

## การรักษาโรคด้วยยีน

### The Gene Therapy

ณยา วงษ์พูน\* เกษตรกรชำนาญการ เกษตรศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ภ.บ.)

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์

หลักสูตรนานาชาติ สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์

(สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล) มหาวิทยาลัยมหิดล (วท.ม.)

### บทคัดย่อ

การรักษาโรคด้วยยีนคือการนำยีนปกติเข้าสู่ร่างกายเพื่อแก้ไข ทดแทนหรือทำลายยีนที่ผิดปกติที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค เช่นโรคทางพันธุกรรมและโรคติดเชื้อบางชนิด โดยมีองค์ประกอบของการรักษาคือ ยีนเพื่อการรักษา พาหะ และเซลล์เป้าหมาย หัวใจหลักของความสำเร็จของการรักษาโรคด้วยวิธีนี้อยู่ที่ความสามารถในการนำส่งยีนเพื่อการรักษาเข้าสู่เซลล์เป้าหมายซึ่งแบ่งออกเป็นสองวิธีคือ การใช้เซลล์เป็นพาหะร่วมและการใช้เซลล์เป็นพาหะร่วมที่เรียกว่า “genetic modified cell” ซึ่งถือว่าการผนวกกำลังการรักษาระหว่างการรักษาโรคด้วยยีนและการรักษาโรคด้วยเซลล์ การรักษาโรคด้วยยีนมีหลายรูปแบบโดยแบ่งเป็นสามหลักคือการนำยีนปกติเข้าสู่ร่างกายเพื่อทำหน้าที่แทน ทำลาย และเข้าจับกับโปรตีนที่ใช้ในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติโดยมีรูปแบบย่อยดังนี้ 1) การใช้พลาสมิด 2) แอนติยีนและแอนติเซนส์ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ 3) ไวโรโซม 4) ดีเอ็นเอโซม 5) ดีคอปเปอร์ 6) แอปทาเมอร์ และ 7) อาร์เอ็นเอไอ การรักษาโรคด้วยยีนถูกนำมาศึกษาวิจัยในมนุษย์ตั้งแต่ ค.ศ. 1990 และปัจจุบันนี้ได้รับการอนุมัติโครงการประมาณ 100 โครงการทั่วโลกซึ่งโดยส่วนใหญ่ศึกษาวิจัยอยู่ในระยะที่ 1 ในโรคมะเร็งและโรคหัวใจและหลอดเลือด ตามลำดับ

คำสำคัญ: Gene therapy, Genetic Modified Cell, Viral vector, Gene Therapy for Clinical Trials

วารสารเกษตรศาสตร์อีสาน 2553; 6(3) : 1-24

### 1. พัฒนาการการรักษาโรคด้วยยีน (Development of Gene Therapy)

เหตุการณ์สำคัญของการรักษาโรคด้วยยีนเริ่มขึ้นเมื่อมีการตีพิมพ์งานวิจัยครั้งแรกในปี ค.ศ. 1972 โดย ดร. ทีโอดอร์ เฟรดแมน และ ดร. ริชาร์ด โรบิน โดยสรุปว่า “ในอนาคตมีความเป็นไปได้ว่ายีนสามารถถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมในมนุษย์บางโรคได้และเห็นว่าควรมีการศึกษาวิจัยโดยตรงเพื่อพัฒนาเทคนิคต่าง ๆ ที่จะใช้ในการรักษาโรคด้วยยีนอย่างต่อเนื่อง” (Friedmann and Roblin, 1972) จากนั้นก็มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการรักษาโรคด้วยยีนเรื่อยมาจนถึงปี ค.ศ. 1978 พบว่าโอลิโกนิวคลีโอไทด์แบบแอนติเซนส์

(antisense oligonucleotides) สามารถกดการแปลรหัสของไวรัสชนิดหนึ่งได้ (Stephenson and Zamecnik, 1978) ต่อมาในปี ค.ศ. 1980 การรักษาโรคด้วยยีนถูกนำมาศึกษาวิจัยในโรคธาลัสซีเมีย (Cline et al., 1980) จากนั้นปี 1989 ก็มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับหลักการของการรักษาโรคด้วยยีนต่อโรคตับ มะเร็งและโรคทางระบบประสาทรวมถึงการใช้ไวรัสเป็นพาหะในการรักษาโรคด้วยยีน (Friedmann, 1989) การรักษาโรคด้วยยีนถูกนำมาศึกษาวิจัยในระดับคลินิก (clinical trial) เป็นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1990 ในผู้ป่วยโรคมะเร็ง (Rosenberg et al., 1990) และในปีเดียวกันนี้ “แอปทาเมอร์ (aptamer)” ซึ่งเป็นรูปแบบหนึ่งของการรักษาโรคด้วยยีนก็ถูกค้นพบขึ้น (Ellington and Szostak, 1990) จากนั้นในปี

\* Corresponding author : สำนักยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข จ. นนทบุรี 11000  
โทร: 02-5907341 โทรสาร: 02-5907341 E-mail : nayavong@hotmail.com

ค.ศ. 1992 ดร. คลูดีโอ บอร์ดิกนอนท์ ชาวอิตาลีได้ใช้สเต็มเซลล์เป็นพาหนะในการรักษาโรคด้วยยีนสำเร็จเป็นครั้งแรก (Abbott A, 1992) ต่อมาการรักษาโรคด้วยยีนในรูปแบบของดีเอ็นเอไซม์ (DNAzyme) ได้ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1994 (Breaker and Joyce, 1994) ในปี ค.ศ. 1998 ผลึกพันธุกรรมของการรักษาโรคด้วยยีนชนิดแรกชื่อว่า “ฟอร์มิเวอร์เซน (Formivirsene)” ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา (Mulamba, et al., 1998, NIH) ซึ่งในปีเดียวกันนี้ ศ. ดร. แอนดรูว์ แซตต์ ไฟร์ และ ศ. ดร. เกรก ซี เมลโล ได้ค้นพบการรักษาโรคด้วยยีนรูปแบบอาร์เอ็นเอไอ (RNA interference, RNAi) (Fire, et al., 1998) จากนั้นในปี ค.ศ. 2000 เกิดความสำเร็จครั้งแรกของการศึกษาวิจัยระดับคลินิกในผู้ป่วยโรคเอสซีไอดี-เอ็กซ์หนึ่ง (Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1) ในประเทศฝรั่งเศส (Cavazzana-Calvo, et al., 2000) และเมื่อต้นศตวรรษที่ 21 คณะกรรมการอาหารและยาประเทศจีนก็ได้อนุมัติผลึกพันธุกรรมของการรักษาโรคด้วยยีนชื่อว่า “เจนซินดีน (Gencidine)” ในปี ค.ศ. 2003 (Pearson, et al., 2004) และในปี ค.ศ. 2008 คณะกรรมการอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกาได้ประกาศแนวทางปฏิบัติเกี่ยวกับการผลิตผลึกพันธุกรรมของการรักษาโรคด้วยยีนหลายฉบับด้วยกัน เช่น การทดสอบความปราศจากเชื้อ (sterility test) (USFDA, Guidance for Industry: Validation of Growth-Based, 2008) ข้อมูลสำหรับการขออนุญาตศึกษาวิจัยยาใหม่ที่เป็นยีน (USFDA, Guidance for FDA Reviewers and Sponsors, 2008) และการทดสอบความแรงของผลึกพันธุกรรมของการรักษาโรคด้วยยีน (USFDA, Guidance for Industry: Potency Tests, 2008) สำหรับในปี ค.ศ. 2009-2010 พบว่าโครงการศึกษาวิจัยในระดับคลินิกเกี่ยวกับการรักษาโรคด้วยยีนได้รับอนุญาตให้ทำการวิจัยได้ประมาณ 100 โครงการทั่วโลก (The Journal of Gene Medicine )

## 2. หลักการรักษาโรคด้วยยีน (Principle of Gene Therapy)

### 2.1) นิยาม ความแตกต่าง จุดประสงค์ของการรักษาโรคด้วยยีน

ยีน คือ นิวคลีโอไทด์ช่วงหนึ่ง ๆ บนเส้น ดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอ (ยีนของไวรัสบางชนิด) ซึ่งบรรจุรหัสทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตเอาไว้โดยยีนจะถูกถอดรหัส

และแปลรหัสให้โปรตีนที่มีความเฉพาะทั้งรูปร่างและหน้าที่ซึ่งหน้าที่ของโปรตีนเหล่านั้นสามารถเป็นได้ทั้งส่วนประกอบของโครงสร้างสิ่งมีชีวิตหรือเป็นสารชีวเคมีในร่างกาย เช่น เอนไซม์ ฮอร์โมน หรือสัญญาณโมเลกุลต่าง ๆ (signal molecules) เป็นต้น การมียีนที่ผิดปกติ (defective gene) เป็นสาเหตุของการเกิดโรคหลายชนิดเนื่องจากยีนที่ผิดปกติทำให้เกิดการผลิตโปรตีนที่ผิดปกติไปด้วย ตัวอย่างโรคที่เกิดจากการมียีนที่ผิดปกติแล้วทำให้เกิดการพร่องเอนไซม์ เช่น โรคจีซีพีดี (Glucose-6-Phosphate dehydrogenase Deficiency, G-6-PD) หรือโรคโลหิตจางแบบซิกเกิ้ลเซลล์ (Sickle cell anemia) ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงอะมิโนแอซิดเพียงตำแหน่งเดียวแล้วทำให้เกิดเลือดแดงมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปทำให้จับออกซิเจนได้ไม่ดี หรือโรคมะเร็งที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์แล้วมีผลให้เซลล์เจริญเติบโตอย่างไม่จำกัด เป็นต้น (Pearson, 2006, Gerstein, et al., 2007) **ยีนบำบัด (Gene therapy)** หรือการรักษาโรคด้วยยีน คือ วิธีการรักษาโรคที่มีจุดประสงค์เพื่อแก้ไขอาการเจ็บป่วยอันเกิดจากการมียีนที่ผิดปกติรวมถึงการติดเชื้อด้วยยีนด้วยกันเอง โดยยีนนั้นเราเรียกว่า “ยีนเพื่อการรักษา (therapeutic gene)” ซึ่งถูกออกแบบให้มีลำดับการเรียงตัวและความยาวของนิวคลีโอไทด์รวมถึงรูปร่างอย่างจำเพาะเจาะจงเพื่อควบคุมให้มัลกลไกในการทำหน้าที่เป็นไปตามที่ต้องการ ซึ่งสิ่งเหล่านี้ต้องใช้เทคโนโลยีและปฏิบัติการทางพันธุวิศวกรรมและชีวโมเลกุล **องค์ประกอบของการรักษาโรคด้วยยีนประกอบด้วย** 1) ยีนเพื่อการรักษา 2) พาหนะที่นำยีนเพื่อการรักษาเข้าเซลล์เป้าหมาย (vectors) และ 3) เซลล์เป้าหมาย (targeted cells) วิธีการที่ใช้สำหรับการรักษาโรคด้วยยีนนั้นมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น 1) การนำยีนปกติ (healthy gene) เข้าไปแทรกในจีโนมของผู้ป่วยเพื่อทดแทนยีนที่ผิดปกติ 2) ใส่ยีนปกติเข้าไปในร่างกายเพื่อทำลายหรือกดการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติ หรือ 3) เปลี่ยนแปลงปัจจัยที่มีผลในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ผิดปกตินั้น เป็นต้น (Human Genome Project Information) การรักษาโรคด้วยยีนมีความแตกต่างจากการรักษาโรคแบบเดิม (traditional therapy) ตรงที่การรักษาโรคแบบเดิมเป็นการใช้ตัวยาซึ่งเป็นสารเคมีที่ผลิตนอกร่างกายใส่

เข้าไปให้ออกฤทธิ์ในร่างกาย ในขณะที่การรักษาโรคด้วยยีนเป็นการใส่ยีนเพื่อการรักษาเข้าไปในร่างกายแล้วให้ร่างกายผลิตสารเพื่อการรักษาขึ้นมาเอง ดังนั้นความสำเร็จของการรักษาโรคด้วยยีนจึงขึ้นอยู่กับ 1) การนำส่งยีน (delivery) เพื่อการรักษาเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม และ 2) ความสามารถในการทำหน้าที่ได้อย่างเหมาะสมของยีนเพื่อการรักษาภายในเซลล์ (The National Institute of Health resource for stem cell research)

## 2.2) วิธีการนำส่งยีนเพื่อการรักษาเข้าสู่ร่างกายและ Genetic Modified Cells

การนำส่งยีนเพื่อการรักษาเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วยมี 2 รูปแบบด้วยกัน (รูปที่ 1) 1) การฉีดเข้าร่างกายโดยตรง (directly infuse) โดยการนำยีนเพื่อการรักษาใส่เข้าไปในพาหะที่เป็นไวรัส (viral vectors) หรือไม่ใช่ไวรัส (non-viral vectors) แล้วฉีดพาหะที่บรรจุยีนเพื่อการรักษาแล้วนั้นเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วยโดยตรง และ 2) การนำยีนเพื่อการรักษาใส่เข้าพาหะที่เป็นไวรัส หรือไม่ใช่ไวรัสแล้วนำพาหะนั้นใส่เข้าไปในเซลล์ที่นำออกมาจากร่างกายผู้ป่วย จากนั้นนำเซลล์ของผู้ป่วยที่บรรจุยีนเพื่อการรักษาแล้วนั้นใส่กลับเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วย (ex vivo) อีกครั้ง เซลล์ชนิดนี้เรียกว่า “Genetic Modified Cells” หรือเซลล์ที่ได้รับการปรับแต่งยีนแล้ว ดังนั้นเซลล์ชนิดนี้จึงทำหน้าที่เป็นพาหะร่วมโดยส่วนใหญ่แล้วชนิดของเซลล์ที่นำมาใช้เป็นพาหะคือ สเต็มเซลล์ (Rath, et al., 2009, Josef et al., 2006) เซลล์ลิมโฟไซต์ และเซลล์ไฟโบบลาสต์ ในกรณีที่ใช้สเต็มเซลล์เป็นพาหะเรียกว่า “Genetic Modified Stem Cells” หรือ “Stem Cell Based Gene Therapy” (รูปที่ 1) การใช้ Genetic Modified Stem Cells ในการรักษาโรคถือเป็นการเสริมกำลังกัน (synergism) ระหว่างการรักษาโรคด้วยยีนและการรักษาโรคด้วยสเต็มเซลล์ ด้วยเหตุผลที่ว่าผู้ป่วยจะได้รับสารเพื่อการรักษาจากยีนเพื่อการรักษาและเซลล์ใหม่ที่เป็นเซลล์ต้นกำเนิดไปด้วยในครั้งเดียวกัน (Yamamoto, et al., 2009, Rey, et al., 2009) การรักษาแบบ Genetic Modified Cells มีข้อดีที่เหนือกว่า directly infuse และการรักษาโรคด้วยเซลล์ (cell therapy) ที่ไม่ได้ปรับแต่งยีนดังนี้ 1) ปฏิบัติการนำยีนเพื่อการรักษาเข้าสู่เซลล์ที่ใช้เป็นพาหะนั้นกระทำนอกร่างกาย ดังนั้น นักวิทยาศาสตร์สามารถทดสอบคุณภาพ Genetic Modified Cells ก่อน

