

## Terapötik Moleküllerin Aktarımında Kullanılan Yeni Nesil Biyomalzemeler

Ayşenur PAMUKCI, Hüseyin Saygın PORTAKAL, Erdal EROĞLU\*

Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Manisa, Türkiye

Geliş / Received: 22/09/2017, Kabul / Accepted: 02/08/2018

### Öz

Son yıllarda, RNA interferans mekanizmasının keşfedilmesiyle birlikte çeşitli ufak nükleik asit parçacıklarının (miRNA, siRNA, shRNA ve plazmid DNA vb.) transfeksiyonu giderek önem kazanmakta ve günümüzde birçok hastalığa sebep olan spesifik gen bölgelerinin susturulması için kullanılmaktadır. Birçok hastalığın tedavisinde kullanılması hedeflenen terapötik nükleik asitlerin, ilaç veya aşılardan doku ve hücrelere aktarılmasındaki engeller bu alandaki gelişmeleri sınırlamaktadır. Bu doğrultuda, polimer, inorganik ve lipid bazlı çeşitli biyomalzemeler veya bu biyomalzemelerden oluşan kompozitler çeşitli modifikasyonlara uğratılarak terapötik nükleik asit, ilaç veya DNA/protein aşısı aktarımı için uygun hale getirilmektedir. Aynı zamanda, toksik etkiyi azaltmak ve aktarımın yapılacağı hücreyi hedeflemek için çeşitli optimizasyon ve modifikasyonlar yapılarak nanoparçacıklar daha fonksiyonel hale getirilebilmektedirler. Yeni nesil terapötiklerin geliştirilmesinde; *i*) yeni nükleik asit tipleri, *ii*) transfeksiyon verimini sınırlayan biyolojik bariyerlerin aşılması, *iii*) daha fonksiyonel nano-biyomalzemelerin sentezi *in vitro/in vivo* ortamlarda yoğun bir şekilde araştırılmakta ve umut vaat eden gelişmeler yaşanmaktadır. Bu derleme makalesinde, literatürdeki güncel gelişmeler göz önünde tutularak farklı biyomalzemeler yapılarına göre sınıflandırılmış, ayrıntılı bir şekilde incelenmiş ve bu biyomalzemelerin terapötik uygulamalarda kullanımıyla ilgili örnek çalışmalara yer verilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyomalzemeler, Nanoteknoloji, Non-Viral Vektörler, Nükleik Asit Transfeksiyonu

## New Generation Biomaterials Used in Delivery of Therapeutic Molecules

### Abstract

Recently, with the discovery of the RNA interference mechanism, transfection of various small nucleic acid fragments (miRNA, siRNA, shRNA and plasmid DNA etc.) has been gradually gaining importance and it is nowadays being used for silencing of the specific gene regions causing many diseases. The barriers in delivery of therapeutic nucleic acids, drug, DNA or protein vaccines, which are aimed to used in treatment of many diseases, into tissue and cells restrict the developments in this field. Consequently, polymer, inorganic and lipid-based biomaterials or composites synthesized from aforementioned biomaterials are tailored through various modification for the delivery of nucleic acids, drugs and DNA/protein vaccines. Also, nanoparticles are able to be more functionalized by optimizing or modifying them to reduce the toxic effects and to target cell being transfected. In the development of new generation therapeutics; *i*) new nucleic acid types, *ii*) surpassing biological barriers restricting transfection efficiency, *iii*) synthesis of more functional nano-biomaterials are being intensively studied *in vitro/in vivo* conditions and promising developments are being experienced. In this review article, different biomaterials are classified depending on their structures, discussed in detail and reference studies regarding therapeutic applications of these biomaterials are presented in the light of recent developments in the literature.

**Keywords:** Biomaterials, Nanotechnology, Non-Viral Vectors, Nucleic Acid Transfection

### 1. Giriş

Günümüzde moleküler biyoloji ve nanoteknolojide yaşanan gelişmelerle birlikte gen tedavisi, gen susturulması ve rekombinant DNA/protein aşısı gibi tekniklerin *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda uygulamaları oldukça ilgi görmektedir. Bu amaçla çeşitli nükleik asitlerin biyolojik

bariyerleri geçerek hedef hücreye bozunmadan aktarımı ve nükleik asit tipine göre sitoplazma veya çekirdeğe transfeksiyonunun nano-biyomalzemeler yardımıyla gerçekleştirilmesi güvenli bir alternatif oluşturmaktadır. Biyoyumlu ve toksik etkisi düşük malzemelerin nükleik asitlerin aktarımında transfeksiyon ajanı

olarak kullanılmasıyla birlikte, biyolojik bariyerlerin aşılması, ilgilenilen hedef genin düzenlenmesi ve yüksek verim sağlanması kanser de dahil olmak üzere birçok hastalığın tedavisi için umut vaat etmektedir. Çeşitli nükleik asit tipleri, özellikleri ve kullanım amacına göre nanoparçacık içine enkapsüle edilerek transfeksiyon çalışmalarında kullanılmaktadır. Nükleik asit-temelli gen terapisi, nükleik asit dizisinin hücreye iletilmesiyle hedef mRNA'nın parçalanması, dolayısıyla hastalıklardan sorumlu olan genlerin susturulması olarak tanımlanır (Videira vd., 2014). Posttranskripsiyonel düzeyde işlev gösteren bu nükleik asit dizilerinin hedef sekansı spesifik olarak bloke edebilme yeteneği, bu yöntemin terapötik amaçlı kullanılmasına yol açmıştır. Bu amaçla kullanılan nükleik asitlerin başında susturucu RNA (siRNA), mikro RNA (miRNA), kısa hairpin RNA (shRNA) ve plazmid DNA (pDNA) gelmektedir (Ku vd., 2016). Yapılan çalışmalar, kemoterapötik ajan ve siRNA'nın kanser hücrelerine birlikte gönderilmesi durumunda bu ajanlara karşı olan duyarlılığın arttığını göstermiştir (Gandhi vd., 2014). Öte yandan, miRNA kullanımının birden fazla genin susturulmasını sağladığı gösterilmiştir (O'Bryan vd., 2017). Ancak mikro ve makro boyutlardaki birçok biyolojik engel bu terapötik moleküllerin etkinliğini ciddi oranda sınırlamaktadırlar.

## 2. Biyolojik Engeller ve Non-viral Vektörler

### 2.1. RNAi Bazlı Gen Regülasyonu Çalışmaları ve Bu Çalışmaları Sınırlayan Zorluklar

RNA interferans (RNAi) temelli çalışmaların transfeksiyon evresinde belli başlı zorluklarla ve biyolojik engellerle karşılaşmaktadır. Bu zorluklar ve engeller en geniş haliyle; *i)* damar içinde yoğun şekilde şeker, tuz, plazma ve serum proteinleri varlığında

oluşan ekzonükleolitik parçalanma, *ii)* vücudun savunma mekanizmasından sorumlu retiküloendotelial sistemin (RES) varlığı, *iii)* siRNA ve miRNA'ların çıplak olarak uygulanması halinde istenmeyen immün yanıtın tetiklenmesi, *iv)* negatif yüklü nükleik asitlerin yine negatif yüklü olarak değerlendirilen hücre membranından geçememesi, *v)* düşük pH değerlerine sahip olan endozom ve lizozomların varlığı, *vi)* bu koşullardan kaçılabilmesi halinde karşılaşılabilecek olan endonükleaz enzimlerinin varlığı, *vii)* çekirdek membranının hücre membranına benzer davranması sonucu nükleik asitlerin çekirdek içine alınamayışı ve *viii)* mikro düzeydeki engellerin yanı sıra; deri, akciğer epiteli, mukozal bariyerler, kan-beyin bariyeri gibi makro düzeydeki bariyerlerin varlığı olarak özetlenebilir (Jiang vd., 2014; Mokhtarzadeh vd., 2017; Wang, 2014). Bahsedilen bu engeller sebebiyle RNAi moleküllerinin transfeksiyonu oldukça sınırlı olmaktadır. Son yıllarda, terapötik amaçlı kullanılan nükleik asitlerin nano boyutlu vektörlere yüklenmesi, bu vektörler aracılığıyla hücresele engellerin aşılması ve sağlam olarak hücreye aktarılması yoğun olarak çalışılmaktadır.

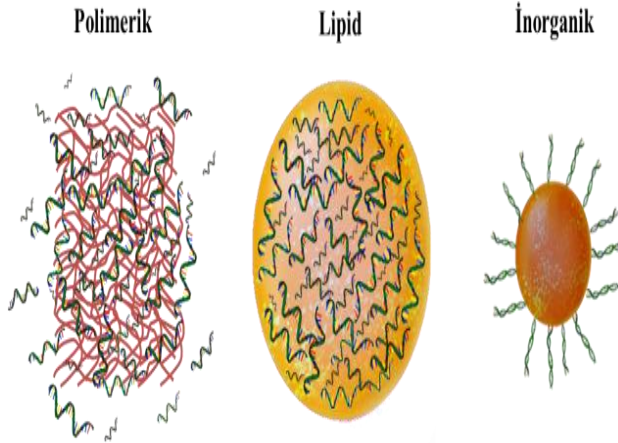
### 2.2. Transfeksiyonda Kullanılan Non-viral Vektörler

Nükleik asitleri biyolojik engellere karşı koruyup, taşınmasında kolaylık sağlayan vektörler en geniş haliyle viral ve non-viral olarak iki sınıfa ayrılır (Tablo 1). Bu doğrultuda günümüzde yürütülen transfeksiyon çalışmalarında non-viral vektör kullanımı önem kazanmıştır. Non-viral vektörler ise virüs gibi doğal taşıyıcıların kullanımının aksine; polimerik, lipit ve inorganik biyomalzemelere nükleik asitler gibi çeşitli terapötik ajanların yüklenmesi ile sentezlenen nano boyutlu taşıyıcılardır.

**Tablo 1.** RNAi bazlı çalışmalarda nanoboyutlu vektör tipleri ve bu vektörlerin transfeksiyon ajanı olarak kullanılan özellikleri (Jiang vd., 2014).

