کشف داروهای جدید با استفاده از
گرماسنجی ریزآرایه

دکتر علی‌اکبر موسوی موحدی[1]، ایمان راد[2]

۱. مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران
۲. دانشجوی دکترا

خلاصه

گرماسنجی ریزآرایه[1] به دستگاه بسیار کوچکی اطلاق می‌شود که عمل گرماسنجی را در مقیاس نانوکلوین انجام می‌دهد. این دسته هر گونه تغییرات گرمایی را که در اثر بر هم کنش مولکول‌های زیستی انجام می‌شود، اندازه‌گیری می‌نماید. ویژگی اصلی گرماسنج ریزآرایه، انجام همزمان چندین آزمایش در مدت زمان کوتاه و در ازای حجم ناچیزی از محلول مورد آزمایش است. با استفاده از این فناوری می‌توان بدون نیاز به نشان‌دار نمودن مولکول‌های مورد آزمایش، بهترین کاندیداهای دارویی را از میان انبوهی از مهارکننده‌های یک آنزیم و یا لیگاندهای یک گیرنده ردیابی کرده و در مرحله بعدی با دستکاری ساختار کاندیداها از آن یک داروی بهینه شده به دست آورد. در صورتی که طی غربالگری از طیف نمونه‌های متنوع‌تری استفاده شود، چه بسا می‌توان داروهای نوینی را معرفی نمود که تا پیش از این مورد توجه و شناسایی قرار نگرفته بوده‌اند. در این مقاله سعی می‌شود به وضعیت کنونی این فناوری و کاربردهای آن در زمینه کشف داروهای نوین پرداخته شود.

واژگان کلیدی: کشف داروهای نوین، گرماسنجی ریزآرایه، غربالگری کتابخانه، کاندیدای دارویی و دستکاری ساختاری.

■ مقدمه

تا اواخر دهه نود میلادی دستگاه‌های میکروکالریمتری[۲] (گرماسنجی میکرو) به عنوان ابزارهایی صرفاً تحقیقاتی شناخته می‌شدند که مورد استفاده محققان شیمی، فیزیک و زیست‌شناسی قرار می‌گرفتند. به طور کلی دستگاه‌های کالریمتری عمل گرماسنجی را انجام می‌دهند و به همین دلیل گرماسنج نامیده می‌شوند. طی برهم کنش مولکول‌ها، انرژی لازم برای انجام این برهم کنش به صورت گرما با محیط مبادله می‌گردد. به این ترتیب دمای محلولی که مولکول‌های موردنظر ما در آن حل شده‌اند، تغییر می‌نماید. این تغییر دما بر حسب نوع پیوند متغیر است ولی معمولاً مقادیر بسیار ناچیزی در حد میکروژول یا کمتر از آن است که با دستگاه‌های گرماسنج حساس (میکروکالریمتر یا نانوکالریمتر) سنجیده می‌شوند. از آن‌جا که در آن زمان کاربردهای متنوع امروزی این دستگاه‌ها شناخته و یا معرفی نشده بود، این دستگاه‌ها به صورت سفارشی و در تعداد بسیار محدود توسط چند مرکز تحقیقاتی مشخص در دنیا تولید می‌شدند. با کشف قابلیت‌های فوق‌العاده دستگاه‌های گرماسنجی در حیطه علوم دارویی پزشکی و زیستی این دستگاه‌ها به تعداد زیاد و به صورت تجاری تولید شدند (۱). افزایش حساسیت و قابلیت تشخیصی این دستگاه‌ها به طور موازی با افزایش عرضه آن‌ها مورد توجه کارخانه‌های تولیدکننده آن‌ها قرار گرفت.

