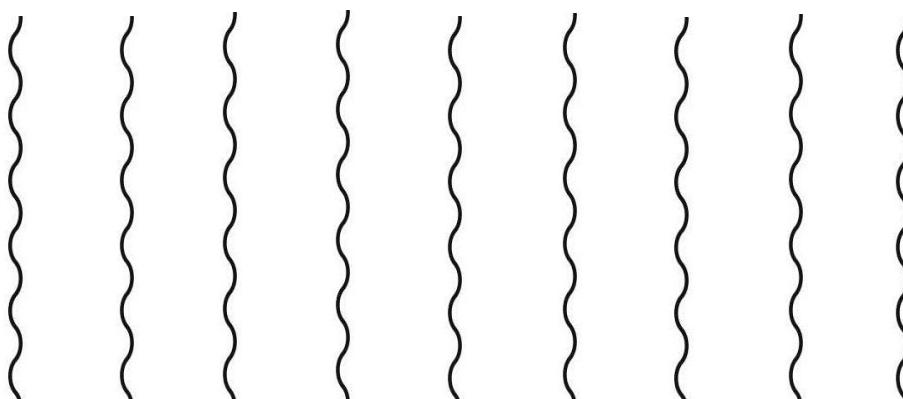
۶. melanoma antigen family C2 (MAGEC2)

۷. Survivin

۸. Trophoblast Glycoprotein (TPBG; synonym 5T4)



بیمار CV9201 را در فاز I و ۳۷ بیمار در فاز IIa مطالعه نمودند (۳۳). در کل، ۴۵ نفر از ۴۶ بیمار حداقل دو نوع و ۳۳ نفر از ۴۶ بیمار همه پنج نوع طراحی شده CV9201 را دریافت کردند. این مطالعه بیان کرد که همانند روش CV9103، رویکرد CV9201 پروفایل ایمنی مطلوب را با عوارض جانبی معمول شامل: واکنش التهابی ناحیه تزریق، خارش، تغییر رنگ، و درد را نشان می‌دهد (۱۸). سایر عوارض جانبی مرتبط با درمان علائم تب، خستگی، لرز و شبه آنفولانزا بودند. به علاوه، پاسخ‌های ایمنی علیه همه آنتی‌ژن‌های کد شده قابل ردیابی بودند. طی این پژوهش ۶۵ درصد همه بیماران، پاسخ‌های ایمنی سلولی و هورمونی اختصاصی آنتی‌ژن را نشان دادند و ۶۵ درصد پاسخ دهنده‌ها علیه آنتی‌ژن چندگانه واکنش نشان دادند (۶، ۷۶). قدرت پاسخ سلول T القا شده متفاوت بود، ولی بیشتر بیماران افزایش بیش از دو برابر را در فراوانی و تعداد سلول T اختصاصی آنتی‌ژن نشان دادند. به علاوه، ۴۸ درصد از بیماران تیمار شده در فاز IIa پاسخ‌های هورمونی اختصاصی آنتی‌ژن داشتند (۶۸). در نهایت، این نتایج بیان کردند که واکسن‌های RNActive® یک پلت فرمی از واکسن جدید و امیدبخش را ارائه می‌دهند که ایمن، به شدت اختصاصی، متنوع، و قادر به القا پاسخ ایمنی متعادل در مطالعات کلینیکی است (۸۱).



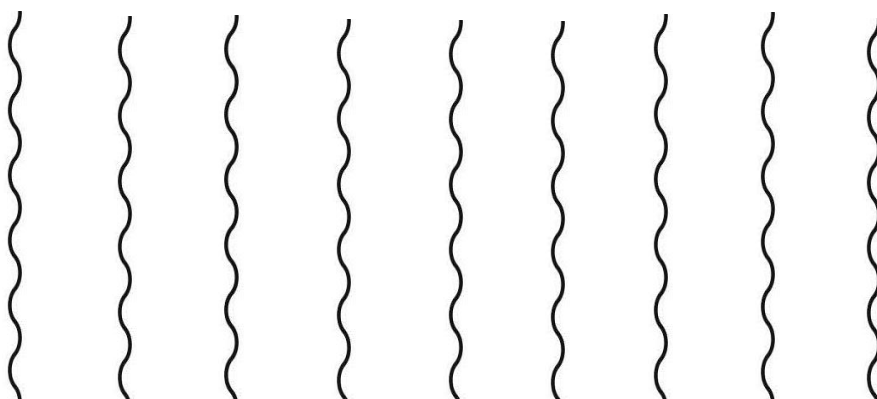


جدول ۲- بررسی اجمالی از آزمایشات بالینی با استفاده از واکسن‌های RNActive®

رویکرد	سلول هدف	فاز کلینیکی	آنتی‌ژن	نتیجه نهایی
CV9103	سرطان پروستات مقاوم به هورمون	I/IIa	PSA/ PSMA/ PSCA/ STEAP	-پروفایل ایمنی مطلوب -القاء واکنش‌های آنتی‌ژن اختصاصی ایمنی
CV9104	سرطان پروستان کاسترات متاستاتیک	I/IIb	MUC1/ PAP/ PSA/ PSMA/ PSCA/ STEAP1	-پروفایل ایمنی مطلوب -القاء واکنش‌های آنتی‌ژن اختصاصی ایمنی
CV9104	سرطان پروستات با خطر بالا قبل از پروستاتکتومی رادیکال	II	MUC1/ PAP/ PSA/ PSMA/ PSCA/ STEAP1	-پروفایل ایمنی مطلوب -القاء واکنش‌های آنتی‌ژن اختصاصی ایمنی
CV9201	سرطان ریه پیشرفته	I/IIa	MAGEC1/ 5T4 / MAGEC2/ Survivin NYSEO-1	-پروفایل ایمنی مطلوب -القاء واکنش‌های آنتی‌ژن اختصاصی ایمنی
+ CV9202 پرتو دهی	سرطان ریه پیشرفته	Ib	MAGEC1/ MUC1 MAGEC2/ Survivin NY-SO- 1/5T4	مطالعات هنوز ادامه دارند

ترکیب واکسن RNActive® با شیمی‌درمانی یا پرتودرمانی

از دیدگاه کلینیکی، بررسی اینکه واکسن‌های RNActive® را می‌توان با استاندارد کنونی درمان ترکیب کرد مهم است. بنابراین، ترکیب این واکسن‌ها با شیمی‌درمانی یا پرتودرمانی بررسی شدند (۳، ۹).



ترکیب با شیمی درمانی در مدل تومور E.G7-OVA با استفاده از دوستاکسل^۱ یا سیسپلاتین^۲ و واکسن mRNA علیه اوالبومین آزمایش شد (۸).

پس از به دست آوردن راه حل برای تزریق زیرپوستی^۳ به تومور با واکسن RNaive®، موش‌های آزمایشگاهی را با تزریق داخل صفاقی دوستاکسل به همراه واکسن درمان نمودند. این برنامه درمانی به تأخیر معنی‌داری در رشد تومور در مقایسه با دوستاکسل یا واکسن RNaive® به تنهایی منجر شد (۹۱). نتایج مشابه وقتی مشاهده شد که از همان برنامه درمانی ولی به همراه سیسپلاتین به عنوان داروی شیمی درمانی استفاده شد. طی این آزمایش تأخیر در رشد تومور تا زمانی که شیمی درمانی زودتر از واکسیناسیون انجام شده بود، قابل ردیابی نبود، که نشان دهنده اثر منفی دوستاکسل طی القای پاسخ ایمنی است (۵۶).

گزینه جالب دیگر ترکیب واکسیناسیون به همراه پرتودرمانی^۴ به دلیل ویژگی‌های مکمل دو رویکرد است، که می‌تواند رشد تومور را تشدید یا محدود کند. استفاده از پرتوها^۵ یک روش درمانی تثبیت شده است، به خصوص برای درمان تومورهای تکی جامد^۶. این روش روی بافت تومور به صورت ناحیه‌ای با افزایش رهاسازی سیتوکین‌های پیش التهابی^۷ و القای بیان MHC^۸، مؤثر است (۶۵). به علاوه، مرگ سلولی در اثر پرتودرمانی به نظر می‌رسد که شکلی از مرگ سلولی ایمنوژنیک^۹ را ارائه

۱. Docetaxel

۲. Cisplatin

۳. Subcutaneous

۴. Radiation Therapy

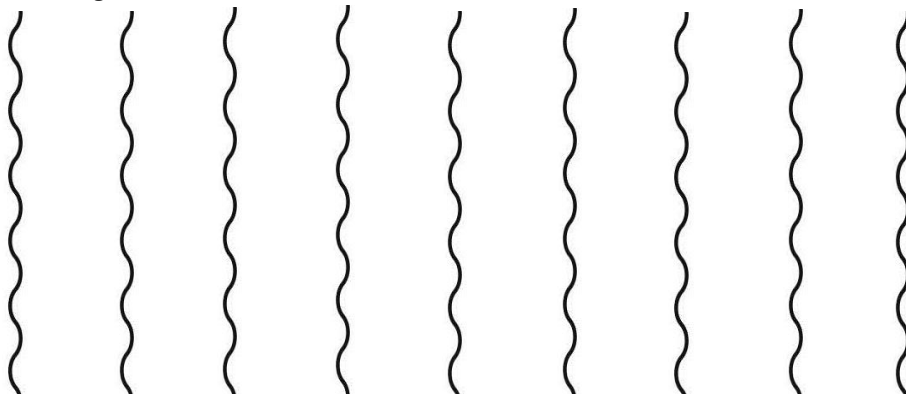
۵. Radiation

۶. Single Solid Tumors

۷. Proinflammatory Cytokines

۸. Local MHC (Major Histocompatibility Complex) Expression

۹. Immunogenic Cell Death

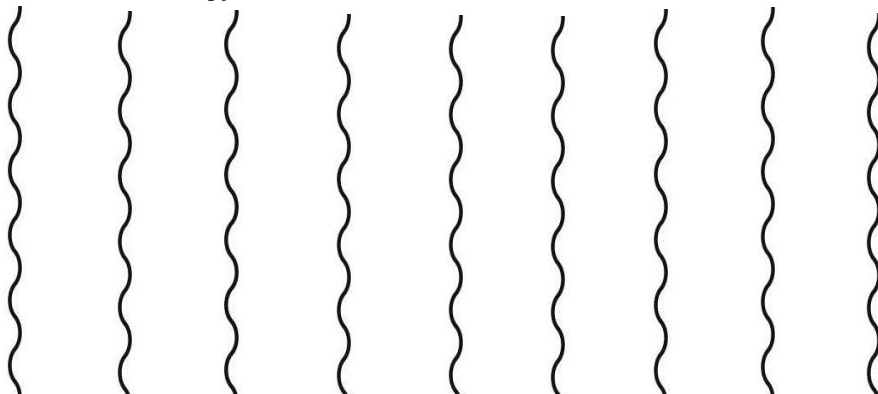




می‌دهد که با انتقال سطح سلول کالرتیکولین^۱ و رهاسازی خارج سلولی ATP و پروتئین گروه باکس ۱ با حرکت شدید (HMGB1)^۲، همراه می‌باشد. این عوامل قادر به فعال‌سازی سلول‌های دندرون (DCs)^۳ از طریق گیرنده‌های شناسایی الگو هستند و حضور آنتی‌ژن‌های تومور را بین DCs و سلول‌های T القا می‌کند (۶۰).

بنابراین، ترکیب پرتودرمانی و واکسن‌های RNActive® در یک مدل تومور E.G7-OVA آزمون شد. پس از تثبیت تومورهای بزرگ زیرپوستی، موش‌های تحت آزمایش، سه پرتو منطقه‌ای را طی سه روز متوالی دریافت نمودند (۱۹). همراه با آن چند واکسیناسیون با واکسن OVA-RNActive® انجام شد. این آزمایشات برگشت تومور را در گروه‌هایی نشان دادند که درمان ترکیبی را داشتند و همچنین حذف کامل تومورهای بزرگ تثبیت شده E.G7-OVA در ۳ تا ۷ موش تحت آزمایش نیز مشاهده شد، در حالی که درمان‌های مجزا به صورت معنی‌داری اثر کمی از خود نشان دادند (۵۲). آزمایشات بعدی در مدل سرطان ریه لویس (LLC)^۴ به عنوان سیستم تومور ثانویه انجام شدند، که ایمنی‌زایی کمی داشتند و نسبت به انواع مختلف رژیم‌های درمانی، مقاوم است. طی پژوهشی، موش‌ها را با سه پرتو منطقه‌ای در روزهای متوالی در ترکیب با چند واکسن RNActive® تیمار نمودند که EGFR آنتی‌ژن‌های مرتبط با تومور و کانکسین^۵ را کد می‌کرد. درمان ترکیبی خاصیت ضد توموری را نشان داد که بیان‌کننده راندمان پرتوایمنی‌درمانی^۶ است (۷۰، ۶۳، ۵۵).

-
۱. Calreticulin
 ۲. High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) protein
 ۳. Dendritic Cells (DCs)
 ۴. Lewis Lung Cancer (LLC)
 ۵. Tumor-Associated Antigens EGFR and Connexin
 ۶. Radioimmunotherapy



مطالعه کلینیکی با واکسن‌های RNaive® در ترکیب با پرتودرمانی

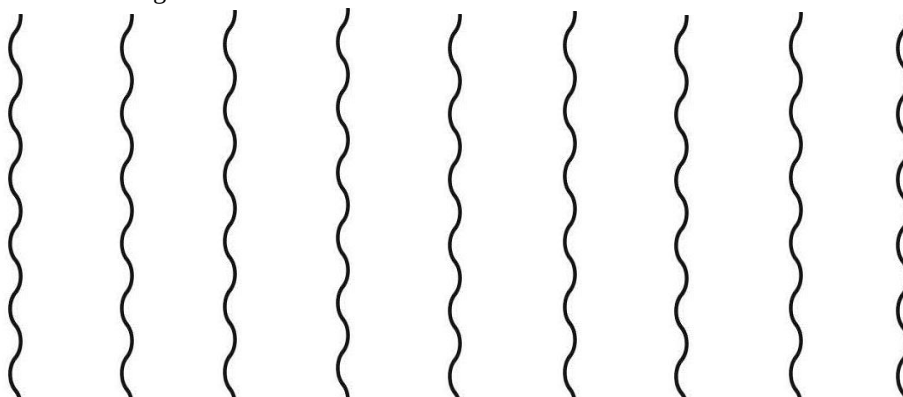
بر اساس نتایج امیدبخش پیش‌کلینیکی، پتانسیل کلینیکی واکسن RNaive® CV9202 در ترکیب با پرتودرمانی به عنوان روش درمانی ادغامی برای بیماران مبتلا به سرطان ریه ارزیابی شد (۱). CV9202 یک نسخه به روز شده CV9102 است که علاوه بر NY-ESO-1، MAGEC1، MAGEC2، سورویوین و 5T4، آنتی‌ژن MUC1 را نیز کد می‌کند (۹۴). همانطور که قبلاً تشریح شد، گلیکوپروتئین MUC1 - که بیش از حد بیان شده و به صورت نابجا در چندین سرطان گلیکوزیله شده - قبلاً در روش‌های ایمنی‌درمانی علیه سرطان ریه استفاده شده است (۲۲). طی یک پژوهش، ایمنی و تحمل‌پذیری واکسیناسیون CV9202 را در ترکیب با پرتودهی موضعی در بیماران با مرحله IVNSCLC انواع مختلف (سلول‌های سنگ‌فرشی و غیرسنگ‌فرشی)^۱ با یا بدون جهش‌های EGFR ارزیابی شدند که یک پاسخ ثابت را پس از اولین لاین درمانی، دریافت کردند (۲۹). همه بیماران دو واکسیناسیون اولیه را با CV9202 قبل از پرتودرمانی موضعی دریافت کردند که با اعمال واکسیناسیون بیشتر در زمان پیشرفت بیماری همراه شد. نتایج این پژوهش سبب کاهش معنی‌داری در رشد سلول‌های تومور در استفاده از ترکیب واکسن و پرتو شدند (۱۹).

ترکیب واکسن‌های RNaive® با مهارکننده‌های ایمنی

پاسخ ایمنی به روند درمانی بیماری سرطان طی چندین سال تکامل یافته اما در نهایت با شکست همراه شده است که به دلیل ویرایش ایمنی^۲ (کاهش بیان MHC I و آنتی‌ژن‌های ایمنی‌زایی) و سرکوب ایمنی^۱ می‌باشد (۸۵، ۹۱).

۱. Squamous and Non-Squamous Cell

۲. Immunoediting

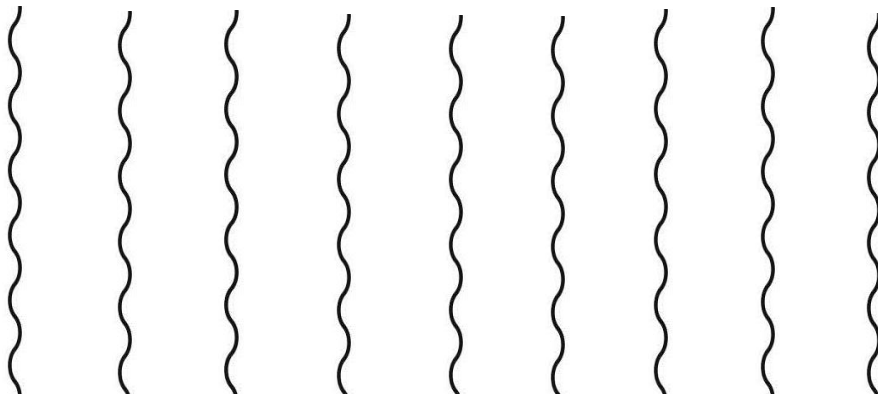




چندین آنتی‌بادی که مهارکننده‌های ایمنی را مورد هدف قرار می‌دهند هم اکنون تحت بررسی‌های کلینیکی می‌باشند و نتایج امیدبخشی را برای برخی از بیماران نشان داده‌اند. ولی هنوز یک بخش اصلی بیماران به بستن مهارکننده‌های ایمنی، واکنش نشان نداده‌اند. مطالعات جدید به یک همبستگی قوی بین سلول‌های T اختصاصی آنتی‌ژن و پاسخ به بستن مهارکننده‌های ایمنی دلالت کرده‌اند (۸۰). بنابراین، القا پاسخ سلولی اختصاصی آنتی‌ژن علیه آنتی‌ژن‌های مرتبط با تومور توسط واکسیناسیون طی درمان بستن مهارکننده‌های ایمنی مفید خواهد بود. برای آزمون اینکه مهارکننده‌های ایمنی را می‌توان با واکسن‌های mRNA ترکیب کرد، واکسن RNActive® را با آنتی‌بادی anti-CTLA-4 ترکیب نمودند (۴۰). موش‌ها با تومورهای E.G7-OVA مورد بررسی قرار گرفتند و به صورت متناوب با واکسن mRNA کدکننده اوالبومین و یک آنتی‌بادی anti-CTLA-4 تیمار شدند. این ترکیب منجر به کاهش معنی‌دار رشد تومور شد، در حالی که درمان anti-CTLA-4 به تنهایی رشد تومور را به تأخیر نینداخت. خلاصه اینکه، پاسخ ضد توموری درمان واکسن RNActive® در ترکیب با بستن مهارکننده‌های ایمنی در یک مدل حیوانی پیش‌کلینیکی قابل بیان است (۴۲).

واکسن‌های mRNA فردی

توسعه واکسن‌های سرطان در گذشته اصولاً به صورت پروتئین‌های مرتبط با تومور به عنوان یک آنتی‌ژن بوده است. این آنتی‌ژن‌های مرتبط با تومور را می‌توان به دو گروه تقسیم کرد: آنتی‌ژن به دست آمده از ژن‌های جنینی که بیش از حد در سلول سرطانی بیان شده‌اند یا آنتی‌ژن‌هایی که از پروتئین‌های اختصاصی بافت به دست آمده‌اند و در سلول‌های سرطانی بیان شده‌اند. برای ارائه درمان‌های ایمنی کاربردی

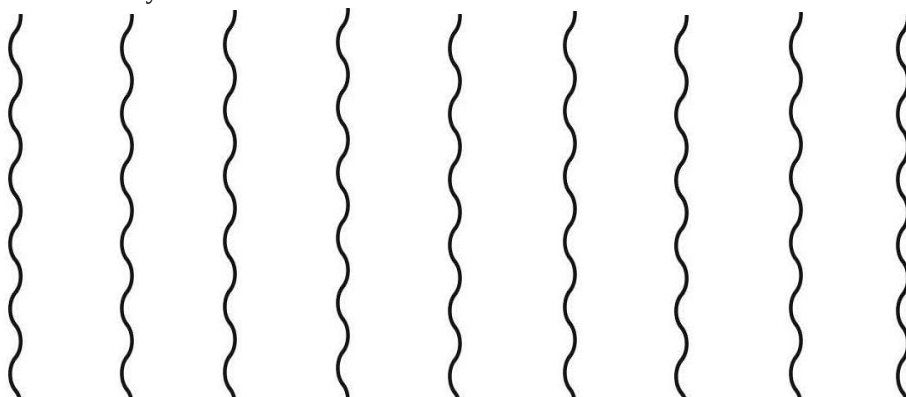


گسترده علیه سرطان، آخرین فعالیت‌های توسعه‌ای در زمینه واکسن سرطان بر آنتی‌ژن‌های مرتبط با تومورهای مشترک تمرکز کرده‌اند (۷۷، ۸۱). ولی استفاده از چنین آنتی‌ژن‌های مرتبط با تومور مشترک با مشکلاتی همراه است: نخست اینکه، سلول‌های T به آسانی آنتی‌ژن‌های خارجی را شناسایی می‌کنند ولی در کل قادر به شناسایی آنتی‌ژن‌های خودی نیستند که به دلیل فرایند انتخاب منفی در تیموس^۱ است که از القا خودایمنی^۲ ممانعت می‌کند. متأسفانه، بیشتر آنتی‌ژن‌های مرتبط با تومور در گروهی از آنتی‌ژن‌های خودی قرار می‌گیرند که مانع از شروع پاسخ ایمنی مناسب به سمت این آنتی‌ژن‌ها می‌شود (۷۴). دوم اینکه، آنتی‌ژن‌های مرتبط با تومور به صورت تکی در بافت تومور بیان نمی‌شوند که منجر به اثر بر روی هدف در بافت سالم از طریق پاسخ ایمنی القا شده می‌شود. در نهایت اینکه، میزان بیان آنتی‌ژن‌های مرتبط با تومور در بافت‌های توموری مختلف یا بیماران سرطانی مختلف، می‌تواند متنوع باشد که به دلیل ناهمگونی زیستی شایع است. تحقیقات اخیر نشان داده است که ۹۵ درصد جهش‌ها در یک بیمار تنوع بالایی در یک تومور خاص یافت می‌شود (۱۴). بنابراین، به نظر می‌رسد که بیان آنتی‌ژن‌های مرتبط با تومورهای مشترک تنوع یکسانی دارند (۳۶). به علاوه، بافت‌های تومور اغلب مکانیزم‌های فرار مختلفی را برای حمله به پاسخ ایمنی ضد تومور به کار می‌گیرند مانند: کاهش بیان آنتی‌ژن‌های مرتبط با تومور یا رشد بیش از حد ترجیحی کلون‌های غیریپایان‌کننده (۷۸).

استفاده از آنتی‌ژن‌های اختصاصی تومور یا آنتی‌ژن‌های جدید به جای آنتی‌ژن‌های مرتبط با تومور برای تولید واکسن‌های سرطان مفید خواهد بود زیرا با توجه به جهش‌های اختصاصی در تومور، سلول T اختصاصی تحت تأثیر انتخاب منفی در تیموس قرار نمی‌گیرد. به علاوه، سلول‌های T اختصاصی آنتی‌ژن جدید، باعث اثرات

۱. Thymus

۲. Autoimmunity





منفی روی هدف در بافت‌های سالم نمی‌شود زیرا آنتی‌ژن‌های جهش‌یافته فقط در سلول‌های سرطان بیان می‌شوند (۱۱، ۲۰، ۳۹).

پیشرفت فناوری‌های توالی‌یابی نسل بعد (NGS)^۱ طی سال‌های اخیر به تولید آنتی‌ژن‌های اختصاصی تومور یا آنتی‌ژن‌های جدید در مقایسه با داده‌های ژنوم، اگزوم^۲ یا ترانسکریپتوم^۳ بافت تومور نسبت به بافت سالم برای یک بیمار منجر شد (۱۸). این رویکرد به تشریح جهش‌های غیرمعمول منجر می‌شود که به صورت تکی در سلول‌های تومور بیان می‌شود. به علاوه، تحلیل اگزوم یا ترانسکریپتوم به شناسایی فراوانی پروتئین در جهش‌های غیرمعمول در بافت تومور منجر شده است (۹۳). این جهش‌های اختصاصی تومور، که به نام موتانوم^۴ مشهور است، توسط سلول‌های توموری در هر فرد منبع ارزشمندی را برای تولید آنتی‌ژن‌های اختصاصی تومور فراهم می‌آورد (۲۵، ۳۱، ۷۴).

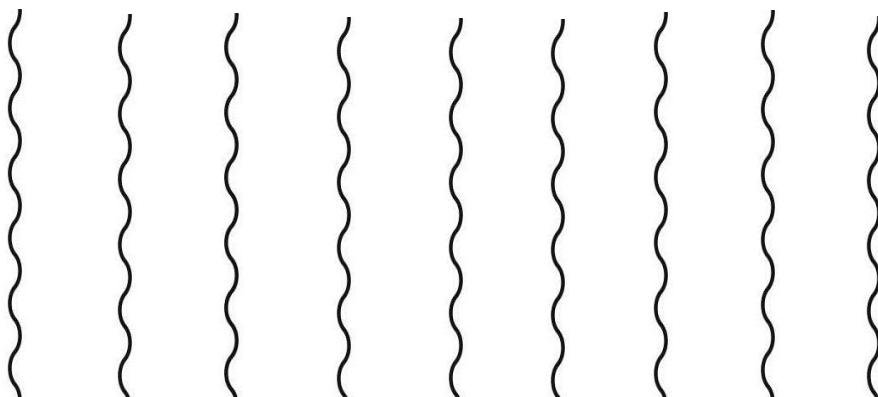
در مطالعه‌ای که بر روی موش‌ها انجام شد شواهد اولیه‌ای را فراهم نمود مبنی بر اینکه آنتی‌ژن‌های جدید که توسط تحلیل موتانوم شناسایی شده‌اند بوسیله سلول‌های T شناسایی می‌شوند (۵۰، ۵۱، ۸۹). به این طریق که، پپتیدهای متصل به MHC برای جهش‌های اختصاصی تومور منجر به تشکیل توالی‌های پروتئین جدید می‌شوند تا فعالیت دوباره سلول T را در شرایط *in vivo* مورد بررسی قرار دهند. کاستل و همکاران توانستند ۱۶ تا از ۵۰ پپتید کدکننده جهش را نشان دهند که پاسخ ایمنی قابل اندازه‌گیری را در موش نشان می‌دهد. به علاوه، پاسخ ایمنی القا شده اثر ضد توموری معنی‌داری در مدل تومور B16F10 ایجاد کرد (۴۱). در مطالعه ماتسوشیتا و

۱. Next-Generation Sequencing (NGS)

۲. Exome

۳. Transcriptome

۴. Mutanome



همکاران، بیان شده است که یک آنتی ژن جدید که از اسپکتترین- $\beta 2$ ^۱ جهش یافته مشتق می شود برای القا حذف سلول تومور مناسب است (۳۹).

مطالعات بعدی در زمینه کلینیکی، شواهد بیشتری را برای توانایی آنتی ژن های جدید اضافه کرد تا پاسخ های ایمنی ضد توموری معنی دار و قابل پیش بینی را در چنین آنتی ژن جدیدی با بررسی موتانوم، القا کنند. رابینز و همکاران توانستند آنتی ژن های جدیدی را شناسایی کنند که توسط سلول های T انتخابی تشخیص داده می شوند، همچنین ون روجی و همکاران واکنش پذیری سلول T اختصاصی آنتی ژن جدید را در یک ملانوما^۲ پاسخ دهنده به ipilimumab (آنتی بادی مونوکلونال) با تحلیل آگزوم تومور کشف کردند (۹۳، ۷۳). بعلاوه، همبستگی مثبت بین بستن مهارکننده ایمنی و وقوع آنتی ژن جدید اختصاصی تومور در چندین مقاله طی سال های اخیر بیان شده است (۳۰). گوپین و همکاران، آنتی ژن های جدید را بعد از درمان anti-PD1 یا anti-CTLA-4 موشی شناسایی کردند که سارکوما^۳ (تومورهای بدخیم) در حال رشد را داشتند. به علاوه آن ها توانستند نشان دهند که واکسن های سنتزی دارای پپتید طولانی قادرند پس زدن تومور را در مقایسه با بستن مهارکننده ایمنی القا کنند (۴۸). جالب تر اینکه، نتایج اسنیدر و همکاران و ریزوی و همکاران همبستگی نزدیکی را بین فراوانی آنتی ژن جدید کلون شده و میزان حساسیت به بستن مهارکننده ایمنی توسط تیمار anti-PD1 یا anti-CTLA-4 در بیمارانی که از سرطان ریه یا ملانوما رنج می بردند، بیان کردند (۸۶). به علاوه، آنتی ژن های جدید پاسخ های اختصاصی سلول $CD8^+$ T را در هر دو مطالعه بیان کردند. همچنین برای رویکردهای درمانی با انتقال لمفوسیت در بیماران ملانوما،

۱. Spectrin- $\beta 2$

۲. Melanoma

۳. Sarcoma

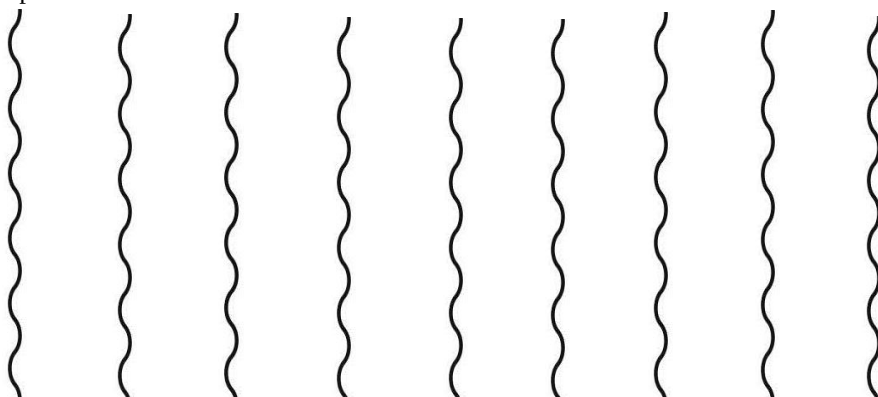


همبستگی مشابهی بین بار آنتی‌ژن جدید و راندمان درمان بیان شد (۸۹). همچنین، تران و همکاران توانستند شواهدی را فراهم آورند که ایمنی درمانی بر اساس سلول‌های $CD4^+ T$ با جهش اختصاصی در بیماران با سرطان اپی‌تلیال^۱ ممکن است (۹۰).

مطالعات مطرح شده در بالا و چند مقاله دیگر امکان بررسی آگزوم تومور به علاوه پیش‌بینی ایمنی‌زایی بر اساس آلوتیپ‌های HL و احتمال اتصال به پپتید را برای شناسایی آنتی‌ژن جدید اختصاصی بیمار در انواع مختلف سرطان را بیان کردند (۷۹، ۸۷). به علاوه، ارزش بالقوه چنین آنتی‌ژن‌های جدیدی برای رویکردهای ایمنی درمانی فردی به فراوانی به کار رفته است. یک احتمال برای مورد هدف قرار دادن آنتی‌ژن‌های جدید اختصاصی در بیماران سرطانی، مهندسی گیرنده‌های سلول T اختصاصی آنتی‌ژن جدید و انتقال انتخابی این سلول‌های T با استفاده از روش‌هایی است که در اینجا تشریح شده است. گزینه دیگر ایمنی‌سازی با واکسن‌هایی است که توالی‌های جهش‌یافته آنتی‌ژن جدید را وارد می‌کنند (۹). راندمان چنین رویکرد ایمنی‌سازی با استفاده از پپتیدها در حال حاضر تحت ارزیابی در فاز I کلینیکی است. این مطالعه کلینیکی بر اساس نتایجی است که توسط شوماخر و همکاران به چاپ رسیده است که پتانسیل ضد توموری واکسیناسیون پپتید IDH1 جهش‌یافته در موش حمل‌کننده تومور انسانی MHC را نشان می‌دهد.

این میزان از نفوذ بالای آنتی‌ژن جدید به نظر می‌رسد که خلاف ماهیت دیگر تومورها می‌باشد (۱۰۰). در بیشتر تومورهای انسانی، بخش بزرگی از جهش‌ها بین بیماران، در فراوانی آن مشترک نیست. به علاوه، فقط بخش کوچکی از جهش‌ها که درون ژن‌ها بیان شده، پتانسیل آنتی‌ژنی را دارد که منجر به واکنش سلول T می‌شود. به دلیل این محدودیت‌ها، آنتی‌ژن‌های جدید با کاربرد وسیع، که در گروه‌های بزرگ بیمار

۱. Epithelial Cancer



برای واکسیناسیون استفاده می‌شوند، کلاً بدون تشابه هستند. بنابراین، واکسن‌های mRNA رویکرد بهتری برای رضایت از تقاضای اختصاصی یک ایمنی‌درمانی بر اساس آنتی‌ژن جدید فردی ارائه می‌دهند (۱۷).

سلول‌های CAR T

امروزه ایمنی‌درمانی گیرنده آنتی‌ژن شیمیری (CAR)^۱ سلول T به عنوان روشی امیدبخش برای درمان تومورها به وجود آمده است. سلول‌های CAR T شکلی از درمان سلول فردی هستند که از سلول‌های T مشتق شده از بیمار، استفاده می‌کنند (۷۶). پس از جمع‌آوری سلول‌های T، از لحاظ ژنتیکی مهندسی می‌شوند تا گیرنده‌هایی را بیان کنند که به آن‌ها اجازه می‌دهد تا یک آنتی‌ژن خاص که توسط سلول‌های سرطان بیان می‌شوند را شناسایی کنند و وقتی که سلول‌ها درون بیمار تزریق می‌شوند، به تومور حمله می‌کنند (۲۳). گیرنده‌های شیمیری معمولاً از یک دامین اتصال به آنتی‌بادی اختصاصی TAA، خارج سلولی تشکیل شده است که به دامین‌های پیام‌رسانی سلول T درون سلولی متصل می‌شود. سلول‌های CAR T مهندسی می‌شود تا در واقع هر آنتی‌ژن مرتبط با تومور مورد هدف قرار بگیرد (۱۱)، ۳۰، ۸۸).

از آنجا که CAR ها بر اساس دامین‌های اتصال به آنتی‌بادی اختصاصی TAA طراحی شده‌اند، تشخیص آنتی‌ژن تومور، مستقل از HLA است، بنابراین کاربرد آن را در بسیاری از بیماران گسترده کرده و بر بعضی از مکانیزم‌های فرار تومور غلبه می‌کند. تزریق انتخابی سلول‌های T تغییر یافته ژنتیکی، سبب شد تا یک CAR را بیان کند که نتایج امیدبخش اولیه را در درمان هماتولوژیک بدخیم^۲ نشان داده است. ولی،

۱. Chimeric Antigen Receptor (CAR)

۲. Hematologic Malignancies



تاکنون، استفاده از سلول‌های CAR T برای درمان سرطان جامد موفقیت محدودی داشته است (۴۶، ۹۱).

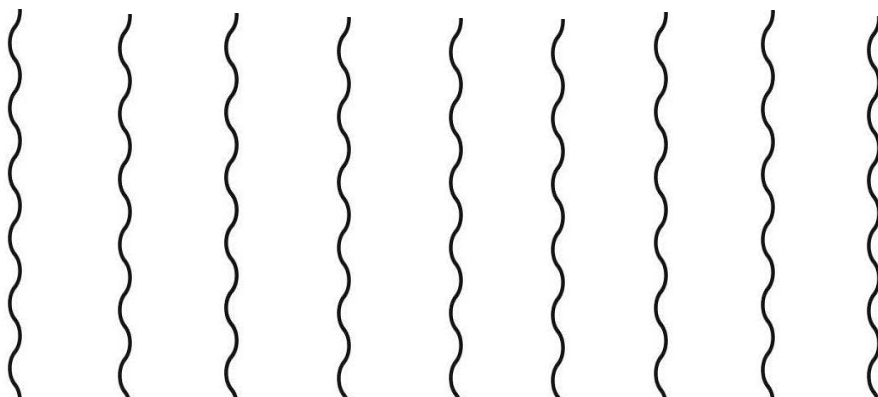
رویکرد اصلی برای تغییر سلول‌های T استفاده از ناقلین ویروسی مانند رتروویروس- γ و لنتی‌ویروس‌ها است که برای تولید بسیار گران هستند و نگرانی‌های امنیتی نیز دارند که با تلفیق درون ژنوم مرتبط است (۵۷).

اخیراً، از تکنیک الکتروپوریشن mRNA استفاده شده است تا سلول‌های T را با بیان موقت CAR مهندسی کند. پروفیسور جون و همکارانش در دانشکده پزشکی دانشگاه پنسیلوانیا، اولین کسانی بودند که سهولت این روش و پتانسیل سلول‌های T مهندسی شده mRNA را تأیید کردند تا اثرات ضد توموری را در مدل‌های تومور پیش‌کلینیکی القا کند (۲۳). در نتیجه، آن‌ها اولین آزمایش کلینیکی را انجام دادند تا سهولت و ایمنی تزریق‌های تکراری mRNA سلول‌های CAR T را در بیماران ارزیابی کنند. دو بیمار، یکی با مزوتلیوما پیشرفته^۱ و دیگری با سرطان پانکراس متاستاز^۲، در فاز I آزمایش کلینیکی مورد بررسی واقع شدند (۲۵). محققین از الکتروپوراسیون mRNA استفاده کردند تا سلول‌های T مشتق شده از بیمار را با CAR مهندسی کنند که به صورت اختصاصی مزوتلین^۳ را مورد هدف قرار می‌دهند (۱۰). پس از اطمینان از زیستایی و اختصاصیت آن‌ها، سلول‌های T مهندسی شده به بیماران تزریق می‌شود (۳، ۴). همه این یافته‌ها از ایجاد سلول‌های T مهندسی شده mRNA به عنوان رویکرد جدید برای انتقال انتخابی سلول حمایت می‌کند که یک پلت فرم منعطف برای درمان سرطان فراهم می‌کند که ممکن است استفاده از سلول‌های T مهندسی شده رتروویروس و لنتی‌ویروس را تکمیل کند.

