UPPSALA
UNIVERSITET

Systemiska och cellulära begränsningar med *in vivo* RNAi behandling och utveckling av siRNA vektorer i terapeutiskt syfte

Akif Görgülü

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2016
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Systemiska och cellulära begränsningar med *in vivo* RNAi behandling och utveckling av siRNA vektorer i terapeutiskt syfte

Akif Görgülü

Självständigt arbete i biologi 2016

Sammandrag

RNA interferens (RNAi) är både en försvarsmekanism mot infektioner och ett självreglerande system för post-transkriptionellt genuttryck i eukaryoter. Dubbelsträngat RNA (dsRNA) i cytoplasman inducerar RNAi vilket leder till sekvensspecifik gentystnad: ett riboprotein-komplex binder till mRNA och antingen klyver eller inhiberar dess translation. Metoder utvecklas för att utnyttja detta i genterapi och använda det vid kliniska behandlingar. Det finns systemiska och cellulära barriärer som hindrar dess användning idag; serumnukleaser, immunförsvaret, filtration via njurarna och cellulärt upptag är vissa faktorer som hindrar små interfererande RNA (siRNA) från att effektivt levereras till målceller *in vivo*. Nanopartiklar, såsom nanogel och liposomer, utvecklas för att effektivt transportera siRNA till målceller i hopp om att i framtiden använda dessa vid genterapi. Forskning på dessa partiklar har mest fokuserat på *in vitro* studier eller *in vivo* intratumorala injektioner på möss. Men det är viktigt att även forska kring intravenösa injektioner för genterapeutiskt ändamål.

Inledning

RNA interferens (RNAi) är en cellulär reaktionsväg hos eukaryoter med två viktiga uppgifter: en försvarsmekanism gentemot främmande nukleinsyror, bland annat bakteriella och virala, samt ett självreglerande system för post-transkriptionellt genuttryck. Det fungerar på så sätt att en dubbelsträngad RNA (dsRNA) molekyl känns igen av intracellulära proteiner och inducerar RNAi. Detta leder till sekvensspecifik bindning till mRNA; budbäraren bryts antingen ned eller dess translation hämmas, i båda fallen leder det till tystat genuttryck. (Wilson & Doudna 2013)

Sedan RNAi:s egenskap att nedtysta genuttryck upptäcktes har intresset ökat för dess applicering i behandling av både genetiska och förvärvade sjukdomar, såsom cancer (Burnett *et al.* 2011) och virusinfektioner (Geisbert *et al.* 2010). Men för att RNAi skall ha en bra verkningsgrad behövs det tas fram en vektor som överkommer de hinder som bemöter leveransen av siRNA *in vivo*.

I det här litteraturarbetet beskriver jag rådande begränsningar med RNAi terapi. Det finns systemiska och cellulära barriärer hos däggdjur som hindrar leveransen av små interfererande RNA (siRNA) till målceller. Jag beskriver även två olika typer av vektorer, nanogel och liposomer, under utveckling för leverans av siRNA och den forskning som har gjorts i design av dessa för att överkomma begränsningarna. Ifall problemen med *in vivo* leverans kan överkommas med innovativ bioteknik kan RNAi utnyttjas för att behandla en bred grupp av sjukdomar, från cancer till virusinfektioner. Vilka vektorer och egenskaper som undersöks för optimal siRNA leverans samt den utveckling som sker inom detta forskningsområde är av intresse för framsteg inom genterapi.

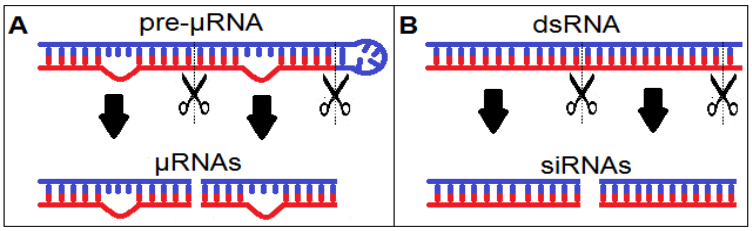
RNAi upptäcktes först i *Caenorhabditis elegans* som transfekterades med långa dsRNA (Fire *et al.* 1998) men dess tillämpning på däggdjur visade sig endast vara effektiv med korta dsRNA ≤ 30 baspar (Elbashir *et al.* 2001). Långa, nakna nukleinsyror kom att inducera en immunrespons hos däggdjur (Alexopoulou *et al.* 2001) och bröts ned av endonukleaser redan

i blodet (Hoerter & Walter 2007). På grund av detta kan RNAi reaktionsvägen inte utnyttjas inom kliniska försök i dagsläget. Först måste en vektor framtas för att skydda siRNA från att brytas ned och effektivt leverera den till målceller.

RNAi reaktionsvägen

RNAi reaktionsvägen fyller två funktioner i den eukaryota cellen: den reglerar genuttrycket av det egna genomet och försvarar gentemot exogent dsRNA, från till exempel viruspartiklar, med hjälp av mikro RNA (µRNA) respektive siRNA. Detta sker i samband med proteiner i ett riboproteinkomplex med RNA molekylen. Komplexet hämmar translationen av mRNA molekyler eller klyver dem beroende på om antisens si- eller µRNA:t har ofullständig respektive fullständig komplementaritet med mRNA:t. (Wilson & Doudna 2013)

De två arter av korta dsRNA (Figur 1) som är involverade i RNAi reaktionsvägen är på kring 22 baspar. Dessa är si- och µRNA. Det förstnämnda är produkter av längre exogena dsRNA som har kluvits i syfte att vara delaktiga i det cellulära immunförsvaret gentemot det främmande genetiska materialet. µRNA är istället syntetiserad från eget genom och har en genreglerande effekt. Det är fragment av enkelsträngade transkripter från exempelvis antisens DNA som vikt ihop sig och bildat hårnålar och sedan kluvits. Vare sig det är siRNA eller µRNA som inducerar RNAi har dem både samma effekt, vilket är sekvensspecifik ned-tystande av en gen. (Bartel 2004)



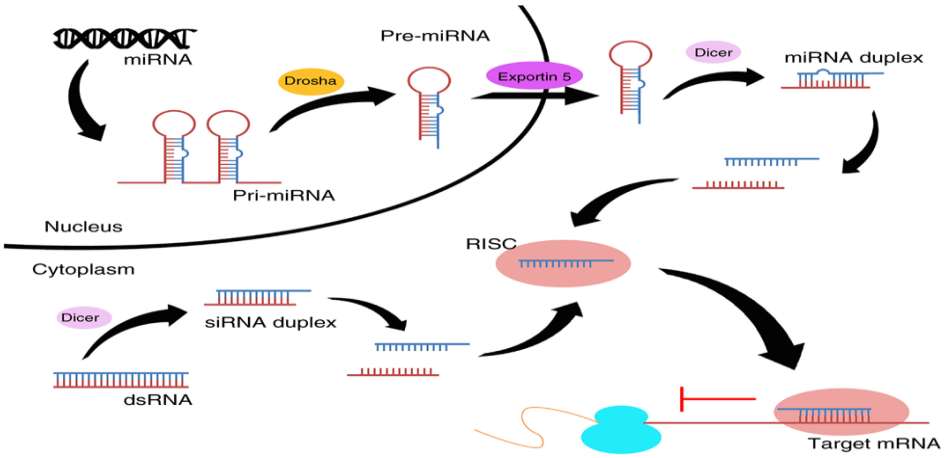
Figur 1. Illustration över prekursorer (övre) som fragmenterats (nedre) till A. µRNA respektive B. siRNA. Saxar representerar ribonukleasen Dicer; röd och blå kedja representerar sens respektive antisens.

µRNA och siRNA har skilda biosyntetiskt ursprung men sammanlöper sedan i cytoplasman där båda medverkar i den aktiva delen av RNAi reaktionsvägen. Båda orsakar sekvens-specifikt nedtystande av en gen genom samma mekanism.

