

Gen taşınması için olası bir yaklaşım; Poli (2-oksazolin) tabanlı vektörler

Received : 18.02.2015

Revised : 30.03.2015

Accepted : 02.07.2015

Aslı Kara^{*}, İmran Vural^{**}, Özgür Yılmaz^{***}, Asuman Bozkır^{****o}**

Giriş

Sentetik polimerler taşıyıcı sistemler için umut verici materyaller olma yolunda hızla ilerlemektedir. Son zamanlarda biyomateryal olarak kullanılan çevresel şartlara duyarlı polimerlerin sentezi için oldukça yoğun bir ilgi bulunmaktadır. İstenilen kimyasal, fiziksel ve biyolojik özelliklere sahip çeşitli polimer formülasyonları geliştirilmiştir. Bu özellikler pH, sıcaklık, ışık ve iyonik güç gibi bir uyarıcının etkisine bağlı olarak etkin maddenin kontrollü salımı için oldukça önemlidir. Bu bahsedilen özellikler polimerik materyallerin, etkin madde ve gen taşıma, biyomembran teknolojisi ve biyokataliz gibi biyomedikal uygulamalarda kullanımı için gereklidir. Polimerik materyalin biyoyumluluk ve immünotoksitesisi, taşıyıcı sistemler için uygun materyallerin keşfedilmesi açısından önemli bir konudur¹. Polimer tabanlı kendiliğinden düzenlenen sistemler, etkin madde taşınması, ayırma teknolojileri, dağılım stabilizasyonu gibi geniş uygulama alanlarında gerekli çok moleküllü yapıların oluşumunda önemli bir ilerlemeyi temsil eder. Bu bağlamda, farklı taşıyıcı sistemler için uygun sentetik polimerlerin bir çeşidi olarak, 2-oksazolinler çok yönlü ve umut verici materyallerdir.

2-oksazolin tabanlı polimerler, fonksiyonel gruplar ile işlevselleştirilerek kendi alanlarında biyolojik ve medikal kullanım için önemli bir rol üstlenmekle birlikte özellikle biyolojik ve tıbbi olarak etkin ve genetik madde taşınması gibi temel uygulama alanlarında etkinlik göstermektedirler.

* Hitit Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Çorum

** Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara

*** TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Malzeme Enstitüsü, Kocaeli

****Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara

o Yazışma Yapılacak Yazar: Email: aslicaplikara@gmail.com

Özellikle terapötik genlerin kontrollü taşınması kanser tedavisi gibi günümüz tıp uygulamalarında oldukça önemli bir yer teşkil etmektedir. Bu tedavi uygulamalarında çıplak DNA, lipit tabanlı ya da polikationik molekülleri içeren viral olmayan taşıyıcı sistemler, viral sistemler ile karşılaştırıldığında oldukça güvenli, uygulaması kolay ve daha uygun maliyetlidir. Sentetik ve doğal katyonik polimerler negatif yüklü DNA ile kompleks oluşturma, DNA'yı taşıma ve hücre yüzeyindeki anyonik bölgeler ile yük-yük etkileşimi sayesinde endositoz yoluyla DNA'nın hücre içerisine alınımı kolaylaştırdıklarından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır²⁻³. Polimerik gen taşıyıcıları genellikle poli(L-lizin), poliamidoamin dendrimerler, kitosan ve polietilenimin(PEI)'i kapsamaktadır. Bunlar arasında, sentetik polimerlerin bir serisi olan Polietilenimin (PEI), dallanmış (BPEI) ve düz (LPEI) çeşitleri ile bilinen en etkili katyonik polimer olup *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda yüksek gen aktarım etkinliği göstermektedir^{2,4-5}. Dallanmış PEI aziridinin asit katalizli polimerizasyonu ile sentezlenirken, düz PEI, poli (2-etil-2-oksazolin)(PEtOx)'un kısmi hidrolizi ile sentezlenmektedir⁶. PEI yüksek pozitif yük yoğunluğu ve güçlü tamponlama kapasitesi ile DNA'nın endozomal kaçışını arttırarak sitoplazmaya salınımı sağlamaktadır. PEI, sitotoksiste ve kan serum proteinleri ile gereksiz etkileşim gibi bazı dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle PEI'nin sitotoksistesinin azaltılması ve gen aktarım etkinliğinin arttırılması oldukça önemli bir konudur. Bu düşünceden yola çıkarak, Poli (2-etil-2-oksazolin) (PEtOx)'un kısmi hidrolizi ile sentezlenen PEI, hücre canlılığını etkileyen yüksek katyonik yük yoğunluğunu düşürmekte ve LPEI'ye göre daha düşük sitotoksiste sergilemektedir⁷. Bu avantajlı özellikleri sayesinde, poli (2-etil-2-oksazolin) (PEtOx)'un kısmi hidrolizi polimer/DNA nanopartikülleri hazırlanmasında çoğunlukla kullanılmaktadır. Bu taşıyıcıların hazırlanmasında, Poli(laktik asit) gibi alifatik poli esterlerin yapıya eklenmesi polimerin biyoyumluluk ve kullanılabilirliğini arttırabilir⁸. PEtOx'un kısmi hidrolizine dayalı olarak hazırlanan nanopartiküler sistemlerin yanı sıra, hidrofilik özelliği sayesinde miseller ve lipozomal sistemlerin hazırlanması da oldukça ilgi çekicidir⁹. İlaç taşıma kapsamında, hidrofilik Poli (2-oksazolin) (POx) ile miseller yapı oluşturma eğiliminde olan hidrofobik yapıdaki Poli (ϵ -kaprolakton)(PCL) ve Poli (laktik asit) (PLA) sıkça kullanılmakla birlikte, genetik materyalin taşınmasında POx'a dayalı miseller sistemlerin geliştirilmesi devam etmektedir. PEtOx-PLA sentezini takiben yapıya PEI konjuge edilmesiyle hazırlanan yeni miseller sistemler genetik materyallerin taşınmasında oldukça etkili bulunmuştur¹⁰. Bu avantajlı özellikleri ile Poli(2-oksazolin)lerin gen taşınmasında kullanımı umut vaat edici özellik sergilemektedir.

Poli (2-oksazolin)

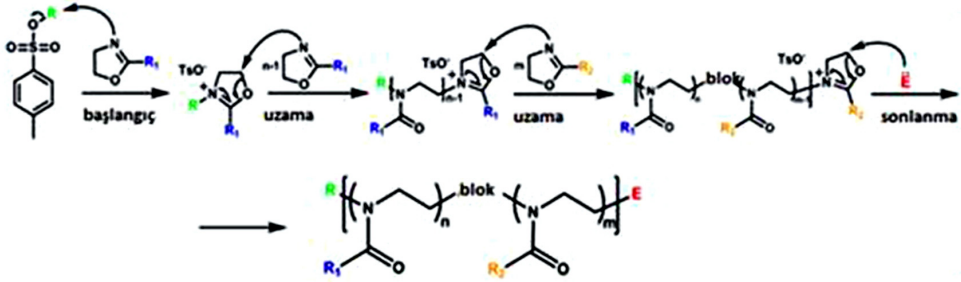
Poli (2-oksazolin)(POx) yalancı polipeptidlerin önemli bir üyesidir. İlk olarak 1966'da 4 araştırma grubu tarafından poli (2-oksazolin)(POx) ya da Poli (N-açıl etilenimin) olarak keşfedilmiş olup, dar moleküler ağırlık, ayarlanabilir özellik ve mükemmel biyoyumluluk ile milenyumda yeniden ortaya çıkmıştır. POx birimleri polietilen glikol (PEG)'un oksidasyona uğrama gibi dezavantajlarını ortadan kaldırmak için, istenilen özellikleri ile olası bir aday olarak düşünülmektedir. Bu dezavantajlar genellikle PEG'in immünojenitesi ve etkinliği ile ilgilidir¹⁰. Yüksek molar kütleli PEG'in vücutta birikimi ve biyoparçalanamama gibi dezavantajlarının yanı sıra, Ishida ve arkadaşları, amfilik PEGlenmiş taşıyıcıların (lipozom, misel) tekrarlanan uygulamalarının ilk uygulama sırasında üretilen anti-PEG IgM'ye dayalı immünolojik cevap oluşturduğundan kaynaklandığını göstermiştir. Bu durum hızlandırılmış kan klerensi olarak ifade edilmekte ve PEG nanotaşıyıcıların farmakokinetik profilinde modifikasyonlara neden olarak hedef tümöre ulaşmadan karaciğer ve dalakta birikime neden olmaktadır¹¹⁻¹². Yüksek biyoyumluluk, görünmezlik (stealth) etkisi, düşük ortalama moleküler dağılım, yanıt oluşturma, yüksek fonksiyonelleştirme, kopolimerizasyon ve çok yönlülük özellikleri ile taşıyıcı sistemler için yeni bir polimerik platform oluşturmaktadır¹³⁻¹⁶.