تاکنون بارها در گزارش‌های تحقیقاتی و مقالات علمی با نام تکنیک میکرواری[۳] (ریزآرایه) و یا روش‌هایی که پسوند اری[۴] دارند، برخورد شده است. ویژگی مشترکی که تمام دستگاه‌های واجد ساختار آرایه دارند، این است که به طور همزمان امکان انجام چندین آزمایش از یک نوع را فراهم می‌کنند. انتالپی اَری[۵] یکی از این دستگاه‌ها است که برای اولین بار توسط مرکز تحقیقاتی PARC[۶] طراحی و ارائه گردید (۲،۳). مطالعات پروتئومیک، بهینه‌سازی و طراحی داروهای نوین، سنجش[۷] همزمان انواع آنزیم‌ها (۴،۵) و یافتن بهترین مهارکننده‌های پروتئازی (۶،۷) تنها مواردی از استفاده فناوری انتالپی اری تاکنون می‌باشند. در این مقاله بیش‌تر تأکید بر آن است تا کاربردهای فناوری انتالپی اَری در مطالعات کشف داروهای نوین معرفی شوند.

■ کشف داروها در راستای دارو شناختی نوین[۸] با استفاده از گرماسنجی

به طور کلی، تأثیر دارو در بدن به واسطه برهم کنش‌هایی است که با مولکول هدف (پروتئین‌ها یا اسیدهای نوکلئیک) انجام می‌دهد. بخش زیادی از داروهایی که از گذشته تاکنون مورد مصرف هستند، عصاره خام و یا ترکیب ناخالص به دست آمده از یک منشأ زیستی و یا شیمیایی است. با توجه به این که از بین انواع ترکیبات موجود در این قبیل داروها تنها یکی از آن‌ها با اتصال خود به مولکول هدف ویژگی دارویی مد نظر ما را اعمال خواهد کرد، هر چقدر ناخالصی دارو زیادتر باشد، احتمال بروز عوارض ناخواسته نیز زیادتر خواهد شد. با علم به این مطلب، داروهایی که امروزه طراحی می‌شوند شامل یک ترکیب خالص با ساختار شیمیایی معین هستند. شناسنامه

ساختاری دارو به ما کمک می‌کند تا در فرآیند کشف داروهای نوین، برخی از داروهای خالصی که قبلاً شناخته شده بودند را به عنوان کاندیدای غربالگری داروهای جدید به حساب نیاوریم و در عوض به دنبال کشف خواص دارویی جدید آن باشیم که تا قبل از این مورد توجه قرار نگرفته است. دستگاه‌های گرماسنجی راه‌گشای رسیدن به این اهداف هستند.

□ لحاظ کردن ساختار مولکولی در طراحی دارو

با افزایش تعداد بر هم کنش‌های ساختاری بین دارو و مولکول هدف (اسیدنوکلئیک یا پروتئین) احتمال وقوع بر همکنش‌های مطلوب نیز بالاتر می‌رود. به طور کلی، با تخمین این که چه نسبتی از پیوندها مطلوب یا نامطلوب هستند، می‌توان پیش‌بینی کرد که از میان دریایی از ترکیبات دارویی کدامشان بهتر و اختصاصی‌تر به مولکول هدف متصل می‌شوند و این اساس کشف داروی بهینه است.