Vektörler	Transfeksiyonda Kullanım Şekli	Avantajları	Dezavantajları	Vektör Türleri
Viral Vektörler	Virüslerin doğal genetik materyal aktarım mekanizmasının kullanımı	Yüksek transfeksiyon verimi	Yüksek toksisite, istenmeyen immün yanıt, yüksek dozda kullanım riskleri	Adenovirüsler, Retrovirüsler, Lentivirüsler
Non-viral Vektörler	Organik ya da inorganik biyomalzemelerin kullanımı	Kolay sentezlenebilme, hücreye özel fonksiyon kazandırılabilme, yüksek kapasite, salım hızını kontrol edilebilme	Düşük transfeksiyon verimi	Lipit bazlı, polimer bazlı, inorganik biyomateryaller

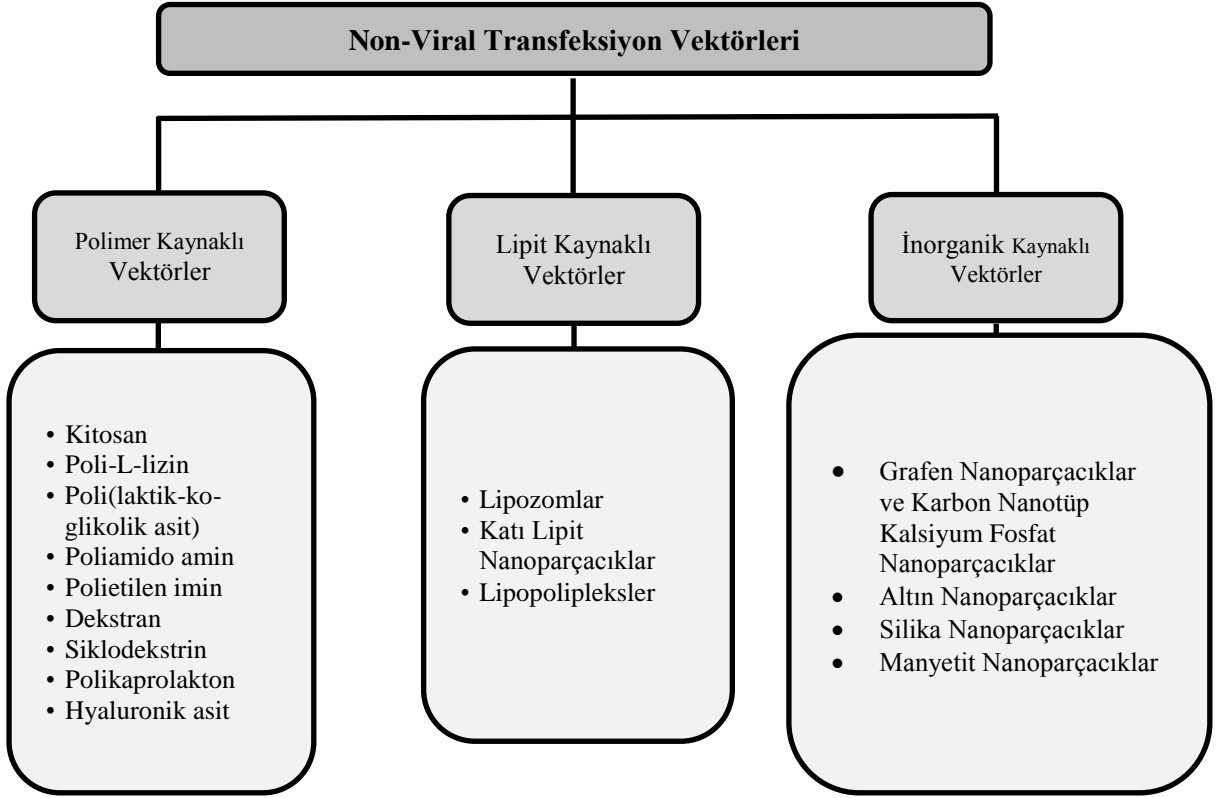
Polimerik nano vektörlerde nükleik asitler uzun polimer zincirleri arasına hapsedilirken (Eroğlu vd., 2013), lipitlerde (liposom vb.) hidrofilik özellik gösteren iç boşluğa yüklenmektedir (Zhang vd., 2015). İnorganik non-viral vektörlerde ise terapötik ajan genellikle yüzeye tutturulmaktadır (Mohammadi vd., 2015) (Şekil 1).



**Şekil 1.** Polimerik, lipit ve inorganik kaynaklı nano-biyomalzemelere terapötik nükleik asit yüklenmesi.

Bu çalışmalarda, negatif yüklü nükleik asitler ve yine negatif yüklü olarak değerlendirilen hücre membranı ile kolaylıkla etkileşime girebilme özelliğine sahip katyonik malzemeler genellikle tercih edilmektedirler. İyonik etkileşimlerin dışında kimyasal etkileşimler kullanılarak sentezlenen nano taşıyıcılar da bulunmaktadır (Jiang vd., 2014; Urie ve Rege, 2015). Yapılan çalışmalarda

bahsi geçen vektörler için en uygun boyutların 10 ile 100 nanometre arasında olduğu gözlenmiştir (Zhang vd., 2014a). İlaç taşınımındaki; *i*) pasif hedefleme, *ii*) aktif hedefleme, *iii*) manyetik alan doğrultulu hedefleme olarak özetlenebilen üç temel yaklaşım göze alındığında, uygulanacak yöntemde özgü nano taşıyıcı sentezlenebilmesi özelliği ile non-viral vektörler gelecek çalışmalar için umut vaat etmektedir (Yang ve Yu, 2016). Non-viral vektörler viral vektörlerle karşılaştırıldığında; *i*) kolay sentezlenebilme, *ii*) yüksek yük kapasitesi, *iii*) düşük toksisite, *iv*) düşük immün yanıt, *v*) özel fonksiyonlar kazandırılabilmesi ve *vi*) salım yönetiminin kolaylığı gibi avantajlara sahiptir (Sun vd., 2014). Non-viral vektörlerde gözlenen düşük transfeksiyon verimi bazı yüzey modifikasyonları (örnek olarak; PEGilasyon, aptamer veya ligand konjugasyonu) ile arttırılmaya çalışılmaktadır (Suk vd., 2016). Non-viral vektör tipleri ve bu vektörlerin sentezinde kullanılan organik ve inorganik biyomalzemeler Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2. Non-viral transfeksiyon vektörleri ve bu vektörlerin sentezinde kullanılan organik ve inorganik bazlı biyomalzemeler.

### 2.2.1. Polimer Kaynaklı Vektörler

Polimer kaynaklı taşıyıcılar non-viral vektör çeşitlerinden biri olup kontrollü nükleik asit aktarımı/salımı çalışmalarında sıklıkla tercih edilir (Chen vd., 2014). Doğal veya sentetik polimerlerden oluşan polimer kaynaklı vektörler polipeks, polimer bazlı misel veya diğer non-viral vektörlerle kompleks halinde bulunabilir. Bu biyomalzemelerin transfeksiyon verimi ve sitotoksite değerleri kullanılan polimerlerin özelliğine göre değişirken, doğal polimerlerin sentetik polimerlere göre genellikle daha az toksisiteye sahip olduğu görülür (Mokhtarzadeh vd., 2017; Yang vd., 2014). Genellikle biyobozunur ve biyouyumlu olan polimerlerin diğer avantajları; *i*) pasif hedeflemede kullanılabilmesi, *ii*) kimyasal modifikasyonlara elverişli fonksiyonel gruplar içermesi, *iii*) boyutunun ayarlanabilir olması, *iv*) kolay üretilmesi ve *v*) ligandlarla konjuge edilerek hedefe yönelik ilaç/nükleik asit aktarım sistemlerinde kullanılabilmesidir (Chen vd., 2014; Mokhtarzadeh vd., 2017; Wang, 2014). Bahsedilen tüm avantajlara

rağmen polimer kaynaklı vektörler polimer tipine göre bazı dezavantajlara sahip olabilmektedirler. Bunlara örnek olarak; *i*) salım hızının istenilen şekilde ayarlanamaması, *ii*) düşük yükleme kapasitesi ve *iii*) bunun sonucunda *in vivo* ortamda gözlenen düşük transfeksiyon verimi verilebilir. Lipit nanoparçacıklarıyla, inorganik nanoparçacıklarla veya diğer polimerlerle kompozit biyomateryaller oluşturularak yükleme kapasitesi ve nanoparçacığın dayanıklılığı artırılabilir (Mokhtarzadeh vd., 2017; Wang, 2014). Terapötik etkiyi artırmanın yollarından birisi de kullanılan polimerin yüzey özelliklerini PEGilasyon işlemi ile değişikliğe uğratarak daha fonksiyonel hale getirmektir. Yüzeyi poli etilen glikol (PEG) ile modifiye edilen nanoparçacıkların immunojenitesinin azaldığı, kan dolaşımında kalma süresinin arttığı ve retikuloendotelial sistemden daha iyi korunduğu bilinmektedir (Chen vd., 2014; Gupta vd., 2016). Negatif yüklü nükleik asitlerle elektrostatik etkileşim kurulabilmesi

için genellikle katyonik polimerler tercih edilir (Yang vd., 2014). Bu elektrostatik etkileşim nano/mikron boyutunda kompakt nanoparçacıkların sentezlenebilmesi için önemlidir (Mokhtarzadeh vd., 2017). Fakat yüksek moleküler ağırlığa sahip katyonik polimerlerin sitotoksositeye sahip olması bu polimerlerin transfeksiyonda kullanımını sınırlar. Bu sebeple düşük moleküler ağırlıklı katyonik polimerler diğer non-viral vektörlerle konjuge edilerek elektrostatik etkileşim ve yüksek transfeksiyon verimi sağlanmış olur (Yang vd., 2014). Sonuç olarak bu avantaj ve dezavantajlar göz önünde bulundurulduğunda günümüzde en çok kullanılan doğal polimerlerin kitosan, dekstran, hyaluronik asit ve sentetik polimerlerin ise poli-L-lizin (PLL), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poliamidoamin (PAMAM) ve polietilen imin (PEI) olduğu görülür.

### 2.2.1.1. Kitosan

Kitosan kontrollü ilaç ve nükleik asit aktarımında en çok kullanılan polisakkaritlerden birisidir. Lineer bir yapıya sahip olan kitosan, kitinin deasetilasyonu ile elde edilir. Biyobozunurluk, düşük toksisite, biyouyumluluk ve katyonik yük gibi özelliklere sahip olması nedeniyle bu polimer farmasötik alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Shi vd., 2014a). Kitosanın yapısındaki amin grubu polimerin asidik pH'da çözünmesine ve katyonik yüke sahip olmasına sebep olur (Gomes vd., 2016; Martirosyan vd., 2014). Katyonik yüke sahip olan kitosan anyonik maddelerle elektrostatik etkileşime girebilme yeteneği sayesinde aktif maddelerin nanoparçacık içine hapsedilmesinde büyük avantaj sağlar. Ayrıca, nanoparçacığın negatif yüklü hücre membranıyla etkileşime girmesini ve hücre içine alınımını kolaylaştırır (Mokhtarzadeh vd., 2017). Ek olarak, yapısındaki glukozamin birimleri kitosanın mukozal dokulara yapışabilmesine olanak verir, bu da polimerin ilaç/nükleik asit aktarım çalışmalarında sıklıkla kullanılmasını sağlar

(Martirosyan vd., 2014). Kitosanın moleküler ağırlığı ve asetilasyon derecesi bu polimerin dayanıklılık, boyut ve biyolojik aktivite gibi fizikokimyasal özelliklerini etkilemektedir (Martirosyan vd., 2014). Örneğin, kitosanın enzimatik bozunması bu polimerin asetilasyon derecesi ile ters orantılıdır (Mokhtarzadeh vd., 2017). Bu bilgi göz önüne alınarak kitosanın aktif maddeyi salım hızı asetilasyon derecesi değiştirilerek ayarlanabilir (Gomes vd., 2016). Eroğlu vd. (2013) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada kitosan ve pHEMA polimerleri kullanılarak sentezlenmiş olan kompozit nanoparçacıklar RSV-F genini içeren plazmidin enkapsülasyonu için kullanılmış ve transfeksiyon verimi *in vitro* ve *in vivo* ortamda incelenmiştir. Respiratuvar sinsitiyal virüsüne karşı DNA nano-aşısı olarak geliştirilen bu kompozit nanoparçacıklar HEp-2, Vero ve Cos-7 hücre hatlarına aktararak sitotoksosite ve transfeksiyon verimi incelenmiştir. Hücre hatlarında önemli bir sitotoksosite gözlenmemekle birlikte, *in vitro* ortamda yüksek transfeksiyon verimi gözlenmiştir. Bir diğer yandan, RSV-F geni BALB/c tipi farelerin iskelet kaslarına enjekte edilen pHEMA-kitosan nanoparçacıkları ile transfekte edilmiş ve bu genin *in vivo* ortamda da yüksek seviyede ifade olduğu gözlemlenmiştir (Eroğlu vd., 2013).