POx ailesi oldukça işlevsel bir yapı sergilemektedir, örneğin; Her iki zincir ucu kimyasal (örn; -OH, -NH vb.) ya da yapısal (örn; lipit) işlevsellik ile donatılmıştır¹⁷. Bununla birlikte, 2-oksazolin monomerlerinin bir kaç ticari olarak (örn, 2-metil-, 2-etil-, 2-isopropil, 2-fenil-2-oksazolin) ve diğer alifatik yan zincir ve fonksiyonel yan zincirler taşıyan 2-oksazolin monomerlerinin büyük bir kısmı da sentez sırasında monomerin 2 pozisyonundaki fonksiyonel grubun değiştirilmesiyle kolaylıkla elde edilebilir. Böylelikle yan zincirlerin değiştirilmesi ile farklı özellikte polimerler elde edilebilir¹⁸.

Hidrofilik poli (2-metil-2-oksazolin) (PMeOx) ve poli (2-etil-2-oksazolin) (PEtOx) lipozom ve yüzeyler üzerine kaplandığında PEG'e benzer görünmezlik etkisi sergileyebilir^{19,20}. Ayrıca amfilik POx blok kopolimerleri insan serum proteinleri ile oldukça sınırlı etkileşimler sergiler²¹. Bu nedenle, düşük molar kütleli PMeOx ve PEtOx böbreklerden çok hızlı bir şekilde atılır ve *in vivo* intravenöz uygulama sonrasında spesifik olmayan organ alımı sergilemez²².

Polietirlere benzer olarak POx, zincir büyüme katyonik polimerizasyon ile sentezlenerek (Şekil 1), yüksek yapısal ve içeriksel tanımlama ve uç grup fonksiyonelleştirilmesine izin verir. Ayrıca polietirlere zıt olarak, POx polimerin suda çözünürlüğü spesifik olarak ayarlanabilir. Polimerik amfiller oluş-

turan POx'un hidrofobik polimerler ile kombinasyonu, polimer sistemlerinde POx'un görünmezlik etkisi gibi avantajlı özellikleri ile birleştirilebilir. Obeid ve Scholz²³, α,ω -amino, hidroksil PMeOx'u iyi tanımlanmış POx-poli(aminoasit)(PAA) kopolimeri elde etmek için N-karboksianhidrid (NCAs)ji halka açılma polimerizasyonu (ROP) için makrobaşlatıcı olarak kullanmışlardır. Amfifilik POx-PAA blok kopolimerler su içerisinde, blok boyut ve oranına bağlı olarak, 70-130 nm büyüklüğünde partiküller oluşturmuştur. Araştırmacılar bu boyuttaki polimerik partiküllerin terapötik olarak kullanım için uygun olduğunu belirtmişlerdir.

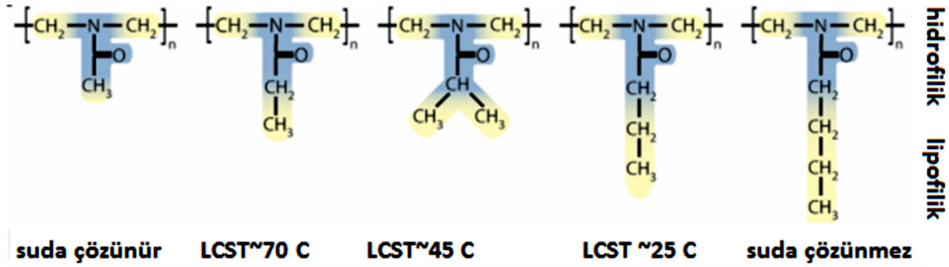


Şekil 1

2-oksazolinlerin yaşayan katyonik halka açılma polimerizasyonu²⁴. (Dağılım = 1.05–1.30)

Poli (2-oksazolin)lerin diğer bir ilgi çekici özelliği de, özellikle blok, yıldız şekilli ve çok dallı çapraz bağlı ağ kopolimerlerinin kolay hazırlanışıdır. Bu sayede polimerik miseller ve veziküller gibi komplekslerin oluşumu için kendiliğinden düzenlenebilir özellik göstermektedirler. Bu da farklı uygulamalar için onları ilgi çekici materyaller haline getirmektedir¹⁴.

Metil ya da etil poli (2-oksazolin)ler noniyonik ve suda çözünür polimerlerdir (Şekil 2). Daha uzun zincirli alkil gruplar ya da aril yan gruplar poli-oksazolinlere artan hidrofobisite kazandırır. Poli (2-oksazolin)lerin amfifilik özellikleri çeşitli yan grupların blok uzunluğu ve içeriğinin kontrolü sayesinde değiştirilebilir. Bu materyallerin çözelti ortamında ya da yüzeyler üzerinde kendiliğinden düzenlendiği belirtilmiştir. Polimer yan grupları ve zincir sonlarına fonksiyonel ve reaktif grupların kolaylıkla eklenmesi (uç-grup fonksiyonelleştirme) bu polimer sınıfını terapötik özellikte yüksek miktarda genetik materyal ve ilaç yükleme, proteinlere konjuge edilme, lipozomal çift tabaka üzerine bağlanma, miseller yapı oluşturma ve yüzeyler üzerine uygulanma gibi avantajlı özellikleri nedeniyle taşıyıcı sistem geliştirilmesi için ideal bir platform haline getirir¹⁴⁻²⁵.



Şekil 2

Poli(2-etil-2-oksazolin)lerin sıcaklığa bağlı çözünürlükleri²²

*LCST: En düşük kritik çözelti sıcaklığı

POx biyouyumluluğu

PEG'e benzer görünmezlik davranışı sergilemesi, peptid taklit eden yapısı ve farklı topolojilerde POx tabanlı polimer oluşturabilme yeteneği ile bu polimerler oldukça düşük *in vitro* sitotoksinite ve yüksek hücre alım sergilemektedirler^{1, 19, 26-29}.

Ayrıca POx, PEG'de bulunan O-komşu C-H bağına göre, N-komşu C-H bağının düşük polimerizasyonunun bir sonucu olarak önemli derecede yüksek stabilite sergilemektedir. Sensör ve implantlar için kaplama gibi uzun dönem uygulamalarda PEG'e alternatif olarak gösterilmektedir³⁰.

POx tabanlı polimerlerin büyük bir kısmında *in vitro* sitotoksinite çalışılmış ve genellikle insan nöral ata hücreleri, Madin-Darby Canine böbrek hücreleri, MCF-7, HEPG2 ve CATH-a-hücrelerinde sitotoksinite oldukça düşük bulunmuştur³¹.

Ayrıca poli (2-etil-2-oksazolin) – poli (D, L-laktid) – poli (2-etil-2-oksazolin) (PEOz-PLA-PEOz) gibi hibrit sistemlerin 50g/L'de sitotoksik olmadığı ve ağırlıkça %15 oranında bile hücre (insan deri fibroblast) canlılığında sadece %23 oranında orta derecede azalmaya bağlı olarak yaklaşık %78 oranında canlılık belirtilmiştir²⁸.

In vivo toksinite için PMeOx'dan sonra en fazla çalışılan polimer PEtOx olmuştur. Viegas ve arkadaşları yakın zamanda 2g/kg (Mn= 10 kg/mol) olarak yüksek dozda sıçanlara tekrarlanan damar içi enjeksiyonların hayvanlar üzerinde yan etkiye neden olmadığı ve kontrol grubu hayvanlar ile karşılaştırıldığında karaciğer, dalak ve böbrekteki histolojik uygulamalarda hiç bir farklılık oluşmadığını tespit etmişlerdir³².

Hidrofilik POx için proteinler ile etkileşim incelendiğinde, insan serum albümini, protein adsorblama, hücre ya da bakteriyel adezyon için eğilim düşük bulunmuştur. PMeOx-kaplama radikal ve peroksit ürünlere parçalanmış PEG'e göre daha dayanıklı özellik göstermiştir³⁰.

Radyonüklid işaretli 5 kDa (5kg/mol) PMeOx ve PEtOx ile yapılan biyodağılım çalışmaları, polimerlerin molar kütleyle bağlı olarak, düşük dağılım ile çok hızlı kan klerensi gösterdiği (en fazla, böbrekten ilk olarak geçtikten sonra) ve dikkate değer oranda retiküloendotelyal sistem organları tarafından düşük alıma uğradığı tespit edilmiştir²².

