บทความวิชาการ

ไขมันประจุบวกสำหรับการนำส่งดีเอ็นเอ: โครงสร้างและวิธีสังเคราะห์

วิชญ รัชตเวชกุล*

บทคัดย่อ

หลักพื้นฐานของเทคโนโลยียีนบำบัด คือ ระบบการนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย วิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงสุด คือ การใช้พาหะที่เป็นไวรัส ถึงแม้พาหะชนิดไวรัสจะแสดงประสิทธิภาพการนำส่งดีเอ็นเอที่สูง แต่มีข้อจำกัดเนื่องจากผลของภูมิคุ้มกันบกพร่อง พาหะชนิดไม่ใช่ไวรัสสามารถแบ่งเป็น 2 ประเภทหลัก คือ วิธีทางฟิสิกส์และวิธีทางเคมี ในบรรดาพาหะชนิดไม่ใช่ไวรัสไขมันประจุบวกได้รับความสนใจเนื่องจากสามารถเตรียมและพิสูจน์ลักษณะโครงสร้างทางเคมีได้ ไขมันประจุบวกจึงมีบทบาทหลักในการนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์และไม่เป็นพิษ ดังนั้นไขมันประจุบวกจึงเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการนำส่งดีเอ็นเอ สำหรับกลไกการนำส่งดีเอ็นเอยังไม่เป็นที่แน่ชัด แต่เชื่อว่าเป็นแบบเอ็นโดไซโตซิส โดยปกติแล้วโครงสร้างของไขมันประจุบวกประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก คือ ส่วนหัวที่มีขั้ว ส่วนหางที่ไม่มีขั้ว และส่วนเชื่อมต่อ ในปัจจุบัน นักวิจัยจำนวนมากได้ให้ความสนใจที่จะศึกษา สังเคราะห์ และพัฒนาไขมันประจุบวกสำหรับศึกษาการนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

คำสำคัญ: ยีนบำบัด การนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: widchaya.r@msu.ac.th, widchaya@hotmail.com

Cationic Lipids for DNA Delivery: Structures and Synthetic Methods

Widchaya Radchatawedchakoon*

ABSTRACT

The fundamental of gene therapy technology is a DNA delivery system into target cells. The most efficient method for DNA delivery is the use of viral vectors. Eventhough the viral vector exhibited very high transfection efficiency but it has severely limited due to the potential for a specific immune response. Nonviral vector can be classified into two major categories: physical and chemical method. Among the various types of nonviral vectors, cationic lipids are especially attractive as they can be prepared with relative ease and extensively characterized. Cationic lipids play an important role in this method, capable of delivering DNA into cells and nontoxicity. Therefore, these vectors are considered as an alternative for transfecting. The mechanism of DNA intake is not exactly known but is believed to be related to endocytosis. Normally, the structure of cationic lipids compose of three main parts: cationic headgroup, hydrophobic tail and linker. Nowadays, many researchers interest to study, synthesis, and develop the chemistry of cationic lipids for transfection studies.

Keywords: gene therapy, transfection, synthesis of cationic lipid

Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahasarakham University

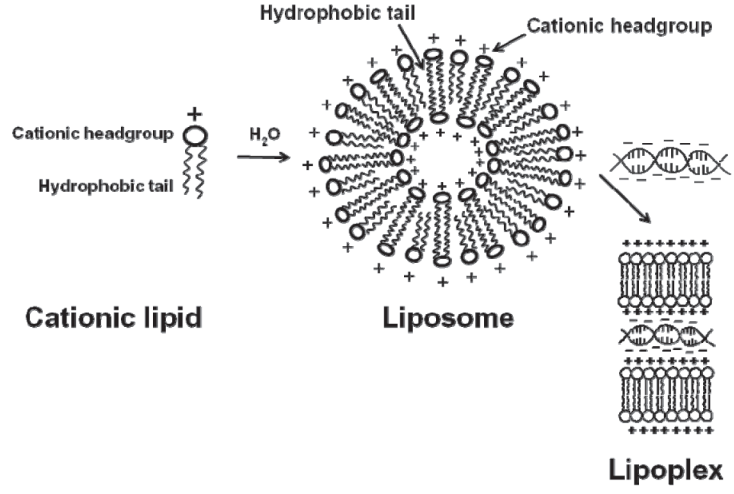
*Corresponding author, e-mail: widchaya.r@msu.ac.th, widchaya@hotmail.com

บทนำ

ยีนบำบัด (Gene therapy) เป็นวิธีการสำหรับรักษาโรคทางพันธุกรรม เอดส์ และโรคชนิดอื่น ซึ่งเกี่ยวข้องกับความผิดปกติทางยีน วิธีนี้เป็นการแทนที่ยีนที่ผิดปกติด้วยยีนที่ปกติโดยอาศัยพาหะ (vector) [1] มีหลากหลายเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับพาหะชนิดไวรัสและไม่ใช่ไวรัส (viral and nonviral vector) ซึ่งได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง นักวิจัยได้พยายามที่จะพัฒนาการนำชิ้นส่วนของยีนเข้าสู่เซลล์เป้าหมายโดยใช้พาหะชนิดไม่ใช่ไวรัส เนื่องจากพาหะชนิดไวรัสมีข้อเสีย คือ ผลของภูมิคุ้มกันบกพร่องต่อผู้รับ [2] ด้วยเหตุผลนี้ พาหะชนิดไม่ใช่ไวรัสจึงเป็นที่นิยมในการนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ โดยจัดประเภทเป็น 2 กลุ่มหลัก คือ วิธีทางฟิสิกส์ และวิธีใช้สารเคมี วิธีทางฟิสิกส์ ได้แก่ microinjection [3], hydrodynamic [4], particle bombardment [5], electroporation [6], ultrasound [7] และ encapsulated microsphere [8] ส่วนวิธีใช้สารเคมี ได้แก่ DEAE-dextran [9], calcium phosphate [10], cationic lipid [11], cationic polymer [12] และ cationic dendrimer [13] ในบรรดาพาหะชนิดไม่ใช่ไวรัส ไขมันประจุบวก (cationic lipid) เป็นวิธีการทางเคมีที่สามารถนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยการเกิดเป็นไลโปโซม (liposome) ซึ่งมีความปลอดภัย ราคาถูกเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต เป็นวิธีการที่ทำได้ง่ายและไม่มีผลต่อภูมิคุ้มกัน [14]

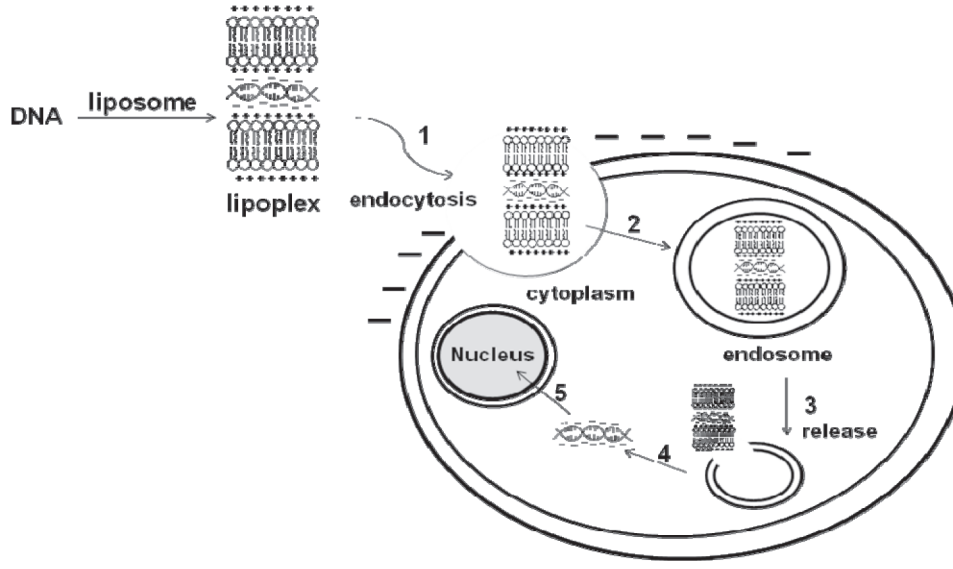
ไขมันประจุบวกและยีนบำบัด (Cationic Lipids and Gene Therapy)

ไขมันประจุบวกสามารถเกิดเป็นไลโปโซมในสารละลายที่เป็นน้ำ [15] พื้นผิวของไลโปโซมมีประจุเป็นบวก และสามารถเกิดแรงดึงดูดทางประจุกับประจุลบของหมู่ฟอสเฟตในสายโซ่ดีเอ็นเอเกิดเป็นสารเชิงซ้อนระหว่างไลโปโซมกับดีเอ็นเอที่เรียกว่า ไลโปเพล็กซ์ (lipoplexes) (รูปที่ 1) [16]



รูปที่ 1 การเกิดไลโปโซมและไลโปเพล็กซ์

สารเชิงซ้อนไลโปเพล็กซ์มีบทบาทสำคัญในการนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ กลไกของการนำส่งดีเอ็นเอเข้าเซลล์มีการทำนายว่าเป็นแบบเอ็นโดไซโตซิส (endocytosis) [17] สารเชิงซ้อนไลโปเพล็กซ์มีประจุสุทธิเป็นบวก จะเกิดอันตรกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมีประจุเป็นลบ จึงเป็นการช่วยให้นำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายขึ้น (โมเลกุลของดีเอ็นเอเพียงอย่างเดียวจะไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้เนื่องจากมีประจุเป็นลบเหมือนกับเยื่อหุ้มเซลล์) หลังจากนั้นส่งผ่านและปลดปล่อยชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเข้าสู่ไซโทพลาซึม ในขั้นตอนสุดท้ายดีเอ็นเอจะถูกส่งเข้าสู่นิวเคลียสเพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีนต่อไป (รูปที่ 2) [18-19]



รูปที่ 2 ขั้นตอนการนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

หลักการเบื้องต้นของการนำส่งดีเอ็นเอโดยใช้ตัวกลางไขมันประจุบวก (Basic Principles of Cationic Lipid-Mediated DNA Transfer)