### 2.2.1.2. Poli-L-lizin

Poli-L-lizin (PLL) gen terapisi için kullanılan ilk katyonik polipeptittir (Tang vd., 2016). PLL lizin N-karboksi anhidritin katyonik polimerizasyonu sonucu oluşur (Mokhtarzadeh vd., 2017). Biyobozunur olan PLL nükleik asitlerin negatif yüklü fosfat grubuyla elektrostatik etkileşime girerek polielektrolit kompleksi oluşturabilir (Kim vd., 2016; Yang vd., 2014). Fakat pozitif yüzey yükünden kaynaklanan toksisitesi sebebiyle PLL'nin kullanımı sınırlıdır. Toksisite derecesi pozitif yüklerin sayısına ve dizilimine bağlı olarak değişebilir (Kim vd., 2016). PLL'ye çeşitli yüzey modifikasyonları

uygulanarak veya farklı maddelerle (PEI, PLGA, PAMAM, mezoporöz silika) kompozit oluşturularak, bu polipeptidin toksisitesi azaltılabilir (Kesharwani vd., 2015). PLL normal koşullarda düşük transfeksiyon yeteneğine sahiptir, bu durum PLL'nin sulu çözelti içinde veya hücre membranıyla etkileşim halindeyken düzensiz sargı biçimini almasından ya da polipleksin endozomdan yavaş salım yapılmasından kaynaklanır (Askarian vd., 2015; Zhang vd., 2014b). PLL'nin transfeksiyon verimi yine başka polimerler kullanarak kopolimer oluşturulmasıyla artırılabilir (Tang vd., 2016). Bunlara örnek olarak PEI-g-PLL, PZLL-b-PAMAM veya MPEG-PLLD-Arg kopolimerleri örnek olarak verilebilir (Gao vd., 2016; Lin vd., 2014; Lin vd., 2017a). Askarian vd. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada PLL-alkil-PEI kopolimerleri hazırlanarak bu kopolimerin akciğer kanseri hücre hattına (A549 hücre hattı) gen aktarımının etkisi incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada, shRNA plazmidi yüklenmiş PLL-alkil-PEI kopolimerinin sitotoksitesinin azaltılması ve düşük tamponlanma kapasitesinin artırılması amaçlanmıştır. Sonuç olarak bu kompozit polimerle aktarımı gerçekleştirilen shRNA plazmid vektörünün Bcl-xL geninin ifadesini %41,6 oranında düşürdüğü sonucuna varılmıştır. Ayrıca, üretilen nanoparçacıkların serum ortamında düşük sitotoksositeye, iyi tamponlama kapasitesine ve iyi transfeksiyon verimine sahip olduğu gözlenmiştir (Askarian vd., 2015).

### 2.2.1.3. Poli(laktik-ko-glikolik asit)

Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Kurumu (EMA) tarafından terapötik uygulamalar için onaylanmış olan biyouyumlu, biyobozunur ve toksik olmayan bir kopolimerdir (Mokhtarzadeh vd., 2017). PLGA nanoparçacıkları virus, peptit, lipopeptit, antijen, tümör ilişkili antijen gibi birçok molekülün aktarımında kullanılmaktadır (Gupta vd., 2016). PLGA,

laktik asit ve glikolik asidin kopolimerizasyonu sonucu oluşturulur ve oluşan kopolimer iki molekülün de özelliklerini taşır (Fonseca vd., 2014). Monomerleri birbirlerine ester bağlarıyla bağlanan PLGA fizyolojik pH'da nötrdür (Adijanto ve Naash, 2015). PLGA'nın biyobozunurluk ve salım hızı gibi fiziksel özellikleri polimerin içerdiği glikolik asit-laktik asit oranı değiştirilerek ayarlanabilir (Bishop vd., 2015). Laktik asit içeriği arttıkça nanoparçacığın bozunma hızı azalır (Adijanto ve Naash, 2015). PLGA'nın bozunma hızı ayrıca hidrofobiklik derecesi, polidispersite indeksi, camısı geçiş sıcaklığı ve pH gibi etmenlere de bağlıdır (Mokhtarzadeh vd., 2017). Zou vd. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, PLGA nanoparçacıkları SKOV3 hücre hattında ve yumurtalık kanserine sahip dişi BALB/c farelerde FAK ve CD44 genlerini susturmak amacıyla plazmid shRNA aktarımı için kullanılmıştır. SKOV3 hücre hattında mRNA ifadesinin yaklaşık %70 oranında azaldığı belirtilirken, *in vivo* ortamda da benzer değerler elde edilmiştir. Hiçbir toksisite gözlenmemekle birlikte, yumurtalık kanseriyle ilişkilendirilen bu genlerin susturulması tümör büyümesinde azalmayı ve tümör hücrelerinde apoptozun artmasını sağlamıştır. Yapılan bu çalışma, PLGA nanoparçacıklarının nükleik asit aktarımında etkili ve güvenilir bir şekilde kullanılabilirliğini açıkça göstermektedir (Zou vd., 2013).

### 2.2.1.4. Poliamidoamin

Poliamin polimerlerden birisi olan PAMAM, yapısında çekirdek olarak amonyak veya etilendiamin (EDA) içeren katyonik ve sferik bir makromoleküldür (Kang vd., 2015). PAMAM polimeri dendrimer adı verilen, bir diğer deyişle tekrarlayan ağaçsı dallanmaya sahip olan bir yapıya sahiptir (Fan vd., 2016). PAMAM bu ağaçsı dallanma sayesinde çeşitli molekülleri hapsetmeye olanak veren iç boşluklar içerir (Adijanto ve Naash, 2015).

PAMAM yüzeyinde DNA ve siRNA gibi nükleik asitlere bağlanmayı sağlayan katyonik amin grupları içerir. Ayrıca, amin grupları dendripleks adı verilen yapıyı oluşturarak nükleik asitlerin hücre içine alımını artırır. (Kesharwani vd., 2015). PAMAM dendrimerleri kullanılarak pDNA aktarımının kök hücre dahil çeşitli hücre hatlarında etkili bir şekilde gerçekleştirildiği gösterilmiştir (Adijanto ve Naash, 2015). Günümüzde de PAMAM'ın pDNA ile olan etkileşimi göz önüne alınarak geliştirilen DNA transfeksiyon kitleri (PolyFect®, SuperFect®) bulunmaktadır (Kesharwani vd., 2015). PAMAM'ın yüksek katyonik yüzey yüküne sahip olması, bu polimeri toksik hale getirir ve nükleik asit transfeksiyonu çalışmalarında kullanılmasını sınırlar. Fakat PAMAM gibi dendrimerlerin toksisitesinin ayrıca tür, boyut ve doz gibi etmenlere de bağlı olduğu bilinmektedir (Kesharwani vd., 2015). PEGilasyon veya hedefleyici ligand kullanımı gibi çeşitli modifikasyonlar yapılarak katyonik yükten kaynaklanan toksisite azaltılabilir (Zhang vd., 2014b). Askarian vd. (2017) PAMAM'ı doğal bir polimer olan pullulan ile konjuge etmiş ve oluşan kompozit nanoparçacıkların insan karaciğer (HepG2) ve mürin nöroblastom (Neuro2A) hücre hatları üzerinde sitotoksikite ve transfeksiyon verimlerini incelemişlerdir. Pullulanın karaciğer hücrelerinde bulunan asialoglikoprotein reseptörleri ile etkileşime geçebilmesi hedefleyici ligand olarak kullanılmasına sebep olmuştur. Sonuç olarak, hücre hatlarına gönderilen pDNA ile yüklü polipekslerde önemli bir toksisite gözlenmemiş ve pullulanın PAMAM'a konjuge edilmesiyle birlikte transfeksiyon veriminde 1,5-2 kat artış gözlenmiştir (Askarian vd., 2017).

### 2.2.1.5. Polietilen İmin

Polietilen imin (PEI) yüksek katyonik yüke sahip olan, lineer veya dallanmış halde bulunabilen, yüksek transfeksiyon verimine

sahip olan sentetik bir aziridin polimerdir (Lai, 2014). Lineer PEI katyonik halka açma polimerizasyonu sonucu oluşturulurken dallanmış PEI asit-katalizli halka açma polimerizasyonu sonucunda oluşturulur (Lai, 2014). Lineer PEI, yapısında primer ve sekonder amin içerirken, dallanmış PEI'nin yapısında bunlara ek olarak tersiyer grup da bulunmaktadır (Pandey ve Sawant, 2016). Primer aminler nükleik asit kondensasyonundan sorumluyken, sekonder ve tersiyer aminler ise tamponlayıcı özelliğe sahiptir (Fan vd., 2016). PEI'nin yüksek katyonik yüke ve toksisiteye sahip olması, yapısında primer, sekonder ve tersiyer amin gruplarını bulundurması ile açıklanmaktadır (Bishop vd., 2015). Yapısal olarak incelendiğinde, lineer PEI'nin dallanmış PEI'ye göre daha yüksek transfeksiyon verimine ve düşük toksisiteye sahip olduğu görülür (Yang vd., 2014). Diğer biyomateryallerde de olduğu gibi PEI'nin sitotoksitesini azaltmak ve biyoyumluluğunu arttırmak için çeşitli modifikasyonlar yapılabilir. PEI; kitosan, PEG, PLL, dekstran gibi çeşitli polimerlerle, herceptin veya TAT peptidi gibi hedefleyici ligandlarla ve hidrofobik moleküllerle modifiye edilebilir (Pandey ve Sawant, 2016). Gao vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada, PEI ve PEI-PLL kopolimerinin MCF-7 hücrelerine (insan meme kanseri hücreleri) pDNA ve anti-miR-21 oligonükleotidi aktarımındaki verimliliği karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, en iyi verimin PEI-PLL kompleksi ve nükleik asit arasındaki ağırlık oranı 10/1 olduğu durumda elde edildiği gösterilmiştir. Ayrıca, bu kopolimerin PEI'ye oranla daha az toksisiteye sahip olduğu da ifade edilmiştir (Gao vd., 2015).