µRNA och siRNA

Primär µRNAs (pri-µRNAs) är transkripter av enkelsträngade nukleinsyror som vikt ihop sig och bildat dubbelsträngsstruktur (de består av hårnålar samt många inre öglor). Dessa är minst 1000 nukleotider långa molekyler som bearbetas över ett fåtal steg till µRNA. Pri-µRNA bearbetas i cellkärnan av ett så kallat mikroprocessor komplex bestående av ribonukleasen Drosha och ett dsRNA-bindande protein (dsRBP). DsRBP binder till pri-µRNA så att Drosha kan klyva den till en precursor µRNA (pre-µRNA) molekyl på ca 65–70 baspar. Pre-µRNA transporteras sedan ut till cytoplasman med hjälp av transportproteinerna exportin-5 och Ran-GTP (Figur 2). (Wilson & Doudna 2013)

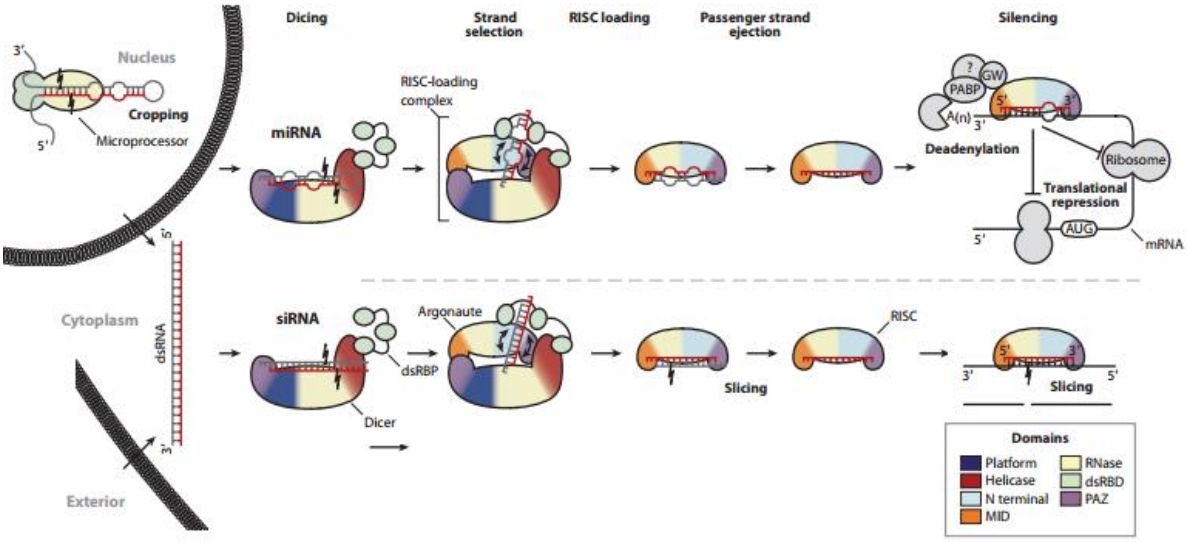
I cytoplasman är det ribonukleasen Dicer som bearbetar pre-µRNA vidare och klyver den till µRNA på drygt 20 baspar med hjälp av ett annat dsRBP. Det är även vid det här steget av RNAi reaktionsvägen som µRNA och siRNA börjar sammanlöpa med varandra. Även siRNA är en produkt av Dicer-katalyserat kluven dsRNA (Figur 2). (Wilson & Doudna 2013)



Figur 2. Schematisk bild över biosyntesen av si- och µRNA och transport av dessa till RISC. Återanvänd av (Zhou *et al.* 2016) med tillåtelse från Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA. © 1999–2016 John Wiley and Sons, Inc.

RISC

Efter att ha bearbetats av Dicer transporteras µRNA eller siRNA vidare i cytoplasman av ribonukleasen i association med dsRBPer. Nukleinsyrorna transporteras till och laddas på ett Argonaut (Ago) protein där dubbelsträngen löses upp och endast en av RNA-strängen blir associerat i ett riboproteinkomplex, den så kallade guidesträngen. Den andra strängen, passagerarsträngen, förkastas till cytoplasman där den bryts ned av nukleaser. Riboprotein-komplexet, RNA-inducerat förstummande komplex (RISC), består av guidesträngen, Ago, Dicer och dsRBPer, och den binder komplementärt till mRNA med guidesträngen för att tysta genen. Vid fullständig komplementaritet—vilket oftast är fallet med siRNA—kan Ago klyva det bundna mRNA:t och tysta genuttrycket. Hos människor har endast Ago2 en katalytisk aktivitet. µRNA har oftast ofullständig komplementaritet vilket tillåter att den kan reglerera flera olika gener och verkar genom att guida RISC till mRNA och inhibera dess translation både innan och efter initiation. Icke-katalytisk Ago kan då rekrytera deadenylerande proteiner så att mRNA:t exponeras för och bryts ned av exonukleaser (Figur 3) (Wilson & Doudna 2013). RISC kan tysta flera budbärare under några cykler (Whitehead *et al.* 2009).



Figur 3. Illustration på RNAi reaktionsvägen från biosyntes av µRNA och siRNA till inkorporation i RISC och gentystande. Omarbetad med tillåtelse från Wilson & Doudna 2013. © 2016 Annual Review of Biophysics.

Syntetiskt siRNA kan direkt introduceras till celler för att inducera RNAi reaktionsvägen, utan att först bearbetas av Dicer. Detta kan uppnås med hjälp av nanopartiklar som levererar siRNA till celler och skyddar den under transport från till exempel serum nukleaser i blodserumet (Kozlowska & Puszynski 2016). Att direkt introducera dsRNA till blodet för transport till målceller har visat sig att inte vara effektiv, vilket kommer att utforskas senare i artikeln.

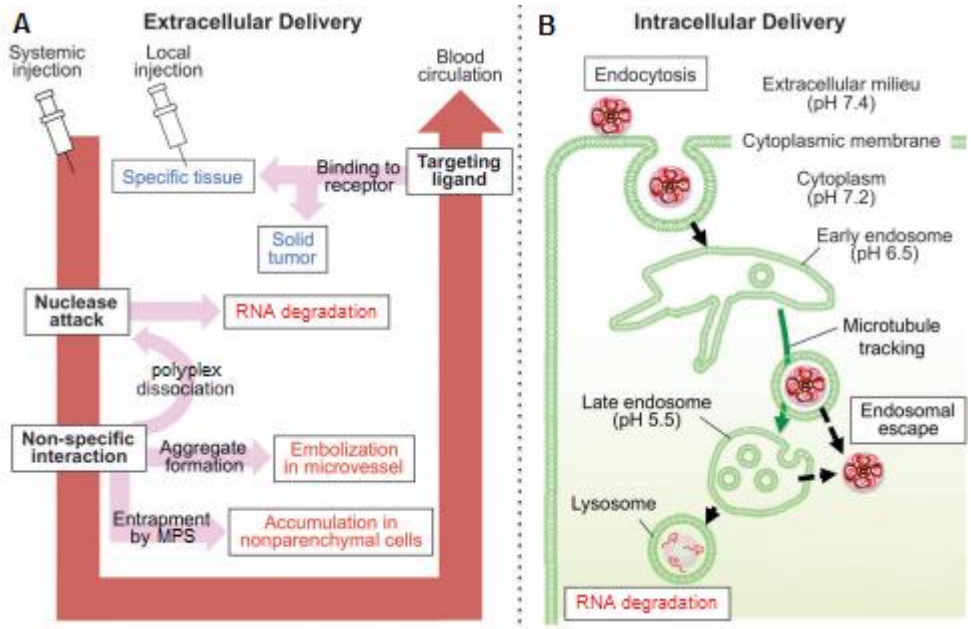
Begränsningar med RNAi i genterapeutiskt syfte

Rådande *in vivo* förhållanden och siRNA:s struktur presenterar en del utmaningar som hindrar RNAi reaktionsvägens effektiva översättning till kliniska behandlingar. *In vitro* ser behandling med RNAi lovande ut och har till exempel inhiberat replikationen av japansk encefalit viruset (Yuan *et al.* 2016), *in situ* behandlingar med siRNA på möss har också visat sig vara framgångsrika (Lau *et al.* 2012).

Naket siRNA – RNA-molekylen för sig själv, utan modifikationer eller krosslänkad till andra molekyler – kräver en transportör som kan bära den till och integrera den i målcellers cytoplasma för terapeutiska ändamål, speciellt vid direkt administrering till blodet. Utan en transportör bryts naket siRNA snabbt ner av serumnukleaser innan den når målceller.