ขั้นตอนแรกในการนำส่งดีเอ็นเอเข้าเซลล์เป้าหมาย คือ การรวมตัวเป็นไลโปเพล็กซ์ (lipoplex) ที่เหมาะสมให้มีประจุสุทธิเป็นบวกระหว่างตัวพาหะกับโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่จับกันด้วยอันตรกิริยาระหว่างไขมันประจุบวกและดีเอ็นเอซึ่งมีประจุเป็นลบ โมเลกุลทั้งสองจะรวมตัวอย่างรวดเร็วเป็นอนุภาคของไลโปเพล็กซ์ขนาดระดับนาโน [20] (ขั้นตอนที่ 1, รูปที่ 2) การเกิดไลโปเพล็กซ์ทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอถูกบดบังและป้องกันการถูกทำลายจากเอนไซม์หรือจากสิ่งอื่นๆ ภายในเซลล์ การใช้ปริมาณของไขมันประจุบวกจำนวนมากส่งผลให้อัตราส่วนระหว่างประจุบวกของไขมันต่อประจุลบของดีเอ็นเอเป็นบวก พื้นผิวของไลโปเพล็กซ์มีประจุเป็นบวกจึงสันนิษฐานได้ว่าสามารถนำส่งดีเอ็นเอเข้าเซลล์โดยผ่านการเกิดอันตรกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีประจุเป็นลบของโครงสร้าง heparan sulphate และ proteoglycans ชนิดอื่นๆ จากผลดังกล่าวนำไปสู่การเกิดเอ็นโดไซโตซิส (endocytosis) โดยไลโปเพล็กซ์จะถูกห้อมล้อมเข้าไปภายในเซลล์ (ขั้นตอนที่ 2) ผ่านการหลอมเข้ากับเยื่อหุ้มเซลล์เกิดเป็นเอนโดโซม โมเลกุลของดีเอ็นเอต้องเลี่ยงการสลายตัวในการเกิดเป็นเอนโดโซม จากนั้นเกิดการปล่อยสารเชิงซ้อนไลโปเพล็กซ์ภายในเอนโดโซมสู่

ไซโทพลาซึม ซึ่งมีรายงานโดย Xu และ Szoka ถึงกลไกการปลดปล่อยดีเอ็นเอสู่ไซโตซอล (cytosol) (ขั้นตอนที่ 3-4) [19] โมเลกุลดีเอ็นเอจะแยกออกจากพาหะ ถ้าไม่สามารถแยกตัวออกจากพาหะ (ยังคงเป็นสารเชิงซ้อนไลโปเพล็กซ์) การแสดงออกของยีนก็ไม่สามารถเกิดได้ [19] เมื่อโมเลกุลของดีเอ็นเออยู่ในไซโตซอลจะต้องเข้าสู่นิวเคลียสเป้าหมายและเกิดการแสดงออกของยีนเป็นลำดับถัดมา (ขั้นตอนที่ 5) จึงจะทราบว่าดีเอ็นเอถูกนำส่งสู่นิวเคลียสได้ ซึ่งกลไกแท้จริงยังไม่ทราบแน่ชัด โดยปัจจัยที่มีผลต่อการนำส่งดีเอ็นเอสู่นิวเคลียสในขั้นตอนสุดท้าย คือ nuclease activity [21]

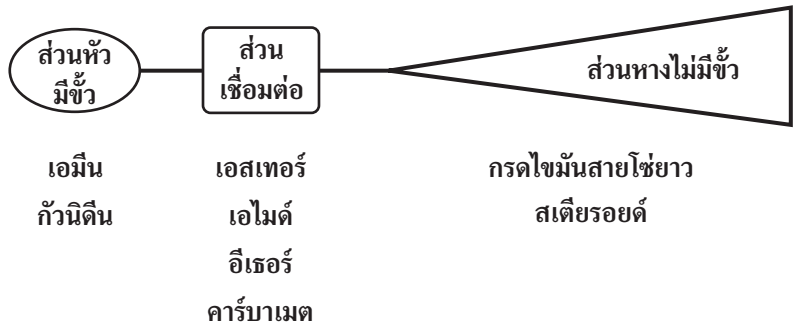
ในปัจจุบันมีการยอมรับว่าไลโปโซมเป็นตัวกลางในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์โดยผ่านกระบวนการเอ็นโดไซโตซิส ไลโปเพล็กซ์จะทำให้ผนังของเอ็นโดโซมเสถียรส่งผลให้เกิดฟลิปฟล็อป (flip-flop) ของฟอสโฟลิพิด โมเลกุลของฟอสโฟลิพิดนี้จะเกิดการกระจายตัวไปยังไลโปเพล็กซ์และเกิดอันตรกิริยากับไขมันประจุบวก ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ดีเอ็นเอแยกตัวเข้าไปในไซโทพลาซึม [19]

มีรายงานการนำไขมันเป็นกลาง (neutral lipid) เช่น คอเลสเตอรอล (cholesterol) เป็นส่วนประกอบของไลโปโซมประจุบวกในการเกิดเป็นสารสองชั้น (bilayer) ซึ่งใช้ในการนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ ไขมันเป็นกลาง สามารถแทรกตัวอยู่ระหว่างชั้นของ bilayer ได้ เนื่องจากไม่มีขั้ว นอกจากนี้ยังช่วยให้ไลโปโซมมีความเสถียรและเพิ่มการเข้ากันได้กับเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดีขึ้น [22]

ลักษณะของไขมันประจุบวก

ได้มีรายงานครั้งแรกโดย Flegner [22] ถึงการใช้ไขมันประจุบวกชนิด DOTMA (1) นำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นที่ทราบกันว่าการนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์จะขึ้นกับคุณสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ (ขนาด ความเสถียร ประจุสุทธิ สัณฐานวิทยา และการสลายตัว) ปัจจัยอื่นๆ (ไขมันร่วม (colipid) ขนาดของดีเอ็นเอ ผลของซีรัม และพลังงานศักย์ออสโมติก) และลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลไขมันประจุบวกนั้น

ไขมันประจุบวกเป็นชีวโมเลกุลประเภทแอมฟิไฟล์ (amphiphile) ที่มีประจุสุทธิเป็นบวก โดยปกติจะประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก คือ 1) ส่วนหัวที่มีขั้ว (polar headgroup) มีประจุเป็นบวก มักเป็นสารกลุ่มเอมีน (amine) หรือกัวนิดีน (guanidine) ที่ถูกโปรโตเนท (protonated) อาจเป็นไขมันแบบประจุบวก เช่น monovalent lipid หรือไขมันแบบหลายประจุ (multivalent lipid) ก็ได้ 2) ส่วนหางที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic tail) อาจเป็นโมเลกุลของสเตียรอยด์หรือหมู่แอลคิลสายโซ่ยาวที่อิ่มตัว (saturated) หรือไม่อิ่มตัว (unsaturated) 3) ส่วนเชื่อมต่อ (linker) เป็นส่วนที่เชื่อมส่วนหัวที่มีขั้วกับส่วนหางที่ไม่มีขั้วเข้าด้วยกันด้วยพันธะเอสเทอร์ (ester) เอไมด์ (amide) อีเธอร์ (ether) หรือคาร์บาเมต (carbamate) ส่วนนี้มีความสำคัญต่อเสถียรภาพและการสลายตัวได้ในระบบทางชีวภาพ (รูปที่ 3) [19]



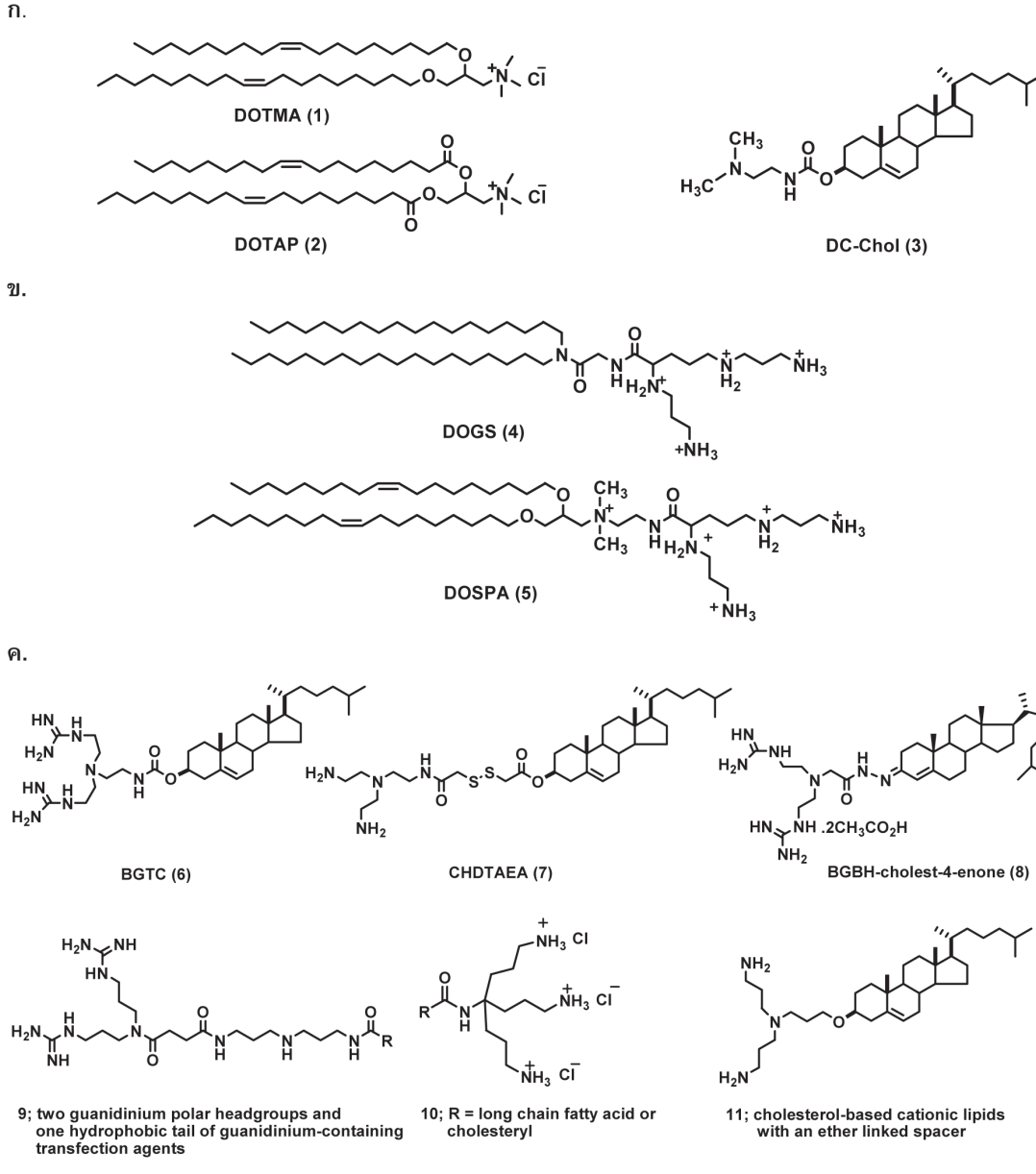
รูปที่ 3 ส่วนประกอบหลักของไขมันประจุบวก

ตัวอย่างงานวิจัยไขมันประจุบวก

ส่วนหัวที่มีขั้ว (Polar Headgroup)