### 2.2.1.6. Dekstran

Dekstran ilaç ve nükleik asit aktarımında kullanılan, FDA tarafından onaylanmış, biyoyumlu, toksik olmayan ve biyobozunur bir polimerdir (Mokhtarzadeh vd., 2017; Ochrimenko vd., 2014). Yüksek moleküler

ağırlıklı bir polisakkarit olan dekstran bakteriyel kaynaklıdır ve  $\alpha$ -1,6 ve  $\alpha$ -1,3 bağlarıyla bağlı glikopiranoz birimlerinden oluşmaktadır (Adijanto ve Naash, 2015). Kimyasal yapısında bulunan hidroksil grupları dekstranı çeşitli modifikasyonlar için elverişli kılar (Mokhtarzadeh vd., 2017). Yüksek çözünürlüğe sahip olan dekstran düşük immunojenisiteye sahiptir (Mai vd., 2015). Fakat dekstran fizyolojik pH'da nötr davrandığı için nükleik asitlerle etkin bir şekilde etkileşime giremez (Adijanto ve Naash, 2015). Bu yüzden PEI, PLL, PAMAM, protamin, spermin ve dietilaminoetil gibi çeşitli katyonik polimerler veya moleküller kullanılarak modifikasyonlar yapılabilir (Ochrimenko vd., 2014). Mai vd. (2015) dekstranı PAMAM ile kimyasal olarak modifikasyona uğratmış ve oluşturulan kompozitler HEK293 hücrelerine (insan embriyonik böbrek hücreleri) pDNA (plazmid PEGFP-N3) aktarımı için kullanılmıştır. Sonuç olarak, PAMAM kullanımının dekstranın tamponlama kapasitesini ve pDNA'ya bağlanma yeteneğini arttırdığı gözlenmiştir (Mai vd., 2015).

### 2.2.1.7. Siklodekstrin

Siklodekstrinler (CD) üç farklı ( $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD ve  $\gamma$ -CD) formda bulunabilen halkalı yapıya sahip oligosakkaritlerdir (Deng vd., 2014). Siklodekstrin yaklaşık olarak 7 glukoz monomerinin  $\alpha$ -1,4 bağıyla bağlanmasıyla oluşturulur (Lai, 2014). Doğal bir polimer olan siklodekstrin düşük immunojenisite ve yüksek miktarda nükleik asit yükleme kapasitesine sahiptir (Li vd., 2015). Nükleik asitlere olan bağlanma afinitesi ve absorpsiyonu artırması siklodekstrinin nükleik asit aktarımında kullanılmasına sebep olan avantajlardır (Lai, 2014). Diğer polimerlerin transfeksiyon verimini arttırmak için düzenleyici malzeme ya da bağlayıcı madde olarak da siklodekstrinden yararlanılabilir (Lai, 2014). Fitzgerald vd. (2016)'nin yaptıkları çalışmada, PEG ve anizamitle birleştirilen hidrofobik adamantan

molekülleri dilizin- $\beta$ -siklodekstrini modifiye etmek için kullanılmıştır. Oluşturulan kompleksin PLK1-siRNA aktarımında kullanılması ve prostat kanserinde rol alan PLK1 geninin susturulması amaçlanmıştır. Hedefleyici ligand olan anizamit kullanılarak prostat kanseri hücrelerinde fazla üretilen sigma reseptörleri hedef alınmış, bu sayede PLK1-siRNA içeren nanoparçacıkların spesifik olarak bu hücreler tarafından sitoplazmaya alınması sağlanmıştır. Sonuç olarak, oluşturulan nanoparçacığın hedef genin ifadesini azalttığı gözlenmiştir (Fitzgerald vd., 2016).

### 2.2.1.8. Polikaprolakton

Alifatik bir poliester olan polikaprolakton (PCL), biyoyumluluk, düşük toksisite, yavaş bozunurluk, düşük maliyet gibi özellikleri sayesinde ilaç/nükleik asit aktarımında kullanılmaktadır (Tang vd., 2014). Sentetik bir polimer olan PCL, kaprolaktonun (CL) halka açma polimerizasyonu sonucu oluşturulur (Tang vd., 2016). PCL'nin fizyolojik ortamda yavaş bir hızda bozunması polimerin hidrofobik ve yarı kristal bir yapıda olmasından kaynaklanır. Bu bozunma yapısındaki ester bağlarının hidrolizi sonucu gerçekleşir (Kumar vd., 2016; Mokhtarzadeh vd., 2017). PCL kullanımıyla, vektör sistemlerinin hücre membranına olan afinitesini artırabilir (Endres vd., 2014). Tang vd. (2014) tarafından trimetil kitosan ve poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (TMC-g-PCL) kullanılarak graft kopolimerizasyon yöntemiyle sentezlenen polipleksler HEK293T hücre hattına (insan embriyonik böbrek hücre hattı) pDNA aktarımı için kullanılmıştır. Oluşturulan TMC-g-PCL/pDNA poliplekslerinin yapısında PCL'nin bulunması bu poliplekslerin hücre membranıyla olan hidrofobik etkileşimini arttıracığı düşünülmüştür. Böylece bu etkileşimden faydalanılarak transfeksiyon veriminin artması hedeflenmiştir. Çalışmalar sonucunda TMC-g-PCL polipleksinin pDNA'ya bağlanma yeteneğinin yüksek



olduğu gözlenmiş fakat transfeksiyon veriminin beklenenden az olduğu belirtilmiştir (Tang vd., 2014).

### 2.2.1.9. Hyaluronik Asit

Hyaluronik asit (HA), birçok dokunun ekstrasellüler matriksinde bulunan ve D-glukuronik asit ve N-asetil-D-glukozamin birimlerinden oluşan doğal bir polisakarittir (Amjad vd., 2017; Mokhtarzadeh vd., 2017). Hidrofilik, anyonik, biyobozunur, biyoyumlu, nonimmunojenik ve sulu ortamda yüksek çözünürlüğe sahip bir polimer olan hyaluronik asit, düşük ve yüksek moleküler ağırlıklarda bulunabilmektedir (Jiang vd., 2014). Hyaluronik asidin gen terapisinde kullanılması için uygulanan en yaygın modifikasyon, polimer yapısına amin gruplarının eklenmesi ve böylece transfeksiyon veriminin artırılmasıdır (Oliveira vd., 2016). Hyaluronik asidin bir diğer kullanım amaçlarından biri ise antikanser ilaçların veya nükleik asitlerin aktarımı için geliştirilen nanoparçacıkların yüzeyinin kaplanmasında kullanılmasıdır (Dosio vd., 2016). Hyaluronik asit DNA ve polikatyondan oluşan nanoparçacıkların yüzeyini negatif yüke çevirmek için kullanılabilir, böylece pozitif yükten kaynaklanan toksisite azaltılmış olur (Dosio vd., 2016; Ito vd., 2014). Ayrıca nanoparçacıkların hyaluronik asit ile kaplanması DNA komplekslerinin dağılımını önleyebilir veya dış yüzeyde bulunan hyaluronik asit, hedefleyici ligand görevi görerek malign hücreler hedef alınabilir (Ito vd., 2014). Birçok tümör tipinde hyaluronik asit reseptörlerinin fazla oranda üretilmesi, hyaluronik asidin nükleik asit transfeksiyonu çalışmalarında kullanımını yaygınlaştırmıştır (Jiang vd., 2014). Hyaluronik asidin karboksilik grupları membran reseptörleriyle etkileşimi sağlar ve bu reseptörlere en yaygın çalışılan örnek olarak CD44 reseptörü verilebilir (Dosio vd., 2016; Oliveria vd., 2016). Lin vd. (2017b) tarafından yapılan bir çalışmada düşük (29

kDa) ve yüksek (120 kDa) moleküler ağırlıklı hyaluronik asit (LHA ve HHA) PLGA-PEG kopolimeri ile konjuge edilmiş ve bu kopolimer DOTAP ve pDNA'dan oluşan lipopleksin enkapsülasyonu için kullanılmıştır. Çalışmada dört farklı hücre hattında (CD44-pozitif MCF-7 hücre hattı, CD44-pozitif MDA-MB-231 hücre hattı, CD44-negatif HepG2 hücre hattı ve L929 normal hücre hattı) CD44 reseptörü hedef alınmış ve HHA ve LHA'nın transfeksiyon verimi, sitotoksosite ve stabilite üzerine olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. DOTAP/DNA lipopleksi PLGA-PEG, LHA-PEG-PLGA ve HHA-PEG-PLGA kopolimerleri ile enkapsüle edilmiş ve DNA enkapsülasyon verimleri sırasıyla %99.9, %86.7 ve %95.7 olarak bulunmuştur. PLGA-PEG kopolimeri ve DOTAP/DNA lipopleksi pozitif yüke sahipken LHA/HHA-PLGA-PEG kopolimerlerinin hyaluronik asidin karboksil gruplarından ötürü negatif yük sergilediği gözlenmiştir. Böylece pozitif yükten kaynaklanabilecek toksisite azaltılmıştır. Çalışmalar sonucu, HHA konjuge edilmiş lipozomların LHA içeren lipozomlara oranla CD44 reseptörlerine daha güçlü bağlandığı ve böylece CD44-pozitif hücrelere karşı daha seçici olduğu gözlemlenmiştir (Lin vd., 2017b).

### 2.2.2. Lipit Kaynaklı Vektörler

Lipit kaynaklı vektörler ilaç ve nükleik asit yükleme/salım çalışmalarında en çok kullanılan non-viral vektörler arasında yer almaktadır. Lipit kaynaklı vektörlerin yüksek biyoyumluluk, kontrollü salım yapabilme, düşük sitotoksosite ve hücre membranına benzerliği sebebiyle hücre içine kolay alınabilme gibi önemli özellikleri bulunmaktadır (Chen vd., 2016; Ezzati Nazhad Dolatabadi ve Omid, 2016). Son yıllarda yürütülen çalışmalara örnek olarak Liu vd. (2014)'nin yaptıkları nanoparçacık ile siPlk1-fosfolipit konjugasyonu ve DOX anti-kanser ilaç salımı çalışmaları verilebilir. Hayvan modellerinde yürüttükleri bu çalışmalar ile tümör büyümesini engellemede

önemli başarı kaydedilmiştir (Liu vd., 2014). Lipit kaynaklı vektörler lipozomlar, katı lipit nanoparçacıklar, lipopolipeksler olarak sınıflandırılabilir.