Shah ve arkadaşlarının yapmış olduğu güncel çalışmada PEtOx'un kısmi hidrolizi ile farklı oranlarda hazırlanan PEI ünitelerinin *in vitro* hücre canlılığına etkisi ve biyotoleransı araştırılmıştır³³. Bunun için embriyonik fare 3T3 fibroblastları, pankreatik bTC3 hücreleri ve fare lenfoid makrofajlar P388.D1 olmak üzere farklı hücre hatları kullanılmıştır. PEtOx'un hidroliz derecesi arttığında hücre canlılığının tüm hücre hatlarında azaldığı belirtilmiştir. Fibroblast hücrelerinin makrofajlar ve pankreatik bTC3 hücrelerine göre daha yüksek toleransa sahip olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, sonuçlar tüm analiz edilen farklı oranlardaki PEI ve kopolimer konsantrasyonları arasında %30 molar oranında PEI içeren kopolimerlerin canlılık üzerine önemli ölçüde bir etki göstermediği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, çalışılan tüm kopolimerlerin tüm hücre hatlarında 5 mg/mL'ye kadar biyotolare edilebilir olduğu tayin edilmiştir. Araştırmacılar, bu kopolimerin geniş aralıktaki uygulamalar için biyotoleranslı polimerik materyaller olduğunu belirtmiştir.

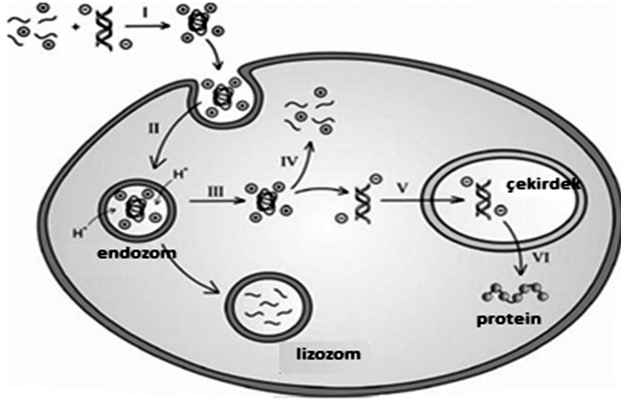
POx uygulama alanları

Fonksiyonel gruplar taşıyan 2-oksazolin polimerler özellikle biyolojik ve tıbbi amaçlı etkin madde ve gen taşınması gibi temel uygulama alanlarında etkinlik göstermektedirler. Etkin madde taşıma kavramı ya etkin maddenin polimere enkapsüle edilmesi ve difüzyon yoluyla taşınmasını ya da fonksiyonel polimer ile konjugasyonunu ifade eder. Etkin madde ve gen taşınmasında kullanılmak üzere araştırılan polimerlerin büyük kısmı poli (etilenoksit) (PEO), poli (N-2-hidroksi propil metakrilat) (pHPMA) vb. gibi doğrusal polimerlere dayanır. Ayrıca ya hidrofilik ve hidrofobik 2-oksazolin monomer bloğu ya da hidrofilik poli (2-oksazolin) ve diğer hidrofobik polimer bloğu amfifilik blok kopolimerlerin hazırlanmasında görev almaktadırlar. Buna göre, hidrofilik blok olarak poli (2-etil-2-oksazolin) ve hidrofobik blok olarak polikaprolakton içeren amfifilik blok kopolimerler hazırlanmıştır. Bu blok kopolimerler sulu çözeltilerde misel oluşturabilir ve etkin madde taşınmasında kullanılabilirler³⁴.

Misellerin etkin madde taşıyıcı olarak tasarlanması için, amfifilik blok kopolimerler alternatif oluşturur. Gradient ve blok kopolimerlerin çözünürlüğündeki önemli farklılıklar nedeniyle agregat yapıları oldukça farklıdır, ayrıca misel oluşturma etkinliğini sağlayan yüzey aktivitesi oldukça yüksek olduğundan, etkin madde enkapsülasyon yeteneği ve hücrel alım tamamen ayarlanabilir. Bütün bunlara rağmen POx polimerleri henüz hak ettiği ilgiyi görmemiş, ayrıca FDA tarafından da tıbbi kullanım açısından henüz uygun bulunmamıştır. Ancak PEtOx'un doğrudan besinlere katılmak yerine, gıdaların paketlenmesi ya da işlenmesine yardımcı olan materyallerin yapısına katılarak dolaylı yoldan gıda takviyesi olarak kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır. Tıbbi kullanım için POx'un onaylanması ile birlikte POx'a dayalı biyomateryaller oldukça hızlı gelişecek ve pazar payını arttıracaktır²⁴.

Poli (2-oksazolin)lerin yapışkan ve kaplama formülasyonlarında³⁵⁻³⁷, mürekkepte pigment dağıtıcı olarak³⁸ ve etkin madde taşıma uygulamalarında kullanımı literatürde belirtilmiştir³⁹. Poli (2-oksazolin)ler ayrıca aşı ve antimikrobiyal teknolojide, biyolojik kirlilik tahliyesi, biyosensör tasarımı, membran teknolojisi, biyokataliz işlemleri gibi farklı uygulamalar için de biyoteknolojide kullanılmıştır^{40,41}. Poli (2-oksazolin)lerin bahsedilen tüm bu uygulamaları biyomateryal olarak 2-oksazolin tabanlı polimerlerin iyi bir potansiyele sahip olduklarını göstermektedir. Ancak biyoyuumluluk ve immünoyuumluluklarının detaylı olarak canlı sistemler (biyomoleküller, hücreler ve dokular) üzerinde çalışılması gerekmektedir¹⁴.

2-oksazolin kimyasına dayalı polimerlerin en önemli uygulama alanlarından biri de gen taşımadır⁴². Gen tedavisinin başlangıç vizyonu, genetik hasarlara bağlı kalıtsal hastalıklarla mücadele etmeyi amaçlamıştır. Gen tedavisinin bu fikri oldukça basittir ve mutasyonlu ya da kayıp genlerin değiştirilmesi ya da eklenmesi, hastanın hücrelerine fonksiyonel genlerin eklenmesini gerektirir ve bu durum tedavi edici bir proteinin üretimi ile sonuçlanır⁴³. Bununla birlikte, kanser gibi yaygın görülen hastalıklarda, doku yenilenmesinde ve enfeksiyon tedavilerinde de gen tedavisi kullanılmıştır. Bu açılardan incelendiğinde gen tedavisi, özellikle genetik ve tedaviye dirençli hastalıkların tedavisi için umut verici bir yaklaşımdır ve başarısı gen vektörünün kapasitesine dayanmaktadır^{44,45}. Etkin gen tedavisi gerçekleştirmek için farklı varsayımlar göz önüne alınarak vektör tasarımı yapmak gerekmektedir. Gen transfer ve taşınmasını geliştirmek için viral ve viral olmayan vektörler kullanılmaktadır. Şekil 3'de gen taşıma mekanizmasının özeti gösterilmiştir⁴⁶. Nispeten yüksek aktarım verimine rağmen, viral vektörlerin terapötik uygulamaları immünojenite ve toksisite gibi doğal problemler tarafından engellenmiştir. Virüs gibi doğal aktarım ajanlarının kullanımındaki problemlerden dolayı günümüzde sentetik viral olmayan vektörlerin kullanımını artıran bir hızla devam etmektedir^{47,48}.



Şekil 3

Gen taşıma engelleri- Gen taşıma sistemleri için tasarım gereksinimleri (I) Terapötik genleri paketleme; (II) hücre içine giriş ; (III) endo-lizozomal yoldan kaçış; (IV) DNA/vektör salın etkisi; (V) sitoplazma aracılığıyla çekirdek içine yolculuk; (VI) gen ekspresyonunun etkin hale gelmesi⁴⁶.

Viral olmayan gen taşıyıcı sistemlerde terapötik genin taşınabilmesi için plazmidlere ihtiyaç duyulmaktadır. Kullanılan plazmidleri nükleaz etkisinden korumak ve hücresel bariyerlerden geçirmek için genellikle bir taşıyıcı ile kombine etmek gerekmektedir. Bu gen taşıyıcıları polimerik sistemlerden oluşmakta ve polipleks olarak adlandırılmaktadır. Polipleksler, pozitif yüklü (katyonik) polimer ile genetik materyalde bulunan fosfat iyonlarının etkileşimi ile oluşmaktadır⁴⁹. Viral olmayan gen taşıyıcıları olarak katyonik polimer-DNA kompleksinin (polipleks) yanı sıra katyonik lipid-DNA kompleksi (lipopleks) ve polimer-lipid-DNA kompleksleri (lipopolipleks) de negatif yüklü plazmid DNA (pDNA)'yı enzimatik ve hidrolitik parçalamadan korumak için paketleyerek (<200 nm) endositoz yolu ile etkili hücresel alım sergilemektedir⁴⁸. Poli (L-lizin), polietilenimine (PEI), kitosan ve poliamidoamin (PAMAM) gibi polimerler gen taşınmasında en sık kullanılan katyonik polimerlerdir⁴⁹.

Bu polimerler arasında gen taşıma çerçevesinde yeni bir yaklaşım olarak POx oldukça ilgi çekici bir materyal haline gelmiştir. Her ne kadar DNA ile bağlanabilme yeteneğinin yüksek oluşu nedeni ile düz Poli(etilenimin) (PEI) uygun bir kaynak olsa da yüksek sitotoksitesi nedeniyle tercih edilmemektedir. Bunun yerine POx'un kısmi hidrolizi ile elde edilen PEI gösterdiği düşük sitotoksitesi sebebiyle POx ile blok halinde etkinlik göstermektedir⁵⁰.