ตัวอย่างสารไขมันประจุบวกทางการค้าที่มีประจุเดียว เช่น DOTMA (**1**) [22], DOTAP (**2**) [23] และ DC-Chol (**3**) [24-25] (รูปที่ 4 (ก)) ส่วนสารไขมันประจุบวกที่มีหลายประจุ เช่น DOGS (**4**) และ DOSPA (**5**) [26] (รูปที่ 4 (ข))

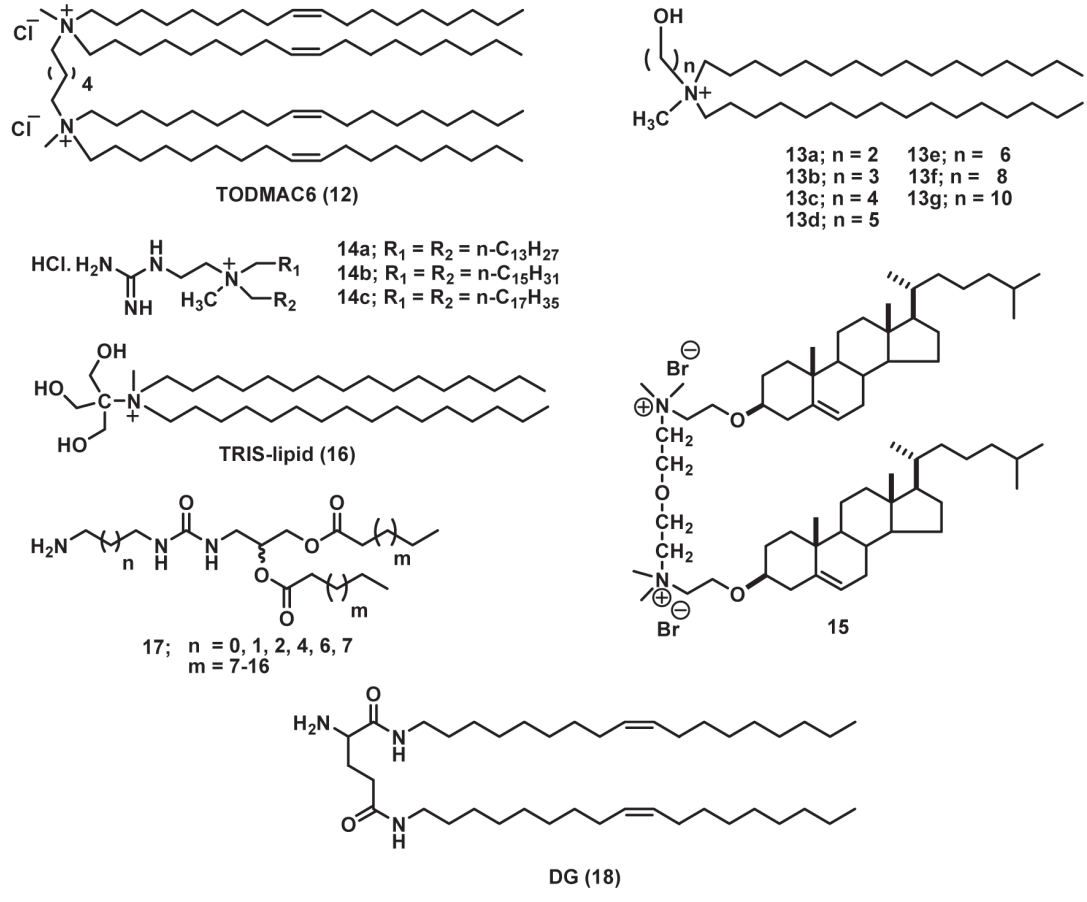
มีรายงานการใช้ไขมันประจุบวกหลายชนิดที่มีส่วนหัวสมมาตร (รูปที่ 4 (ค)) ในปี ค.ศ. 1996 Vigneron และคณะ [27] ได้รายงานการใช้ BGTC (**6**) ซึ่งมีประสิทธิภาพที่สูงในการนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด เมื่อมีส่วนผสมของ DOPE เป็นไขมันตัวช่วย (helper lipid) ต่อมาในปี ค.ศ. 1999 Tang และคณะ [28] ได้รายงานการใช้ dithiodiglycolic acid เป็นส่วนเชื่อมต่อชนิดใหม่ในโมเลกุลของ CHDTAEA (**7**) (รูปที่ 4 (ค)) พบว่าไลโปโซมของ CHDTAEA มีประสิทธิภาพสูงกว่า DC-Chol 2 เท่าต่อเซลล์ CHO และ 7 เท่าต่อเซลล์ SKnSH ในปี ค.ศ. 2004 Aissaoui และคณะ [29] ได้รายงานถึงสารประกอบไขมันประจุบวก BGBH-cholest-4-enone (**8**) ซึ่งมีส่วนเชื่อมต่อเป็น acylhydrazone ระหว่างส่วนหัวที่เป็นกัวนิดีนกับส่วนหาง cholestanone (รูปที่ 4 (ค)) มีประสิทธิภาพการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมและในหนู ในปีเดียวกัน Yingyongnarongkul และคณะ [30] ได้สังเคราะห์ไขมันประจุบวกซึ่งมีส่วนหัวเป็นกัวนิดีน 2 หมู่ที่สมมาตร และมีส่วนหางเพียงหนึ่งสายโซ่ (**9**) (รูปที่ 4 (ค)) ซึ่งโดยปกติแล้วไขมันประจุบวกที่มีหางหนึ่งสายโซ่มักมีความเป็นพิษสูง แต่พบว่าไขมัน **9** นี้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HEK293T ไขมันประจุบวกชนิดใหม่ **10** ประกอบด้วย ส่วนหางไม่มีขั้ว และส่วนหัวที่มีประจุ +3 (รูปที่ 4 (ค)) ได้รายงานโดย U.-Broceta และคณะ [31] ในปี ค.ศ. 2008 ประสิทธิภาพการนำส่งดีเอ็นเอเข้าเซลล์ได้ทดสอบกับ CHO, COS7 และ 16HBE14o ในปีถัดมา Kim และคณะ [32] ได้สังเคราะห์ไขมันประจุบวกชนิดใหม่ **11** ที่มีส่วนหางเป็นคอเลสเตอรอล โดยมีพันธะอีเธอร์เชื่อมส่วนหัวกับส่วนหาง การศึกษานี้พบว่าพันธะอีเธอร์มีประสิทธิภาพที่สูงกว่าพันธะคาร์บาเมตซึ่งมีซีรัมเป็นส่วนประกอบ



รูปที่ 4 รูปแบบต่างๆ ของส่วนหัวมีขั้วในโครงสร้างไขมันประจุบวก
(ก) ไขมันประจุบวกทางการค้าที่มีประจุเดียว
(ข) ไขมันประจุบวกที่มีหลายประจุ
(ค) ไขมันประจุบวกที่มีส่วนหัวสมมาตร

ส่วนหางที่ไม่มีขั้ว (Hydrophobic Tail)

ไขมันประจุบวกหลายชนิดมีหางที่สมมาตร ในปี ค.ศ. 2002 Gaucheron และคณะ [33] ได้สังเคราะห์ไขมันประจุบวกชนิดใหม่ที่มีส่วนหัวเป็นประจุ +2 มีหาง 4 สายโซ่ TODMAC6 (**12**) (รูปที่ 5) พบว่าสารนี้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ อีก 2 ปีถัดมา Mahidhar และคณะ [34] ได้วัดประสิทธิภาพการนำส่งดีเอ็นเอเข้าเซลล์ของแอมฟิไฟล์สังเคราะห์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล **13** (รูปที่ 5) ต่อเซลล์ CHO, COS-1, HepG2 และ MCF7 พบว่าระยะระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลกับประจุบวกที่ไนโตรเจน ถ้าระยะห่างมากจะมีประสิทธิภาพต่ำ ในปี ค.ศ. 2005 Sen และคณะ [35] ได้รายงานการสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มีหางสมมาตร และมีส่วนหัวเป็นกัวนิดีน **14a-14c** (รูปที่ 5) และมีประสิทธิภาพที่ดีในการนำส่งดีเอ็นเอเข้าเซลล์ CHO, COS-1, MCF-1, A549 และ HepG2 ในปี ค.ศ. 2007 Bajaj และคณะ [36] ได้สังเคราะห์ไขมันประจุบวกชนิดที่หางสมมาตรเป็นคอเลสเตอรอล **15** (รูปที่ 5) โดยมีส่วนเชื่อมต่อเป็น oxyethylene ที่เชื่อมระหว่างหมู่แอมโมเนียม สารที่สังเคราะห์ได้นี้มีประสิทธิภาพการนำส่งยีนเข้าเซลล์ได้ดีถึงแม้จะมีซีรัมเป็นส่วนประกอบ