### 2.2.2.1. Lipozomlar

Lipozomların keşfi 1960'lı yıllara dayanmakta olup uygun fiziksel özellikleri sebebiyle ilaç salımı ve enzim enkapsülasyon çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Leung vd., 2014). Lipozomlar temelde sulu bir bölümü kaplayan ince fosfolipit tabakasından oluşmaktadır (Knudsen vd., 2015). Günümüzde yük özelliklerine göre katyonik, anyonik ve nötral lipozom çeşitleri bulunmaktadır. Katyonik lipozomlar negatif yüklü genetik materyal ile elektrostatik etkileşim kurması ve endozom keselerinden zarar görmeden çıkabilmesi gibi özellikleri nedeniyle transfeksiyon ajanı olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Yang vd., 2014). Bu amaçla en sık kullanılan katyonik lipozomlara örnek olarak Lipofektamin 2000, DODAP (1,2 dioleoyl-3-dimetilamonyum propan), DOTAP (1,2 dioleoyl-3-trimetilamonyum propan) ve DOTMA (N-[1-(2,3-dioleoyloksi) propil]-N, N-trimetilamonyum klorür) verilebilir (Leung vd., 2014; Yang vd., 2014). Zhang vd. (2015)'nin yaptıkları çalışmada, kalsiyum fosfat/siRNA nanoparçacığı polikasyon lipozom ile birleştirilip PEI-kolesterol yüzey modifikasyonu uygulanmış ve düşük sitotoksositeye sahip olduğu belirtilen bu yeni nanoparçacığın endozomdan kaçış aşamasında ve hedef genin susturulmasında oldukça verimli sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir (Zhang vd., 2015). Katyonik lipozomların yüzeyindeki pozitif yük yoğunluğu arttıkça sitotoksitesi arttığından anyonik özellik taşıyan başka materyallerle kompozit uygulamaları ve anyonik lipozomların kullanımı önem kazanmıştır. Bu amaçla en sık kullanılan anyonik lipozomlara örnek olarak dioleoyil fosfotidil gliserol (DOPG) ve 1,2-dioleoyil fosfotidil etanolamin (DOPE) verilebilir (Zhang vd., 2014b). Nötral lipozomların düşük

sitotoksosite ve proteinlerle etkileşime girmeme gibi avantajları bulunmaktadır. Bu sebeple nötral lipozomlar nükleik asitleri nükleaz enzimlerinden koruyarak hedefe daha etkin biçimde aktarmaktadır. Bu amaçla kullanılan nötral lipozomlara örnek olarak 1,2-distearol-sn-glisero-3-fosfoetanolamin [metoksi (polietilen glikol)-2000] (DSPE-PEG2000) ve dioleoyil fosfatidil kolin (DOPC) verilebilir (Yang vd., 2014; Zhang vd., 2014b).

### 2.2.2.2. Katı Lipit Nanoparçacıkları

Katı lipit nanoparçacıklarının kullanımı 1990 yılında başlamış olup günümüzde hâlâ devam etmektedir (Adijanto ve Naash, 2015). Bir katı lipit nanoparçacığın yapısı katyonik lipit ve genetik materyal konjugasyonundan oluşmaktadır (Chen vd., 2015a). Nanoparçacık çalışmalarında *i*) birim kütledeki yüzey alanının genişliği, *ii*) materyal çevresiyle iyi temas kurabilmesi ve *iii*) hedeflenen alana kolay ulaşabilmesi gibi gereklilikler doğrultusunda parçacığın küçük boyutlu olması arzu edilir. Bu doğrultuda genellikle 100 nm'den düşük yarıçapa sahip katı lipit nanoparçacıkları, geniş yüzey alanına sahip olduğundan yüksek adsorpsiyon özelliği göstermektedir (Kalaycioglu ve Aydoğan, 2016). Ayarlanabilir salım özelliği, biyouyumluluğu, yüksek kararlılığı, hapsettiği aktif materyal (ilaç/genetik materyal) ile yaptığı etkileşimler ve çeşitli yollarla vücuda verilebilmesi gibi özellikleri ile katı lipit nanoparçacıkları nükleik asit transfeksiyonu çalışmalarında ideal nanoparçacıklardan biri haline gelmiştir. Katı lipit nanoparçacıklarının nispeten düşük depolama miktarı ve düşük ilaç salımı gibi dezavantajları gözlemlense de, kararlı yapısını 2-3 yıldan uzun süre koruyabilmesi en önemli avantajlarından biridir (Adijanto ve Naash, 2015; Kalaycioglu ve Aydoğan, 2016). Katı lipit nanoparçacıkların sentezinde yağ asitleri, trigliseritler, kısmi gliseritler ve steroidler kullanılabilir (Ozpolat vd., 2014). Ayrıca transfeksiyon verimliliğini arttırmak

amacıyla biyouyumlu diğer malzemeler ile kompozit biyomateryal üretimi üzerinde çalışılmaktadır (Adijanto ve Naash, 2015).

### 2.2.2.3. Lipopolipeksler

Lipopolipeksler en genel haliyle katyonik polimerler, katyonik lipitler ve nükleik asitlerden oluşan konjugasyonlardır. Lipit ve polimer kaynaklı vektörlerin sentezinden oluşan lipopolipekslerin yüksek biyouyumluluk özelliği transfeksiyon çalışmalarında kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Germershaus ve Nultsch, 2015). Lipopolipeks sentezinde çeşitli lipit türleri ve PEI, PLL, protamin, kitosan, polialilamin (PAA) gibi çeşitli polimer türleri kullanılmaktadır. Shi vd. (2014b)'nin yaptıkları çalışmada G0-C14 katyonik lipit molekülü ile hidrofobik PLGA polimeri sentezlenmiştir. Bununla beraber nötral lipit-PEG yüzey modifikasyonu uygulanan hibrid nanoparçacığın sürdürülebilir olduğu, uzun ömürlü gen susturma için umut vaat ettiği ve tümör hücrelerinin büyümesini durdurmada oldukça etkin rol oynadığı gözlemlenmiştir (Shi vd., 2014b).

### 2.2.3. İnorganik Kaynaklı Vektörler

Nükleik asit ve ilaç salım çalışmalarında kullanılan non-viral vektör tiplerinden bir diğeri de inorganik kaynaklı vektörlerdir. İnorganik kaynaklı vektörlerin diğer non-viral vektörlere kıyasla sergilediği avantajlar; *i*) kolay sentezlenmesi, *ii*) üstün boyut/şekil özelliklerine sahip olması, *iii*) yüksek yük kapasitesi, *iv*) mikroorganizmalara karşı dirençli olması sebebiyle uzun raf ömrü, *v*) üstün fizikokimyasal (manyetik, elektrik, fototermal gibi) özellikler göstermesi ve *vi*) kan dolaşımında uzun süre bulunabilmesi dolayısıyla belli doku bölgelerinde (karaciğer ve dalak gibi) kümelenebilmesi olarak özetlenebilir (Urie ve Rege, 2015; Wang vd., 2016). Ayrıca bu vektörlerin yüksek sitotoksitelerini azaltmak ve biyolojik engellere karşı dayanıklılığını arttırmak amacıyla yüzey modifikasyon çalışmaları yapılmaktadır (Vago vd., 2016). İnorganik

vektörler, grafen nanoparçacıkları ve karbon nanotüpleri, altın nanoparçacıklar, manyetik nanoparçacıklar, kalsiyum fosfat nanoparçacıklar ve silika nanoparçacıklar olarak sınıflandırılabilir.

#### 2.2.3.1. Grafen Nanoparçacıkları ve Karbon Nanotüpleri

Grafen hekzagonal yapıda bağ oluşturmuş karbon atomlarından oluşan tek katmanlı malzemedir (Urie ve Rege, 2015). Grafen malzemesinin sahip olduğu avantajlar; *i*) aromatik gruplarla  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri kurabilmesi, *ii*) geniş yüzey alanı sayesinde çok sayıda aromatik grupla etkileşim kurabilmesi, *iii*) diğer kovalent ve elektrostatik etkileşimlere yatkınlığı, *iv*) bal peteği (hekzagonal) yapısının suda çözünmeyen çeşitli ilaçlarla etkileşim kurabilmesi, *v*) yüksek yük kapasitesi, *vi*) düşük sitotoksite göstermesi ve *vii*) düşük maliyetli üretimi olarak özetlenebilir (Gulzar vd., 2017; McCallion vd., 2016; Urie ve Rege, 2015). Hidrofobik özelliğinden dolayı sulu ortamda çözünmemesi ise grafen vektörlerinin kullanımını sınırlayan en önemli dezavantajdır (McCallion vd., 2016). Grafen malzemesinin küre şeklinde düzenlenmiş morfolojisi fulleren, nano boyutlu silindir şeklinde düzenlenmiş morfolojisi ise karbon nanotüp olarak tanımlanır (McCallion vd., 2016; Vago vd., 2016). Bu yapılar tek katmanlı grafen nanovektörler ile aynı avantaj ve dezavantajlara sahiptirler. Bu üç morfoloji arasında bahsi geçenlerden farklı avantajlara sahip olması nedeniyle karbon nanotüpler en ilgi çekici olanlarıdır. Karbon nanotüpler yüksek uzunluk/çap oranına sahip olan nano boyutlu silindirlerdir (Chen vd., 2015b). Karbon nanotüpler içerdikleri silindir birimi sayısına göre tek katmanlı (tek duvarlı) ya da çok katmanlı (çok duvarlı) olarak bulunabilirler. Tek duvarlı karbon nanotüplerin çap uzunluğu yaklaşık 1 nm iken uzunluğu 50 nm'den mikron boyutlarına kadar çıkabilir. Çok duvarlı karbon nanotüpler ise 100 nm çapına ve 1 ile 10

mikron arasında değişen uzunluğa sahip olabilmektedirler (Caoduro vd., 2017). Karbon nanotüplerin kızılötesi ışın değerlerine yakın dalga boylarını absorblama özelliği sayesinde nükleik asit salım süreci izlenebilmektedir (Urie ve Rege, 2015; Vago vd., 2016). Karbon nanotüplerin birimleri ile hücre membran proteinlerinin aromatik amino asit yan zincirleri arasında katyon- $\pi$  etkileşimleri bu nanovektörlerin endositoza uğramadan ve enerji harcanmadan nano boyutlu bir iğne gibi hücre içine girmesini sağlamaktadır (Caoduro vd., 2017; Vardharajula vd., 2012). Bunların yanı sıra karbon nanotüplerin kullanımını sınırlayan bazı etmenler; sulu ortamdaki düşük çözünürlüğü, düşük biyoyumluluğu, mitokondri aktivitesinde değişikliklere sebep olması, oksidatif stres, DNA hasarı ve membran hasarı sebebiyle yüksek sitotoksositeye sahip olması olarak özetlenebilir (Vardharajula vd., 2012). Son yıllarda yapılan bir çalışmada Mohammadi vd. (2015) tek duvarlı karbon nanotüpü piperazin-PEI türevi ile birleştirmiş ve daha fonksiyonel hale getirilen bu yeni biyomalzeme meme kanserine karşı gen terapisi çalışmalarında kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda bu yeni vektörün yüksek transfeksiyon verimliliğine sahip olduğu gözlemlenmiştir (Mohammadi vd., 2015). Benzer şekilde Hollanda vd. (2014) grafen ile karbon nanotüpleri birlikte kullanarak nano boyutta olan kompozit vektörler üretmiş ve bu vektörlerin ticari amaçla kullanılan Effectene kitiyle karşılaştırıldığında daha yüksek transfeksiyon verimine sahip olduğunu, düşük sitotoksosite gösterdiğini ve su içinde kolayca dağılabildiğini ifade etmişlerdir (Hollanda vd., 2014).