Polietilen imin (PEI) yüksek yük yoğunluğu nedeniyle (her 3.atomu protonlanabilen azot atomu taşır) nükleik asit taşınması için yaygın olarak kullanılan katyonik polimerlerden biridir. Düz PEI, poli (2-etil-2-oksazolin)'in

bazık ya da asidik hidrolizi ile hazırlanabilir. Aziridinin geleneksel polimerizasyonu ile hazırlanan düz PEI'nin dallanmış PEI'den daha etkili olduğu bulunmuştur. Diğer yandan kısmi hidrolize poli (2-etil-2-oksazolin) ile PEI karşılaştırıldığında, poli(2-etil-2-oksazolin)'in daha düşük sitotoksite ve gen ekspresyonunda yüksek aktarım etkinliği gösterdiği bulunmuştur^{51,33}. Düz PEI taşıyan çok dallı polikasyonlar ortalama 50 nm çapında, DNA ile haftalarca stabil kalan kompleks oluşturabilir ve DNAz I'e dayalı parçalanmaya karşı direnc gösterebilir. 'Çevrilmiş blok' kopolimerler *in vitro* PEG-*b*-LPEI'in blok kopolimerlerinden birkaç kat daha yüksek aktarım etkinliği göstermiştir. Düz poli (etilenimin)-graft-poli(2-etil-2-oksazolin) (LPEI-graft-PEtOx) ve (etilenimin)-graft-poli(etilenimin) gibi graft (fırça benzeri) kopolimerler DNA aktarımı için uygundur⁵². Yüksek aktarım etkinliği ile başarılı gen taşınması ayrıca terapötik DNA ile poli (L-lizin)-graft-poli (2-metil-2-oksazolin)'in değişken graft yoğunluklarındaki farklı kopolimerleri ile kondensasyonu ile de hazırlanmıştır⁵³.

Thomas ve arkadaşları⁴² tam açılmiş PEI ile DNA kompleksinin akciğer hasarlarının gen tedavisinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir. N-açıl grubu içeren düz PEI'nin nükleik asit aktarımında düşük etkinliğe sahip olması nedeniyle, Poly(2-etil-2-oksazolin)'in asit katalizli hidrolizi ile açıl grubu uzaklaştırılmış birkaç düz PEI (PEI25, PEI87, PEI217) sentezlemişlerdir. PEtOx'un hidrolizinden elde edilen düz PEI, geleneksel düz PEI'ye göre fare akciğerlerine 200 kat özgülükte DNA taşımıştır. Bu sonuçlar protonlanabilir sayıdaki azot gruplarının artması ile plazmid DNA'nın sıkı kondanse olduğunu göstermiştir. Bulgulardan yola çıkarak araştırmacılar, düz, tam asetilenmiş PEI'nin akciğer hastalıklarında gen tedavi potansiyelini araştırmışlardır. PEI25 ve PEI87 ile siRNA kompleksinin fare akciğerlerinde gen ifadesini sırasıyla %77 ve %93 oranında baskıladığı ve akciğerlerdeki virüs titresini %94 oranında azalttığı belirlenmiştir. Böylece araştırmacılar, yaşamı tehdit eden bir enfeksiyona karşı hastanın etkili şekilde tedavi edilmesini sağlamıştır.

Kabanov ve arkadaşları⁵⁶, POx'un tam deasetilasyonunun gen taşınma etkinliği ve özgünlüğünü önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir.

Buna benzer bir yaklaşım Klivanov ve arkadaşları tarafından sunulmuştur. Araştırmacılar⁵⁵, geleneksel PEI'nin, N-propiyonil gruplarının önemli bir miktarını içerdiğini ve üretim sırasında tamamen yok olmadığını belirtmişlerdir. Amid grupları genellikle asidik olup, DNA'nın yoğunlaşma yeteneğini azaltmaktadır. Bu durum titrasyon deneyleri ve etidyum bromid ile yapılan floresans spektrometresindeki sonuçlar ile desteklenmektedir. Böylece geleneksel ürünlerin tamamen deasetillenmesi, DNA bağlanma yeteneği ve aktarım etkinliğinde önemli bir artış meydana getirmektedir. PEtOx'un

hidrolizi yoluyla üretilen PEI, deasetillenmiş geleneksel ürünlerden daha iyi sonuçlar vermekte ve polimer doğrusallığının gen taşımadaki büyük önemini ortaya koymaktadır.

Park ve arkadaşları, kısmi hidrolizin etkisini tayin etmek için PEtOx'un iyi kontrol edilebilir hidrolizini araştırmışlardır. Araştırmada, ticari olarak elde edilen POx kullanılmıştır. Hidroliz derecesi yaklaşık %50-90 olarak tayin edilmiştir. Polimerlerin sitotoksitesisi, dallanmış PEI kadar toksik olan PEtOx-co-PEI (8/92 mol/mol) ile hidrolizin derecesine bağlı olarak bulunmuştur. Buna göre asit konsantrasyonundaki değişim, polimerin hidroliz derecesi üzerinde ve polimer omurgasının yük yoğunluğunda kontrol sağlar ve böylece kısmi hidrolize uğramış PEtOx, DNA ile çok sıkı kompleks oluşturur. DNA aktarım etkinliği hücre içerisindeki Lusiferaz gen sistemi ile tayin edilmiştir. Söz konusu çalışmada, polimerin gen aktarım etkinliğinin %88'lik hidroliz derecesi ile hücredeki protein miktarı 7,5 RLU/mg olarak yüksek bulunmuştur. Bu nedenle PEtOx'un kısmi hidrolizi ile PEI üretimi oldukça verimlidir. Aynı zamanda polimerin yük yoğunluğunun aktarım için uygun olduğu belirtilmiştir. Hücre sitotoksitesisinin polimerin yük yoğunluğuna, moleküler ağırlığına ve dallanma derecesine bağlı olduğu bulunmuştur. Genel olarak düşük yük yoğunluğundaki polimerlerin, yüksek yük yoğunluğundaki polimerlere göre daha az, dallanmış polimerlerin ise düz polimerlere göre daha çok sitotoksik oldukları bilinmektedir⁵⁶. PEI ile yapılan bir çalışmada, yüksek moleküler ağırlığın, yüksek sitotoksitesiyeye neden olduğu *in-vitro* çalışmalarla tespit edilmiştir⁵⁷.

DNA'ya bağlı tedaviye paralel olarak sunulan antisens tedavi, 1970'lerin sonlarında ilk olarak bildirilmiştir. Araştırmacılar antisens teknolojiyi, kodlanan mRNA'yı inaktif eden bir antisens oligodeoksinükleotidin (ODN) etkisi ile hastalığa neden olan genin kapatılması olarak tanımlamışlardır. Gen ekspresyonunu düzenlemek ve sonrasında protein üretimini kontrol etmek için siRNA ve miRNA gibi antisens oligodeoksinükleotidler daha fazla etki ile tedavi edici potansiyel olarak karşımıza çıkmaktadır^{58,59}. Antisens tedavi, kanser gibi çeşitli hastalıklara müdahale için uygulanmıştır⁵⁸.

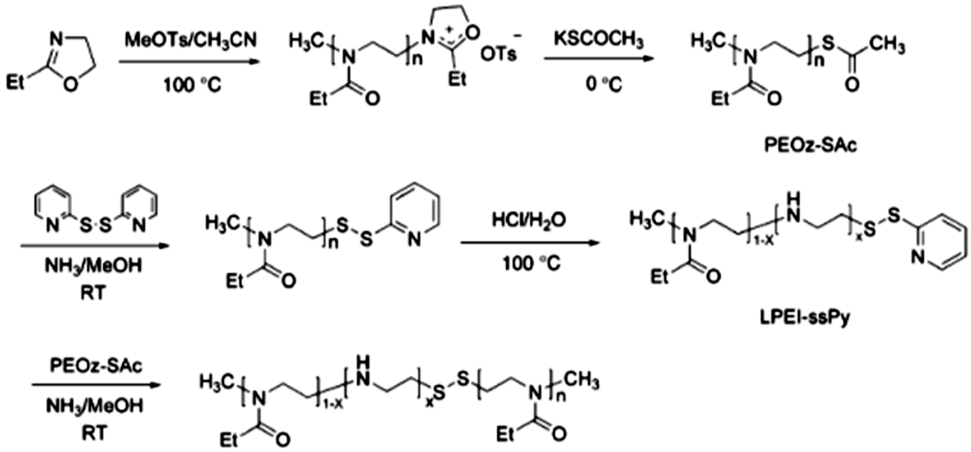
Bu düşünceden yola çıkarak, Fernandes ve arkadaşları², PEI'nin sitotoksitesisini azaltmak ve etkili DNA, siRNA gen aktarımını sağlamak amacıyla, PEtOx'un kısmi hidrolizi ile farklı hidroliz yüzdelerinde düz PEI sentezi gerçekleştirmiştir. 3 farklı hidroliz yüzdesi (%30, %70 ve %96) ile hazırlanan PEI türevlerinden %70 etilenimin segmentlerinden oluşan PEtOx'un en düşük hücresel toksisite sergilediği bulunmuştur. PEI70-DNA ile ortalama hücre canlılığı, uygulanmayan hücreler ile kıyaslandığında 50 ve 100 lük N/P (Düz PEI azot/ DNA fosfat) oranlarında %65,7 ve %67,6 arasında bulunmuştur.