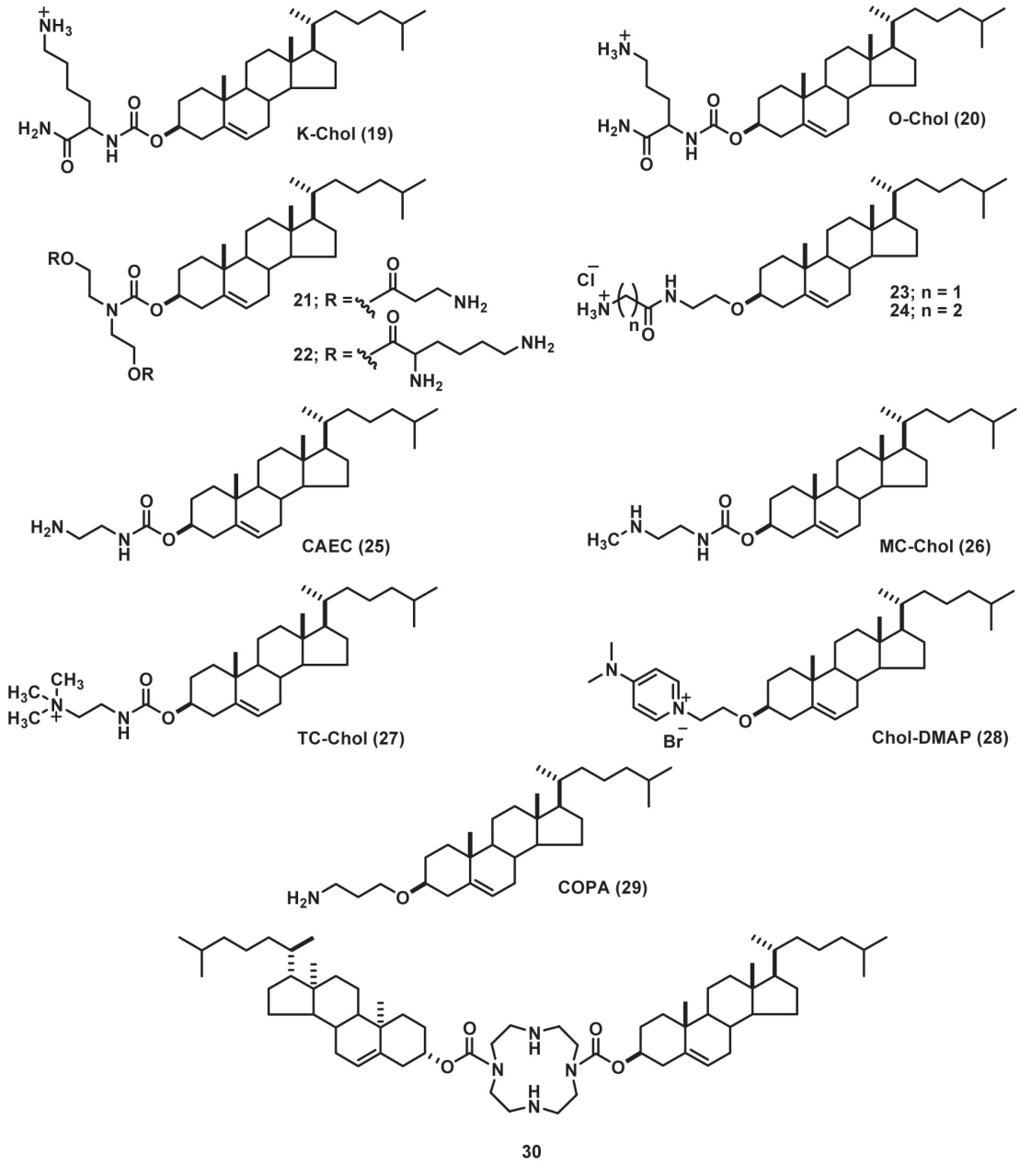


รูปที่ 5 ไขมันประจุบวกที่ส่วนหางไม่มีขั้วสมมาตร

ในปี ค.ศ. 2008 Mukherjee และคณะ [37] ได้รายงานถึง TRIS-lipid (**16**) (รูปที่ 5) ซึ่งมีส่วนของหมู่ไฮดรอกซิล 3 หมู่ที่มีการเชื่อมของ tri-hydroxymethyl aminomethane (TRIS) พบว่าไขมันประจุบวกโมเลกุลนี้สามารถนำส่งดีเอ็นเอเข้าเซลล์ได้ดี ถึงแม้จะมีซีรัมเป็นองค์ประกอบที่สูง ในปีถัดมา Yingyongnarongkul และคณะ [38] ได้สังเคราะห์ไขมันประจุบวก 60 ชนิด (**17**) (รูปที่ 5) สำหรับการนำส่งพลาสมิดดีเอ็นเอ (pCH110) เข้าสู่เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม โครงสร้างมีส่วนของยูเรีย (urea) โดยมีเอมีน 2 หมู่เชื่อมอะมิโนกลีเซอรอลและไดเอมีน (diamine) เข้าด้วยกัน ไขมันประจุบวกที่มีระยะระหว่างหัวและหางที่สั้นจะสามารถนำส่งดีเอ็นเอเข้าเซลล์ HEK293 ได้มากกว่าสายโซ่ที่ยาวกว่า ในปีเดียวกันนี้ Suh และคณะ [39] ได้สังเคราะห์ DG (**18**) (รูปที่ 5) สำหรับนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์มะเร็ง A549, HeLa และ WM266.4 พบว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่า Lipofectamine2000 อย่างน้อย 2 เท่า

ไขมันประจุบวกที่มีคอเลสเตอรอลเป็นส่วนหลัก (Cholesterol-Based Cationic Lipid)

มีรายงานถึงไขมันประจุบวกหลายชนิดที่มีคอเลสเตอรอลเป็นส่วนหลัก ตัวอย่างเช่น ในปี ค.ศ. 2001 Choi และคณะ [40] ได้เสนอและพัฒนาไขมันประจุบวกที่มีส่วนไม่มีขั้วเป็นคอเลสเตอรอล โดยให้ส่วนหัวเป็น L-lysinamide (K-Chol, **19**) หรือ O-ornithinamide (O-Chol, **20**) (รูปที่ 6) ไขมันประจุบวกนี้สามารถรวมตัวกับพลาสมิดดีเอ็นเอและนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมได้ ต่อมาในปี ค.ศ. 2004 ไขมันประจุบวกที่สามารถสลายตัวได้ **21-22** (รูปที่ 6) ได้รายงานโดย Lee และคณะ [41] จากการศึกษาได้มีการเปรียบเทียบกับสารไขมันประจุบวกทางการค้า DOTMA (**1**), DC-Chol (**3**) และ DOSPA (**5**) พบว่าไขมัน **21** และ **22** มีประสิทธิภาพที่ดีในการนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ และเกือบจะไม่เป็นพิษต่อเซลล์ นอกจากนี้ได้ศึกษาการสลายตัวของพันธะเอสเทอร์โดยเทคนิคโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (^{1}H NMR) การไม่เป็นพิษต่อเซลล์นั้นเนื่องมาจากการสลายตัวได้ง่ายของพันธะเอสเทอร์ ภายในปีเดียวกัน Singh และคณะ [42] ได้รายงานถึงไขมันประจุบวก **24** (รูปที่ 6) ที่มีส่วนหัวเป็น β-alanine ได้แสดงคุณสมบัติการนำส่งดีเอ็นเอเข้าเซลล์ CHO, COS-1 และ HepG2 มากกว่าไขมันประจุบวก **23** (รูปที่ 6) 10-24 เท่า ที่มีส่วนหัวเป็น glycine ซึ่งมีหมู่เมทิลีน (methylene) น้อยกว่าเพียงหนึ่งหมู่ และมีส่วนผสมของ DOPE เป็นส่วนประกอบ ในปี ค.ศ. 2007 Kearns และคณะ [43] ได้สังเคราะห์ไขมันประจุบวก 4 ชนิด คือ DC-Chol (**3**), CAEC (**25**), MC-Chol (**26**) และ TC-Chol (**27**) (รูปที่ 6) สารเหล่านี้มีการปรับเปลี่ยนส่วนที่มีขั้วโดยการทำปฏิกิริยาเมทิเลชัน (methylation) 4 ชนิด พบว่าเฉพาะสาร **25** และ **26** สามารถนำส่งดีเอ็นเอเข้าเซลล์ได้ ในปีถัดมา Bajaj และคณะ [44] ได้รายงานไขมันประจุบวก **28** (รูปที่ 6) ซึ่งมี DMAP เป็นส่วนหัวที่มีขั้วว่ามีประสิทธิภาพที่สูงในการนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ ถึงแม้จะมีซีรัมเป็นส่วนประกอบ นอกจากนี้ Han และคณะ [45] ได้สังเคราะห์ COPA (**29**) (รูปที่ 6) และรายงานประสิทธิภาพที่สูงในการนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์ Hepal-6, A549 และ HeLa ในปี 2009 โดย Islam และคณะ [46] ได้รายงานไขมันประจุบวกชนิดที่เป็นวงเฮทเทอโรไซคลิก (heterocyclic) มีอะตอมของไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของวงไซเคลน (cyclen) เชื่อมกับคอเลสเตอรอล 2 โมเลกุล โดยใช้พันธะคาร์บาเมตที่สามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพ สาร **30** (รูปที่ 6) นี้ สามารถนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์ได้ดี



รูปที่ 6 ไขมันประจุบวกที่มีคอเลสเตอรอลเป็นส่วนหลัก

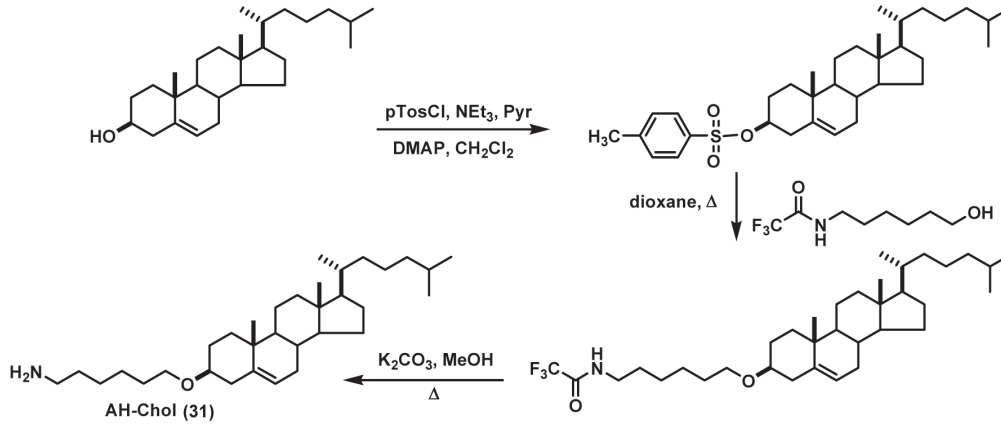
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก (Synthesis of Cationic Lipids)

มีวิธีการทางเคมีสังเคราะห์ 2 วิธีหลักที่ใช้ในการสังเคราะห์ไขมันประจุบวก คือ การสังเคราะห์แบบสารละลาย (solution synthesis) และการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็ง (solid phase synthesis)

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกแบบสารละลาย (Solution Synthesis of Cationic Lipids)