### 2.2.3.2. Altın Nanoparçacıklar

Altın nanoparçacıklar kızılötesi ışına yakın değerleri ve X-ray ışınlarını yakalama özelliği nedeniyle nanoteknoloji alanında ilk olarak biyomedikal görüntüleme kullanılmıştır (Urie ve Rege, 2015). Bu

özellikleri sayesinde altın nanoparçacıkları karanlık alan mikroskopi, fototermal mikroskopi, geçirimli elektron mikroskobu gibi tekniklerle görüntülenebilmekte ve hücre içine alımı kolayca gözlemlenebilmektedir (Adijanto ve Naash, 2015). Altın nanoparçacıklarının yüksek kararlılık, yüksek biyoyumluluk, düşük sitotoksosite, tiyol gruplarına karşı afinite ve yüksek yüzey aktivitesi gibi avantajlarının yanı sıra transfeksiyon verimliliğini olumsuz etkileyen düşük DNA bağlama kapasitesi gibi dezavantajları mevcuttur (Sun vd., 2014; Vago vd., 2016). Ayrıca bu nanoparçacıklar nano-küre, nano-çubuk nano-kafes ve nano-kabuk morfolojilerinde bulunabilmektedirler (Urie ve Rege, 2015). Son yıllardaki bir çalışmada Tiwari vd. (2014) altın nanoparçacıklarını viral bir protein olan VG-21 hücre geçiş proteinleri ile daha fonksiyonel hale getirdiklerini belirtmişlerdir. Herhangi bir sitotoksosite göstermeyen bu nanoparçacığın çeşitli dokulara çıplak altın nanoparçacıklarına oranla daha yüksek verimle girebildiği ve dolaşım sistemi ile kolayca temizlenebildiği gözlemlenmiştir (Tiwari vd., 2014).

### 2.2.3.3. Manyetik Nanoparçacıklar

Manyetik nanoparçacıklar yüksek biyoyumluluğa sahip inorganik kaynaklı nanovektör türlerinden biridir. En sık kullanılan manyetik nanoparçacıklar demir oksit ve mangan oksitlerdir (Urie ve Rege, 2015; Zhang vd., 2014a). Ayrıca bu vektörler sahip oldukları kontrast özellikleri sebebiyle manyetik rezonans görüntüleme (MRI) de kullanılmaktadırlar (Vago vd., 2016). Manyetik nanoparçacıkları ideal kılan özelliklerinden biri de dışardan uygulanan manyetik alan doğrultusunda belli bölgelerde kümelenebilmeleridir. Bu sayede nükleik asitlerin fagositoz ile alımı tetiklenmiş olup transfeksiyon verimliliğinde artış gözlenmektedir (Sun vd., 2014). Manyetik nanoparçacıklarının yüksek sitotoksiteleri ve oksitlenmeye olan duyarlılıkları kullanımlarını sınırlamaktadır. Bu olumsuz

özellikleri ortadan kaldırmak amacıyla çeşitli malzemelerle birleştirilerek kompozit vektör üretim çalışmaları bulunmaktadır. Ayrıca aktif hedefleme molekülleri transfeksiyon verimliliğini arttırmak için manyetik nanoparçacıklara tutturulabilmektedirler (Urie ve Rege, 2015; Vago vd., 2016). Son yıllardaki bir çalışmada Xiong vd. (2015) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ile katmanlı hidroksiapatit kompozit vektörünü çeşitli morfolojilerde sentezlemişlerdir. Bu yeniden düzenlenen yapı ve morfolojilerin sitotoksosite, DNA kapasitesi ve transfeksiyon verimliliğine olan etkileri incelenmiştir. Aynı çalışmada, katmanlı yapıda, büyük boyutlu ve levha şekline sahip olan ML-HA-2 olarak isimlendirilen nanoparçacığın DNA taşıma kapasitesinin nispeten düşük olduğu belirlenmiştir. Buna rağmen bu nanoparçacığın diğer morfolojilerle sentezlenen nanoparçacıklara oranla transfeksiyon verimliliği için en yüksek değere sahip olduğu da gözlemlenmiştir. Ayrıca çalışma sonuçlarına göre dış kaynaklı manyetik alan uygulandığında bu nanoparçacığın performansının yükseldiği de tespit edilmiştir (Xiong vd., 2015).

#### 2.2.3.4. Kalsiyum Fosfat Nanoparçacıklar

Kalsiyum fosfat kaynaklı nanoparçacıklar amorf yapıli kalsiyum fosfat nanoparçacıkları ya da kristalin yapıli hidroksiapatit formlarında bulunabilir (Vago vd., 2016). Kalsiyum fosfat nanoparçacıkları oldukça biyouyumlu olarak değerlendirilmektedir. Bunun yanı sıra kalsiyum fosfat nanoparçacıkları; *i*) yüksek biyobozunma, *ii*) kolay hazırlanma ve maliyet uygunluğu, *iii*) küçük parçacık boyutları, *iv*) pH'ya duyarlı çözünme, *v*) makrofaj hücrelerinden kaçabilme, *vi*) yüzey modifikasyonlarına uygunluk, *vii*) nükleik asitlerin fosfat gruplarına sıkı bağlanabilmesi, *viii*) endozomal ve lizozomal koşullardan kaçabilme gibi avantajlara da sahiptir. Ancak bu nanoparçacıkların; *i*) toksisite, *ii*) düşük yük kapasitesi, *iii*) kontrol edilemeyen kristal büyümesi ve *iv*) hızlı kümelenme gibi

dezavantajları transfeksiyon verimliliğini düşürmektedir (Sharma vd., 2015; Urie ve Rege, 2015; Vago vd., 2016). Bu vektörlerin kullanımına örnek olarak Lee vd. (2014) tarafından yürütülen çalışmada hyaluronik asit ve dopa kullanılan CaP/siRNA/dopa-HA kompozit nanoparçacığının düşük yük yoğunluğuna sahip olduğu ve tümör bölgelerinde enzimsel parçalanmaya yakalanmadan kümelenmediği belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışma ile kalsiyum fosfat büyümesi kontrol altında tutulabilmiştir (Lee vd., 2014).

#### 2.2.3.5. Silika Nanoparçacıkları

İnorganik nanoparçacık tiplerinden biri de silika nanoparçacıklarıdır. Silika nanoparçacıkları mezoporöz silika nanoparçacıkları, silika nanotüpleri ve dendrimer benzeri silika nanoparçacıkları yapılarında bulunabilir. Bu yapılar arasında en çok kullanılan nanoparçacık çeşidi mezoporöz silika nanoparçacıklarıdır. Bu nanoparçacıkların; *i*) porlu yapısı, *ii*) 2-6 nm arası değişen ayarlanabilir por boyutları ve 50-300 nm arası değişen ayarlanabilir nanoparçacık boyutları, *iii*) kolay sentezlenebilme, *iv*) pH duyarlılığı, *v*) düşük sitotoksosite, *vi*) düşük immün yanıt, *vii*) düşük maliyet, *viii*) yüksek kararlılık, *ix*) yüzey modifikasyonlarına yatkınlık ve *x*) üstün biyouyumluluk gibi birçok avantajları mevcuttur (Urie ve Rege, 2015; Vago vd., 2016; Yang ve Yu, 2016; Zhang vd., 2014a). Bu avantajlarının yanı sıra yapısındaki çapraz bağlanma sebebiyle saf silikanın yavaş biyobozunma özelliği bu nanoparçacıkların kullanımını sınırlamaktadır (Yang ve Yu, 2016). Son yıllarda yürütülen bir çalışmada, Rea vd. (2014) temel yapısını amorf silikanın oluşturduğu diatomit nanotaşıyıcıları kanser hücreleri üzerine uygulamışlardır. Sonuç olarak ortalama boyutunun 450 nm'den düşük olduğu bu nanoparçacıkların *in vitro* koşullarda toksik olmadığı gözlemlenmiştir (Rea vd., 2014).

### 3. Sonuç ve Değerlendirme

Nanoteknoloji alanında yaşanan gelişmeler ilaç aktarımı ve RNAi temelli nükleik asit transferi gibi terapötik uygulamaların verimini oldukça arttırmaktadır. Bu çalışmalar ilacın veya nükleik asidin nano boyutlu vektörler aracılığıyla vücut içerisine kontrollü şekilde iletilmesi ve terapötik maddenin hücre içine alınmasına dayanmaktadır. Bu çalışmaları sınırlayan çeşitli mikro ve makro düzeyli fizyolojik engellerle karşılaşılabilir. Karşılaşılan bu engellerden kurtulmak için farklı türlerde nanoparçacıklar sentezlenmektedir. Bu nanoparçacıklar temel olarak viral ve non-viral vektörler olmak üzere iki gruba ayrılır. Sahip oldukları sitotoksikite ve immün yanıtı tetikleme gibi dezavantajları sebebiyle viral vektör kullanımı sınırlanmaktadır. Bu doğrultuda ilaç salım ve nükleik asit aktarım çalışmalarında non-viral vektör kullanımı daha avantajlı hale gelmiştir. Non-viral vektörlerin sentezinde, özellikle nükleik asitler ile elektrostatik etkileşime girebilme yeteneği daha yüksek olan pozitif yüklü malzemeler tercih edilmektedir. İlaç salımı ve nükleik asit aktarımı amacıyla kullanılan non-viral vektörler polimer kaynaklı vektörler, lipit kaynaklı vektörler ve inorganik kaynaklı vektörler olarak sınıflandırılabilir. Ayrıca bu vektörlerin birlikte kullanıldığı kompozit vektör çalışmalarına da sıklıkla rastlanmaktadır. Polimer kaynaklı vektörler sentetik veya doğal yapılı polimerlerin diğer polimerlerle veya non-viral vektörlerle birleştirilmesi sonucu oluşturulan nano boyutlu parçacıklardır. Katyonik polimerler ve negatif yüklü nükleik asitler arasında oluşan elektrostatik etkileşim kompakt yapılı nanoparçacık sentezi için önemli bir avantajdır. Ayrıca katyonik polimerlerin negatif yüklü hücre membranıyla etkileşime kolay geçebilmesi, polimer yüzeylerinde modifikasyonlara elverişli fonksiyonel grupların bulunması ve düşük sitotoksikite bu vektörlerin genel özellikleridir. Yüksek