B-galaktosidaz geni taşıyan plazmid DNA'nın HeLa servikal karsinoma hücrelerinde yapılan gen aktarım çalışması sonucunda, en yüksek gen aktarımı %96 hidrolize PEtOx ile 22,57 mU/mg protein olarak tayin edilmiştir. Polimer-siRNA kompleksinin aktarım etkinliği real-time PCR ile mRNA ifadesi ile analiz edilmiştir. Bunun sonucunda araştırmacılar, gen susturma etkinliğinin PEtOx'un hidroliz yüzdesine bağlı olarak arttığını ve en iyi susturma etkinliğinin %57 oranında PEI96-siRNA nanopartikülleri ile elde edildiğini belirtmişlerdir.

Ayrıca, POx'un hidrolizi ile elde edilen iyi tanımlanmış PEI, diğer polimerler ile bağlantılı olarak optimize edilmiş gen taşıyıcılar oluşturabilir⁵⁶. Biyouyumluluğu, mimari ve işlevsel dağılımı nedeniyle, polimerik terapötiklerin tüm alanında POx'a dayalı polimerik sistemlerin kullanılması araştırılmaktadır⁴⁹.

PEtOx'un kısmi hidrolizi, folat poli(etilenimin)-blok-Poli(L-laktid), (PEI-b-PLL) kopolimerine dayalı polimer/DNA nanopartikül hazırlamak için kullanılmıştır⁶⁰. Folat reseptörleri tümör hücrelerinde fazla ifade edilmektedir. Ayrıca, polimer üzerindeki folik asit bölgelerinin spesifik hedeflemeyi artırıcı olduğu tahmin edilmektedir. Gelişmiş biyouyumluluk için polimere Poli(laktik asit) eklenmiştir. Blok kopolimer ve DNA ile polimer/DNA oranı 10 olan bir polipleks oluşturulmuştur. AFM görüntüleri, komplekslerin yaklaşık 100 nm boyutunda küresel partiküller oluşturduğuna işaret etmektedir. *In vitro* aktarım ve hücre canlılık çalışmaları, yüksek miktarda Poli(laktik asit) içeren polimerlerin düşük aktarım etkinliği gösterdiğini kanıtlamaktadır. Ayrıca folat, PEI ve PLLA polimerleri saf PEI'ye göre daha düşük toksisite göstermektedir.

Hsiue ve arkadaşları tarafından, POx ve PEI'nin blok kopolimerlerini elde etmek için, Park'ın çalışmasına benzer olarak, PEtOx bloğu geleneksel katyonik halka açılma polimerizasyonu ile (Şekil 4) ve düz PEI ise PEtOx'un kısmi hidrolizi ile hazırlanmıştır. Hedef polimer tiyol disülfid değişim reaksiyonu ile oluşturulmuştur. Polimer/DNA ağırlık oranı 1:2 olup, ortalama çapı 190 nm olan stabil polipleksler elde edilmiştir. Poliplekslerin düşük toksisite ve yüksek aktarım etkinliğine sahip olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca PEI fragmentlerinin DNA bağlama kapasitesinin hidroliz miktarının artması ile arttığı tespit edilmiştir. Bu polimerler, PEI ile kıyaslandığında, HeLa hücrelerinin lusiferaz kodlayan plazmid DNA ile oldukça iyi aktarıldığı saptanmıştır (saf PEI'ye göre düşük sitotoksisite). Noniyonik/katyonik kopolimerlerin toksisitesi dallanmış ya da düz PEI ile kıyaslandığında oldukça zayıf bulunmuştur⁵¹.



Şekil 4

Katyonik halka açılma polimerizasyonu ile PEtOx-b-LPEI sentezi⁵¹

Benzer bir yaklaşım da Breunig ve arkadaşları⁶¹ tarafından farklı uzunluktaki tiyol uçlu PMeOx'un redoks parçalanabilir PEI-SS-PEG blok kopolimerlerin bir kütüphanesini oluşturmak için sentezlenmiştir. Gen taşıyıcı olarak yapı-özellik ilişkisi araştırılmıştır. Araştırmacılar, hemen hemen 3 kDa ya da daha fazla uzunlukta PEI ile nötr, sıkı ve stabil polipleksler elde etmiştir. Uzun PEI blokları taşıyan poliplekslerin sitotoksitesisi, yüksek molekül ağırlıklı PEG kısımları kullanılarak kısmi olarak engellenmiştir. İlginç olarak, her iki bloğu bağlamak için stabil bağlayıcılar kullanıldığında, poliplekslerin aktarım yeteneği kaybolmuştur, bu durum aktarım işlemi için gerekli PEG kısımlarının hücre içinde parçalandığını göstermiştir.

Düşük sitotoksite ve serum proteinlerine karşı stabilite gösteren poliplekslerin elde edilmesi için farklı bir strateji Luhmann ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Araştırmacılar yan zincirleri PMeOx ile kaplı bir poli(L-lizin) (PLL) omurgası içeren (PLL-g-PMeOx) yapısını araştırmıştır⁶². Bu materyaller daha önce kir tutmayan yüzeyler kapsamında incelenmiştir. Çalışmada, PLL-g-PEG yapılarına benzer olarak, COS-7 hücrelerinde %10 oranında aktarım etkinliği elde edilmiş ve PLL-g-PMeOx-DNA kondensatları serum ve DNaz etkinliğine karşı mükemmel bir stabilite göstermiştir.

Grayson ve Cortez farklı olarak, proparjil başlangıçlı ve azido uçlu PEtOx'un halkasallaştırılması ile halkasal PEI sentezlemiştir. Düz PEI ile halkasal PEI'nin gen aktarım etkinlikleri açısından önemli farklar elde edilmiştir. Halkasal PEI'nin düz PEI'ye göre daha uzun sistemik dolaşım sergilediği ve dokular içinde daha yüksek konsantrasyonda biriktiği belirtilmiştir. Ayrıca

halkasal PEI genetik materyali daha iyi enkapsüle etmektedir. Araştırmacılar bunun sebebini, daha sıkı bir dairesel polikasyonun daha küçük bir hidrodinamik hacimde olması ve yük yoğunluğunda meydana gelen artış nedeniyle paketleme ve gen aktarım yeteneğinin yüksek olmasına bağlamışlardır⁶³.

İki bloklu POx materyallerinin yanı sıra Zhong ve arkadaşları tarafından, düşük molekül ağırlıklı PEI-PEG-PEI triblok kopolimerler PMeOx-PEG-PMeOx polimeri öncülüğünde asit hidrolizi ile sentezlenmiştir⁶⁴. PEG bloğu, polimer/DNA polipleksinin koloidal stabilitesini geliştirmek ve PEI'nin sitotoksitesini azaltmak için eklenmiştir. Sentezlenen blok kopolimerler plazmid DNA ile yüksek yoğunlaşma ve etkileşim sergilemiş ve bu polipleksler 100 nm'den küçük boyutta elde edilmiştir. Poliplekslerin aktarım etkinliği COS-7 ve birincil sığır endotel hücreleri (BAECs)nde değerlendirilmiş ve dallanmış PEI polipleksleri ile kıyaslandığında yüksek gen aktarım etkinliği bulunmuştur. Yine bu blok kopolimerler düz PEI/DNA polipleksleri ile kıyaslandığında BAECs hücrelerine Lusiferaz genini 3 kat yüksek aktivitede aktarmıştır. Böylece araştırmacılar PMeOx-PEG-PMeOx polimeri öncülüğünde asit hidrolizi ile sentezlenen düz PEI-PEG-PEI triblok kopolimerlerinin viral olmayan gen taşıyıcı sistemler içerisinde yeni ilgi çekici bir sınıf olduğu belirtmişlerdir.

Guis ve arkadaşları⁶⁵, yüksek molekül ağırlıklı PEG-b-PEtOx-co-PMeOx sentezlemişlerdir. Bu yapının sentezinde, makrobaşlatıcı olarak tosilatlanmış PEG kullanılmış ve MetOx ve EtOx'un rastgele polimerizasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Sonrasında bu materyal, büyük düz PEG-*b*-PEI polimeri oluşturmak için alkali hidroliz yöntemi ile hidroliz edilmiştir.