Det finns såväl systemiska som cellulära barriärer (Figur 4) som utgör ett hinder för användandet av naket RNA i genterapi. De systemiska barriärerna är de problem som uppkommer vid icke-lokal administrering, till exempel intravenöst. Cellulära barriärer uppstår vid upptag och integration av RNA av målcellerna, till exempel på grund av molekylens storlek (Moghimi *et al.* 2016). Först vid framtagandet av en effektiv transportör, en nanopartikel, kan klinisk behandling med siRNA övervägas igen. Det finns vissa krav som sätts på nanopartiklarna för en lyckad leverans av siRNA till RNAi maskineriet i cellerna:

1) Nanopartiklarna behöver en långvarig cirkulationstid i blodomloppet för att siRNA ska effektivt nå och ackumuleras i målceller. Då gäller det att undvika immunförsvaret, serumnukleaser och filtration via njurarna då dessa påverkar cirkulationstiden och siRNA:s livslängd i organismen. (Kanasty *et al.* 2013, Xia *et al.* 2016)
2) De bör vara specifika och endast tas upp av målceller för minskad cytotoxicitet. (Kanasty *et al.* 2013, Xia *et al.* 2016)
3) Efter att ha integrerats i cytoplasman behöver nanopartiklarna eventuellt bryta sig ut ur endosomer till cytosolen. Endosomen fångar in dem vid cellulärt upptag och eventuellt transporterar dem till lysosomer där de bryts ned. (Kanasty *et al.* 2013, Xia *et al.* 2016)
4) När nanopartiklar väl har nått cytosolen och RNAi maskineriet behöver de effektivt lämna av siRNA. Därefter bör de brytas ned och filtreras ut istället för att ackumuleras i cellerna för minskad cytotoxisk effekt. (Zhang *et al.* 2015)



Figur 4. Schematisk översikt över en transportörs resa genom blodet till målceller och de barriärer den bemöter vid systemisk administrering. A. systemiska barriärer vid injektion. B. Cellulära barriärer vid cellulärt upptag. Omgjord från (Miyata *et al.* 2012) med tillåtelse från The Royal Society of Chemistry.

Systemiska barriärer vid intravenös administrering

RNA har en generell instabil struktur: ribos i RNA molekyler har en 2'-OH vilket gör den till en reaktiv molekyl. Vid basiska förhållanden kan hydroxylgruppen bli deprotonerad och omvandla sockret till en nukleofil som kan angripa och klyva fosfodiesterbindningen i RNA kedjans egna ryggrad. Detta resulterar i fragmenterade RNA molekyler. (Strobel & Cochrane 2007)

Utöver nukleinsyrans autokatalytiska aktivitet har det visat sig att naket RNA hotas av blod-serumets proteiner, till exempel av endonukleaser som snabbt kan bryta ner den. Naket RNA har en halveringstid på 15 minuter i blodet, vilket inte är en tillräcklig lång cirkulationstid för att siRNA ska ha ett terapeutiskt värde vid intravenös administrering. Den bryts snabbt ned av serumets nukleaser och hinner inte fram till målcellerna (Hoerter & Walter 2007). Dessutom är naket RNA i blodet immunogen: den inducerar opsonisering och tas sedan upp och rensas bort av mononukleära fagocytsystemet (MPS) i bland annat levern. Opsonisering är en process där patogener blir märkta av opsoniner, en grupp molekyler som främjar fagocytos genom MPS, vilket leder till att siRNA:s cirkulationstid reduceras (Huang & Liu 2011, Naeye *et al.* 2011).

Det har även visat sig att dsRNA inducerar en typ I interferonrespons. Detta immunsvar stimulerar produktionen av proinflammatoriska cytokiner (proteiner som stimulerar inflammation) för att bekämpa infektioner och det kan eventuellt leda till celldöd. Infektionen som stimulerar en typ I interferonrespons i detta fall blir exogent siRNA. Aktivering av immunsvaret kan bero på specifika sekvensmotiver på RNA molekylen och på så sätt kan det skiljas mellan egen producerat och exogen dsRNA. (Gantier & Williams 2007)

Förutom RNA molekylens kemiska egenskaper, vilka ger upphov till en rad olika problem i blodcirkulationen, kan även dess små storlek orsaka problem. Som nämnt tidigare kan RNA filtreras bort från blodet av MPS i levern, men det vanligaste sättet för naket RNA att filtreras

bort är via njurarna. Gränsen för filtration genom njurens glomerulus ligger på runt 50 kDa och siRNA har en molekylär vikt på 13-15 kDa. (Tamura *et al.* 2009)

Ett nanoplex (nanopartikel med en siRNA last) skyddar nukleinsyran från att brytas ned av serumnukleaser. Hög salthalt i blodet kan dock påverka nanoplexets integritet och orsaka dess sönderfall vilket leder till att lasten exponeras och siRNA:t blir tillgänglig för endonukleaser (Naeye *et al.* 2011). En positiv ytladdning hos katjoniska nanoplex kan minska specificiteten och se den binda ospecifikt till cellmembran och störa dess membranintegritet, vilket kan leda till nekros och apoptos. Nanoplex kan behöva en viss positiv laddning för att behålla stabiliteten och bindningen till negativt laddade siRNA samtidigt som laddningen inte är för stor för att ha en cytotoxisk effekt (Miyata *et al.* 2012).

PEGylation
SiRNA nanoplex måste själv undvika ospecifika interaktioner med serumproteiner, till exempel opsoniner, och därmed upptag av MPS (Guo & Huang 2012). En strategi för detta har varit att förse nanoplexets yta med hydrofila polymerer som utgör ett steriskt hinder. Oftast används polyetylenglykol (PEG) för detta ändamål.

PEGylation kan bidra till nanoplexets stabilitet och öka dess cirkulationstid, vilket beror på PEGens längd. Korta PEG är inte tillräckliga för att minska på ospecifika interaktioner med serumproteiner; för långa PEG reducerar chansen för nanoplex att tas upp av celler och påverkar deras förmåga att bryta sig ur endosomer (Pozzi *et al.* 2014). Det är viktigt att placera PEG vid motsatt ände av ligander som binder till ytreceptorer för att inte påverka nanoplexets förmåga för cellulärt upptag (Guo & Huang 2012).

Nackdelen med PEGylering är att långvarig administrering av PEGylerade nanopartiklar har visat sig slutligen bli immunogena: anti-PEG immunoglobulin har producerats. Denna induktion av immunförsvaret har lett till att även PEGylerade nanopartiklar togs upp av MPS och filtrerades från blodet. (Gomes-da-Silva *et al.* 2012)

Cellulära barriärer
Utöver systemiska barriärer har siRNA visat även ha lågt cellulärt upptag (Gomes-da-Silva *et al.* 2012). De har en total negativ laddning vid fysiologiskt pH, vilket inte gör dem lämpliga för upptag av celler (Raemdonck *et al.* 2009). Dess laddning leder till repulsiva krafter mellan dem anjoniska cellmembranen samtidigt som de är för stora för att passivt diffundera genom membranen (Xia *et al.* 2016).

Nanoplex kan eventuellt konstrueras med förmågan att stimulera cellulärt upptag genom endocytos. Dock behöver den förmågan att bryta sig ut ur den fängslande endosomen den hamnar i och ta sig ut i cytosolen där RNAi maskineriet befinner sig. Om inte nanoplexet lyckas bryta sig ut från endosomen kommer den att trafikeras genom vesiklar med sjunkande pH och slutligen till en lysosom. Väl i lysosomen kommer nanoplexet att brytas ned och siRNA:t lyseras (Huang & Liu 2011, Miyata *et al.* 2012). Alternativt kan det konstrueras nanopartiklar som kan kringgå cellulärt upptag genom endocytos och direkt tas in i cytoplasman istället (Morris *et al.* 2000). Detta uppnås med hjälp av amfipatiska peptider som binder till ytan av målceller och destabiliserar membranet så att negativt laddade nukleinsyror kan passera (Dom *et al.* 2003). Slutligen, efter leverans av siRNA till cytoplasman behöver nanopartiklarna kunna filtreras bort ut ur cellen för att inte ha en cytotoxisk effekt (Zhang *et al.* 2015).

