ANTISENSE OLIGONOCLEOTIDE
یک استراتژی نوین در داروسازی

دکتر رضا فروغ ـ دکتر گودرز گودرزی
دانشگاه واشنگتن ـ دانشگاه سنت‌لوئیس

DNA واقع در هستهٔ سلول موجودات زنده، اطلاعات ژنتیکی را با خود دارد. این DNA به شکل دو زنجیره مارپیچی مکمل (Complementary double helix strands) در هستهٔ سلول شناور است. RNA های پیغام‌بر mRNA معمولاً از قسمت‌های مختلف یکی از این دو زنجیرهٔ DNA سنتز می‌شوند. از آنجایی که چنین mRNA هایی در ادامهٔ سیر طبیعی‌شان پروتئین‌های مشخصی را می‌سازند اصطلاحاً Sense strands (معنی‌دار، حاوی اطلاعات) نامگذاری شده‌اند. با چنین برهانی، محققین مکمل Sense RNA را با مقیاسی بسیار کوچک‌تر (حدود ۲۰ تا ۳۰ نوکلئوتید) به طریقه مکانیکی (سنتز مصنوعی) تولید نموده و antisense RNA نامگذاری نموده‌اند. امروزه محققین با استفاده از تکنولوژی antisense DNA و antisense RNA سعی در جلوگیری از تولید پروتئین‌های مضرّ از قبیل پروتئین‌های مترشحه در رشدهای سرطانی و یا پروتئین‌های سنتز شده توسط پاتوژن‌های باکتریایی، قارچی و ویروسی را دارند. به عبارت دیگر تکنولوژی antisense را می‌توان به عنوان طریقه‌ای جدید در تولید دارو در علم داروسازی مورد مطالعه جدی قرار داد.

تاریخچه کشف و پیشرفت تکنولوژی antisense:

شاید بتوان گفت که اولین اشاره به امکان استفاده از antisense به عنوان یک استراتژی در داروسازی توسط Zamecnik مطرح شد. اما تا چندسالی محققین چندان علاقه‌ای در این زمینه نشان ندادند. در سال ۱۹۸۱ میلادی Tomizawa در حین تحقیقات علمی‌اش در علوم پایه موفق به کشف وجود antisense RNA در باکتری‌ها گردید. **این antisense RNA به‌طور طبیعی توسط باکتری مورد مطالعه این محقق برای براندازی پاره‌ای از فعالیت‌های ژنتیکی‌اش سنتزگردیده و مورد استفاده قرار می‌گیرد.** پس از این مشاهدات علمی، آزمایشگاههای مختلف و کمپانی‌های داروسازی شروع به تمرکز در توسعهٔ antisense تکنولوژی به عنوان یک متد نوین برای متوقف ساختن تولید پروتئین‌های نامطلوب نمودند.

مکانیسم عمل تکنولوژی antisense:

به‌طور کلی می‌توان گفت که عملکرد اغلب داروها در متوقف ساختن عمل پروتئین‌های مشخصی در بدن است. این پروتئین‌های مورد هدف معمولاً یا یک

آنزیم و یا یک گیرنده (receptor) می‌باشند. اغلب داروسازان چنین داروهایی را با تلاش و پس از انجام آزمایش‌های عملی مکرر (trial and error) سنتز می‌کنند. متأسفانه یکی از مشکلات عمده در دنیای داروسازی امروز وجود عوارض جانبی (side effects) چنین داروهایی است.

در تکنولوژی antisense مهار یک پروتئین از طریق کنترل mRNA مختص آن پروتئین انجام می‌گیرد. آزمایشات in vitro نشان داده که افزودن antisense DNA (تک زنجیرهٔ کوچک مصنوعی متشکل از تقریباً ۱۵ تا ۲۰ دزاکسی ریبونوکلئیک اسید) و یا antisense RNA (تک زنجیره کوچک مصنوعی متشکل از تقریباً ۱۵ تا ۲۰ ریبونوکلئیک اسید) به سلول‌های کشت شده، نخست با نفوذ این مولکول‌های antisense به درون فضای مایع داخل سلولی ادامه می‌یابد. سپس این مولکول‌های antisense به راحتی RNA های مورد هدف را که در فضای داخلی سلول شناور هستند جستجو و یافته و با چسبیدن (hybridization) به آنها وظیفه مهاری خود را انجام می‌دهند.