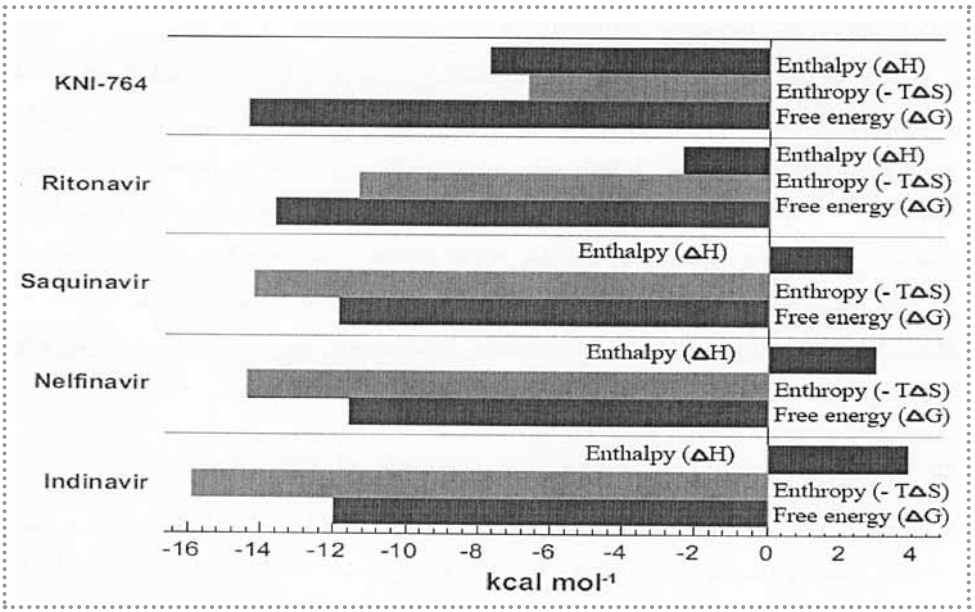
طی مرحله اول، نمونه‌های مورد نظر دارویی بر حسب اختصاصی ترین برهمکنش آنها با مولکول هدف غربالگری می‌شوند. نمونه مورد قبول در این مرحله آن‌هایی هستند که طی تشکیل اختصاصی‌ترین برهم کنش با مولکول هدف بیشترین انرژی پیوندی را داشته باشند. انرژی پیوندی بیشینه یا همان انتالپی بهینه[۹] به وسیله دستگاه‌های گرماسنجی حساس اندازه‌گیری می‌شود.

در مرحله دوم، ساختار بهترین نمونه مورد نظر دارویی مرحله اول را جهت دستیابی به انرژی آزاد بهینه دست‌کاری می‌کنند. به عبارت ساده‌تر، در مرحله دوم سعی می‌شود اثر منفی نظم‌یافتگی حاصل از اتصال دارو با مولکول هدف که همان کاهش انتروپی[۱۰] است، تا حد ممکن تقلیل می‌یابد. آنچه در طراحی دارو باید در نظر گرفته شود، انرژی آزاد برهم کنش دارو و مولکول هدف است. در واقع انرژی آزاد[۱۱] برهم کنش، برایند دو مولفه اِنتالپی و انتروپی است که در فرمول معروف انرژی آزاد[۱۲] نیز دیده می‌شود.

به این ترتیب داروی بهینه که در نهایت معرفی می‌شود، نمونه‌ای است که منفی‌ترین انتالپی (که نشانه اختصاصی بودن اتصال دارو به هدف است) و مثبت‌ترین انتروپی (که نشانه تطابق ساختاری دارو و هدف است) را دارد که اندازه‌گیری انتالپی توسط دستگاه گرماسنجی انجام می‌شود.

داروهای قدیمی عموماً به دلیل انتروپی مثبتی که طی برهم کنش ایجاد می‌نمودند، اثر خود را اعمال می‌کردند. این در حالی است که داروهای نوین به دلیل انتالپی منفی حاصل از بر هم کنش، اثر بخش هستند. مزیت پایین‌تر بودن انتالپی به بالا بودن انتروپی این است که انتالپی منفی بر اختصاصی بودن برهم کنش دلالت دارد. به همین دلیل است که امروزه تأکید داروسازان بر اندازه‌گیری انتالپی توسط دستگاه‌های گرماسنجی نوینی از جمله انتالپی اَری است تا به واسطه آن اختصاصی بودن داروی تازه ساخته شده را تایید کنند.

هم اکنون یک کمپانی داروسازی[۱۳] در ایالات متحده آمریکا با لحاظ کردن این دو مرحله اقدام به تولید مهارکننده‌های سرطان می‌نماید (۸). کمپانی داروسازی دیگری[۱۴] نیز در انگلستان با منطقی مشابه توانست محل اتصال آنزیم جیراز[۱۵] را روی مولکول DNA پیدا نماید (۹).



شکل ۱ ـ نسل‌های مختلف مهارکننده پروتئاز ویروس HIV. انتالپی (ΔH)، انتروپی (-TΔS) و انرژی آزاد (ΔG) برهم کنش این مهارکننده‌ها با آنزیم پروتئاز مذکور نشان داده شده است (۷).