ที่จะเลือกใช้เฉพาะเซลล์ที่มียีนเพื่อการรักษาและที่สามารถผลิตสารเพื่อการรักษาเท่านั้นเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วย 2) นักวิทยาศาสตร์สามารถควบคุมทั้งระดับและอัตราการผลิตสารเพื่อการรักษาของเซลล์ได้ (The National Institute of Health resource for stem cell research)

## 2.3) พาหะที่เป็นไวรัส (Viral vectors)

เนื่องจากโดยธรรมชาติไวรัสสามารถนำยีนของไวรัสเองเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้โดยการเข้าบุกรุกเซลล์เจ้าบ้านจนทำให้เกิดโรคติดเชื้อต่าง ๆ (Kay, et al., 2001) นอกจากนั้นไวรัวยังมีความสามารถในการแบ่งยีนแปลกปลอมเอาไว้ แล้วนำยีนแปลกปลอมนั้นเข้าไปส่งในเซลล์เป้าหมายโดยที่ยีนนั้นยังคงสามารถแสดงออกให้โปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Walther and Stein, et al., 2000) ด้วยเหตุนี้นักวิทยาศาสตร์จึงประยุกต์ใช้ความสามารถตามธรรมชาติของไวรัสเหล่านั้นในการรักษาโรคด้วยยีนโดยให้ไวรัสนำยีนเพื่อการรักษาซึ่งถือว่าเป็นยีนแปลกปลอมสำหรับไวรัสเข้าสู่เซลล์เป้าหมายโดยการสร้าง (construct) ยีนของไวรัสที่ใช้เป็นพาหะขึ้นมาใหม่โดยการสอดยีนเพื่อการรักษาเข้าไปอยู่ในจีโนมของไวรัส เช่น นำนิวคลีโอไทด์ช่วงที่มีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนไวรัสออกแล้วแทรกยีนเพื่อการรักษาเข้าแทนที่ หรือนำยีนที่เป็นโครงสร้างของตัวไวรัสออกแล้วสอดยีนเพื่อการรักษาเข้าไปแทนเป็นต้น (Walther and Stein, 2000, Traversari and Bordignon, 2008) ไวรัสแต่ละชนิดที่ใช้เป็นพาหะควรมีคุณสมบัติสำคัญดังนี้ 1) ไวรัสที่ใช้เป็นพาหะนั้นต้องถูกทำให้มีความปลอดภัย เช่น กำจัดจีโนมบางช่วงที่มีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสออก 2) ไวรัสนั้นต้องไม่เกิดพิษต่อลักษณะทางกายภาพของเซลล์ 3) ไวรัสนั้นต้องมีจีโนมที่มีความเสถียรเมื่อถูกปรับแต่งยีน 4) โดยทั่วไปแล้วมักต้องการไวรัสพาหะที่สามารถบุกรุกเซลล์ได้หลายแบบแต่ในบางกรณีไวรัสนั้นต้องสามารถเข้าบุกรุกเซลล์ได้อย่างจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์บางชนิดเท่านั้นได้ ด้วย (cell type specificity) 5) ไวรัสพาหะต้องสามารถถูกบรรจุยีนที่ใช้ในการคัดเลือกเซลล์ได้ เช่น ยีนดื้อยาปฏิชีวนะ (antibiotic resistance) ไวรัสที่ถูกนำมาใช้เป็นพาหะแบ่งออกเป็นสามกลุ่มใหญ่ คือ 1) พาหะที่เป็นรีโทรไวรัส (retroviral vectors) เช่น ไวรัสมิวแอลวี (Moloney murine leukaemia virus, MuLV) เป็นต้น (Traversari and Bordignon, 2008) เมื่อรีโทรไวรัสเข้า

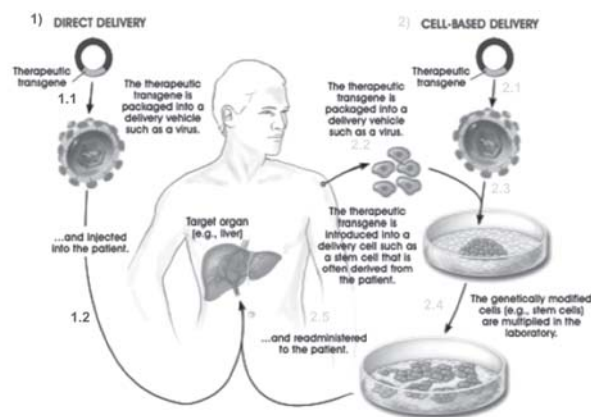
บุกรุกเซลล์เจ้าบ้านจะทำการแทรกยีนของตัวเองเข้ารวม (integrate) กับจีโนมของเซลล์เจ้าบ้านแบบไม่เจาะจงตำแหน่งบนยีนใด (random integration) และมีข้อจำกัดคือจะเข้าบุกรุกเฉพาะเซลล์เจ้าบ้านที่มีการแบ่งตัวเท่านั้น (Roe, et al., 1993) ดังนั้นจึงมีการนำไวรัสในกลุ่มเดียวกันนี้แต่เป็นตระกูลเลนติไวรัส (Lentiviruses) ซึ่งมีข้อเด่นเพิ่มขึ้นมาคือสามารถเข้าบุกรุกเซลล์ที่ไม่มีการแบ่งตัวแล้วได้ (Lewis and Emerman, 1994, Naldini, et al., 1996) ความสามารถในการนำยีนของตัวเองเข้าแทรกจีโนมของเซลล์เจ้าบ้านได้นั้นส่งผลคือทำให้ยีนเพื่อการรักษาแสดงออกได้นานแต่การเข้าแทรกแบบไม่เจาะจงตำแหน่งบนยีนใดอาจมีผลเสียคืออาจเกิดการกลายพันธุ์ (insertional mutagenesis) อันเนื่องมาจากการ integrate ได้ซึ่งอาจเกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีนปรกติหรือถ้าเข้าแทรกตรงยีนมะเร็งอาจกระตุ้นการเกิดมะเร็งได้ (Patil, et al., 2005) ส่วนความสามารถของการบุกรุกเซลล์ที่ไม่มีการแบ่งตัว เช่น เซลล์สมองและเซลล์หัวใจ ทำให้สามารถนำไปใช้ในโรคทางสมองหรือหัวใจได้ ตัวอย่างไวรัสในตระกูลนี้ ได้แก่ ไวรัสเอชไอวี (Human immunodeficiency virus type1, HIV-1) (Naldini, et al., 1996, Kim, et al., 1998, Blomer, et al., 1997) ไวรัสบีไอวี (Bovine immunodeficiency virus, BIV) ไวรัสเอฟไอวี (Feline immunodeficiency virus, FIV) และไวรัสเอสไอวี (Simian immunodeficiency virus, SIV) 2) **ไวรัสพาหะที่มีจีโนมเป็นดีเอ็นเอ (DNA virus vectors)** ได้แก่ **อะดีโนไวรัส (Adenoviral vectors)** เป็นไวรัสที่มีจีโนมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ความยาวประมาณ 35 กิโลเบส ตามธรรมชาติไวรัสชนิดนี้ก่อให้เกิดการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร และตา ข้อดีของไวรัสชนิดนี้เมื่อนำมาใช้เป็นพาหะในการรักษาโรคด้วยยีนคือสามารถเข้าบุกรุกเซลล์ได้หลายชนิดและมีประสิทธิภาพสูงรวมถึงสามารถบุกรุกเซลล์ที่ไม่มีการแบ่งตัวได้ (Roth, et al., 1997, Vorburger and Hunt, 2002) มีรายงานการวิจัยในช่วงแรกพบว่าสามารถบรรจุยีนเพื่อการรักษาเข้าไปในจีโนมของไวรัสชนิดนี้ได้มากกว่า 7 กิโลเบส (Bett, et al., 1993) ต่อมาพบว่าสามารถบรรจุยีนเพื่อการรักษาเพิ่มขึ้นได้มากกว่า 30 กิโลเบส (Morsy, et al., 1998) แล้วยังมีประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนเพื่อการรักษาเพิ่มขึ้นและความเป็นพิษของไวรัสลดลง (Schiedner, et al.,

1998) ข้อด้อยของไวรัสชนิดนี้คือกระตุ้นภูมิคุ้มกันมากและไม่ integrate เข้ากับจีโนมของเซลล์เจ้าบ้านทำให้ยีนเพื่อการรักษาออกฤทธิ์ได้ไม่นาน (transient gene expression) **ไวรัสเอเอวี (Adeno-associated virus, AVV)** เป็นไวรัสขนาดเล็กที่มีจีโนมเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ความยาวประมาณ 5 กิโลเบสและไม่ก่อโรคในมนุษย์ (Rose, et al., 1969) โดยธรรมชาติไวรัสชนิดนี้มีตำแหน่งที่จำเพาะในการเข้าแทรกจีโนมของเซลล์เจ้าบ้านคือบริเวณโครโมโซม 19 (Kotin, et al., 1990, Samulski, et al., 1991) แต่เมื่อมีการปรับแต่งยีนใหม่เพื่อใช้เป็นพาหะแล้วจะสูญเสียคุณสมบัติข้อนี้ไป (Walther and Stein, 2000) ไวรัสเอเอวีมีข้อดีคือกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่ำและมีข้อด้อยคือสามารถบรรจุขนาดของยีนเพื่อการรักษาได้น้อยประมาณ 4.1 ถึง 4.9 กิโลเบส (Dong, et al., 1996) ไวรัสเอเอวีถูกนำมาศึกษาวิจัยในหลายโรคด้วยกัน เช่น โรคมะเร็งตับ (Ponnazhagan, et al., 2001, Arbanas, 2007) และโรคอัลไซเมอร์ เป็นต้น (Hudry, et al., 2010) **เฮอร์ปีส์ไวรัส (Herpes simplex virus (HSV) vectors)** ไวรัสชนิดนี้มีจีโนมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ความยาว 150 กิโลเบส เนื่องจากมีขนาดที่ค่อนข้างใหญ่จึงสามารถบรรจุยีนเพื่อการรักษาได้สูงประมาณ 30 ถึง 50 กิโลเบส นอกจากนั้นยังสามารถเข้าบุกรุกเซลล์เจ้าบ้านได้หลายชนิดทั้งที่แบ่งตัวและไม่แบ่งตัวซึ่งไม่ integrate จีโนมตัวเองเข้ากับจีโนมเจ้าบ้าน เฮอร์ปีส์ไวรัสได้รับความสนใจในการนำมาใช้เป็นพาหะเนื่องจากสามารถบรรจุยีนเพื่อการรักษาได้มากและโดยธรรมชาติไวรัสชนิดนี้เข้าบุกรุกเซลล์ประสาทได้ดีจึงมีการนำมาศึกษาวิจัยในโรคมะเร็งเซลล์ประสาท (neurogenic tumours) (Chou, et al., 1990) แม้ว่าจะสามารถเข้าบุกรุกเซลล์เจ้าบ้านได้หลายชนิดแต่พบว่าไวรัสชนิดนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic effects) โดยความเป็นพิษต่อเซลล์เกิดจากโปรตีนชื่อว่า “ไอซีพี” (Infected Cell Protein, ICP) ดังนั้นการนำเฮอร์ปีส์ไวรัสมาใช้เป็นพาหะจึงมักจำกัดไอซีพียีน (ICP gene) ทั้งซึ่งพบว่าสามารถลดความเป็นพิษต่อเซลล์ลงได้ (Naxin, et al., 1996) อย่างไรก็ตามไวรัสชนิดนี้ก็ยังถูกจำกัดการใช้ (Lowenstein, et al., 1994) 3) **ไวรัสชนิดอื่น ๆ** เช่น ไวรัสเอปสไตน์บาร์ (Epstein-Bar virus, EBV) ไวรัสชนิดนี้สามารถแฝงตัวอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์เจ้าบ้านได้เป็นระยะเวลานาน

(Calos, 1998) จึงถูกนำมาทดสอบในการใช้เป็นพาหะของการรักษาโรคด้วยยีน นอกจากนั้นมีการนำไวรัสกลุ่มอัลฟาไวรัส (Alphaviruses) มาใช้เป็นพาหะ เช่น ไวรัสเอสไอเอน (Sindbis virus, SIN) (Xiong, 1989) หรือ ไวรัสวีอีอี (Venezuelan equine encephalitis virus, VEE) (Davis, et al., 1989) มีการศึกษาวิจัยโดยใช้ไวรัสวีอีอีเป็นพาหะในการบรรจุยีนฮีแมกกลูตินิน (Hemagglutinin gene) ของไวรัสไข้หวัดใหญ่เพื่อผลิตวัคซีนป้องกันไข้หวัดใหญ่ (Davis, et al., 1996) รวมถึงใช้เป็นพาหะในการบรรจุยีนแกก (*gag gene*) ของเชื้อไวรัสเอชไอวี-หนึ่งในการผลิตวัคซีนเพื่อกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมาต่อต้านเชื้อเอชไอวี (Caley, et al., 1997) ไวรัสที่ใช้เป็นพาหะแต่ละชนิดมีความเหมาะสมต่อเซลล์เป้าหมายที่ไม่เหมือนกันจึงทำให้เกิดข้อจำกัด ข้อดีและข้อด้อยในการนำไปใช้ที่แตกต่างกัน ดังแสดงไว้ตามตารางที่ 1

**2.4) พาหะที่ไม่ใช่ไวรัส (Non-viral vectors)**  
แบ่งได้เป็นสามกลุ่ม คือ 1) เทคนิคการนำส่งยีนโดยใช้เครื่องกลและกระแสไฟฟ้า (mechanical and electrical technique) 2) การนำส่งยีนด้วยระบบโพลิเมอร์ (polymeric delivery systems) และ 3) การนำส่งยีนด้วยระบบไลโปโซม (liposomal delivery systems)  
1) การนำส่งยีนโดยใช้เครื่องกลและกระแสไฟฟ้า เช่น การใช้เข็มฉีดยาเข้าเซลล์ (microinjection) (Davis, et al., 2000, GeneTherapyReview) ใช้ปืนนำส่งยีน (gene gun) (Yang and Sun, 1995, Chuang, et al., 2003) และการใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) (Wells,