Vektorer under utveckling för siRNA leverans

Biokompatibla vektorer klassificeras generellt i två typer, virala och icke-virala vektorer (Guo & Huang 2012). Virus är naturligt förekommande vektorer för introduktion av exogent genetiskt material. Rekonstruerade virus utnyttjas för leverans av siRNA *in vivo*. Icke-virala vektorer är syntetisk framställda vektorer designade för att besitta liknande egenskaper som en viral vektor för biodistribution och leverans av siRNA. Exempelvis, polymer- och lipid-baserade vektorer (Guo & Huang 2012) som nanogel respektive liposomer. Nanoplex av dessa två typer av vektorer benämns poly- respektive lipoplex i litteraturarbetet.

Virala vektorer

Virus är naturligt förekommande partiklar som besitter förmågan att infektera och introducera främmande genetiskt material till en värdcell. De består av ett skyddande proteinskal, en så kallad kapsid, som ibland är omsluten av ett yttre hölje av lipid. Kapsiden förpackar det virala genomet – den genetiska informationen för att syntetisera nya viruspartiklar, och kan antingen vara en dubbel- eller enkelsträngat DNA eller RNA molekyl. Virus klarar inte av att självmant replikera sig utan besitter förmågan att tvångsrekvirera infekterade cellers eget maskineri för att transkribera sitt virala genom och producera nya viruspartiklar (Dimmock *et al.* 2007). En viruspartikel kan på så sätt ge upphov till 100-tals eller så mycket som 1000-tals nya per livs-cykel (Howard Hughes Medical Institute 2016). Hela deras livscykel består av att komma in i värdorganism samt transporteras till och infektera målceller där den replikerar sig.

Virus är främst associerade med sjukdomar då vissa av dem är patogena, med några ökända virusstammar som influensa, HIV och hepatit. Deras naturliga förmåga att introducera främmande genetiskt material till en cell och överkomma många av dem systemiska och cellulära barriärerna gör dem till eftertraktade partiklar att rekonstruera till siRNA vektorer.

Virus har redan använts som vektor vid kliniska försök (Blaese *et al.* 1995, Aiuti *et al.* 2002) men det kommer inte utan sina risker då det har visat sig kunna sprida sig vidare med blod-cirkulationen och inducera inflammationer genom att initiera en cytokin kaskad. I ett fall rapporterades det att en patient hade utvecklat flera andra sjukdomar (disseminerad intravasal koagulation, chocklunga och multiorgansvikt) direkt på grund av en omkonstruerad adeno-virus, och dött som en följd (National Institute of Health 2004). Adenovirus har proteiner i kapsiden vilka används för att både stimulera endocytos och sedan för att bryta sig ut ur den efter cellulärt upptag (Nakano *et al.* 2000). Denna egenskap utnyttjas i design av en viral vektor i det rapporterade fallet. Vid konstruktion av virala vektorer för siRNA leverans behövs det minskas på faktorer som kan inducera cytotoxicitet och generera immunsvar. På grund av säkerhetsrisker med virus som vektor forskas det även grundligt på att ta fram andra icke-virala alternativ för siRNA leverans.

Virus använder olika mekanismer för att replikera sig beroende på dess värdorganism. Vissa retrovirus inkorporerar sitt virala genom bland värdorganismens vilket får en långvarig effekt som överförs till infekterade cellers dotterceller (Vargas *et al.* 2016). Detta kan utnyttjas för att inkorporera komplementär DNA av siRNA hos exempelvis cancerceller. Fördelen med en sådan långvarig effekt av engångsdosering är att man kan minska på behovet av kontinuerlig behandling, eller förlänga tidsramen mellan varje behandling. Risken med en sådan retroviral konstruktion är att man kan störa värdorganismens naturliga genuttryck genom insertions-mutationer. Till exempel, en plasmid kan inkorporeras vid olämpliga platser i värdgenomet; den kan inkorporeras mitt i en gen eller vid förstärkande gensekvenser så att ett genuttryck

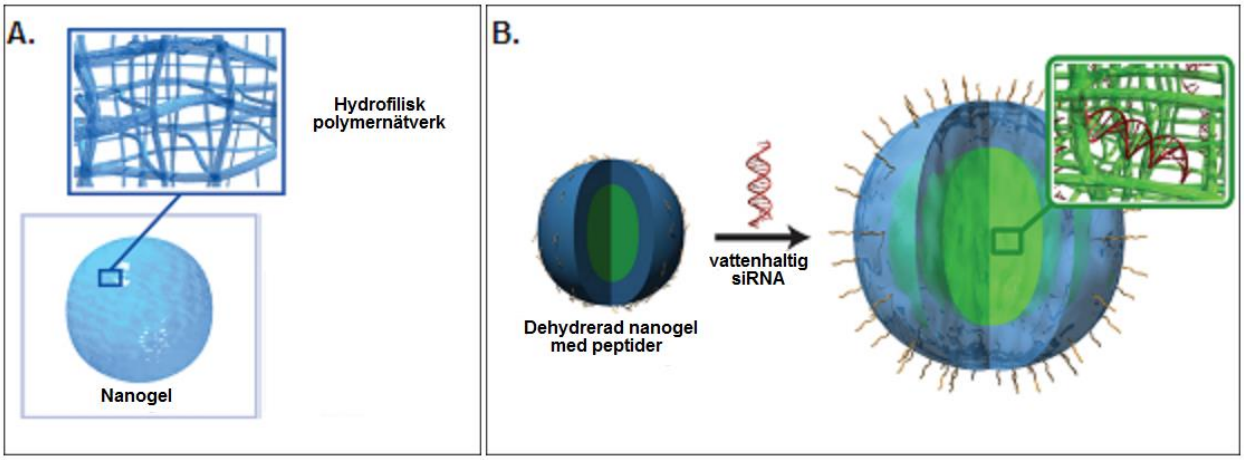
nedregleras (Uren *et al.* 2005). Detta kan eventuellt leda till grava konsekvenser. Vid ett fall rapporterades det att patienter hade utvecklat ett leukemi-liknande sjukdom efter ett kliniskt försök på grund av insertionsmutationer (Hacein-Bey-Abina *et al.* 2003).

Vid bruk av virala vektorer används vissa av virusens egna gener, vilka är nödvändiga för att leverera siRNA med framgång. Det är viktigt att separera på dessa för att undvika exempelvis insertionsmutationer eller oönskad viral replikation. Retrovirala gener klipps ut från det virala genom och kvar lämnas endast gener nödvändiga för inkorporation i värdorganismen. Ut-klippta gener—vars funktion är att uttrycka proteiner för syntes av nya viruspartiklar— ersätts med önskad gensekvens istället, till exempel siRNA. Dessa gener kan sättas i en så kallad hjälparvirus ifall vektorn med siRNA behövs replikeras för en långvarig effekt. Design av dessa sker för att hindra en rekombination mellan viral vektor och hjälparvektor så att den inte återfår sin virulens (Vargas *et al.* 2016).

Nanogel

Gel i nanostorlek är en lovande vektor för leverans av siRNA som undersöks i flera olika studier. Nanogel är en polymerbaserad vektor, det vill säga uppbyggd av ett nätverk av polymerer (Figur 5A).

En gel är ett tredimensionellt nätverk av krosslänkade polymerer; det är ett ämne bestående av både flytande och fasta komponenter. Nätverket ger den en fastform, och det kan absorbera till sig vätska (till exempel vatten) i relativt stor kvantitet i fickorna mellan polymererna och svälla upp som en konsekvens (Figur 5B). Det innebär att den besitter egenskaper typiskt för ämnen i båda aggregationstillstånden, och den förekommer som ett ämne i mjukt, fast eller i ett halvfast tillstånd. Exempel på gel inom biologin är agarosgel. En annan typ av gel, hydro-gel, består främst av hydrofila polymerer och är vattenrika (Almdal *et al.* 1993). Hydrogel kan förekomma i väldigt små dimensioner; när dess storlek förefaller i nanoskala betecknas den som nanogel (Oh *et al.* 2008).