■ معرفی داروی بهینه ایدز[۱۶] با استفاده از گرماسنجی

اطلاعات گرماسنجی نشان می‌دهند که مهارکننده نسل اول[۱۷] توان برقراری اتصال مطلوب و اختصاصی با پروتئاز عامل ایدز را ندارد و به همین دلیل مقدار انتالپی آن عدد مثبتی است و این وضعیت تا نسل سوم[۱۸] ادامه داشت اما ساختار داروهای نسل چهارم و پنجم طوری دستکاری شدند که امکان اتصال اختصاصی‌تر با پروتئاز ویروس فراهم شود. این اتصال به مراتب محکم‌تر خواهد بود و اثر مهارکنندگی آن در کاهش تخریب پروتئاز ویروس نیز به مراتب افزایش خواهد یافت. به این ترتیب طی تکامل نسل‌های داروی ایدز مقدار عددی انتالپی و انتروپی به ترتیب منفی‌تر و مثبت‌تر شده‌اند. در نهایت، با وجود اعمال نفوذ در مقادیر انتالپی و انتروپی، انرژی آزاد نیز به حد مطلوبی رسیده است.

■ روش‌های غربالگری نمونه موردنظر دارویی

در روش‌های متداول غربالگری امروزی از مواد رادیواکتیو و یا فلورسنت جهت نشان‌دار کردن استفاده می‌شود. هزینه بالا و زمان‌بر بودن این نوع غربالگری‌ها از مهمترین عوامل محدودکننده هستند. در فرایند غربالگری نمونه موردنظر دارویی به یک سیگنال قوی و ارزان که برهم کنش

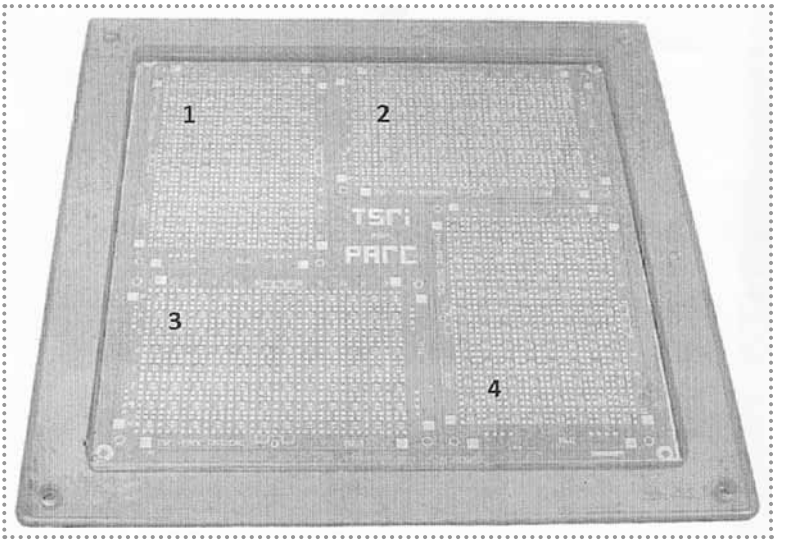
پی در پی ۲۶۵ / ۲۶

نمونه‌ها با مولکول هدف را به صورت درجا[19] نشان دهد نیاز است. انتالپی حاصل از تشکیل پیوند بین نمونه دارویی و مولکول هدف ویژگی‌های چنین سیگنالی را در خود دارد.

با توجه به اطلاعاتی که از انتالپی برهم کنش بین مولکول‌ها وجود دارد، از روی مقدار گرمای مبادله شده می‌توان به نحوه بر هم کنش نمونه مورد قبول دارویی با مولکول هدف پی برد. در روش‌های غربالگری نیازمند به نشانگر، پس از انجام موفقیت‌آمیز غربالگری به تفسیر ترمودینامیک داده‌ها نیاز است. پس از انجام این تفاسیر می‌توان داروها را به لحاظ تأثیرگذاری درجه‌بندی کرد. ویژگی اصلی استفاده از دستگاه‌های گرماسنجی (که نقش مهمی در کاهش زمان غربالگری دارد) این است که نیازی به تفسیر داده‌های حاصل از آن نیست؛ چرا که خود این داده‌ها ترمودینامیک هستند. هم اکنون یک کمپانی داروسازی در آمریکا[20] به منظور کشف داروهای نوین و مؤثرتر از این روش برای غربالگری استفاده می‌کند.