۱. Advanced Mesothelioma

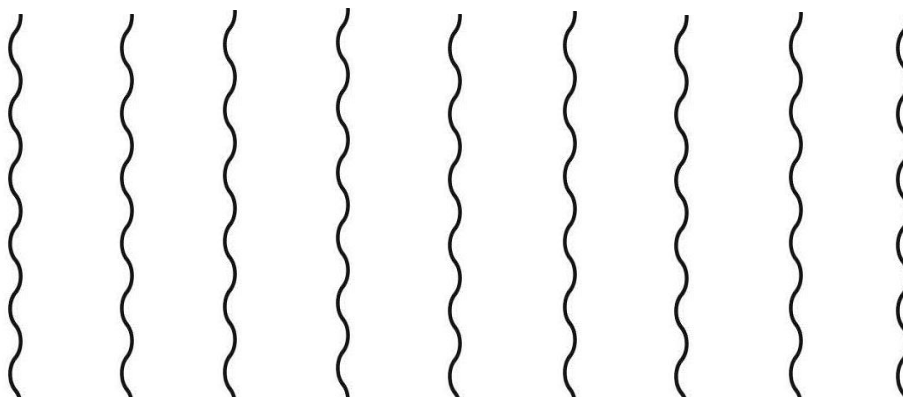
۲. Metastatic Pancreatic Cancer

۳. Mesothelin



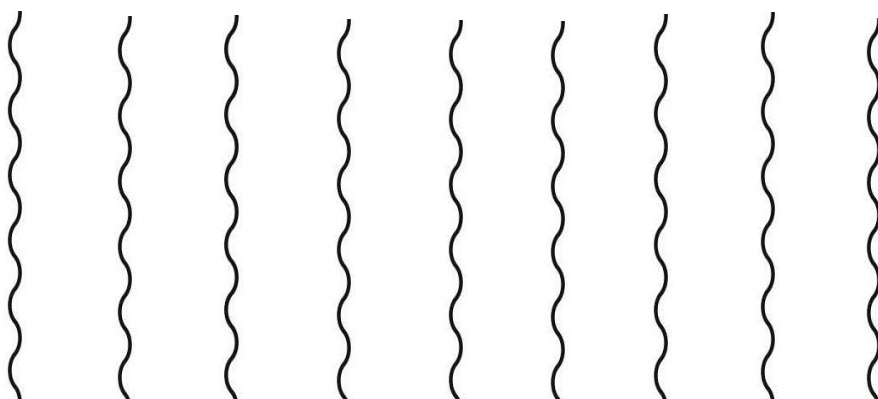
نتیجه گیری

تنوع mRNA که TAA را رمز می‌کند، آنتی‌ژن‌های جدید تومور مشتق شده از بیمار، یا حتی گیرنده‌های آنتی‌ژن شیمیری، واکسن‌های mRNA را به عنوان کاندید امیدبخشی برای استفاده در ایمنی‌درمانی سرطان تبدیل نموده است. نتایج امیدبخشی از اولین مطالعات کلینیکی تحقیقات متعددی را آماده کرده است تا ایمنی‌زایی واکسن‌ها را افزایش دهد، که شامل تغییرات mRNA و کاربرد یا ترکیب با سایر درمان‌ها مانند ممانعت‌کننده‌های ایمنی یا پرتودرمانی است. این تلاش‌ها منجر به گزینه‌های درمان جدید در درمان سرطان می‌شود که از ویژگی‌های خاص واکسن‌های mRNA استفاده می‌شود.

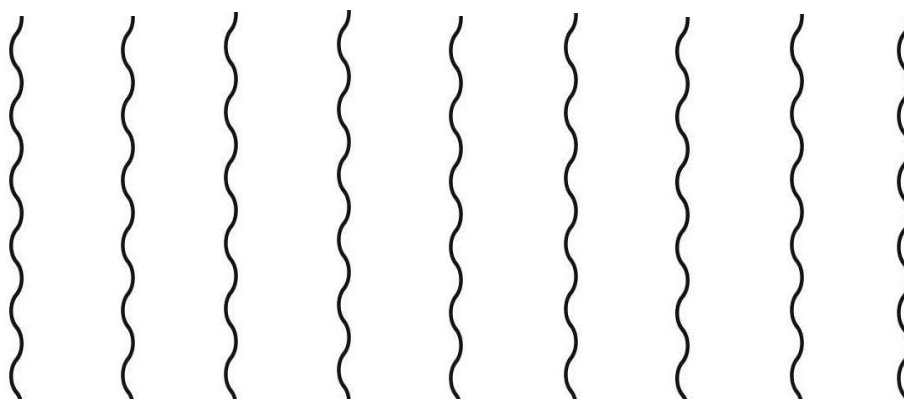




1. Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuyaerts S, Corthals J, Aerts JL, Bonehill A, Thielemans K, Breckpot K (2007) CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol* 37(3):686–695
2. Anderson BR, Muramatsu H, Nallagatla SR, Bevilacqua PC, Sansing LH, Weissman D, Karikó K (2010) Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation. *Nucleic Acids Res* 38(17):5884–5892
3. Bai Y, Kan S, Zhou S, Wang Y, Xu J, Cooke JP, Wen J, Deng H (2015) Enhancement of the in vivo persistence and antitumor efficacy of CD19 chimeric antigen receptor T cells through the delivery of modified TERT mRNA. *Cell Discov* 1:Article number: 15040
4. Barrett DM, Zhao Y, Liu X, Jiang S, Carpenito C, Kalos M, Carroll RG, June CH, Grupp SA (2011) Treatment of advanced leukemia in mice with mRNA engineered T cells. *Hum Gene Ther* 22(12):1575–1586
5. Barrett DM, Liu X, Jiang S, June CH, Grupp SA, Zhao Y (2013) Regimen-specific effects of RNA-modified chimeric antigen receptor T cells in mice with advanced leukemia. *Hum Gene Ther* 24(8):717–727
6. Beatty GL, Haas AR, Maus MV, Torigian DA, Soulen MC, Plesa G, Chew A, Zhao Y, Levine BL, Albelda SM, Kalos M, June CH (2014) Mesothelin-specific chimeric antigen receptor mRNA-engineered T cells induce anti-tumor activity in solid malignancies. *Cancer Immunol Res* 2(2):112–120

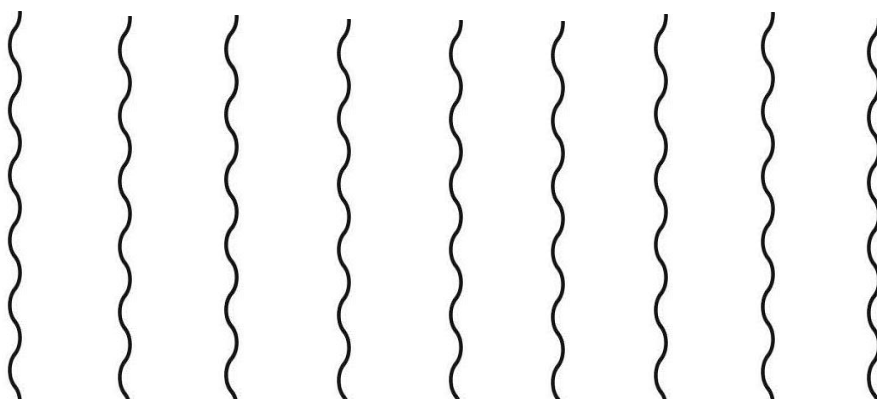


7. Benteyn D, Heirman C, Bonehill A, Thielemans K, Breckpot K (2015) mRNA-based dendritic cell vaccines. *Expert Rev Vaccines* 14(2):161–176
8. Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E (1996) Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med* 184(2):465–472
9. Bonehill A, Van Nuffel AM, Corthals J, Tuyaerts S, Heirman C, François V, Colau D, van der Bruggen P, Neyns B, Thielemans K (2009) Single-step antigen loading and activation of dendritic cells by mRNA electroporation for the purpose of therapeutic vaccination in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 15(10):3366–3375
10. Boon T, Kellermann O (1977) Rejection by syngeneic mice of cell variants obtained by mutagenesis of a malignant teratocarcinoma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(1):272–275
11. Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A (1994) Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 12:337–365
12. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, Bartido S, Stefanski J, Taylor C, Olszewska M, Borquez-Ojeda O, Qu J, Wasielewska T, He Q, Bernal Y, Rijo IV, Hedvat C, Kobos R, Curran K, Steinherz P, Jurcic J, Rosenblat T, Maslak P, Frattini M, Sadelain M (2013) CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 5(177):177ra38
13. Caruso DA, Orme LM, Neale AM, Radcliff FJ, Amor GM, Maixner W, Downie P, Hassall TE, Tang ML, Ashley DM (2004) Results of a phase 1 study utilizing monocyte-derived dendritic
14. cells pulsed with tumor RNA in children and young adults with brain cancer. *Neuro Oncol.* 6 (3):236–246

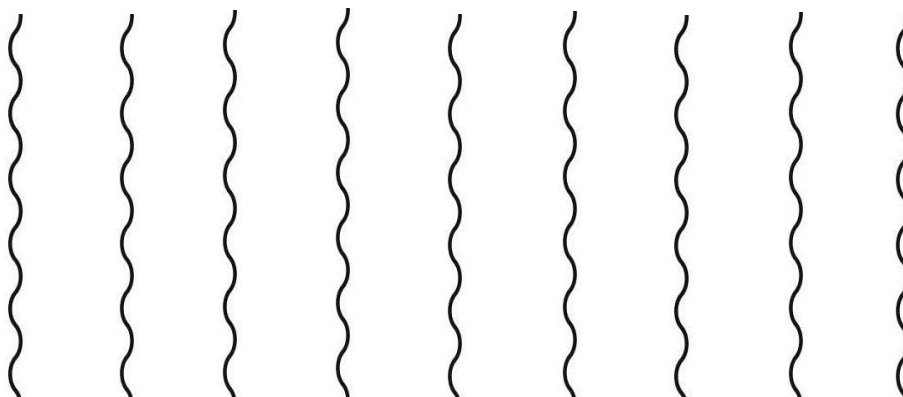




15. Caruso DA, Orme LM, Amor GM, Neale AM, Radcliff FJ, Downie P, Tang ML, Ashley DM (2005) Results of a Phase I study utilizing monocyte-derived dendritic cells pulsed with tumor RNA in children with Stage 4 neuroblastoma. *Cancer* 103(6):1280–1291
16. Castle JC, Kreiter S, Diekmann J, Lower M, van de Roemer N, de Graaf J, Selmi A, Diken M, Boegel S, Paret C, Koslowski M, Kuhn AN, Britten CM, Huber C, Türeci O, Sahin U (2012) Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer Res* 72(5):1081–1091
17. Cerundolo V, Hermans IF, Salio M (2004) Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. *Nat Immunol* 5(1):7–10
18. Cheadle EJ, Sheard V, Hombach AA, Chmielewski M, Riet T, Berrevoets C, Schooten E, Lamers C, Abken H, Debets R, Gilham DE (2012) Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy. *Methods Mol Biol* 907:645–666
19. Coulie PG, Lehmann F, Lethé B, Herman J, Lurquin C, Andrawiss M, Boon T (1995) A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(17):7976–7980
20. Dannull J, Nair S, Su Z, Boczkowski D, DeBeck C, Yang B, Gilboa E, Vieweg J (2005) Enhancing the immunostimulatory function of dendritic cells by transfection with mRNA encoding OX40 ligand. *Blood* 105(8):3206–3213
21. Demaria S, Formenti SC (2012) Role of T lymphocytes in tumor response to radiotherapy. *Front Oncol* 2:95 Diken M, Kreiter S, Selmi A, Britten CM, Huber C, Türeci, Sahin U (2011) Selective uptake of naked vaccine RNA by dendritic cells is driven by macropinocytosis and abrogated upon DCmaturation. *Gene Ther* 18(7):702–708

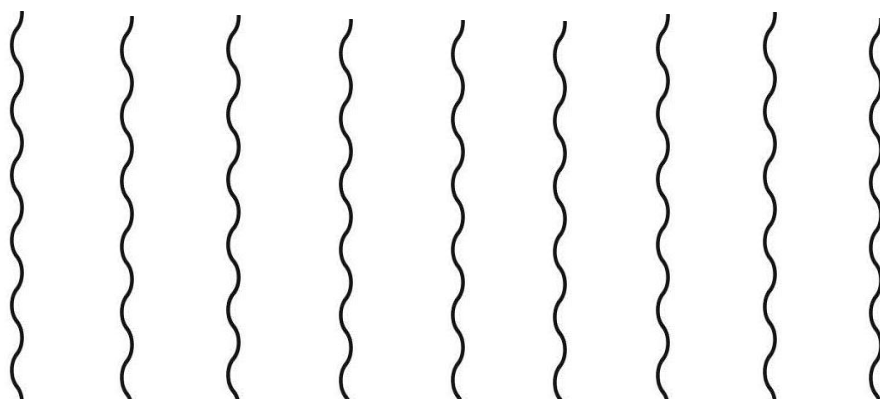


22. Dörrie J, Schaft N, Müller I, Wellner V, Schunder T, Hönig J, Oostingh GJ, Schön MP, Robert C, Kempgen E, Schuler G (2008) Introduction of functional chimeric E/L-selectin by RNA electroporation to target dendritic cells from blood to lymph nodes. *Cancer Immunol Immunother* 57(4):467–477
23. Duan F, Duitama J, Al Seesi S, Ayres CM, Corcelli SA, Pawashe AP, Blanchard T, McMahon D, Sidney J, Sette A, Baker BM, Mandoiu II, Srivastava PK (2014) Genomic and bioinformatic profiling of mutational neoepitopes reveals new rules to predict anticancer immunogenicity. *J Exp Med* 211(11):2231–2248
24. Echchakir H, Mami-Chouaib F, Vergnon I, Baurain JF, Karanikas V, Chouaib S, Coulie PG (2001) A point mutation in the alpha-actinin-4 gene generates an antigenic peptide recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human lung carcinoma. *Cancer Res* 61(10):4078–4083
25. Formenti SC, Demaria S (2013) Combining radiotherapy and cancer immunotherapy: a paradigm shift. *J Natl Cancer Inst* 105(4):256–265
26. Fotin-Mleczek M, Duchardt KM, Lorenz C, Pfeiffer R, Ojki Z, Zrna S, Probst J, Kallen KJ (2011) Messenger RNA-based vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity. *J Immunother* 34(1):1–15
27. Fotin-Mleczek M, Zanzinger K, Heidenreich R, Lorenz C, Thess A, Duchardt KM, Kallen KJ (2012) Highly potent mRNA based cancer vaccines represent an attractive platform for combination therapies supporting an improved therapeutic effect. *J Gene Med* 14(6):428–439
28. Fotin-Mleczek M, Zanzinger K, Heidenreich R, Lorenz C, Kowalczyk A, Kallen KJ, Huber SM (2014) mRNA-based vaccines synergize with radiation therapy to eradicate established tumors. *Radiat Oncol* 9:180





29. Garnett CT, Schlom J, Hodge JW (2008) Combination of docetaxel and recombinant vaccine enhances T-cell responses and antitumor activity: effects of docetaxel on immune enhancement. *Clin Cancer Res* 14(11):3536–3544
30. Gerlinger M, Catto JW, Orntoft TF, Real FX, Zwarthoff EC, Swanton C (2015) Intratumour heterogeneity in urologic cancers: from molecular evidence to clinical implications. *Eur Urol* 67(4):729–737
31. Golden EB, Frances D, Pellicciotta I, Demaria S, Helen Barcellos-Hoff M, Formenti SC (2014) Radiation fosters dose-dependent and chemotherapy-induced immunogenic cell death. *Oncoimmunology* 3:e28518
32. Grünebach F, Kayser K, Weck MM, Müller MR, Appel S, Brossart P (2005) Cotransfection of dendritic cells with RNA coding for HER-2/neu and 4-1BBL increases the induction of tumor antigen specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Gene Ther* 12(9):749–756
33. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, Teachey DT, Chew A, Hauck B, Wright JF, Milone MC, Levine BL, June CH (2013) Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 368(16):1509–1518
34. Gubin MM, Zhang X, Schuster H, Caron E, Ward JP, Noguchi T, Ivanova Y, Hundal J, Arthur CD, Krebber WJ, Mulder GE, Toebes M, Vesely MD, Lam SS, Korman AJ, Allison JP, Freeman GJ, Sharpe AH, Pearce EL, Schumacher TN, Aebersold R, Rammensee HG,
35. Melief CJ, Mardis ER, Gillanders WE, Artyomov MN, Schreiber RD (2014) Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* 515 (7528):577–581
36. Heiser A, Coleman D, Dannull J, Yancey D, Maurice MA, Lallas CD, Dahm P, Niedzwiecki D, Gilboa E, Vieweg J (2002) Autologous dendritic cells transfected



with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest.* 109 (3):409–417

37. Hoerr I, Obst R, Rammensee HG, Jung G (2000) In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur J Immunol* 30(1):1–7 Jger E, Jger D, Knuth A (2002) Clinical cancer vaccine trials. *Curr Opin Immunol* 14 (2):178–182

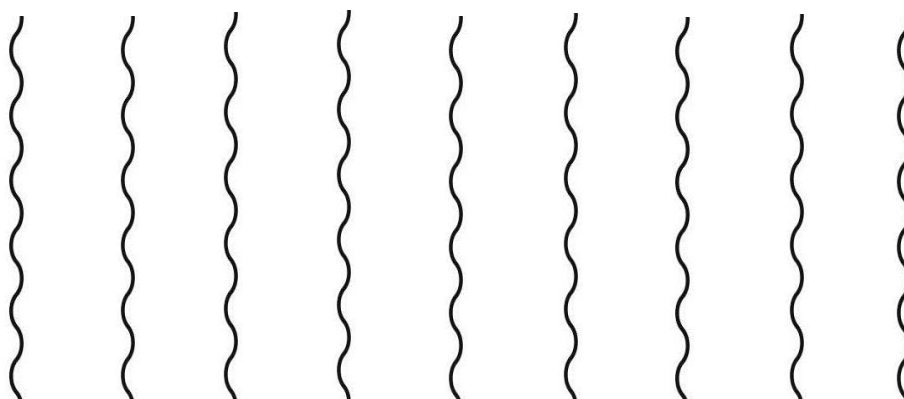
38. Jensen MC, Riddell SR (2015) Designing chimeric antigen receptors to effectively and safely target tumors. *Curr Opin Immunol* 33:9–15

39. Kallen KJ, The^ك A (2014) A development that may evolve into a revolution in medicine: mRNA as the basis for novel, nucleotide-based vaccines and drugs. *Ther Adv Vaccines.* 2(1):10–31

40. Kallen KJ, Heidenreich R, Schnee M, Petsch B, Schlake T, Thess A, Baumhof P, Scheel B, Koch SD, Fotin-Mleczek M (2013) A novel, disruptive vaccination technology: self-adjuvanted RNActive(®) vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 9(10):2263–2276

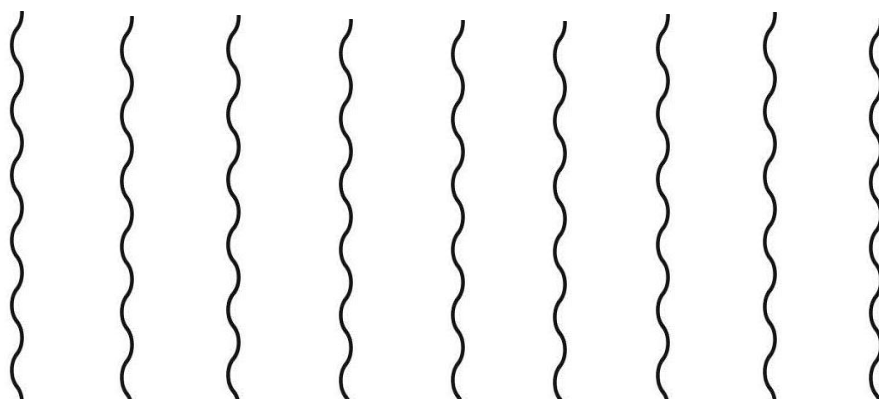
41. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, Redfern CH, Ferrari AC, Dreicer R, Sims RB, Xu Y, Frohlich MW, Schellhammer PF; IMPACT Study Investigators (2010) Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med.* 363 (5):411–22

42. Karik^و K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, Weissman D (2008) Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther* 16(11):1833–1840

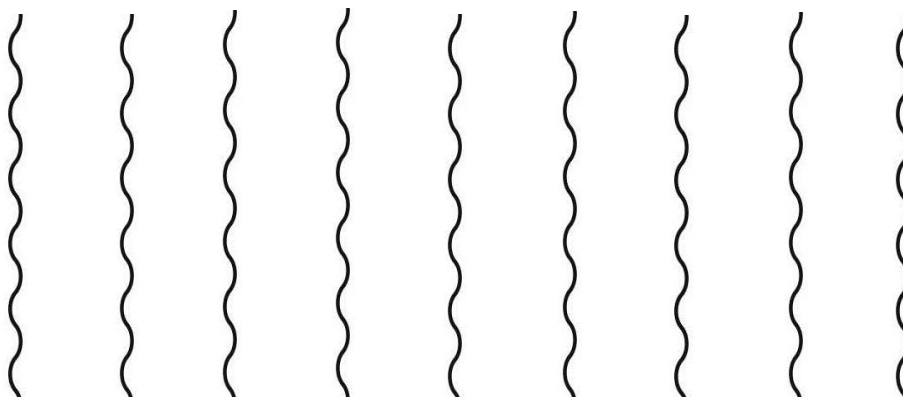




43. Kershaw MH, Westwood JA, Darcy PK (2013) Gene-engineered T cells for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 13(8):525–541
44. Knapp DC, Mata JE, Reddy MT, Devi GR, Iversen PL (2003) Resistance to chemotherapeutic drugs overcome by c-Myc inhibition in a Lewis lung carcinoma murine model. *Anticancer Drugs* 14:39–47
45. Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, Wilson WH, Spaner DE, Maric I, Stetler-Stevenson M, Phan GQ, Hughes MS, Sherry RM, Yang JC, Kammula US, Devillier L, Carpenter R, Nathan DA, Morgan RA, Laurencot C, Rosenberg SA (2012) B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood* 119(12):2709–2720
46. Kowalczyk A, Doener F, Zanzinger K, Noth J, Baumhof P, Fotin-Mleczek M, Heidenreich R (2016) Self-adjuvanted mRNA vaccines induce local innate immune responses that lead to a potent and boostable adaptive immunity. *Vaccine* 34:3882–3893
47. Kreiter S, Vormehr M, van de Roemer N, Diken M, Lower M, Diekmann J, Boegel S, Schrörs B, Vascotto F, Castle JC, Tadmor AD, Schoenberger SP, Huber C, Türeci, Sahin U (2015) Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature* 520(7549):692–696
48. Kübler H, Scheel B, Gnad-Vogt U, Miller K, Schultze-Seemann W, Vom Dorp F, Parmiani G, Hampel C, Wedel S, Trojan L, Jocham D, Maurer T, Rippin G, Fotin-Mleczek M, von der Mülbe F, Probst J, Hoerr I, Kallen KJ, Lander T, Stenzl A (2015) Self-adjuvanted mRNA vaccination in advanced prostate cancer patients: a first-in-man phase I/IIa study. *J Immunother Cancer* 3:26

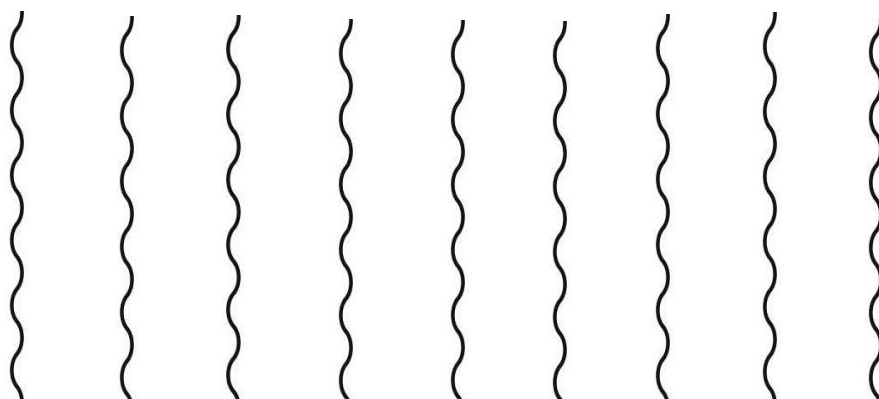


49. Kyte JA, Kvalheim G, Lislud K, Straten P, Dueland S, Aamdal S, Gaudernack G (2007) T cell responses in melanoma patients after vaccination with tumor-mRNA transfected dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 56(5):659–675
50. Lamers CH, Sleijfer S, Vulto AG, Kruit WH, Kliffen M, Debets R, Gratama JW, Stoter G, Oosterwijk E (2006) Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *J Clin Oncol* 24(13):e20–e22
51. Lamers CH, Sleijfer S, van Steenbergen S, van Elzakker P, van Krimpen B, Groot C, Vulto A, den Bakker M, Oosterwijk E, Debets R, Gratama JW (2013) Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity. *Mol Ther* 21(4):904–912
52. Leisegang M, Kammertoens T, Uckert W, Blankenstein T (2016) Targeting human melanoma neoantigens by T cell receptor gene therapy. *J Clin Invest* 126(3):854–858
53. Linnemann C, van Buuren MM, Bies L, Verdegaal EM, Schotte R, Calis JJ, Behjati S, Velds A, Hilkmann H, Atmioui DE, Visser M, Stratton MR, Haanen JB, Spits H, van der Burg SH, Schumacher TN (2015) High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neoantigens by CD4⁺ T cells in human melanoma. *Nat Med* 21(1):81–85
54. Lu YC, Yao X, Crystal JS, Li YF, El-Gamil M, Gross C, Davis L, Dudley ME, Yang JC, Samuels Y, Rosenberg SA, Robbins PF (2014) Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions. *Clin Cancer Res* 20 (13):3401–3410

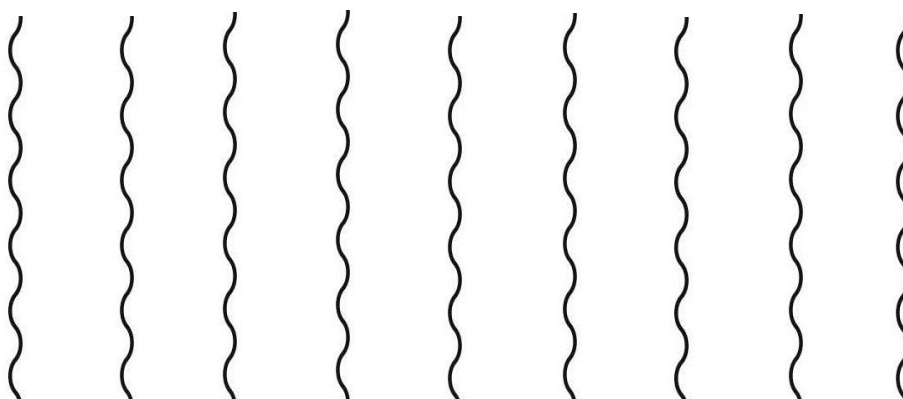




55. Lurquin C, Van Pel A, Mariamé B, De Plaen E, Szikora JP, Janssens C, Reddehase MJ, Lejeune J, Boon T (1989) Structure of the gene of tum- transplantation antigen P91A: the mutated exon encodes a peptide recognized with Ld by cytolytic T cells. *Cell* 58(2):293–303
56. Mandelboim O, Vadai E, Fridkin M, Katz-Hillel A, Feldman M, Berke G, Eisenbach L (1995) Regression of established murine carcinoma metastases following vaccination with tumour-associated antigen peptides. *Nat Med* 1(11):1179–1183
57. Martincorena I, Roshan A, Gerstung M, Ellis P, Van Loo P, McLaren S, Wedge DC, Fullam A, Alexandrov LB, Tubio JM, Stebbings L, Menzies A, Widaa S, Stratton MR, Jones PH, Campbell PJ (2015) High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science* 348(6237):880–886 Tumor evolution
58. Martinon F, Krishnan S, Lenzen G, Magné R, Gomard E, Guillet JG, Lévy JP, Meulien P (1993) Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *Eur J Immunol* 23(7):1719–1722
59. Matsushita H, Vesely MD, Koboldt DC, Rickert CG, Uppaluri R, Magrini VJ, Arthur CD, White JM, Chen YS, Shea LK, Hundal J, Wendl MC, Demeter R, Wylie T, Allison JP, Smyth MJ, Old LJ, Mardis ER, Schreiber RD (2012) Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature* 482(7385):400–404
60. Maus MV, Haas AR, Beatty GL, Albelda SM, Levine BL, Liu X, Zhao Y, Kalos M, June CH (2013) T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans. *Cancer Immunol Res* 1(1):26–31
- 82 K. Fiedler et al.



61. Melero I, Berman DM, Aznar MA, Korman AJ, Pérez Gracia JL, Haanen J (2015) Evolving synergistic combinations of targeted immunotherapies to combat cancer. *Nat Rev Cancer* 15 (8):457–472
62. Moore MW, Carbone FR, Bevan MJ (1988) Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* 54(6):777–785
63. Morse MA, Nair SK, Mosca PJ, Hobeika AC, Clay TM, Deng Y, Boczkowski D, Proia A, Neidzwiecki D, Clavien PA, Hurwitz HI, Schlom J, Gilboa E, Lysterly HK (2003) Immunotherapy with autologous, human dendritic cells transfected with carcinoembryonic antigen mRNA. *Cancer Invest* 21(3):341–349
64. Nair SK, Hull S, Coleman D, Gilboa E, Lysterly HK, Morse MA (1999) Induction of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vitro using autologous dendritic cells loaded with CEA peptide or CEA RNA in patients with metastatic malignancies expressing CEA. *Int J Cancer* 82(1):121–124
65. Nair SK, Morse M, Boczkowski D, Cumming RI, Vasovic L, Gilboa E, Lysterly HK (2002) Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer patients by autologous tumor RNA-transfected dendritic cells. *Ann Surg* 235(4):540–549
66. Palmer M, Parker J, Modi S, Butts C, Smylie M, Meikle A, Kehoe M, MacLean G, Longenecker M (2001) Phase I study of the BLP25 (MUC1 peptide) liposomal vaccine for active specific immunotherapy in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 3 (1):49–57 discussion 58
67. Petsch B, Schnee M, Vogel AB, Lange E, Hoffmann B, Voss D, Schlake T, Thess A, Kallen KJ, Stitz L, Kramps T (2012) Protective efficacy of in vitro synthesized, specific





mRNA vaccines against influenza A virus infection. *Nat Biotechnol* 30(12):1210–1216

68. Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN (2003) Cancer immunotherapy using RNA-loaded dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 134(3):378–384

69. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH (2011) Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 365(8):725–733

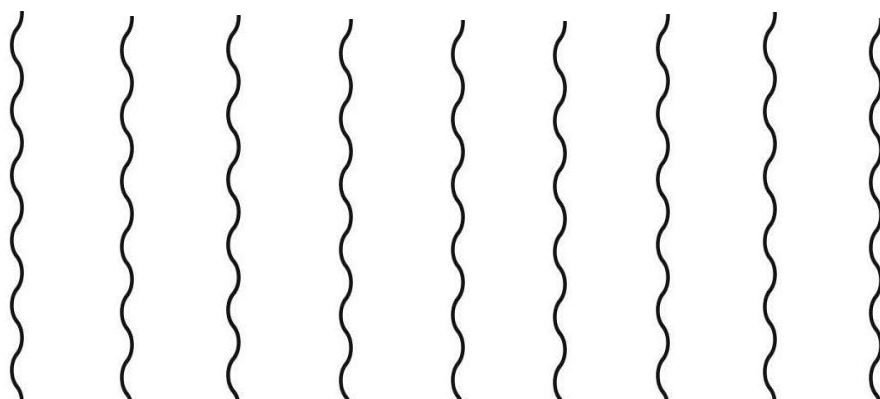
70. Pruitt SK, Boczkowski D, de Rosa N, Haley NR, Morse MA, Tyler DS, Dannull J, Nair S (2011) Enhancement of anti-tumor immunity through local modulation of CTLA-4 and GITR by dendritic cells. *Eur J Immunol* 41(12):3553–3563

71. Rajasagi M, Shukla SA, Fritsch EF, Keskin DB, DeLuca D, Carmona E, Zhang W, Sougnez C, Cibulskis K, Sidney J, Stevenson K, Ritz J, Neuberg D, Brusic V, Gabriel S, Lander ES, Getz G, Hacohen N, Wu CJ (2014) Systematic identification of personal tumor-specific neoantigens in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 124(3):453–462

72. Rammensee HG (2006) Some considerations on the use of peptides and mRNA for therapeutic vaccination against cancer. *Immunol Cell Biol* 84(3):290–294

73. Ramos CA, Dotti G (2011) Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 11(7):855–873

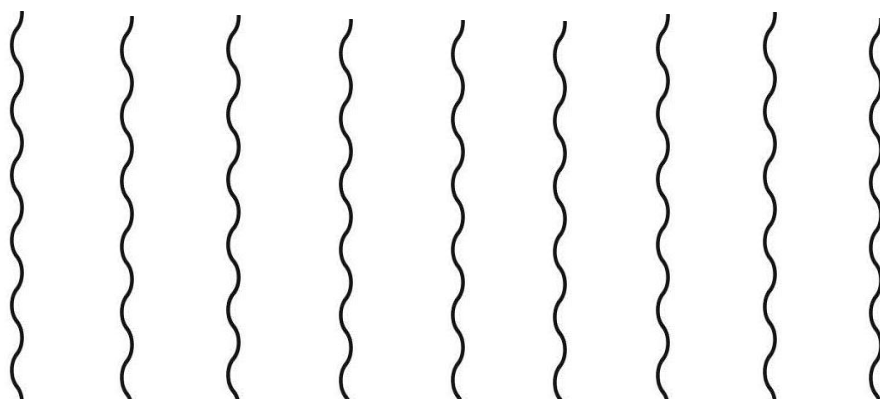
74. Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, Groothuis TA, Chakraborty M, Wansley EK, Camphausen K, Luiten RM, de Ru AH, Neijssen J, Griekspoor A, Mesman E, Verreck FA, Spits H, Schlom J, van Veelen P, Neefjes JJ (2006) Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J Exp Med* 203(5):1259–1271



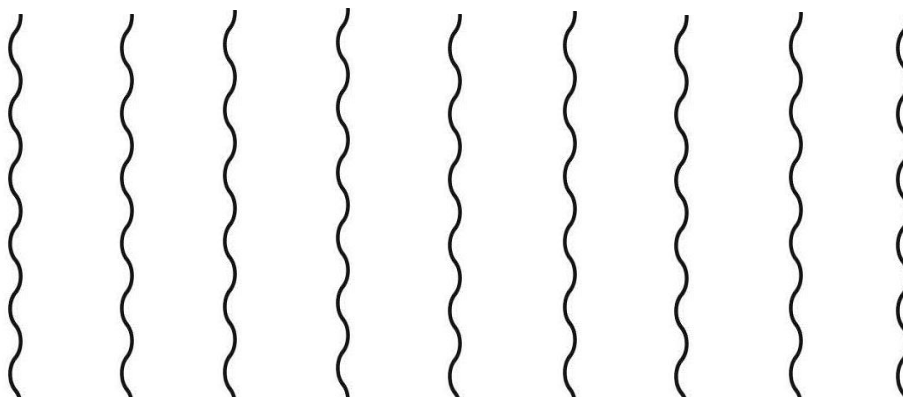
75. Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA (2012) Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol* 12(4):269–281
76. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, Lee W, Yuan J, Wong P, Ho TS, Miller ML, Rekhtman N, Moreira AL, Ibrahim F, Bruggeman C, Gasmi B, Zappasodi R, Maeda Y, Sander C, Garon EB, Merghoub T, Wolchok JD, Schumacher TN, Chan TA (2015) Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 348(6230):124–128
77. Robbins PF, Lu YC, El-Gamil M, Li YF, Gross C, Gartner J, Lin JC, Teer JK, Clifton P, Tycksen E, Samuels Y, Rosenberg SA (2013) Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med* 19 (6):747–752
78. Savai R, Schermuly RT, Pullamsetti SS, Schneider M, Greschus S, Ghofrani HA, Traupe H, Grimminger F, Banat GA (2007) A combination hybrid-based vaccination/adoptive cellular therapy to prevent tumor growth by involvement of T cells. *Cancer Res* 67(11):5443–5453
79. Scheel B, Teufel R, Probst J, Carralot JP, Geginat J, Radsak M, Jarrossay D, Wagner H, Jung G, Rammensee HG, Hoerr I, Pascolo S (2005) Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA. *Eur J Immunol* 35(5):1557–1566
80. Schnee M, Vogel AB, Voss D, Petsch B, Baumhof P, Kramps T, Stitz L (2016) An mRNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein induces protection against lethal infection in mice and correlates of protection in adult and newborn Pigs. *PLoS Negl Trop Dis* 10(6)



81. Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM (2003) The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 15(2):138–147
82. Schumacher TN, Schreiber RD (2015) Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 348 (6230):69–74
83. Schumacher T, Bunse L, Pusch S, Sahm F, Wiestler B, Quandt J, Menn O, Osswald M, Oezen I, Ott M, Keil M, Bal J, Rauschenbach K, Grabowska AK, Vogler I, Diekmann J, Trautwein N, Eichmüller SB, Okun J, Stevanović S, Riemer AB, Sahin U, Friese MA, Beckhove P, von Deimling A, Wick W, Platten M (2014) A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. *Nature* 512(7514):324–327
84. Sebastian M, Papachristofilou A, Weiss C, Früh M, Cathomas R, Hilbe W, Wehler T, Rippin G, Koch SD, Scheel B, Fotin-Mleczek M, Heidenreich R, Kallen KJ, Gnad-Vogt U, Zippelius A (2014) Phase Ib study evaluating a self-adjuvanted mRNA cancer vaccine (RNAActive®) combined with local radiation as consolidation and maintenance treatment for patients with stage IV non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 14:748
85. Shojaei F, Wu X, Malik AK, Zhong C, Baldwin ME, Schanz S, Fuh G, Gerber H-P, Ferrara N (2007) Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b⁺ Gr1⁺ myeloid cells. *Nat Biotechnol* 25:911–920
86. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, Walsh LA, Postow MA, Wong P, Ho TS, Hollmann TJ, Bruggeman C, Kannan K, Li Y, Elipenahli C, Liu C, Harbison CT, Wang L, Ribas A, Wolchok JD, Chan TA (2014) Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med* 371(23):2189–2199
87. Stratton MR (2011) Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science* 331 (6024):1553–1558

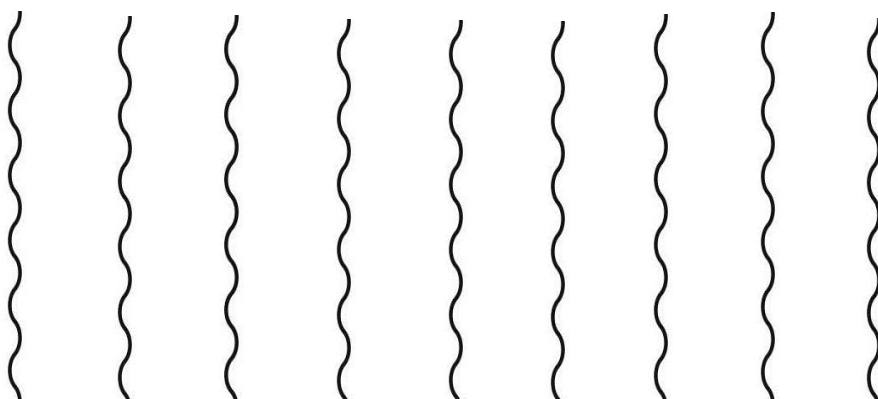


88. Su Z, Dannull J, Heiser A, Yancey D, Pruitt S, Madden J, Coleman D, Niedzwiecki D, Gilboa E, Vieweg J (2003) Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res* 63(9):2127–2133
89. Tran E, Turcotte S, Gros A, Robbins PF, Lu YC, Dudley ME, Wunderlich JR, Somerville RP, Hogan K, Hinrichs CS, Parkhurst MR, Yang JC, Rosenberg SA (2014) Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4⁺ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science* 344 (6184):641–645
90. Tran E, Ahmadzadeh M, Lu YC, Gros A, Turcotte S, Robbins PF, Gartner JJ, Zheng Z, Li YF, Ray S, Wunderlich JR, Somerville RP, Rosenberg SA (2015) Immunogenicity of somatic mutations in human gastrointestinal cancers. *Science* 350(6266):1387–1390
91. Van den Eynde B, Lethé B, Van Pel A, De Plaen E, Boon T (1991) The gene coding for a major tumor rejection antigen of tumor P815 is identical to the normal gene of syngeneic DBA/2 mice. *J Exp Med* 173(6):1373–1384
92. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T (1991) A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254(5038):1643–1647
93. Van Nuffel AM, Wilgenhof S, Thielemans K, Bonehill A (2012) Overcoming HLA restriction in clinical trials: Immune monitoring of mRNA-loaded DC therapy. *Oncoimmunology* 1 (8):1392–1394

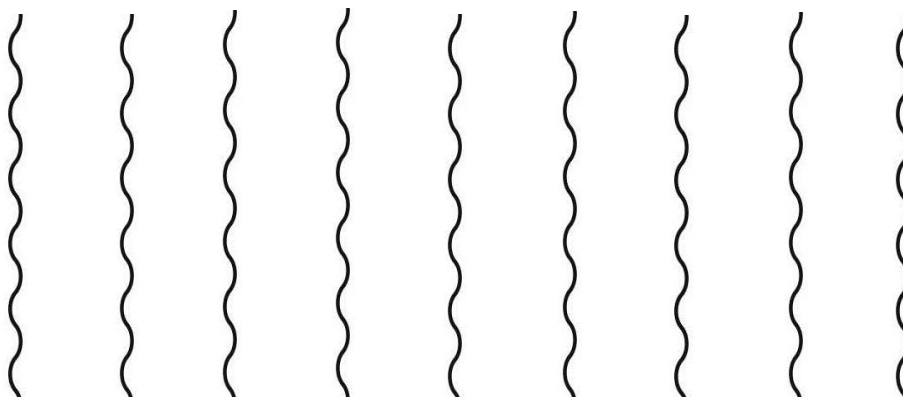




94. van Rooij N, van Buuren MM, Philips D, Velds A, Toebe M, Heemskerk B, van Dijk LJ, Behjati S, Hilkmann H, El Atmioui D, Nieuwland M, Stratton MR, Kerkhoven RM, Kesmir C, Haanen JB, Kvistborg P, Schumacher TN (2013) Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma. *J Clin Oncol* 31(32):e439–e442
95. Van Tendeloo VF, Ponsaerts P, Lardon F, Nijs G, Lenjou M, Van Broeckhoven C, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2001) Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood* 98 (1):49–56
96. Vesely MD, Schreiber RD (2013) Cancer immunoediting: antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy. *Ann NY Acad Sci* 1284:1–5
97. Wolfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wolfel C, Klehmann-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer zum Büschenfelde KH, Beach D (1995) A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269(5228):1281–1284
98. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247(4949 Pt 1):1465–1468
99. Yadav M, Jhunjhunwala S, Phung QT, Lupardus P, Tanguay J, Bumbaca S, Franci C, Cheung TK, Fritsche J, Weinschenk T, Modrusan Z, Mellman I, Lill JR, Delamarre L (2014) Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature* 515(7528):572–576
100. Zhao Y, Moon E, Carpenito C, Paulos CM, Liu X, Brennan AL, Chew A, Carroll RG, Scholler J, Levine BL,



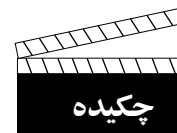
Albelda SM, June CH (2010) Multiple injections of electroporated autologous T cells expressing a chimeric antigen receptor mediate regression of human disseminated tumor. Cancer Res 70(22):9053–9061



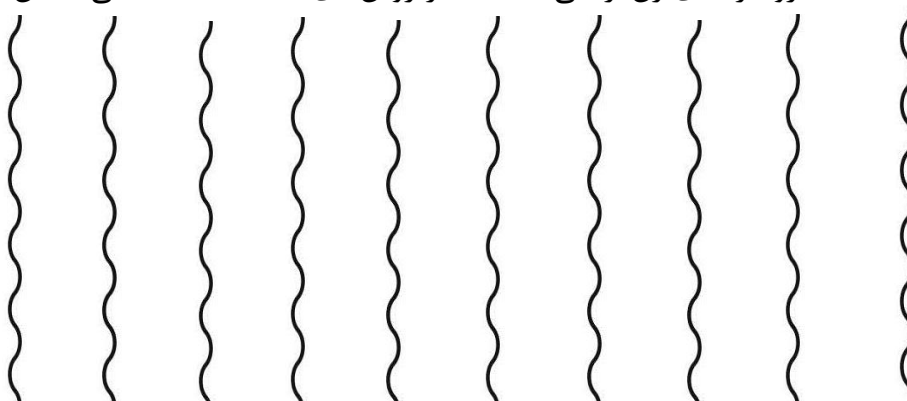
○ فصل پنجم

روش‌های ژن‌درمانی برای غلبه بر مقاومت دارویی به

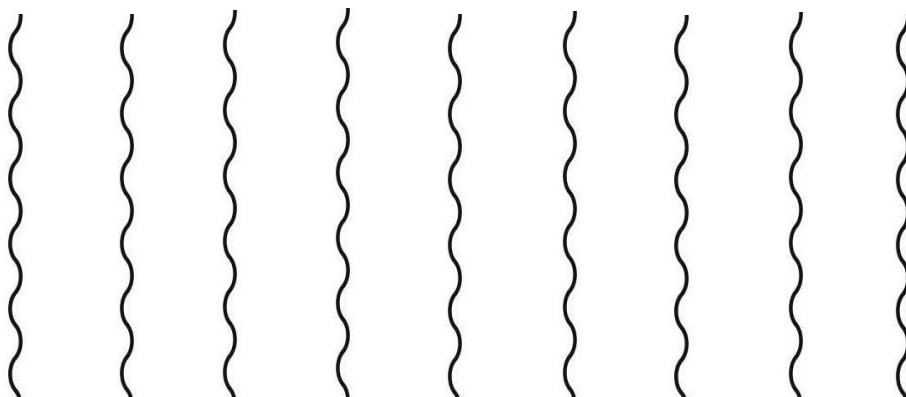
ABCB1

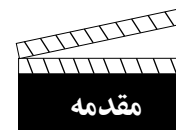


مقاومت چند دارویی (MDR) در برابر عوامل فعال دارویی یک مشکل کلینیکی عمومی در بیمارانی است که از سرطان رنج می‌برند. MDR اغلب توسط بیان بیش از حد مولکول‌های مصنوعی شیمیایی و انتقال بین غشایی آن‌ها که به خانواده کاست انتقال‌دهنده‌ی متصل به ATP (ABC) تعلق دارند، اطلاق می‌شود. این خانواده پروتئینی شامل انتقال‌دهنده‌ی مرتبط با MDR کلاسیک ABCB1 (MDR1/P-gp) است. ممانعت از انتقال‌دهنده‌ی ABC بوسیله ترکیباتی با وزن مولکولی کم در بیماران سرطانی به صورت گسترده در آزمایشات کلینیکی بررسی شده‌اند، ولی نتایج حاصله ناامیدکننده بودند. بنابراین، در دهه‌های اخیر رویکردهای درمانی آزمایشی جایگزین برای غلبه بر MDR تحت بررسی گسترده قرار گرفته است. این موارد شامل رویکردهای ژن‌درمانی است که از روش‌های مختلف مانند: آنتی‌سنس،



ریبوزایم، RNA مداخله‌گر و CRISPR/Cas9 به کار گرفته می‌شود. رویکردهای انتقال متنوعی استفاده شده است تا MDR را در مدل‌های تومور مختلف در شرایط *in vitro* و *in vivo* معکوس سازد. در این بخش نتایج و نتیجه‌گیری‌های این مطالعات ژن‌درمانی بحث خواهد شد.





مقاومت شامل مقاومت چند دارویی (MDR)^۱ نسبت به شیمی‌درمانی^۲ یک مشکل کلینیکی عمومی در بیمارانی است که از سرطان رنج می‌برند. علاوه بر تغییرات در مسیرهای مختلف سلولی که در تنظیم چرخه سلولی، آپوپتوز^۳ (مرگ برنامه‌ریزی شده سلول) و ترمیم دخیل هستند، MDR با بیان بیش از حد^۴ مولکول‌های زنبیوتیک^۵ (شیمیایی مصنوعی) و انتقال بین غشایی که به خانواده ترانسپورترهای کاست متصل به ATP (ABC)^۶ تعلق دارند، اطلاق می‌گردد (۱۶). اولین عضو شناسایی شده این خانواده در MDR، ABCB1 بود، یک گلیکوپروتئین جاسازی شده در غشای سیتوپلاسمی ۱۷۰ کیلودالتونی که به نام P-گلیکوپروتئین^۷، P170، یا MDR1/P-gp هم شناخته می‌شود (۸). در ادامه شناسایی ABCB1، تعداد زیادی از ترانسپورترهای ABC بی‌اثرکننده دارو در سلول‌های سرطانی شناسایی شده‌اند. ممانعت از ترانسپورترهای ABC با ترکیباتی با وزن مولکولی کم، در بیماران سرطانی به صورت گسترده در آزمایشات کلینیکی بررسی شده‌اند، ولی نتایج ناامیدکننده بوده‌اند

۱. Multidrug Resistance (MDR)

۲. Chemotherapy

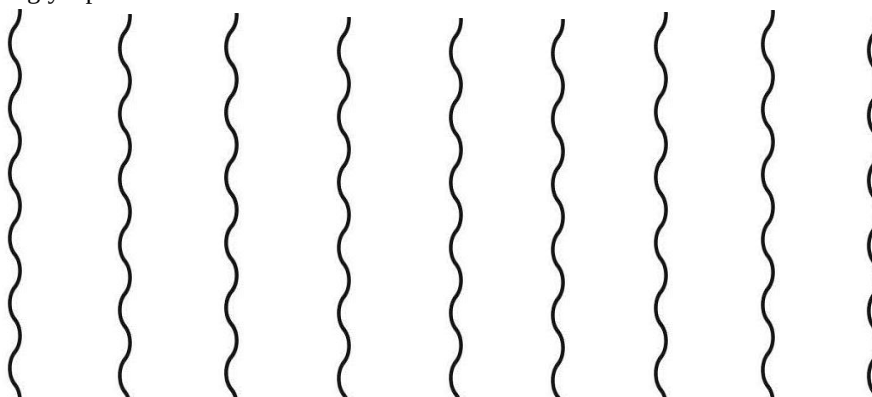
۳. Apoptosis

۴. Over Expression

۵. Xenobiotic

۶. ATP-Binding Cassette (ABC)-Transporters

۷. P-glycoprotein



(۲۷). امروزه، رویکردهای درمانی تجربی مختلفی ایجاد شده‌اند که قادر به خاموش کردن ژن‌های کدکننده ترانسپورتر ABC اختصاصی در سلول‌های سرطانی مقاوم به دارو هستند. امیدبخش‌ترین این تلاش‌ها بر طراحی درمان‌هایی بر اساس RNA تمرکز یافته‌اند (۷، ۱۲).

در اواسط دهه ۱۹۸۰، الیگونوکلیوتیدهای آنتی‌سنس^۱ بر اساس DNA و RNA با تغییرات شیمیایی مختلف با سیستم‌های مدل مختلف در شرایط *in vitro* و *in vivo* با درجات مختلف موفقیت، آزمون شده‌اند. مطابق آن، در زمان سنتز ABCB1 با متیل فسفونات‌های الیگونوکلیتوزید غیریونی^۲ در سلول‌های اریترولوسمی (سرطان خون حاد)^۳ K562 مقاوم به چند دارو، ممانعت می‌شود (۵). طی دهه ۱۹۹۰، ریبوزایم‌هایی^۴ با دو ویژگی آنتی‌سنس و کاتالیتیکی به صورت موفقیت‌آمیزی برای حذف بیان ژن اختصاصی به کار رفتند. ریبوزایم‌ها بیان شدند تا به صورت انتخابی از بیان ژن‌های مختلف مانند ABCB1 که ژنی را در لاین‌های سلولی سرطان انسان مانند تومورهای که در موش رشد می‌کردند، ممانعت کنند. ولی مشکلات حل نشده با موارد انتقالی برای این مولکول‌های RNA، کاربرد کلینیکی آن‌ها را محدود کرد (۴).

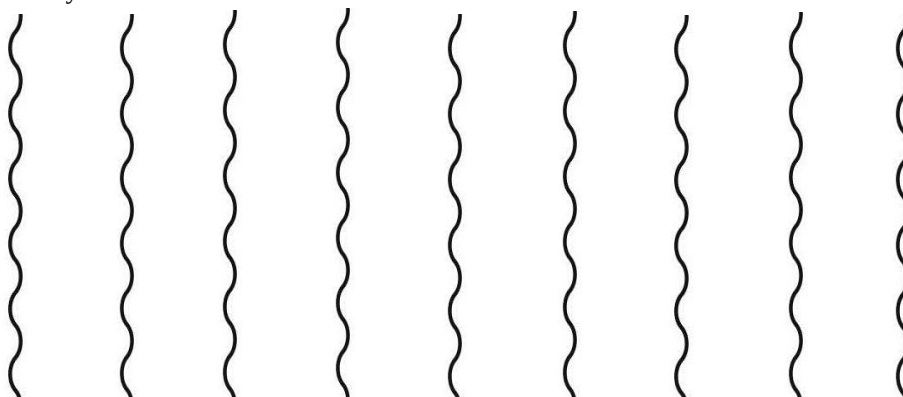
در اواخر دهه ۲۰۰۰، پیشرفت‌ها فرصت‌های جدیدی را برای ایجاد درمان‌های RNA به خصوص آن‌هایی که بر اساس استفاده از مسیر

۱. Antisense Oligonucleotides

۲. Nonionic Oligonucleoside Methylphosphonates

۳. Erythroleukemia Cells

۴. Ribozymes





RNA مداخله‌گر (RNAi)^۱ بودند، بیان کردند (۲۳). مشاهداتی که مولکول‌های RNA سنتزی، یعنی مولکول‌های RNA مداخله‌گر کوچک دورشته‌ای (siRNA)^۲، را می‌توان برای خاموشی اختصاصی ژن در سلول‌های پستانداران استفاده کرد که در آن زمان انفجار تحقیق در مورد مکانیزم‌های کاربرد پدیده RNAi شروع شد (۳۰). پیرو اولین شواهد از اهمیت کارایی این فناوری بر روی مدل حیوانی در برای به دام انداختن MDR با ممانعت از سنتز ABCB1، تعداد فراوانی از مطالعات به چاپ رسید که این روش در مدل‌های مختلف سلول سرطانی به کار گرفته شدند (۳۱).

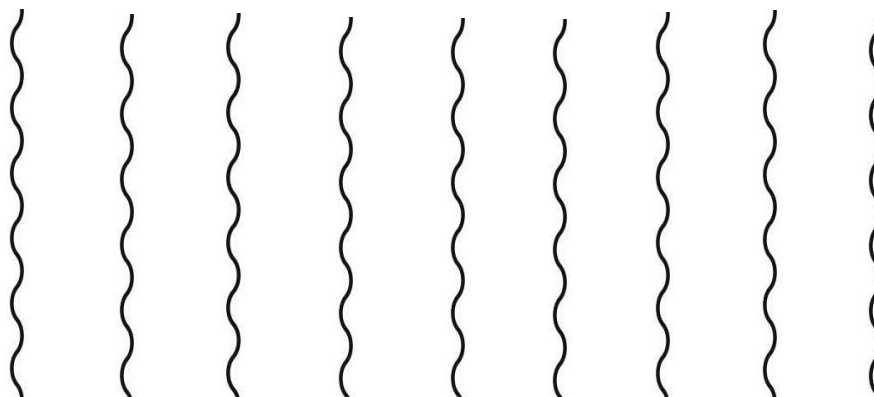
با شروع دهه ۲۰۱۰، ایجاد فناوری ویرایش ژنومی CRISPR/Cas9^۳ امکانات جدیدی را به عنوان ابزار عمومی برای تنظیم دقیق بیان ژن در سلول‌های یوکاریوتی ارائه داد. در تحقیقات سرطان، ابتدا این روش در شرایط *in vitro* به کار گرفته شد تا ژن‌های E6 یا E7 کد شده توسط HPV16 در سلول‌های کارسینومای (بدخیم سرطانی) گردن انسان^۴ را مورد هدف قرار داده و تخریب کند، که منجر به توقف چرخه سلولی شده و مرگ سلول سرطانی را ایجاد می‌کرد (۴). تاکنون، فقط یک مطالعه به چاپ رسیده است که این فناوری جدید به کار رفت تا بیان ABCB1 را در یک نوع سگ در مدل *in vitro* مشاهده شود. در این مطالعه، سلول‌های کلیه سگ Madin-Darby

۱. RNA interference (RNAi)

۲. Double-Stranded small interfering RNA (siRNA)

۳. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 (CRISPR/Cas9)

۴. Human Cervical Carcinoma Cells

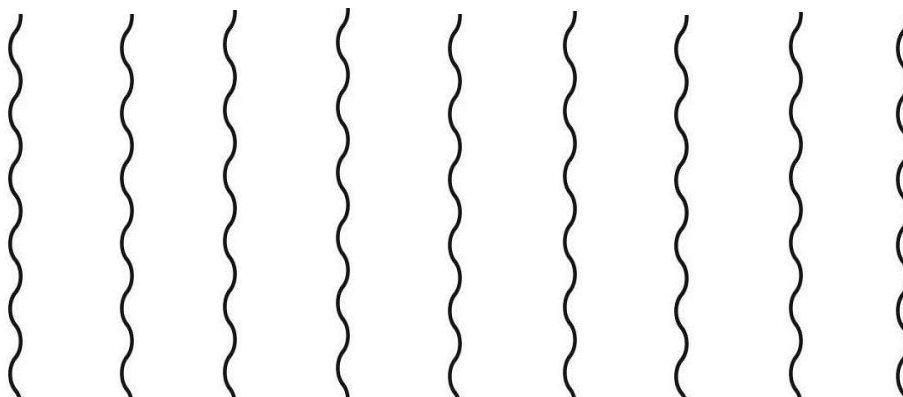


(MDCK II wt)^۱ بیان بالایی از ABCB1 را نشان دادند که با ناقلین پلاسمید CRISPR/Cas9 تلقیح شده بودند، که سه ناحیه خاص از ژن کدکننده ABCB1 را مورد هدف قرار می دادند. سلول های تیمار شده به صورت کامل سطوح قابل ردیابی بیان ABCB1 را از دست داده بودند و هیچ فعالیت انتقال اختصاصی ABCB1 که قابل مشاهده باشد را نداشتند (۱۱).

همانند استفاده از الیگونوکلوئوتیدها و ریبوزیم های آنتی سنس، راه حل کلیدی در درمان هایی بر اساس RNAi یا CRISPR/Cas9، به دست آوردن انتقال مؤثر است. مولکول های RNA لخت (بدون پوشش)^۲ به سرعت در محیط فیزیولوژیکی تجزیه می شوند و در نتیجه، طول نیمه عمر کوتاهی دارند. تغییرات شیمیایی قبلی که ایجاد شد تا نیمه عمر مولکول های آنتی سنس و ریبوزایم ها را طولانی کند، اثبات نمود که در درمان هایی با روش siRNA ارزشمندتر است. در این تغییرات لینکاژهای اسکلت الیگونوکلوئوتیدی را در نظر می گرفتند تا از تجزیه توسط نوکلئازها محافظت شوند. رویکردهای استفاده از RNAi یا CRISPR/Cas ممکن است فرصت های بهتری را نسبت به مواردی که از روش های قبلی حاصل می شود، ارائه دهد. امروزه رویکردهای جدید برای انتقال مولکول های درمانی RNA دائماً در حال توسعه هستند و برای هدف گیری ترانسپورترهای ABC مرتبط با MDR به کار گرفته می شوند (۲۲).

۱. Madin– Darby Canine Kidney Cells (MDCK II wt)

۲. Naked RNA





مقاومتی که بر رویکردهای ژن درمانی غلبه می‌کند

انتقال به روش ترانسفکسیون^۱

آسان‌ترین روش برای انتقال عوامل درمانی مانند نوکلئیک‌اسیدها می‌شود استفاده از روش ترانسفکسیون با انواع مختلف معرف‌ها می‌باشد. این معرف‌ها شامل لیپیدهای کاتیونی یا سایر پلیمرهای کاتیونی است که می‌تواند کمپلکس‌هایی را با نوکلئیک‌اسید دارای بار منفی تشکیل دهد. این کمپلکس‌ها توسط سلول‌های هدف از طریق اندوسیتوز^۲ پذیرفته شده‌اند. با توجه به معرف تشکیل‌دهنده کمپلکس، این فرایند به صورت لیپوفکشن^۳ یا پلی‌فکشن^۴ طراحی شده است. مطابق آن، اولین مطالعات که از الیگونوکلوئید آنتی‌سنس، ریبوزایم یا عوامل وساطت RNAi استفاده کردند، روش‌های ترانسفکسیون برای حذف mRNA کدکننده ABCB1 به کار رفت. در این بین، تعداد فراوانی از مطالعات که از مدل‌های مختلف سلولی استفاده کردند، به چاپ رسیدند. با توجه به، نوع مدل سلولی، عوامل خاموشی ژن و توالی‌های هدف، دامنه وسیعی از راندمان‌ها در خاموشی ژن مشاهده می‌شود (۱۷). به عنوان مثال، درمان لاین سلولی کارسینومای معده انسان^۵ مقاوم به چند دارو EPG85-257RDB و لاین سلولی کارسینوما پانکراس انسانی^۶ EPP85-181RDB با کمپلکس‌های شامل siRNA سنتزی شیمیایی و پلیمرهای کاتیونی، منجر به بیش از ۹۰ درصد کاهش در سطح بیان mRNAABCB1 شد (۱۹). در این آزمایش، مقاومت علیه داروی

۱. Transfection

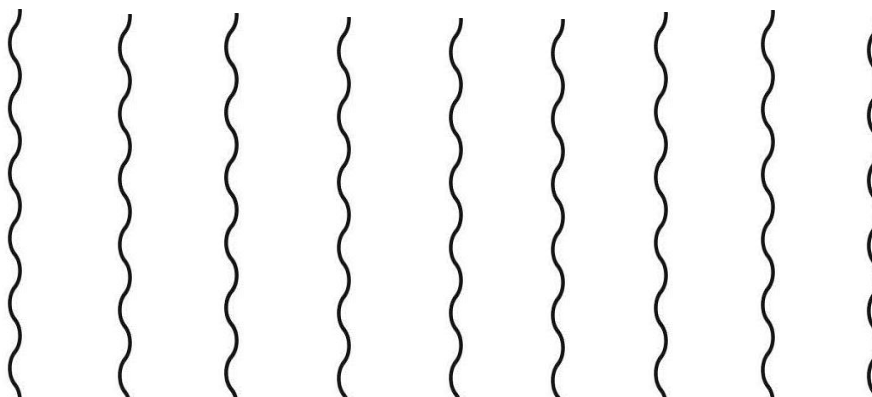
۲. Endocytosis

۳. Lipofection

۴. Polyfection

۵. Human Gastric Carcinoma Cell

۶. Human Pancreatic Carcinoma Cell



دانوروبیسین^۱ سوپسترای ABCB1 تا ۸۹ درصد (EPP85-181RDB) یا ۵۸ درصد (EPG85-257RDB) کاهش یافت. اما آزمایشات با این مدل‌های سلولی که از روش‌های ترانسفکسیون پایدار استفاده می‌کردند، راندمان‌های بیشتری در برگشت MDR نشان دادند. کاهش بیان ABCB1 با ترانسفکسیون با ریبوزایم anti-ABCB1 یا ناقلین بیان بر اساس پلاسمید RNA سنجاق سری کوتاه (shRNA)^۲ ضد ABCB1 در هر مورد منجر به حذف کامل بیان mRNA ABCB1 و بازگشت کامل فنوتیپ مقاومت دارویی در سلول‌های EPP85-181RDB و EPG85-257RDB شدند (۲۴).

روش‌های مختلفی در بهبود این رویکردها توسعه یافتند. برای مثال: ریبوزایم چندگانه چند منظوره^۳ (MTMR) ساخته شد. این MTMR همزمان علیه mRNA کدکننده سه نوع ترانسپورتر ABC با نام‌های ABCB1، ABCC2 و ABCG2 هدایت شد. در این MTMR، سه ریبوزایم سرچکشی با فعالیت ترانس^۴ که علیه ABCB1، ABCC2 و ABCG2 هدایت شدند با توالی جداکننده فضای همولوگ ABCB1 و سه ریبوزایم اختصاصی ABCB1 با فعالیت سیس^۵ متصل شدند. ریبوزایم‌های سرچکشی با فعالیت ترانس از MTMR با طریق روش خودبرش کاتالیکی^۶ توسط ریبوزایم‌هایی با فعالیت سیس، رها شدند. در مدل‌های سلولی مختلف، MTMR می‌تواند سوبستراهای اختصاصی خودشان را بدون از دست رفتن راندمان، تجزیه کنند (۱۴).

۱. Daunorubicin

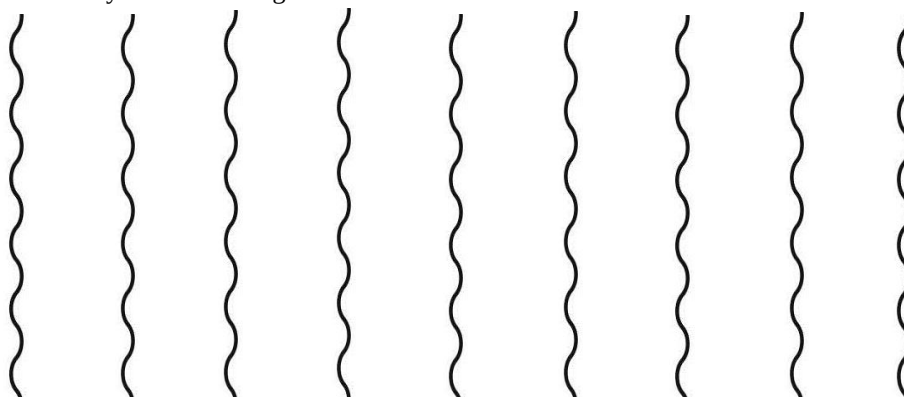
۲. short hairpin RNA (shRNA)

۳. Multitarget Multiribozyme (MTMR)

۴. Trans-acting Hammerhead Ribozymes

۵. Cis-acting ABCB1-specific Ribozymes

۶. Autocatalytic Self-cleavage





این مطالعات اگرچه پتانسیل بالای رویکردهای ژن درمانی را برای برگشت MDR با هدف قرار دادن ABCB1 نشان دادند، ولی این رویکردهای تجربی برای کاربرد درمانی مناسب نیستند. بنابراین، پروتوکل‌های جدید انتقالی ایجاد شدند.

انتقال با استفاده از نانوذرات

انواع مختلفی از حاملین نانو^۱ که بر اساس RNA هستند، برای ژن درمانی طراحی شده‌اند. این حاملین شامل لیپوزوم‌ها^۲، نانوذرات فلزی و پلیمری^۳، دندریمرها^۴، ژلاتین‌ها^۵، و نقاط یا میله‌های کوانتومی^۶ هستند که ویژگی‌های مجزایی را نشان می‌دهند. ایجاد MDR با واسطه ABCB1 کلاسیک توسط انتقال siRNA بر اساس نانوذرات در سال ۲۰۰۵ با ساخت یک وسیله انتقال مانند دندریمر متصل به پپتید Tat و یک پپتید سوراخ‌کننده سلول شروع شد (۳۲). ولی کمپلکس‌های دندریمر-الیگونوکلوئوتید^۷ برای انتقال siRNA ها بسیار ضعیف بودند و بیان ABCB1 فقط به صورت هفتگی ممانعت می‌شد (۹). در رویکردهای بعدی RNAi بر اساس نانوذرات، بهبود راندمان ممانعت از ABCB1 مشاهده شد (۲۱، ۲۶). چندین مطالعه در استفاده از مدل‌های سلولی سرطان مقاوم به چند داروی مختلف، در شرایط in vitro و in vivo مورد بررسی قرار گرفتند (۲۰، ۳۳، ۳۵، ۳۶). همه این مطالعات تأییدی بر این مفهوم فراهم کردند که این روش ممکن است برای به دام انداختن MDR با واسطه ABCB1 قابل کاربرد باشد.

۱. Nanocarriers

۲. Liposomes

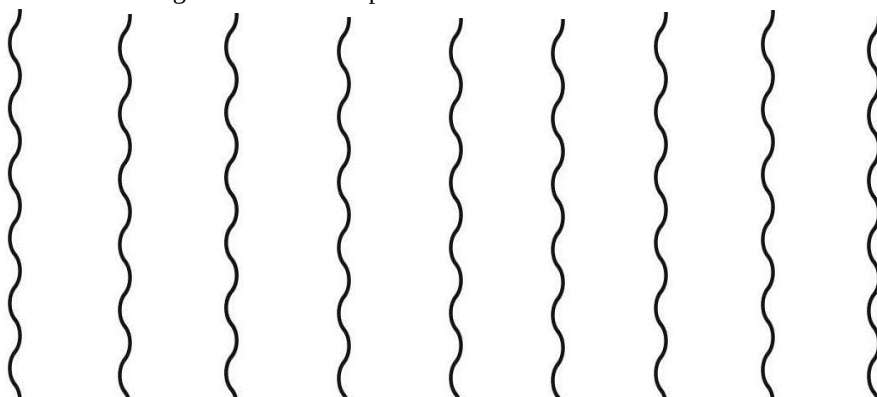
۳. Metallic and Polymeric Nanoparticles

۴. Dendrimers

۵. Gelatins

۶. Quantum dots/rods

۷. Dendrimer- Oligonucleotide Complexes



انتقال ویروسی

در آزمایشات متنوع انسانی، ناقلین ویروسی^۱ به عنوان ابزار انتقال مؤثر برای ژن درمانی کلینیکی ظهور یافتند (۱۳). در این روش‌ها، از ویروس‌ها برای طراحی ناقلینی استفاده شدند که shRNA را کد می‌کردند که علیه یک هدف مرتبط با بیماری mRNA هدایت می‌شدند مانند: رونوشت اختصاصی ترانسپورتر ABC. به عنوان مثال، آدنوویروس‌هایی^۲ که shRNA ضد ABCB1 را کد می‌کنند پتانسیل بالای این رویکرد را در بازگشت کامل فنوتیپ مقاومت به چند دارو در مدل‌های سرطان مختلف در شرایط in vitro و in vivo نشان دادند (۲، ۱۰). مشابه آن، ناقلین لنتی ویروسی^۳ که از HIV-1 مشتق شده‌اند کاهش بیان مناسبی از ABCB1 و بازگشت موفقیت‌آمیز فنوتیپ مقاومت به چند دارو را نشان دادند (۳۴).

انتقال باکتریایی

در این روش جهت تیمار ژن درمانی بیماری‌های مرتبط با روده، سویه‌های باکتری *Escherichia coli* مهاجم غیربیمارگر ایجاد شدند. طبق این رویکرد، توالی‌های DNA که یک نوکلئیک‌اسید درمانی مانند shRNA را کد می‌کنند و به یک مولکول خاص حمله می‌کند، به سلول هدف توسط باکتری منتقل شده‌اند. دو مرحله مختلف برای باکتری لازم است تا به عنوان سیستم انتقال برای نوکلئیک‌اسیدهای درمانی درون سلول پستانداران عمل کند: ۱- داخلی‌سازی میکروارگانیزم‌ها به درون سلول میزبان با روش اندوسیتوز ۲- انتقال باکتری درمانی^۴ یا مولکول‌های نوکلئیک‌اسید درمانی از وزیکول اندوسیتوز به سیتوسول سلول هدف. برای این رویکرد، باکتری

۱. Viral Vectors

۲. Adenoviruses

۳. Lentiviral Vectors

۴. Therapeutic Bacterial



Escherichia coli با پلاسمید حاوی توالی‌هایی که دو پروتئین مختلف را کد می‌کنند تجهیز شدند (۱). اولین پروتئین اینویسین^۱ از باکتری گرم منفی *Yersinia pseudotuberculosis* است. اینویسین روی سطح باکتریایی قرار می‌گیرد و قادر به اتصال به یک زیرگروه بتا-۱-اینTEGRIN^۲ است که در غشاهای سلولی سلول‌های پستانداران شامل سلول‌های سرطانی قرار گرفته است. با این اتصال، جذب انتخابی به وسیله اندوسیتوز باکتری توسط سلول میزبان پستاندار ممکن می‌شود. در نتیجه داخل شدن، باکتری *Escherichia coli* در وزیکول اندوسیتوز لیزوزم^۳ قرار می‌گیرد که در نتیجه تجزیه میکروارگانیزم رخ می‌دهد. در بین پروتئین‌های مختلف باکتریایی که در وزیکول فاگوزوم^۴ رها می‌شوند، غشای لومن^۵ دومین پروتئین ضروری برای انتقال باکتریایی درمانی، لیتریولیزین O (LLO)^۶ از باکتری بیماری‌زای موتوسیتوزن لیستریا^۷ است. این پروتئین یک سم تشکیل‌دهنده منفذ است (۳). محتوای سیتوپلاسمی باکتری *Escherichia coli* مهاجم، شامل نوکلئیک‌اسید یا پروتئین درمانی، می‌تواند بعداً به داخل سیتوسول سلول پستاندار میزبان از طریق منفذ تولید شده توسط LLO رها شود. در نتیجه، این مورد به صورت موفقیت‌آمیزی برای انتقال مولکول‌های درمانی با واسطه باکتری در شرایط *in vitro* و *in vivo* به کار گرفته شدند (۱۵).

با کاربرد این فناوری در برابر سلول‌های سرطانی مقاوم به چند دارو، بیان ABCB1 و سطح مقاومت دارویی تا حدود ۵۰ درصد مقدار اولیه کاهش یافت.

۱. Invasin

۲. Subset of Beta-1-Integrins

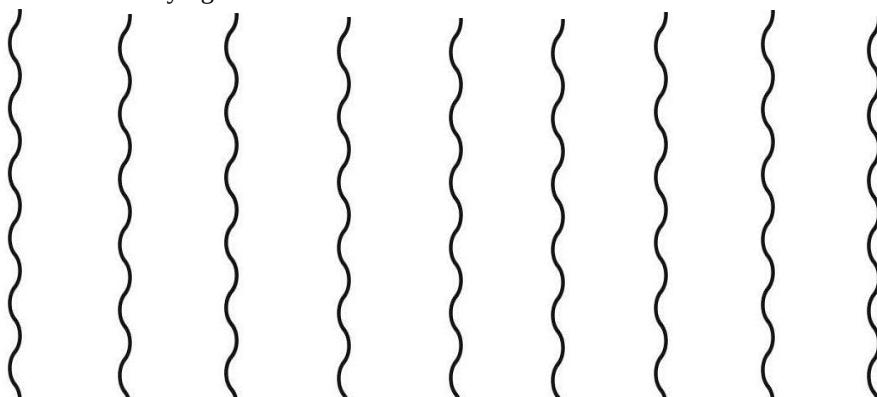
۳. Lysosomal Endocytosis Vesicle

۴. Phagosomal Vesicle

۵. Lumen

۶. Listeriolysin O (LLO)

۷. *Listeria Monocytogenes*



استفاده از این روش به کارآمدی روش‌های جایگزین، مانند استفاده از آدنوویروس نبود، ولی یک رویکرد انتقال مستقیم برای درمان سلول‌های کارسینومای مقاوم به چند دارو را نشان داد.