Figur 5. A. Illustration av en nanogel. B. En uppsvullen hydrerad nanogel (täckt med peptider) efter inkorporation av siRNA. Omgjord med tillåtelse från Smith & Lyon 2012. © 2011 American Chemical Society.

Det som är viktigt för nanogel som vektor är att polymerresterna inte är toxiska och ackumulerar i celler efter nedbrytning utan kan filtreras bort via njurarna efter leverans (Zhang *et al.* 2015). Ett annat viktigt kriterium för att nanogel skall vara effektiva vektorer är att de är stabila och kan ha en lång cirkulationstid; instabila gelkonstruktion kan eventuellt leda till att siRNA lasten släpps av för tidigt. Även att gelens diameter är mindre än 200 nm

skulle öka dess cirkulationstid då det skulle minska risken att immunförsvaret fagocyterar och bryter ner nanogelen innan den har nått målcell och uppfyllt sitt uppdrag (Oh *et al.* 2008).

Den porösa gelen har en stor ytarea vilket tillåter för multivalent biokonjugation, det vill säga att biomolekyler kan kovalent binda till gel och bilda komplex. Tillsammans med det inre nätverket kan ett stort antal biomolekyler inkorporeras i gelen, exempelvis siRNA (Figur 5B) eller ligander. Detta kan utnyttjas i bland annat läkemedelsdistribution *in vivo* till målceller. Ligander – från antikroppar till folsyraderivat – kan känna igen specifika receptorer och kan utnyttjas för att finjustera specificitet och få vektorn att endast binda till målceller, vilket även är ett sätt att minska på cytotoxicitet.

Blackburn och medförfattare konstruerade nanogel beklädda med YSA (tyrosin-serin-alanin) peptider, vilka härmar en naturlig ligand till en viss typ av tyrosinkinasreceptor. Denna receptor är vanlig i en rad olika cancertyper, till exempel äggstocks-, prostata- och bröst-cancer. Författarnas konstruktion påvisade hög selektivitet och endocytiskt upptag av äggstockscancerceller *in vitro* även om den verkade vara en aning ostabil med läckage av siRNA-last upp till ca 33%. Utöver det indikerar även deras resultat ett effektivt nedtystande av epidermal growth factor receptor i cellerna. Nedtystande av denna receptor har inte dödliga konsekvenser men är av kliniskt intresse vid behandling av äggstockscancer då de är överaktiva. Det betyder att polyplexet lyckades bryta sig ut ur endosomen och levererades till RNAi maskineriet. Författarna är ovissa om hur detta kan ha skett men spekulerar att osmostrycket i vesikeln kan ha påverkat polyplexets volym. De kunde heller inte observera någon cytotoxicitet efter leverans. (Blackburn *et al.* 2009)

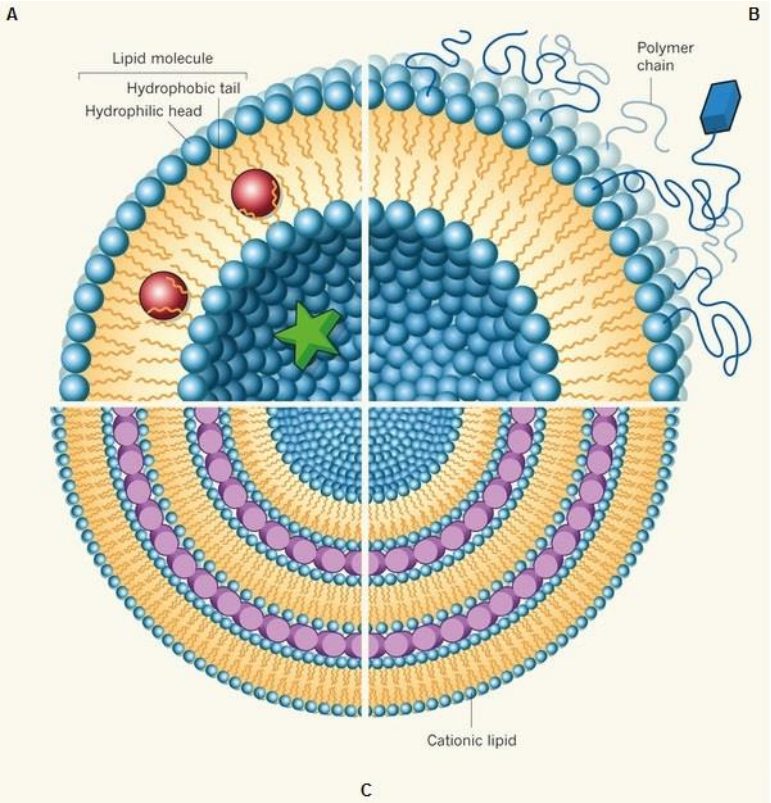
Nanogelen kan potentiellt konstrueras till att binda till och endocyteras av cancerceller och väl inne i cellen lasta av siRNA. Det är viktigt kriterium att gelkomplexen är nedbrytbara för att lasten ska släppas fri—i nukleinsyrornas fall för att de skall kunna inducera RNAi reaktionsvägen. Disassociation kan uppnås efter stimuli (pH, enzymaktivitet, redoxpotential med mera) i rådande miljö beroende på vilka polymerer nanogelen har konstruerats med och hur gelen har betingats. Polymerer med nedbrytbara huvudkedjor eller sidogrupper med klyvbara bindningar används i detta syfte. (Oh *et al.* 2008)

Shatsberg och kollegor konstruerade nanogel rik på krosslänkade disulfider. Disulfiderna agerade som ankare till katjoniska molekyldelar med aminogrupper som band till och neutraliserade negativt laddade siRNA (Shatsberg *et al.* 2016). Disulfidbindningar är av stort intresse i och med att dem klyvs hastigt vid hög redoxpotential, vilket råder i celler (Zhang *et al.* 2015). Uppmätta zeta potential (den elektriska potentialen hos ett disperst system) påvisade bildandet av stabila polyplex, och även att dess ytladdning var positiv. Detta möjliggör en elektrostatisk interaktion med cellmembranens negativt laddade cellytor för att stimulera endosomalt upptag. Vidare testade forskarna sin konstruktion *in vivo* på möss (med inplanterad mänsklig cancer) genom intratumoral injektion. Vad de fann var en effektiv nedtystande av målgener (ett µRNA-replikat användes för att reglera flera gener), vilket indikerar en lyckad flykt från endosomer (Shatsberg *et al.* 2016).

Experiment med nanogel har påvisat att det är en lovande vektor för siRNA leverans. Dock har experiment med nanogel polyplex ännu inte övergått till kliniska försök, experiment har mest fokuserad på leverans av vacciner med till exempel trunkerade proteiner (Tahara & Akiyoshi 2015). De experiment jag har beskrivit har också varit fokuserade på lokal administrering och inte systemisk.

Liposomer

Liposomer är en annan vektor av intresse för siRNA leverans. De är en koncentrisk lipid-baserad vektor med hög potential för siRNA leverans och består av en lipid tvåskiktsmembran (Figur 6A), likt cellmembranen. De besitter amfipatisk karaktär vilket gör dem lämpliga för inkorporering av både hydrofila och hydrofoba läkemedel. Läkemedel kan antingen inkorporeras i den akvatiska fasen eller inbäddas i det hydrofoba lipidlagret (Akbarzadeh *et al.* 2013). Molekyler kan även fästas på ytan av liposomerna av olika skäl (Figur 6B), till exempel för att öka cirkulationstid och hindra aggregation av andra molekyler (PEG kan användas i detta syfte). Även andra molekyler kan fästas, speciellt när specificitet önskas. Då binds det molekyler som kan binda till målcellers ytreceptorer (Xia *et al.* 2016).



Figur 6. A. en vanlig liposom konstruktion med bilipidlager. Hydrofoba molekylär (röd cirkel) kan fästas i bilipidlagret medan hydrofila molekyler (grön stjärna) kan hysas i kärnan. B. Polymerer, till exempel PEG, kan fästas på ytan för att skydda liposomen eller från att hindra läckage in eller ut. Även molekyler (blå rektangel) kan fästas för att agera som ligand till cellytreceptorer för specificitet. C. Ett så kallad lipoplex. Liposomen har flera bilipidlager av katjoniska lipider som omsluter varandra med nukleinsyror (lila cylinder) inbäddade i den hydrofila miljön mellan bilipidlagren (Safinya & Ewert 2012). Omgjord med tillåtelse från Macmillan Publishers Ltd: Nature (Safinya & Ewert 2012), © 2012.