moleküler ağırlıktan kaynaklanabilecek sitotoksikite riski, çeşitli yüzey modifikasyonları yapılarak veya düşük sitotoksikiteye sahip biyomalzemelerle kompozit nanoparçacıklar oluşturularak azaltılabilir. Kitosan, hyaluronik asit, PEI, PLGA, PAMAM gibi polimerler nükleik asit transfeksiyonunda sıkça kullanılan polimerlerden bazılarıdır. Lipit kaynaklı vektörlerin hücre içine alınmada kolaylık sağlama, yüksek biyoyoumluluk ve düşük sitotoksikite gibi avantajları bulunmaktadır. Bu vektörler; lipozomlar, katı lipit nanoparçacıkları ve lipopolipeksler olarak sınıflandırılmaktadır. Her alt grup için çeşitli çalışmalar mevcut olmakla birlikte bu nanoparçacıkların verimini arttırmak için çeşitli yüzey modifikasyonları ve kompozit çalışmaları da bulunmaktadır. Non-viral vektör çeşitlerinden biri de inorganik kaynaklı vektörlerdir. Bu vektörler yüksek yük kapasitesi, kolay sentezlenebilme ve uzun raf ömrü gibi çeşitli avantajlara sahiptirler. Bunun yanında yüksek sitotoksikiteye sahip olmaları bu vektörlerin en büyük dezavantajı olarak değerlendirilmektedir. İnorganik kaynaklı nanoparçacıklar içinde özellikle grafen nanoparçacıklar ve karbon nanotüpler son yıllarda yoğun olarak çalışılmaktadır. Karbon nanotüpler temelde grafen malzemesinin silindirik morfolojisiyle oluşmaktadır ve hücre içine enerji gerektirmeyen yollar ile alınmaktadır. Ayrıca karbon nanotüplerin kızılötesi ışın değerlerine yakın dalga boylarını absorblama özelliği nükleik asitlerin salımını izlemeye kolaylık sağlamaktadır. Bunun dışında inorganik kaynaklı nanoparçacıkların; kalsiyum fosfat nanoparçacıkları, altın nanoparçacıkları, silika nanoparçacıkları ve manyetik nanoparçacıklar gibi diğer alt grupları da mevcuttur. Günümüzde, RNA interferans mekanizması göz önünde bulundurularak çeşitli genetik hastalıkları tedavi etmek amacıyla alternatif nükleik asit transfeksiyon metodları üzerine çalışmalar yoğun şekilde devam etmektedir. mRNA parçalanmasını

veya translayon baskılanmasını sağlamak için nükleik asit (siRNA, miRNA, shRNA gibi) aktarımı baz alınırken, *in vitro* ve *in vivo* ortamda yapılan çalışmalar bu nükleik asitlerin nanoparçacık ile aktarımının önemini göstermektedir. Hem transfeksiyon verimini arttırmak hem de nükleik asitleri hedef hücre içine parçalanmadan aktarabilmek için çeşitli biyomalzemeler kullanılmakta, kompozit nanoparçacıklar sentezlenmekte ve terapötik moleküller bu kompozit nanoparçacıklar ile enkapsüle edilmektedir. Günümüzde yoğun bir şekilde çalışılan düşük toksisite ve yüksek transfeksiyon verimine sahip nano taşıyıcıların gen terapisinde kullanılması oldukça umut vaat etmektedir.

#### 4. Teşekkür

Bu derleme makalesinin yazımında emeği geçen bilim insanlarına finansal destekte bulunduğu için Tübitak'a (216Z033 nolu proje) teşekkür ederiz.

#### 5. Kaynaklar

Adijanto, J., Naash, M.I. 2015. Nanoparticle-based technologies for retinal gene therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 95, 353–367.

Amjad, M.W., Kesharwani, P., Mohd Amin, M.C.I., Iyer, A.K. 2017. Recent advances in the design, development, and targeting mechanisms of polymeric micelles for delivery of siRNA in cancer therapy. *Progress in Polymer Science*, 64, 154–181.

Askarian, S., Abnous, K., Ayatollahi, S., Farzad, S.A., Oskuee, R.K., Ramezani, M. 2017. PAMAM-pullulan conjugates as targeted gene carriers for liver cell. *Carbohydrate Polymers*, 157, 929–937.

Askarian, S., Abnous, K., Taghavi, S., Oskuee, R.K., Ramezani, M. 2015. Cellular delivery of shRNA using aptamer-conjugated PLL-alkyl-PEI nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136, 355–364.

Bishop, C.J., Kozielski, K.L., Green, J.J. 2015. Exploring the role of polymer

structure on intracellular nucleic acid delivery via polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 219, 488–499.

Buchholz, C.J., Friedel, T., Büning, H. 2015. Surface-Engineered Viral Vectors for Selective and Cell Type-Specific Gene Delivery. *Trends in Biotechnology*, 33(12), 777–790.

Caoduro, C., Hervouet, E., Girard-Thernier, C., Gharbi, T., Boulahdour, H., Delage-Mourroux, R., Pudlo, M. 2017. Carbon nanotubes as gene carriers: Focus on internalization pathways related to functionalization and properties. *Acta Biomaterialia*, 49, 36–44.

Chen, W., Meng, F., Cheng, R., Deng, C., Feijen, J., Zhong, Z. 2014. Advanced drug and gene delivery systems based on functional biodegradable polycarbonates and copolymers. *Journal of Controlled Release*, 190, 398–414.

Chen, Y., Gao, D.Y., Huang, L. 2015a. *In vivo* delivery of miRNAs for cancer therapy: Challenges and strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 81, 128–141.

Chen, D., Dougherty, C.A., Zhu, K., Hong, H. 2015b. Theranostic applications of carbon nanomaterials in cancer: Focus on imaging and cargo delivery. *Journal of Controlled Release*, 210, 230–245.

Chen, J., Guo, Z., Tian, H., Chen, X. 2016. Production and clinical development of nanoparticles for gene delivery. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 3(16023).

Deng, Y., Wang, C.C., Choy, K.W., Du, Q., Chen, J., Wang, Q., Li, L., Chung, T. K., Tang, T. 2014. Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: Principles, challenges, and new strategies. *Gene*, 538(2), 217–227.

Dosio, F., Arpicco, S., Stella, B., Fattal, E. 2016. Hyaluronic acid for anticancer drug and nucleic acid delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97, 204–236.

- Endres, T., Zheng, M., Kılıç, A., Turowska, A., Beck-Broichsitter, M., Renz, H., Merkel, O.M., Kissel, T. 2014. Amphiphilic Biodegradable PEG-PCL-PEI Triblock Copolymers for FRET-Capable *in vitro* and *in vivo* Delivery of siRNA and Quantum Dots. *Molecular Pharmaceutics*, 11(4), 1273–1281.
- Eroğlu, E., Tiwari, P.M., Waffo, A.B., Miller, M.E., Komal Vig, K., Dennis, V., Singh, S. 2013. A nonviral pHEMA+chitosan nanosphere-mediated high-efficiency gene delivery system. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 1403.
- Ezzati Nazhad Dolatabadi, J., Omidi, Y. 2016. Solid lipid-based nanocarriers as efficient targeted drug and gene delivery systems. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 77, 100–108.
- Fan, X., Zhao, Y., Xu, W., Li, L. 2016. Linear–dendritic block copolymer for drug and gene delivery. *Materials Science and Engineering: C*, 62, 943–959.
- Fitzgerald, K.A., Malhotra, M., Gooding, M., Sallas, F., Evans, J.C., Darcy, R., O’Driscoll, C.M. 2016. A novel, anisamide-targeted cyclodextrin nanoformulation for siRNA delivery to prostate cancer cells expressing the sigma-1 receptor. *International Journal of Pharmaceutics*, 499(1), 131–145.
- Fonseca, A.C., Gil, M.H., Simões, P.N. 2014. Biodegradable poly(ester amide)s – A remarkable opportunity for the biomedical area: Review on the synthesis, characterization and applications. *Progress in Polymer Science*, 39(7), 1291–1311.
- Gandhi, N.S., Tekade, R.K., Chougule, M.B. 2014. Nanocarrier mediated delivery of siRNA/miRNA in combination with chemotherapeutic agents for cancer therapy: Current progress and advances. *Journal of Controlled Release*, 194, 238–256.
- Gao, S., Tian, H., Guo, Y., Li, Y., Guo, Z., Zhu, X., Chen, X. 2015. miRNA oligonucleotide and sponge for miRNA-21 inhibition mediated by PEI-PLL in breast cancer therapy. *Acta Biomaterialia*, 25, 184–193.
- Gao, S., Tian, H., Xing, Z., Zhang, D., Guo, Y., Guo, Z., Zhu, X., Chen, X. 2016. A non-viral suicide gene delivery system traversing the blood brain barrier for non-invasive glioma targeting treatment. *Journal of Controlled Release*, 243, 357–369.
- Germershaus, O., Nultsch, K. 2015. Localized, non-viral delivery of nucleic acids: Opportunities, challenges and current strategies. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(3), 159–175.
- Gomes, C.P., Varela-Moreira, A., Leiro, V., Lopes, C.D.F., Moreno, P.M.D., Gomez-Lazaro, M., Pêgo, A.P. 2016. A high-throughput bioimaging study to assess the impact of chitosan-based nanoparticle degradation on DNA delivery performance. *Acta Biomaterialia*, 46, 129–140.
- Gulzar, A., Yang, P., He, F., Xu, J., Yang, D., Xu, L., Jan, M.O. 2017. Bioapplications of graphene constructed functional nanomaterials. *Chemico-Biological Interactions*, 262, 69–89.
- Gupta, A., Bahal, R., Gupta, M., Glazer, P.M., Saltzman, W.M. 2016. Nanotechnology for delivery of peptide nucleic acids (PNAs). *Journal of Controlled Release*, 240, 302–311.
- Hollanda, L.M., Lobo, A.O., Lancellotti, M., Berni, E., Corat, E.J., Zanin, H. 2014. Graphene and carbon nanotube nanocomposite for gene transfection. *Materials Science and Engineering: C*, 39, 288–298.
- Ito, T., Koyama, Y., Otsuka, M. 2014. Preparation of Calcium Phosphate Nanocapsule Including Deoxyribonucleic Acid–Polyethyleneimine–Hyaluronic Acid Ternary Complex for Durable Gene Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(1), 179–184.
- Jiang, H.L., Cui, P.F., Xie, R.L., Cho, C.S. 2014. Chemical modification of chitosan for efficient gene therapy.