Benzer bir yaklaşım ile, Brissault ve arkadaşları⁶⁶ amfililik poli [(propilen glikol)-blok-(2-metil-2-oksazolin)] (PMeOxz-PPG-PMeOxz) blok kopolimerlerini iskelet kasına gen aktarımı için çalışmışlardır. Araştırmacılar, daha önce hazırlanan PEG-PPG-PEG blok kopolimerlerindeki PEG kısımlarını daha hidrofilik polimetiloksazolin zincirleri ile değiştirmiş ve yeni poli [(propilen glikol)-blok-(2-metil-2-oksazolin)] PMeOxz-PPG-PMeOxz blok kopolimerlerinin sentezini ve karakterizasyonu yapmıştır. *In vivo* gen aktarımı sonuçlarını plazmid DNA taşıyan kopolimerlerin çıplak DNA'ya göre kas içinde gen transfer etkinliğinin yaklaşık 20 kat yüksek olduğunu göstermiştir. Bu sonuca göre Poli(2-oksazolin) lere dayalı amfililik üç blok tabanlı vektörlerin gen taşınması için ideal bir sistem olabileceği belirtilmiştir.

Polimerik metal kompleksleri taşıyıcı vektör olarak uygulama potansiyeli ile çok fonksiyonlu materyaller olup gen taşınması gibi uygulamalarda kullanılabilir potansiyele sahiptir. Fraser ve arkadaşları⁶⁷, polimerik metal kompleksi oluşturmak için Ru tris(bipiridin)-merkezli poli(2-etil-2-oksazolin) (Ru PEOX)'in asit hidrolizi ile Rutenyum(II) tris(bipiridine)-merkezli poli(e-

tilenimin) (Ru PEI) sentezlemiş ve yapının DNA hapsetme ve gen aktarım etkinliğini incelemişlerdir. Ru PEI (7900 Da) ve düz PEI (L-PEI; 22000 Da)'nin DNA (5,4 kb) 'yı N/P: 2 oranında tamamen hapsettiği tayin edilmiştir. LNCaP prostat kanser hücrelerine Ru PEI ve L-PEI vektörleri kullanılarak yeşil floresans protein geni içeren plazmid karşılaştırma yapabilmek için aktarılmıştır. L-PEI'ye kıyasla Ru PEI'nin N/P: 48 oranında gen aktarım etkinliği %50 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre araştırmacılar bu model çalışmanın gen taşıma uygulamalarında kullanılabileceğini belirtmiştir.

Miseller ile ilaç ve gen taşınması için POx uygun bir taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Hidrofilik POx'un biyoyumlu hidrofobik polimerler ile kombinasyonu sonucu oluşan POx miseller ilaç ve gen taşınması için uygun materyaller olarak belirtilmiştir⁵⁰.

Hsiue ve arkadaşları⁷, gen tedavisi için amin uç taşıyan bir gen taşıyıcı blok kopolimer poli((2-etil-2-oksazolin)-ko-etilenimin)-blok-poli(2-etil-2-oksazolin)(PEOz/EI)-b-PEOzNH₂) sentezlemişlerdir. Bu iki blok kopolimer plazmid DNA ile yoğunlaşmakta ve çekirdek-kabuk yapısı ile miselleri oluşturmaktadır. *In vitro* sitotoksite çalışmaları HeLa hücrelerinde blok kopolimerin IC50 değerinin dallanmış PEI ile karşılaştırıldığında yaklaşık 10 kat (IC50 > 100 µg/mL) yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca hidrofilik polimer PEOz'un pH duyarlılığı, hücre alından sonra düşük pH'da (pH=5) DNA'nın polipleksden endozoma salınımını sağlamıştır. Araştırmacılar *in vitro* gen aktarımını lusiferaz geni taşıyan plazmid DNA ile HeLa hücrelerinde toplam protein üretimine bağlı olarak incelemiş ve çıplak DNA (100 RLU/µg) ile kıyaslandığında poliplekslerin 750 RLU/µg ile yüksek gen aktarımını sergilediğini göstermişlerdir. Araştırmacılar oluşan poliplekslerin sitotoksite ve gen aktarım etkinliği sonuçlarına göre, bu blok kopolimerin gen tedavi uygulamalarında gen taşıyıcı olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Gaspar ve arkadaşları¹⁰ Poli (2-etil-2-oksazolin)'e dayalı nanoboyutta kendiliğinden düzenlenen yeni bir amfilik kopolimer (PEtOx)-PLA-g-PEI (PPP) miseller sistem geliştirerek, minicircle DNA (mcDNA) vektörü ve mcDNA ile Doksorubisin kemoterapötik ilacın birlikte taşınmasını hedeflemişlerdir. Bu kopolimerde hidrofilik kabuk için PEG yerine biyoyumlu PEtOx kullanılmıştır. Sonuçlar bu misellekslerin *in vitro* ve *in vivo* olmak üzere her iki uygulamada da minicircle DNA'yı yüksek etkinlikte aktardığı ve önemsiz sitotoksite gösterdiği belirtilmiştir. Amfilik misellerin düşük kritik misel konsantrasyonu (1,63x10⁻² mg/mL) ve serumda yüksek stabilite sergilediği gösterilmiştir. Misellekslerin MCF-7 hücrelerine alınımının etkili olduğu ve kontrol polimerine göre 2,7 kat daha fazla gen ifadesi gösterdiği tayin edilmiştir. Ayrıca mcDNA ve Doksorubisin'in birlikte taşınması ile düşük konsantras-

yonlarda bile (100-200 µg/mL) yüksek aktarım etkinliği elde edilmiş, %95 üzerinde hücresel alım ve anti-tümör aktivitesi oldukça yüksek bulunmuştur. Araştırmacılar bu bulgular ile miselplekslerin yeni mcDNA vektörlerinin taşınması için önemli bir potansiyele sahip olduğunu vurgulamıştır.

Sonuç ve Değerlendirme

Sentetik polimerler kapsamında değerlendirilen Poli (2-oksazolin)lerin gen taşıma çalışmalarındaki klinik kullanımı ve güvenilirliği adına özelliklerle polimer genomik ve immünojenitesi ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmakla birlikte, eldeki veriler POx'un genel olarak genetik madde taşınmasında güvenilir bir malzeme olarak kabul edildiğini göstermektedir. Günümüzde sadece birkaç grup gen taşıma etkinlikleri açısından POx tabanlı sistemleri araştırmıştır. Umut verici ilk sonuçlar ve POx'un zengin yapısal ve kimyasal çok yönlülüğü göz önüne alındığında, bu durum yakın gelecekte değişeceği düşünülmektedir. Çalışmaların artması sonucu terapötik amaçlı POx kullanımı yakın gelecekte PEG'in yerini alacak ve başarılı gen tedavi uygulamalarında tercih sebebi olacağı ümit edilmektedir.

Özet

Günümüzde, sentetik polimerlerin ilaç ve gen taşıyıcı sistem olarak kullanımı artan bir hızla devam etmektedir. Bunlar arasında, yüksek biyouyumluluk, görünmezlik (stealth) etkisi, düşük ortalama molekül dağılımı, yüksek terapötik yanıt, ilaç ve gen taşıma için polimer uç gruplarına eklenen fonksiyonel gruplar ile yüksek fonksiyonellik ve kimyasal yapının kolay değiştirilebilmesi ile farklı moleküllerin taşınması gibi çok yönlülük özellikleri ile 2-oksazolinler gen taşıyıcı sistemler olarak umut verici materyallerdir ve bu kapsamda yeni bir polimerik platform oluşturmaktadırlar. Özellikle polimerik terapötik olarak POx, PEG ile eşit düzeyde protein etkileşimi göstermesine rağmen, düşük spesifik olmayan organ birikimi göstermektedir. Bununla birlikte kimyasal stabilitesi de PEG'e göre önemli ölçüde daha iyidir. Günümüzde kullanılan PEG'lenmiş etkin maddelerin sürekli uygulanma zorlukları, immünolojik yanıt oluşturma, hızlandırılmış kan klerensi, biyoparçalanır olmayışı ve vücutta birikimi gibi dezavantajlarından dolayı, PEG yerine hidrofilik POx kullanımı iyi bir tercihtir. Son zamanlarda, etkin madde taşıyıcı özelliklerinin yanı sıra, gen tedavi uygulamalarında da POx polimerleri potansiyel bir alternatif olarak tartışılmaktadır. Gen taşınmasında POx'un kısmi hidrolizi ile sentezlenen PEI'nin *in vitro* hücre kültüründe

düşük sitotoksosite ve yüksek gen aktarım etkinliği sergilemesi ve DNA ile sıkı kompleks oluşturma ve polimer kondensasyon kapasitesinin gen aktarımı için uygun olması gibi avantajları nedeniyle günümüzde araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih edilmektedir.

Bu derlemede işlevsel özellikleri ile Poli (2-oksazolin)ler ele alınmış ve gen taşımadaki başarılı uygulamalarına örnekler verilerek vektör olarak kullanılmalarının avantajları ile ilgili bilgilere yer verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sentetik polimer, Poli (2-oksazolin), Gen tedavisi.