انتقال با تزریق جت^۱

همانطور که در بخش‌های قبلی بحث شد، انتخاب روش مناسب انتقال افکتورهای RNAi راه حل اصلی جهت کاربرد کلینیکی موفق را ارائه می‌دهد. در این بحث، انتقال مولکول‌های هدف‌گیری RNAi لخت یک روش جایگزین در برابر روش‌هایی مانند: انتقال ژن ویروسی، باکتریایی و لیپوزومی است که تشریح شد. چندین روش مانند: تزریق سوزنی ساده^۲، بمباران ذره‌ای^۳، الکتروپوریشن in vivo^۴، یا تزریق جت، به کار گرفته شده‌اند تا نوکلئیک‌اسید با واسطه RNAi لخت را به سلول‌ها یا بافت‌های مطلوب انتقال دهند. این روش‌ها فواید فراوانی دارند، مانند: ممانعت از استفاده از ذرات ویروسی نو ترکیب، موجودات باکتریایی تغییر یافته، پتانسیل محرک ایمنی، و عدم سمیت (۲۹).

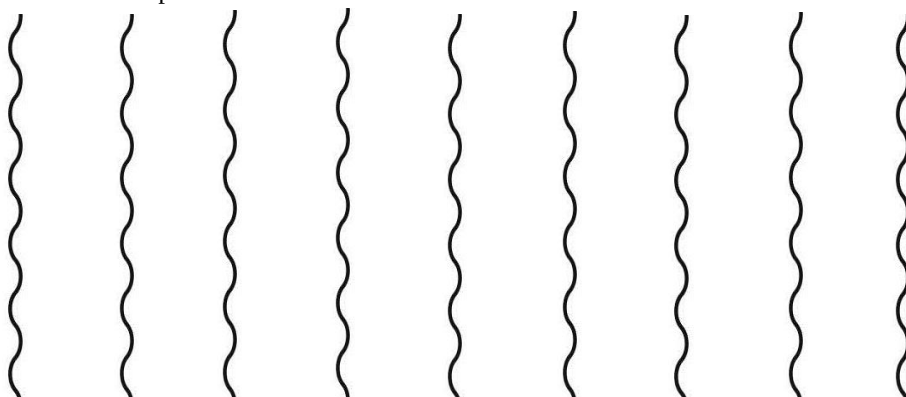
در بین فناوری‌های مختلف، تزریق جت محبوبیت فزاینده‌ای را به دست آورده است، زیرا این روش اجازه انتقال به بافت‌های مختلف با نفوذ عمیق‌تر نوکلئیک‌اسید را می‌دهد. فناوری تزریق جت بر اساس جت‌هایی با حجم کوچک است که با سرعت بالایی رها شده و نیرویی را تولید می‌کنند که با عمق در بافت هدف‌گیری شده نفوذ کرده و ناحیه هدف تحت تأثیر قرار می‌دهد. روش تزریق جت نواحی وسیعی از افکتور RNAi را تولید می‌کند که بیان تراژن را درون بافت تزریق جت شده کد می‌کنند.

۱. Jet-Injection

۲. Simple Needle Injection

۳. Particle Bombardment

۴. in vivo Electroporation



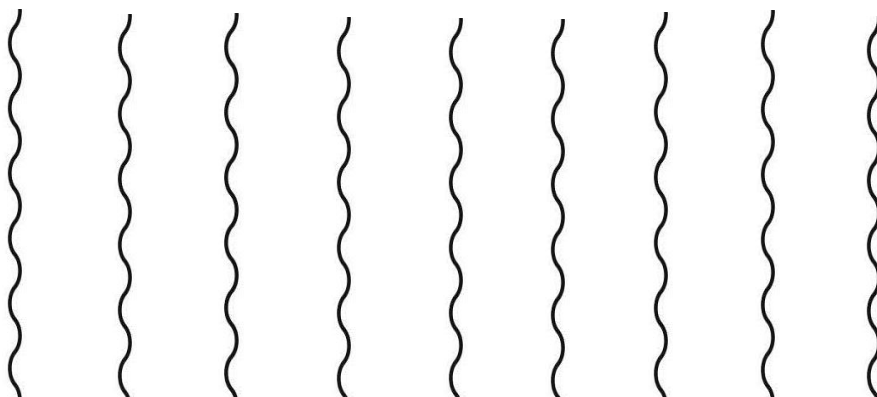


کاربرد in vivo این فناوری، آسیب بافتی یا واکنش‌های التهابی معنی‌داری را در ناحیه تزریق جت ایجاد نمی‌کند (۲۸).

از این فناوری به صورت موفقیت‌آمیزی جهت بازگشت مقاومت چند دارویی با واسطه ABCB1 در لاین‌های سلول سرطانی مانند موش حامل زئوگرافت (پیوند از گونه دیگر) سرطان انسان^۱ به کار رفت (۲۵). ناقلین پلاسمید کدکننده shRNA ضد ABCB1، بیان mRNAABCB1 را تا بیش از ۹۰ درصد کاهش دادند. پروتئین ترانسپورتر مربوطه بیش از این در تومورها قابل ردیابی نبود. با دو تزریق جت ناقلین shRNA ضد ABCB1 در تومورها، در ترکیب با دو اجرای درون وریدی داروی دوکسوروبیسین^۲، برای به دست آوردن بازگشت کامل فنوتیپ مقاوم به چند دارو در زئوگرافت تومور، مناسب بودند.

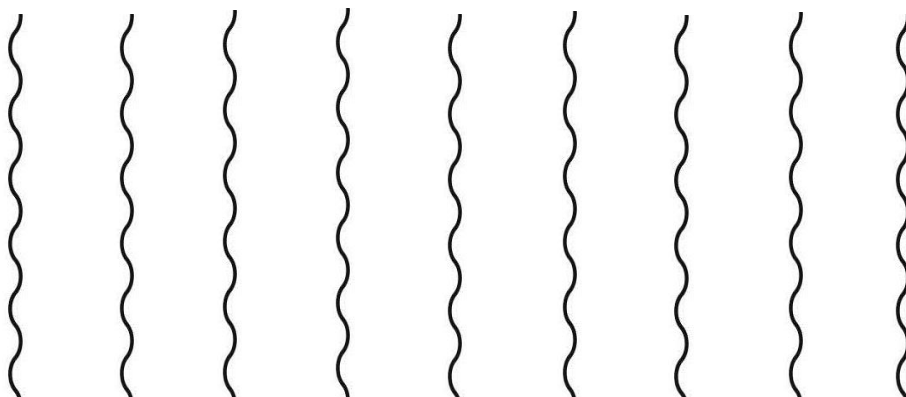
۱. Human Cancer Xenograft-Bearing Mice

۲. Doxorubicin



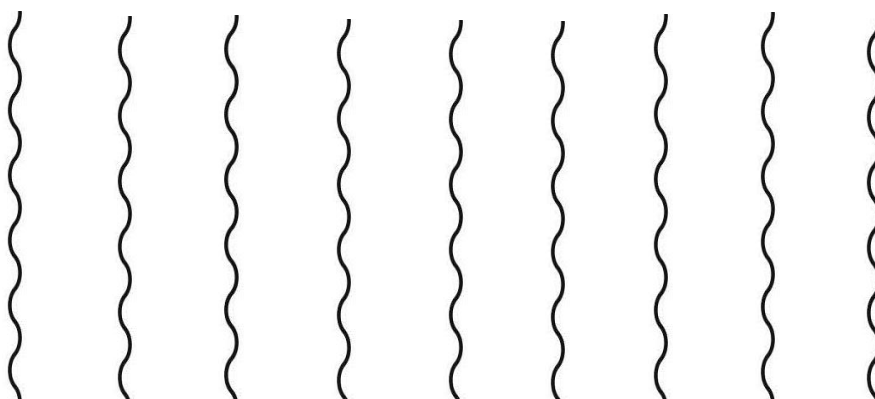
نتیجه گیری

اگرچه در سال‌های اخیر پیشرفت در ایجاد روش‌های جدید ژن درمانی صورت گرفته است، ولی پیدا کردن روش مناسب انتقال، هنوز مانع اصلی برای طراحی موفق پروتوکل‌های ژن درمانی شامل هدف‌گیری ترانسپورترهای ABC برای غلبه بر مقاومت چند دارویی است. فناوری‌های جدید یا بهبودیافته شامل رویکردهای بر اساس RNAi یا CRISPR/Cas9 ممکن است از تجارب به دست آمده با رویکردهای انتقالی در گذشته استفاده کنند. همچنین در آینده، دانشمندان و پزشکان تلاش‌های فراوانی در توسعه روش‌های انتقالی برای عوامل ژن درمانی خواهند نمود تا سلول‌های سرطانی مقاوم به دارو را مورد هدف قرار دهند.

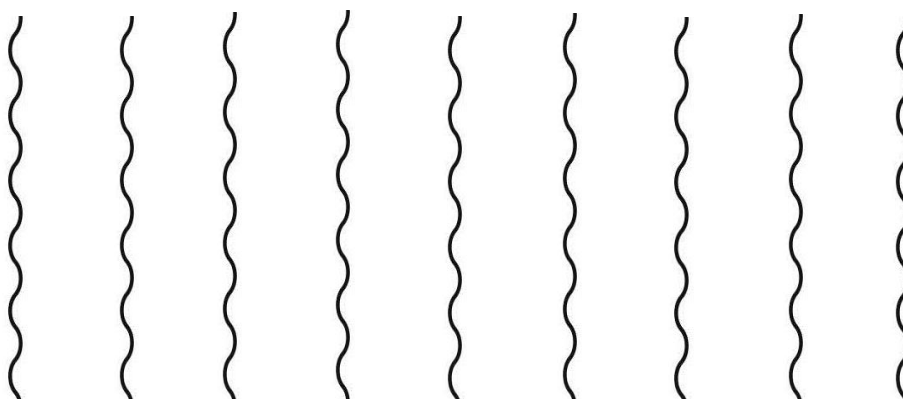




1. Ahmed O, Krühn A, Lage H (2015) Delivery of siRNAs to cancer cells via bacteria. *Methods Mol Biol.* 1218: 117–129.
2. Ahn SJ, Jeon YH, Lee YJ, Lee YL, Lee SW, Ahn BC, Ha JH, Lee J (2010) Enhanced anti-tumor effects of combined MDR1 RNA interference and human sodium/iodide symporter (NIS) radioiodine gene therapy using an adenoviral system in a colon cancer model. *Cancer Gene Ther.* 17: 492–500.
3. Critchley RJ, Jeppard S, Radford KJ, Goussard S, Lemoine NR, Grillot-Courvalin C, Vassaux G. (2004). Potential therapeutic applications of recombinant, invasive *E. coli*. *Gene Ther.* 11: 1224–1233.
4. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 411: 494–498.
5. Gao Z, Gao Z, Fields JZ, Boman BM. (1999). Tumor-specific expression of anti-mdr1 ribozyme selectively restores chemosensitivity in multidrug-resistant colon-adenocarcinoma cells. *Int J Cancer.* 82: 346–352.
6. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, Stern-Ginossar N, Brandman O, Whitehead EH, Doudna JA, Lim WA, Weissman JS, Qi LS. (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell.* 154: 442–451.
7. Holm PS, Scanlon KJ, Dietel M. (1994). Reversion of multidrug resistance in the P-glycoprotein-positive human pancreatic cell line (EPP85-181RDB) by introduction of a hammerhead ribozyme. *Br J Cancer.* 70: 239–243.

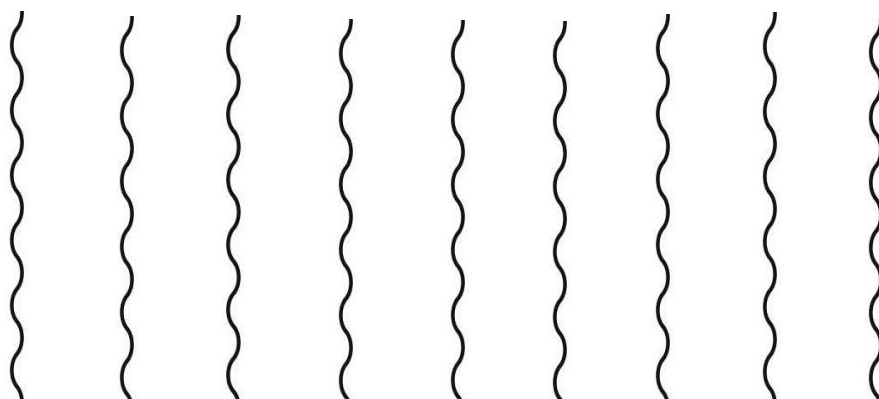


8. Juliano RL, Ling V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*. 455: 152–162.
9. Kang H, DeLong R, Fisher MH, Juliano RL. (2005). Tat-conjugated PAMAM dendrimers as delivery agents for antisense and siRNA oligonucleotides. *Pharm Res*. 22: 2099–2106.
10. Kaszubiak A, Holm PS, Lage H. (2007). Overcoming the classical multidrug resistance phenotype by adenoviral delivery of anti-MDR1 short hairpin RNAs and ribozymes. *Int J Oncol*. 31: 419–430.
11. Kennedy EM, Kornepati AV, Goldstein M, Bogerd HP, Poling BC, Whisnant AW, Kastan MB, Cullen BR. (2014). Inactivation of the human papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells by using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided endonuclease. *J Virol*. 88: 11965–11972.
12. Kobayashi H, Dorai T, Holland JF, Ohnuma T. (1994). Reversal of drug sensitivity in multidrug-resistant tumor cells by an MDR1 (PGY1) ribozyme. *Cancer Res*. 54: 1271–1275.
13. Kotterman MA, Chalberg TW, Schaffer DV. (2015). Viral vectors for gene therapy: translational and clinical outlook. *Annu Rev Biomed Eng*. 17: 63–89.
14. Kowalski P, Surowiak P, Lage H. (2005). Reversal of different drug-resistant phenotypes by an autocatalytic multitarget multiribozyme directed against the transcripts of the ABC transporters MDR1/P-gp, MRP2, and BCRP. *Mol Ther*. 11: 508–522.
15. Krühn A, Wang A, Fruehauf JH, Lage H. (2009). Delivery of short hairpin RNAs by transkingdom RNA interference modulates the classical ABCB1-mediated multidrug-resistant phenotype of cancer cells. *Cell Cycle*. 8: 3349–3354.

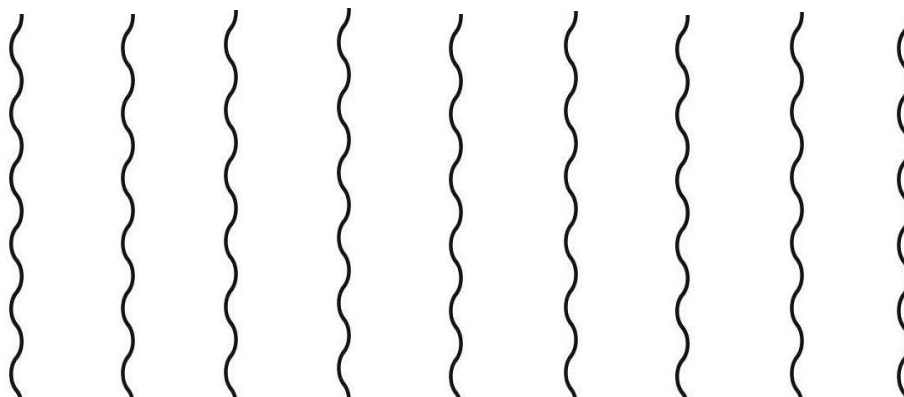




16. Lage H. (2008). An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cell Mol Life Sci.* 65: 3145–3167.
17. Lage H. (2009). Therapeutic potential of RNA interference in drug-resistant cancers. *Future Oncol.* 5: 169–185.
18. Lage H, Fruehauf JH. (2011). Delivery of therapeutic RNA molecules to cancer cells by bacteria. *Ther Deliv.* 2: 441–449.
19. Nieth C, Priebisch A, Stege A, Lage H. (2003). Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). *FEBS Lett.* 545: 144–150.
20. Nourbakhsh M, Jaafari MR, Lage H, Abnous K, Mosaffa F, Badiie A, Behravan J. (2015). Nanolipoparticles-mediated MDR1 siRNA delivery reduces doxorubicin resistance in breast cancer cells and silences MDR1 expression in xenograft model of human breast cancer. *Iran J Basic Med Sci.* 18: 385–392.
21. Patil YB, Swaminathan SK, Sadhukha T, Ma L, Panyam J. (2010). The use of nanoparticle-mediated targeted gene silencing and drug delivery to overcome tumor drug resistance. *Biomaterials.* 31: 358–365.
22. Simoff I, Karlgren M, Backlund M, Lindström AC, Gaugaz FZ, Matsson P, Artursson P. (2016). Complete knockout of endogenous Mdr1 (Abcb1) in MDCK cells by CRISPR-Cas9. *J Pharm Sci.* 105: 1017–1021.
23. Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Röhl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliensky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP. (2004). Therapeutic



- silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*. 432: 173–178.
24. Stege A, Priebisch A, Nieth C, Lage H. (2004). Stable and complete overcoming of MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human gastric carcinoma cells by RNA interference. *Cancer Gene Ther*. 11: 699–706.
25. Stein U, Walther W, Stege A, Kaszubiak A, Fichtner I, Lage H. (2008). Complete in vivo reversal of the multidrug resistance (MDR) phenotype by jet-injection of anti-MDR1 short hairpin RNA-encoding plasmid DNA. *Mol Ther*. 16: 178–186.
26. Susa M, Iyer AK, Ryu K, Choy E, Hornicek FJ, Mankin H, Milane L, Amiji MM, Duan Z. (2010). Inhibition of ABCB1 (MDR1) expression by an siRNA nanoparticulate delivery system to overcome drug resistance in osteosarcoma. *PLoS One*. 5: e10764.
27. Vasanthakumar G, Ahmed NK. (1989). Modulation of drug resistance in a daunorubicin resistant subline with oligonucleoside methylphosphonates. *Cancer Commun* 1:225–232
28. Walther W, Stein U, Fichtner I, Malcherek L, Lemm M, Schlag PM. (2001). Non-viral in vivo gene delivery into tumors using a novel low volume jet-injection technology. *Gene Ther*. 8: 173–180.
29. Walther W, Stein U, Lage H. (2010). Jet-injection of short hairpin RNA encoding vectors into tumour cells. *Methods Mol Biol*. 629: 123–139.
30. Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. (2009). Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 8: 129–138.
31. Wu H, Hait WN, Yang JM. (2003). Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein)





restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res.* 63: 1515–1519.

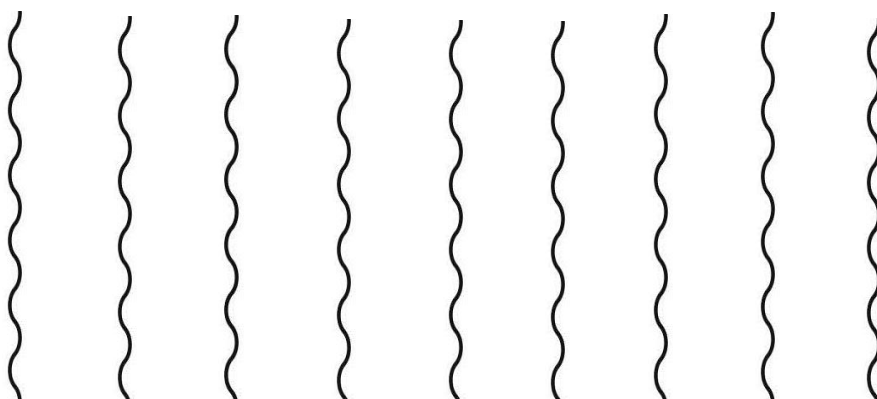
32. Xu H, Li Z, Si J. (2014). Nanocarriers in gene therapy: a review. *J Biomed Nanotechnol.* 10: 3483–3507.

33. Yang X, Iyer AK, Singh A, Milane L, Choy E, Hornicek FJ, Amiji MM, Duan Z. (2015). Cluster of differentiation 44 targeted hyaluronic acid based nanoparticles for MDR1 siRNA delivery to overcome drug resistance in ovarian cancer. *Pharm Res.* 32: 2097–2109.

34. Ye X, Liu T, Gong Y, Zheng B, Meng W, Leng Y. (2009). Lentivirus-mediated RNA interference reversing the drug-resistance in MDR1 single-factor resistant cell line K562/MDR1. *Leuk Res.* 33: 1114–1119.

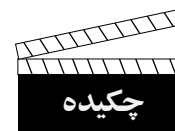
35. Yin Q, Shen J, Chen L, Zhang Z, Gu W, Li Y. (2012). Overcoming multidrug resistance by co-delivery of Mdr-1 and survivin-targeting RNA with reduction-responsible cationic poly (b-amino esters). *Biomaterials.* 33: 6495–6506.

36. Zhao P, Wang H, Gao H, Li C, Zhang Y. (2013). Reversal of multidrug resistance by magnetic chitosan-Fe₃O₄ nanoparticle-encapsulated MDR1 siRNA in glioblastoma cell line. *Neurol Res.* 35: 821–828.



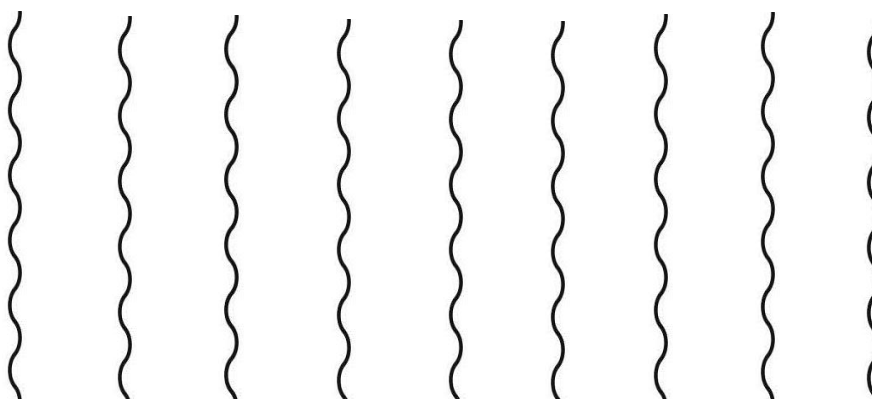
○ فصل ششم

سموم باکتریایی برای ژن درمانی خودکشی اونکولیکینگ سرطان

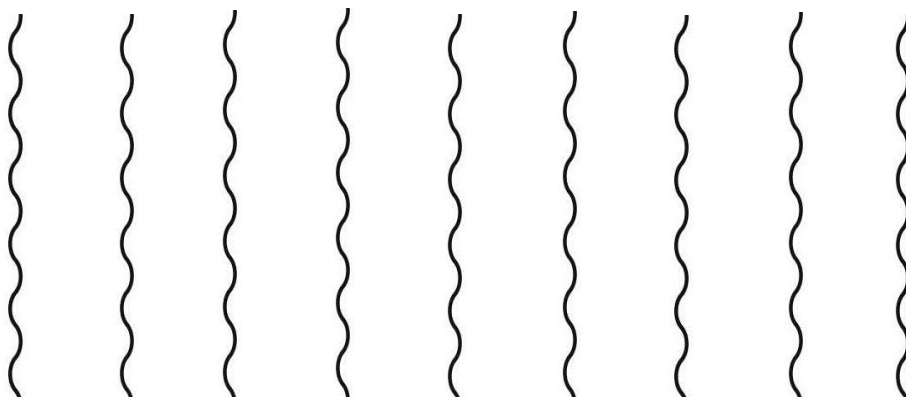


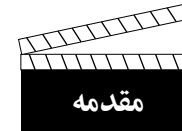
در روش ژن درمانی خودکشی، ابتدا آنزیم‌های تبدیل‌کننده پیش‌دارو (درمان تولیدکننده آنزیم هدایت‌شده توسط ژن، GDEPT) به کار گرفته شد تا پیش‌داروی غیرسمی را به ترکیبات سمی متابولیزه کند، که منجر به خودکشی مؤثر سلول‌های تومور ترانسفکت شده شود. به این منظور، روش ژن درمانی خودکشی، پتانسیل خود را برای حذف مؤثر تومور نشان داده است.

ژن‌های خودکشی فراوانی با منشأ ویروسی یا باکتریایی جداسازی، شناسایی و به صورت گسترده در شرایط *in vitro* و *in vivo* آزمون شدند، که پتانسیل درمانی خودشان را حتی در آزمایشات کلینیکی برای درمان سرطان‌های با ماهیت مختلف نشان دادند. جدا از این، تلاش‌هایی در حال انجام است تا سیستم ژن خودکشی مؤثرتر و



هدفمندتری برای ژن درمانی سرطان صورت گیرد. به این منظور، سم‌های باکتریایی جایگزینی مناسب برای روش GDEPT بشمار می‌روند، که به طیف وسیعی از رویکردهای خودکشی مختلف اضافه می‌شوند. در این مورد، سموم تجزیه‌کننده باکتریایی، مانند استرپتولیزین O (SLO) یا انتروتوکسین *Clostridium perfringens* هدفمند-کلاودین (CPE) انواع جدیدی از ژن‌های انکولیکینگ خودکشی را ارائه دادند. آن‌ها به عنوان پروتئین‌های تشکیل‌دهنده منفذ، به سرعت و با سمیت انتخابی به سمت دامنه وسیعی از سرطان‌ها عمل کردند. در این فصل، ما تولید و استفاده از ژن درمانی بر اساس SLO همچنین CPE را برای حذف مؤثر سلول تومور به عنوان رویکرد ژن خودکشی امیدبخش به خصوص برای درمان تومورهای سرسخت تشریح می‌کنیم.





یافتن روش‌های درمانی جدید و مؤثر که تومورهای بدخیم را مورد هدف قرار دهد هنوز از اهمیت بالایی برخوردار است زیرا وقوع بیماری‌های سرطانی به صورت مداوم افزایش می‌یابد (۲۳). روش‌های درمان سنتی برای سرطان مانند جراحی، پرتودرمانی^۱ و شیمی‌درمانی^۲، که معمولاً برای اثر درمانی بهتر ترکیب می‌شوند، اساس درمانی در درمان سرطان را شامل می‌شوند. ولی، این درمان‌ها محدودیت‌های خودشان را دارند، که اصولاً در اثر ناهمگنی تومور و تولید جمعیت‌های سلولی تومور سرسخت^۳، ایجاد می‌شوند. طی دهه‌های اخیر، درمان ضدسرطان^۴ به صورت مداوم بهبود یافته است تا بر این مشکلات غلبه کند، ولی مشکلات با اثرات جانبی و مقاومت‌های دارویی، هنوز مانع اصلی برای درمان موفق سرطان است (۳۱). بنابراین، گزینه‌های درمانی جایگزین شدیداً لازم است تا به صورت مناسبی تومورها را مورد هدف قرار داده و حذف نمود.

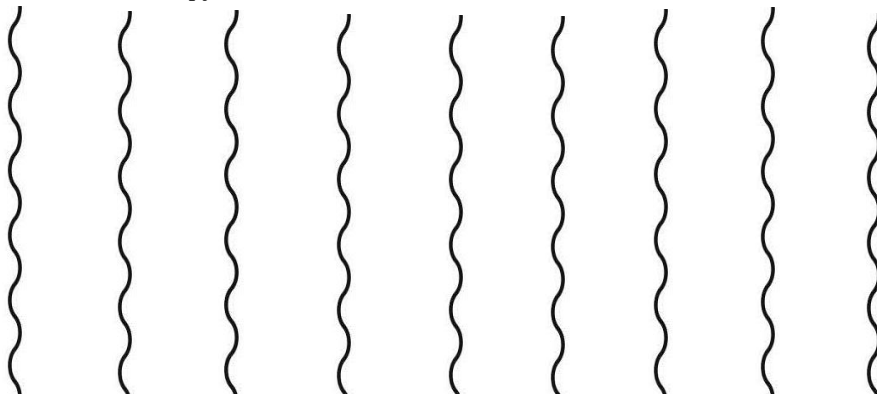
ژن درمانی سرطان چنین رویکرد امیدبخشی را ارائه می‌دهد، رویکردی که کشتن سلول تومور انتخابی و ممانعت از رشد تومور با ورود نوکلئیک‌اسید خارجی (DNA یا RNA) به عنوان عامل درمانی سلول

۱. Radiation Therapy

۲. Chemotherapy

۳. Refractory Tumor

۴. Anticancer Therapy



سرطانی به دست می‌آید. ژنتیک درمانی^۱ می‌تواند از جهات مختلف پیش برود، مانند ورود ژن طبیعی به سلول‌های سرطانی تا جایگزین ژن جهش‌یافته یا تغییر یافته شود، حذف انتخابی سلول‌های تومور با مکانیزم‌های خودکشی^۲، آپوپتوز^۳ القا شده با استفاده از ورود ژن اضافی، سرکوبی ژن با تداخل رونویسی و ترجمه ژن با استفاده از الیگنوکلئوتید آنتی‌سنس (ASO)^۴، میکرو RNA (miRNA)^۵ یا RNA کوچک دورشته‌ای مداخله‌گر (siRNA)^۶ امکان‌پذیر می‌باشد (۲۲). به علاوه، رویکردهای فراوانی مانند مایه‌زنی سلول‌های ایمنی^۷ (به نام سلول‌های T مهندسی شده) برای ایمنی درمانی^۸، این سلول‌ها به صورت اختصاصی تغییر می‌کنند تا یا جایگزین سیستم ایمنی شوند تا پاسخ ضد تومور را افزایش دهند یا سیستم ایمنی خود بیمار را بالا می‌برند تا به صورت مناسبی سلول‌های سرطانی را بکشد (۱۰).

فناوری انتقال ژن شامل سری متنوعی از گزینه‌های درمانی است و پیشگامان امیدبخشی برای درمان را فراهم می‌کند. طی دهه‌های اخیر، انواع گسترده‌ای از ناقلین ویروسی^۹ و غیرو ویروسی ایجاد شده‌اند (۷۴). بدین منظور، ناقلین ویروسی همانند ساز و غیرهمانند ساز با استفاده از

۱. Genetic Therapy

۲. Suicide

۳. Apoptosis

۴. Antisense-Oligonucleotides (ASO)

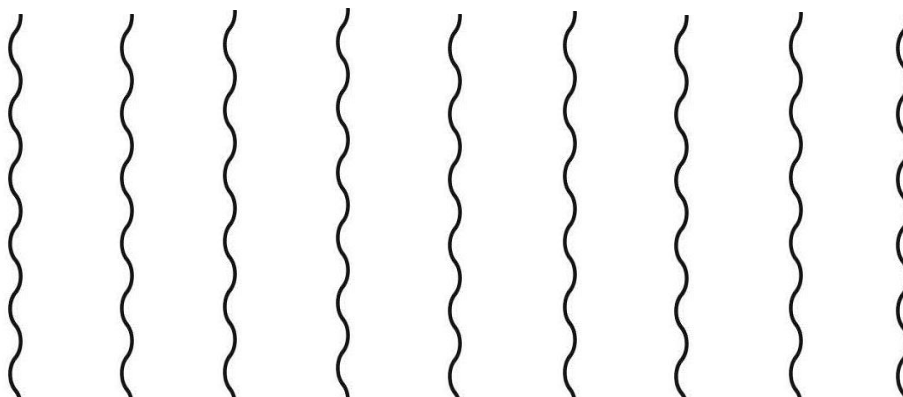
۵. micro-RNA (miRNA)

۶. small interfering Double-Stranded RNA (siRNA)

۷. Immune Cells

۸. Immunotherapy

۹. Viral Vectors

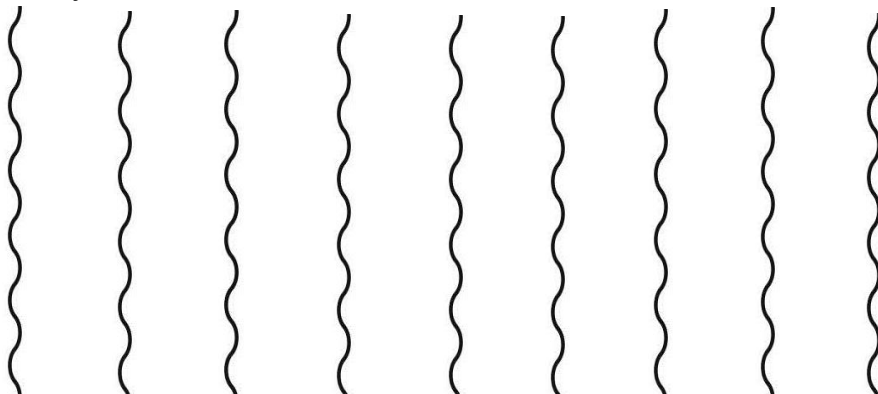




پلت فرم‌های فناوری رتروویروس^۱ یا ویروس‌های DNA دار (مانند، لنتی‌ویروس^۲، آدونوویروس^۳، AVV، ویروس سیمپلکس هرپس^۴) بهبود یافتند تا راندمان‌های انتقال را افزایش دهند و هدف‌گیری ناقل را بهبود بخشند.

سیستم‌های غیرویروسی سطح جدیدی از کیفیت را وارد کردند که توسط انواع ناقلین جدید (مانند ناقلین miniplasmid، minicircle، dumbbellshaped minimalistic و sleeping-beauty)، فناوری‌های انتقال شامل نانوذرات^۵ یا لیپوفکشن^۶ و فناوری‌های فیزیکی (مانند سونوپوریشن^۷، الکتروپوریشن^۸، بمباران ذره‌ای یا تفنگ ژنی^۹، تزریق جت^{۱۰}) ارائه شد (۹). یک مانع اساسی در ژن‌درمانی سرطان هدف‌گیری اختصاصی مستقیم به یک تومور جامد است (۲۳، ۵۵). از آنجا که به خصوص در مراحل پیشرفته آن، سرطان یک بیماری در حال گسترش در بدن است، انتقال سیستمیک ژن هنوز چالش اصلی در ژن‌درمانی سرطان است. انتخاب نامناسب و راندمان انتقال به خصوص برای کاربردهای کلینیکی عوامل محدودکننده برای ژن‌درمانی موفق هستند و نیاز به بهبود در هدف‌گیری انتقال ناقل، رونویسی

-
۱. Retroviral
 ۲. Lentivirus
 ۳. Adenovirus
 ۴. Herpes Simplex Virus
 ۵. Nanoparticles
 ۶. Lipofection
 ۷. Sonoporation
 ۸. Electroporation
 ۹. Particle Bombardment/ Gene-Gun
 ۱۰. Jet Injection



تراژن، و یا ترجمه دارند. به این منظور، ژن درمانی موضعی^۱ سرطان برای کنترل منطقه‌ای بیماری هنوز جذابیت‌هایی را دارد و حدود ۲۰ درصد همه آزمایشات کلینیکی ژن درمانی سرطان به صورت انتقال ژن ویروسی یا غیرویروسی منطقه‌ای انجام می‌شود (۷۴، ۹۱).

جدا از ایجاد فناوری‌های انتقالی بهبودیافته، یک ژن درمانی مناسب برای درمان موفق سرطان قطعی است (۱۱). انتخاب ژن مورد نظر و مناسب با رویکردهای ژن درمانی خاص که برای درمان سرطان استفاده می‌شود تعیین می‌شود، مانند ژن ایمنی درمانی^۲، ژن درمانی خودکشی^۳، ژن درمانی تصحیحی^۴، یا ژن درمانی سرکوبی^۵.

از زمان تکامل ژن درمانی سرطان، سموم باکتریایی فهرست ژن‌های درمانی را تکمیل کرده‌اند و کاندیداهای جذابی هستند زیرا آن‌ها ظرفیت کشتن سلول را بیان کرده و پتانسیل‌شان برای درمان مؤثر سرطان را نشان داده‌اند (۱۳). در این فصل ما بر ژن درمانی خودکشی بر اساس سم باکتریایی تمرکز می‌کنیم که هم اکنون توجه فزاینده‌ای را به عنوان گزینه درمانی به خود جلب کرده است.

۱. Local Gene Therapy

۲. Immunogene Therapy

۳. Suicide Gene Therapy

۴. Gene Correction Therapy

۵. Gene Suppression Therapy



ژن درمانی خودکشی برای درمان سرطان

کاربرد اصلی ژن درمانی خودکشی بر درمان سرطان تمرکز یافته است. به همین خاطر، ابتدا آنزیم‌های تبدیل‌کننده پیش‌داروی مختلف (ژن درمانی تولیدکننده آنزیم هدایت شده، GDEPT)^۱ با منشأ باکتریایی یا ویروسی برای بیان در سلول‌های تومور استفاده شدند، که پیش‌داروی غیرسمی را به متابولیت سمی تبدیل می‌کند تا سلول‌های تومور و سلول‌های همسایه آن را بکشد (اثر پیرامونی)^۲. بیشتر اعضای دائمی این ژن‌های خودکشی هنوز سیتوسین دی‌آمیناز (CD)^۳، تیمیدین کیناز ویروس سیمپلکس هرپس (HSV-tk)^۴، سیتوکروم P450-2B1^۵ و نیترو ردوکتاز^۶ و انواع آن هستند (۳۰، ۴۴، ۷۳، ۷۹، ۸۰). ناقلین بیان‌کننده CD و HSV-tk مدتی هست که به فاز I و II کلینیکی وارد شده‌اند. پیشرفت‌های اخیر برای این ژن‌های خودکشی کلاسیک به دنبال بهینه‌سازی خودشان از طریق واریانت‌های جهش‌یافته یا پروتئین‌های اتصال برای تولید بهتر متابولیت‌های سمی هستند (۲۵، ۳۱، ۸۱، ۸۸). واژه ژن درمانی خودکشی در همین زمان به سمت انتقال ژن‌هایی سوق یافت که یا سمی‌اند یا پروآپتوز^۷ هستند (شکل ۱).