- Advances in Food and Nutrition Research, 73, 83–101.
- Kalaycioglu, G.D., Aydogan, N. 2016. Preparation and investigation of solid lipid nanoparticles for drug delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 510, 77–86.
- Kang, L., Gao, Z., Huang, W., Jin, M., Wang, Q. 2015. Nanocarrier-mediated co-delivery of chemotherapeutic drugs and gene agents for cancer treatment. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(3), 169–175.
- Kesharwani, P., Banerjee, S., Gupta, U., Mohd Amin, M.C.I., Padhye, S., Sarkar, F.H., Iyer, A.K. 2015. PAMAM dendrimers as promising nanocarriers for RNAi therapeutics. *Materials Today*, 18(10), 565–572.
- Kim, K., Chen, W.C.W., Heo, Y., Wang, Y. 2016. Polycations and their biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 60, 18–50.
- Knudsen, K.B., Northeved, H., Kumar E.K., P., Permin, A., Gjetting, T., Andresen, T.L., Larsen, S., Wegener, K.M., Lykkesfeldt, J., Loft, S., Moller, P., Roursgaard, M. 2015. *In vivo* toxicity of cationic micelles and liposomes. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(2), 467–477.
- Ku, S.H., Jo, S. D., Lee, Y.K., Kim, K., Kim, S.H. 2016. Chemical and structural modifications of RNAi therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 104, 16–28.
- Kumar, V.B., Medhi, H., Yong, Z., Paik, P. 2016. Designing idiosyncratic hmPCL-siRNA nanoformulated capsules for silencing and cancer therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(3), 579–588.
- Lai, W.F. 2014. Cyclodextrins in non-viral gene delivery. *Biomaterials*, 35(1), 401–411.
- Lee, M.S., Lee, J.E., Byun, E., Kim, N.W., Lee, K., Lee, H., Sim, S.J., Lee, D.S., Jeong, J.H. 2014. Target-specific delivery of siRNA by stabilized calcium phosphate nanoparticles using dopa-hyaluronic acid conjugate. *Journal of Controlled Release*, 192, 122–130.
- Leung, A.K.K., Tam, Y.Y.C., Cullis, P.R. 2014. Chapter Four – Lipid Nanoparticles for Short Interfering RNA Delivery. *Advances in Genetics*, 88, 71–110.
- Li, Z., Zhang, L., Li, Q. 2015. Induction of apoptosis in cancer cells through N-acetyl-l-leucine-modified polyethylenimine-mediated p53 gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 135, 630–638.
- Lin, J.T., Zou, Y., Wang, C., Zhong, Y.C., Zhao, Y., Zhu, H.E., Wang, G.H., Zhang, L.M., Zheng, X.B. 2014. Cationic micellar nanoparticles for DNA and doxorubicin co-delivery. *Materials Science and Engineering: C*, 44, 430–439.
- Lin, Q., Yang, Y., Hu, Q., Guo, Z., Liu, T., Xu, J., Wu, J., Kirk, T.B., Ma, D., Xue, W. 2017a. Injectable supramolecular hydrogel formed from  $\alpha$ -cyclodextrin and PEGylated arginine-functionalized poly(1-lysine) dendron for sustained MMP-9 shRNA plasmid delivery. *Acta Biomaterialia*, 49, 456–471.
- Lin, W.J., Lee, W.C., Shieh, M.J. 2017b. Hyaluronic acid conjugated micelles possessing CD44 targeting potential for gene delivery. *Carbohydrate Polymers*, 155, 101–108.
- Liu, H., Li, Y., Mozhi, A., Zhang, L., Liu, Y., Xu, X., Xing, J., Liang, X., Ma, G., Yang, J., Zhang, X. 2014. SiRNA-phospholipid conjugates for gene and drug delivery in cancer treatment. *Biomaterials*, 35(24), 6519–6533.
- Mai, K., Zhang, S., Liang, B., Gao, C., Du, W., Zhang, L.M. 2015. Water soluble cationic dextran derivatives containing poly(amidoamine) dendrons for efficient gene delivery. *Carbohydrate Polymers*, 123, 237–245.
- Martirosyan, A., Olesen, M.J., Howard, K. A. 2014. Chapter Eleven – Chitosan-Based Nanoparticles for Mucosal Delivery of RNAi Therapeutics. *Advances in Genetics*, 88, 325–352.

- McCallion, C., Burthem, J., Rees-Unwin, K., Golovanov, A., Pluen, A. 2016. Graphene in therapeutics delivery: Problems, solutions and future opportunities. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 104, 235–250.
- Mohammadi, M., Salmasi, Z., Hashemi, M., Mosaffa, F., Abnous, K., Ramezani, M. 2015. Single-walled carbon nanotubes functionalized with aptamer and piperazine–polyethylenimine derivative for targeted siRNA delivery into breast cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 485(1), 50–60.
- Mokhtarzadeh, A., Alibakhshi, A., Hashemi, M., Hejazi, M., Hosseini, V., de la Guardia, M., Ramezani, M. 2017. Biodegradable nano-polymers as delivery vehicles for therapeutic small non-coding ribonucleic acids. *Journal of Controlled Release*, 245, 116–126.
- O'Bryan, S., Dong, S., Mathis, J.M., Alahari, S.K. 2017. The roles of oncogenic miRNAs and their therapeutic importance in breast cancer. *European Journal of Cancer*, 72, 1–11.
- Ochrimenko, S., Vollrath, A., Tauhardt, L., Kempe, K., Schubert, S., Schubert, U. S., Fischer, D. 2014. Dextran-graft-linear poly(ethylene imine)s for gene delivery: Importance of the linking strategy. *Carbohydrate Polymers*, 113, 597–606.
- Oliveira, A.V., Marcelo, A., Rosa da Costa, A.M., Silva, G.A. 2016. Evaluation of cystamine-modified hyaluronic acid/chitosan polyplex as retinal gene vector. *Materials Science and Engineering: C*, 58, 264–272.
- Ozpolat, B., Sood, A.K., Lopez-Berestein, G. 2014. Liposomal siRNA nanocarriers for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66, 110–116.
- Pandey, A.P., Sawant, K.K. 2016. Polyethylenimine: A versatile, multifunctional non-viral vector for nucleic acid delivery. *Materials Science and Engineering: C*, 68, 904–918.
- Rea, I., Martucci, N.M., De Stefano, L., Ruggiero, I., Terracciano, M., Dardano, P., Migliaccio, N., Arcari, P., Tate, R., Rendina, I., Lamberti, A. 2014. Diatomite biosilica nanocarriers for siRNA transport inside cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(12), 3393–3403.
- Sharma, S., Verma, A., Teja, B.V., Pandey, G., Mittapelly, N., Trivedi, R., Mishra, P.R. 2015. An insight into functionalized calcium based inorganic nanomaterials in biomedicine: Trends and transitions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 133, 120–139.
- Shi, B., Zhang, H., Bi, J., Dai, S. 2014. Endosomal pH responsive polymers for efficient cancer targeted gene therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 119, 55–65.
- Shi, J., Xu, Y., Xu, X., Zhu, X., Pridgen, E., Wu, J., Votruba, A.R., Swami, A., Zetter, B.R., Farokhzad, O.C. 2014. Hybrid lipid–polymer nanoparticles for sustained siRNA delivery and gene silencing. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10(5), 897–900.
- Suk, J.S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J., Ensign, L.M. 2016. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 99, 28–51.
- Sun, N., Liu, Z., Huang, W., Tian, A., Hu, S. 2014. The research of nanoparticles as gene vector for tumor gene therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 89(3), 352–357.
- Tang, S., Huang, Z., Zhang, H., Wang, Y., Hu, Q., Jiang, H. 2014. Design and formulation of trimethylated chitosan-graft-poly( $\epsilon$ -caprolactone)nanoparticles used for gene delivery. *Carbohydrate Polymers*, 101, 104–112.
- Tang, Z., He, C., Tian, H., Ding, J., Hsiao, B. S., Chu, B., Chen, X. 2016. Polymeric nanostructured materials for biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 60, 86–128.

- Tiwari, P.M., Eroglu, E., Bawage, S.S., Vig, K., Miller, M.E., Pillai, S., Dennis, V. A., Singh, S.R. 2014. Enhanced intracellular translocation and biodistribution of gold nanoparticles functionalized with a cell-penetrating peptide (VG-21) from vesicular stomatitis virus. *Biomaterials*, 35(35), 9484–9494.
- Urie, R., Rege, K. 2015. Nanoscale inorganic scaffolds as therapeutics and delivery vehicles. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 7, 120–128.
- Vago, R., Collico, V., Zuppone, S., Prosperi, D., Colombo, M. 2016. Nanoparticle-mediated delivery of suicide genes in cancer therapy. *Pharmacological Research*, 111, 619–641.
- Vardharajula, S., Ali, S.Z., Tiwari, P.M., Eroglu, E., Vig, K., Dennis, V.A., Singh, S.R. 2012. Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications. *International journal of nanomedicine*, 7, 5361–74.
- Videira, M., Arranja, A., Rafael, D., Gaspar, R. 2014. Preclinical development of siRNA therapeutics: Towards the match between fundamental science and engineered systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10(4), 689–702.
- Wang, Y., Huang L. 2014. Composite Nanoparticles for Gene Delivery. *Advances in Genetics*, 88, 111–137.
- Wang, K., Kievit, F.M., Zhang, M. 2016. Nanoparticles for cancer gene therapy: Recent advances, challenges, and strategies. *Pharmacological Research*, 114, 56–66.
- Xiong, G., Wan, Y., Zuo, G., Ren, K., Luo, H. 2015. Self-assembled magnetic lamellar hydroxyapatite as an efficient nano-vector for gene delivery. *Current Applied Physics*, 15(7), 811–818.
- Yang, J., Liu, H., Zhang, X. 2014. Design, preparation and application of nucleic acid delivery carriers. *Biotechnology Advances*, 32(4), 804–817.
- Yang, Y., Yu, C. 2016. Advances in silica based nanoparticles for targeted cancer therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(2), 317–332.
- Zhang, J., Li, X., Huang, L. 2014a. Non-viral nanocarriers for siRNA delivery in breast cancer. *Journal of Controlled Release*, 190, 440–450.
- Zhang, R., Zheng, N., Song, Z., Yin, L., Cheng, J. 2014b. The effect of side-chain functionality and hydrophobicity on the gene delivery capabilities of cationic helical polypeptides. *Biomaterials*, 35(10), 3443–3454.
- Zhang, J., Sun, X., Shao, R., Liang, W., Gao, J., Chen, J. 2015. Polycation liposomes combined with calcium phosphate nanoparticles as a non-viral carrier for siRNA delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 30, 1–6.
- Zou, L., Song, X., Yi, T., Li, S., Deng, H., Chen, X., Li, Z., Bai, Y., Zhong, Q., Wei, Y., Zhao, X. 2013. Administration of PLGA nanoparticles carrying shRNA against focal adhesion kinase and CD44 results in enhanced antitumor effects against ovarian cancer. *Cancer Gene Therapy*, 20(4), 242–250.