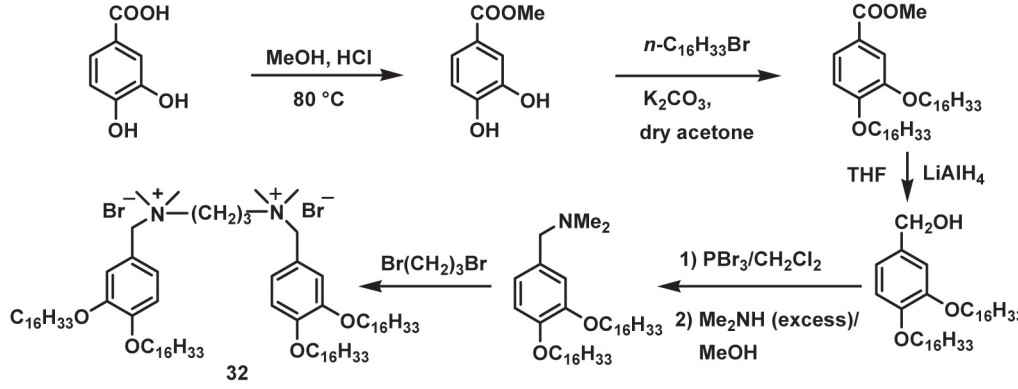
การสังเคราะห์แบบสารละลายถือเป็นวิธีพื้นฐานทางเคมีอินทรีย์สังเคราะห์ที่อาศัยการเกิดปฏิกิริยาของสารตั้งต้นและรีเอเจนต์ในตัวทำละลาย โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาให้ได้ผลผลิตตามต้องการ ตัวอย่างงานวิจัยของการสังเคราะห์แบบสารละลายมีดังนี้

ในปี ค.ศ. 1999 Zimmer และคณะ [47] ได้นำเสนองานวิจัยในการออกแบบและการเตรียมไขมันประจุบวก **31** ที่มีคอเลสเตอรอลเป็นส่วนหลักใน Scheme 1



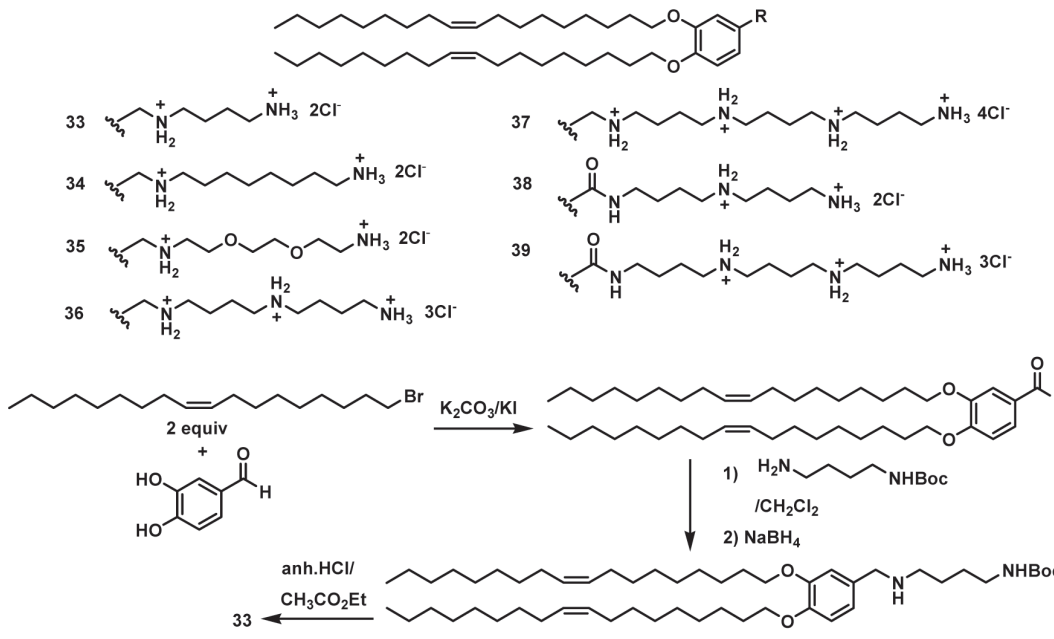
Scheme 1 การสังเคราะห์ AH-Chol (**31**)

ในปี ค.ศ. 2006 Paul และคณะ [48] ได้สังเคราะห์ไขมันประจุบวก **32** (Scheme 2) ที่มีส่วนของแอโรเมติกเชื่อมระหว่างสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนและหมู่ที่มีประจุส่วนหัว



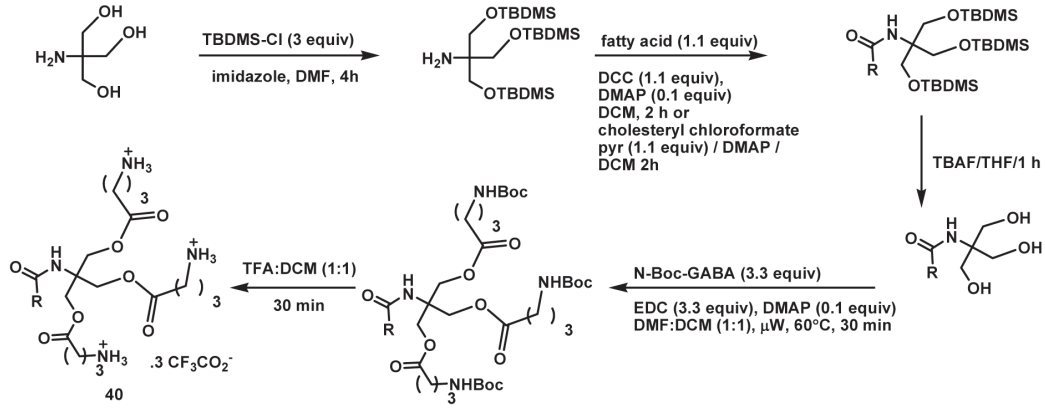
Scheme 2 การสังเคราะห์สาร **32**

ในปีถัดมา Gardner และคณะ [49] พบว่าจำนวนและตำแหน่งของประจุบวกที่อยู่ตามส่วนของโมเลกุลพอลิเอมีน **33-39** ได้แสดงถึงประสิทธิภาพในการนำส่งดีเอ็นเอ ตัวอย่างการสังเคราะห์ไขมันประจุบวก **33** แสดงดัง Scheme 3



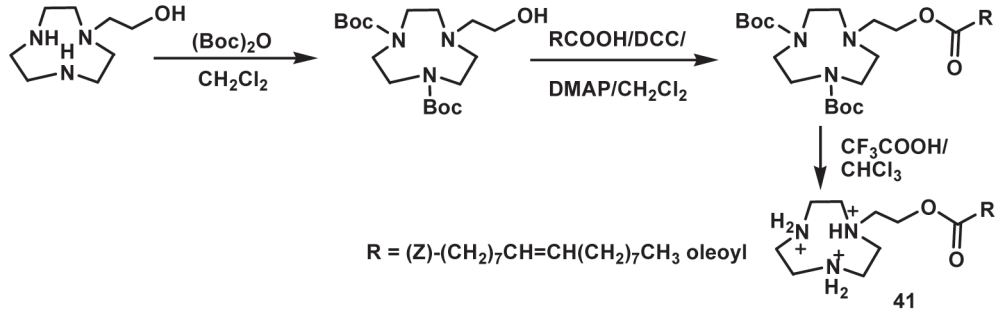
Scheme 3 การสังเคราะห์สาร **33**

ในปี 2011 U.-Broceta และคณะ [50] ได้สังเคราะห์ไขมันประจุบวก **40** หมู่ไฮดรอกซิลของสารตั้งต้นทำปฏิกิริยากับ TBDMS-Cl และหมู่เอมีนนำมาทำปฏิกิริยาต่อกับกรดไขมันสายโซ่ยาวหมู่ silyl ถูกกำจัดออกโดยใช้ TBAF และนำมาเชื่อมต่อกับ N-^{t}Boc-GABA โดยใช้คลื่นไมโครเวฟ จากนั้นกำจัดหมู่ N-Boc ออก โดยใช้สภาวะที่เป็นกรด TFA สารผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นเกลือของ TFA (Scheme 4)



Scheme 4 การสังเคราะห์สาร **40**

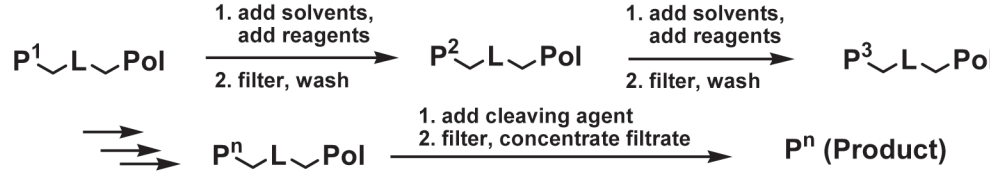
และในปีเดียวกัน Zhang และคณะ [51] ได้สังเคราะห์ไขมันประจุบวก **41** ที่มีส่วนหัวของ TACN เป็นส่วนที่มีขั้ว (Scheme 5) หลังจากป้องกันอะตอมไนโตรเจนด้วยหมู่ Boc แล้ว หมู่ไฮดรอกซิลที่เหลือได้เชื่อมต่อกับกรดคาร์บอกซิลิก โดยมี DCC เป็นสารคู่ควบ หมู่ Boc ถูกกำจัดออก โดยใช้ TFA ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าหมู่ oleoyl ของกรดไขมันมีประสิทธิภาพที่ดีในการนำส่งดีเอ็นเอ



Scheme 5 การสังเคราะห์สาร **41**

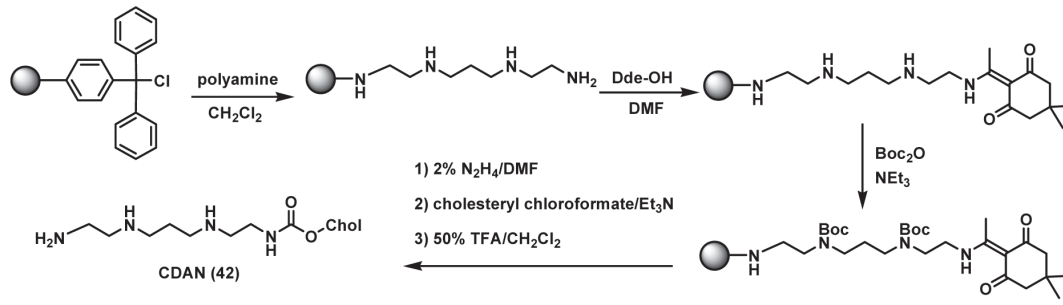
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกบนวัฏภาคของแข็ง (Solid Phase Synthesis of Cationic Lipids)

การสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็ง [52] หมายถึง การสังเคราะห์ซึ่งเริ่มต้นจากการเชื่อมพันธะระหว่างสารเคมีหรือสารมัธยันตร์ (intermediate) กับพอลิเมอร์ค้ำจุนที่ไม่ละลาย (insoluble polymer support) ซึ่งเป็นการง่ายในขั้นตอนการแยกสารที่ต้องการออกจากสารตั้งต้นที่มากเกินพอและตัวทำละลาย มีวิธีการโดยทั่วไป ดัง Scheme 6



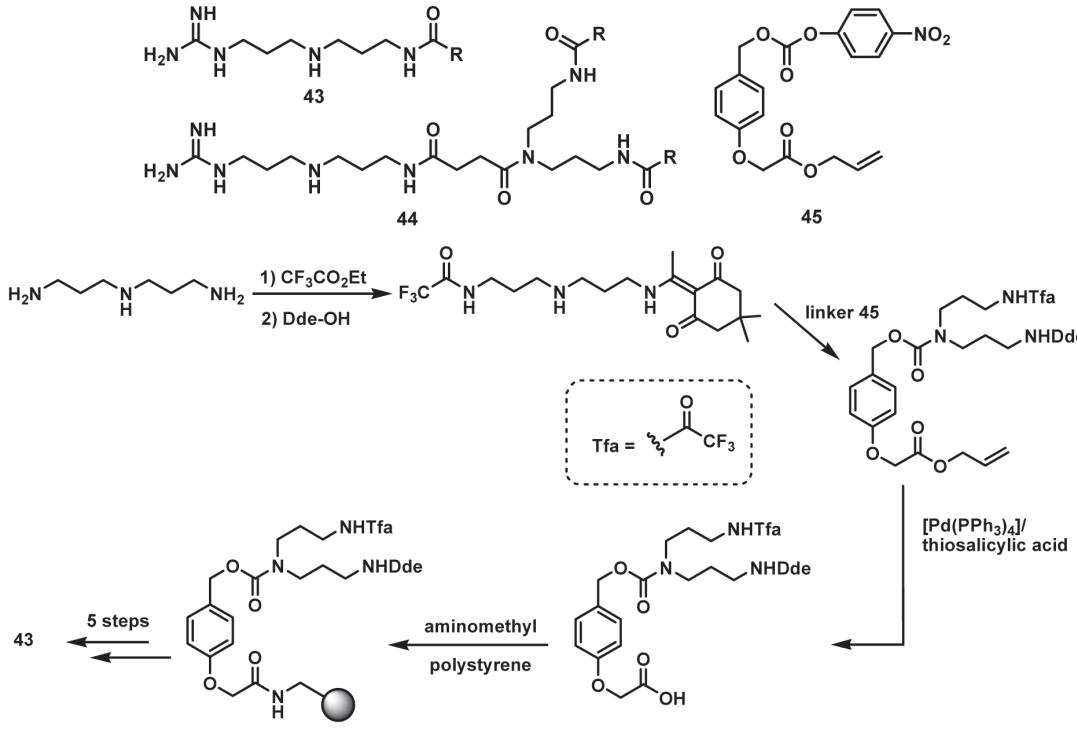
Scheme 6 แผนภาพแสดงวิธีการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็ง Pol: support, L: linker, P: synthetic intermediate

ปี ค.ศ. 2004 Oliver และคณะ [53] ได้สังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มีคอเลสเตอรอลเป็นส่วนหลักโดยวิธีการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็ง ซึ่งให้ร้อยละผลผลิตมากกว่า 87 และมีความบริสุทธิ์ วิธีการสังเคราะห์ใช้เรซิน 2-chlorotrityl chloride (0.4 mmol/g) เป็นพอลิเมอร์ค้ำจุนและหมู่ป้องกัน (protecting group) สำหรับหมู่เอมีนชนิดปฐมภูมิ (primary amine) ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจง คือ 2-acetyldimedone (Dde-OH) แผนการสังเคราะห์แสดงใน Scheme 7 โดยใช้ CDAN (**42**) เป็นตัวอย่างในการนำเสนอ ดังนี้



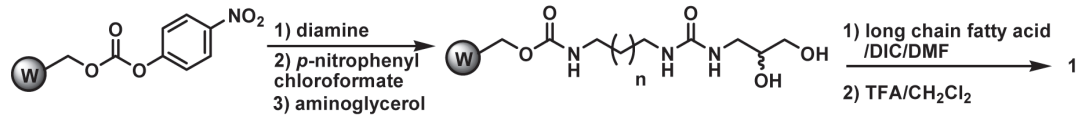
Scheme 7 การสังเคราะห์ CDAN (**42**)

ในปีเดียวกัน Yingyongnarongkul และคณะ [30] ได้รายงานการสังเคราะห์สารนำส่งดีเอ็นเอเข้าเซลล์จำนวน 3 คลัง (library) (**9, 43, 44**) โดยวิธีการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็งได้เลือกใช้ตัวเชื่อม **45** ในการสังเคราะห์ไขมันประจุบวกทั้ง 3 คลังนี้ ไขมันประจุบวก 89 ชนิดที่มีพอลิเอมีนเป็นส่วนหลักได้ทดสอบเบื้องต้นสำหรับการนำส่งดีเอ็นเอเข้าเซลล์ตัวอย่างการสังเคราะห์สำหรับคลัง **43** แสดงดัง Scheme 8



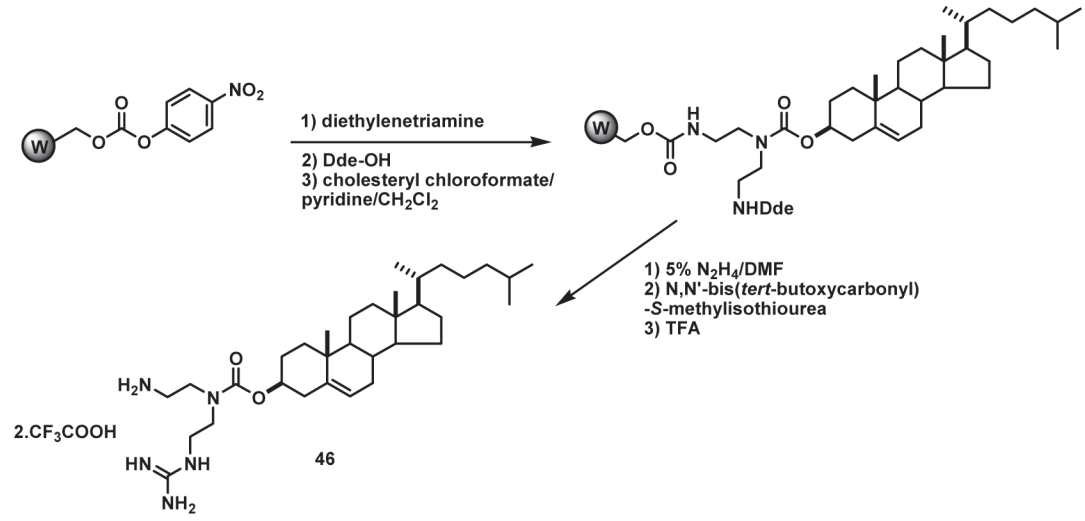
Scheme 8 การสังเคราะห์สาร **43**

ในปี ค.ศ. 2009 Yingyongnarongkul และคณะ [38] ได้รายงานการสังเคราะห์สาร **18** ดัง Scheme 9 ต่อไปนี้



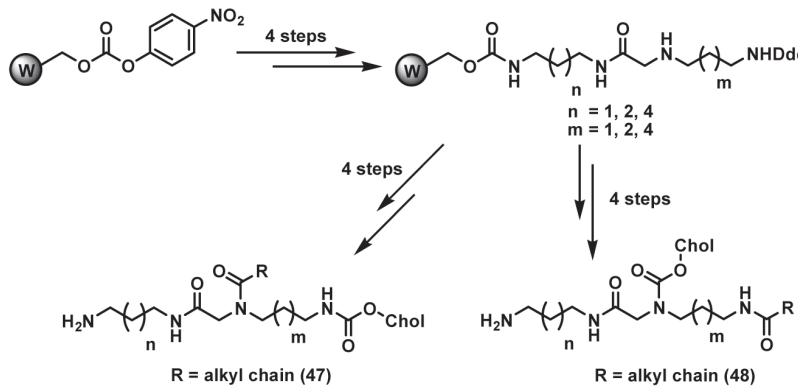
Scheme 9 การสังเคราะห์สาร **18**

ในปี ค.ศ. 2010 Radchatawedchakoon และคณะ [54] ได้สังเคราะห์ไขมันประจุบวกชนิดที่มีส่วนหัวไม่สมมาตรโดยวัฏภาคของแข็งพบว่าไขมัน **46** มีประสิทธิภาพที่สูงในการนำส่งดีเอ็นเอเข้าเซลล์ HEK293 และ PC3 ซึ่งวิธีการสังเคราะห์แสดงได้ดัง Scheme 10