2004) พบว่าวิธีการนี้ควบคุมมาตรฐานให้คงที่ได้ยากเมื่อนำไปใช้จริงในมนุษย์ 2) การนำส่งยีนด้วยระบบโพลิเมอร์ หรือเรียกอีกอย่างว่า “โพลิเพล็กซ์ (polyplexes)” (Sun and Zhang, 2010) คือการนำสารโพลิเมอร์ที่มีประจุบวกมาเชื่อมต่อกับยีนเพื่อการรักษา (ดีเอ็นเอ/อาร์เอ็นเอ) ซึ่งมีประจุลบในการนำส่งเข้าเซลล์ สาเหตุที่ต้องใช้สารที่มีประจุบวกเนื่องจากพลาสมาเมมเบรนของเซลล์เป้าหมายมีประจุลบจากหมู่ฟอสเฟตและยีนเพื่อการรักษาซึ่งเป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอก็มีประจุลบจากแนวแกนหมู่ฟอสเฟตเช่นเดียวกัน การมีประจุเหมือนกันทำให้เกิดแรงผลักระหว่างโมเลกุล ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องใช้สารที่มีประจุบวกช่วยในการนำส่งโมเลกุลที่มีประจุลบเข้าเซลล์เป้าหมาย ตัวอย่างโพลิเมอร์ได้แก่ โพลิเอทิลีนไอมีน (polyethylenimine, PEI) (Abdallah, et al., 1996) โพลิแอลไลซีน (poly(L-lysine)) (Lollo, et al., 2002, Yamagata, et al., 2007) ไคโตซาน (chitosan) (Fernandes, et al., 2006, Gaspar, et al., 2011) และเดนไดรเมอร์ (dendrimer) (Paleos, et al., 2009, Dufes, et al., 2005) 3) การนำส่งยีนด้วยระบบไลโปโซม ไลโปโซม หรือเรียกอีกอย่างว่า “ลิโปเพล็กซ์ (lipoplexes)” (Li and Huang, 2000) คือโมเลกุลที่มีส่วนประกอบสองชั้นโดยชั้นนอกเป็นสารฟอสโฟไลปิด (phospholipid bilayers) ห่อหุ้มชั้นในซึ่งเป็นส่วนของน้ำดีเอ็นเอ/อาร์เอ็นเอจะถูกบรรจุไว้ในส่วนนี้ ไลโปโซมที่นิยมใช้คือไลโปโซมที่มีประจุบวก (cationic liposome) (Charoensit, et al., 2010, Templeton, 2002)



รูปที่ 1 แสดงวิธีการนำส่งยีนเพื่อการรักษาเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วยสองวิธีหลัก (The National Institute of Health resource for stem cell research)

1) การนำส่งยีนเพื่อการรักษาเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วยโดยตรง (direct infuse/delivery)

1.1) ยีนเพื่อการรักษาถูกบรรจุเข้าสู่พาหะในทีนี้คือไวรัส 1.2) ไวรัสที่บรรจุยีนเพื่อการรักษาแล้วถูกฉีด (injection) เข้าสู่ร่างกายผู้ป่วย

2) การนำส่งยีนเพื่อการรักษาเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วยโดยใช้เซลล์ปรับแต่ง (genetic modified cells)

2.1) ยีนเพื่อการรักษาถูกบรรจุเข้าสู่พาหะในทีนี้คือไวรัส 2.2) สเต็มเซลล์ของผู้ป่วยถูกนำออกจากร่างกาย 2.3) พาหะที่บรรจุยีนเพื่อการรักษาถูกนำส่งเข้าสู่สเต็มเซลล์ ซึ่งเรียกว่า “สเต็มเซลล์ที่ได้รับ การปรับแต่งยีน (genetic modified stem cells)” 2.4) เพิ่มจำนวนสเต็มเซลล์ที่ได้รับการปรับแต่งยีน 2.5) นำเซลล์ที่ได้รับการปรับแต่งยีนกลับเข้าสู่เซลล์ร่างกายผู้ป่วยอีกครั้ง

**ตารางที่ 1** แสดงข้อดีและข้อด้อยของไวรัสที่ใช้เป็นพาหะชนิดต่าง ๆ (Walther and Stein, 2000, Roth and Cristiano, 1997)

| ชนิดของไวรัสพาหะ                                    | ข้อดี                                                                                                                                                                                                           | ข้อด้อย                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. รีโทรไวรัส                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- แทรกจีโนมเข้ากับจีโนมของเซลล์เจ้าบ้าน</li> <li>- บุกรุกเฉพาะเซลล์ที่มีการแบ่งตัว (ในกรณีที่ต้องการความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์เป้าหมายแบบไม่แบ่งตัว)</li> </ul>            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- บุกรุกเฉพาะเซลล์ที่มีการแบ่งตัว</li> <li>- ประสิทธิภาพในการเข้าเซลล์ได้ต่ำ (low transduction efficiency)</li> <li>- แทรกจีโนมเข้ากับจีโนมของเซลล์เจ้าบ้านแบบไม่เจาะจงตำแหน่งบนยีน [ถ้าแทรกบริเวณยีนมะเร็ง (oncogenes) อาจกระตุ้นยีนมะเร็งได้]</li> </ul> |
| 2. เลนติไวรัส                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- บุกรุกได้ทั้งเซลล์ที่มีการแบ่งตัวและไม่แบ่งตัว</li> <li>- การแสดงออกของยีนเพื่อการรักษามีความเสถียร</li> </ul>                                                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>- อาจเกิดการกลายพันธุ์ขึ้นเนื่องมาจากการแทรกของยีน (insertional mutagenesis)</li> </ul>                                                                                                                                                                    |
| 3. อะดีโนไวรัส                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- บุกรุกได้ทั้งเซลล์ที่มีการแบ่งตัวและไม่แบ่งตัว</li> <li>- ประสิทธิภาพในการเข้าเซลล์สูง (high transduction efficiency)</li> <li>- บุกรุกเซลล์ได้หลากหลายชนิด</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันมาก</li> <li>- ไม่แทรกจีโนมเข้ากับจีโนมของเซลล์เจ้าบ้าน</li> <li>- ยีนแสดงออกได้ไม่นาน (transient gene expression)</li> </ul>                                                                                                      |
| 4. เอเอวีไวรัส (Adeno-associated virus vector, AAV) | <ul style="list-style-type: none"> <li>- บุกรุกได้ทั้งเซลล์ที่มีการแบ่งตัวและไม่แบ่งตัว</li> <li>- ไม่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันมาก</li> <li>- ไม่ก่อโรค</li> </ul>                                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>- บรรจุยีนเพื่อการรักษาได้น้อย</li> <li>- ไม่แทรกจีโนมเข้ากับจีโนมของเซลล์เจ้าบ้าน</li> <li>- ผลผลิตได้ยาก</li> </ul>                                                                                                                                      |
| 5. เฮอร์ปีไวรัส                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- บุกรุกเซลล์ได้หลากหลายชนิด</li> <li>- บรรจุยีนเพื่อการรักษาได้มาก</li> <li>- บุกรุกเซลล์ประสาทได้ดี</li> </ul>                                                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>- อาจเป็นพิษต่อเซลล์</li> <li>- ไม่แทรกจีโนมเข้ากับจีโนมของเซลล์เจ้าบ้าน</li> </ul>                                                                                                                                                                        |

### 3. รูปแบบการรักษาโรคด้วยยีน (Approaches)

**3.1) พลาสมิด (plasmid)** พลาสมิดคือดีเอ็นเอชนิดหนึ่งซึ่งพบโดยธรรมชาติได้ในแบคทีเรีย สาหร่ายหรือสิ่งมีชีวิตประเภทยูแคริโอตบางชนิด พลาสมิดมีรูปร่างหลายแบบ เช่น สายคูล่งกลม สายคู่เส้นตรงหรือพันกันเป็นเส้นเกลียวปลายปิดและปลายเปิด (Wikipedia. Plasmid) เป็นต้น เนื่องจากพลาสมิดมีคุณสมบัติพิเศษที่สามารถจำลอง (replication) ถอดรหัส (transcription) และแปลรหัส (translation) ยีนของตัวเองได้อย่างเป็นอิสระเมื่ออยู่ในเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมจึงทำให้พลาสมิดเป็นที่นิยมในการนำมาใช้เป็นพาหะนำยีนเพื่อการรักษาเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย ตัวอย่างการนำพลาสมิดมาใช้สำหรับเทคโนโลยีการรักษาโรคด้วยยีนมีดังนี้ 1) การรักษาโรคด้วยยีนในรูปแบบของ “ดีเอ็นเอวัคซีน (DNA vaccine) / จีเนติกวัคซีน (genetic vaccine) / นิวคลีโอติกแอซิดวัคซีน (nucleic acid vaccine) / ยีนวัคซีน (gene vaccine)” เอนเอวัคซีนเป็นเทคโนโลยีการผลิตวัคซีนวิธีใหม่ที่เกิดจากการสอดแทรกยีนเป้าหมายเข้าสู่พลาสมิดโดยยีนเป้าหมายนั้นจะถูกแปลรหัสให้โปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้ต่อต้านโรคที่ต้องการได้ (Wikipedia. DNA vaccination, Donnelly, et al., 2005) วัคซีนชนิดนี้มีข้อเด่นคือสามารถสร้างให้เกิดแอนติเจนที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อหนึ่งหรือสองโรคในครั้งเดียวได้และสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งที่เป็นแบบเซลล์ (cell-mediated immunity) และแบบของเหลวในร่างกายได้ (humoral immunity) (Sharma, et al., 2004) แต่มีข้อด้อยคือร่างกายอาจสร้างแอนติบอดีขึ้นมาต่อต้าน ดีเอ็นเอที่นำส่งเข้าร่างกาย (Wikipedia. DNA vaccination) กระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ humoral ได้น้อยและมีความเสี่ยงต่อการเกิด insertional mutagenesis ได้ (Sharma, et al., 2004) มีการศึกษาวิจัยการใช้ดีเอ็นเอวัคซีนในโรคแพ้อาหาร (Nguyen, et al., 2001) โรคไข้วัดนก (Barnes, 2011) และโรควัณโรค (Franco, et al., 2008) เป็นต้น

**2) การรักษาโรคด้วยยีนในรูปแบบของยีนฆ่า (suicide gene)** เทคโนโลยีที่เรียกว่ายีนฆ่าคือการนำยีนที่จะถูกแปลรหัสให้โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงยาจากรูปที่ยังไม่ออกฤทธิ์ (prodrug) ให้เป็นรูปที่ออกฤทธิ์ (active form) เข้าสู่เซลล์เป้าหมายที่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนั้น ๆ ได้

เช่น เซลล์มะเร็ง (Walther and Stein, 2000) ตัวอย่างยีนฆ่าได้แก่ การสอดยีน ไซโตซีนดีอะมิเนส (Cytosine deaminase, CD) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนยา 5-ฟลูออโรโรไซโตซีนเป็น 5-ฟลูออโรยูราซิลซึ่งออกฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็ง (Patil, et al., 2005, Alj, et al., 2000) หรือยีนเฮอร์ปีซิมเพลกไทมิดีนไคเนสไทป์วัน (Herpes simplex type-1 thymidine kinase, HSV-Tk) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงยาด้านไวรัสแกงไซโคลเวียร์หรือไซโดวูดีนจากรูปที่ยังไม่ออกฤทธิ์เป็นรูปที่ฆ่าเชื้อไวรัส (Denny, 2003, Bonini, et al., 2007) เป็นต้น

### 3.2) โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotides)

#### 3.2.1 แอนติยีน โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (anti gene oligonucleotides)

คือ ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอสายเดี่ยวหรือสายคู่ที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อให้เข้าจับกับดีเอ็นเอจีโนมโดยการเข้าจับนั้นอาจเข้าจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เกิดขึ้นขณะเปิดเส้นยีนในขบวนการจำลองยีนหรือขบวนการถอดรหัสส่งผลให้รบกวนหรือหยุดกระบวนการจำลองยีนและกระบวนการถอดรหัสตามลำดับ ในกรณีที่เข้าจับกับดีเอ็นเอสายคู่แอนติยีนจะเข้าจับบริเวณร่องขนาดใหญ่ (major groove) ของดีเอ็นเอจีโนมภายในนิวเคลียสทำให้เกิดเส้นเกลียวสามเส้น (triple helix, triplex) จึงเป็นการขัดขวางการเข้าจับของโปรตีนสำคัญที่ต้องใช้ในการเริ่มต้นขบวนการถอดรหัส (transcription factor protein) หรือยับยั้งกระบวนการต่อความยาวของเส้นยีน (elongation) หลักการแอนติยีนถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อไวรัสหลายชนิด เช่น โรคเอดส์ โดยให้แอนติยีนเข้ายับยั้งกระบวนการจำลองยีนของไวรัสเอชไอวีทำให้เกิดการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสเอชไอวี (McShan, et al., 1992)

#### 3.2.2 แอนติเซนส์ โอลิโก นิวคลีโอไทด์ (antisense oligonucleotides)

เป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นให้มีเป้าหมายในการเข้าจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) เป้าหมาย หรือเส้นเซนส์ซึ่งทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการแปลรหัสตามมาจุดที่แอนติเซนส์เข้าจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายมีดังนี้ 1) ระหว่างกระบวนการตกแต่งเอ็มอาร์เอ็นเอ (splicing process) โดยการเข้าจับกับเบสตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตกแต่ง (splicing sequence) ทำให้ไม่

เกิดเอ็มอาร์เอ็นเอที่สมบูรณ์ 2) ระหว่างกระบวนการขนส่งเอ็มอาร์เอ็นเอออกสู่ไซโตพลาสซึมทำให้ไม่มีเอ็มอาร์เอ็นเอออกมาสู่ไซโตพลาสซึมเพื่อการแปลรหัส 3) เข้าจับกับเบสที่เป็นรหัสเริ่มต้นของการแปลรหัส (initiation codon) ทำให้กระบวนการแปลรหัสไม่สามารถเริ่มต้นได้ หรือไรโบโซมอลโปรตีนเคลื่อนที่ไปบนเส้นเอ็มอาร์เอ็นเอในระหว่างกระบวนการแปลรหัสไม่ได้ ในกรณีที่แอนตี้เซนส์นั้นเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว จะเป็นการจับกันระหว่างอาร์เอ็นเอสองเส้น (antisense RNA-mRNA) การยับยั้งการแปลรหัสอาจเกิดจากการเคลื่อนตัวของไรโบโซมอลไปบนเส้นเอ็มอาร์เอ็นเอไม่ได้ ส่วนในกรณีที่แอนตี้เซนส์นั้นเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว จะเป็นการจับกันระหว่างดีเอ็นเอและเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย (antisense DNA-mRNA) การจับกันนี้จะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสเอส (RNase H) ซึ่งมีหน้าที่อย่างจำเพาะในการตัดสายอาร์เอ็นเอที่เข้าคู่กับเส้นดีเอ็นเอ (DNA/RNA hybrids) ทำให้เอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายถูกทำลายส่งผลให้กระบวนการแปลรหัสไม่สามารถเกิดขึ้นได้ (Patil, et al., 2005, Dias and Stein, 2002, Jarald, et al., 2004, Bhindi, et al., 2007)