تا به امروز چند مکانیسم عمل برای antisense پیشنهاد شده است.

الف ـ نفوذ antisense به درون هستهٔ سلول و با چسبیدن به RNA تازه سنتز شده (Primary transcript) سبب جلوگیری از انتقال چنین RNAهایی به سیتوپلاسم سلول می‌شوند.

ب ـ چسبیدن antisense به مولکول دو زنجیره‌ای DNA و تشکیل یک فرم جدید هندسی سه زنجیره‌ای (triple helix) که فاقد قدرت سنتز (transcription) RNA می‌باشد.

پ ـ چسبیدن antisense به mRNA مربوطه در سیتوپلاسم و در نتیجه ایجاد یک مولکول دو زنجیره‌ای نامتجانس mRNA - antisense DNA و یا mRNA antisense RNA می‌شود که ریبوزم قادر به «خواندن» و در نتیجه تولید پروتئین از این mRNA نخواهد بود.

ت ـ برطبق چهارمین مکانیسم پیشنهاد شده، مولکول دو زنجیره mRNA-antisense متشکله در سیتوپلاسم توسط یک آنزیم سیتوپلاسمی سلول به اسم RNase H مورد حمله واقع شده و زنجیره mRNA توسط این آنزیم هضم و پاکسازی می‌شود. باید متذکر شد که محققین هنوز پارامترهای لازم را کاملاً شناسایی

▣ انتظار می‌رود که به مرور زمان و با بهتر شناخته شدن چگونگی مکانیسم عمل antisense در متوقف ساختن فعل و انفعالات یک ژن و در نتیجه بهتر کنترل نمودن قدرت تشخیص این ملکول در تعقیب هدف مورد نظر، شاهد تثبیت این فرم از دارو درمانی در جهان داروسازی باشیم.

نکرده‌اند که قادر باشند با مطالعهٔ ساختمان (Sequence) مولکول antisense و یا مولکول mRNA مورد هدف، نوع مکانیسم خنثی‌کننده را پیش‌بینی نمایند.

در نظر گرفتن سه خصوصیت selectivity (قدرت تشخیص هدف)، Stability (ثبات) و Solubility (محلول بودن) از ضروریات طراحی موفق یک مولکول antisense ایده‌آل است.

قدرت تشخیص هدف ـ این صفت یک مولکول antisense رابطهٔ مستقیم با اندازهٔ مولکول سنتز شده antisense دارد. به عبارت دیگر هر چقدر طول یک مولکول antisense بلندتر باشد این مولکول شانس بیشتری دارد که هدف (sense) را یافته و مورد اصابت قرار دهد. با یک منطق ریاضی می‌توان چنین استنباط کرد که اگر ۴ باز سازنده نوکلئیک اسیدها به دفعات مساوی و به طور پراکنده (random) در ژن‌های یک فرد پخش شده باشند و با توجه به اینکه قریب به ۳ میلیارد باز (base pairs) تشکیل کروموزمها را می‌دهند، احتمال اینکه یک ردیف (sequence) ۱۲ تایی از این بازها بیشتر از یک بار تکرار شود بسیار ضعیف است. به عبارت ساده‌تر، یک مولکول antisense متشکل از حداقل ۱۲ باز مکمل یک mRNA معین، پتانسیل مهار این mRNA هدف را خواهد داشت. هرچند که در واقعیت مسئله به این سادگی نیست و ابعاد مختلف آن را بعداً بررسی خواهیم کرد.