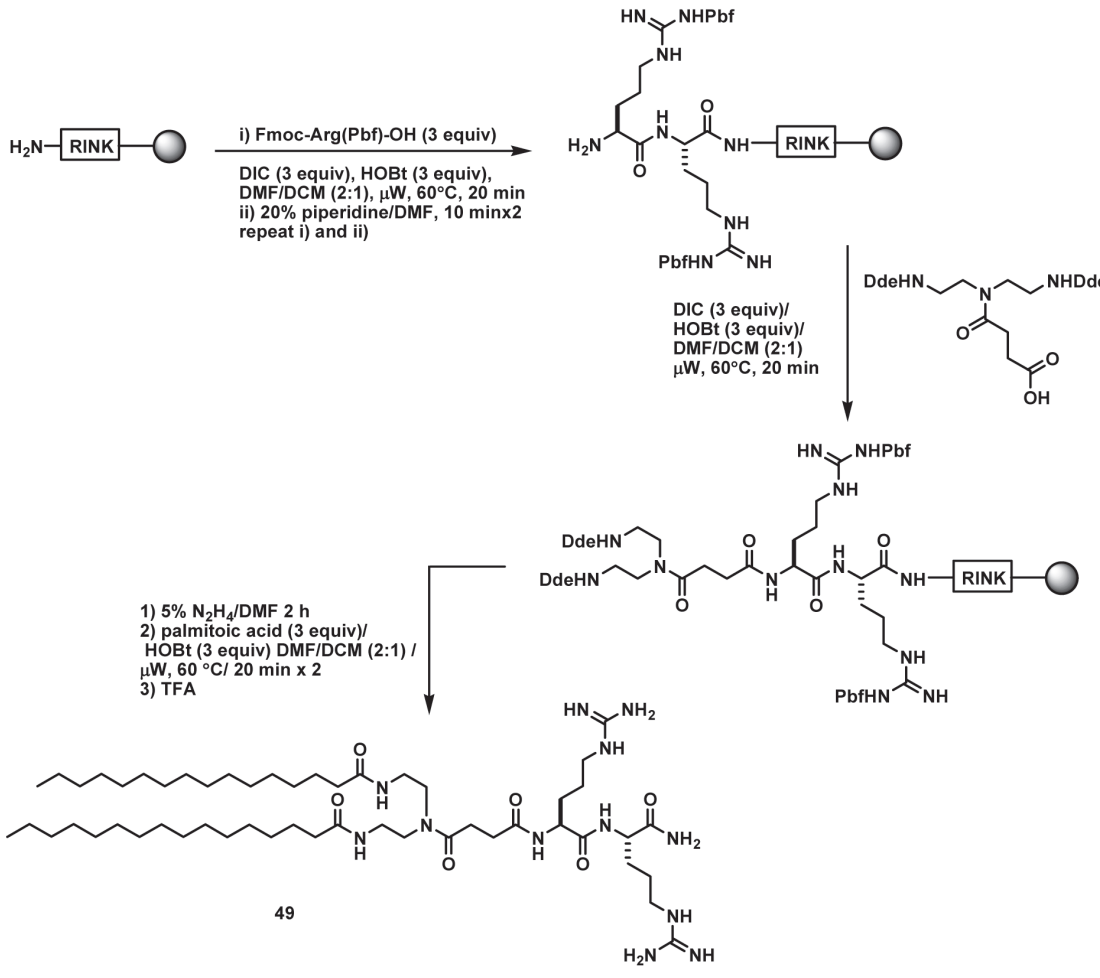
Scheme 10 การสังเคราะห์สาร **46**

และในปีถัดมานักวิจัยกลุ่มเดิม [55] ได้รายงานการสังเคราะห์ไขมันประจุบวกชนิดหางไม่สมมาตร (**47-48**) โดยใช้เทคนิคเดียวกัน (Scheme 11) พบว่าไขมันประจุบวกที่มีส่วนของคอเลสเตอรอลอยู่ตำแหน่งกลางของโมเลกุลมีประสิทธิภาพที่สูงในการนำส่งดีเอ็นเอเข้าเซลล์ PC3 และ HEK293 ได้ดีเมื่อเทียบกับ Effectene®, DOTAP (**2**) และ DC-Chol (**3**)



Scheme 11 การสังเคราะห์สาร **47-48**

ในปี 2011 Liberska และคณะ [56] ได้รายงานการสังเคราะห์ไลโปเพปไทด์ที่มีอาร์จินินเป็นส่วนหลักของโครงสร้าง **49** ใช้การสังเคราะห์แบบขนาน (parallel synthesis) บนวัฏภาคของแข็งดัง Scheme 12 โดยใช้คลื่นไมโครเวฟในการเชื่อม Fmoc-Arg(Pbf)-OH และ DIC/HOBt กับ Rink เรซิน หมู่ป้องกันอะมิโน Fmoc ถูกกำจัดออก โดยใช้ 20% piperidine ใน DMF และเชื่อมต่อหมู่อะมิโนกับส่วนเชื่อมต่อ (spacer) ที่มีการสังเคราะห์ไว้ต่างหาก และสร้างพันธะกับส่วนหางของกรดปาล์มิติก สารประกอบที่ได้นี้ได้ทดสอบการนำส่งดีเอ็นเอเข้าเซลล์ HeLa และ HEK293T ผลการทดสอบแสดงประสิทธิภาพในระดับที่สูง



Scheme 12 การสังเคราะห์สาร **49**

สรุป

มีกลุ่มนักวิจัยจำนวนมากได้ให้ความสนใจศึกษาสารไขมันประจุบวก ทั้งในด้านการพัฒนาการสังเคราะห์แบบสารละลายหรือบนวัฏภาคของแข็ง และนำสารที่สังเคราะห์ได้ไปศึกษาประสิทธิภาพการนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ ในปัจจุบันงานวิจัยเรื่องไขมันประจุบวกยังได้รับความสนใจที่จะมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องและประยุกต์ใช้ในการนำส่งยา และเป็นความหวังสำหรับยีนบำบัดในอนาคต

อักษรย่อ

A549	human lung adenocarcinoma epithelial
BGBH	bis-guanidinium bis(2-aminoethyl)amine hydrazone
BGTC	bis-guanidinium-tren-cholesterol
Boc	tert-butyloxycarbonyl
CHDTAEA	cholesteryl hemidithiodiglycol tris(aminoethyl)amine
CHO	chinese hamster overy
COPA	cholesteryloxypropan-1-amine
COS-1	African green monkey kidney
COS7	African Green Monkey SV40-transf'd kidney fibroblast
DC-Chol	3β-[*N*-(*N*′,*N*′-dimethylaminoethane)carbamoyl]cholesterol
DCC	dicyclohexylcarbodiimide
DG	dioleoylglutamide
DMAP	4-*N*,*N*′-dimetylaminopyridine
DOGS	dioctadecylamido-glycylspermine
DOPE	dioleoylphosphatidylethanolamine
DOSPA	2,3-dioleyloxy-*N*-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-*N*,*N*-dimethyl-1-propanaminium trifluoro acetate
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimethylammoniumpropane
DOTMA	*N*-(2,3-dioleyloxypropyl)-*N*,*N*,*N*-trimethyl ammonium chloride
GABA	γ-aminobutyric acid
16HBE14o	human bronchial epithelial
HEK293T	human embryonic kidney
HeLa	human cervical adenocarcinoma
HepG2	human hepatocellular liver carcinoma
MCF7	human breast adenocarcinoma
PC3	human prostate adenocarcinoma
SKnSH	human neuroblastoma
TACN	1,4,7-triazacyclononane
TBAF	tetrabutylammonium fluoride
TBDMS-Cl	*tert*-butyldimethylsilyl chloride
TFA	trifluoroacetic acid

เอกสารอ้างอิง

1. Singh, M., Parikh, V., and Sharma, A. 1997. Fundamentals and Future Prospects of Gene Therapy. *Drugs of the Future* 22: 995-1003.
2. Mountain, A. 2000. Gene therapy: The First Decade. *Trends in Biotechnology* 18: 119-128.
3. Zhang, Y., and Yu, L.-C. 2008. Microinjection as a Tool of Mechanical Delivery. *Current Opinion in Biotechnology* 19: 506-510.
4. Liu, D., and Knapp, J. E. 2001. Hydrodynamics-Based Gene Delivery. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 3: 192-197.
5. Uchida, M., Li, X. W., Mertens, P., and Alpar, H. O. 2009. Transfection by Particle Bombardment: Delivery of Plasmid DNA into Mammalian Cells Using Gene Gun. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790: 754-764.
6. Knutson, J. C., and Yee, D. 1987. Electroporation: Parameters Affecting Transfer of DNA into Mammalian Cells. *Analytical Biochemistry* 164: 44-52.
7. Newman, C. M., Lawrie, A., Brisken, A. F., and Cumberland, D. C. 2001. Ultrasound Gene Therapy: On the Road from Concept to Reality. *Echocardiography* 18: 339-347.
8. Wang, D. Robinson, D. R., Kwon, G. S., and Samuel, J. 1999. Encapsulation of Plasmid DNA in Biodegradable Poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) Microspheres as a Novel Approach for Immunogene Delivery. *Journal of Controlled Release* 57: 9-18.
9. Rigby, P. G. 1969. Prolongation of Survival of Tumour-Bearing Animals by Transfer to "Immune" RNA with DEAE-dextran. *Nature* 221: 968-969.
10. Schenborn, E. T., and Goiffon, V. 2000. Calcium Phosphate Transfection of Mammalian Cultured Cells. *Methods in Molecular Biology* 130: 135-145.
11. Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., and Danielsen, M. 1987. Lipofection: A Highly Efficient, Lipid-Mediated DNA-Transfection Procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 7413-7414.
12. Lynn, D. M., Anderson, D. G., Putnam, D., and Langer, R. 2001. Accelerated Discovery of Synthetic Transfection Vectors: Parallel Synthesis and Screening of a Degradable Polymer Library. *Journal of the American Chemical Society* 123: 8155-8156.
13. Tang, M. X., Redemann, C. T., and Szoka, F. C., Jr. 1996. *In vitro* Gene Delivery by Degraded Polyamidoamine Dendrimers. *Bioconjugate Chemistry* 7: 703-714.
14. Templeton, N. S. 2002. Cationic Liposome-Mediated Gene Delivery *In vivo*. *Bioscience Reports* 22: 283-295.