**3.3) ไรโบไซม์ (Ribozyme)/ อาร์เอ็นเอเอนไซม์ (RNA enzyme) หรือ คาตาไลติกอาร์เอ็นเอ (catalytic RNA)** คืออาร์เอ็นเอที่มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์อยู่ในตัวเอง โดยอาร์เอ็นเอจะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ได้ก็ต่อเมื่ออาร์เอ็นเอนั้นมีรูปร่างที่จำเพาะและมีโลหะประจุสองบวกร่วมทำงานด้วย (เฉพาะไรโบไซม์ที่มีรูปร่างแบบหัวฆ้อน) ไรโบไซม์ธรรมชาติถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อ ค.ศ. 1970 โดย ดร. โทมัส เชค และ ดร. ชิดนีย์ เอทแมน ซึ่งต่อมาได้รับรางวัลโนเบลสาขาเคมีในปี ค.ศ. 1989 เนื่องจากไรโบไซม์สามารถตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ได้ทั้งของตัวเองและของอาร์เอ็นเออื่นทำให้ไรโบไซม์ถูกนำมาใช้ศึกษาวิจัยเพื่อลดการแสดงออกของยีนที่ทำให้เกิดโรคโดยออกแบบให้ไรโบไซม์เลือกเข้าจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายแล้วตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ของเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนเป้าหมายนั้นทำให้ยีนที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคไม่สามารถแสดงออกได้ (Bhindi, et al., 2007, Stull and Jr. Szoka, 1995) ไรโบไซม์ถูกแบ่งออกเป็นสองประเภทคือไรโบไซม์ที่มีรูปร่างแบบหัวฆ้อน (hammerhead ribozyme) และไรโบไซม์ที่มีรูปร่างแบบกึ่งพิติดม (hairpin ribozyme) (Patil, et al., 2005)

ซึ่งทั้งสองชนิดมีรูปแบบการเข้าจับกับลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์จำเพาะที่แตกต่างกัน (Stull and Jr. Szoka, 1995) ไรโบไซม์ทั้งสองประเภทถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งต่อไปนี้ **1) โรคติดเชื้อไวรัส** เช่น โรคไขหวัดใหญ่ (Wong, et al., 2010) โดยมีเป้าหมายที่ยีนต่างๆ เช่น ยีนนิวคลีโอโปรตีนของไวรัสไขหวัดใหญ่ (Nucleoprotein gene, NP) (Tang, et al., 1994) ยีนพีบีหนึ่ง (PB1 gene) (Lazarev, et al., 1999) หรือยีนเอ็มหนึ่ง (Matrix, M1 gene) (Kumar, et al., 2010) เป็นต้น หรือโรคไวรัสตับอักเสบบี (Weizsacker, et al., 1998, Wang, et al., 2010) ไวรัสตับอักเสบบี (Welch, et al., 1998, Pawlotsky, et al., 2007) ไวรัสเริม (Trang, et al., 2001) ไวรัสเอชไอวีซึ่งกำลังมีการศึกษาวิจัยในมนุษย์ระยะที่สอง (de Feyter, et al., 2000, Rigden, et al., 2000, Mitsuyasu, et al., 2009) และไวรัสซาร์ (Fukushima, et al., 2009) เป็นต้น **2) โรคมะเร็ง** หนึ่งในสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งคือการเกิดการผ่าเหล่า (mutation) และการแสดงออกที่เกิน (over-expression) ของยีนบางชนิดแล้วส่งผลให้มีการเพิ่มและเจริญเติบโตของเซลล์อย่างไม่จำกัด ไรโบไซม์ถูกนำมาใช้ในการลดการแสดงออกของยีนผ่าเหล่าและแสดงออกเกินที่เป็นสาเหตุของโรคมะเร็งดังนี้ ยีนแรส (RAS gene) ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Chang, et al., 1997, Leirdal and Sioud, 2002) ยีนซี-มิก (c-myc gene) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cheng, et al., 2000) ยีนเฮอร์-สอง (HER-2 gene) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม (He, et al., 2009) ยีนบีซีแอล-สอง (bcl-2 gene) (CancerLink, 2011) ยีนวีอีจีเอฟ (Vascular endothelial growth factor, VEGF gene) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเส้นเลือดที่ไปเลี้ยงเซลล์มะเร็ง พบว่าการลดการแสดงออกของยีนนี้มีผลให้เซลล์มะเร็งลดการเจริญเติบโตลง (Ciafre, et al., 2004, Chang, et al., 2009) ยีนเทโลเมอเรส (telomerase gene) ทั้งสองยีนนี้อยู่ในวิถีกลไกที่ทำหน้าที่กำหนดควบคุมการตายของเซลล์ซึ่งถ้ามีการผ่าเหล่าของยีนนี้ไปจะทำให้เสียสมดุลระหว่างการมีชีวิตอยู่และตายของเซลล์ (Song, et al., 2004) และ ยีนเอ็มดีอาร์-หนึ่ง (Multidrug resistance, MDR-1 gene)

ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา การแสดงออกที่เกินของยีนนี้มีผลให้เซลล์มะเร็งดื้อต่อยาเคมีบำบัดบางชนิดพบว่าไรโบไซม์ที่ถูกออกแบบมาให้กีดการแสดงออกของยีนนี้ทำให้เซลล์มะเร็งไวต่อยาโดxorubicin (doxorubicin) เพิ่มขึ้น (Wang, et al., 2003) **3) โรคหัวใจและหลอดเลือด** ตัวอย่างโรคหัวใจที่เกิดจากพยาธิสภาพของหลอดเลือดหัวใจ เช่น ความดันโลหิตสูง การเกิดภาวะตีบตันของหลอดเลือดแดงหลังการผ่าตัดขยายหลอดเลือดด้วยสายสวน (artery restenosis after angioplasty) ซึ่งการเกิดภาวะตีบตันเหล่านี้เชื่อว่ามาจากการเจริญเติบโตของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด (Vascular smooth muscle cell, VSCM) รุกเข้าไปในโพรงหลอดเลือดซึ่งมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น สารช่วยเจริญ (growth factor) ไซโตไคน์ (cytokines) เคโมไคน์ (chemokines) และ ฮอร์โมน เป็นต้น มีการนำไรโบไซม์มาใช้กีดการแสดงออกของยีนที่เป็นสารช่วยเจริญ เช่น ยีนพิตีจีเอฟ (Platelet-derived growth factor, PDGF gene) (Hu, et al., 2002) ยีนทีจีเอฟ-เบต้าหนึ่ง (Transforming growth factor, TGF- $\beta$ 1 gene) (Su, et al., 2000) หรือยีนเอฟแอลที-หนึ่ง (Flt-1 gene) และยีนเคดีอาร์ (KDR gene) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับให้สารช่วยเจริญของหลอดเลือด (Vascular endothelial growth factor, VEGF) (Parry, et al., 1999) และยีนลิปสอง-ไลพอกซีจีเนส (12-Lipoxygenase, 12-LO gene) ซึ่งเป็นยีนผลิตเอนไซม์ในวิถีการเจริญเติบโตของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด (Gu, et al., 1995) เป็นต้น

**3.4) ดีเอนเอไซม์ (DNAzyme)** ดีออกซีไรโบไซม์ (Deoxyribozyme) ดีเอนเอ เอนไซม์ (DNA enzyme) หรือ คาตาไลติก ดีเอนเอ (Catalytic DNA) คือ ดีเอนเอที่มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์โดยมีคุณสมบัติและกลไกการทำงานคล้าย ๆ อาร์เอนเอไซม์แต่ต่างกันตรงที่ ดีเอนเอไซม์มีความคงตัวสูงกว่าเนื่องจากตำแหน่งที่ 2'-OH ของอาร์เอนเอซึ่งถูกไฮโดรไลซิสได้ง่ายนั้นถูกแทนที่ด้วย 2'-H ในดีเอนเอทำให้ดีเอนเอมีความคงตัวสูงกว่าอาร์เอนเอ โครงสร้างดีเอนเอไซม์ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 10-23 นิวคลีโอไทด์ซึ่งแบ่งเป็นสองส่วนตามหน้าที่ คือ ส่วน “แขนจับ (binding arm)” ซึ่งมีหน้าที่ไว้เลือกจับกับเอ็มอาร์เอนเอเป้าหมายเท่านั้น ดังนั้นบริเวณนี้จึงเป็นบริเวณที่ถูกออกแบบให้มีลำดับการเรียง

ตัวของนิวคลีโอไทด์ที่หลากหลายแปรเปลี่ยนไปตามเอ็มอาร์เอนเอของยีนเป้าหมายที่จะเข้าคู่ด้วย ส่วนที่สองคือ “บ่วงที่ใช้ตัด (catalytic loop/core)” เป็นบริเวณที่เอนไซม์ออกฤทธิ์ตัดเอ็มอาร์เอนเอเป้าหมายที่จับไว้ ดังนั้น ณ บริเวณนี้ของดีเอนเอไซม์แต่ละชนิดจะถูกออกแบบให้มีเบสที่เหมือนเดิม (conserve) โดยส่วนใหญ่เป็น GGCTAGCTACAACGA (Richards, et al., 2010) มีงานวิจัยพบว่าดีเอนเอไซม์ที่มีประโยชน์จะมีลักษณะดังนี้ ดีเอนเอไซม์นั้นควรเข้าจับและตัดเฉพาะเอ็มอาร์เอนเอเป้าหมายเท่านั้น ยีนที่เลือกเป็นเป้าหมายควรเป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรค การยับยั้งการทำงานของยีนเป้าหมายนั้นต้องไม่ส่งผลให้ร่างกายมีความผิดปกติ ดีเอนเอไซม์นั้นควรถูกนำและส่งเข้าสู่เซลล์หรือเนื้อเยื่อเป้าหมายได้ด้วยพาหะหลายชนิด ควรสามารถถูกเติมแต่งโครงสร้างด้วยสารเคมีเพื่อป้องกันการถูกทำลายได้ (Dass, et al., 2008) เนื่องจากดีเอนเอไซม์มีความคงตัวที่ดีและยังสามารถสังเคราะห์ได้ง่ายกว่าไรโบไซม์ จึงทำให้ดีเอนเอไซม์ถูกนำมาศึกษาวิจัยในการรักษาโรคหลายชนิด เช่น โรคมะเร็ง โดยมีเป้าหมายที่ยีน *c-myc* ยีน *bcl-2* ยีน *VEGFR-2* (Patil, et al., 2005, Spoerri, et al., 2006) และยีน *K-RAS* (Yu, et al., 2009) เป็นต้น ดีเอนเอไซม์ถูกนำมาศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลอง เพื่อรักษาโรคหัวใจขาดเลือด โดยมีเป้าหมายที่อีจีอาร์-หนึ่ง (*Egr-1*) (Bhindi, et al., 2006) หรือยีนซี-จูน (*c-Jun*) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Luo, et al., 2009) เป็นต้น นอกจากนั้นดีเอนเอไซม์ยังถูกนำมาศึกษาวิจัยโดยรบกวนการทำงานของยีนเอ็มพีอาร์หนึ่ง (*mPer1*) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการติดมอร์ฟินในหนู (Liu, et al., 2005) และยีนทีจีเอฟ-เบต้าในโรคกรวยไตอักเสบ เป็นต้น (Isaka, et al., 2004)

**3.5) แอปทาเมอร์ (Aptamer)** คือ ดีเอนเอหรืออาร์เอนเอสายเดี่ยวหรือสายคู่ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาให้เข้าจับและยับยั้งการทำงานของโปรตีนเป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจงแล้วทำให้กระบวนการทางชีวภาพที่จะเกิดขึ้นในลำดับต่อมาไม่สามารถเกิดขึ้นได้ (Stull and Szoka Jr., 1995) แอปทาเมอร์ถูกนำมาศึกษาวิจัยในโรคติดเชื้อเอชไอวี โดยมีเป้าหมายต่อโปรตีนสำคัญเหล่านี้ เอนไซม์อินทีเกรส (integrase) (Chou, et al., 2005, Held, et al., 2006, de Soultrait, et al., 2004) เอนไซม์

รีเวอร์สทรานสคริปเทส (reverse transcriptase) (Held, et al., 2006, Chaloin, et al., 2002) เอนไซม์โปรตีเอส (protease) ไกลโคโปรตีน 120 (gp120) (de Soultrait, et al., 2004) ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญที่ไวรัสเอชไอวีใช้ในช่วงขั้นตอนการเข้าบุกรุกเซลล์เจ้าบ้าน รวมถึงโปรตีนที่ควบคุมการแสดงออกของยีนต่าง ๆ เช่น โปรตีนเรป (Regulator of Viral Gene Expression, Rev) โปรตีนแทต (TransActivator of Transcription, Tat) รวมถึงโปรตีนทาร์ (Trans-activation response element, TAR) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ใช้ในกระบวนการจำลองยีนของเชื้อไวรัสเอชไอวี (Kolb, et al., 2006) เป็นต้น นอกจากนี้ แอปทาเมอร์ยังถูกนำมาใช้ในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสใหญ่โดยเข้าจับกับฮีแมกกลูตินินไกลโคโปรตีน (Jeon, et al., 2004) เชื้อไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B) โดยการเข้าจับกับโปรตีนตัวรับ CD81 ของเซลล์เจ้าบ้าน (Zhang, et al., 2010) หรือในโรคมะเร็งที่ยีน K-RAS (Jeong, et al., 2010) มีรายงานการวิจัยพบว่าแอปทาเมอร์มีข้อดีกว่าแอนติบอดีคือมีความจำเพาะที่สูงกว่าไม่กระตุ้นภูมิคุ้มกันและมีความคงตัวดีกว่าในการเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ยา (Patil, et al., 2005)

**3.6) ดิคอยด์ (Decoy)** เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอสายคู่ให้มีลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *cis-element* ซึ่งเป็นบริเวณจำเพาะที่โปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์จะเข้าจับ ดิคอยด์สามารถยับยั้งกระบวนการก่อนถอดรหัส (pre-transcription level) และกระบวนการจำลองยีน (Bhindi, et al., 2007, Stull and Szoka Jr., 1995) เช่น ยับยั้งกระบวนการก่อนถอดรหัสของยีนซี-มิก (*c-myc*) และยีนซีดีสอง (*cdc2*) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด (vascular smooth muscle cell) โดยเข้าจับกับโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ชนิดอีสองเอฟ (E2F) จึงเรียกว่า “E2F decoy” (Morishita, et al., 1995, Morishita, et al., 1998, Prevent IV Investigator, 2005) หรือชนิดเอนเอฟแคปปาบี (NF-κB) (Nakagami, et al., 2006) เรียกว่า “NF-κB decoy” ในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจหรือยับยั้งกระบวนการจำลองยีนของไวรัสเอชไอวีหนึ่ง (HIV-1) โดยเข้าจับกับโปรตีนเรป (Rev protein) เรียกว่า “RRE decoy” (Bahner, et al., 1996) หรือเข้าจับกับโปรตีนแทต (Tat protein) เรียกว่า “TAR decoy” ซึ่ง

ทำให้ไวรัสเอชไอวีหนึ่งไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ (Unwalla and Rossi, 2010)