□ افزایش توان غربالگری جهت بررسی نمونه‌های دارویی بیشتر

با وجود پیشرفت دستگاه‌های گرماسنجی، هنوز زمان اندازه‌گیری گرمای مبادله‌شده در برهم کنش‌ها طولانی است و پاسخ‌گوی نیاز روزافزون صنعت داروسازی نیست. در تلاش‌هایی که جهت افزایش برون‌ده دستگاه و اندازه‌گیری تعداد بیشتر



شکل ۲ـ یک دستگاه انتالپی اری با چهار آرایه نشان داده شده است. هر آرایه از دستگاه به طور معمول از ۹۶ تا مربع که خودش از هفت حسگر تشکیل گردیده، ساخته می‌شود. مساحت کل یک دستگاه چهار آرایه‌ای کمی کوچک‌تر از یک اسکناس یک دلاری است.

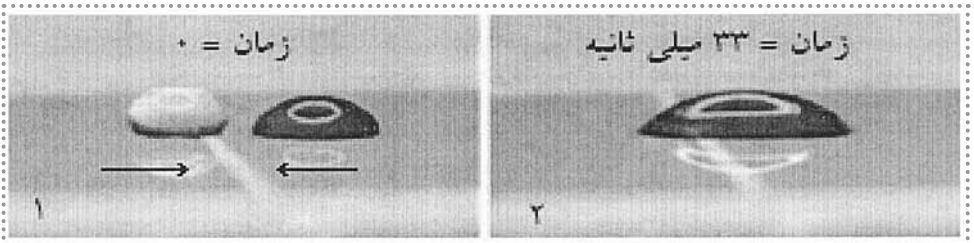
نمونه انجام شد، از صفحات حرارتی (ترموفلور) استفاده گردید (۱۰). این صفحات معمولاً ۳۸۴ چاهک دارند که هر چاهک حسگر[۲۱] گرمایی مخصوص به خود را دارد. به این ترتیب در عمل ۳۸۴ گرماسنج مینیاتوری داریم که با آن می‌توان در یک دمای معین تعداد زیادی نمونه دارویی را علیه یک مولکول هدف غربالگری کرد.

هر چند فناوری ترموفلور باعث کاهش زمان غربالگری شده ولی هنوز با دو محدودیت همراه است. اول این‌که دقت گرمای محاسبه شده با این روش به اندازه گرماسنجی‌های معمولی نیست و دوم این‌که به دلیل وجود احتمال نشت گرمای چاهک‌ها، کاربرد این فناوری با محدودیت ساخت مواجه است. با ایجاد یک فناوری جدیدتر در سال ۲۰۰۴ که همان انتالپی اری می‌باشد، کمبودهای فناوری ترموفلور تا حد زیادی مرتفع شد.

■ ساز و کار فناوری انتالپی اری

هر کدام از آرایه‌ها یک نانوگرماسنج است که بدون نیاز به استفاده از نشانگر[۲۲] امکان بررسی برهم کنش‌های بین مولکولی را با کمترین مقدار نمونه و در کوتاه‌ترین زمان ممکن، میسر می‌سازد. طرز کار هر کدام از این آرایه‌ها شبیه گرماسنج هم دما[۲۳] معمولی است ولی نسبت به آن به مقدار بسیار کمتری از نمونه (حدود ۲۵۰ نانولیتر که معادل یک قطره بسیار کوچک است) نیاز دارد و کل عملیات گرماسنجی را در عرض ۳۰ ثانیه انجام می‌دهد، در حالی‌که این کار در مورد گرماسنج هم دما معمولی حدود ۱۵ الی ۳۰ دقیقه طول می‌کشد.