ثبات ـ در حالت طبیعی DNA ها و RNA های پاتوژن‌های مهاجم و همچنین DNA و RNA های سلول‌های میزبان در تحت شرایط معینی معمولاً هدف اصابت آنزیم‌هایی به اسم nucleases واقع شده و پاکسازی می‌شوند. nuclease ها همچنین antisense هایی را که از غشاء پلاسمایی عبور کرده و وارد فضای داخلی سلول می‌شوند مورد اصابت و پاکسازی قرار می‌دهند. بنابراین یکی از صفات antisense ایده‌آل باید این باشد که قبل از شناسایی و چسبیدن به RNA یا DNA میزبان توسط nucleaseهای میزبان مهار و پاکسازی نگردد. محققین به این منظور تغییراتی

▣ ژن‌تراپی در آینده‌ای نه چندان دور، انقلابی در دارو درمانی بوجود خواهد آورد و پیش‌بینی می‌شود که تکنولوژی شاخه antisense وسیعی از مداوا به طریقه ژن‌تراپی را تشکیل دهد.

زیرکانه در ساختمان و طراحی antisenseها انجام داده‌اند که در زیر بررسی خواهیم کرد.

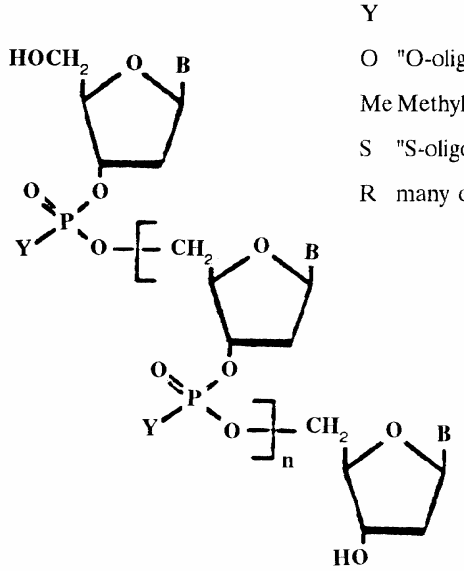
محلول بودن ـ همانطور که می‌دانیم فضای درون سلولی مایع است. بنابراین یک مولکول antisense باید قابل حل در آب باشد که بتواند در چنین محیطی به راحتی شناور باشد تا هدف خود را جستجو و شناسایی کند.

تغییرات زیرکانه در طراحی ساختمان antisense:

محققین برای حفظ «ثبات» و «قدرت تشخیص» یک مولکول antisense تغییرات زیرکانه‌ای بکار برده‌اند. از جمله چنین شگردهایی قرار دادن یک

گروه شیمیایی متیل (metyl) به جای اکسیژن در محل phosphodiester bond در استخوان‌بندی یک مولکول antisense از نوع DNA می‌باشد (شکل شمارهٔ ۱). چنین تغییری سبب احیاء اتم‌های O که مولکول antisense را با بار الکتریکی منفی آرایش کرده‌اند می‌گردد و با تبدیل آن به یک مولکول خنثی، ثبات بهتر antisense در مقابل آنزیم‌های پاکسازی nuclease را موجب می‌شوند. محققین اخیراً گروه سولفور را جانشین اکسیژن در محل phosphodiester bond یک مولکول antisense کرده‌اند (شکل شمارهٔ ۱). این مولکول سولفوردار هر سه خصوصیات یک antisense ایده‌آل یعنی ثبات بیشتر، قابلیت حل شدن بهتر و قدرت تشخیص و تمیز دادن هدف را دارا می‌باشد. این antisense طراحی شده حامل گروه سولفور نتایج رضایت‌بخشی در مهار ژن ویروس‌های گوناگون داشته است. به عنوان مثال فعل و انفعالات بیولوژیکی سه ژن ویروس مسبب بیماری ایدز (HIV) به نام‌های tat، P24، reverse transcriptase توسط چنین antisense های تکنولوژی خنثی گردیده است.