### 3.7) อาร์เอ็นเอไอ (RNA interference, RNAi)

คือ กระบวนการรบกวนหรือกีดการแสดงออกของยีนโดยใช้อาร์เอ็นเอขนาดเล็ก เช่น “เอสไออาร์เอ็นเอ” (short interfering RNA, siRNA) “เอ็มไออาร์เอ็นเอ” (micro RNA, miRNA) หรือ “เอสเอชอาร์เอ็นเอ” (short hairpin RNA, shRNA) ซึ่งอาร์เอ็นเอขนาดเล็กเหล่านี้จะทำงานร่วมกับเอนไซม์ในร่างกายของเจ้าบ้าน เช่น เอนไซม์ “ไดเซอร์” (Dicer) และเอนไซม์ในกลุ่ม “อาร์โกนาต” (Argonaute) ตัวอย่างกลไกการทำงานของ siRNA เกิดจากการใส่อาร์เอ็นเอสังเคราะห์สายคู่ยาวเข้าไปในเซลล์เมื่อเข้าไปอยู่ในไซโตพลาสซึมแล้วอาร์เอ็นเอสายคู่ยาวนั้นจะถูกตัดให้เป็นสายคู่สั้นลงโดยเอนไซม์ไดเซอร์เหลือความยาวประมาณ 21-25 คู่เบส (Bernstein, et al., 2006) และที่ปลายด้านสามไพรม์ (3') ทั้งสองข้างมีนิวคลีโอไทด์ยื่นเหลื่อมออกมา 2 นิวคลีโอไทด์ผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า “small interfering RNA หรือ siRNA” จากนั้น siRNA จะเข้าจับกับโปรตีนกลุ่มอาร์โกนาต (Hammond, et al., 2000) รวมเป็นกลุ่มก้อนทำงานเรียกว่า “ริส” (RNA-induced silencing complex, RISC) (Hammond and Simard, 2008) จากนั้นเอนไซม์อาร์เอ็นเอเฮลิเคส (RNA helicase) ที่อยู่ภายในริสจะแยก siRNA จากสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว โดยเส้นที่มีลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่กับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายเรียกว่าเส้น “แอนติเซนส์” (antisense) หรือ “ไกด์สแตรน” (guide strand) ส่วนเส้นที่เหลือเรียกว่าเส้น “เซนส์” (sense) หรือ “พาสเซนเจอร์สแตรน” (passenger strand) ซึ่งเป็นเส้นที่ถูกกำจัดทิ้งไป ต่อมาไกด์สแตรนจะพา ริส เข้าจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย (Martinez, et al., 2002) อย่างจำเพาะเจาะจงตามหลักการเข้าคู่กันของคู่เบส (Watson and Crick, 1953) จากนั้น เอนไซม์อาร์โกนาตจะตัดพันธะฟอสโฟ ไดเอสเทอร์ระหว่างนิวคลีโอไทด์ที่ 10 และ 11 บนเส้นเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายเมื่อนับจากปลายด้านห้าไพรม์ (5') ของเส้นไกด์สแตรน (Elbashir, et al., 2001, Elbashir, et al., 2001) ทำให้เส้นเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายสลายตัวอย่างรวดเร็วเนื่องจากที่ปลายทั้ง 5' และ 3' ไม่มี Cap (m7G) และ Poly A ตามลำดับ ช่วยในการป้องกันการสลายตัวอีกต่อไป (Liu, et al., 2004)

ดังนั้นจึงเป็นการกวดการแสดงออกของยีน ณ ระดับหลังการถอดรหัส (post-transcriptional level) เนื่องจากทำลายเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายถูกทำลายก่อนที่จะถูกแปลรหัส เอสไออาร์เอ็นเอถูกนำมาศึกษาในโรคหลายชนิดด้วยกัน **1) โรคติดเชื้อไวรัส** เช่น โรคไขหวัดใหญ่ โดยมีเป้าหมายที่ยีนของเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซา ดังนี้ ยีนเอ็มหนึ่ง (Hui, et al., 2004) ยีนเอ็มสอง (Matrix2 gene, M2) (Sui, et al., 2009) ยีนนิวคลีโอโปรตีน (Zhou, et al., 2007) และยีนที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ไซอะลิลทรานสเฟอเรส (sialyltransferase) การกวดการแสดงออกของยีนเหล่านี้มีผลให้การจำลองยีนของไวรัสหยุดลงส่งผลให้ไวรัสไม่มียีนชุดใหม่ที่จะใช้ในการประกอบร่างเป็นไวรัสตัวใหม่ขึ้นมา ดังนั้นจึงเป็นการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส นอกจากนั้นเอสไออาร์เอ็นเอยังถูกนำมาศึกษาในการรักษาโรคติดเชื้อเอชไอวี โดยถูกออกแบบให้กวดการแสดงออกของยีนสองกลุ่มใหญ่คือ ยีนของไวรัสเอชไอวีเอง เช่น ยีน Rev ยีน Tat และยีน Nef ซึ่งส่งผลต่อการจำลองยีนของไวรัส (Singh and Gaur, 2009, Subramanya, et al., 2010) และยีนของเจ้าบ้าน เช่น ยีนซีดีโฟร์ (CD4 gene) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับเชื้อไวรัสเอชไอวีหรือยีนซีเอ็กซ์ซีอาร์โฟร์ (CXCR4 gene) และซีซีอาร์โฟร์ (CCR5 gene) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับช่วย (Rossi, 2008, Isamu, et al., 2008) เป็นต้น ยิ่งไปกว่านั้นมีความพยายามที่จะรักษาโรคติดเชื้อเอชไอวีด้วยการนำวิธีการรักษาโรคด้วยยีนหลายๆวิธีมาใช้ร่วมกัน เช่น มีการศึกษาถึงความปลอดภัยและประสิทธิผลของการนำไรโบไซม์ เอสไออาร์เอ็นเอ และดีคอยด์มาใช้ร่วมกัน (Anderson, et al., 2007) หรือการใช้เอนไซม์รีเวิร์มกับเอสไออาร์เอ็นเอ (Zhou, et al., 2008, Neff, et al., 2011) การใช้แอนติเซนส์ร่วมกับเอสไออาร์เอ็นเอ (Juliano, et al., 2008) เป็นต้น นอกจากนั้น เอสไออาร์เอ็นเอยังถูกนำมาศึกษาในโรคไวรัสตับอักเสบชนิดบี (Cheng, et al., 2005, Chen, et al., 2008) ตับอักเสบชนิดซี (Kim, et al., 2009) และตับอักเสบชนิดอี (Huang, et al., 2009) ด้วยเช่นกัน **2) โรคมะเร็ง** โรคมะเร็งเป็นเป้าหมายหนึ่งของการรักษาด้วยเอสไออาร์เอ็นเอโดยกวดการทำงานของยีนที่เป็นสาเหตุการเกิดมะเร็งกลุ่มเดียวกับการรักษาด้วยไรโบไซม์ (Pai, et al., 2006, Song, et al., 2009) **3) โรคหัวใจและหลอดเลือด** เอสไออาร์เอ็นเอถูกนำ

มาใช้กวดการแสดงออกของยีนที่คาดว่าจะเป็สาเหตุของการเกิดโรคหัวใจหลายยีนด้วยกัน เช่น ยีนตัวรับ แองจิโอเทนซินชนิดที่หนึ่ง (AT1R gene) ซึ่งเป็นยีนที่ผลิตตัวรับสารเรนินแองจิโอเทนซิน (rennin-angiotensin) โดยสารชนิดนี้มีคุณสมบัติทำให้หลอดเลือดหดตัวซึ่งทำให้เกิดความดันโลหิตสูง หรือยีนนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี (Nuclear factor-kappa B, NF-KB) ซึ่งคาดว่าจะเป็สาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบตัน (atherosclerosis) เอสไออาร์เอ็นเอถูกนำมากวดการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์อาร์เอ็นเอดีเพนเดนอาร์เอ็นเอโพลิเมอเรส (RNA-dependent RNA polymerase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการจำลองยีนของ ไวรัสค็อกซากกีบีสาม (Coxsackievirus B3, CVB3) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ (myocarditis) (Tang, et al., 2007, Kim, et al., 2008) รวมถึงกวดการแสดงออกของยีนฟาส (Fas gene) เพื่อยับยั้งการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Kim, et al., 2008) หรือยีนห้า-ไลพอกซีจีเนส (5-lipoxygenase gene, ALOX5) ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (Myocardial infraction, MI) (Lisovyy, et al., 2009) และยีนฟอสโฟแลมเบรน (Phospholamban gene, PLB) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคหัวใจวาย (Poller, et al., 2010) **4) โรคอันเกิดจากความเสื่อมของเซลล์ประสาท** ประกอบด้วยโรคหลัก ๆ ดังนี้ โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease, AD) พาร์กินสัน (Parkinson's disease, PD) โรคฮันติงตัน (Huntington's disease, HD) เอแอลเอส (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) และโรคกล้ามเนื้อเสียการประสานงานจากสมองน้อยและไขสันหลัง (Spinocerebellar ataxia, SCA) สาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคอัลไซเมอร์คือการเพิ่มขึ้นและสะสมของสารเบต้าอะไมลอยด์ ( $\beta$ -amyloid) ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทซึ่งการเพิ่มขึ้นของสารนี้เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนเทา (Tau gene) และยีนเอพฟี (Amyloid precursor protein, APP) หรือการเพิ่มขึ้นของระดับเอนไซม์เบต้าซีเครเทส ( $\beta$ -secretase, BACE1) ดังนั้น เอสไออาร์เอ็นเอจึงถูกนำมาใช้กวดการแสดงออกยีนเหล่านี้เพื่อลดการสะสมของสารเบต้าอะไมลอยด์ (Miller, et al., 2004, Singer, et al., 2005) มีการศึกษาโดยนำเอสไออาร์เอ็นเอมากวดการแสดงออกของยีนที่เชื่อว่ามิ

ส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคพาร์กินสัน ดังนี้ ยีนอัลฟา-ซินนิวคลีอิน ( $\beta$ -synuclein gene) ยีนพาร์กิน (Parkin gene) ยีนดีเจ-หนึ่ง (DJ-1) ยีนพีโอเอนเค-หนึ่ง (PINK-1) และยีนยูบิเควอเทอโรน (Ubiquitin C-terminal hydroxylase L1, UCHL1) (Manfredsson, et al., 2006) นอกจากนั้นเอสไออาร์เอนเอยังถูกนำมาใช้ในการทดแทนการทำงานของยีนฮันติงตัน (Huntingtin gene) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคฮันติงตัน (DiFiglia, et al., 2007) ยีนเอสโอดีหนึ่ง (Cu/Zn-superoxide dismutase, SOD1 gene) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรค เอแอลเอส และยีนอเทกซินชนิดที่ 1 และชนิดที่ 10 (Ataxin-1 และ Ataxin-10) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคกล้ามเนื้อเสื่อมการประสานงานจากสมองน้อยและไขสันหลังชนิดที่หนึ่งและชนิดที่สิบตามลำดับ (Xia, et al., 2004, Marz, et al., 2004) 5) **โรคเบาหวาน** เบาหวานเกิดจากการมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติซึ่งมีสาเหตุมาจากตับอ่อนสร้างและหลั่งฮอร์โมนอินซูลินในระดับที่ต่ำกว่าปกติหรือมีความผิดปกติของ กระบวนการสร้างน้ำตาลจากตับ (gluconeogenesis) ซึ่งกระบวนการนี้ถูกควบคุมจากยีนหลายชนิด มีการศึกษาโดยใช้เอสไออาร์เอนเอกทดแทนการทำงานของยีนดังต่อไปนี้เพื่อรักษาโรคเบาหวาน เช่น ยีนแกมมา-โค-เอกติเวเตอร์ (?-co-activator gene, PGC-1) ยีนทีอาร์บีสาม (TRB-3 gene) หรือยีนที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ฟอสโฟอินอลไพริเวตคาร์บอกซีไคเนส (Phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK) (Rondinone, 2006) และ ยีนฟาสซึ่งเชื่อว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเบาหวานด้วยเช่นกัน (Jeong, et al., 2010) 6) **โรคติดเชื้อมาลาเรีย** เอสไออาร์เอนเอยังถูกนำมาศึกษาเพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อมาลาเรียโดยให้ทดแทนการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการฝังตัวและพัฒนาการของไขยุง เช่น การแสดงออกของยีนลามินิน (Laminin gene) ซึ่งเป็นยีนที่ทำให้ผนังของกระเพาะยุงแข็งแรงเหมาะแก่การฝังตัวของไข่ การทดแทนการแสดงออกของยีนนี้ทำให้ไขยุงไม่สามารถฝังตัวได้ซึ่งมีผลต่อพัฒนาการไปเป็นเป็นไขในระยะอื่น ๆ ต่อไป (Brown and Catteruccia, 2006) 7) **โรคผิวหนังที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรม** เช่น โรคพาโคไอนีเซีย คอนเจนิตา (Pachyonychia

congenita) ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของมิโนแอซิดชนิดแอสพาราจีนที่ตำแหน่งหนึ่งร้อยเจ็ดสิบเอ็ดไปเป็นอะมิโนแอซิดชนิดไลซีน (N171K) โดยความผิดปกตินี้เกิดขึ้นบนยีนเคอราติน (Keratin gene) ทำให้พบอาการผิวหนังบริเวณฝ่าเท้าหนาและด้านขึ้นปูดฝ่าเท้าและฝ่าเท้าอ่อนกำลัง เอสไออาร์เอนเอยังถูกนำมาศึกษาเพื่อใช้ทดแทนการแสดงออกของยีนเคอราตินที่กลายพันธุ์ซึ่งการศึกษานี้กำลังจะเข้าสู่การศึกษาวิจัยในมนุษย์ระยะที่ 1 (Leachman, et al., 2008) สามารถดูการเปรียบเทียบรูปแบบการรักษาโรคด้วยยีนชนิด ต่าง ๆ ได้จากตารางที่ 2

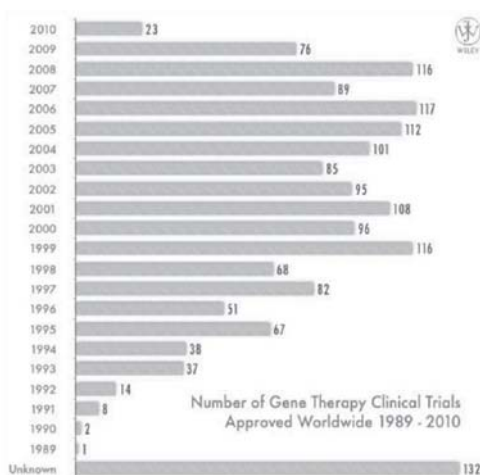
#### 4.การนำการรักษาโรคด้วยยีนมาศึกษาวิจัยในมนุษย์ (Gene Therapy Clinical Trials) (The Journal of Gene Medicine )

หลายประเทศทั่วโลกมีหน่วยงานที่ทำหน้าที่ในการควบคุมกำกับกับการศึกษาวิจัยการรักษาโรคด้วยยีนในมนุษย์ ดังนี้ 1) The NIH Recombinant DNA Advisory Committee (RAC) และสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (USFDA) 2) The Gene Therapy Advisory Committee (GTAC) ประเทศอังกฤษ 3) The Belgian Biosafety Server ประเทศเบลเยียม 4) Interactive database of trials being conducted in Germany (DeReG) ร่วมกับ Commission of Somatic Gene transfer (KSG) และ German Society for Gene Therapy (DG-GT) ประเทศเยอรมนี 5) The Gene and Related Therapies Research Advisory Panel (GTRAP) ประเทศออสเตรเลีย 6) Swiss Expert Committee for Biosafety ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ 7) “Ministry of Housing Spatial Planning and the Environment’s (VROM) office for licensing of genetically modified organisms (GMOs) ประเทศเนเธอร์แลนด์ 8) The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) ประเทศในเครือสหภาพยุโรป และ 9) เมื่อ ค.ศ. 2003 ประเทศจีนโดย State Food and Drug Administration (SFDA) ได้อนุมัติให้ใช้ผลิตภัณฑ์ยีนเพื่อใช้ในการรักษาชนิดแรก (Edelstein, et al., 2007)