Liposomer kan ha varierande egenskaper beroende på lipidkomposition de byggs upp av; de kan vara uppbyggda med kolesterol, glykolipider och fosfolipider med mera. Detta gör dem till väldigt anpassbara vesiklar och det utnyttjas i design av ett optimalt siRNA leverans-system (Moghimi *et al.* 2016). Valet av lipidkomponenter styr bland annat liposomers fluiditet och laddning. Exempelvis, lipidkomposition av omättade fosfatidylkoliner leder till mindre stabila samt lättgenomträngliga liposomer. Liposomer uppbyggda av fosfolipider med långa acylkedjor är rigorösa och ogenomträngliga istället (Akbarzadeh *et al.* 2013). Lazebnik och kollegor demonstrerade *in vitro* att lipoplex konstruerade med kolesterol kringgick endosomalt upptag av celler och istället integrerades i celler genom fusion med cell-

membranet (Lazebnik *et al.* 2016). En sådan konstruktion slipper verktyg—som annars kan påverka lipoplexets integritet—för att bryta sig ut ur endosomer då de direkt hamnar i cytosolen.

Lipidkompositionen, lipoplexets morfologi och vikt samt proportionen av lipid/genetiskt material styr lipoplexets storlek. Morfologin kan skilja sig till den grad att liposomen inte består av en tvåskiktsmembran utan flera som omsluter varandra (Figur 6C). Bilipidlagren kan endast bildas av katjoniska lipider, vilka kan interagera med RNA, och mellan de hydrofila utrymmena kan siRNA hysas (Moghimi *et al.* 2016).

Det finns även liposomer som har konstruerats för att ingå i ett komplex med polymerbaserade vesiklar – ett så kallad lipopolyplex (Xia *et al.* 2016). Exempel på detta är nanogel i komplex med siRNA: komplexet kan ges ett skal av lipidbilager som omsluter den och bilda ett lipopolyplex. Ett lipopolyplex konstruerades av Itakura och kollegor. Polyplexet bestod av peptidkedjor med histidin och glutamin sidokedjor vilket gav den olika laddning beroende på pH: i sura miljöer protonerades histidinresterna och nanopartikeln fick en positiv nettoladdning; vid fysiologisk pH deprotonerades de och fick en negativ nettoladdning. Konsekvensen av en deprotonation var att siRNA kunde frigöras från komplexet samtidigt som nanopartikeln inte interagerade med naturliga RNA molekyler. Det är jätteviktigt att interaktion med cellens egna RNA inte sker vilket kan ge upphov till en cytotoxisk effekt. Polyplexet omslöts med en liposom, och för att testa lipopolyplexets effektivitet *in vivo* levererades den både intratumoralt och intravenöst i möss. Effektiv gentystnad observerades vid lokal administrering men inte signifikant vid systemisk administrering (Itakura *et al.* 2016).

In vivo studier på intravenöst administrerade lipoplex finns. Genom att administrera konstruerade lipoplex i svansvenen på möss upptäckte Xiao *et al.* att lipoplexen hade distribuerats främst till levern, lungorna och mjälten. Ingenting upptäcktes i njurarna och den hade alltså varit i tillräcklig stor storlek för att undvika filtration. De upptäckte även att RNAi var effektiv i leverceller vid användning av deras lipoplex och att det hade en dosberoende verkan. Den hade heller ingen tydlig cytotoxisk verkan, speciellt vad gällde födointag, vikt och generell hälsa. Leverenzymer i blodserumet ökade heller inte vilket också påvisar att lipoplexen inte hade någon synbar toxicitet (Xiao *et al.* 2016). Framsteg i design av liposomer stödjer tanken av att det är en potentiell vektor vid genterapi.

Diskussion

Det är nödvändigt att titta på alternativa läkemedel vid behandling av sjukdomar, till exempel alternativ till antibiotika och antiviralt med inkommande rapporter om multiresistenta bakterier och virus (World Health Organization 2016). RNAi har visat sig vara ett lovande alternativ med hög effektivitet vid *in vitro* applikationer. Även mot diverse sjukdomar, såväl som mot genetiska sjukdomar och cancer, vid in vivo studier på möss.

Möjligheten för infektiösa agenter att utveckla resistans mot det siRNA patienter behandlas med skulle potentiellt kunna uppstå genom mutation i mål-mRNA sekvenser. Detsamma vad gäller cancer. Men detta hinder skulle lätt kunna överkommas genom att anpassa nukleinsyrasekvensen av dem siRNA som används för behandling. Att anpassa existerande läkemedel, till

exempel antibiotika, är inte lika enkelt. Antibiotika har väldigt specifika interaktioner (Barna & Williams 1984), och kan vara lika specifikt som den siRNA som tystar en specifik gen eller µRNA som kan känna igen flera gener. Fast antibiotika interagerar inte med gener, utan med makromolekyler, som proteiner. Om en gensekvens förändras kan det leda till förändrat genuttryck; en aminosyra byts ut mot en annan. Det här kan påverka hela den kodade peptidens struktur och funktion, och i förlängning dess interaktion med andra molekyler. Till exempel, samma antibiotika som hämmade en proteins funktion kan ha förändrad interaktion med proteinet efter att den muterat. Den kanske inte binder till proteinet lika effektivt och är nu värdelös som antibiotika. Det är så resistens uppkommer.

Det är inte lika enkelt att anpassa antibiotika för att den effektivt ska hämma det muterade proteinets funktion som det är med siRNA. Med RNAi är det endast sekvensspecifik interaktion med siRNA och mål-mRNA som gäller – om mRNA sekvensen muteras kan siRNA lätt modifieras för att på nytt vara komplementär. Om proteininteragerande läkemedel modifieras i någon molekyldel kan det medfölja grava konsekvenser; det är inte bara att administrera det modifierade läkemedlet utan en ny preklinisk forskning krävs för att påvisa att ingen cytotoxisk effekt tillkommer av det nya ämnet. En fosfatgrupp istället för en amingrupp i sidokedjan kan ha väldigt olika effekter. Det finns heller ingen garanti för det modifierade läkemedlet att vara effektiv. Det tar både lång tid och kostar väldigt mycket pengar att producera nya läkemedel: kliniska försök har flera faser (U.S. National Library of Medicine 2016) innan en ny produkt kan rullas ut.

Problemet med RNAi visar sig vara i transporten av siRNA *in vivo* eftersom nakna nukleinsyramolekyler bryts snabbt ner av serumnukleaser. Det finns även andra barriärer till siRNA transport vid systemisk administrering och cellulärt upptag. Det krävs en nanopartikel som kan transportera siRNA till målceller. Kan dessa problem överkommas med innovativ bioteknik utgör RNAi ett lovande medel inom genterapi för behandling mot diverse sjukdomar. Från vanlig förkylning, till sexuellt överförbara sjukdomar och till cancer. Samtidigt är det viktigt för nanopartikeln att inte ha cytotoxiska effekter under och efter leverans. Man vill framta ett nanoplex som är specifik för målceller och målgener, och som sedan kan brytas ner av cellerna.

Virus har visat sig vara effektiv till hög grad som vektor. Patienter har rapporterats bli botade från allvarliga sjukdomar. Men med den grad av effektivitet medföljer även höga risker då virala vektorer har visat sig utveckla virulens och orsaka andra sjukdomar. En djupare förståelse för virusbiologi krävs för att den ska på nytt ses som en potentiellt effektiv vektor för användning inom genterapi. För att undkomma den cytotoxicitet som virala vektorer orsakar har forskare vänt sig mot syntetiska vektorer. Nanogel och liposomer är två exempel på vektorer som utvecklas.