به وسیله این فناوری مثلاً می‌توان به طور همزمان قدرت مهارکنندگی ۹۶ مهارکننده (با ساختار و ویژگی‌های متفاوت) پروتئاز ویروس ایدز



شکل ۳ ـ فرض کنید قطره تیره‌رنگ پروتئاز ویروس ایدز و قطره روشن مهارکننده آن باشد. دو قطره نمونه (دارو و مولکول هدف) توسط ربات در وسط هر کدام از مربع‌ها قرار داده می‌شوند. همان‌طور که دیده می‌شود، پیکان‌ها جهت جریان الکتریکی را نشان می‌دهند که دو قطره را به سمت هم هدایت می‌کند. طی ۳۳ میلی‌ثانیه این دو قطره مخلوط می‌گردند و گرمای آزاد شده از آن‌ها به صورت اختلاف پتانسیل ترجمه شده و توسط حسگر زیر قطره‌ها (خطی که در قسمت دوم شکل در وسط مربع قرار گرفته است و بر قطره‌ها عمود است) به رایانه گزارش می‌شود.

را در زمان کمتر از چند دقیقه تنها توسط یکی از چهار آرایه این دستگاه مقایسه کرد. به همین ترتیب می‌توان با آرایه‌ای دیگر در همان زمان، فعالیت ۹۶ آنزیم را بررسی کرد و به همین منوال با دو آرایه دیگر نیز به ترتیب برهم کنش آنتی‌ژن ـ آنتی‌بادی و آنتی‌بیوتیک با محل اثرش را بررسی نمود. در حالت عادی انجام این چهار فرایند حدود ۱۲۰۰ برابر بیشتر طول می‌کشد!

■ نتیجه‌گیری

معضل بزرگی که ورود این فناوری را به بازار تجاری با کندی مواجه ساخته، واقعی نبودن مقدار انتالپی محاسبه شده بر هم کنش‌ها در مقایسه با گرماسنجی همدمای معمولی است. به عبارت دیگر گرچه در این فناوری مقایسه اندازه‌گیری گرما از میکرو به نانو ارتقا یافته است، گرمای اندازه‌گیری شده بر اساس دستوری که به آن داده می‌شود محاسبه می‌گردد (ΔH وانت هوف)، در این دستور تمام معیارهای دخیل در محاسبه انتالپی برهم کنش‌ها لحاظ نمی‌شود (۱۱).

هم‌اکنون شرکت PARC پروژه‌هایی در جهت نزدیک‌تر نمودن مقادیر محاسبه شده به واقعیت را در دست اجرا دارد. همزمان با این فرایند، استفاده از مواد مقاوم و ارزان در ساخت آرایه‌ها در دستور کار قرار گرفته است تا هزینه نهایی نمونه‌های تجاری را تا حد ممکن کاهش دهد. هر چند تاکنون موارد ساخته شده به دلیل محدودیت بازار تقاضای این فناوری بیشتر جنبه سفارشی داشته‌اند ولی با شناخته‌شدن کاربردهای متنوع این دستگاه در حوزه‌های مختلف علوم زیستی، پزشکی و دارویی مسیر تجاری‌سازی این محصول هموارتر گشته است. این روند به گونه‌ای است که در گزارش اخیر شرکت PARC، ورود تجاری این‌گونه فناوری‌ها در آینده‌ای نزدیک نوید داده شده است (۲،۷).

زیرنویس‌ها

1. Chip microcalorimetry

۲. Microcalorimetry این دستگاه‌ها به طور عمده شامل دو نوع Differential scanning calorimetry (DSC) و Isothermal titration calorimetry (ITC) هستند.

۳. Microarray روشی است که در آن امکان بررسی همزمان نرخ بیان ژن‌های مختلف وجود دارد.

۴. آرایه معادل لغوی array است. زمانی که چندین ساختار مینیاتوری طوری کنار هم آرایش می‌یابند که امکان بررسی جامع و همزمان را فراهم آورند، واژه آرایه (array) به آن اطلاق می‌گردد.