از دیگر طراحی‌های زیرکانه اتصال یک پیوند شیمیایی EDTA-Fe به مولکول antisense می‌باشد. چنین مولکولی پس از چسبیدن به هدف خویش با استفاده از محمولهٔ EDTA-Fe خویش، به RNA هدف صدمه می‌زند. گروهی دیگر از محققین مولکول acridine را به مولکول antisense متصل نمودند.



Y
O "O-oligo", phosodiester or normal DNA
Me Methylphosphonate, (uncharged)
S "S-oligo", phosphorothioate
R many other substitutions possible

شکل (۱) ـ ساختمان شیمیایی یک مولکول antisense.در این دیاگرام، (B) معرّف یکی از بازهای آدنین، سیتوزین، گوانین و یا تیمین می‌باشد.

چنین طراحی نه فقط سبب بهتر چسبیدن مولکول antisense به هدفش گردید بلکه سبب بهتر جذب شدن مولکول antisense توسط سلول گردید. این مولکول antisense در ظروف کشت آزمایشگاهی موفق به کشتن Trypanosoma Brucei عامل بیماری انگلی trypanosomiasis گردید.

چگونگی عبور مولکول antisense از غشاء پلاسمایی سلول:

چگونگی مکانیسمی که طی آن شناسایی غشاء پلاسمایی، چسبیدن به آن و بالاخره اینترنالیزه شدن یک مولکول antisense اتفاق می‌افتد هنوز به درستی مشخص نشده است. گروهی معتقدند که این مرحله عبور از غشاء پلاسمایی حالت passive دارد و پارامترهایی از قبیل اندازهٔ مولکولی، بار الکتریکی antisense و دیگر عوامل فیزیکی مثل دمای محیط چنین ترافیکی را کنترل می‌کنند. گروه دیگری از محققین به وجود یک گیرنده واقع در سطح غشاء پلاسمایی سلول برای شناسایی و انتقال antisense به درون سلول اعتقاد دارند. در پشتیبانی از این تئوری یک گروه از محققین پیشنهاد کرده‌اند که چنین گیرنده‌ای با وزن مولکولی ۸۰ کیلودالتون شناسایی نموده‌اند. باید متذکر شد که وجود چنین گیرنده‌ای هنوز به طور یقین به اتفاق مورد تأیید محققین واقع نشده است.

مصرف antisense به عنوان دارو در معالجه بیماری‌ها:

ژن‌تراپی در آینده‌ای نه چندان دور انقلابی در دارو درمانی بوجود خواهد آورد. پیش‌بینی می‌شود که تکنولوژی antisense شاخهٔ وسیعی از مداوا به طریقهٔ ژن‌تراپی را تشکیل دهد. تا به امروز، بیشتر مطالعات به روی antisense به عنوان یک دارو در ظروف آزمایشگاهی (in vitro) انجام شده و در مواردی هم در حیوانات (in vitro) با موفقیت امتحان گردیده است. به عنوان مثال مولکولی antisense با موفقیت در مهار فعالیت یکی از ژن‌های ویروس هپاتیت

▣ چگونگی مکانیسمی که طی آن شناسایی غشاء پلاسمایی، چسبیدن به آن و بالاخره اینترنالیزه شدن یک ملکول antisense اتفاق می‌افتد هنوز به درستی مشخص نشده است.

موسوم به hepatitis B surface antigen (HBsAg) در ظروف کشت آزمایش شده است. این محققین در ادامهٔ تحقیقاتشان به روی موش‌های آزمایشگاهی، این مولکول antisense را که از ۲۰ نوکلئوتید با استخوان‌بندی سولفور طراحی شده بود به طرق مختلف از قبیل S.C., i.P., i.V. به حیوان تزریق نمودند و سپس توزیع (distribution) و کلیرانس این antisense را اندازه گیری نمودند. براساس نتایج حاصله بیشترین مقدار این antisense در کبد تجمع نمود (به‌طور تخمینی ۲٪ از کل مقدار تزریق شده پس از مدت زمانی در حدود ۳۰ دقیقه). به‌علاوه، این antisense ۲۰ نوکلئوتیدی، حدود ۳۰ دقیقه پس از تزریق توسط آنزیم‌های nuclease در کبد به قطعات

کوچک‌تر تجزیه گردید. همچنین تزریق دوز 5mg/kg این antisense اثر سمی (toxicity) در موش‌ها نداشت.