Båda typer av vektorer har visat på hög förmåga att överkomma de cellulära barriärerna och leverera siRNA till cytosolen, med observerad gentystnad. Det stödjer deras potential för hög genterapeutiskt värde, men samtidigt begränsar det. Dem flesta forskningarna har fokuserat på tumörbehandlingar genom intratumorala injektioner. Behandlingsbara sjukdomar blir då begränsad till de fall då endast lokal administrering är möjligt. Nanoplexens förmåga att upptas av cellen och gentysta gör dem ideala för endast viss typ av sjukdomar. Grundlig forskning saknas för nanoplexens kapacitet vid systemisk administrering, till exempel vid intravenösa

injektioner. Genetiska sjukdomar uttrycks oftast i celler otillgängliga för lokal administrering och kräver systemisk leverans av siRNA till exempel genom blodcirkulationen. Därför är det viktigt att forska kring huruvida nanoplex klarar sig i blodet. Det är väldigt få forskning som har undersökt det och fler forskare behöver ta det steget.

Samtidigt finns det alternativa administreringsvägar som inte togs upp i artikeln, till exempel oral, nasal, anal, vaginal administrering med mera som presenterar andra utmaningar. Dessa kan möjligtvis föredras över intravenösa injektioner beroende på bland annat sjukdom och målceller. Det finns forskning som undersöker dessa administreringsvägar istället.

Viktigt att tänka på är, det är inte en vektor att sämja dem, en vektor att främja dem, en vektor att djupt i mörkrets vida riken tämja dem som gäller. De olika vektorer som utvecklas kan vara optimala för olika typer av sjukdomar eller kanske för olika typer av administrerings-vägar och är värt att undersöka.

Tack

Under litteraturarbetets gång har jag fått hjälp från min handledare Ida Lundholm samt mina gruppmedlemmar Hanna Börjeson, Victor Björk och Elin Ekman. Tack till dem. Deras åter-kopplingar har varit till stor hjälp.

Ifall jag aldrig vinner en Oscar vill jag även ta tillfället i akt och tacka familjen Görgülü. Tack till min syster Afife för sitt stöd och kärlek ända bort från Oceanien under hela arbetets gång. Tack till WhatsApp som tillåter gratis samtal över internet med aktivitetskoll så vi både hade koll på när den andra var vaken för uppringning. Tack till mor och far för moraliskt stöd och kärlek till dem med. Även tack till mor för alla matlådor och alla timmar jag inte spenderade varje dag på att tänka på vad jag skulle laga för mat, och sen laga det. Tack för att ni finns!

Jag vill även sträcka ut min tacksamhet till Gwendoline Ifans för att hon ständigt skickade mig ”good vibes” ända från Australien och höll mitt humör uppe under arbetets gång. Också tack till henne för den återkoppling jag fick på min populärvetenskapliga sammanfattning.

Referenser

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**: 2410–2413.

Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K. 2013. Liposome: classification, preparation, and applications. Nanoscale Research Letters **8**: 102.

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-κB by Toll-like receptor 3. Nature **413**: 732–738.

Almdal K, Dyre J, Hvidt S, Kramer O. 1993. What is a ‘gel’? Makromolekulare Chemie Macromolecular Symposia **76**: 49–51.

Barna JCJ, Williams DH. 1984. The Structure and Mode of Action of Glycopeptide Antibiotics of the Vancomycin Group. Annual Review of Microbiology **38**: 339–357.

Bartel DP. 2004. MicroRNAs. Cell **116**: 281–297.
Blackburn WH, Dickerson EB, Smith MH, McDonald JF, Lyon LA. 2009. Peptide-functionalized nanogels for targeted siRNA delivery. Bioconjugate Chemistry **20**: 960–968.
Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, Greenblatt JJ, Rosenberg SA, Klein H, Berger M, Mullen CA, Ramsey WJ, Muul L, Morgan RA, Anderson WF. 1995. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. Science (New York, NY) **270**: 475–480.
Burnett JC, Rossi JJ, Tiemann K. 2011. Current Progress of siRNA/shRNA Therapeutics in Clinical Trials. Biotechnology Journal **6**: 1130–1146.
Dimmock NJ, Easton AJ, Leppard KN. 2007. Introduction to Modern Virology, 6:e uppl. Blackwell Publishing Ltd., Oxford.
Dom G, Shaw-Jackson C, Matis C, Bouffioux O, Picard JJ, Prochiantz A, Mingeot-Leclercq M-P, Brasseur R, Rezsohazy R. 2003. Cellular uptake of Antennapedia Penetratin peptides is a two-step process in which phase transfer precedes a tryptophan-dependent translocation. Nucleic Acids Research **31**: 556–561.
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.
Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature **391**: 806–811.
Gantier MP, Williams BRG. 2007. The response of mammalian cells to double-stranded RNA. Cytokine & growth factor reviews **18**: 363–371.
Geisbert TW, Lee AC, Robbins M, Geisbert JB, Honko AN, Sood V, Johnson JC, de Jong S, Tavakoli I, Judge A, Hensley LE, MacLachlan I. 2010. Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study. The Lancet **375**: 1896–1905.
Gomes-da-Silva LC, Fonseca NA, Moura V, Pedroso de Lima MC, Simões S, Moreira JN. 2012. Lipid-based nanoparticles for siRNA delivery in cancer therapy: paradigms and challenges. Accounts of Chemical Research **45**: 1163–1171.
Guo X, Huang L. 2012. Recent Advances in Nonviral Vectors for Gene Delivery. Accounts of Chemical Research **45**: 971–979.
Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval J-L, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A. 2003. A Serious Adverse Event after Successful Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency. New England Journal of Medicine **348**: 255–256.
Hoerter JAH, Walter NG. 2007. Chemical modification resolves the asymmetry of siRNA strand degradation in human blood serum. Rna-a Publication of the Rna Society **13**: 1887–1893.
Howard Hughes Medical Institute. 2016. Viral Lifecycle. WWW-dokument 2016-11-18: http://www.hhmi.org/biointeractive/viral-lifecycle. Hämtad 2016-11-18.
Huang L, Liu Y. 2011. In Vivo Delivery of RNAi with Lipid-Based Nanoparticles. Annual Review of Biomedical Engineering **13**: 507–530.
Itakura S, Hama S, Matsui R, Kogure K. 2016. Effective cytoplasmic release of siRNA from liposomal carriers by controlling the electrostatic interaction of siRNA with a charge-invertible peptide, in response to cytoplasmic pH. Nanoscale **8**: 10649–10658.
Kanasty R, Dorkin JR, Vegas A, Anderson D. 2013. Delivery materials for siRNA therapeutics. Nature Materials **12**: 967–977.

Kozlowska E, Puszynski K. 2016. Application of bifurcation theory and siRNA-based control signal to restore the proper response of cancer cells to DNA damage. Journal of Theoretical Biology **408**: 213–221.

Lau S, Graham B, Cao N, Boyd BJ, Pouton CW, White PJ. 2012. Enhanced extravasation, stability and in vivo cardiac gene silencing via in situ siRNA-albumin conjugation. Molecular Pharmaceutics **9**: 71–80.

Lazebnik M, Keswani RK, Pack DW. 2016. Endocytic Transport of Polyplex and Lipoplex siRNA Vectors in HeLa Cells. Pharmaceutical Research **33**: 2999–3011.

Miyata K, Nishiyama N, Kataoka K. 2012. Rational design of smart supramolecular assemblies for gene delivery: chemical challenges in the creation of artificial viruses. Chem Soc Rev **41**: 2562–2574.

Moghimi HR, Saffari M, Dass CR. 2016. Barriers to liposomal gene delivery: from application site to the target. Iranian Journal of Pharmaceutical Research **15**: 3–17.

Naeye B, Deschout H, Röding M, Rudemo M, Delanghe J, Devreese K, Demeester J, Braeckmans K, De Smedt SC, Raemdonck K. 2011. Hemocompatibility of siRNA loaded dextran nanogels. Biomaterials **32**: 9120–9127.

Nakano MY, Boucke K, Suomalainen M, Stidwill RP, Greber UF. 2000. The First Step of Adenovirus Type 2 Disassembly Occurs at the Cell Surface, Independently of Endocytosis and Escape to the Cytosol. Journal of Virology **74**: 7085–7095.

National Institute of Health. 2004. Assessment of Adenoviral Vector Safety and Toxicity: Report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee. Human Gene Therapy **13**(1): 3-13. doi:10.1089/10430340152712629. Hämtad 2016-11-27.