15. Ghosh, Y. K., Indi, S. S., and Bhattacharya, S. 2001. Thermal Lipid Order-Disorder Transitions in Mixtures of Cationic Cholesteryl Lipid Analogues and Dipalmitoyl Phosphatidylcholine Membranes. *The Journal of Physical Chemistry B* 105: 10257-10265.
16. Caracciolo, G., and Caminiti, R. 2004. DNA-DNA Electrostatic Interactions within Cationic lipid/DNA Lamellar Complexes. *Chemical Physics Letters* 400: 314-319.
17. Zabner, J., Fasbender, A. J., Moninger, T., Poellinger, K. A., and Welsh, M. J. 1995. Cellular and Molecular Barriers to Gene Transfer by a Cationic Lipid. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 18997-19007.
18. Martin, B., Sainlos, M., Aissaoui, A., Oudrhiri, N., Hauchecorne, M., Vigneron, J.-P., Lehn, J.-M., and Lehn, P. 2005. The Design of Cationic Lipids for Gene Delivery. *Current Pharmaceutical Design* 11: 375-394.
19. Xu, Y., and Szoka, F. C., Jr. 1996. Mechanism of DNA Release from Cationic Liposome/DNA Complexes Used in Cell Transfection. *Biochemistry* 35: 5616-5623.
20. Kudsiova, L., Ho, J., Fridrich, B., Harvey, R., Keppler, M., Ng, T., Hart, S. L., Tabor, A. B., Hailes, H. C., and Lawrence, M. J. 2011. Lipid Chain Geometry of C14 Glycerol-Based Lipids: Effect on Lipoplex Structure and Transfection. *Molecular BioSystems* 7: 422-436.
21. Lechardeur, D., Sohn, K. J., Haardt, M., Joshi, P.B., Monck, M., Graham, R.W., Beatty, B., Squire, J., O'Brodovich, H., and Lukacs, G. L. 1999. Metabolic Instability of Plasmid DNA in the Cytosol: A Potential Barrier to Gene Transfer. *Gene Therapy* 6: 482-497.
22. Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., and Danielsen, M. 1987. Lipofectin: A Highly Efficient, Lipid-Mediated DNA-Transfection Procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 7413-7417.
23. Uchida, M., Li, X. W., Mertens, P., and Alpar, H. O. 2009. Transfection by Particle Bombardment: Delivery of Plasmid DNA into Mammalian Cell Using Gene Gun. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790: 754-764.
24. Ren, T., and Liu, D. 1999. Synthesis of Cationic Lipids from 1,2,4-Butanetriol. *Tetrahedron Letters* 40: 209-212.
25. Li, S., Gao, X., Son, K., Sorgi, F., Hofland, H., and Huang, L. 1996. DC-Chol Lipid System in Gene Transfer. *Journal of Controlled Release* 39: 373-381.
26. Schofield, J. P., and Caskey, C. T. 1995. Non-viral Approaches to Gene Therapy. *British Medical Bulletin* 51: 56-71.

27. Vigneron, J.-P., Oudrhiri, N., Fauquet, M., Vergery, L., Bradley, J.-C., Basseville, M., Lehn, P., and Lehn, J.-M. 1996. Guanidinium-Cholesterol Cationic Lipids: Efficient Vectors for the Transfection of Eukaryotic Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 9682-9686.
28. Tang, F., and Hughes, J. A. 1999. Use of Dithiodiglycolic Acid as a Tether for Cationic Lipids Decreases the Cytotoxicity and Increase Transgenes Expression of Plasmid DNA *In Vitro. Bioconjugate Chemistry* 10: 791-796.
29. Aissaoui, A., Martin, B., Kan, E., Oudrhiri, N., Hauchecorne, M., Vigneron, J.-P., Lehn, J.-M., and Lehn, P. 2004. Novel Cationic Lipids Incorporating an Acid-Sensitive Acylhydrazone Linker: Synthesis and Transfection Properties. *Journal of Medicinal Chemistry* 47: 5210-5223.
30. Yingyongnarongkul, B., Horwarth, M., Elliott, T., and Bradley, M. 2004. Solid-Phase Synthesis of 89 Polyamine-Based Cationic Lipids for DNA Delivery to Mammalian Cells. *Chemistry-A European Journal* 10: 463-473.
31. U.-Broceta, A., Holder, E., Jones, L. J., Stevenson, B., Turner, A. R., Porteous, D. J., Boyd, A. C., and Bradley, M. 2008. Tripod-Like Cationic Lipids as Novel Gene Carriers. *Journal of Medicinal Chemistry* 51: 4076-4084.
32. Kim, B.-K., Doh, K.-O., Nam, J. H., Kang, H., Park, J.-G., Moon, I.-J., and Seu, Y.-B. 2009. Synthesis of Novel Cholesterol-Based Cationic Lipids for Gene Delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19: 2986-2989.
33. Gaucheron, J., Wong, T., Wong, K. F., Maurer, N., and Cullis, P. R. 2002. Synthesis and Properties of Novel Tetraalkyl Cationic Lipids. *Bioconjugate Chemistry* 13: 671-675.
34. Mahidhar, Y. V., Rajesh, M., Madhavendra, S. S., and Chaudhuri, A. 2004. Distance of Hydroxyl Functionality from the Quaternized Center Influence DNA Binding and *in Vitro* Gene Delivery Efficacies of Cationic Lipids with Hydroxyalkyl Headgroups. *Journal of Medicinal Chemistry* 47: 5721-5728.
35. Sen, J., and Chaudhuri, A. 2005. Design, Syntheses, and Transfection Biology of Novel Non-Cholesterol-Based Guanidinylated Cationic Lipids. *Journal of Medicinal Chemistry* 48: 812-820.
36. Bajaj, A., Kondaiah, P., and Bhattacharya, S. 2007. Synthesis and Gene Transfer Activities of Novel Serum Compatible Cholesterol-Based Germini Lipids Possessing Oxyethylene-Type Spacers. *Bioconjugate Chemistry* 18: 1537-1546.
37. Mukherjee, K., Bhattacharyya, J., Sen, J., Sistla, R., and Chaudhuri, A. 2008. Covalent Grafting of Common Trihydroxymethylaminomethane in the Headgroup Region Impacts High Serum Compatibility and Mouse Lung Transfection Property to Cationic Amphiphile. *Journal of Medicinal Chemistry* 51: 1967-1971.

38. Yingyongnarongkul, B., Radchatawedchakoon, W., Krajarng, A., Watanapokasin, R., and Suksamrarn, A. 2009. High Transfection Efficiency and Low Toxicity Cationic Lipid with Aminoglycerol-Diamine Conjugate. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17: 176-188.
39. Suh, M. S., Shim, G., Lee, H. Y., Han, S.-E., Yu, Y.-H., Choi, Y., Kim, K., Kwon, I. C., Weon, K. Y., Kim, Y. B., and Oh, Y.-K. 2009. Anionic Amino Acid-Derived Cationic Lipid for siRNA Delivery. *Journal of Controlled Release* 140: 268-276.
40. Choi, J. S., Lee, E. J., Jang, H. S., and Park, J. S. 2001. New Cationic Liposomes for Gene Transfer into Mammalian Cells with High Efficiency and Low Toxicity. *Bioconjugate Chemistry* 12: 108-113.
41. Lee, Y., Koo, H., Lim, Y.-b., Lee, Y., Mo, H., and Park, J. S. 2004. New Cationic Lipids for Gene Transfer with High Efficiency and Low Toxicity: T-shape Cholesterol Ester Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14: 2637-2641.
42. Singh, R. S., and Chaudhuri, A. 2004. Single Additional Methylene Group in the Head-group Region Imparts High Gene Transfer Efficacy to Transfection-incompetent Cationic Lipid. *FEBS Letters* 556: 86-90.
43. Kearns, M. D., Donkor, A.-M., and Savva, M. 2008. Structure-Transfection Activity Studies of Novel Cationic Cholesterol-Based Amphiphiles. *Molecular Pharmaceutics* 5: 128-139.
44. Bajaj, A., Mishra, S. K., Kondaiah, P., and Bhattacharya, S. 2008. Effect of the Headgroup Variation on the Gene Transfer Properties of Cholesterol Based Cationic Lipids Possessing Ether Linkage. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778: 1222-1236.
45. Han, S.-E., Kang, H., Shim, G. Y., Suh, M. S., Kim, S. J., Kim, J.-S., and Oh, Y.-K. 2008. Novel Cationic Cholesterol Derivative-Based Liposomes for Serum-Enhanced Delivery of siRNA. *International Journal of Pharmaceutics* 353: 260-269.
46. Islam, R. U., Hean, J., van Otterlo, W. A., de Koning, C. B., and Arbuthnot, P. 2009. Efficient Nucleic Acid Transduction with Lipoplexes Containing Novel Piperazine-and Polyamine-Conjugated Cholesterol Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19: 100-103.
47. Zimmer, A., Aziz, S. A., Gilbet, M., Werner, D., and Noe, C. R. 1999. Synthesis of Cholesterol Modified Cationic Lipids for Liposomal Drug Delivery of Antisense Oligo-nucleotides. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 47: 175-178.
48. Paul, B., Bajaj, A., Indi, S. S., and Bhattacharya, S. 2006. Synthesis of Novel Dimeric Cationic Lipids Based on an Aromatic Backbone between the Hydrocarbon Chains and Headgroup. *Tetrahedron Letters* 47: 8401-8405.
49. Gardner, R. A., Belting, M., Svensson, K., and Phanstiel, O 4^{th}. 2007. Synthesis and Transfection Efficiencies of New Lipophilic Polyamines. *Journal of Medicinal Chemistry* 50: 308-318.

50. U.-Broceta, A., Moggio, L., Dhaliwal, K., Pidgeon, L., Finlayson, K., Haslett, C., and Bradley, M. 2011. Safe and Efficient *In Vitro* and *In Vivo* Gene Delivery: Tripodal Cationic Lipids with Programmed Biodegradability. *Journal of Materials Chemistry* 21: 2154-2158.
51. Zhang, Q.-F., Yang, W.-H., Yi, W.-J., Zhang, J., Ren, J., Luo, T.-Y., Zhu, W., and Yu., X.-Q. 2011. TACN-Containing Cationic Lipids with Ester Bond: Preparation and Application in Gene Delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21: 7045-7049.
52. Labadie, J. W. 1998. Polymeric Supports for Solid Phase Synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology* 2: 346-352.
53. Oliver, M., Jorgensen, M. R., and Miller, A. D. 2004. The Facile Solid-Phase Synthesis of Cholesterol-Based Polyamine Lipids. *Tetrahedron Letters* 45: 3105-3107.
54. Radchatawedchakoon, W., Watanapokasin, R., Krajarng, A., and Yingyongnarongkul, B. 2010. Solid Phase Synthesis of Novel Asymmetric Hydrophilic Head Cholesterol-Based Cationic Lipids with Potential DNA Delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18: 330-342.
55. Radchatawedchakoon, W., Krajarng, A., Niyomtham, N., Watanapokasin, R., and Yingyongnarongkul, B. 2011. High Transfection Efficiency of Cationic Lipids with Asymmetric Acyl-Cholesteryl Hydrophobic Tails. *Chemistry-A European Journal* 17: 3287-3295.
56. Liberska, A., Lilienkampf, A., U.-Broceta, A., and Bradley, M. 2011. Solid-Phase Synthesis of Arginine-Based Double-Tailed Cationic Lipopeptides: Potent Nucleic Acid Carriers. *Chemical Communications* 47: 12774-12776.

ได้รับบทความวันที่ 23 มกราคม 2555
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 27 กุมภาพันธ์ 2555