اگرچه توانایی روش‌های کشتن سلول‌های سرطانی بسیار قدرتمند است، ولی دو مانع اصلی در سیستم آنزیم-پیش‌دارو وجود دارند: ۱- اثر پیرامونی، که می‌تواند باعث اثرات جانبی ناخواسته شود ۲- کاهش اثربخشی در تقسیم آهسته سلول‌های سرطانی (۴۰، ۵۵، ۵۸، ۶۹). ژن درمانی خودکشی بر اساس ژن‌های آپوپتوز، مانند Bax، p53

۱. Gene-Directed Enzyme-Producing Therapy (GDEPT)

۲. Bystander Effect

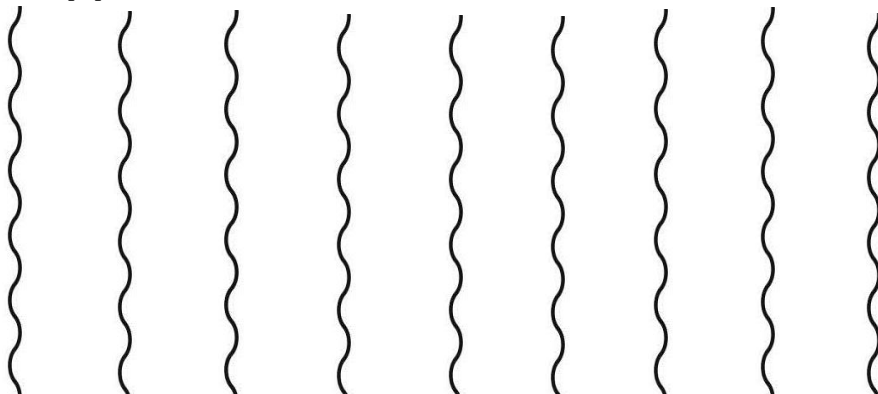
۳. Cytosine Deaminase (CD)

۴. Herpes Simplex Virus thymidine kinase (HSV-tk)

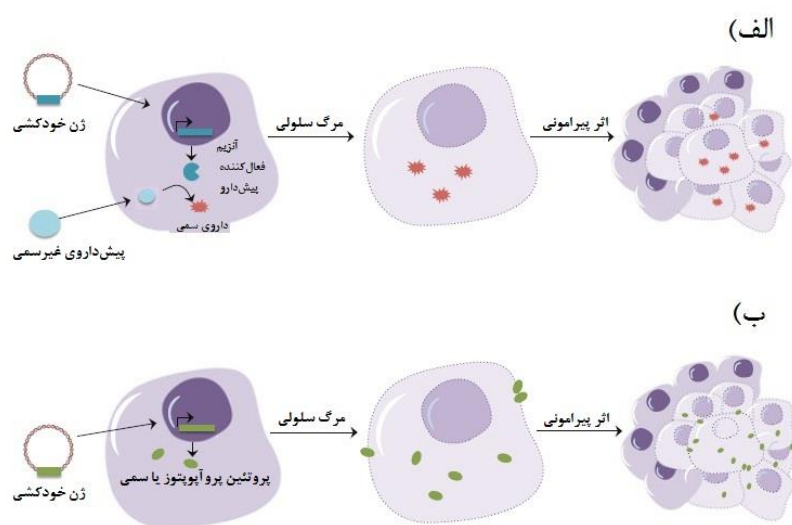
۵. Cytochrome P450-2B1

۶. Nitroreductase

۷. Pro-Apoptotic

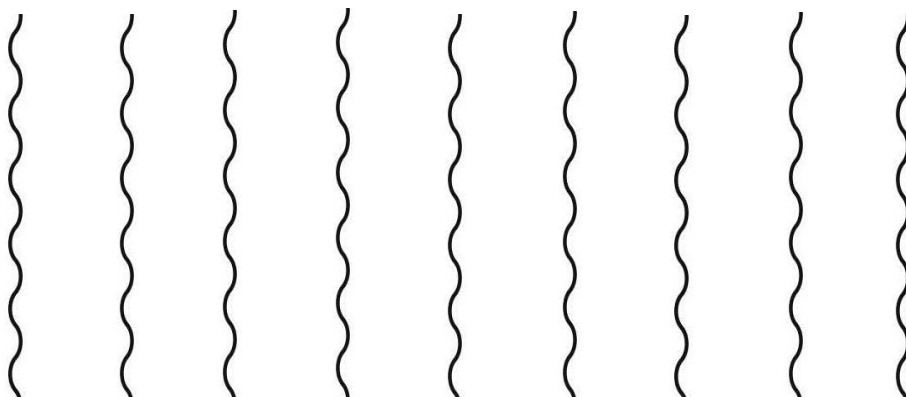


یا FasL، به صورت گسترده مطالعه شده است ولی محدودیت‌هایی را به عنوان گسترش سلول‌های سرطانی مقاوم به القا آپوپتوز بیان کرده است (۶۶، ۷۱، ۷۹). بنابراین، درمان‌های ژن خودکشی جدید مانند سموم باکتریایی مورد بررسی قرار گرفتند، که می‌تواند بر موانع مقاومت و وابستگی تکثیر سیستم‌های خودکشی غلبه کنند.



شکل ۱- کشتن هدفمند سلول‌های سرطانی با استفاده از ژن درمانی خودکشی.

الف- این رویکرد شامل انتقال ژن درمانی کدکننده یک آنزیم فعال‌ساز پیش‌دارو به درون سلول‌های تومور است که در ادامه با یک پیش‌داروی خاص درمان می‌شود. بیان ژن درمانی (آنزیم فعال‌ساز پیش‌دارو) تبدیل پیش‌داروی غیرسمی غیرفعال را به داروی سمیت سلولی فعال تبدیل می‌کند. متابولیت‌های سمی که بتواند از سلول‌های سرطان همسایه عبور کند باعث کشتن سلول از طریق اثر پیرامونی می‌شود.





ب- کشتن مستقیم سلول هم در صورتی ممکن است که ژن وارد شده بیان شود تا یک سمیت سلولی القا شده توسط سم را تولید کند. همانطور که سلول‌های ترانسفکت شده متحمل مرگ سلولی می‌شوند، سم بیان شده می‌تواند بر سلول‌های ترانسفکت نشده کناری اثر بگذارد.

سموم باکتریایی در درمان سرطان

مفهوم استفاده از سموم باکتریایی به عنوان عوامل ضدسرطان واقعاً جدید نیست زیرا پتانسیل آن‌ها شناسایی شده و حدود ۱۰۰ سال پیش کشف شده‌اند. همزمان، تعداد در حال رشد مداومی از آزمایشات امیدبخش با استفاده از سموم باکتریایی برای درمان سرطان، به چاپ رسیده است، که توانایی آن‌ها برای کشتن مؤثر سلول را بیان می‌کند (۳۰، ۷۱، ۷۵، ۹۰). در دهه‌های اخیر، فراوری و دستورزی پروتئین‌های باکتریایی سمی، مانند سم دیفتری^۱، استرپتولیزین O^۲ یا انتروتوکسین^۳ *Clostridium perfringens* و ژن‌های کدکننده آن‌ها تسهیل شده، و منجر به تثبیت «روش درمان بر اساس سم^۴» برای درمان سرطان شده‌اند که ویژگی‌های جدید ژن درمانی خودکشی مانند: تجزیه سلولی با ایجاد منفذ سریع و کاملاً مؤثر مانند رویکرد اونکولیکینگ^۵ (نشت سلول سرطانی) جدید را وارد کرده‌اند (۱۴، ۲۱).

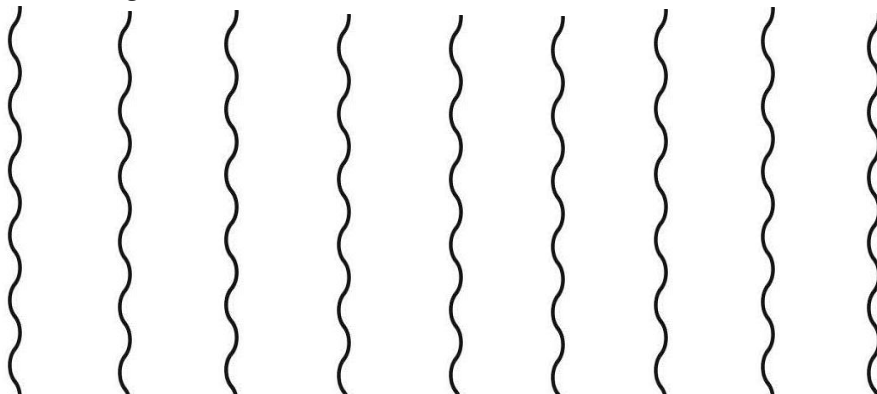
۱. Diphtheria Toxin

۲. Streptolysin O

۳. Enterotoxin

۴. Toxin-Based Therapy

۵. Oncoleaking



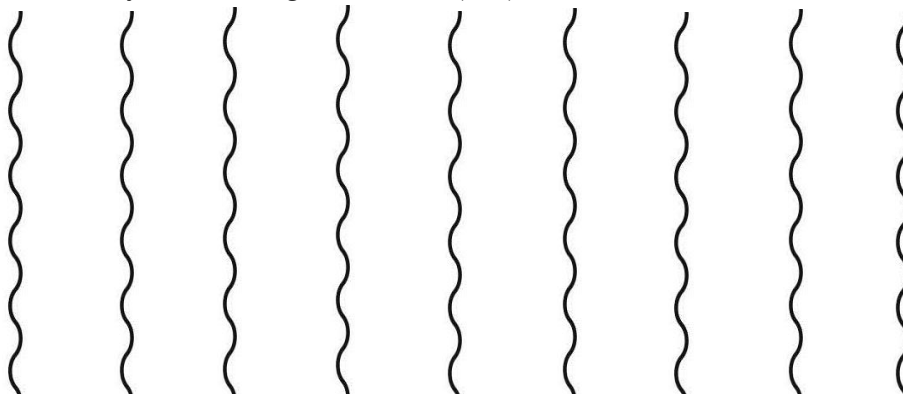
سم دیفتری

یک سم باکتریایی دائمی، که به صورت گسترده برای رویکردهای درمانی شامل ژن درمانی استفاده شده است، سم دیفتری (DT) است (۱۱، ۶۶، ۹۱). DT یک اگزوتوکسین ۶۲ کیلودالتونی است که توسط سویه‌های بیمارگر *Corynebacterium diphtheria* ترشح شده، که به پیش‌ساز فاکتور رشد اپیدرمی متصل به هپارین (HB-EGF)^۱ روی سطح سلول، متصل می‌شود. DT شامل ۵۳۵ آمینواسید است و به گروه سموم AB تعلق دارد که می‌تواند به دو بخش اصلی تقسیم شود (DTA و DTB). بخش DTB ورود به سلول را با اتصال به گیرنده‌های سطحی و انتقال بعدی به درون سیتوپلاسم با روش اندوسیتوز^۲ انجام می‌دهد. در مقابل، DTA مسئول فعالیت آنزیمی سمیت سلولی است و ریبوزیلایسیون ADP فاکتور طویل‌سازی ۲ (EF2)^۳ را غیرفعال می‌کند، که باعث ممانعت از سنتز پروتئین و مرگ سلولی می‌شود. مشخص شده است که انتقال یک مولکول تکی DTA کاتالیتیکی برای کشتن یک سلول مناسب است ولی قادر به ورود یک سلول همسایه در غیاب DTB نیست (شکل ۲) (۸۹).

۱. Heparin-Binding Epidermal Growth Factor Precursor (HB-EGF)

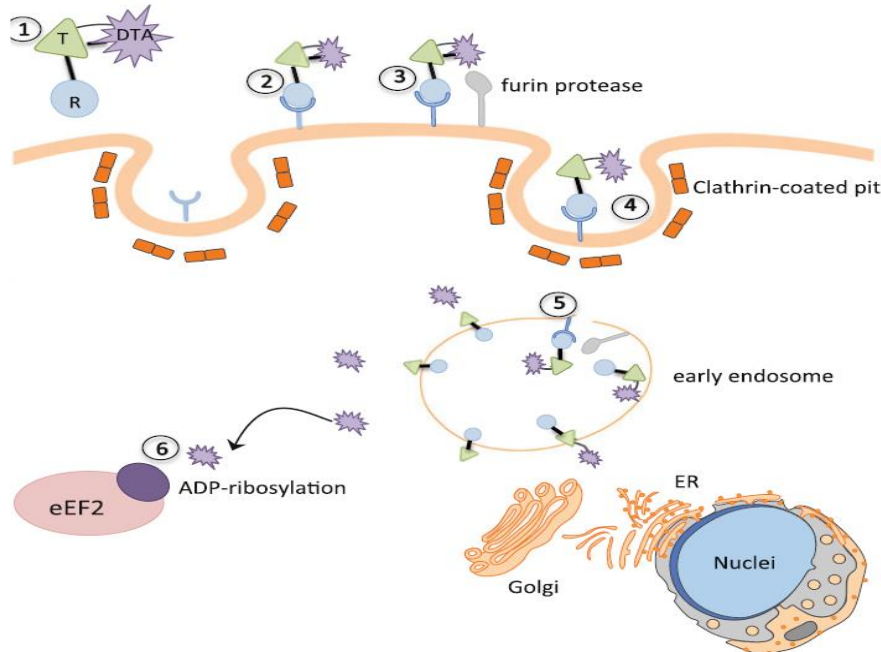
۲. Endocytosis

۳. ADP-Ribosylation of Elongation Factor 2 (EF2)



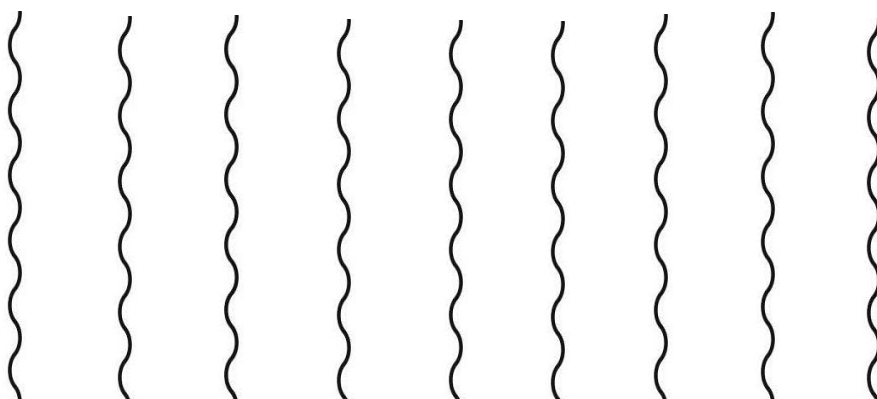


Diphtheria Toxin



شکل ۲- مکانیزم عمل سم دیفتری.

- ۱- سم ترشح شده شامل سه دامین عملکردی است: دامین کاتالیتیکی انتهای N (DTA)، دامین انتقال (T)، که با یک پیوند دی سولفیدی به دامین اتصال به گیرنده پیوند شده (R).
- ۲- DT به گیرنده‌اش متصل شده است (پیش ساز عامل رشد اپیدرمی اتصال به هپارین).
- ۳- پروتئاز فورین سطح سلولی که زنجیره پلی پپتید را بین دامین‌های C و T برش می‌زند.
- ۴- کمپلکس سم- گیرنده درون پیت پوشش یافته با کلاترین داخلی شده.



۵- داخل اندوزوم اولیه، فورین پروتئاز مولکول‌های سم را برش می‌زند و دمین T تغییر کنفورماسیون می‌یابد، که به غشا اندوزوم وارد شده و یک کانال را تشکیل می‌دهد، که منجر به انتقال دمین کاتالیتیک به سیتوپلاسم می‌شود، در ادامه پیوند دی سولفیدی کاهش می‌یابد.

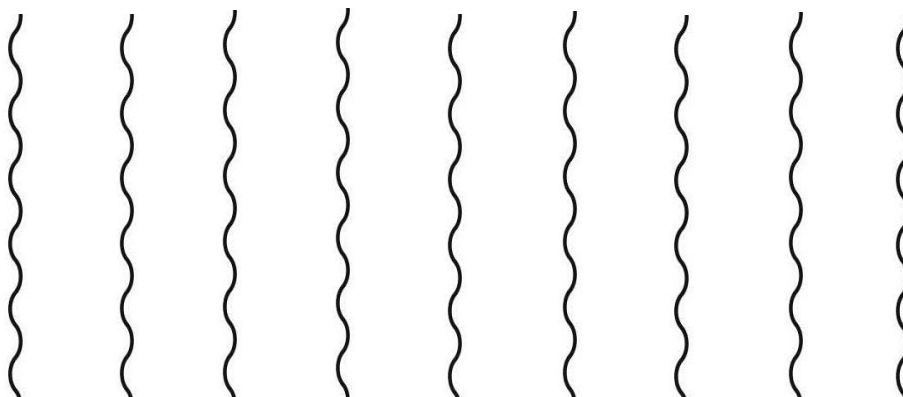
۶- DTA عامل طویل سازی ۲ ترجمه یوکاریوتی را به وسیله ریبوزیلاسیون-ADP غیرفعال می‌کند، که باعث ممانعت از ترجمه و در نتیجه مرگ سلولی می‌شود.

ژن درمانی خودکشی بر اساس DT

همانطور که در بالا اشاره شد، DTA قادر به ورود به سلول همسایه در غیاب DTB نیست. بنابراین فقط به صورت اختصاصی سلول هدف‌گیری شده را می‌کشد، و سمیت آن را محدود می‌کند. این ویژگی‌ها از قابلیت درمانی بالا، اثر سمیت محدودشده به منطقه از فواید دیگر تهاجم ایمنی ضد DT بشمار می‌رود (۴۳).

اگرچه این سم باکتریایی به هدف‌گیری انتخابی قابل اعتماد و مناسب نیاز دارد، اصولاً برای ممانعت از هر گونه اثر جانبی ناخواسته روی سلول‌های طبیعی، یک نیاز ضروری برای استفاده از سم در ژن درمانی سرطان وجود دارد (۲۰). تلاش‌هایی برای محدود کردن سمیت DTA با استفاده از پروموتر متالوتیونین تغییر یافته^۱ یا با جایگزینی نوع وحشی توالی DTA با ارقام جهش‌یافته DTA هنوز نتوانسته کشتن سلول تومور هدفمند را ایجاد کند. برای به حداقل رساندن آسیب به بافت سالم، مکانیزم هدف‌گیری اختصاصی یک الزام ضروری بود تا از استفاده بیشتر سم مطمئن شویم (۷۰).

۱. Modified Metallothionein Promoter





در دهه‌های اخیر، عناصر پروموتور اختصاصی بافت و تومور شناسایی شدند، که برای کاربرد هدفمند مؤثر و در رونویسی ژن درمانی به شدت مهم هستند. با این دانش، هدف‌گیری رونوشتی^۱، روشی بر اساس قرار دادن ژن درمانگر (مثل ژن خودکشی) تحت تنظیم رونویسی یک پروموتور که به صورت اختصاصی در بافت تومور هدف فعال می‌شود، توسعه یافت (۱۹). تاکنون، پروموتورهای فراوان اختصاصی بافت کلون شده، از نظر مولکولی شناسایی شده و برای بیان کنترل شده DTA در سرطان‌های مختلف به کار رفته‌اند (۷۶).

یک مثال از چنین پروموتوری از ژن H19 RNA انسان به دست آمده است که به شدت در دامنه وسیعی از سرطان‌ها بیان می‌شود و برای تکثیر سلولی، عدم ثبات ژنتیکی، آنژیوژنز وریدی^۲، مقاومت چند دارویی^۳، متاستاز^۴ و همچنین پیشرفت و انتشار ثانویه تومور مهم است (۱۰، ۲۱). میزراهی و همکاران، استفاده از پروموتور ژن H19 را گزارش کرده‌اند که بیان هدفمند DTA در سرطان تخمدان^۵ را هدایت می‌کند و بصورت معنی‌داری ممانعت از رشد تومور از زئوگرافت^۶ سرطان تخمدان در موش بعد از تزریق درون توموری DTA-H19 نشان داد. این پتانسیل در انواعی از تومورها تأیید شده است، مانند سرطان پانکراس^۷، آدنوکارسینومای روده^۸ یا سرطان ابتدایی ریه^۹. بنابراین، DTA-H19 به عنوان یک ناقل چندکاره معرفی شد و به چند مطالعه کلینیکی وارد شد. یک آزمایش کلینیکی فاز I و II در بیماران با سرطان مثانه

۱. Transcriptional Targeting

۲. Vascular Angiogenesis

۳. Multiple Drug Resistance

۴. Metastasis

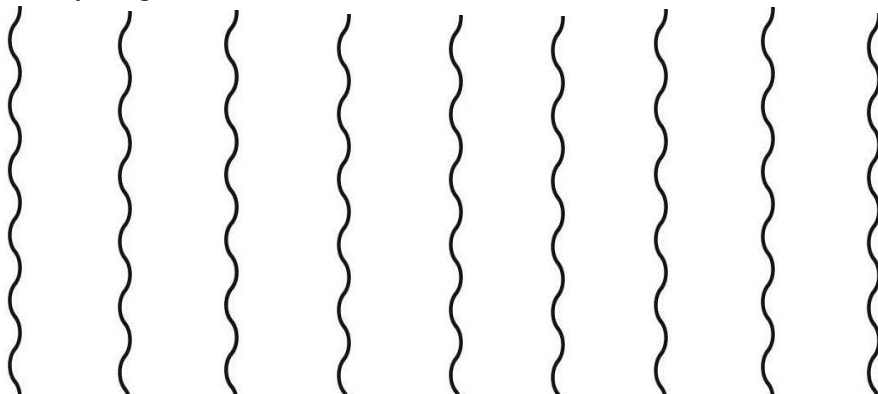
۵. Ovarian Cancer

۶. Xenograft

۷. Pancreatic Cancer

۸. Colon Adenocarcinoma

۹. Primary Lung Cancer



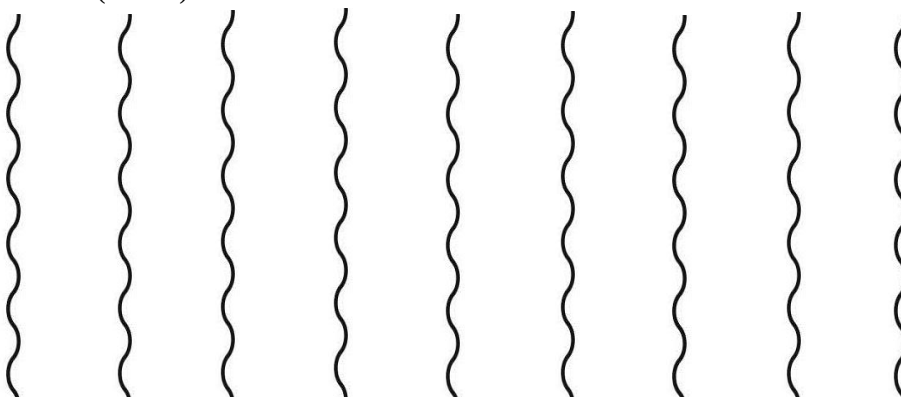
مهاجم^۱، که DTA-H19 (به نام BC-819) را به صورت درون مثانه‌ای دریافت کردند میزان پاسخ ناقص یا کامل را مانند ممانعت از رخداد دوباره تومور در دوسوم بیماران تیمار شده نشان دادند (۹۰).

مثال اخیر دیگر برای هدف‌گیری رونوشتی درمان DT توسط تولی و همکاران نشان داده شد. آن‌ها سازه ناقل-DNA را با پروموتر مزوتلین اختصاصی سرطان پانکراس (MSLN)^۲ یا موسین ۱ (MUC)^۳ که به توالی کدکننده DTA متصل بود، تولید کردند و آن را با پلیمر مناسب و قابل تجزیه زیستی، ترکیب نمودند تا DNA ناقل را به سلول‌های سرطان پانکراس منتقل کنند (۸۸). پروموترهای ژن MSLN و MUC1 عناصر کنترل رونویسی امیدبخشی را ارائه می‌کنند، زیرا در سطح کم در سلول‌های طبیعی فعال‌اند، به خصوص در سلول‌های سرطان پانکراس، همچنین در شکل‌های مهاجم نسبت به درمان‌های سنتی مقاوم‌تر هستند. با این دانش در مورد فعالیت پروموتر، سازه DTA برگرفته از پروموتر MSLN و MUC1 تولید شد، که فعالیت اختصاصی و انتخابی خودش را نشان داد که به صورت ترجیحی سلول‌های سرطان پانکراس بیان‌کننده MSLN/MUC1 را نابود نمود. تحلیل بیشتر از تومورهای اولیه و متاستازی در بیماران پتانسیل بالای درمان هدف‌گیری MUC1 را به عنوان رویکرد هدف‌گیری نشان داد، که این بیان به صورت مداوم در تومورهای اولیه و متاستاز مشاهده می‌شود (۱۸).

۱. Invasive Bladder Cancers

۲. Pancreatic Cancer-Specific Mesothelin (MSLN)

۳. Mucin 1 (MUC1)





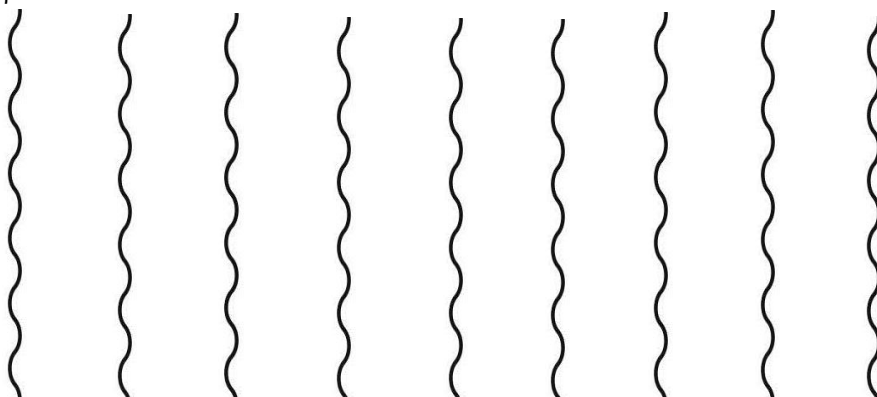
استرپتولیزین O

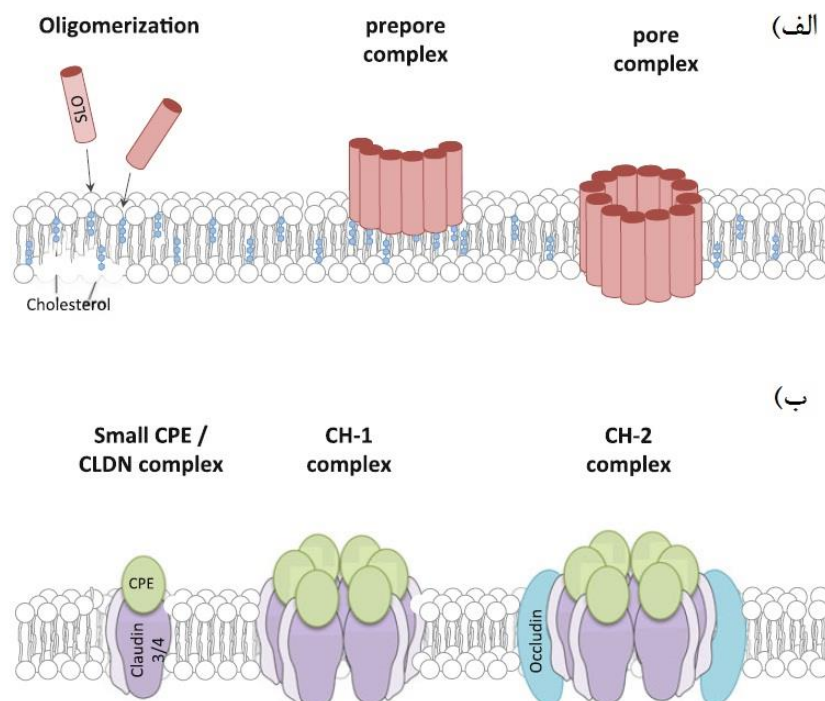
جدا از رویکرد مداخله در ترجمه پروتئین توسط سم باکتریایی مانند DTA، رویکرد تجزیه سلولی توسط سموم تشکیل دهنده منفذ برای حذف سلول‌های تومور، جالب توجه است. به خصوص به دلیل سایر محرک‌های ایمنی، تجزیه سلول سرطان ممکن است به تومور درمانی اضافه شود زیرا آنتی ژن‌های تومور را آزاد می‌کند، که می‌تواند به فعال‌سازی پاسخ ایمنی بیمار علیه تومور مربوط باشد (۲). یکی از این سموم تشکیل دهنده منفذ، استرپتولیزین O (SLO) است. SLO یک سم ۶۲ کیلودالتونی است که توسط سویه‌های باکتری استرپتوکوکوس^۱ ترشح می‌شوند که به خانواده سموم تشکیل دهنده منفذ تعلق دارند که سیتولیزین وابسته به کلسترول (CDCs)^۲ نام دارند. SLO از چهار دامین D1-D4 تشکیل شده است، که غنی از بخش‌های صفحه β ^۳ هستند. مهمترین دامین‌های پروتئین D3 و D4 هستند، زیرا دامین D3 نواحی عبور از غشا را برای سم فراهم می‌کند و D4 به صورت مستقیم با کلسترول غشاهای سلولی برهمکنش دارد (۷۵). پس از اتصال اختصاصی به کلسترول‌های غشا، مونومرهای SLO الیگومر می‌شوند تا توده‌های هموتیپ را تشکیل دهند که به داخل غشا وارد می‌شوند تا یک منفذ بزرگ را تشکیل دهند که قطره‌ایش می‌تواند به ۳۵ نانومتر برسد (شکل ۳، الف).

۱. Streptococcus Bacteria

۲. Cholesterol-Dependent Cytolysins (CDCs)

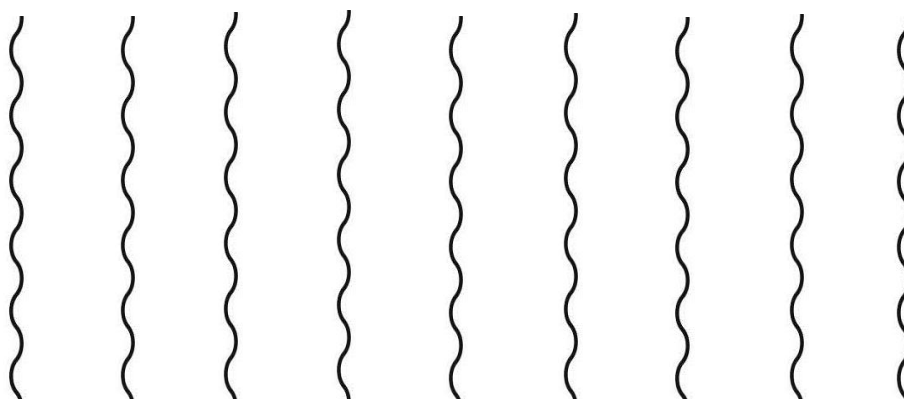
۳. β -sheet





شکل ۳

الف- مکانیزم عمل SLO. SLO به صورت اختصاصی به کلسترول غشا متصل شده و الیگومر می‌شود تا یک ساختار حلقه‌ای را درست کند که حاوی ۴۵-۵۰ واحد است و به درون غشا وارد شود تا یک منفذ بزرگ ایجاد کند که منجر به از دست رفتن تعادل بین جریان به داخل و به خارج در عرض غشا سلولی می‌شود. این تشکیل منفذ بعداً تجزیه سلولی را القا می‌کند. ب. مکانیزم اتصال CPE و ایجاد سمیت سلولی. CPE مستقیماً به گیرنده‌اش، و به صورت ترجیحی به کلاودین-۳ یا کلاودین-۴، در غشای پلاسمایی اپی‌تلیوم رودهم متصل شده. کمپلکس‌های کوچک CPE/کلاودین ممکن است شامل سایر کلاودین‌ها مثل کلاودین-۱ از طریق برهمکنش غیرمستقیم هم باشند.





شش کمپلکس کوچک الیگومر می‌شوند تا یک کمپلکس هگزامری بزرگ را تشکیل دهند (CH-1) که نفوذپذیری غشا سلولی را افزایش می‌دهد. کمپلکس CH-1 در نهایت در مسدود کردن وارد می‌شود که منجر به یک کمپلکس بزرگتر می‌شود که CH-2 نام دارد، که اتصالات به هم فشرده اپی تلیال را تخریب می‌کند که منجر به شکست تعادل کلوتید-اسمزی سلول‌های تحت تأثیر می‌شود. در نتیجه، سلول‌ها مرگ سلولی را در اثر تجزیه خواهند داشت.

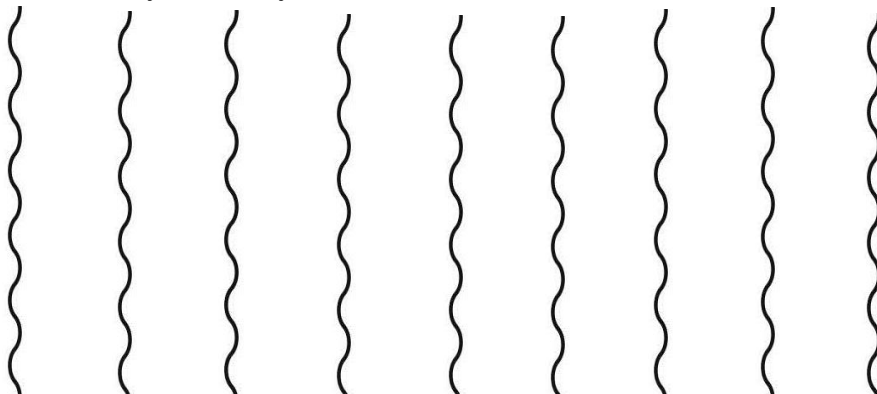
SLO باعث ژن درمانی خودکشی سیتوسولی می‌شود

در حالی که پروتئین SLO نو ترکیب در چند مطالعه برای ویژگی‌های تشکیل منفذ استفاده شده است، یانگ و همکاران به فکر به کارگیری این ویژگی خاص SLO برای کشتن سلول‌های تومور بدخیم بودند و استفاده از مزایای آن برای غلبه بر مقاومت ضدآپوپتوزی سلول‌های سرطان. بیشتر سموم باکتریایی، مانند سم دیفتری یا اگزوتوکسین سودوموناس^۱، که تاکنون در ژن درمانی خودکشی در غشا سلولی آزمون شده‌اند درون سلول تومور هدف‌گیری شده عمل می‌کنند (۴۳). بر عکس، سموم تشکیل‌دهنده منفذ شناخته شده‌اند که در غشا سلولی عمل می‌کنند و قبلاً به عنوان سموم ایمنی یا پروتئین نو ترکیب برای درمان ضدسرطان شناخته شده‌اند. در مطالعه یانگ و همکاران، یک ناقل بیانی پلاسمید سنتی که ژن SLO را حمل می‌کرد در سیستم ترانسفکت با واسطه لیپوزوم^۲ استفاده شد. ابتدا، سلول‌های HEK293T (فیبروبلاست کبد جنینی انسان^۳) به صورت موقت با ناقل SLO ترانسفکت شدند، که منجر به مرگ سلولی در اثر نفوذ و عدم تلفیق غشا سلول شد. SLO ترشح شده

۱. Pseudomonas Exotoxin

۲. Liposome-Mediated Transfection System

۳. Human Embryonic Kidney Fibroblasts



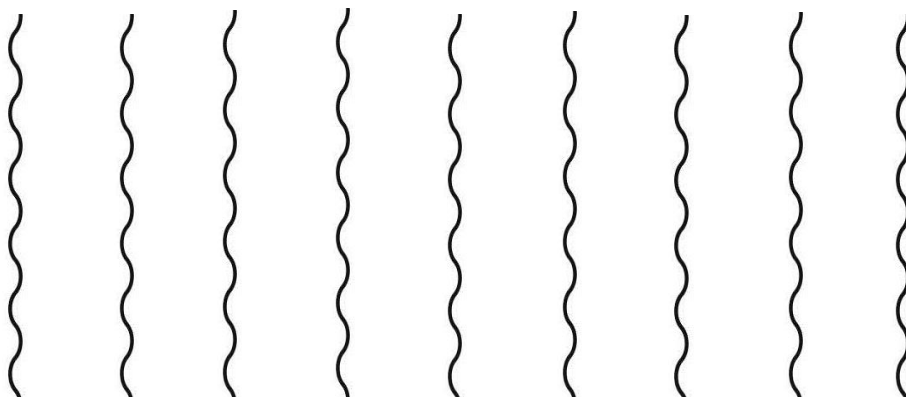
توسط باکتری که معمولاً منافذ بزرگی را در غشا سلول هدف ایجاد می‌کند، به مولکول‌های بزرگ اجازه می‌دهد که از آن عبور کنند (۶۳). برای تعیین اینکه سمیت سلولی مشاهده شده در سلول‌های ترانسفکت شده SLO در اثر تشکیل منفذ لاکتات دی‌هیدروژناز (LDH)^۱ است، فعالیت کاسپاز^۲ اندازه‌گیری شد و سلول‌ها تحت میکروسکوپ الکترونی پایش شدند. سطح بالای LDH ولی بدون فعال‌سازی کاسپاز مشاهده شد، که نشان می‌دهد که پروتئین SLO بیان شده درون سلول‌های HEK، نکرور را القا می‌کند (۶۰). در مطالعات بیشتر، آن‌ها رویکرد خود را با ایجاد یک بیان آدنوویروسی به عنوان سیستم انتقال ژن با راندمان بالا گسترش دادند، که به صورت معنی‌داری زیستایی سلول را در چند لاین سلول سرطانی انسان کاهش داد (سلول‌های کارسینومای گردن، C33، سلول‌های کارسینومای ریه، A549، سلول‌های سرطان سینه، MCF-7، و سلول‌های سرطان پروستات، Hep3B). پس از انتقال ژن SLO، فعالیت ضدتومور معنی‌داری توسط سمیت سلولی با واسطه SLO در موش حامل زئوگرافت CA33 تیمار شده مشاهده شد (۱۰).