Oh JK, Drumright R, Siegwart DJ, Matyjaszewski K. 2008. The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. Progress in Polymer Science **33**: 448–477.

Pozzi D, Colapicchioni V, Caracciolo G, Piovesana S, Capriotti AL, Palchetti S, De Grossi S, Riccioli A, Amenitsch H, Laganà A. 2014. Effect of polyethyleneglycol (PEG) chain length on the bio–nano-interactions between PEGylated lipid nanoparticles and biological fluids: from nanostructure to uptake in cancer cells. Nanoscale **6**: 2782.

Raemdonck K, Naeye B, Buyens K, Vandenbroucke RE, Høgset A, Demeester J, De Smedt SC. 2009. Biodegradable Dextran Nanogels for RNA Interference: Focusing on Endosomal Escape and Intracellular siRNA Delivery. Advanced Functional Materials **19**: 1406–1415.

Safinya CR, Ewert KK. 2012. Materials chemistry: Liposomes derived from molecular vases. Nature **489**: 372–374.

Shatsberg Z, Zhang X, Ofek P, Malhotra S, Krivitsky A, Scomparin A, Tiram G, Calderon M, Haag R, Satchi-Fainaro R. 2016. Functionalized nanogels carrying an anticancer microRNA for glioblastoma therapy. Journal of Controlled Release **239**: 159–168.

Smith MH, Lyon LA. 2012. Multifunctional Nanogels for siRNA Delivery. Accounts of Chemical Research **45**: 985–993.

Strobel SA, Cochrane JC. 2007. RNA Catalysis: Ribozymes, Ribosomes and Riboswitches. Current opinion in chemical biology **11**: 636–643.

Tahara Y, Akiyoshi K. 2015. Current advances in self-assembled nanogel delivery systems for immunotherapy. Advanced Drug Delivery Reviews **95**: 65–76.

Tamura A, Oishi M, Nagasaki Y. 2009. Enhanced cytoplasmic delivery of siRNA using a stabilized polyion complex based on PEGylated nanogels with a cross-linked polyamine structure. Biomacromolecules **10**: 1818–1827.

Uren AG, Kool J, Berns A, van Lohuizen M. 2005. Retroviral insertional mutagenesis: past, present and future. Oncogene **24**: 7656–7672.

U.S. National Library of Medicine. 2016. FAQClinicalTrials.gov - Clinical Trial Phases. WWW-dokument 2016-12-13: https://www.nlm.nih.gov/services/ctphases.html. Hämtad 2016-12-13.

Vargas JE, Chicaybam L, Stein RT, Tanuri A, Delgado-Cañedo A, Bonamino MH. 2016. Retroviral vectors and transposons for stable gene therapy: advances, current challenges and perspectives. Journal of Translational Medicine **14**: 288.

Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. 2009. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. Nature Reviews Drug Discovery **8**: 129–138.

Wilson RC, Doudna JA. 2013. Molecular Mechanisms of RNA Interference. Annual Review of Biophysics **42**: 217–239.

World Health Organization. 2016. Antimicrobial resistance. WWW-dokument 2016-11-18: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/. Hämtad 2016-11-18.

Xia Y, Tian J, Chen X. 2016. Effect of surface properties on liposomal siRNA delivery. Biomaterials **79**: 56–68.

Xiao H, Altangerel A, Gerile G, Wu Y, Baigude H. 2016. Design of Highly Potent Lipid-Functionalized Peptidomimetics for Efficient in Vivo siRNA Delivery. Acs Applied Materials & Interfaces **8**: 7638–7645.

Yuan L, Wu R, Liu H, Wen X, Huang X, Wen Y, Ma X, Yan Q, Huang Y, Zhao Q, Cao S. 2016. The NS3 and NS4A genes as the targets of RNA interference inhibit replication of Japanese encephalitis virus in vitro and in vivo. Gene **594**: 183–189.

Zhang X, Malhotra S, Molina M, Haag R. 2015. Micro- and nanogels with labile crosslinks – from synthesis to biomedical applications. Chem Soc Rev **44**: 1948–1973.

Zhou Y, Zhou G, Tian C, Jiang W, Jin L, Zhang C, Chen X. 2016. Exosome-mediated small RNA delivery for gene therapy. Wiley Interdisciplinary Reviews-Rna **7**: 758–771.

[Systemiska och cellulära begränsningar med *in vivo* RNAi behandling och utveckling av siRNA vektorer i terapeutiskt syfte]: Etikbilaga

Akif Görgülü

Självständigt arbete i biologi 2016

Dual-use av RNAi

RNAi har varit en revolutionerande upptäckt som grenat sig in i flera olika forsknings-områden. Tekniken att tysta gener genom sekvensspecifikt bindande med siRNA har visat sig ha ett terapeutiskt värde och är av intresse vid genterapi. Men tekniken kan såväl användas i ett gement syfte och ha en så kallad ”dual-use”. Istället för att behandla sjukdomar skulle det lika väl kunna utnyttjas för att avsiktligt ha en cytotoxisk effekt hos en organism. SiRNA kan syntetiseras för att rikta sig in mot friska gener och orsaka sjukdomar istället för att behandla dem. Bör utvecklingen av siRNA vektorer fortsätta om det lika lätt går att avsiktligt syntetisera siRNA sekvenser som slår ut friska gener istället för att behandla sjukdoms-alstrande gener?

Att utveckla teknologi som potentiellt kan bota en stor variation med sjukdomar skall inte skys från för att det medföljer en risk att samma teknologi kan användas för ont. Med samma logik borde saxar sluta säljas för allmänheten: saxar kan användas som vapen istället för att generera preciserade snitt. Något löjligt. Visst är det möjligt att riva papper istället för att klippa, men det uppnår inte samma funktion lika väl. Och likaså, visst finns det antibiotika och andra läkemedel för sjukdomar, men det funkar inte heller alltid så bra – precis som med rivning.

Men en sax är inte en likställd analogi till ett potentiellt biovapen, kan det argumenteras för. Med RNAi som en etablerad metod kan terrorister (t.ex. vilseledda unga människor som springer in i skolor eller biosalonger och avfyrar vapen) enkelt designa siRNA på labb och eventuellt beställa hem en vektor. Kombinera, och vips så har de ett biovapen till handa—RNAi riktad mot friska gener—som de ser till att tilltänkta offer sedan förtär. Men lättare, och förmodligtvist billigare, skulle de kunna använda råttgift istället och generera samma utfall.

Men vi har fortfarande lagar och reglemente som finns där för att skydda oss. Mord är juridiskt olagligt internationellt, vilket är en trygg barriär till att RNAi inte används i gement syfte. RNAi banar inte direkt vägen för en ny, oupptäckt och nyanserat metod för att ta död på någon eller en folkmängd. I gement syfte är det ett toxin som vilket annat, som även tillgängliggör potentiella botemedel – ett annat siRNA som riktar sig in mot det giftiga RNA:t, eller kanske specificerade ribonukleaser eller annat.

Anseende ”dual-use” av RNAi finns det inget stort etiskt dilemma vare sig metoden ska utforskas mer eller inte i genterapeutiskt syfte.

Forskningsetik

Jag har främst använt mig av Web of Science för att söka på artiklar, och därefter Google

Scholar om den förstnämnda inte räckte till.

Vid valet av artiklar att läsa och citera tänkte jag inte direkt på genus. De fallen då namnet på författaren hade någon betydelse var ifall jag redan hade en källa med samma förste författare då det inte föredrogs, samt vid originalartiklar föredrogs det minst tre namn medan antalet författare inte spelade någon roll vid citerade review-artiklar. Det tittades nästan inte något alls på namn utan bara på efternamn. Viss diskriminering kan ha skett mot artiklar publicerade i ett utomeuropeiskt eller utom-nordamerikanskt land, med undantag för japanska tidskrifter, då jag är omedveten om till vilken utsträckning forskningsvärlden har slagit sig till rot i dessa länder generellt. Diskrimineringen var till den grad att jag var medveten om en specifik nation, inte att artikeln valdes bort för det.

Jag tog inte hänsyn till från vilket håll de citerade forskarna hade tagit emot ekonomiskt stöd och om det möjligtvis medförde partiskhet hos författarna.