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างของรูปแบบการรักษาโรคด้วยยีนชนิดต่าง ๆ

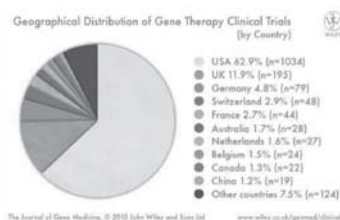
| รูปแบบ                                      | ประเภทของ<br>นิวคลีโอ                              | กลไกการทำงาน                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|---------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. พลาสมิด (Plasmid)                        | ดีเอ็นเอ                                           | นำยีนปกติเข้าสู่ร่างกายเพื่อแก้ไข ทดแทนยีนที่ผิดปกติ<br>[ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ เจนสิดีน (Gendicine) ผ่านการรับรองจาก<br>คณะกรรมการอาหารและยาประเทศจีน ปี ค.ศ. 2003]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 2. โอลิโกนิวคลีโอไทด์<br>(Oligonucleotides) | ดีเอ็นเอ/<br>อาร์เอ็นเอ                            | กวดการแสดงออกของยีนโดยยับยั้งการถอดรหัส (จับกับดีเอ็นเอจีโนม)<br>- แอนตี้ยีนต้องเข้าสู่นิวเคลียส<br>- กรณีที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยว จะเข้าจับกับดีเอ็นเอจีโนมขณะที่มีการ<br>เปิดสายเกลียวดีเอ็นเอระหว่างกระบวนการถอดรหัส<br>- กรณีที่จับกับดีเอ็นเอสายคู่ จะเข้าจับกับร่องขนาดใหญ่ของดีเอ็นเอจีโนม                                                                                                                                                                                              |
| 2.1 แอนตี้ยีน<br>โอลิโกนิวคลีโอไทด์         | สายเดี่ยวหรือ<br>สายคู่                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 2.2 แอนตี้เซนส์<br>โอลิโกนิวคลีโอไทด์       | ดีเอ็นเอ/อาร์<br>เอ็นเอสาย<br>เดี่ยว               | กวดการแสดงออกของยีนโดยการยับยั้งการแปลรหัส (จับกับเอ็มอาร์เอ็นเอ)<br>- กรณีเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวเมื่อจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายทำให้<br>ไรโบโซมเคลื่อนตัวไปบนเส้นเอ็มอาร์เอ็นเอไม่ได้<br>- กรณีเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวเมื่อจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายจะกระตุ้น<br>การทำงานของเอนไซม์อาร์เอ็นเอสเอส (RNase H) ซึ่งมีหน้าที่ตัด DNA-<br>RNA duplex [ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ฟอร์มิเวอริเซน โซเดียม (Formivirsene<br>sodium) ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการอาหารและยาประเทศ<br>สหรัฐอเมริกา ปี ค.ศ. 1998] |
| 3. ไรโบไซม์<br>(Ribozyme)                   | อาร์เอ็นเอที่มี<br>คุณสมบัติ<br>เป็นเอนไซม์        | กวดการแสดงออกของยีนโดยยับยั้งการแปลรหัสด้วยการตัดเอ็มอาร์เอ็นเอ<br>เป้าหมายซึ่งใช้ฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ทำงานร่วมกับโลหะประจุสองบวก                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 4. ดีเอ็นเอไซม์<br>(DNAzyme)                | ดีเอ็นเอที่มี<br>คุณสมบัติ<br>เป็นเอนไซม์          | กวดการแสดงออกของยีนโดยยับยั้งกระบวนการแปลรหัสด้วยการตัดเอ็ม<br>อาร์เอ็นเอเป้าหมายซึ่งใช้ฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ทำงานร่วมกับโลหะประจุสอง<br>บวก มีความคงตัวสูงกว่าและสังเคราะห์ง่ายกว่าไรโบไซม์                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 5. แอปทาเมอร์<br>(Aptamer)                  | ดีเอ็นเอ/อาร์<br>เอ็นเอสาย<br>เดี่ยวหรือสาย<br>คู่ | จับกับโปรตีนเป้าหมาย เช่น เอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทสหรือเอนไซม์<br>อินทีเกรสของเชื้อเอชไอวี ทำให้โปรตีนทำหน้าที่ไม่ได้ พบว่ามีความคงตัว<br>และมีความจำเพาะที่สูงกว่าแอนติบอดี [ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ พีแกปทานิบ<br>โซเดียม (Pegaptanib sodium)]                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 6. ดีคอยด์ (Decoys)                         | ดีเอ็นเอ/อาร์<br>เอ็นเอสายคู่                      | กวดการแสดงออกของยีนโดยยับยั้งกระบวนการถอดรหัสโดยจับกับโปรตีนที่ทำ<br>หน้าที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 7. อาร์เอ็นเอไอ (RNAi)                      | อาร์เอ็นเอ<br>สายคู่                               | กวดการแสดงออกของยีนโดยยับยั้งกระบวนการหลังการถอดรหัส (post-<br>transcription) โดยการตัดเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายด้วยเอนไซม์ อาร์โกนอต<br>ใน RISC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

การรักษาโรคด้วยยีนถูกนำมาศึกษาวิจัยในมนุษย์เป็นครั้งแรกเมื่อปี ค. ศ. 1990 นำการศึกษาวิจัยโดย นายแพทย์ ดร. สตีเฟน โรเซนเบิร์ก และคณะ (Rosenberg, et al., 1990) จากนั้นต่อมาก็มีการศึกษาวิจัยในมนุษย์เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน (รูปที่ 2) ประเทศที่มีการนำการรักษาโรคด้วยยีนมาศึกษาวิจัยในมนุษย์มีหลายประเทศโดยกระจายอยู่ทั่วโลกตามลำดับดังนี้ สหรัฐอเมริกา (62.9%)



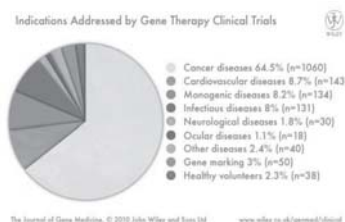
รูปที่ 2 แสดงจำนวนโครงการที่ได้รับการอนุมัติให้การรักษาโรคด้วยยีนมาศึกษาวิจัยในมนุษย์ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1989-2010

สหราชอาณาจักรอังกฤษ (11.9%) เยอรมันนี (4.8%) สวิตเซอร์แลนด์ (2.9%) ฝรั่งเศส (2.7%) ออสเตรเลีย (1.7%) เนเธอร์แลนด์ (1.6%) เบลเยียม (1.5%) แคนาดา (1.3%) จีน (1.2%) และประเทศอื่นๆ เช่น อิตาลี (1.3%) ญี่ปุ่น (1.1%) สเปน (0.8%) อิสราเอล (0.5%) สวีเดน (0.5%) โปแลนด์ (0.4%) ฟินแลนด์ (0.3%) นอร์เวย์ (0.1%) ไอร์แลนด์ (0.1%) เดนมาร์ก (0.1%) สาธารณรัฐเชค (0.1%) รัสเซีย (0.1%) อียิปต์ (0.1%) เม็กซิโก (0.1%) นิวซีแลนด์ (0.1%) สิงคโปร์ (0.1%) และไต้หวัน (0.1%) เป็นต้น (รูปที่ 3)



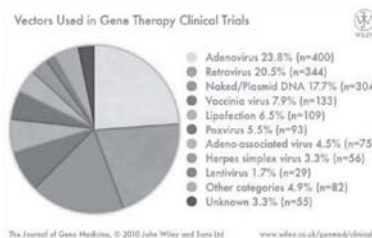
รูปที่ 3 แสดงประเทศที่มีการนำการรักษาโรคด้วยยีนมาศึกษาวิจัยในมนุษย์

โรคที่เป็นเป้าหมายสำหรับการรักษาด้วยยีน คือ โรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคที่เกิดจากความผิดปกติของยีนเพียงชนิดเดียว (monogenic diseases) เช่น โรคซิสติกไฟโบซิส (cystic fibrosis) ฮีโมฟีเลียชนิดเอ และชนิดบี (hemophilia A and B) และ Severe combined immunodeficiency (SCID) โรคติดเชื้อ โรคทางระบบประสาท และโรคทางตา เป็นต้น (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 แสดงโรคเป้าหมายของการศึกษาวิจัยในมนุษย์

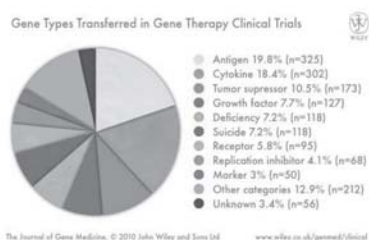
พบว่าพาหะที่ใช้นำยีนเพื่อการรักษาเข้าสู่เซลล์หรือเนื้อเยื่อเป้าหมายในการศึกษาวิจัยในมนุษย์มากที่สุดคือ อะดีโนไวรัส ธีโธไวรัส พลาสมิด แวกซ์เนียไวรัส การใช้ไลโปโซม ฟอกไวรัส อะดีโนแอสโซซิเอตไวรัส (adeno-associated virus) เฮอร์ปีไวรัส และเลนติไวรัส ตามลำดับ (รูปที่ 5)



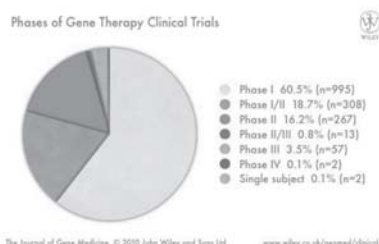
รูปที่ 5 แสดงพาหะที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในมนุษย์

ยีนหลายชนิดถูกนำมาศึกษาวิจัยในระดับคลินิก ซึ่งโดยส่วนใหญ่สอดคล้องกับโรคที่เป็นเป้าหมาย เช่น แอนติเจนยีน (antigen genes) ไซโตไคน์ยีน (cytokine genes) ยีนกดการเจริญของเนื้องอก (tumor suppressor genes) ยีนตัวรับ (receptor genes) และยีนฆ่า (suicide genes) ซึ่งยีนเหล่านี้ถูกนำมาศึกษาวิจัยในโรค มะเร็ง หรือยีนช่วยเจริญเติบโต (growth factor genes) ซึ่งส่วนใหญ่มีเป้าหมายของการศึกษาที่โรคหัวใจและหลอดเลือด นอกจากนั้นพบว่ายีนที่มีหน้าที่ยับยั้งกระบวนการจำลองยีน (replication inhibitor genes) และ

ที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ (marker genes) ถูกนำมาศึกษาวิจัยในโรคติดเชื้อเอชไอวี (รูปที่ 6) และจากรายงานการวิจัยพบว่า การนำการรักษาโรคด้วยยีนมาศึกษาวิจัยในมนุษย์โดยส่วนใหญ่แล้วอยู่ในระยะที่ 1 (รูปที่ 7)



รูปที่ 6 แสดงชนิดของยีนที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในมนุษย์



รูปที่ 7 แสดงระยะของการศึกษาวิจัยในมนุษย์ของการรักษาโรคด้วยยีน

## 5. สรุป

มีความเป็นไปได้สูงว่าการรักษาโรคด้วยยีนจะเป็นวิธีการรักษาโรคที่สำคัญและทรงประสิทธิภาพอีกวิธีหนึ่งในอนาคตสำหรับโรคทางพันธุกรรมรวมถึงโรคติดเชื้อร้ายแรงหลายชนิดในมนุษย์ เนื่องจากการรักษาโรคด้วยวิธีนี้มีข้อเด่นตรงที่เป็นการแก้ปัญหาที่ต้นเหตุของการเกิดโรคในระดับนิวคลีโอไทด์โดยการนำยีนที่ปกติเข้าทำหน้าที่แทนหรือทำลายยีนที่ผิดปกติ กอปรกับความจำเพาะเจาะจงสูงโดยสามารถเลือกนำส่งเฉพาะเซลล์เป้าหมายที่ต้องการจึงทำให้ลดการเกิดพิษต่อระบบอื่น ๆ ในร่างกาย เป็นต้น อย่างไรก็ตามการรักษาโรคด้วยยีนยังมีข้อควรพัฒนาในเรื่องดังต่อไปนี้ 1) การออกแบบยีนเพื่อการรักษาต้องมีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมาย 2) ระบบการนำส่งโดยเลือกใช้พาหะให้เหมาะสมต่อเซลล์เป้าหมายเพื่อป้องกันการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน การอักเสบ การเกิด insertional

mutagenesis การเกิดพิษต่อเซลล์และการเพิ่มระยะเวลาในการออกฤทธิ์ในร่างกาย เป็นต้น คาดว่าทั้งในปัจจุบันและอนาคตการรักษาโรคด้วยยีนจะมีความสำเร็จสูงขึ้น เพราะเมื่อไม่นานมานี้มีการพบความสำเร็จของโครงการศึกษายีนในมนุษย์ “The Human Genome Project” ซึ่งถือเป็นการศึกษาวิจัยที่มีประโยชน์อย่างสูงในการนำข้อมูลมาใช้เชื่อมโยงกับวิธีการรักษาโรคด้วยยีนและการรักษาโรคด้วยวิธีอื่นในระดับชีวโมเลกุล

## เอกสารอ้างอิง

- Abbott A. Italians first to use stem cells. *Nature* 1992; 356(6369): 465.
- Abdallah B, Hassan A, Benoist C, et al. A Powerful Nonviral Vector for In Vivo Gene Transfer into the Adult Mammalian Brain: Polyethylenimine. *Hum Gene Ther.* 1996; 7(16): 1947-54.
- Alj MB, Hellin AC, Lechanteur C, et al. Cytosine deaminase suicide gene therapy for peritoneal carcinomatosis. *Cancer Gene Ther.* 2000; 7(1): 20-26.
- Anderson J, Li MJ, Palmer B, et al. Safety and Efficacy of a Lentiviral Vector Containing Three Anti-HIV Genes' CCR5 Ribozyme, Tat-rev siRNA, and TAR Decoy- in SCID-hu Mouse-Derived T Cells. *Molecular Therapy* 2007; 15(6): 1182-1188.
- Arbanas C. Gene therapy using adeno-associated virus linked to liver cancer in mice [Online]. 2007 Jul 26 [Cited 2011 Feb 4]. Available from: <http://news.wustl.edu/news/Pages/9733.aspx>.
- Bahner I, Kearns K, Hao QL, et al. Transduction of Human CD34<sup>+</sup> Hematopoietic Progenitor Cells by a Retroviral Vector Expressing an RRE Decoy Inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication in Myelomonocytic Cells Produced in Long-Term Culture. *J Virol.* 1996; 70: 4352-4360.