مطالعات گروه دیگری از محققین در رابطه با فارماکوکینتیک مولکول‌های antisense در موش‌های آزمایشگاهی نشان داده که حدود ۳۰٪ از این antisense ها با استخوان‌بندی سولفور حدود ۲۴ ساعت پس از تزریق از طریق i.P. و یا i.V. توسط ادرار دفع می‌شوند. این گروه همچنین تخمین زده‌اند که کمتر از ۱٪ از antisense تزریقی در عرض ۲۴ ساعت در مدفوع ترشح شده و حدود ۱۵٪ بین ۲۴ تا ۴۸ ساعت پس از تزریق در مدفوع یافت می‌شود. به طور کلی antisense تزریقی در کبد و کلیه سریع‌تر تجزیه شده و به عنوان مثال سرعت تجزیه در کلیه ۵۰٪ سریع‌تر از سرعت تجزیه در پلاسمای خون در طول مدت زمانی یکسان می‌باشد. برطبق گزارش همین گروه از محققین دوز 150mg/kg این antisense ها که به طریقه i.P. تزریق شده بود هیچ عارضه toxicity در موش‌های آزمایشگاهی نداشت. در حقیقت تزریق روزانه antisense از راه i.P. و یا S.C. به مقدار 100mg/kg برای طول مدت ۱۴ روز هیچگونه اثر سمی به نمایش نگذاشت. یک طریقه دیگر برای ارائه antisense به درون سلول‌های موجود زنده در رابطه با معالجهٔ انسداد شریان‌ها (vascular restenosis) پیشنهاد گردیده است. این گروه از محققین مولکول antisense طراحی شده علیه ژن c-myb را داخل پمادی (gel) گذاشته و سپس این ژل را به قسمت بیرونی یک شریان بالن زده شده (angioplasty) حیوان مالیدند. جالب اینکه antisense مهارکننده c-myb تدریجاً از ژل خارج شده و پس از نفوذ به درون شریان بالن زده شده سبب جلوگیری از تنگ شدن این شریان‌ها در rat شوند. در چنین مدلی برای انسداد شریان‌ها، حیوانات بالن زده شده که antisense مهارکنندهٔ c-myb را دریافت نکردند و یا در عوض یک antisense نامربوط را دریافت کردند، تدریجاً صاحب یک شریان ضخیم شده گردیدند.

نقاط ضعف تکنولوژی antisense:

به‌طور کلی در ازای هریک طراحی موفق یک مولکول antisense، چندین برابر طراحی‌های ناموفق وجود دارد. در بسیاری از این طراحی‌های نامطلوب به عنوان مثال مولکول طراحی شده، sense ژن مورد هدف که در حقیقت باید نقش کنترل را بازی کند، درست همان نقش مهاری را به نمایش می‌گذارد که فقط از مولکول antisense طراحی شده می‌بایست انتظار داشت. این مسئله، نبود specificity در مشاهدات بعضی از محققین، سبب پدید آمدن یک طرز تلقی ناخوشایند به آیندهٔ تکنولوژی antisense به عنوان یک دارو در معالجه بیماران و یا حتی تکنیکی قابل اطمینان برای مطالعهٔ فعل و انفعالات ژنتیکی در سطح مولکولی گردیده است. جنبهٔ منفی دیگر تکنولوژی antisense چسبیدن این مولکول به پروتئین‌های درون سلولی است و در نتیجه تغییر دادن نقش بیولوژیکی این پروتئین‌ها می‌باشد. اما جالب اینکه گروهی از محققین معتقدند از آنجایی که چنین چسبیدنی بین antisense و پروتئین درون سلولی از یک specificity برخوردار می‌باشد، لذا می‌تواند یک شاخه‌ای از **دارو درمانی را نضج** دهد که بوسیله antisense های طراحی شده پروتئین‌های مشخصّی را در درون سلول مورد هدف قرار داده و وظایف

بیولوژیکی آن‌ها را متوقف نمود.