این مطالعه استفاده موفق از ژن SLO به عنوان عامل ضدسرطان را بیان نمود. ولی این مطالعات محدودیت‌هایی را مطرح کردند، زیرا استفاده از آن‌ها محدود به درمان موضعی است در غیر این صورت اثرات جانبی ناخواسته حجیم رخ می‌دهد، زیرا کلسترول در واقع همچنین در غشاهای سلولی سلول‌های طبیعی سالم حاضر است (۸۱). بنابراین، تغییرات بیشتر مانند اتصال پروموت‌های اختصاصی تومور بالادست ژن SLO یا تغییر پروتئین فیبر آدنوویروس، که به پروتئین‌های سطح سلول تومور اختصاصی می‌چسبد، لازم می‌باشد (۵۲).

۱. Lactate Dehydrogenase (LDH)

۲. Caspase Activity: گروهی از آنزیم‌ها هستند که به خانواده پروتئازها تعلق دارند و نقش مهمی در مرگ

برنامه‌ریزی شده سلول دارند





انتروتوکسین Clostridium perfringens

سم باکتریایی امیدبخش تشکیل دهنده منفذ دیگری برای ژن درمانی خودکشی، انتروتوکسین Clostridium perfringens است که توسط باکتری گرم مثبت بی هوازی Clostridium perfringens تولید می شود و اصولاً با سمیت غذایی مرتبط است. این پروتئین تکی ۳۵ کیلودالتونی از ۳۱۹ آمینواسید با توالی اولیه منحصر به فردی تشکیل شده است. CPE یک پروتئین دو دامینی است که از (۱) دامین اتصال به گیرنده انتهایی C (آمینواسید ۳۱۹-۱۸۴) تشکیل شده که غشاهای خانواده کلاوودین^۱ را شناسایی کرده و به آن متصل می شود و (۲) یک دامین انتهایی N که در الیگومریزاسیون و تشکیل منفذ شرکت دارد (۲۳).

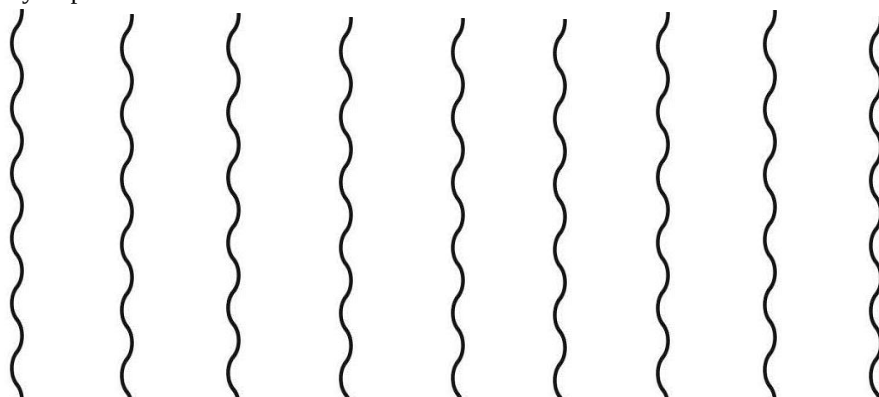
قطعه انتهایی C از CPE (c-CPE) پیوند با وابستگی بالایی به گیرنده هایش نشان می دهد، برای مثال، کلاوودین-۳ یا کلاوودین-۴؛ ولی قادر به شروع یا تشکیل منفذ نیستند. آمینواسیدهای انتهایی N ۸۰-۱۶۰ نیز ناحیه TM1 نامیده می شوند که شامل آمینواسیدهای آب دوست^۲ و آب گریز^۳ می شوند، که حلقه های β را مونتاژ می کنند، که بعداً ورود به غشا و تشکیل منفذ را انجام می دهند. مکانیزم عمل CPE با اتصال به گیرنده طبیعی اش شروع می شود، پروتئین بین غشایی کلاوودین. به خصوص، کلاوودین-۳، کلاوودین-۴، کلاوودین-۶ و کلاوودین-۱۴ گیرنده های CPE تأیید شده هستند. (۹۱)

خانواده کلاوودین شامل حداقل ۲۷ پروتئین است که برای تشکیل اتصال محکم در سلول های اپی تلیال و اندوتلیال ضروری هستند (۳۲). آن ها همچنین نقش مهمی در کنترل انتقال مجاور سلول و نگهداری قطبیت سلول بازی می کنند. کلاوودین ها از

۱. Claudin

۲. Hydrophilic

۳. Hydrophobic



چهار دامین بین غشایی تشکیل شده‌اند، یک دم سیتوپلاسمی انتهایی C، و دو حلقه خارج سلولی، ECL1 و ECL2. اتصال CPE به گیرنده کلائودین تشکیل یک کمپلکس کوچک را شروع می‌کند (۹۰ کیلودالتون)، که حاوی CPE و گیرنده است. این کمپلکس کوچک به خودی خودش قادر به انجام سمیت سلولی نیست، که منجر به کمپلکس بزرگ ۴۵۰ کیلودالتونی می‌شود- به نام کمپلکس CH1. کمپلکس CH1 که از هگزامر CPE و کلائودین تشکیل شده است سپس منفذی را درون غشا می‌سازد، که باعث تغییرات نفوذپذیری غشا می‌شود، و باعث جریان به داخل کلسیم می‌شود، که مرگ سلولی را القا می‌کند (۷۱). آسیب مرفولوژیکی به مواجهه سطح سلول بازولاترال^۱ منجر شده که باعث اتصال اضافی سم برای تشکیل کمپلکس ۶۰۰ کیلودالتون بزرگتر می‌شود که CH-2 نام دارد، که از کلائودین و همچنین اوکلوئودین^۲ تشکیل شده است (شکل ۳، ب) (۲۰).

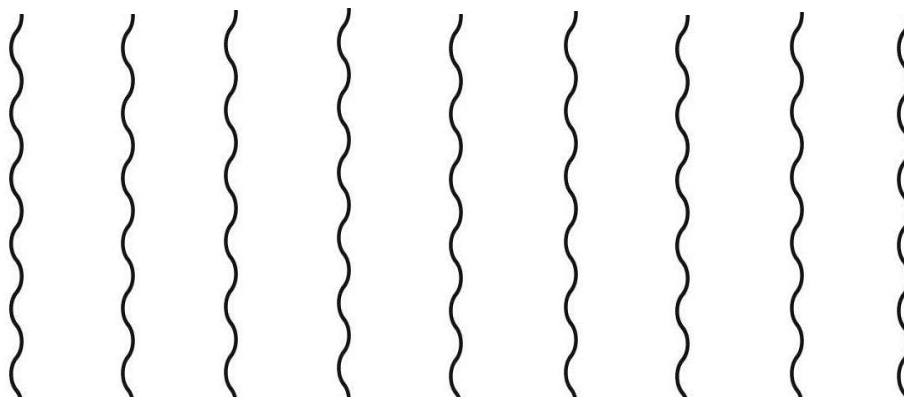
تاکنون مشخص شده است که غلظت بالای CPE باعث تشکیل منافذ فراوانی می‌شود که باعث جریان به داخل کلسیم زیاد و در نتیجه مرگ سلولی نکروز می‌شود، در حالی که غلظت کم CPE منجر به تشکیل تعداد کمی منفذ شده، که باعث آپوپتوز می‌شود (۷۱).

انکولیکینگ ژن درمانی خودکشی بر اساس CPE

مطالعات فراوانی نشان داده‌اند که ماهیت سرطان، به خصوص سرطان‌های اپی‌تلیال، مانند سرطان روده، سینه، پروستات، تخمدان و پانکراس دارای بیان بالای کلائودین-۳ و یا کلائودین-۴ هستند. به همین خاطر، تلاش قابل ملاحظه‌ای صورت گرفته است تا یک رویکرد بر اساس CPE برای درمان سرطان انجام شود و فایده کلینیکی

۱. Basolateral

۲. Occludin

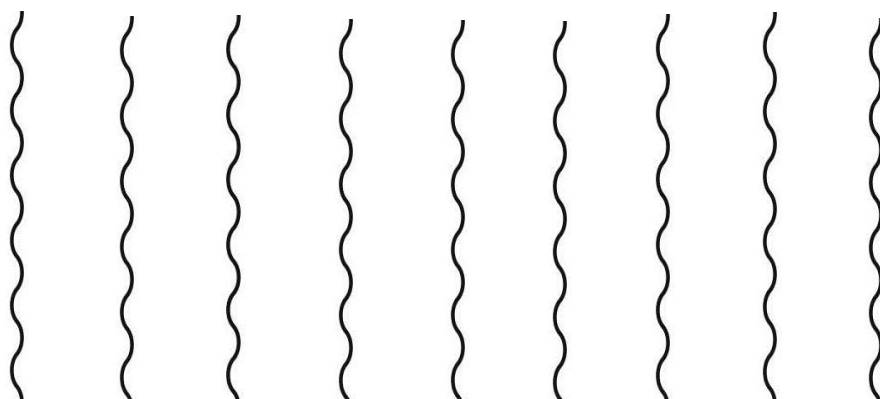




بالقوه آن در هدف‌گیری کلائودین-۳ و کلائودین-۴ که تومورها را بیان می‌کنند ارزیابی شده است (۳۰). کاربرد پروتئین CPE نوترکیب کشتن سلول را بسته به دز کلائودین-۳ و کلائودین-۴ که در سلول‌های پانکراس، سینه یا روده بیش از حد بیان شده‌اند، نشان داده است (۲۸). علاوه بر آن، کاربرد درون توموری در موش حامل تومور اثرات جانبی مرتبط با سم ناخواسته را القا نکرد. ولی استفاده از پروتئین CPE نوترکیب به کاربرد مکرر سم نیاز دارد تا اثر درمانی معنی‌دار به دست آید. در صورت جایگزینی، انتقال ژن ناقل بیان‌کننده CPE می‌تواند مفید باشد تا به صورت معنی‌داری در دسترس بودن سم را طولانی کرده و انتشار درون تومور را بهبود بخشیده و در نتیجه اثر سمیت سلولی را تشدید کند (۲۷).

بر اساس این ایده، ما یک ناقل CPE بهینه شده ترجمه یوکاریوتی (optCPE) را تثبیت کردیم که هم اختصاصیت هدف و هم سمیت سلولی مناسب را ترکیب می‌کرد. بیان درون سلولی CPE و تجمع بعد از انتقال ژن منجر به حذف مؤثر سلول‌های با بیان بالای کلائودین-۳ و کلائودین-۴ شد، مانند لاین سلولی کارسینوما پستانی MCF-7 یا سلول‌های سرطان پانکراس انسان Panc1، که سلول‌های منفی از نظر کلائودین مانند لاین سلولی ملانوما Sk-Mel5 بدون اثر ماندند. این مطالعه بعداً بیان کرده است که اگرچه CPE داخل سلول ترانسفکت شده تولید می‌شود، ولی مانع از عمل بیرونی اتصال به کلائودین و تشکیل منفذ و تجزیه سلولی نمی‌شود (۷۰).

مهم‌تر اینکه، نشان داده شده است که انتقال ژن غیرویروسی درون توموری ناقل پلاسمید بیان‌کننده CPE نکروز تومور گسترده را در کارسینوما روده انسان HCT116 و در موش پیوند خارجی شده با کارسینوما پستان انسان MCF-7 القا کرد. این مورد با کاهش معنی‌داری در رشد تومور مرتبط بود و راندمان بهبودیافته‌ای نسبت به درمان‌های با CPE نوترکیب نشان داد که توسط حیوانات به خوبی تحمل می‌شد (۳۳).

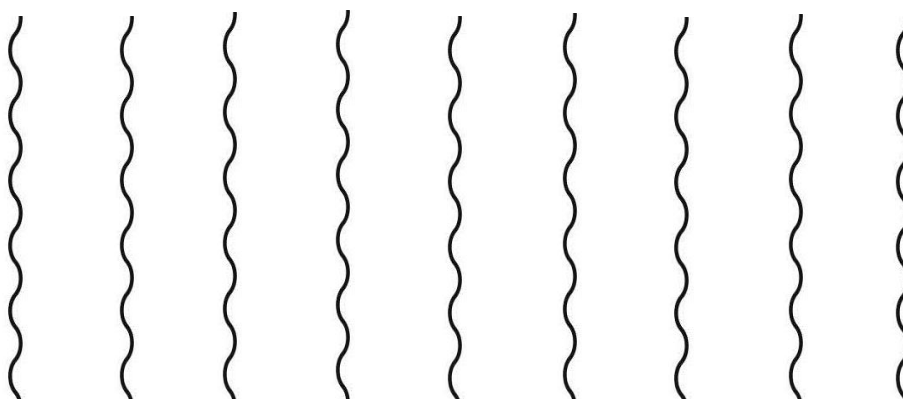


در مطالعه اخیر، ما از ژن درمانی optCPE استفاده کردیم تا به صورت انتخابی کارسینوماهای پانکراس بیان کننده کلائودین-۳ و کلائودین-۴ را حذف کنیم و استفاده موفق از این ژن درمانی خودکشی را دوباره نشان دادیم زیرا بیان CPE به تخریب سریع تومور منجر شد (۲۱).

در هر دو مطالعه، ما حضور CPE فعال زیستی رها شده را در محیط کشت همه سلول های ترانسفکت شده (سلول های کلائودین مثبت و کلائودین منفی) مشاهده کردیم، که پیشنهاد می کند که آزادسازی مستقل از سمیت سلولی CPE رخ داده که از مفهوم اثر پیرامونی حمایت می کند که به شدت به راندمان این رویکرد ژن درمانی مربوط است (شکل ۱، ب).

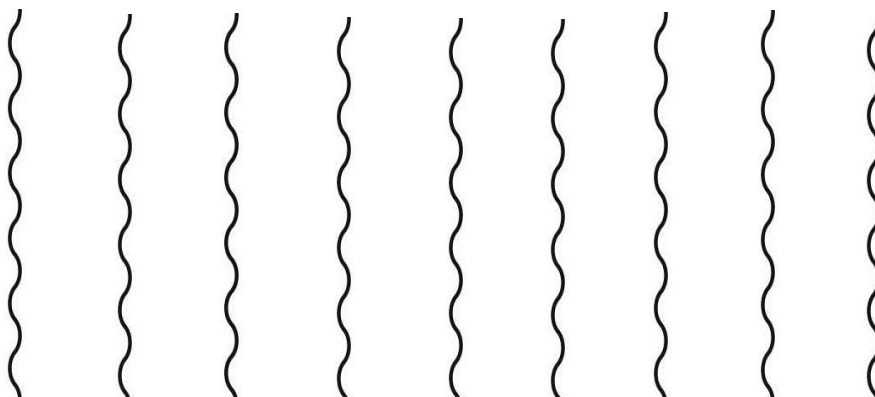
برای استفاده بهبودیافته و مؤثرتر از سم، نحوه مرگ سلولی، که توسط CPE ترانسفکت شده القا می شود، قابل توجه است. تحلیل مکانیزم مرگ سلولی بیان کرده است که فعال سازی با تأخیر کاسپازهای ۳/۷ القا شد، که نشان دهنده نکروز با واسطه CPE بیش از آپوپتوز است (۴۱). بعداً این مورد با افزایش شگفت انگیز رها سازی LDH بعد از ترانسفکت CPE و ظهور مرفولوژی سلول نکروزی حمایت شد، مانند از هم گسیختگی هسته ای و غشا سلولی. همانطور که در بالا اشاره شد و توسط دیگران هم گزارش شده است، مکانیزم مرگ سلولی به غلظت CPE، تعداد منافذ ایجاد شده توسط CPE و مکان کلائودین (اتصالات به هم فشرده، غشا سلولی، سیتوپلاسم) در سلول هدف بستگی دارد که دسترسی اتصال CPE را تعیین می کند (۲۹).

در کل، روش ژن درمانی انکولیکینگ CPE ارزش بالایی برای حذف هدفمند تومورهای سرسخت دارد، که با اثر پیرامونی این رویکرد، خودکشی اختصاصی، بهبود بیشتری یافت (۲۱).

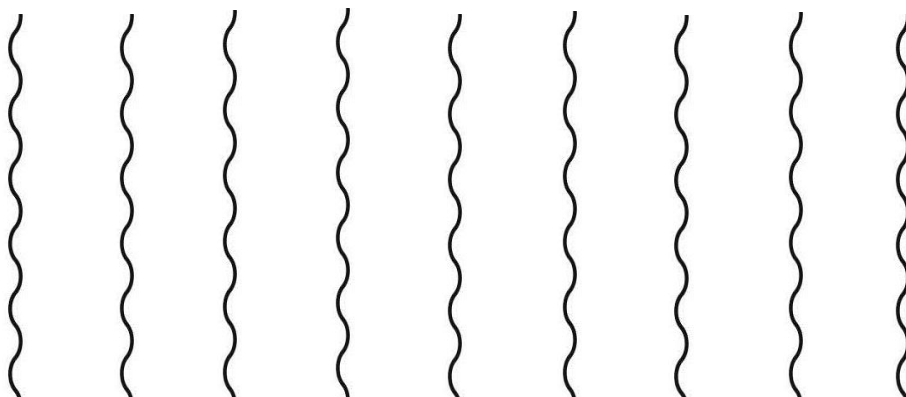




همانطور که روش‌های ژن درمانی بلوغ می‌یابد، راندمان آن برای درمان بیماری‌های سرطانی در آزمایشات کلینیکی نیز افزایش می‌یابد. در واقع، بیش از ۷ درصد همه آزمایشات کلینیکی ژن درمانی در کل جهان رویکردهای خودکشی را به عنوان تک درمانی یا در ترکیب با سایرین، درمان‌های سنتی مانند شیمی درمانی یا پرتو درمانی به کار می‌برند. سیستم‌های خودکشی فراوانی تثبیت شده و به صورت موفقیت‌آمیزی به کار گرفته شده‌اند و در بین آن‌ها سموم باکتریایی ممکن است انقلابی دوباره به عنوان ابزار بالقوه برای ژن درمانی مؤثرتر و هدفمندتر تجربه کنند. به همین خاطر، سموم تشکیل‌دهنده منفذ، اونکولیکینگ باکتریایی مانند SLO یا CPE امیدی برای کشتن مناسب و سریع سلول تومور را به ما می‌دهند. به خصوص عمل CPE با ویژگی‌های کشتن انتخابی سلول تومور مرتبط است که پروتئین‌های اتصالات به هم فشرده کلائودین-۳ یا کلائودین-۴ را مورد هدف قرار می‌دهند، که اغلب در سرطان‌های اپی‌تلیال از تنظیم خارج شده‌اند. همانطور که نشان داده شد برای سیستم‌های خودکشی کلاسیک، (مثل CD، HSV-tk)، سموم باکتریایی مانند CPE ویژگی اثر پیرامونی را دارند، که در صورتی مهم است که برای استفاده در شرایط *in vivo* مناسب این درمان، ژن خودکشی ضروری نباشد. این مطالعات اولیه برای استفاده از سموم باکتریایی برای درمان‌های خودکشی اونکولیکینگ ممکن است بعداً تحقیق هدایت شده برای سموم جدید، مشابه یا حتی

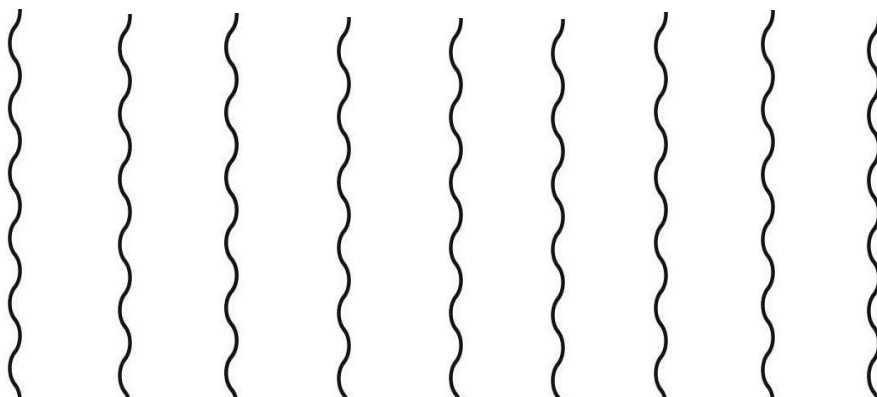


مؤثرتر و هدفمند تومور را القا کند که به صورت بالقوه برای ژن درمانی سرطان استفاده شود.

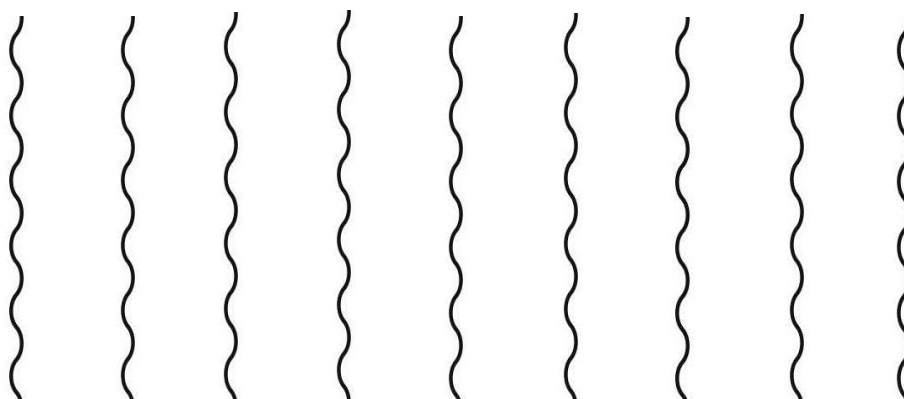




1. Amit D, Hochberg A (2012) Development of targeted therapy for a broad spectrum of cancers (pancreatic cancer, ovarian cancer, glioblastoma and HCC) mediated by a double promoter plasmid expressing diphtheria toxin under the control of H19 and IGF2-P4 regulatory sequences. *Int J Clin Exp Med* 5:296–305
2. Amit D, Tamir S, Hochberg A (2013) Development of targeted therapy for a broad spectrum of solid tumors mediated by a double promoter plasmid expressing diphtheria toxin under the control of IGF2-P4 and IGF2-P3 regulatory sequences. *Int J Clin Exp Med* 6:110–118.
3. Bhakdi S, Bayley H, Valeva A et al (1996) Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and Escherichia coli hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch Microbiol* 165:73–79.
4. Briggs DC, Naylor CE, Smedley JG et al (2011) Structure of the food-poisoning Clostridium perfringens enterotoxin reveals similarity to the aerolysin-like pore-forming toxins. *J Mol Biol* 413:138–149.
5. Chakrabarti G, Zhou X, McClane BA (2003) Death pathways activated in CaCo-2 cells by Clostridium perfringens enterotoxin. *Infect Immun* 71:4260–4270
6. Croce CM (2009) Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 10:704–714.
7. Danda R, Krishnan G, Ganapathy K et al (2013) Targeted expression of suicide gene by tissue-specific promoter and microRNA regulation for cancer gene therapy. *PLoS ONE* 8: e83398.



8. Deng Q, Barbieri JT (2008) Molecular mechanisms of the cytotoxicity of ADP-ribosylating toxins. *Annu Rev Microbiol* 62:271–288.
9. Di Stasi A, Tey S-K, Dotti G et al (2011) Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med* 365:1673–1683.
10. Dorer DE, Nettelbeck DM (2009) Targeting cancer by transcriptional control in cancer gene therapy and viral oncolysis. *Adv Drug Deliv Rev* 61:554–571.
11. Felgner S, Kocijancic D, Frahm M, Weiss S (2016) Bacteria in cancer therapy: renaissance of an old concept. *Int J Microbiol* 2016:1–14.
12. Fidias P, Pennell NA, Boral AL et al (2009) Phase I study of the c-raf-1 antisense oligonucleotide ISIS 5132 in combination with carboplatin and paclitaxel in patients with previously untreated, advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 4:1156–1162.
13. Freedman J, Shrestha A, McClane B (2016) Clostridium perfringens Enterotoxin: action, genetics, and translational applications. *Toxins (Basel)* 8:73.
14. Fujita K, Katahira J, Horiguchi Y et al (2000) Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein. *FEBS Lett* 476:258–261
15. Fukazawa T, Maeda Y, Sladek FM, Owen-Schaub LB (2004) Development of a cancer-targeted tissue-specific promoter system. *Cancer Res* 64:363–369.
16. Gao Z, McClane B a (2012) Use of Clostridium perfringens enterotoxin and the enterotoxin receptor-binding domain (C-CPE) for cancer treatment: opportunities and challenges. *J Toxicol* 2012:981626.
17. Gillet J-P, Macadangdang B, Fathke RL et al (2009) The development of gene therapy: from monogenic





recessive disorders to complex diseases such as cancer. *Methods Mol Biol Clift NJ* 542:5–54

18. Gofrit ON, Benjamin S, Halachmi S et al (2014) DNA based therapy with diphtheria toxin-A BC-819: a phase 2b marker lesion trial in patients with intermediate risk nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol* 191:1697–1702.

19. Gumbiner B (1987) Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. *Am J Physiol* 253:C749–C758

20. Günzel D, Fromm M (2012) Claudins and other tight junction proteins. *Compr Physiol* 2:1819– 1852.

21. Hanna PC, Mietzner TA, Schoolnik GK, McClane BA (1991) Localization of the receptor-binding region of *Clostridium perfringens* enterotoxin utilizing cloned toxin fragments and synthetic peptides. The 30 C-terminal amino acids define a functional binding region. *J Biol Chem* 266:11037–11043

22. Hasenpusch G, Pfeifer C, Aneja MK et al (2011) Aerosolized BC-819 inhibits primary but not secondary lung cancer growth. *PLoS ONE* 6:e20760.

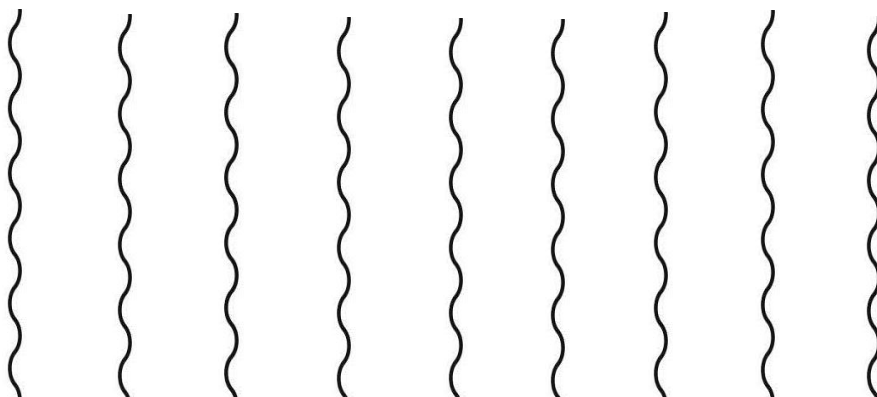
23. Haviv YS, Blackwell J (2001) Transcriptional regulation in cancer gene therapy. *Isr Med Assoc J* 3:517–522

24. Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ (2006) The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer* 6:186.

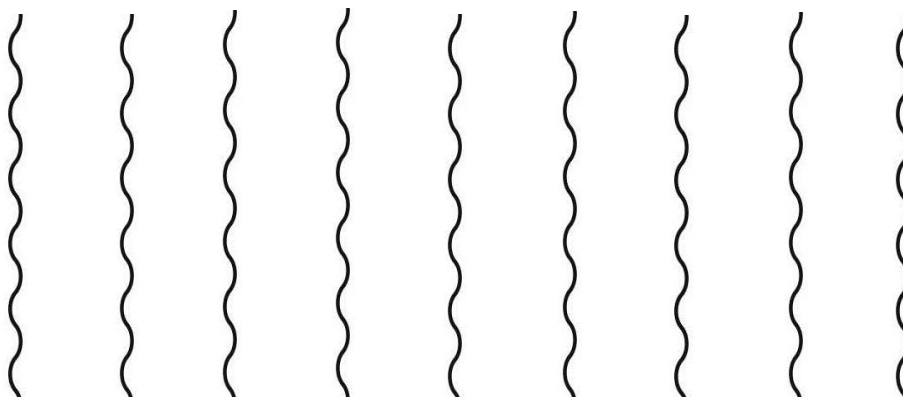
25. Igney FH, Krammer PH (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2:277–288.

26. Johnson EA (1999) Clostridial toxins as therapeutic agents: benefits of nature's most toxic proteins. *Annu Rev Microbiol* 53:551–75.

27. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND et al (2010) Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 363:411–422.

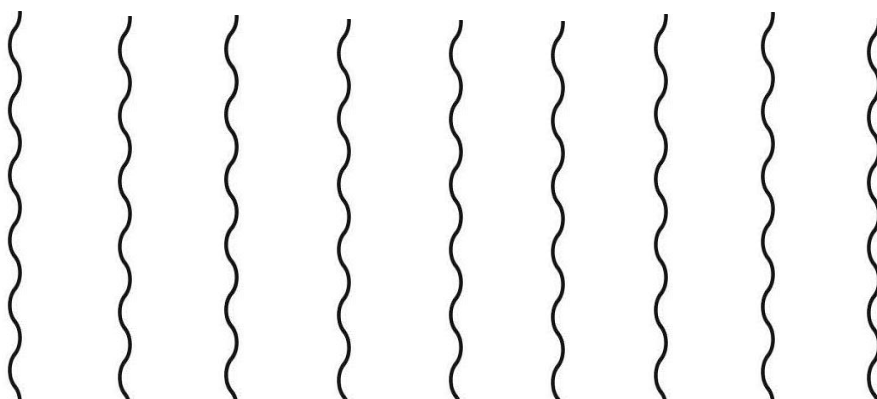


28. Katahira J, Inoue N, Horiguchi Y et al (1997) Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J Cell Biol* 136:1239–1247
29. Kawakami K, Kawakami M, Joshi BH, Puri RK (2001) Interleukin-13 receptor-targeted cancer therapy in an immunodeficient animal model of human head and neck cancer. *Cancer Res* 61:6194–6200
30. Kitadokoro K, Nishimura K, Kamitani S et al (2011) Crystal structure of *Clostridium perfringens* enterotoxin displays features of beta-pore-forming toxins. *J Biol Chem* 286:19549–19555.
31. Kojima T, Kyuno D, Sawada N (2012) Targeting claudin-4 in human pancreatic cancer. *Expert Opin Ther Targets* 16:881–887.
32. Kominsky SL, Tyler B, Sosnowski J et al (2007) *Clostridium perfringens* enterotoxin as a
33. novel-targeted therapeutic for brain metastasis. *Cancer Res* 67:7977–7982.
34. Kominsky SL, Vali M, Korz D et al (2004) *Clostridium perfringens* enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol* 164:1627–1633
35. Lal-Nag M, Battis M, Santin a D, Morin PJ (2012) Claudin-6: a novel receptor for CPE-mediated cytotoxicity in ovarian cancer. *Oncogenesis* 1:e33.
36. Litkouhi B, Kwong J, Lo C-M et al (2007) Claudin-4 overexpression in epithelial ovarian cancer is associated with hypomethylation and is a potential target for modulation of tight junction barrier function using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Neoplasia* 9:304–314

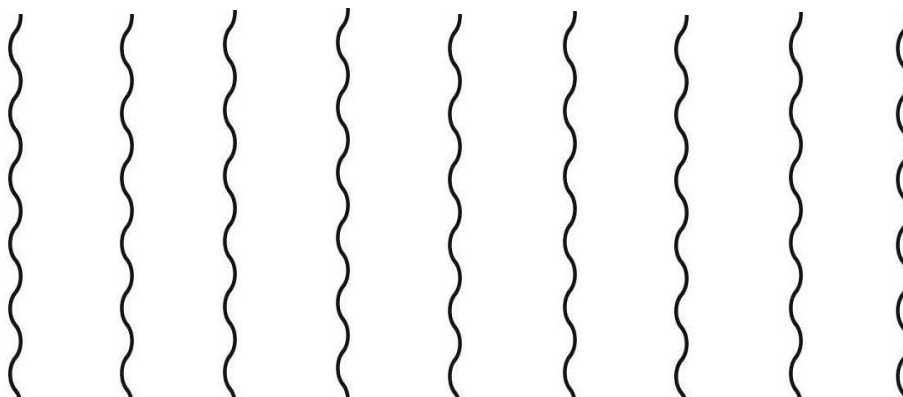




37. Louie GV, Yang W, Bowman ME, Choe S (1997) Crystal structure of the complex of diphtheria toxin with an extracellular fragment of its receptor. *Mol Cell* 1:67–78.
38. Lu C, Stewart DJ, Lee JJ et al (2012) Phase I clinical trial of systemically administered TUSC2 (FUS1)-nanoparticles mediating functional gene transfer in humans. *PLoS ONE* 7:e34833.
39. Lu Z, Ding L, Lu Q, Chen Y-H (2013) Claudins in intestines: distribution and functional
40. significance in health and diseases. *Tissue barriers* 1:e24978
41. Martín V, Cortés ML, de Felipe P et al (2000) Cancer gene therapy by thyroid hormone-mediated expression of toxin genes. *Cancer Res* 60:3218–3224
42. Matouk I, Raveh E, Ohana P et al (2013) The increasing complexity of the oncofetal h19 gene locus: functional dissection and therapeutic intervention. *Int J Mol Sci* 14:4298–4316.
43. Matsuda M, Sugimoto N (1979) Calcium-independent and dependent steps in action of *Clostridium perfringens* enterotoxin on HeLa and Vero cells. *Biochem Biophys Res Commun* 91:629–636.
44. Maxwell F, Maxwell IH, Glode LM (1987) Cloning, sequence determination, and expression in transfected cells of the coding sequence for the tox 176 attenuated diphtheria toxin A chain. *Mol Cell Biol* 7:1576–1579
45. Maxwell IH, Maxwell F, Glode LM (1986) Regulated expression of a diphtheria toxin A-chain gene transfected into human cells: possible strategy for inducing cancer cell suicide. *Cancer Res* 46:4660–4.
46. McCarthy EF (2006) The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J* 26:154–158

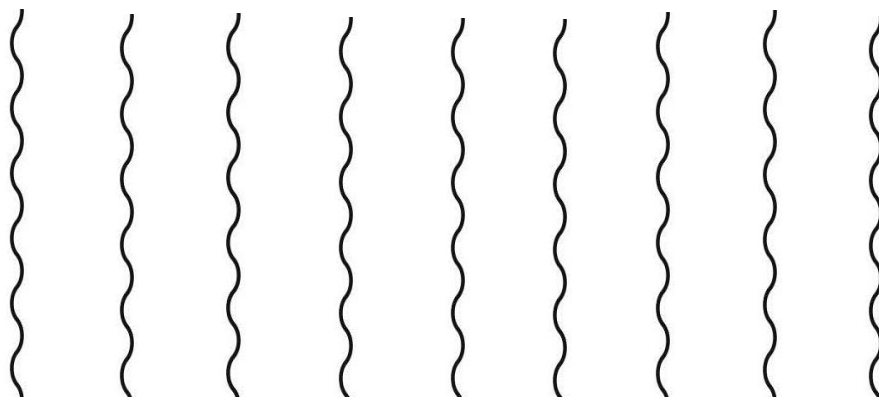


47. Michl P, Buchholz M, Rolke M et al (2001) Claudin-4: a new target for pancreatic cancer
48. treatment using Clostridium perfringens enterotoxin. Gastroenterology 121:678–684.
49. Minton NP (2003) Clostridia in cancer therapy. Nat Rev Microbiol 1:237–242
50. Mizrahi A, Czerniak A, Levy T et al (2009) Development of targeted therapy for ovarian cancer mediated by a plasmid expressing diphtheria toxin under the control of H19 regulatory sequences. J Transl Med 7:69.
51. Moulder SL, Symmans WF, Booser DJ et al (2008) Phase I/II study of G3139 (Bcl-2 antisense oligonucleotide) in combination with doxorubicin and docetaxel in breast cancer. Clin Cancer Res 14:7909–7916.
52. Neesse a, Griesmann H, Gress TM, Michl P (2012) Claudin-4 as therapeutic target in cancer. Arch Biochem Biophys 524:64–70.
53. Pahle J, Aumann J, Kobelt D, Walther W (2015) Oncoleaking: use of the pore-forming clostridium perfringens enterotoxin (CPE) for suicide gene therapy. Methods Mol Biol 1317:69–85.
54. Patyar S, Joshi R, Byrav DP et al (2010) Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. J Biomed Sci 17:21
55. Rangel LBA, Agarwal R, D’Souza T et al (2003) Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. Clin Cancer Res 9:2567–2575
56. Reed JC (2002) Apoptosis-based therapies. Nat Rev Drug Discov 1:111–121.
57. Richardson MA, Ramirez T, Russell NC, Moye LA (1999) Coley toxins immunotherapy: a retrospective review. Altern Ther Health Med 5:42–47





58. Robertson SL, Smedley JG, Singh U et al (2007) Compositional and stoichiometric analysis of *Clostridium perfringens* enterotoxin complexes in Caco-2 cells and claudin 4 fibroblast transfectants. *Cell Microbiol* 9:2734–2755
59. Saeki R, Kondoh M, Kakutani H et al (2009) A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule. *Mol Pharmacol* 76:918–926
60. Santel A, Aleku M, Röder N et al (2010) Atu027 prevents pulmonary metastasis in experimental and spontaneous mouse metastasis models. *Clin Cancer Res* 16:5469–5480.
61. Santin AD, Bellone S, Siegel ER et al (2007) Overexpression of *Clostridium perfringens*
62. enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in uterine carcinosarcomas. *Clin Cancer Res* 13:3339–3346
63. Saukkonen K, Hemminki A (2004) Tissue-specific promoters for cancer gene therapy. *Expert Opin Biol Ther* 4:683–96
64. Scaiewicz V, Sorin V, Fellig Y et al (2010) Use of H19 gene regulatory sequences in DNA-based therapy for pancreatic cancer. *J Oncol* 2010:178174.
65. Senzer N, Nemunaitis J, Nemunaitis D et al (2013) Phase I study of a systemically delivered p53 nanoparticle in advanced solid tumors. *Mol Ther* 21:1096–1103.
66. Sharpe M, Mount N (2015) Genetically modified T cells in cancer therapy: opportunities and challenges. *Dis Model Mech* 8:337–350.
67. Shatursky O, Heuck AP, Shepard LA et al (1999) The mechanism of membrane insertion for a cholesterol-dependent cytolysin. *Cell* 99:293–299.
68. Showalter S, Huang Y-H, Witkiewicz A et al (2008) Nanoparticulate delivery of diphtheria toxin DNA



effectively kills mesothelin expressing pancreatic cancer cells. *Cancer Bio Ther* 7:1584–1590

69. Shrestha A, McClane BA (2013) Human claudin-8 and -14 are receptors capable of conveying the cytotoxic effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *MBio*.