- Barnes K. First positive results for DNA-based flu vaccine. [Online]. [Cited 2011 Feb 10]. Available from: <http://www.in-pharmatechnologist.com/content/view/print/88388>
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, et al. Role of bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; 409: 363-366.
- Bett AJ, Prevec L and Graham FL. Packaging Capacity and Stability of Human Adenovirus Type 5 Vectors. *J Virol.* 1993; 67(10): 5911-5921.
- Bhindi R, Fahmy RG, Lowe HC, et al. DNA Enzymes, Short Interfering RNA, and the Emerging Wave of Small-Molecule Nucleic Acid-Based Gene-Silencing Strategies. *Am J Pathol.* 2007; 171(4): 1079-1088.
- Bhindi R, Khachigian LM and Lowe HC. DNazymes targeting the transcription factor Egr-1 reduce myocardial infarct size following ischemia-reperfusion in rats. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1479-83.
- Blomer U, Naldini L, Kafri T, et al. Highly Efficient and Sustained Gene Transfer in Adult Neurons with a Lentivirus Vector. *J Virol.* 1997; 71(9): 6641-6649.
- Bonini C, Bondanza A, Perna SK, et al. The Suicide Gene Therapy Challenge: How to Improve a Successful Gene Therapy Approach. *Molec Ther.* 2007; 15(7): 1248-1252.
- Breaker RR and Joyce GF. A DNA enzymethat cleaves RNA. *Chem Biol.* 1994; 1(4): 223-9.
- Brown AE and Catteruccia F. Toward silencing the burden of malaria: progress and prospectis for RNAi-based approaches. *BioTechniques* 2006; 40: S38-S44.
- Caley IJ, Betts MR, Irlbeck DM, et al. Humoral, Mucosal, and Cellular Immunity in Response to a Human Immunodeficiency Virus Type 1 Immunogen Expressed y a Venezuelan Equine Encephalitis Virus Vaccine Vector. *J Virol.* 1997; 71(4): 3031-3038.
- Calos MP. Stability without a centromere. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 4084-4085.
- CancerLink. Anti-bcl-2 ribozyme effective against hormone sensitive, resistant prostate cancer in culture [Online]. [Cited 2011 Feb 03]. Available from: <http://www.oncolink.org/resources/article.cfm>.
- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease. *Science* 2000; 288(5466): 669-672.
- Chaloin L, Lehmann MJ, Sczakiel G, et al. Endogenous expression of a high-affinity pseudoknot RNA aptamer suppresses replication of HIV-1. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(18): 4001-4008.
- Chang MY, Won SJ and Liu HS. A ribozyme specifically suppress transformation and tumorigenicity of Ha-ras-oncogene-transformed NIH/3T3 cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1997; 123: 91-99.
- Chang SJ, Chen WC, Yang JC, et al. [Construction of adenovirus anti-vascular endothelial growth factor hairpin ribozyme and its inhibition of growth of colorectal cancer HT-29 cells]. *Ai Zheng* 2009; 28(4): 373-8.
- Charoensit P, Kawakami S, Higuchi Y, et al. Enhanced growth inhibition of metastatic lung tumors by intravenous injection of ATRA-cationic liposome/IL-12 pDNA complexes in mice. *Cancer Gene Ther.* 2010; 17: 512-522.
- Cheng J, Luo J, Zhang X, et al. Inhibition of cell proliferation in HCC-9204 hepatoma cells by a c-myc specific ribozyme. *Cancer Gene Ther.* 2000; 7(3): 407-412.
- Cheng TL, Chang WW, Su IJ, et al. Therapeutic inhibition of hepatitis B virus surface antigen expression by RNA interference. *Biochem Biophy Res Comm.* 2005; 336: 820-830.

- Chen Y, Cheng G and Mahato RI. RNAi for Treating Hepatitis B Viral Infection. *Pharmaceutical Res.* 2008; 25(1): 72-86.
- Chuang YC, Chou AK, Wu PC, et al. Gene Therapy for Bladder Pain With Gene Gun Particle Encoding Pro-Opiomelanocortin cDNA. *J Uro.* 2003; 170: 2044-2048.
- Chou J, Kern ER, Roizman W, et al. Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to gamma 134.5, a gene nonessential for growth in culture. *Science* 1990; 250(4985): 1262-1266.
- Chou SH, Chin KH and Wang AHJ. DNA aptamers as potential anti-HIV agents. *TRENDS in Biochemical Sciences* 2005; 30(5): 231-234.
- Ciafre SA, Niola F, Wannenes F, et al. An Anti-VEGF Ribozyme Embedded within the Adenoviral VAI Sequence Inhibits Glioblastoma Cell Angiogenic Potential in vitro. *J Vasc Res* 2004; 41: 220-228.
- Cline MJ, Stang H, Mercola K, et al. Gene transfer in intact animals. *Nature* 1980; 284: 422-425.
- Dass CR, Choong PFM, Khanchigian LM. DNAzyme technology and cancer therapy: cleave and let die. *Molec Cancer Ther.* 2008; 7: 243-251.
- Davis BR, Brown DB, Prokopishyn NL, et al. Micro-injection-mediated hematopoietic stem cell gene therapy. *Curr Opin Mol Ther.* 2000; 2(4): 412-9.
- Davis NL, Brown KW and Johnston RE. A viral vaccine vector that expresses foreign genes in lymph nodes and protects against mucosal challenge. *J Virol.* 1996; 70(6): 3781-3787.
- Davis NL, Willis LV, Smith JF, et al. In Vitro Synthesis of Infectious Venezuelan Equine Encephalitis Virus RNA from a cDNA Clone: Analysis of a Viable Deletion Mutant. *Virology* 1989; 171: 189-204.
- de Feyter R and Li P. Technology evaluation: HIV ribozyme gene therapy, Gene Shears Pty Ltd. *Curr Opin Mol Ther.* 2000; 2(3): 332-5.
- Denny WA. Prodrugs for Gene-Directed Enzyme-Prodrug Therapy (Suicide Gene Therapy). *J Biolmed and Biotech.* 2003; 2003:1: 48-70.
- de Soultrait VR, Lozach PY, Altmeryer R, et al. DNA aptamers derived from HIV-1 RNase H inhibitors are strong anti-integrase agents. *J Mol Biol* 2002; 324(2): 195-203.
- Dias N and Stein CA. Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms. *Molec Cancer Therapeu.* 2002; 1: 347-355.
- DiFiglia M, Sena-Esteves M, Chase K, et al. Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits. *PNAS* 2007; 104(43): 17204-17209.
- Donnelly JJ, Wahren B and Liu MA. DNA Vaccines: Progress and Challenges. *J Immunol.* 2005; 175: 633-639.
- Dong JY, Fan PD and Frizzell RA. capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gen Ther.* 1996; 7(17): 2101-12.
- Dufes C, Uchegbu IF and Schatzlein AG. Dendrimers in gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005; 57(15):2177-202.
- Edelstein ML, Abedi MR and Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007-an update. *J Gene Med* 2007; 9: 833-842.
- Elbashir SM, Lendeckel W and Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Development.* 2001; 15: 188-200.
- Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, et al. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNA in *Drosophilla melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 2001; 20: 6877-6888.

- Ellington AD and Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 1990; 346: 818-822.
- Fernandes JC, Tiera MJ and Winnik FM. Chitosan Nanoparticles for Non-Viral Gene Therapy. *Am Chem Soci.* 2006; 934: 177-200.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811.
- Franco LH, Wowk PF, Silva CL, et al. A DNA vaccine against tuberculosis based on the 65 kDa heat-shock protein differentially activates human macrophages and dendritic cells. *Genetic Vaccines and Therapy* 2008; 6: 1-11.
- Friedmann T. Progress Toward Human Gene Therapy. *Science* 1989; 244: 1275-1281.
- Friedmann T and Roblin R. Gene Therapy for Human Genetic Disease?. *Science* 1972; 175 (4025): 949-955.
- Fukushima A, Fukuda N, Ueno T, et al. Development of a Chimeric DNA-RNA Hammerhead Ribozyme Targeting SARS Virus. *Intervirology* 2009; 52: 92-99.
- Gaspar VM, Sousa F, Queiroz JA, et al. Formulation of chitosan-TPP-pDNA nanocapsules for gene therapy applications. *Nanotechnology* 2011; 22(1): 015101.
- GeneTherapyReview [Cell & Gene Therapy Forum 2011]. Plasmid DNA Transfection [Online]. 2009 Dec 29 [Cited 2011 Mar 1]. Available from: <http://www.genetherapyreview.com/gene-therapy-education/gene-transfer-vectors/2/147-dna-transfection.html>
- Gerstein MB, Bruce C, Rozowsky JS, et al. What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. *Genome Res.* 2007; 17: 669-681.
- Gu JL, Veerapanane D, Rossi J, et al. Ribozyme-Mediated Inhibition of Expression of Leukocyte-type 12-Lipoxygenase in Porcine Aortic Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ Res.* 1995; 77: 14-20.
- Hammond G and Simard MJ. Argonaute proteins key players in RNA silencing. *NatureReview Mol Cell Biol.* 2008; 9: 22-32.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, et al. An RNA-directed nuclease mediates posttranscriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000; 404: 293-296.
- He P, Zhu D, Hu JJ, et al. pcDNA3.1(-)-mediated targeting of HER-2 suppresses breast cancer tumor growth. *Mol Biol Rep.* 2009; 37(3): 1597-1604.
- Held DM, Kissel JD, Patterson JT, et al. HIV-1 inactivation by nucleic acid aptamers. *Frontiers in Bioscience* 2006; 11: 89-112.
- Hu WY, Fukuda N, Kotani M, et al. Adenovirus-Mediated Transfer of Ribozyme Targeting Platelet-Derived Growth Factor A-Chain mRNA Inhibits Growth of Vascular Smooth Muscle Cells From Spontaneously Hypertensive Rats. *J Cardio Pharmacol.* 2002; 39(6): 858-865.
- Huang F, Hua X, Yang S, et al. Effective inhibition of hepatitis E virus replication in A549 cells and piglets by RNA interference (RNAi) targeting RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Res.* 2009; 83: 274-281.
- Hudry E, Van DD, Kulik W, et al. Adeno-associated Virus Gene Therapy With Cholesterol 24-Hydroxylase Reduces the Amyloid Pathology Before or After the Onset of Amyloid P; aques in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *The American Society of Gene & Cell Therapy* 2010; 18(1): 44-53.

- Human Genome Project Information. Gene Therapy [Online]. [Cited 2010 Sep 7 ]. Available from: [http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/medicine/genetherapy.shtml](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/medicine/genetherapy.shtml).
- Hui EKW, Yap EM, An DS, et al. Inhibition of influenza virus matrix (M1) protein expression and virus replication by U6 promoter driven and lentivirus-mediated delivery of siRNA. *J General Virol.* 2004; 85: 1877-1884.
- Isaka Y, Nakamura H, Mizui M, et al. DNzyme for TGF- $\beta$  suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Inter.* 2004; 66: 586-590.
- Isamu L, Kanzaki B, Ornelas SS, et al. RNA interference and HIV-1 infection. *Rev. Med. Virol.* 2008; 18: 5-18.
- Jarald E, Edwin S, Dubey P, et al. Nucleic acid drugs: a novel approach. *African J Biotech.* 2004; 3(12): 662-666.
- Jeong S, Han SR, Lee YJ, et al. Identification of RNA Aptamer Specific to Mutant KRAS Protein. *Oligonucleotides* 2010; 20(3): 155-161.
- Jeon SH, Kayhan B, Yedidia TB, et al. A DNA Aptamer Prevents Influenza Infection by Blocking the Receptor Binding Region of the Viral Hemagglutinin. *J Biol Chem.* 2004; 279(46): 48410-48419.
- Jeong JH, Kim SH, Lee M, et al. Non-viral systemic delivery of Fas siRNA suppresses cyclophosphamide-induced diabetes in NOD mice. *J Control Release.* 2010; 143(1): 88-94.
- Josef MF, Snyder EY and Loring JF. Gene therapy: can neural stem cells deliver?. *Nature reviews neuroscience* 2006; 7: 75-84.
- Juliano R, Alam R, Dixit V, et al. Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(12): 4158-4171.
- Kay MA, Glorioso JC and Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Medicine* 2001; 7: 33-40.
- Kim SH, Jeong JH, Ou M, et al. Cardiomyocyte-targeted siRNA delivery by prostaglandin E2-Fas siRNA polyplexes formulated with reducible poly(amido amine) for preventing cardiomyocyte apoptosis. *Biomaterials* 2008; 29(33): 4439-4446.
- Kim SI, Shin D, Lee H, et al. Targeted delivery of siRNA against hepatitis C virus by apolipoprotein A-I-bound cationic liposomes. *J Hepatol.* 2009; 50(3): 479-488.
- Kim VN, Mitrophanous K, Kingsman SM, et al. Minimal Requirement for a Lentivirus Vector Based on Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol.* 1998; 72(1): 811-816.
- Kolb G, Reigadas S, Castanotto D, et al. Endogenous Expression of an Anti-TAR Aptamer Reduces HIV-1 Replication. *RNA Biol.* 2006; 3(4): 150-156.
- Kotin RM, Siniscalco M, Samulski RJ, et al. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci.* 1990; 87: 2211-2215.
- Kumar P, Sood V, Vyas R, et al. Potent inhibition of influenza virus replication with novel siRNA-chimeric-ribozyme constructs. *Antiviral Res.* 2010; 87(2): 204-212.
- Lazarev VN, Shmarov MM, Zakhartchouk AN, et al. Inhibition of influenza A virus reproduction by a ribozyme targeted against PB1 mRNA. *Antiviral Res.* 1999; 42(1): 47-57.
- Leachman SA, Hickerson RP, Hull PR, et al. Therapeutic siRNAs for dominant genetic skin disorders including pachyonychia congenita. *J Dermatol Sci.* 2008; 1749: 1-7.