۵. انتالپی گرمایی است که طی برهم کنش آزاد و یا از محیط گرفته می‌شود. انتالپی توسط دستگاه گرماسنجی ردیابی و اندازه‌گیری می‌شود. دستگاه enthalpy array، به طور همزمان انتالپی چندین برهم کنش را اندازه‌گیری و ثبت می‌نماید.

6. Palo Alto Research Center

این شرکت تحقیقاتی زیرمجموعه‌ای از شرکت Xerox است که از سال ۲۰۰۲ میلادی به طور مستقل در نزدیکی شهر سانفرانسیسکو در ایالات متحده آمریکا فعالیت می‌نماید. تمرکز تحقیقاتی این شرکت بر روی مهندسی زیستی (bioenginnering)، فناوری اطلاعات و مطالعات زیست پزشکی است تا سال ۲۰۰۹ سه پروژه این شرکت به طور جدی عملیاتی شده‌اند. این پروژه‌ها عبارتند از: غربالگری و تشخیص انواع سرطان با استفاده از نمونه خون افراد مورد آزمایش، استفاده از دستگاه‌های enthalpy array جهت تشخیص انواع بر هم کنش‌های مولکولی و طراحی الگوریتم‌های نوین جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات حاصل از طیف‌سنجی جرمی.

7. assay

8. Drug discovery

9. (ΔH)

زیرنویس‌ها (ادامه)

10. (ΔS)
11. (ΔG)
12. ΔG=ΔH-TΔS
13. Glaxo Welcome
14. Astra zeneca
15. DNA-gyrase
16. AIDS
17. indinavir
18. saquinavir
19. Real time

۲۰. Althexis Company در ۱۹۹۸ در Waltham در ایالات متحده تأسیس شده است.

21. sensor
22. probe

۲۳. Isothermal titration calorimetry (ITC) در این دستگاه ابتدا نمونه و ماده مورد بررسی همدما می‌شود. زمانی که بر هم کنش رخ می‌دهد، این دستگاه تغییر دما را به عنوان معیاری از تغییر انتالپی گزارش می‌دهد.

منابع

1. Ackers GK. Bolen DW. The Gibbs conference on biothermodynamics: origins and evolution. Biophysical Chem 1997; 64: 3–5.

2. Naiman J. Where physics and biology meet. Materials Today 2005; 8 (12): 52-56.

3.Torres FE. Kuhn P. De Bruyker D. Enthalpy arrays. Proceed National Acad Sci 2004; 101(26): 9517–9522.

4. Ahmad LM. Towe B. Wolf A. Binding event measurement using a chip calorimeter coupled to magnetic beads. Sensors and Actuators B 2010; 145: 239–245.

5. Recht MI. Torres FE, De Bruyker D. Measurement of enzyme kinetics and inhibitor constants using enthalpy arrays. Anal Biochem 2009; 388(2): 204–212.

6. Freire E. A new era for microcalorimetry in drug development. Eur Pharm Rev 2007; 5: 73-78.

7. Muzammil S. Armstrong A. Kang LW. Unique Thermodynamic Response of Tipranavir to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Drug Resistance Mutations. J Virol 2007; 81(10): 5144–5154.

8. Charifson PS. Shewchuk LM. Rocque W. Peptide Ligands of pp60c-src SH2 Domains: A Thermodynamic and Structural Study. Biochem 1997; 36: 6283–6293.

9. Holdgate GA. Tunnicliffe A. Walter HJ. The entropic penalty of ordered water accounts for weaker binding of the antibiotic novobiocin to a resistant mutant of DNA gyrase: a thermodynamic and crystallographic study. Biochem 1997; 36: 9663-9673.

10. Pantoliano MW. Petrella EC. D Kwasnoski J. Miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. J Biomol Screen 2001; 6(6): 429–440.

11. Lee W. Fon W. W Axelrod B. High-sensitivity microfluidic calorimeters for biological and chemical applications. Proceed National Acad Sci 2009; 106 (36): 15225–15230.