70. Shrestha A, Uzal FA, McClane BA (2016) The interaction of *Clostridium perfringens* enterotoxin with receptor claudins. *Anaerobe* 41:18–26.

71. Sierig G, Cywes C, Wessels MR, Ashbaugh CD (2003) Cytotoxic effects of streptolysin o and streptolysin s enhance the virulence of poorly encapsulated group a streptococci. *Infect Immun* 71:446–455

72. Singh R, Bandyopadhyay D (2007) MUC1: a target molecule for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 6:481–486

73. Singh U, Van Itallie CM, Mitic LL et al (2000) CaCo-2 cells treated with *Clostridium perfringens* enterotoxin form multiple large complex species, one of which contains the tight junction protein occludin. *J Biol Chem* 275:18407–18417

74. Smaldone MC, Davies BJ (2010) BC-819, a plasmid comprising the H19 gene regulatory

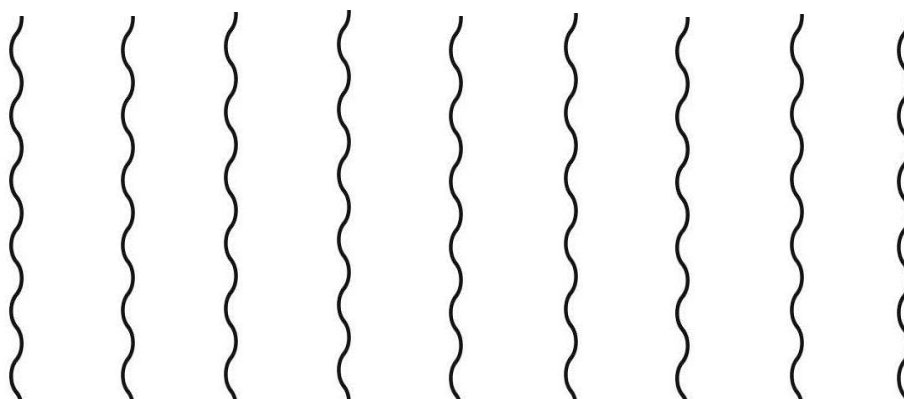
75. sequences and diphtheria toxin A, for the potential targeted therapy of cancers. *Curr Opin Mol Ther* 12:607–616

76. Smedley JG, Uzal FA, McClane BA (2007) Identification of a prepore large-complex stage in the mechanism of action of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect Immun* 75:2381–2390

77. Sorin V, Ohana P, Gallula J et al (2012) H19-promoter-targeted therapy combined with

78. gemcitabine in the treatment of pancreatic cancer. *ISRN Oncol* 2012:351750.

79. Sorin V, Ohana P, Mizrahi A et al (2011) Regional therapy with DTA-H19 vector suppresses growth of colon





adenocarcinoma metastases in the rat liver. *Int J Oncol* 39:1407–1412

80. Strebhardt K, Ullrich A (2008) Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer* 8:473–480.

81. Strumberg D, Schultheis B, Traugott U et al (2012) Phase I clinical development of Atu027, a siRNA formulation targeting PKN3 in patients with advanced solid tumors. *Int J Clin Pharmacol Ther* 50:76–78

82. Takala H, Saarnio J, Wiik H, Soini Y (2007) Claudins 1, 3, 4, 5 and 7 in esophageal cancer: loss of claudin 3 and 4 expression is associated with metastatic behavior. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 115:838–847

83. Tholey RM, Lal S, Jimbo M et al (2015) MUC1 promoter-driven DTA as a targeted therapeutic strategy against pancreatic cancer. *Mol Cancer Res* 13:439–448.

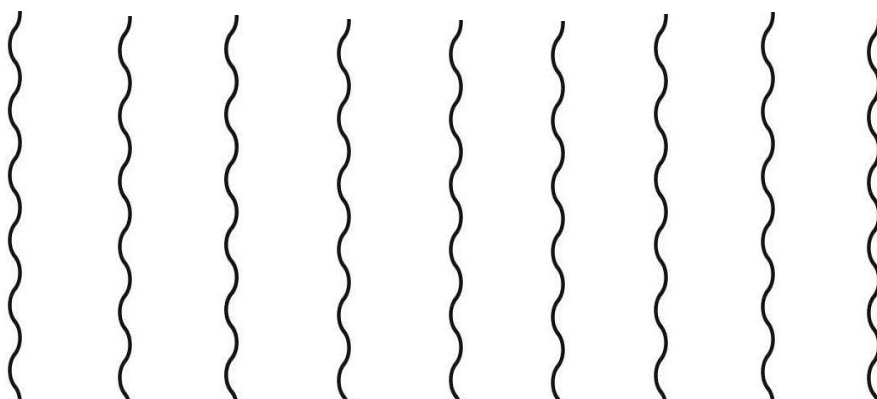
84. Thorburn A, Thorburn J, Frankel AE (2004) Induction of apoptosis by tumor cell-targeted toxins. *Apoptosis* 9:19–25.

85. Tsukita S, Furuse M (2000) Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* 149:13–16

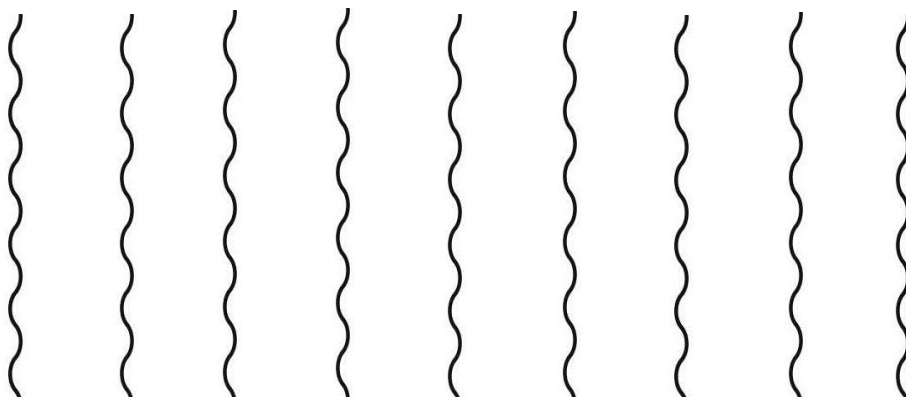
86. Walther W, Petkov S, Kuvardina ON et al (2011a) Novel *Clostridium perfringens* enterotoxin suicide gene therapy for selective treatment of claudin-3- and -4-overexpressing tumors. *Gene Ther* 19:494–503.

87. Walther W, Schlag PM, Stein U (2011b) Local gene delivery for therapy of solid tumors. *Drug delivery in oncology*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp 1391–1413

88. Walther W, Stein U (1999) Therapeutic genes for cancer gene therapy. *Mol Biotechnol* 13:21–28.

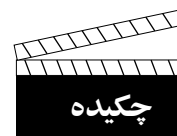


89. Walther W, Stein U Walther W, Stein U (2000) Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs* 60:249–271.
90. Winter JM, Tang LH, Klimstra DS et al (2012) A novel survival-based tissue microarray of pancreatic cancer validates MUC1 and mesothelin as biomarkers. *PLoS ONE* 7:e40157.
91. Yamaizumi M, Mekada E, Uchida T et al (1978) One molecule of diphtheria toxin fragment a introduced into a cell can kill the cell. *Cell* 15:245–250.
92. Yang WS, Park S-O, Yoon A-R et al (2006) Suicide cancer gene therapy using pore-forming toxin, streptolysin O. *Mol Cancer Ther* 5:1610–1619.
93. Zarogoulidis P, Darwiche K, Sakkas A et al (2013) Suicide gene therapy for cancer—current strategies. *J Genet Syndr gene Ther* 9(4pii):16849.

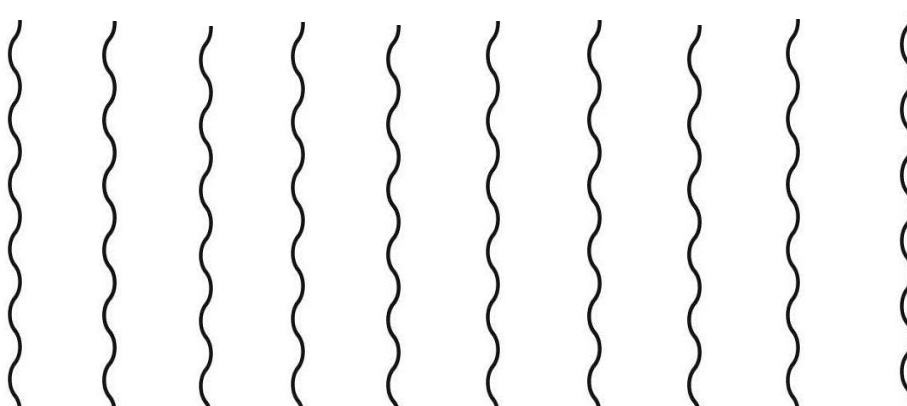


○ فصل هفتم

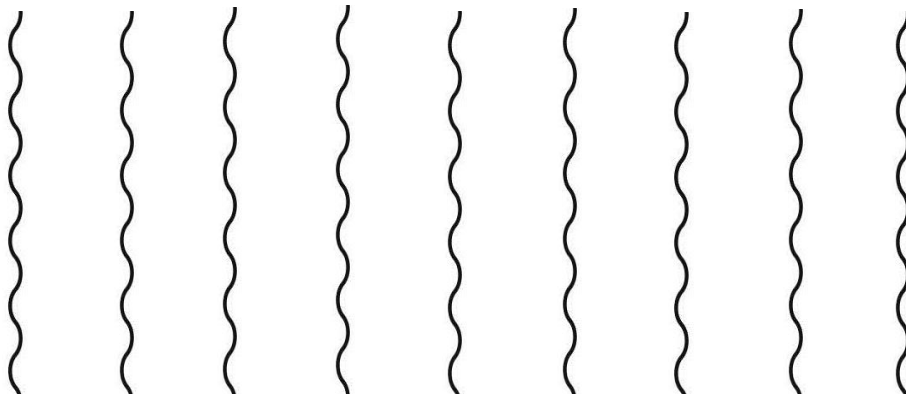
استفاده از باکتری‌ها در درمان سرطان

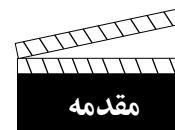


سرطان یکی از هولناک‌ترین بیماری‌ها و علت عمده مرگ و میر در انسان‌ها طی قرن بیست و یکم بشمار می‌رود. وجود اثرات جانبی دارویی در روش‌های سنتی درمان سرطان، مانند: شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و یا جراحی اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. امروزه استفاده از روش‌های نوین درمان سرطان مانند: واکسن‌های سرطان و درمان‌های بیولوژیک همراه با درمان‌های سنتی، در بهبود سرطان بسیار مفید بوده‌اند. موفقیت در این روش‌های نوین درمان سرطان به کاهش سمیت و نابودی اختصاصی سلول‌های سرطانی مربوط می‌شود. درمان باکتریایی سرطان یک قرن پیش شناخته شده است. گونه‌های زنده، ضعیف شده، یا دستورزی شده ژنتیکی اجباری یا اختیاری غیرهوازی، ویژگی وراثت‌پذیری کلونیزه کردن تومورها را نشان می‌دهند و قادر به تکثیر انتخابی درون تومورها هستند، که در نتیجه از رشدهای



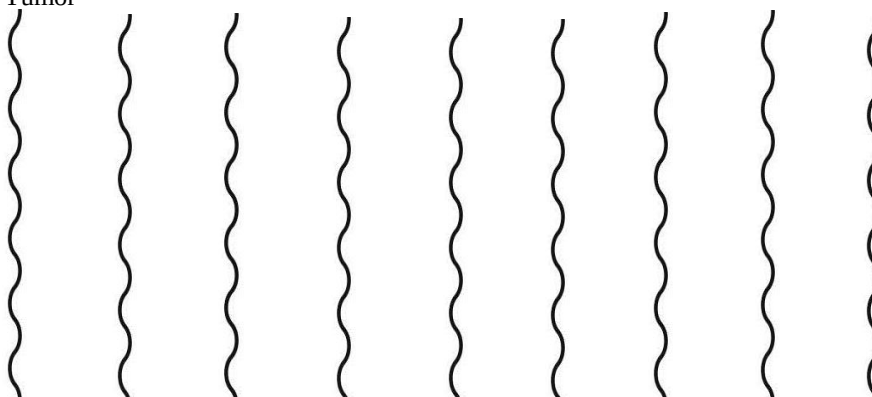
نگران کننده سلول جلوگیری می کنند. باکتری ها و اسپورهای آنها در درمان اختصاصی سلول هدف استفاده می شوند که سبب انتقال مستقیم پیش داروها و سایر پروتئین ها به سمت تومورها می گردند. اگرچه درمان باکتریایی سرطان چشم اندازهای جدیدی در درمان این بیماری پدید آورده است، ولی استفاده از میکروارگانیسم ها برای هدف گیری تومورها محدودیت هایی نیز دارند. ایمنی زیستی، عدم پایداری ژنتیکی و میان کنش باکتری ها با داروهای درمانی از مسایلی است که نیازمند توجه بیشتری در استفاده از این روش در درمان سرطان بشمار می روند.





سرطان را می‌توان به صورت گروه پیچیده‌ی زیست‌پزشکی بیماری‌ها تعریف کرد که تا حدودی حاصل جهش‌های ژنی است که رشد و رفتار سلول را کنترل می‌کنند و تا حدودی به دلیل برهمکنش‌های تنش‌های سلولی و تغییرات ژنتیکی حاصل از عوامل محیطی اختصاصی است. هاناها و وینبرگ در سال ۲۰۰۰ در مقاله مروری مشهور خود با نام "نشانه‌های سرطان"^۱ پیشنهاد کردند که تومورهای انسانی شش ویژگی عمومی را نشان می‌دهند: خودمختاری در سیگنال‌های رشدی، ممانعت از مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپتوز)^۲، عدم حساسیت به پیام‌های ممانعت از رشد، پتانسیل رشد نامحدود، تشکیل رگ خونی پایدار (آنژیوژنز)^۳ و هجوم بافتی و انتشار به سایر نواحی (متاستاز)^۴. مواردی هم به این ویژگی‌ها اضافه شده است مانند غیرطبیعی بودن کروموزوم، مسیرهای متابولیکی غیرطبیعی، و حمله به سیستم ایمنی و التهاب (۴). بیشتر انواع سلول‌های سرطانی در نهایت رشد بیش از حد دارند تا یک برآمدگی یا توده به نام تومور^۵ را تشکیل می‌دهند و نام‌گذاری در انواع سرطان بر اساس منشأ تومور از بخش‌های مختلف بدن می‌باشد. سرطان یکی از بیماری‌های هولناک قرن است که میلیون‌ها نفر را در سراسر دنیا به کام مرگ کشانده است. در حال حاضر علت حدود ۱۲

-
1. The Hallmarks of Cancer
 2. Apoptosis
 3. Angiogenesis
 4. Metastasis
 5. Tumor



درصد از مرگ و میرهای سراسر دنیا، به دلیل ابتلا به سرطان است. پیش‌بینی شده است تا سال ۲۰۳۰، تعداد ۲۶ میلیون مورد سرطان جدید و ۱۷ میلیون مرگ و میر در سال در اثر سرطان خواهیم داشت که بر اساس مراحل و منشأ سرطان، مدیریت بیماری متفاوت است. درمان‌های سنتی مانند: شیمی‌درمانی^۱، جراحی، درمان هدفمند^۲، ایمنی‌درمانی^۳، هورمون درمانی^۴، و پرتودرمانی^۵ اثبات کرده‌اند که با وجود اثرات جانبی دارویی، مفید هستند. ولی، تومورهای مقاوم نشان داده‌اند که اندام‌ها را در بیماران سرطانی دگرگون نموده و روش‌های درمان سنتی را بی‌اثر می‌نمایند. بنابراین، درمان‌های جدید لازم هستند که همراه با درمان‌های سنتی یا به تنهایی به کار می‌روند تا درمانی برای بیماری سرطان باشند.

۱. Chemotherapy

۲. Targeted Therapy

۳. Immunotherapy

۴. Hormonal Therapy

۵. Radiotherapy



تاریخچه استفاده از باکتری‌ها در سرطان

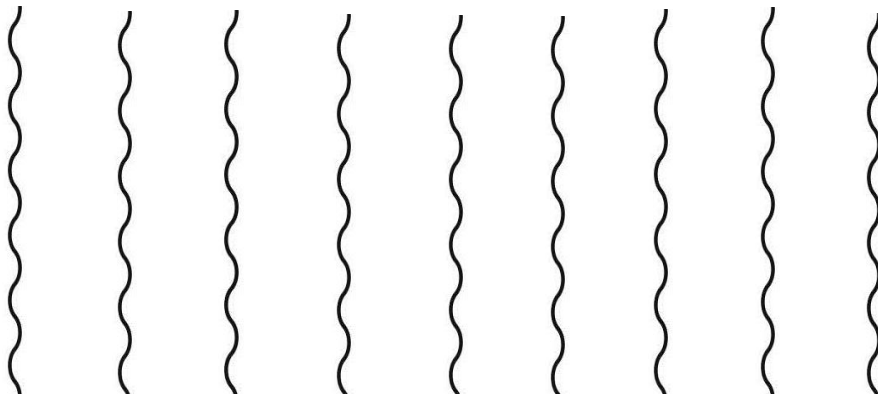
فیزیکدانان آلمانی، بوش و فلهیسن، حدود ۱۵۰ سال پیش از باکتری‌ها به عنوان عامل ضد سرطان استفاده کرده‌اند. آن‌ها مشاهده کردند که آلودگی‌های پوستی تصادفی (اریزیپلاز)^۱ که توسط *Streptococcus pyogenes* ایجاد می‌شود، قادر است سبب بازگشت تومور در بیماران سرطانی گردد. بیست سال بعد، فیزیکدان آمریکایی، ویلیام کولی، اشاره کرد که بیماران دارای سرطان گردن به دلیل آلودگی اریزیپلاز بهبود یافتند. او آزمایشاتی را انجام داد و سپس این مورد را تأیید کرد که چند بیمار سرطانی در مرحله آخر درمان، بازگشت تومور را بعد از آلودگی با باکتری‌های کشته شده *S. pyogenes* و *Serratia marcescens* نشان دادند. موفقیت اولیه سم‌های کولی^۲ مسیر کنونی را برای پیشرفت‌های درمان باکتریایی در سرطان هموار کرد.

در سال ۱۹۳۵، کونل بازگشت تومور را در سرطان متاستاتیک، با استفاده از آنزیم‌هایی استریل باکتری *Clostridium histolyticum* مشاهده نمود. البته، این رشته از تحقیقات به علت افزایش مرگ و میر در اثر آلودگی باکتریایی همانند سایر موانع موجود، راکد مانده است. در طی چند دهه گذشته انقلابی جهت استفاده از موجودات باکتریایی میکروسکوپی توسط مورالز، ایدینگر و بروس صورت پذیرفت. این گروه، درمان‌های مفیدی از سرطان مثانه^۳ را با استفاده از باکتری باسیلوس (BCG) Calmette–Guérin گزارش کرده‌اند (۸).

۱. Erysipelas

۲. Coley Toxins

۳. Bladder Cancer



باکتری‌های هدف‌گیرنده تومور

ژنوم‌های باکتریایی بسیار ساده هستند. این ژنوم‌ها را می‌توان به آسانی دستورزی و تکثیر نمود. زیست‌شناسی نو ترکیبی به این علت موفق است که تکثیر ساده باکتری و هزینه نگهداری کمی دارد. باکتری‌های بی‌هوازی^۱ را می‌توان به سادگی در شرایط بدون اکسیژن همراه با تومورها کشت نمود. محیطی با افزایش رگ‌دار شدن به همراه محصولات فرعی متابولیکی و التهاب مرتبط با رشد تومورها وجود دارد، و موجودات بی‌هوازی می‌توانند به آسانی در هر شرایطی بقا یافته و بنابراین به آسانی تومور را تخریب می‌کنند. امروزه با استفاده از رویکردهای نوین در زیست‌شناسی سنتزی می‌توان اختصاصیت و راندمان هدف‌گیری تومور را با سمیت کمتر افزایش داد. طی قرن گذشته تعداد بسیاری از جنس‌های باکتریایی مانند، *Salmonella*، *Proteus*، *Listeria*، *Caulobacter*، *Bifidobacterium*، *Clostridium*، *Escherichia* و *Streptococcus* جهت بررسی ویژگی‌های ضدسرطانی بررسی شده‌اند. بعضی از باکتری‌ها به صورت طبیعی با توانایی ارثی تومور را هدف‌گیری نموده و کلون می‌کنند. باکتری‌های بی‌هوازی گرم مثبت^۲ مانند *Clostridia* و *Bifidobacteria* می‌توانند نواحی با اکسیژن اندک را درون نواحی نکروزی و یا هیپوکسی (اکسیژن کم) تومورها کلونیزه کنند، در حالی که باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری گرم منفی^۳ مانند *Salmonella* که می‌تواند همانند رشد در بیرون تومور به درون تومور نیز هجوم برده و رشد کند.

مطالعات تجربی اولیه با گونه‌های بیماری‌زای کلستری‌دیوم بی‌هوازی، تکثیر ترجیحی را درون تومور در طول سمیت شدید و مرگ حیوانات، نشان داده است. این

۱. Anaerobic Bacteria

۲. Gram-Positive

۳. Gram-Negative



مطالعات منجر به تمرکز روی سویه‌های غیربیماری‌زای کلستریدیوم شد که موفقیت کمتری در بازگشت تومور داشت.

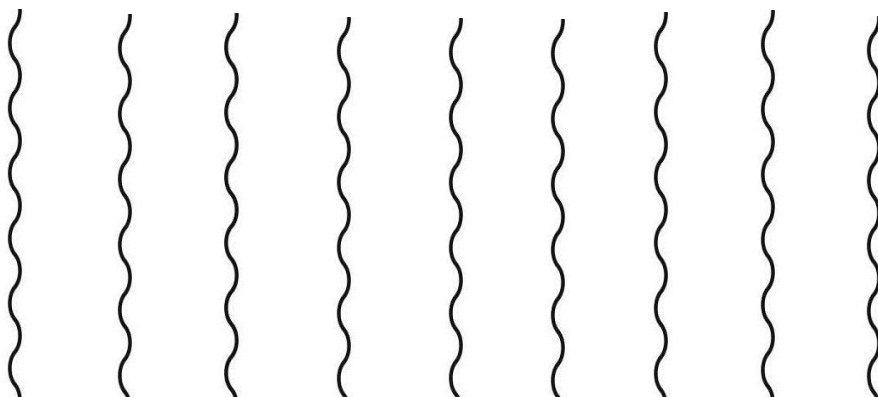
استفاده از باکتری *Clostridium novyi* موفقیت مهمی در کاهش تومور نشان داده است. *C. novyi-NT* پس از حذف ژن کدکننده سم کشنده، تعدیل شد و به صورت موفقیت‌آمیزی برای بازگشت تومور استفاده شد. مطالعه اخیر توسط رابرتز و همکاران (۲۰۱۴) نشان داده است که تزریق اسپور *C. novyi* درون تومور سگ‌ها باعث کاهش یا ناپدید شدن تومورها شد. همچنین مطالعه در سطح آزمایشات کلینیکی نیز صورت پذیرفت که با تجزیه تومور همراه بود.

فراهم و همکاران در سال ۲۰۱۵، سالمونلا را به عنوان بخشی از درمان سرطان از لحاظ ژنتیکی دستورزی نمودند. آن‌ها ساختار لیپوساکارییدی (LPS)^۱ باکتری را که باعث عفونت می‌شد تغییر دادند و باکتری با ضرر کمتری تولید کردند. ورود پروموتور آرایینوز در باکتری باعث کلونیزه کردن مؤثر باکتری در تومورها شد. این گذار سالمونلا باعث شد که بتواند هر ساعت درون تومور رشد کرده و قادر به کشتن سلول سرطانی در موش گردد.

در سال ۲۰۱۰، فوربس مدلی از باکتری هوشمند ارائه کرد که می‌توانست به صورت اختصاصی تومورها را مورد هدف قرار دهد، خودکار شود، مولکول‌های سمی سلول را تولید کند و به سمت مواد جذب‌کننده شیمیایی رانده شود (۱). با تنظیم دقیق فاژهای باکتریایی، فوربس مفهوم باکتری بی‌عیب^۲ یا کارخانه رباتیک برای درمان سرطان را بکار برد.

۱. Lipopolysaccharide Structure (LPS)

۲. Perfect Bacteria



بیان عوامل ضدسرطانی

ژنوم‌های ساده باکتری‌ها را می‌توان به صورت ژنتیکی، دست‌ورزی نمود تا عوامل ضدسرطان^۱ را بیان نمایند تا راندمان را افزایش دهیم.

ناقلین باکتریایی این توانایی را نشان می‌دهند که عوامل ضدسرطان را به صورت دارو، DNA، microRNA، shRNA، siRNA درمانی، عوامل سمیت سلولی، عوامل ضدآنژیوژنز، و آنزیم‌های اختصاصی که پیش‌دارو را به داروهای ضدسرطان تبدیل می‌کنند، حمل، ایجاد و انتقال دهند. باکتری‌ها، ماشین ژنتیکی مکمل خودش را دارد و بنابراین، قادر به ایجاد و انتقال ماکرومولکول‌ها در اهداف اختصاصی است. این پدیده با بیان مستقیم پروتئین‌های ضد تومور، و آلوده شدن سلول‌های سرطانی با ناقلین بیان یوکاریوتی، مواجه شده است.

به بیان ساده، درمان سرطان به روش بیان عوامل ضدسرطانی را می‌توان اینگونه تعریف نمود که، این روش بیان پروتئین‌های کشنده تومور، بیان عوامل سمیت سلولی، بیان عوامل ضد آنژیوژنز و بیان آنزیم‌هایی است که تبدیل پیش‌داروی غیرعملکردی را به داروی ضدسرطان فعال شده، کاتالیز می‌کند. در این روش سایر مکانیزم‌ها شامل: انتقال ناقلین بیانی یوکاریوتی به سلول‌های سرطانی، بیان siRNA جهت خاموشی ژن، سایتوکین‌ها^۲ و آنتی‌ژن تومور که می‌توان هدف‌گیری سیستم‌ایمنی را تحمیل کند نیز بررسی شده‌اند. رویکردهای جدید برای بیان چند عامل ضدتومور به علت توسعه زیست‌شناسی سامانه‌ای^۳ و پیشرفت‌های اخیر در متاژنومیکس^۴ در حال افزایش است (جدول ۱).

۱. Anticancerous

۲. Cytokines

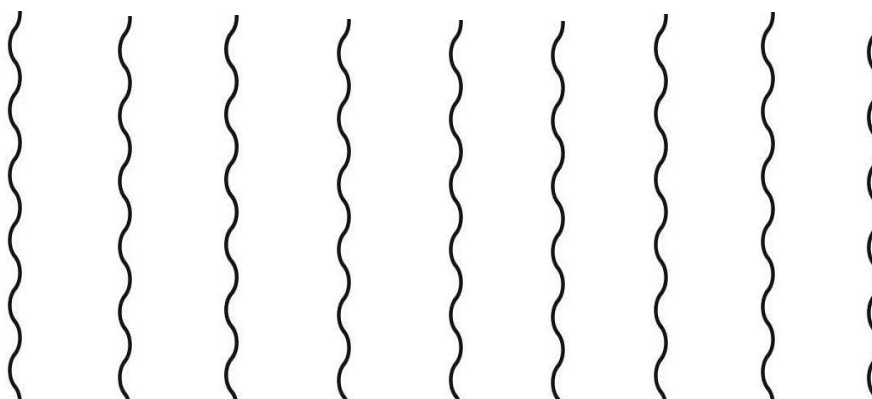
۳. System Biology

۴. Metagenomics



جدول ۱- روش‌های باکتریایی جهت درمان سرطان

جنس باکتری	روش‌ها	
Salmonella, Escherichia, Clostridium, Bifidobacterium, Caulobacter, Listeria, Proteus, Streptococcus	عامل کشنده تومور	زنده، ضعف، دست‌ورزی شده
Lactococcus, Streptococcus, Bifidobacterium, Escherichia, Salmonella, Clostridia	استفاده از باکتری‌های نو ترکیب جهت بیان عوامل ضد سرطانی	سیتوتوکسیک: FASL, TRAIL, $\text{tNF}\alpha$, A سیتولیزین IL-10, IL-12, IL-2 سیتوکینین: عوامل ضد آنژیوژنیک: آنزیم‌های پیش دارویی اندو استاستین تبدیل‌ها: ویروس هرپس سیمپلکس - (با HSV-TK تیمیدین کیناز) (سیتوزین دامیناز GCV گانسیکلوویر) با (باکتری ایکولای CD) (سیتوکروم ۵FC-فلوروسیتوزین) ۵- با سیکلوفسفامید / ایفوسفامید P450 و (نیتروردوکتاز با CPA / IFA) CB1954 siRNA خاموش کردن ژن:
Clostridium, Escherichia	درمان انکولیتیک باکتریایی	اسپورهای باکتریایی
Salmonella, Bifidobacterium, Escherichia	استفاده از باکتری‌ها به عنوان عوامل ایمنی‌درمانی	DNA بیان واکسن‌های آنتی‌ژن
Campylobacter, Helicobacter, Pseudomonas, Staphylococcus, Bordetella	استفاده از سموم باکتریایی	سموم پروتئینی سبب مهار فرایندهای سلولی می‌شود



باکتری‌های نو ترکیب

روش‌های مهندسی ژنتیک جهت ورود ناقلین پلاسمیدی بکار گرفته می‌شود که به صورت پروتئین‌هایی به شکل آنتی‌ژن، آنتی‌بادی، سیتوکین و آنزیم‌ها کد شده‌اند. میزان بیان ژن‌های مختلف را می‌تواند با ورود پروموتورهایی به بعضی باکتری‌های زنده تغییر داد. این باکتری‌های غیربیماریزا، با نام باکتری GRAS (در حالت عمومی ایمن هستند)^۱ نام‌گذاری شده‌اند. از باکتری‌های پروبیوتیک *Lactococcus lactis* به طور وسیعی برای تولید پروتئین‌های مهندسی شده بکار گرفته می‌شود. در فاز I آزمایشات کلینیکی، از باکتری *L. lactis* برای انتقال اینترلوکین ۱۰ (IL-10)^۲ سیتوکین ضدالتهابی به موکوز روده به عنوان روش درمانی در بیمارانی که از بیماری روده ملتهب^۳ رنج می‌بردند، استفاده شد (۱۳). باکتری‌های همزیست مانند: *Streptococcus gordonii* توانایی دارند که سطوح موکوزی را در دهان، حلق و حفره واژن کلونیزه کنند. این باکتری مهندسی شد تا به عنوان ابزاری جهت تولید و انتقال پروتئین‌های فعال زیستی عمل کند.

باکتری‌ها به صورت مؤثری به عنوان وسیله حمل ناقلینی استفاده شده‌اند که می‌توانند RNA مداخله‌گر (RNAi)^۴ را برای درمان بیماری، بیان کنند. سویه‌های باکتری *Salmonella* نیز مهندسی شده‌اند تا siRNA پلاسمید را به تومورها انتقال دهند و رشد تومور را به صورت آزمایشگاهی^۵ کنترل کنند. سویه‌های نو ترکیب siRNA دارای قابلیت خاموشی ژن هدف می‌باشد و همچنین دارای چندین ژن مقاوم به دارو است که به عنوان ناقلین پیام، عمل می‌کنند. علاوه بر این، چندین سویه

۱. GRAS (Generally Regarded As Safe)

۲. Interleukin-10 (IL-10)

۳. Bowel Disease

۴. RNA interference (RNAi)

۵. In vivo



فعال کننده اختصاصی رونویسی siRNA نیز وجود دارند که از رشد تومور ممانعت می‌کنند. باکتری دیگری با نام، *Escherichia coli*، مهندسی شده است تا ناقلی با siRNA را حمل کند، و مدل موفقی (درون شیشه‌ای و آزمایشگاهی)^۱ از خاموشی ژن در سرطان روده بزرگ انسان^۲ بوده است.

همچنین گزارش شده است که بیان پلاسمید RNAi ترانس کینگدام^۳ سبب کد نمودن پروتئین‌هایی جهت حمله به درون سلول، لیستریولیسین^۴ برای فرار از اندوزوم و RNA با سنجاق سر کوتاه علیه ژن سرطانی کاتنین β_1 می‌شود.

در مدل‌های پیش‌کلینیکی، *Salmonella typhimurium* مهندسی شده است تا اینترلوکین-۲ (IL-2) را برای درمان تومورهای کبدی^۵ بیان کند. سیتوکین IL-2 شهرت فراوانی به عنوان سیتوکین منتقل شده باکتریایی دارد. مطالعات نشان داده است که کاربرد دهانی *Salmonella* که IL-2 را بیان می‌کند می‌تواند به صورت پیش‌دفاعی عمل کند و از تشکیل تومور ممانعت بعمل آورد. ولی موفقیت محدودی با این میکروب‌ها حاصل گشته است که به دلیل سمیت سیستمیک در آن‌ها می‌باشد.

VNP20009 مهندسی شد تا پروتئین‌های درمانی مانند $TNF-\alpha$ و بخش ۴ عامل تولیدکننده پلاکت را بیان کند. *S. typhimurium* (SL3261) یک باکتری جهش یافته است که با پروموتر سایتومگالوویروس (CMV)^۶ مهندسی شده است تا بیان ژن‌های کلون شده *hGM-CSF*، *mIL-12* و *mGM-CSF* را کنترل کند. در مدل‌های موش که کارسینومای (رشد بدخیم) لوئیس شش^۷ را حمل

۱. In vitro and In vivo

۲. Human Colon Cancer

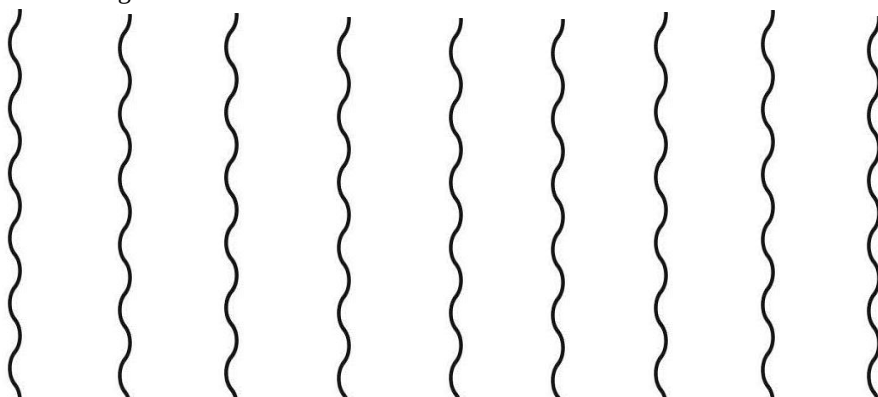
۳. Transkingdom RNAi Plasmid

۴. Listeriolysin O

۵. liver Tumors

۶. Cytomegalovirus (CMV)

۷. Lewis Lung Carcinomas



می‌کنند، ورود دهانی Salmonella که mGM-CSF یا mGM-CSF را به همراه mL-12 بیان می‌کنند بازگشت تومور را به صورت معنی‌داری نشان داد. Clostridium acetobutylicum مهندسی شد تا $TNF-\alpha$ را بیان کند و گزارش شده است که سلول‌های سرطانی را از طریق آپوپتوز در آدنوکارسینوما^۱ می‌کشد.