- Leirdal M and Sioud M. [Tyrosine kinase receptor-ras-ERK signal transduction pathway as therapeutic target in cancer]. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2002; 122(2): 178-82.
- Lewis PF and Emerman M. Passage through Mitosis Is Required for Oncoretroviruses Not for the Human Immunodeficiency Virus. *J Virol*. 1994; 68(1): 510-516.
- Li S and Huang L. Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther*. 2000; 7: 31-34.
- Liu Y, Wang Y, Wan C, et al. The Role of mPer1 in Morphine Dependence in Mice. *Neuroscience* 2005; 130(2): 383-388.
- Lisovsky OO, Dosenko VE, Nagibin VS, et al. Cardioprotective effect of 5-lipoxygenase gene (ALOX5) silencing in ischemia-reperfusion. *Acta Biochimica Polonica* 2009; 56(4): 687-694.
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004; 305: 1437-1441.
- Lollo CP, Banaszczyk MG, Mullen PM, et al. Poly-L-Lysine-Based Gene Delivery Systems Synthesis, Purification, and Application. *Gene Therapy Protocols* 2002; 69: 1-13.
- Lowenstein PR, Morrison EE, Bain D, et al. Use of recombinant vectors derived from herpes simplex virus 1 mutant tsK for short-term expression of transgenes encoding cytoplasmic and membrane anchored proteins in postmitotic polarized cortical neurons and glial cells in vitro. *Neuroscience* 1994; 60(4): 1059-77.
- Luo X, Cai H, Ni J, et al. c-Jun DNazymes Inhibit Myocardial Inflammation, ROS Generation, Infarct Size, and Improve Cardiac Fusion After Ischemia-Reperfusion Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 1836-1842.
- Manfredsson FP, Lewin AS and Mandel RJ. RNA knockdown as a potential therapeutic strategy in Parkinson's disease. *Gene Ther*. 2006; 13: 517-524.
- Martines J, Patkaniowska A, Urlaub H, et al. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 2002; 110: 563-574.
- Marz P, Probst A, Lag S, et al. Ataxin-10, the Spinocerebellar Ataxia Type 10 Neurodegenerative Disorder Protein, Is Essential for Survival of Cerebellar Neurons. *J Biol Chem*. 2004; 279(34): 35542-35550.
- McShan WM, Rossen RD, Laughter AH, et al. Inhibition of Transcription of HIV-1 in Infected Human Cells by Oligodeoxynucleotides Designed to Form DNA Triple Helices. *J Biological Chem*. 1992; 267: 5712-5721.
- Miller VM, Gouvion CM, Davidson BL, et al. Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference: an efficient strategy for silencing mutant alleles. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32(2): 661-668.
- Mitsuyasu RT, Merigan TC, Carr A, et al. Phase 2 gene therapy trial of an anti-HIV ribozyme in autologous CD34<sup>+</sup> cells. *Nature Medicine* 2009; 15: 285-292.
- Morishita R, Gibbons GH, Horiuchi M, et al. A gene therapy strategy using a transcription factor decoy of the E2F binding site inhibits smooth muscle proliferation *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1995; 92: 5855-5859.
- Morsy MA, Gu MC, Motzel S, et al. An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1998; 95: 7866-7871.

- Morishita R, Higaki J, Tomita N, et al. Application of Transcription Factor “Decoy” Strategy as Means of Gene Therapy and Study of Gene Expression in Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 1998; 82: 1023–1028.
- Mulamba G, Hu A, Azad RF, et al. Human Cytomegalovirus Mutant with Sequence-Dependent Resistance to the Phosphorothioate Oligonucleotide Fomivirsen (ISIS 2922). *Antimicrob. Agents Chemother*. 1998; 42(4): 971–973.
- Nakagami H, Tomita N, Kaneda Y, et al. Anti-oxidant gene therapy by NF kappa B decoy oligonucleotide. *Curr Pharm Biotechnol*. 2006; 7(2): 95–100.
- Naldini L, Blomer U, Gally P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; 272(5259): 263–7.
- Naxin W, Watkins SC, Schaffer PA, et al. Prolonged Gene Expression and Cell Survival after Infection by a Hepes Simplex Virus Mutant Defective in the Immediate- Early Genes Encoding ICP4, ICP27, and ICP22. *J Virol*. 1996; 70(9): 6358–6369.
- Neff CP, Zhou J, Remling L, et al. An Aptamer-siRNA Chimera Suppresses HIV-1 Viral Loads and Protects from Helper CD4+T Cell Decline in Humanized Mice. *Sci Transl Med*. 2011; 3(66): 66ra6.
- Nguyen MD, Cinman N, Yen J, et al. DNA-based vaccination for the treatment of food allergy. *Allergy* 2001; 56: 127–130.
- Pai SI, Lin Y-Y, Macaes B, et al. Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther*. 2006; 13: 464–477.
- Paleos CM, Tziveleka LA, Sideratou Z, et al. Gene delivery using functional dendritic polymers. *Expert Opin Drug Deliv*. 2009; 6(1): 27–38.
- Parry TJ, Cushman C, Gallegos AM, et al. Bioactivity of anti-angiogenic ribozymes targeting Flt-1 and KDR mRNA. *Nucleic Acids Res*. 1999; 27(13): 2569–2577.
- Patil SD, Rhodes DG and Burgess DJ. DNA-based Therapeutics and DNA Delivery Systems: A Comprehensive Review. *AAPS J*. 2005; 7(1): E61–E77.
- Pawlotsky JM, Chevaliez S and McHutchison JG. The Hepatitis C Virus Life Cycle as a Target for New Antiviral Therapies. *Gastroenterology* 2007; 132: 1979–1998.
- Pearson H. Genetics: What is a gene?. *Nature* 2006; 441: 398–401.
- Pearson S, Jia H and Kandachi K. China approves first gene therapy. *Nature Biotechnology* 2004; 22: 3–4.
- Poller W, Hajjar R, Schultheiss HP, et al. Cardiac-targeted delivery of regulatory RNA molecules and genes for the treatment of heart failure. *Cardiovasc Res* 2010; 86: 353–364.
- Ponnazhagan S, Curiel DT, Shaw DR, et al. Adeno-associated Virus for Cancer Gene Therapy. *Cancer Res* 2001; 61: 6313–6321.
- Prevent IV Investigator. Efficacy and Safety of Edifoligide, an E2F Transcription Factor Decoy, for Prevention of Vein Graft Failure Following Coronary Artery Bypass Graft Surgery. *JAMA* 2005; 294(19): 2446–2454.
- Rath P, Shi H, Maruniak JA, et al. Stem Cells as Vectors to Deliver HSV/tk Gene Therapy for Malignant Gliomas. *Curr Stem Cell Res Therapy* 2009; 4: 44–49.
- Rey S, Lee K, Wang CJ, et al. Synergistic effect of HIF-1 alpha gene therapy and HIF-1-activated bone marrow-derived angiogenic cells in a mouse model of limb ischemia. *PNAS* 2009; 106(48): 20399–20404.

- Richards JL, Seward GK, Wang YH, et al. Turnign the 10-23 DNAzyme On and Off with Light. *ChemBioChem* 2010; 11: 320-324.
- Rigden JE, Ely JA, Macpherson JL, et al. The Use of Ribozyme Gene Therapy for the Inhibition of HIV Replication and its Pathogenic Sequelae. *Curr Issues Mol. Biol.* 2000; 2(2): 61-69.
- Roe T, Reynolds TC and Brown PO. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.* 1993; 12(5): 2099-2108.
- Rondinone CM. Therapeutic potential of RNAi in metabolic diseases. *BioTechniques* 2006; 40: S31-S36.
- Rosenberg S, Aebersold P, Cornetta K, et al. Gene transfer into humans-Immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltration lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 1990; 323(9): 570-578.
- Rose JA, Berns KI, Hoggan DM, et al. Evidence for a single-stranded adenovirus-associated virus genome: formation of a DNA density hybrid on release of viral DNA. *Microbiol.* 1969; 64: 863-869.
- Rossi JJ. RNAi as a treatment for HIV-1 infection. *BioTechniques* 2006; 40: S25-S29.
- Roth JA and Cristiano RJ. Gene Therapy for Cancer: What Have We Done and Where Are We Going?. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89(1): 21-39.
- Samulski RJ, Xhu X, Xiao X, et al. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J.* 1991; 10(12): 3941-3950.
- Schiedner G, Morral N, Parks RJ, et al. Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nature Genet.* 1998; 18: 180-183.
- Sharma R, Khajuria R, Sharma CL, et al. Gene Therapy: Current Concepts. *JK Science* 2004; 6(2): 62-66.
- Singer O, Marr RA, Rockenstein E, et al. Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nature Neuroscience* 2005; 8: 1343-1349.
- Singh SK and Gaur RK. Progress towards Therapeutic Application of RNA Interference for HIV Infection. *Biodrugs* 2009; 23(5): 269-276.
- Song DP, Lin JS, Sun XM, et al. [Hammerhead ribozyme against human telomerase catalytic subunit (hTERT) induced apoptosis of liver cancer cells]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 2004; 12(10): 616-9.
- Song H, Zhang D, Cheng F, et al. Applications of RNA interference in cancer therapeutics as a powerful tool for suppressing gene expression. *Mol Biol Rep.* 2009; 36: 2153-2163.
- Spoerri PE, Afzal A, Li CS, et al. Effects of VEGFR-1, VEGFR-2, and IGF-1R hammerhead ribozymes on glucose-mediated tight junction expression in cultured human retinal endothelial cells. *Mol Vis.* 2006; 12: 32-42.
- Stephenson ML and Zamecnik PC. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1978; 75(1): 285-288.
- Stull RA and Jr. Szoka FC. Antigene, Ribozyme and Aptamer Nucleic Acid Drugs: Progress and Prospects. *Pharm Res.* 1995; 12(4): 465-483.
- Su JZ, Fukuda N, Hu WY, et al. Ribozyme to Human TGF- $\beta$ 1 mRNA Inhibits the Proliferation of Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Biochem Biophys Res Comm.* 2000; 278(2): 401-407.

- Subramanya S, Kim SS, Manjunath N, et al. RNA interference-based therapeutics for human immunodeficiency virus HIV-1 treatment: synthetic siRNA or vector-based shRNA?. *Expert Opin Biol Ther.* 2010; 10(2): 201-13.
- Sui HY, Zhao GY, Huang JD, et al. Small Interfering RNA Targeting M2 Gene Induces Effective and Long Term Inhibition of Influenza A Virus Replication. *PLoS One* 2009; 4(5): e5671.
- Sun X and Zhang N. Cationic polymer optimization for efficient gene delivery. *Mini Rev Med Chem.* 2010; 10(2): 108-25.
- Tang XB, Hobom G and Luo D. Ribozyme mediated destruction of influenza A virus in vitro and in vivo. *J Med Virol.* 1994; 42(4): 385-95.
- Tang Y, Ge Y-Z and Yin JQ. Exploring in vitro roles of siRNA in cardiovascular disease. *Acta Pharmacol Sin.* 2007; 28(1): 1-9.
- Templeton NS. Cationic Liposome-mediated Gene Delivery In vivo. *Bioscience Reports* 2002; 22(2): 283-295.
- The Journal of Gene Medicine. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide [Online]. [Cited 2011 Mar 5]. Available from: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>.
- The National Institute of Health resource for stem cell research. 11. Use of Genetically Modified Stem Cells in Experimental Gene Therapies [Stem Cell Information] [Online]. [Cited 2010 Sep 7]. Available from: <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/chapter11.asp>.
- The National Institutes of Health Office of Technology Transfer, US Department of Health and Human Services. FDA Approved Products with Technologies from the NIH Intramural Research Program [Online]. [cited 2011 Mar 5]. Available from: [http://www.ott.nih.gov/about\\_nih/fda\\_approved\\_products.aspx](http://www.ott.nih.gov/about_nih/fda_approved_products.aspx).
- Traversari C and Bordignon C. Antigen transduced T cells used as a delivery system for antigens. *U.S. Patent Application Publication* 2008; US2008/0286305 A1: 1-16.
- Trang P, Lee J, Kilani AF, et al. Effective inhibition of herpes simplex virus 1 gene expression and growth by engineered RNase P ribozyme. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(24): 5071-5078.
- Unwalla HJ and Rossi J. A dual function TAR Decoy serves as an anti-HIV siRNA delivery vehicle. *Virol J.* 2010; 7: 33.
- U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for Industry: Validation of Growth-Based Rapid Microbiological Methods for Sterility Testing of Cellular and Gene Therapy Products. FDA U.S. Food and Drug Administration. Feb 2008: 1-12.
- U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for FDA Reviewers and Sponsors: Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs). FDA U.S. Food and Drug Administration. Apr 2008: 1-41.
- U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for Industry: Potency Tests for Cellular and Gene Therapy Products. FDA U.S. Food and Drug Administration. Oct 2008: 1-15.
- Vorburger SA and Hunt KK. Adenoviral Gene Therapy. *Oncologist* 2002; 7: 46-59.
- Walther W and Stein U. Viral Vectors for Gene Transfer. *Drugs* 2000; 60(2): 249-271.

- Wang CX, Lu YQ, Chen LH, et al. Efficient inhibition of hepatitis B virus replication by hepatitis delta virus ribozymes delivered by targeting retrovirus. *Virology*. 2010; 7: 61.
- Wang Hi, Chen XP and Qiu FZ. Overcoming multi-drug resistance by anti-MDR1 ribozyme. *World J Gastroenterol*. 2003; 9(7): 1444-1449.
- Watson JD and Crick FH. Molecular structure of nucleic acids. *Nature* 1953;171: 737-738.
- Weizsacker FV, Blum HE and Wands JR. Hammer-head Ribozyme-Mediated Cleavage of Hepatitis B Virus RNA. *Methods in Molecular Medicine* 1998; 11: 111-117.
- Welch PJ, Yel S and Barber JR. Ribozyme gene therapy for hepatitis C virus infection. *Clin Diag Virology*. 1998; 10: 163-171.
- Wells DJ. Gene Therapy Progress and Prospects: Electroporation and other physical methods. *Gene Ther*. 2004; 11: 1363-1369.
- Wikipedia. DNA vaccination [Online]. [Cited 2010 Apr 09]. Available from: [http://en.wikipedia.org/wiki/DNA\\_vaccination](http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_vaccination).
- Wikipedia. Plasmid [Online]. [Cited 2011 Feb 04]. Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Plasmid>.
- Wong JP, Christopher ME, Salaza AM, et al. Broad-spectrum and virus-specific nucleic acid-based antivirals against influenza. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2010; 2: 791-800.
- Xia H, Mao Q, Eliason SL, et al. RNAi Suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nature Med*. 2004; 10(8): 816-820.
- Xiong C, Levis R, Shen P, et al. Sindbis virus: an efficient, broad host range vector for gene expression in animal cells. *Science* 1989; 243(4895): 1188-1191.
- Yamagata M, Kawano T, Shiba K, et al. Structural advantage of dendritic poly(L-lysine) for gene delivery into cells. *Bioorg & Med Chem*. 2007; 15(1): 526-532.
- Yamamoto Y, Matsuura T, Narazaki G, et al. Synergistic effect of autologous cell and hepatocyte growth factor gene therapy for neovascularization in a murine model of hindlimb ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 297: H1329-H1336.
- Yang NS and Sun WH. Gene gun and other non-viral approaches for cancer gene therapy. *Nature Medicine* 1995; 1: 481-483.
- Yu SH, Wang TH and Au LC. Specific repression of mutant K-RAS by 10-23 DNAzyme: Sensitizing cancer cell to anti-cancer therapies. *Biochem Biophys Res Comm*. 2009; 378(2): 230-234.
- Zhang et al. Small-molecule nucleotide aptamer for hepatitis C virus, preparation method and use thereof. United States Patent Application Publication 2010;US 2010/0184837 A1.
- Zhou H, Jin M, Yu Z, et al. Effective small interfering RNAs targeting matrix and nucleocapsid protein gene inhibit influenza A virus replication in cells and mice. *Antiviral Res*. 2007; 76: 186-193.
- Zhou J, Li H, Li S, et al. Novel Dual Inhibitory Function Aptamer-siRNA Delivery System for HIV-1 Therapy. *Molecular Therapy* 2008; 16(8): 1481-1489.