Summary

Nowadays, the use of synthetic polymers in drug and gene delivery applications continues at an accelerated rate. Among these, as gene delivery system 2-oxazolines are promising materials with high biocompatibility, stealth effect, lower average molecular weight distribution, higher therapeutic response, higher functionalization with functional groups attached to the polymer end groups to drug and gene delivery and versatility features to deliver the different molecules by changing easily the chemical structures and they form a new polymeric platform. Especially as polymeric therapeutically POx, although equally well protein interaction with PEG and shows low non-specific organ accumulation. However, the chemical stability is significantly better than PEG. In addition, the use of POx instead of hydrophilic PEG is a good option due to disadvantages as consistent application of currently used PEGylated drugs, immunological response, accelerated blood clearance, non-biodegradability and accumulation in the body. Recently, besides active substance delivery properties, POx is also discussed as a potential alternative in gene therapy applications. Recently, PEI synthesized by partial hydrolysis of POx frequently chosen by researches for gene delivery applications because of its advantages, such as low cytotoxicity in cell culture and higher gene transfection efficiency and also forming tight complex with DNA and compatibility for condensation capacity to gene transfection.

In this review, the functional properties of poly (2-oxazoline) and their advantages about use as a vector with succesful applications of gene delivery were discussed.

Key words: Synthetic polymers, Poly(2-oxazoline), Gene therapy.

KAYNAKLAR

1. Kronek, J., Kronekova, Z., Luston, J., Paulovic`ova, E., Paulovic`ova, L., Mendrek, B., In vitro bio-immunological and cytotoxicity studies of poly(2-oxazolines), *J Mater Sci Mater Med.*, 22,(7), 1725–34, 2011.
2. Fernandes, J., Qiu, X., Winnik, F.M., Benderdour, M., Zhang, X., Dai, K., Shi, G., Linear polyethylenimine produced by partial acid hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline) for DNA and siRNA delivery in vitro, *International Journal of Nanomedicine*, (8) 4091–4102, 2013.
3. Meredith A., Mintzer and Eric E. Simanek, Nonviral Vectors for Gene Delivery, *Chem. Rev.*, 109, 259–302, 2009.
4. Lin, C.P., Sung Y.C., Hsiue, G.H., Non-viral pH-sensitive Gene Carriers based on Poly((2-ethyl-2-oxazoline)-co-ethylenimine)-block-Poly(2-ethyl-2-oxazoline): A Study of Gene Release Behavior, *Journal of Medical and Biological Engineering*, 32(5): 365-372, 2011.
5. W. T. Godbey, K. K. Wu and A. G. Mikos, "Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery," *J. Control. Release*, 60: 149-160, 1999.
6. Yue, Y., Wu, C., Progress and perspectives in developing polymeric vectors for in vitro gene delivery, *Biomater. Sci.*, 1, 152-170, 2013.
7. Hsiue, G. H., Chiang, H. Z. and Wang, C. H., Novel pH-Sensitive gene carriers based on diblock copolymers of poly(2-ethyl- 2-oxazoline) and linear polyethylenimine, *Bioconjug. Chem.*, 17, 781-786, 2006.
8. Wang, C.H., G.-H. Hsiue, Polymer-DNA hybrid nanoparticles based on folate-polyethylenimine-block-poly(L-lactide), *Bioconjug. Chem.* 16 (2), 391–396, (2005).
9. Sedlacek, O., Monnery, B.D., Filippov, S.K., Hoogenboom, R., Hruby, M., Poly(2-Oxazoline)s – Are They More Advantageous for Biomedical Applications Than Other Polymers?, *Macromolecular Rapid Communications*, 33(19), 1648-1662, 2012.
10. Gaspar, V.M., Gonçalves, C., Melo-Diogo, D., C. Costa, E., Queiroz, J.A., Pichon, Sousa, F., C., Correia I. J., Poly (2-ethyl-2-oxazoline)-PLA-g-PEI Amphiphilic Triblock Micelles for Co-delivery of Minicircle DNA and Chemotherapeutics, *Journal of Controlled Release*, 2014. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.06.040
11. Ishida, T., Wang, X., Shimizu, T., Nawata, K., Kiwada, H., PEGylated liposomes elicit an anti-PEG IgM response in a T cell-independent manner, *Journal of controlled release*, 122, 349-355, 2007.
12. Bauer, M., Lautenschlaeger, C., Kempe, K., Tauhardt, L., Schubert, U.S., Fischer, D., Poly(2-ethyl-2-oxazoline) as alternative for the stealth polymer poly(ethylene glycol): comparison of in vitro cytotoxicity and hemocompatibility, *Macromol Biosci.*, 12(7):986–98, 2012.
13. Schlaad, H., Hoogenboom, R., Special issue: poly(2-oxazoline)s and related pseudo-peptides, *Macromol Rapid Commun.*, 33, (19), 2012.
14. Adams, N., Schubert, U.S., Poly(2-oxazolines) in biological and biomedical application contexts, *Adv Drug Deliv Rev.*, 59, (15), 2007.
15. Hoogenboom, R., Schlaad, H., Bioinspired poly(2-oxazoline)s, *Polymers*, 3,(1), 2011.
16. Schlaad, H., Diehl, C., Gress, A., Meyer, M., Demirel, AL., Nur, Y., Poly(2-oxazoline)s as smart bioinspired polymers, *Macromol Rapid Commun.*, 31, (6), 2010.
17. Lüdtkke, K., Jordan, R., Hommes, P., Nuyken, O., Naumann, C.A., Lipopolymers from new 2-substituted-2-oxazolines for artificial cell membrane constructs, *Macromol. Biosci.* 5, (2005)
18. Bloksma, M. M., Schubert, U. S., Hoogenboom, R., *Macromol. Rapid Commun.* 2011, 32, 1419–1441.

19. Zalipsky, S., Hansen, C.B., Oaks, J.M., Allen, T.M., Evaluation of blood clearance rates and biodistribution of poly(2-oxazoline)-grafted liposomes, *J. Pharm. Sci.*, 85, 133–137, (1996).
20. Konradi, R., Pidhatika, B., Mühlebach, A., Textor, M., Poly-2-methyl-2-oxazoline: A Peptide-like Polymer for Protein-Repellent Surfaces, *Langmuir* 24613–616, (2008).
21. Naka, K., Nakamura, T., Ohki, A., Maeda, S., Aggregation behavior and interaction with human serum albumin of 2-oxazoline block copolymers in aqueous solutions, *Macromol. Chem. Phys.*, 198, 101–116, (1997).
22. Gaertner, F.C., Luxenhofer, R., Blechert, B., Jordan, R., Essler, M., Synthesis, biodistribution and excretion of radiolabeled poly(2-alkyl-2-oxazolines), *J. Control. Release*, 119, 291–300, (2007).
23. Obeid, R., Scholz, C., Synthesis and self-assembly of well-defined poly(amino acid) end-capped poly(ethylene glycol) and poly(2-methyl-2-oxazoline), *Biomacromolecules*, 12, 3797–3804, 2011.
24. Victor, R., Poly(2-oxazoline)s as materials for biomedical applications, *J Mater Sci: Mater Med.*, 2014.
25. Viegas, T. X., Bentley, M. D., Harris, J.M., Fang, Z., Yoon, K., Dizman, B., Weimer, R., Mero, A., Pasut, G., Veronese, F. M., Polyoxazoline: Chemistry, Properties, and Applications in Drug Delivery, *Bioconjugate Chem.*, 22 (5), 976–986, 2011.
26. Bauer, M., Lautenschlaeger, C., Kempe, K., Tauhardt, L., Schubert, U.S., Fischer, D., Poly(2-ethyl-2-oxazoline) as alternative for the stealth polymer poly(ethylene glycol): comparison of in vitro cytotoxicity and hemocompatibility, *Macromol Biosci.*, 12(7):986–98, 2012.
27. Luxenhofer, R., Sahay, G., Schulz, A., Alakhova, D., Bronich, TK., Jordan, R., Structure-property relationship in cytotoxicity and cell uptake of poly(2-oxazoline) amphiphiles, *J Control Release*, 153(1):73–82, 2011.
28. Wang, X., Li, X., Li, Y., Zhou, Y., Fan, C., Li, W., Synthesis, characterization and biocompatibility of poly(2-ethyl-2-oxazoline)-poly(D,L-lactide)-poly(2-ethyl-2-oxazoline) hydrogels, *Acta Biomater.*, 7(12)4149–59, 2011.
29. Konradi, R., Acikgoz, C., Textor, M., Polyoxazolines for nonfouling surface coatings—a direct comparison to the gold standard PEG, *Macromol Rapid Commun.*, 33(19), 1663–76, 2012.
30. Pidhatika, B., Rodenstein, M., Chen, Y., Rakhmatullina, E., Mühlebach, A., Acikgoz, C., Comparative stability studies of poly(2-methyl-2-oxazoline) and poly(ethylene glycol) brush coatings, *Biointerphases*, 7(1):1–15, 2012.
31. Kempe, K., Vollrath, A., Schaefer, H.W., Poehlmann, T.G., Biskup, C., Hoogenboom, R., Hornig, S., Schubert, U.S., *Macromol Rapid Commun.*, 31:1869–1873 (2010).
32. Viegas, T.X., Bentley, M.D., Harris, J.M., Fang, Z., Yoon, K., Dizman, B., Weimer, R., Mero, A., Pasut, G., Veronese, F.M., Polyoxazoline: chemistry, properties, and applications in drug delivery, *Bioconjug Chem.*, 22:976–986, 2011
33. Shah, R., Kronekova, Z., Zahoranová, A., Roller, L., Saha, N., Saha, P., Kronek, J., In vitro study of partially hydrolyzed poly(2-ethyl-2-oxazolines) as materials for biomedical applications, *J Mater Sci Mater Med.* ,(4):5485, 2015.
34. Lee, S.C., Kim, C., Kwon, I.C., Chung, H., Jeong, S.Y, Polymeric micelles of poly(2-ethyl-2-oxazoline)-block-poly(caprolactone) copolymer as a carrier for paclitaxel, *J. control. rel.*, 89: 437–446, (2003).
35. Warchol, J.F., Walton, C.D., Creping adhesives containing oxazoline polymer blends and use in paper product applications, US 97-795911 (1998).