درمان پیش‌داروی آنزیم هدایت شده توسط باکتری

این روش اثرات جانبی درمان باکتریایی را شکست داده و از باکتری‌های بی‌هوازی استفاده نموده است، به این صورت که با استفاده از آنزیم‌های تغییریافته قادر است یک پیش‌داروی غیرسمی را به سمی برای تومورها تبدیل کند. در سیستم پیش‌داروی آنزیمی، باکتری می‌تواند در بخش‌های نکروزی و هیپوکسی تومور تکثیر شده، بنابراین، به صورت گسترده آنزیم فعال‌کننده دارو را در تومور بیان می‌کند. یک پیش‌داروی غیرسمی به صورت سیستمی ثبت می‌شود و می‌تواند به عنوان سوپسترای آنزیم خارجی عمل کرده و برای کشتن یک تومور تغییر شکل دهد. تعداد اندکی از سیستم آنزیم/پیش‌دارو در دسترس می‌باشد. بیشترین جفت‌های مورد مطالعه ویروس هرپس سیمپلکس-تیمیدین کیناز (HSV-TK)^۲ با گانسیکلوویر (GCV)^۳، سیتوزین دامیناز E. coli (CD) با ۵-فلوروسیتوزین (5-FC)، سیتوکروم P450 با سیکلوفسفامید/ایفوسفامید (CPA/IFA)^۴، و نیتروردوکتاز با CB1954 هستند (۵). سیستم CD-5FC از روش‌های درمانی پیش‌دارو آنزیم هدایت شده ژن است. این آنزیم دامیناسیون سیتوزین را به یوراسیل کاتالیز می‌کند و به عنوان عضوی از مسیر بازبایی نوکلئوتید پیریمیدین مطالعه شده است. سیستم 5-FC فقط بر روی یک

۱. Adenocarcinomas

۲. Herpes Simplex Virus -Thymidine Kinase (HSV-TK)

۳. Ganciclovir (GCV)

۴. Cyclophosphamide/Ifosfamide (CPA/IFA)



پیش‌دارو تمرکز کرده است. استفاده گسترده از 5-FU^۱ در شیمی‌درمانی اثرات جانبی متنوعی را به علت دوز بالا نشان داده است.

دآمیناسیون سیتوزین (CD)، 5-FC را به 5-FU تبدیل می‌کند و سمیت فقط به سلول تومور هدایت می‌شود. 5-FU حاصل، نهایتاً توسط آنزیم‌های سلولی به آنتی‌متابولیت پیریمیدین تبدیل شده و مرگ سلول سرطانی را آغاز می‌کند. درمان CD/5-FC در انواعی از مدل‌های حیوانی آزمایشگاهی سرطان مطالعه شده است. نشان داده شده است که سلول‌های کارسینومای سینه MDA-MB-231 که با E. coli CD آلوده شده‌اند ۱۰۰۰ برابر نسبت به 5-FC در مقایسه با شاهد حساس‌تر هستند. CD می‌تواند به صورت مؤثری کلون شده و در Clostridium بیان شود، و با رگ‌دار شدن که بر عملگرها (کامبرتاستاتین A-4 فسفات)^۲ تمرکز دارد، بهبود یابد. این بهبود ممکن است به خاطر توسعه بیان در دامنه نکروزی داخل تومورها باشد.

آزمایشات کلینیکی مختلف، با استفاده از سیستم CD/5-FC موفقیت محدودی داشته است. یک آزمایش کلینیکی فاز I که برای بیماران دارای سرطان سینه^۳ برقرار شد میزان قابل توجهی از سطوح ایمنی بوسیله بیان ژن خودکشی erB-2 با استفاده از پروموتر erbB-2 اختصاصی تومور را نشان داد. هم‌اکنون، سه آزمایش کلینیکی در حال انجام وجود دارد. یکی برای درمان گلیوما درجه بالا^۴ (تومور اولیه سیستم عصبی مرکزی) (NCT01172964) است، درحالی‌که دوتای دیگر برای تومورهای جامد^۵ (NCT01562626) و برای تومور مغزی بدخیم^۶ (NCT01470794) است (۱۴).

۱. 5-Fluorouracil (5-FU)

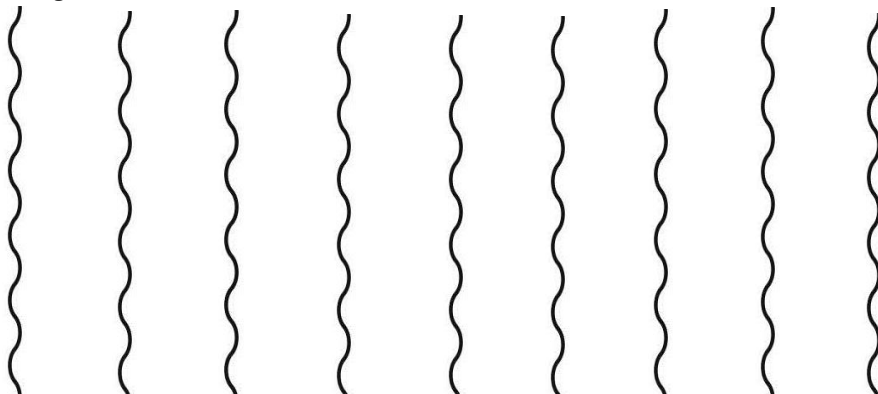
۲. Combretastatin A-4 Phosphate

۳. Breast Cancer

۴. High-Grade Glioma

۵. Solid Tumors

۶. Malignant Brain Tumor



نیترورداکتازها (NR)^۱ گروه‌های نیتروژن دار آروماتیک را به هیدروکسیل آمین‌ها تغییر می‌دهد که این کار با تولید تغییر الکترونیکی صورت می‌گیرد که باعث سمیت سلولی می‌شود. مواردی از فلاوین مونو نوکلئوتید نیتروردوکتاز حساس به اکسی‌جنین^۲ نیز در باکتری *E. coli* یافت شده است. موفق‌ترین پیش‌دارویی که برای درمان در ارتباط با نیتروردوکتاز استفاده شده است ۵-آزیریدینیل-۲ و ۴-دی نیتروبنزامید^۳ است (CB 1954 یا پرولاریکس^۴)، که از انواع خانواده دی‌نیتروبنزامید پیش‌داروها است. متابولیت‌های CB1954 عناصر آلکیل‌کننده قوی هستند که سبب کشتن سلول‌های تومور در حال تقسیم می‌شوند. راندمان سیستم NR-CB1954 در تعداد کمی از آزمایشات کلینیکی جهت درمان سرطان‌های کبد و پروستات^۵ مطرح شده است.

اخیرا آزمایشات کلینیکی با استفاده از ناقل *Salmonella* در بیماران صورت گرفته است که سبب افزایش بیان NR و CD شده است. باکتری *S. typhimurium* که ناقل VNP20009 را حمل می‌کند در *E. coli* CD برای TAPET (درمان بیان پروتئین تکثیر یافته تومور)^۶ مهندسی شده است.

اگرچه ایمنی بالینی در باکتری *S. typhimurium* وجود دارد اما اثر کمی روی بازگشت سرطان در آزمایشات انسانی مشاهده شده است. اما هنوز امیدهایی برای بهینه شدن درمان در روش‌های ژنتیکی برای گونه‌های مختلف وجود دارد (۶).

۱. Nitroreductases (NR)

۲. Oxygeninsensitive Flavin-Mononucleotide Nitroreductase

۳. 5-Aziridinyl-2,4-Dinitrobenzamide

۴. Prolarix

۵. Liver and Prostate Cancers

۶. Tumor Amplified Protein Expression Therapy



درمان انکولیتیک باکتریایی

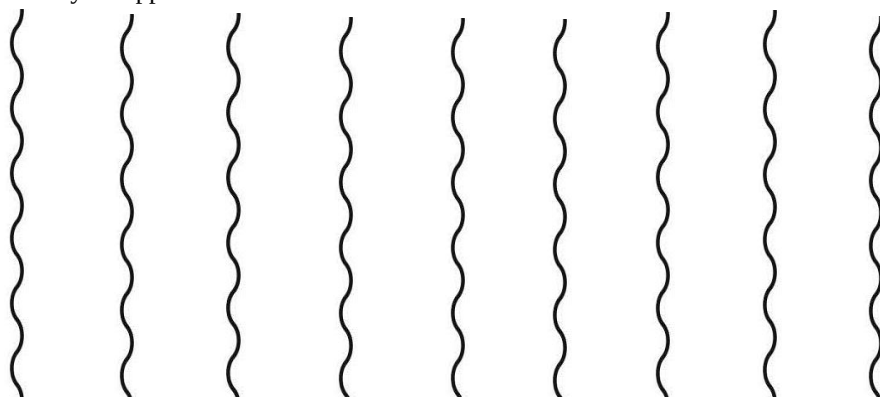
در روش انکولیتیک^۱ برای درمان سرطان از باکتری‌های مستعد با قابلیت همانندسازی در بافت‌های تومور استفاده می‌شود. باکتری می‌تواند تکثیر شده و تومور را از بین ببرد. آزمایشات درمانی که در آن‌ها از اسپورهای باکتری *Clostridium* استفاده می‌شود به میزان فعالیت انکولیتیک باکتری بستگی دارد. ورود اسپورهای کلستریدیوم از طریق مسیر سیاهرگی اثرات انکولیتیک را در مطالعات پیش کلینیکی و کلینیکی تولید می‌کنند. لیز شدن مشخص با اسپورهای *C. histolyticum* و با اسپورهای *Clostridium sporogenes* مشاهده شد.

استفاده از اسپور باکتری‌های بی‌هوازی مزایای بیشتری در درمان باکتریایی سرطان دارد زیرا این اسپورها می‌توانند در شرایط هیپوکسی و نکروز تومور به صورت زیست‌باقی بمانند و نهایتاً در تومور تکثیر شوند. پس از لیز نمودن تومور، این باکتری‌ها نمی‌توانند در محیط غنی از اکسیژن باقی بمانند بنابراین، برای درمان تومور با سمیت کمتر و تخریب کامل سلول‌های تومور به عنوان یک ابزار بسیار موفق می‌تواند بکار گرفته شود.

در مهندسی ژنتیک گونه‌های *Clostridium* باید غربالگری‌های متعددی صورت پذیرد تا کلونیزه شدن تومور را افزایش دهیم. چندین سویه مختلف مانند *Clostridium oncolyticum*، *Clostridium beijerinckii*، *(Acetobutylicum) Clostridium*، *Clostridium tetani*، *C. oncolyticum* (Sporogenes) و *C. novyi-NT* برای درمان تومور استفاده شده‌اند.

از اسپورهای باکتریایی به عنوان عوامل انتقال‌دهنده پپتیدهای سمیت سلولی، عوامل ضد سرطانی و پروتئین‌های درمانی مانند ناقلین ژن درمانی استفاده شده

۱. Oncolytic Approach



است. نشان داده شده است که سویه S. typhimurium A1 می‌تواند به آسانی در سلول‌های سرطان پروستات رشد کنند و سلول‌های سرطان را با تخریب هسته‌ای و مرگ سلولی نابود نماید. بنابراین، قابلیت تکثیر و در نهایت کلونیزه شدن با حداقل سمیت را ایجاد می‌نماید.

سموم باکتریایی

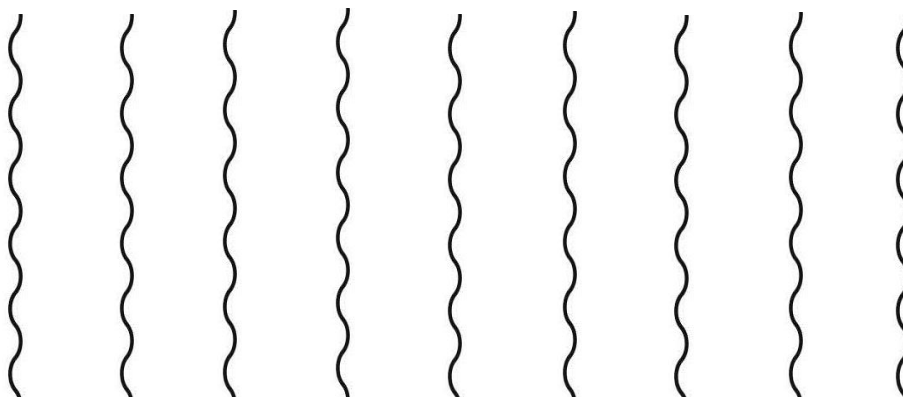
استفاده سموم جهت درمان سرطان از زمان بسیار قدیم کاربرد داشته است. سموم باکتریایی از سنتز پروتئین توسط ریبوزیلاسیون ADP الانگیشن فاکتور ۲^۱ جلوگیری می‌کنند. سموم باکتریایی اثرات بیشتری بر روی فرایندهای سلولی کنترل کننده رشد، تکثیر، آپوپتوز و تمایز دارند. سموم باکتریایی قادر به اتصال با آنتی‌ژن سطح سلول هستند، بنابراین پاسخ ایمنی را تولید می‌کنند (۱۰). سم دیفتیری (DT)^۲ به سطح سلول‌هایی می‌چسبند که عوامل رشد اپیدرمی متصل به هپارین^۳ مانند: پیش‌ساز عامل رشد (HB-EGF) را بیان می‌کنند و کمپلکس DT-HB-EGF را تشکیل می‌دهند. ورود DT-HB-EGF به سلول از طریق کلاترین وزیکول‌ها^۴ چندین تغییر پس از ترجمه را القا می‌کند که منجر به سم فعال کاتالیزی می‌شود که DT بخش A نام دارد. DT بخش A می‌تواند EF-2 را ریبوزیلاته کند که منجر به توقف سنتز پروتئین به همراه تجزیه سلول و یا القا آپوپتوز می‌شود. در حالت مشابه، سم خارجی Pseudomonas A (PE) هم از نظر کاتالیکی EF-2 را ریبوزیلاته می‌کند و بنابراین از سنتز پروتئین جلوگیری می‌کند. در مطالعات بر روی موش‌ها مشاهده شده است که تزریق داخل سیاهرگی ۰/۳ میکروگرم از این سم، سمیت سلولی کشنده

۱. ADP Ribosylation of Elongation Factor 2 (EF-2)

۲. Diphtheria Toxin (DT)

۳. Heparin-Binding Epidermal Growth Factors

۴. Clathrinvesicles





دارد، بنابراین آن را به عنوان یک حریف بالقوه برای درمان هدفمند سرطان می‌شناسند.

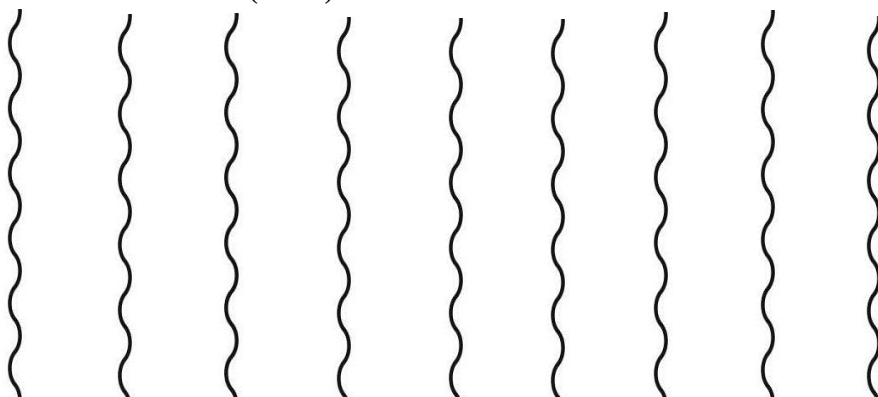
انترتوکسین *Clostridium perfringens* (CPE)^۱ که توسط سویه *C. perfringens* نوع A تولید می‌شود باعث پدید آمدن التهاب در معده و روده می‌شود که علت آن دامین انتهای C است که سمیت سلولی را حاصل می‌کند. بیان شده است که اندوتوکسین خالص شده می‌تواند سلول‌های تومور روده، سینه، گوارش و پانکراس را از بین ببرد. همچنین سموم حاصل از بیماری وبا^۲ نیز نشان داده‌اند که قابلیت ایجاد سمیت سلولی دارند. همچنین بعضی از سموم باکتریایی (توکسین‌های آلفا از *Staphylococcus aureus*، سم AC از *Bordetella pertussis* و سموم شبه شیگا) در لاین‌های سلولی سرطان مورد بررسی قرار گرفته‌اند. این سموم سبب افزایش سمیت سلولی شده و آپوپتوز را القا نموده‌اند. گزارش شده است که نوروپروتوکسین^۳ (سم عصبی) بوتولینوم (BoNT) توانایی باز کردن رگ‌های تومور را دارد. این سم را می‌توان برای افزایش اثرات پرتودرمانی و شیمی‌درمانی روی سلول‌های سرطانی استفاده نمود. اثر BoNT بر تومور فعالیت غیرمستقیم برای اثر سمیت سلولی را نشان می‌دهد.

سموم باکتریایی ممکن است برای اتصال با لیگاندها ایده‌آل باشند زیرا در باکتری به صورت زنجیرهای تکی با دامین‌های اتصال بیانی می‌شوند که برای یک لیگاند در تومور قابل تبدیل هستند. این رویکرد را می‌توان با حذف اتصال به گیرنده توکسین با اتصال با پروتئین‌های متصل به سلول (آنتی بادی‌های مونوکلونال یا عوامل رشد) حذف کرد که به صورت انتخابی سلول‌های سرطان را می‌کشند. طیف وسیعی از

۱. *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE)

۲. Cholera Toxins

۳. *Botulinum* Neurotoxin (BoNT)



لیگاندها مانند: IL-3، IL-4، G-CSF، ترانسفرین^۱، EGF و عامل رشد اندوتلیال رگ (VEGF)^۲ به DT متصل می‌شوند تا اثراتشان بر روی تومور مطالعه گردند. در مطالعات بالینی ترکیباتی مانند: ترانسفرین - DT (Tf-CRM) و DT-EGF به ترتیب در بیماران مبتلا به تومور مغزی و کارسینوماهای متاستاز وجود داشته‌اند. در حالت مشابه، چندین آنتی‌بادی و لیگاند هم به PE متصل شده‌اند. همچنین اتصال IL-4، IL-13، آنتی‌بادی مونوکلونال شناسایی‌کننده آنتی‌کربوهیدرات لوئیس Y (Mab B3) و عامل رشد تبدیل‌شونده (TGF- α) به PE در چند آزمایش کلینیکی مطالعه شده‌اند.

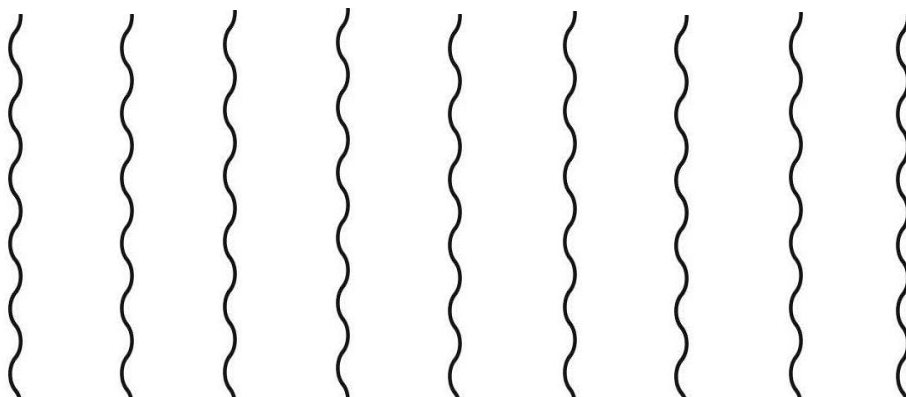
باکتری‌ها به عنوان عوامل ایمنی‌درمانی

سیستم ایمنی، به عنوان سامانه دفاع از زندگی موجودات بشمار می‌رود. ایمنی‌درمانی یک رویکرد مؤثر و نوظهور برای درمان سرطان است. ایمونولوژی بر پایه نابودی سلول‌های تومور با حمله مستقیم یا غیرمستقیم سلول‌های ایمنی افکتور، سلول‌های B با تولید آنتی‌بادی، سلول‌های T، سلول‌های کشنده طبیعی و سلول دندرون^۳ تمرکز دارد. بافت‌های بدخیم دارای مکانیسمی برای حمله به سیستم ایمنی می‌باشند. برای حمله به سیستم ایمنی، سلول‌های تومور می‌توانند سیتوکین‌های مختلفی را ترشح کنند که به سیستم ایمنی حمله کند. از باکتری‌ها می‌تواند برای تولید سیتوکین‌های افزایش‌دهنده ایمنی استفاده کرد تا لیمفوسیت‌ها را جلب کنند (۷). بیان شده است که *S. typhimurium* ضعیف شده می‌تواند سلول‌های سرطانی را در چند آزمایش روی موش‌ها که پاسخ ایمنی را شروع می‌کنند، آلوده کنند. کاهش معنی‌داری در ظهور تومور به دلیل بیان مولکول‌های محرک ایمنی IL-18 و لیگاند Fas وجود

۱. Transferrin

۲. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

۳. Dendritic Cells





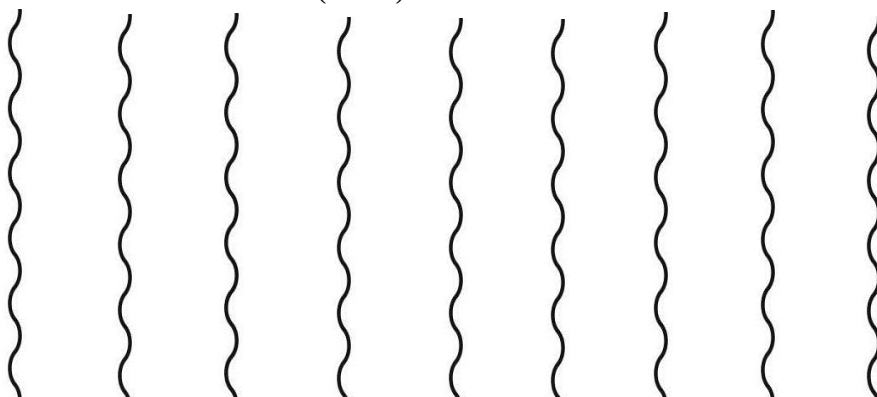
داشت. همچنین گزارش شده است که موجودات *Salmonella* کدکننده IL-2 سرکوب بهتری از تومورها را نسبت به انواع وحشی نشان داده‌اند. مطالعات پیش‌کلینیکی با *Bifidobacteria* که عامل محرک کلونی گرانولوسیت (GCSF)^۱ را بیان می‌کند منجر به اثرات ضد تومور بزرگتری شد. پاسخ ایمنی منجر به کشتن سلول‌های تومور می‌شود.

رویکرد دیگر، استفاده از واکسن DNA است که کمک می‌کند تا سیستم ایمنی را برای آنتی‌ژن اختصاصی که توسط سلول‌های تومور بیان می‌شود را درک کند. واکسن‌های DNA راندمان مهمی در آزمایشات پیش‌کلینیکی و کلینیکی نشان داده‌اند. DNA آنتی‌ژن تومور به باکتری‌هایی مانند *Salmonella* و *Listeria* وارد می‌شوند که به صورت اختصاصی بیان شده و سلول‌های ایمنی را مورد هدف قرار می‌دهند، بنابراین ایمنی را در مدل‌های حیوانی نشان می‌دهند. رویکردهای واکسیناسیون پاسخ لازم را با ایجاد افزایش واکنش ایمنی برای تومور تحریک می‌کنند. باکتری‌هایی که پاسخ ایمنی توسط آن‌ها افزایش می‌یابد کاندید ایده‌آل برای انتقال واکسن DNA هستند.

گزارش شده است که باکتری *S. typhimurium* ضعیف شده که با ژن DNA نشانگر ۸ اندوتلیال تومور انسان (TEM8)^۲ وارد می‌شود پاسخ سلول T-سمیت سلولی CD8 را در مدل‌های حیوانی ایجاد می‌کند. *Salmonella* توسط مونوسیت‌ها در روده برای تجزیه و رهاسازی ناقل جذب می‌شوند که واکنش ایمنی را شروع می‌کنند. یک سویه نو ترکیب از *S. typhimurium* که ژن کدکننده LIGHT را بیان می‌کند، گزارش شده است که از رشد تومور اولیه در مدل‌های موش با سمیت کمتر ممانعت می‌کند (۱۱).

۱. Granulocyte Colony-Stimulating Factor (GCSF)

۲. Tumor Endothelial Marker 8 (TEM8)



ورود سیستمیک اسپورهای C. novyi-NT سبب القای التهاب و افزایش تعداد گلبول قرمز خون به همراه بیان چند سیتوکین مانند IL-6، IL-2 و GS-CSF می‌شود. این سیتوکین‌ها می‌توانند بعداً نوتروفیل‌ها را جذب کنند. التهاب به تولید رادیکال‌های آزاد (ROS)^۱ منجر می‌شود، بنابراین تنش اکسیداتیو و کشتن تومورها رخ می‌دهد. سویه‌های زنده و ضعیف شده *Listeria* برای بیان طیف وسیعی از آنتی‌ژن‌های تومور استفاده شده‌اند. بیان‌های انکوژن‌ها مانند Her-2/neu، آنتی‌ژن مرتبط با ملانوما^۲، و PSA، در افزایش پاسخ ایمنی کمک کرده است. یک سویه واکسن *Listeria monocytogenes* (Lm-NP) با نوکلئوپروتئین (NP) از سویه A/PR8/34 آنفولانزا بازگشت تومور را نشان داده است. *L. monocytogenes* ضعیف شده که HPV16 E7 را بیان می‌کرد از طریق سیاهرگ به بیمارانی که از سرطان دهانه رحم^۳ متاستازی رنج می‌بردند در فاز I آزمایش کلینیکی، وارد شد. طی این پژوهش حدود ۳۰ درصد کاهش تومور به همراه بعضی علائم شبه‌سرماخوردگی و افزایش تب در بعضی از بیماران وجود داشت. این آزمایش موفق ایمنی و راندمان ناقلین لیستریا را در بیماران سرطانی نشان داد (۱۲). داستان موفق دیگر به *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG-CWS) گاوی مربوط می‌شود. اسکلت دیواره سلولی میکوباکتری برای افزایش سیستم‌ایمنی در بیماران سرطانی استفاده شده است. BCG/CWS همچنین برای اثر حساس شده پرتو روی سلول‌های سرطان روده از طریق القا مرگ سلولی اتوفازی شناخته شده است. نتایج برای مطالعات درون شیشه‌ای و آزمایشگاهی امیدبخش بود. بنابراین، (BCG-CWS) می‌تواند رویکرد درمانی برای افزایش پاسخ ایمنی با سمیت کمتر توسط باکتری غیربیماریزا باشد. BCG که موفق‌ترین عامل باکتریایی شناخته

۱. Reactive Oxygen Species (ROS)

۲. Melanoma

۳. Cervical Cancer

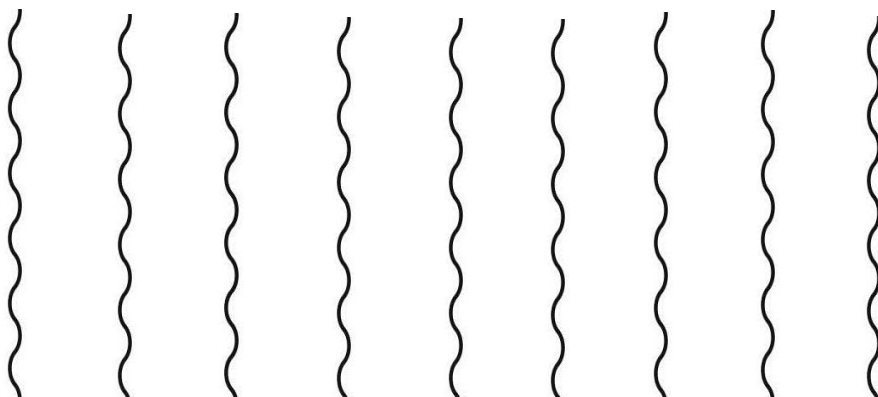


شده است، برای درمان سرطان سطحی مثانه^۱ استفاده می‌شود. گزارش شده است که سلول‌های تومور با ممانعت از تشکیل رگ خونی بریده شده از منبع تغذیه، کشته می‌شوند. انتقال ژن‌های آنتی‌آنژیوژنز شامل: اندوستاتین^۲ و ترومبوسپاندین^۳ می‌تواند به آسانی تومورها را از بین ببرد. انتقال اندوستاتین از *Salmonella* سبب کاهش چگالی مویرگ، کاهش بیان عامل رشد اندوتلیال رگی (VEGF) و کند شدن رشد تومور در موش‌های تحت آزمایش گردید. همچنین رویکردهای مشابهی برای کاهش رشد تومور با استفاده از ژن‌های کدکننده TRAIL، SMAC و FASL استفاده شده است.

باکتری‌ها در درمان ترکیبی

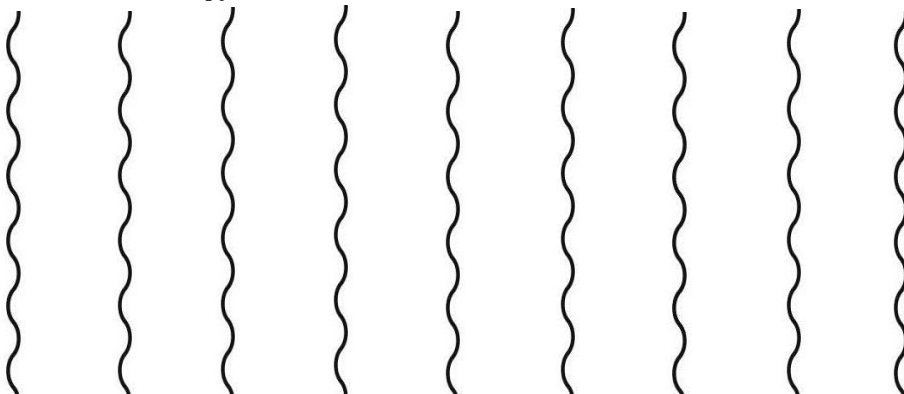
استفاده از باکتری یا باکتری‌های مهندسی شده اختصاصی به همراه درمان سنتی به عنوان درمان ترکیبی باکتریولیتیک (COBALT)^۴ شناخته می‌شود. عوامل شیمی‌درمانی سنتی مانند: دوستاکسل^۵، میتومایسین C^۶، وینرولبین^۷ و دولاستاتین-۱۰^۸ به همراه اسپورهای *C. novyi-NT* به کار رفته‌اند. خواص ضد تومور معنی‌داری به همراه واکنش‌های جانبی جدی نشان داده شده است. همچنین از باکتری *C. novyi* در ترکیب با سایر روش‌های سنتی مانند: پرتودرمانی و

-
۱. Superficial Bladder Cancer
 ۲. Endostatin
 ۳. Thrombospondin
 ۴. Combination Bacteriolytic Therapy (COBALT)
 ۵. Docetaxel
 ۶. Mitomycin C
 ۷. Vinorelbine
 ۸. Dolastatin-10



پرتوایمنی‌درمانی^۱ در مدل‌های تومور آزمایشی بررسی شده‌اند. این باکتری پتانسیل رویکردهای چند روشی ترکیبی را برای آینده درمان‌های سرطان دارد. امروزه این موضوع آشکار شده است که به دلیل ویژگی تخریب غشایی توسط باکتری C. novyi-NT رهاسازی داورهای کپسول شده لیپوزومی را درون تومور افزایش می‌دهد. این سویه همچنین در ترکیب با عوامل ضد میکروتوبول استفاده شده است، بنابراین نواحی رگ‌دار را کاهش و اثرات داروها را افزایش داده است.

۱. Radioimmunotherapy

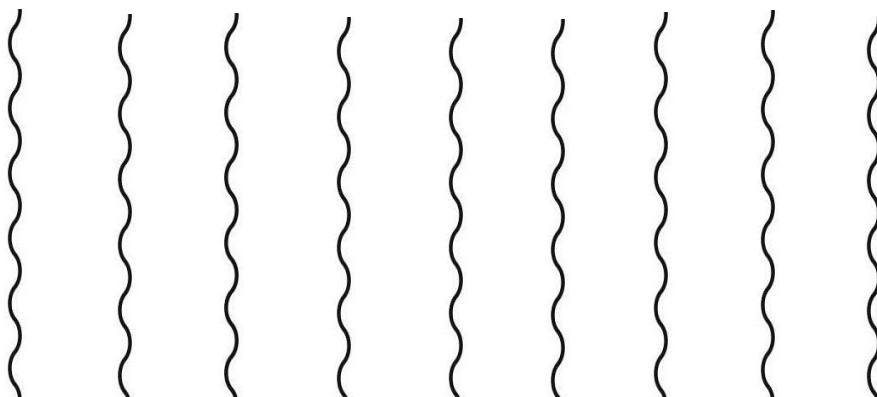




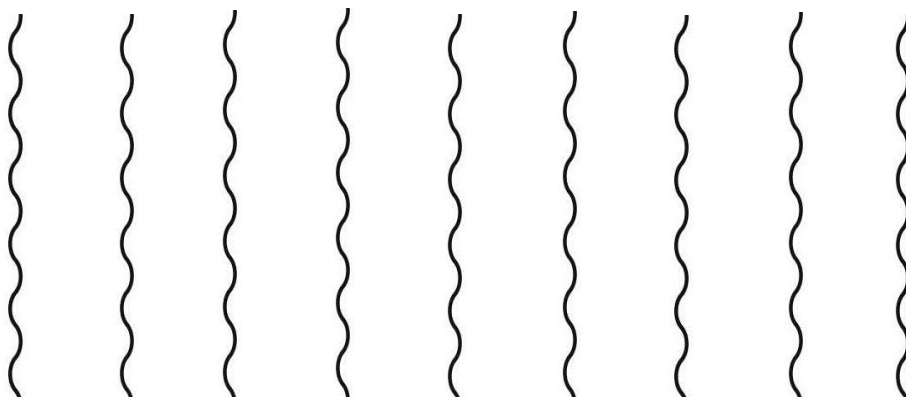
نتیجه‌گیری و چشم‌انداز آینده



باکتری درمانی امید بزرگتری در زمینه‌های متنوعی از درمان سرطان نشان داده است که به دلیل پتانسیل بازگشت کامل تومور و توانایی آن برای انتقال محصولات درمانی است. باکتری‌ها با روش‌های مختلفی جهت درمان انواع سرطان بررسی شده‌اند. باکتری‌های زنده یا ضعیف شده با ناقلین مختلف به عنوان رویکردهای بالقوه برای مدیریت سرطان ظهور یافته‌اند. میکروب‌های مهندسی ژنتیک شده سمیت کمتری برای سلول‌های طبیعی و راندمان بهتر برای درمان نشان داده‌اند. باکتری‌ها مهندسی شده‌اند تا پلاسمیدی را حمل کنند که ژن مورد نظر را دارد که به سمت تومورها هدایت می‌شود. این تغییرات سویه موتانت را تولید می‌کند که ظرفیت بیان عوامل ضد سرطان را دارد. *Salmonella* ضعیف شده با VNP20009 و TAPET-CD به صورت موفقیت‌آمیزی در فاز I آزمایشات کلینیکی در بیماران سرطانی بررسی شده‌اند. باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری نشان داده‌اند که تومورها را با مکانیزم‌های پیچیده کلونیزه می‌کنند و راندمان بیشتری را نشان می‌دهند. باکتری درمانی در ترکیب با درمان‌های سنتی راندمان بهتری برای درمان نشان داده‌اند همچنین کیفیت بهتری از

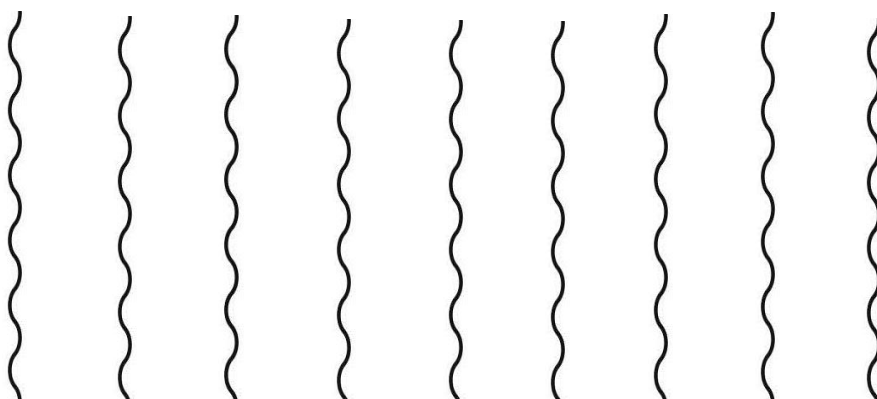


زندگی را برای بیمارانی که از انواع سرطان رنج می‌برند
فراهم می‌آورد.





1. Forbes NS (2010). Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 10:785-794.
2. Frahm M, Felgner S, Kocijancic D et al (2015). Efficiency of conditionally attenuated *Salmonella* enterica serovar Typhimurium in bacterium-mediated tumor therapy. *mBio*. 6(2): e00254-15.
3. Frankel AE, Rossi P, Kuzel TM et al (2001) Diphtheria fusion protein therapy of chemoresistant malignancies. *Curr Cancer Drug Targets*. 2: 19-36.
4. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144: 646-674.
5. Lehouritis P, Springer C, Tangney M (2013) Bacterial-directed enzyme prodrug therapy. *J Control Release*. 170: 120-131.
6. Liu S, Xu X, Zeng X et al (2014) Tumor-targeting bacterial therapy: a potential treatment for oral cancer. *Oncol Lett*. 8: 2359-2366.
7. Nelson MH, Diven MA, Huff LW et al (2015) Harnessing the microbiome to enhance cancer immunotherapy. *J Immunol Res*. doi:10.1155/2015/368736.
8. Patyar S, Joshi R, Byrav DS et al (2010) Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *J Biomed Sci*. 17: 21-29.
9. Roberts NJ, Zhang L, Janku F et al (2014) Intratumoral injection of *Clostridium novyi*-NT spores induces antitumor responses. *SciTransl Med*.
10. Rosadi F, Fiorentini C, Fabbri A (2016) Bacterial protein toxins in human cancers. *Pathog Dis*. doi:10.1093/femspd/ftv105.



11. Ruan Z, Yang Z, Wang Y (2009) DNA vaccine against tumor endothelial marker 8 inhibits tumor angiogenesis and growth. *J Immunother.* 32: 486-491.
12. Wood LM, Guirnalda PD, Seavey MM et al (2008) Cancer immunotherapy using *Listeria monocytogenes* and listerial virulence factors. *Immunol Res.* 42: 233-245.
13. Yoo JW, Irvine DJ, Discher DE et al (2011) Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. *Nat Rev Drug Discov.* 10: 521-535.
14. Zhang J, Kale V, Chen M (2015) Gene-directed enzyme prodrug therapy. *AAPS J.* 17: 102-110.