جمع‌بندی کلی:

در حال حاضر دو هدف مقبول برای antisense therapy عبارت هستند از ویروس‌ها و ژن‌های سرطان‌زا (Oncogenes). در ضمن باید تأکید کرد که antisense هنوز دوران طفولیت خود را می‌گذراند و در نتیجه هنوز شخصیت خود را به عنوان یک فرم نوین drug therapy مسجّل نکرده است. انتظار می‌رود که به مرور زمان و با بهتر شناخته شدن چگونگی مکانیسم عمل antisense در متوقف ساختن فعل و انفعالات یک ژن و در نتیجه بهتر کنترل نمودن قدرت تشخیص این مولکول در تعقیب هدف مورد نظر، شاهد تثبیت این فرم از drug therapy در جهان داروسازی باشیم. با در نظر گرفتن ساختمان ساده شیمیایی نوکلئیک اسید در مقایسه با انواع مختلف داروهای سنتز شده موجود در بازار و همچنین وجود ماشین‌های اتوماتیک برای سنتز این مولکول‌های antisense (Oligonucletide Synthesizer) که با قیمتی در حدود ۳۰ الی ۴۰ هزار دلار می‌توان فراهم کرد، می‌توان تجسم کرد که چه پتانسیل عظیمی برای تولید چنین فرمی از داروها توسط کمپانی‌هایی با کادر فنی و بنیه مالی محدود وجود دارد.

منابع:

1- *Neckers, L., etal., Antisense inhibition of oncogene expression. Crit. Rev. in Onc. 3:175-231, 1992.*

2- *Feng, B. Denhardt, D. Inhibition of processing of the primary transcript of the gene encoding tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) by antisense TIMP RNA in mouse 3T3 cells. Ann. N.Y. Acad. Sci. 660: 280-282, 1992.*

3- *Helene, C., etal., Control of gene expression by triple helix-forming oligonucleotides: The antigen strategy. Ann. N.Y.Acad. Sci 660: 27-36, 1992.*

4- *Goodarzi, G., etal., Antisense oligodeoxynucleotides inhibit the expression of the gene for hepatitis B virus sufface antigen. J. Gen. Virol. 71: 3021-3025, 1990.*

5- *Blum, H., etal. Inhibition of hepatitis B virus by antisense oligonucleotides. Lancet 337: 1230, 1991. 22.Wu, G. Wu, C. Specific inhibition of hepatitis B viral gene expression in vitro by targeted antisense oligonucleotides. J.Biol. Chem. 267: 12436-12439, 1992.*

6- *Goodarzi, G., etal., Organ distribution and stability of phosphorothioated Oligodeoxyribonucleotides in mice. Biopharm. Drug Dispos. 13: 221-227, 1992.*

7- *Agrawal, S., etal., Pharmacokinetics, biodistribution, and stability of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7565-7599, 1991.*

8- *Simons, M., etal., Antisense c-myb oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation in vivo. Nature. 359: 67-70, 1992.*

9- *Woolf, T., etal., Specificity of antisense oligonucleotides in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7305-7309, 1992.*

10- *Bock, L., etal., Selection of single - stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. Nature. 355: 564-566, 1992.*

11- *Stein, C.Cheng, C. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents. Is the bullet really magical? Science. 261: 1004-1012, 1992.*

12- *Carter, G. Lemoine, N. Antisense technology for cancer therapy: does it make sense? Br. J. Cancer. 67: 869-876, 1993.*

■