36. Frechet, J.M.J., Yui, K., Polymerizable polyoxazolines and hyperbranched polymers prepared them, US 96-660684 (1997).
37. Brinkhuis, R.H.G., Hyperbranched ester-oxazoline polymers as binders for coatings, inks and adhesives, WO 2002-EP13898 (2003)
38. Ma, S.-H., Rodriguez-Parada, J.N., Preparation of block copolymers of oxazolines and/or oxazines and their use in ink-jet inks as pigment dispersants, US 97-963839 (1998).
39. Ansari, A.M., Scaria, P.V., Woodle, M.C., Polymers for delivering peptides and small molecules in vivo, WO 2003-US2710 (2003).
40. Farkas, P., Korcova, J., Kronek, J., Bystricky, S., Preparation of synthetic polyoxazoline based carrier and *Vibrio cholerae* O-specific polysaccharide conjugate vaccine, Eur. j. med. chem., 45: 795-799, (2010).
41. Korcova, J., Machova, E., Farkas, P., Bystricky, S., Immunomodulative properties of conjugates composed of detoxified lipopolysaccharide and capsular polysaccharide of *Vibrio cholerae* O135 bound to BSA-protein carrier, Biologia, 65: 768-775, (2010).
42. Thomas, M., Lu, J.J., Ge, Q., Zhang, C.C., Cheng, J.Z., Klibanov, A.M., Full deacylation of polyethylenimine dramatically boosts its gene delivery efficiency and specificity to Mouse lung, Proc. nat. acad. sci. USA, 102: 5679-5684, (2005).
43. Mulligan, R.C., The basic science of gene therapy, Science 260, 926-932, 1993.
44. Verma, I. M., & Somia, N., Gene therapy—promises, problems and prospects, Nature, 389, 239-242, (1997).
45. Pack, D. W., Hoffman, A., Pun, S., & Stayton, P. S., Design and development of polymers for gene delivery, Nat Rev Drug Discov., 4,581-593, (2005).
46. Wong, S.Y., Pelet, J.M., Putnam, D., Polymer systems for gene delivery—past, present, and future, Prog Polym Sci., 32(8-9):799-837, 2007.
47. Felgner, P.L., Rhodes, G., Gene therapeutics, Nature, 24: 351-352, 1991.
48. Ward, C. M., Read, M. L., & Seymour, L. W., Systemic circulation of poly(L-lysine)/DNA vectors is influenced by polycation molecular weight and type of DNA: differential circulation in mice and rats and the implications for human gene therapy, Blood 97, 2221-2229, 2001.
49. Jeong, J.H., Song, S.H., Lim, D.W., Lee, H., Park, T.G., DNA transfection using linear poly(ethylenimine) prepared by controlled acid hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline), J Control Release.:73(2-3):391-9,2001.
50. Felgner, P.L., Rhodes, G., Gene therapeutics, Nature, 24: 351-352, 1991.
51. Hsiue, G.H., Chiang, H.Z., Wang, C.H., Juang, T.M., Nonviral gene carriers based on diblock copolymers of poly(2-ethyl-2-oxazoline) and linear polyethylenimine. Bioconjug. chem. 17: 781-786(2006).
52. Halacheva, S., Price, G.J., Garamus, V.M., Effect of Temperature and Polymer Composition upon the Aqueous Solution Properties of Comblike Linear Poly(ethyleneimine)/Poly(2-ethyl-2-oxazoline)-Based Polymers, Macromolecules, 44: 7394-7404, (2011).
53. Von Erlach, T., Zwicker, S., Pidhatika, B., Konradi, R., Textor, M., Hall, H., Luhmann, T., Formation and characterization of DNA-polymer-condensates based on poly(2-methyl-2-oxazoline) grafted poly(L-lysine) for non-viral delivery of therapeutic DNA, Biomaterials, 32: 5291-5303, (2011).
54. Kabanov, A.V., Batrakova, E.V., Alakhov, V.Y., Adv Drug Deliv Rev., 54:759-779, 2002.

55. Lin, J.; Qiu, S.; Lewis, K.; Klivanov, A.M. Bactericidal Properties of Flat Surfaces and Nanoparticles Derivatized with Alkylated Polyethylenimines. *Biotechnol. Prog.*, 18, 1082-1086, 2002.
56. Jeong, J.H., Song, S.H., Lim, D.W., Lee, H., Park, T.G., DNA transfection using linear poly(ethylenimine) prepared by controlled acid hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline), *J. Control. Release*, 73, (2-3) 391-399, 2001.
57. Abdalla, B., Hassan, A., Goula, D., Benoist, C., Behr, J.P., Demeneix, B., A powerful non-viral vector for in vivo gene transfer in the adult mammalian brain: polyethyleneimine, *Hum. Gene Ther.*, 7, 1947-1954, 1996.
58. Bertrand, J.R., Pottier, M., Vekris, A., Opolon, P., Maksimenko, A., Malvy, C., Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296, 1000-1004, 2002.
59. Chen, P., Edelman, J.D., Gharib, S.A., Comparative Evaluation of miRNA Expression between in Vitro and in Vivo Airway Epithelium Demonstrates Widespread Differences, *Am J Pathol.*, 183(5), 1405-1410, 2013.
60. Wang, C.H., Hsiue, G.H., Polymer-DNA hybrid nanoparticles based on folate-polyethylenimine-block-poly(L-lactide), *Bioconjug Chem.*, 16(2):391-6, 2005.
61. Bauhuber S, Liebl R, Tomasetti L, Rachel R, Goepferich A, Breunig M. A library of strictly linear poly(ethylene glycol)-poly(ethylene imine) diblock copolymers to perform structure-function relationship of non-viral gene carriers. *J Control Release*. 162(2):446-55, 2012.
62. Von Erlach, T., Zwicker, S., Pidhatika, B., Konradi, R., Textor, M., Hall, H., Luhmann, T., gaspar and characterization of DNA-polymer-condensates based on poly(2-methyl-2-oxazoline) grafted poly(L-lysine) for non-viral delivery of therapeutic DNA, *Biomaterials*, 32: 5291-5303, 2011.
63. Grayson, S.M., Cortez, M., inventors; Polyplex Gene Delivery Vectors, International Patent WO 2011/116371, 2011.
64. Zhong, Z., Feijen, J., Lok, M.C., Hennink, W.E., Christensen, L.V., Yockman, J.W., Kim, Y.-H., Kim, S.W., Low molecular weight linear poly(ethyleneimine)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly(ethyleneimine) triblock copolymers: synthesis, characterization and in vitro gene transfer properties, *Biomacromolecules* 6 (6) 3440-3448, 2005.
65. Brissault, B., Kichler, A., Leborgne, C., Danos, O., Cheradame, H., Gau, J., Auvray, L., Guis, C., Synthesis, characterization and gene transfer application of poly(ethylene glycol-b-ethylenimine) with high molar mass polyamine block, *Biomacromolecules*, 7, (10) 2863-2870, 2006.
66. Brissault, B., Kichler, A., Leborgne, C., Jarroux, N., Cheradame, H., Guis, C., Amphiphilic poly[(propylene glycol)-block-(2-methyl-2-oxazoline)] copolymers for gene transfer in skeletal muscle, *ChemMedChem.*, 2: 1202-1207, 2007.
67. Fiore, G.L., Edwards, J.M., Payne, S.J., Klinkenberg, J.L., Gioeli, D.G., Demas, J.N., Fraser C.L., Ruthenium(II) Tris(bipyridine)-Centered Poly(ethylenimine) for Gene Delivery, *Biomacromolecules*, 8, 2829-2835, 2007.