RNA based antisense drugs: different types, molecular mechanisms and clinical trials

N. Bakhtiari* G. Saadatnia**

*Assistant Professor of Biochemistry, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST)
**Assistant Professor of Molecular Biology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST)

Abstract

A few decades ago, drugs which were used to treat different diseases were only limited to chemical drugs, peptides, monoclonal antibodies and recombinant proteins. Since the first nucleotide drug was approved by the Food and Drug Organization of the United States, this new generation of medications became remarkable to researchers and pharmacists. Ribonucleic acid (RNA) based drugs were among these category that encountered a number of hurdles along the way such as potential immunogenicity, structural instability and the need for a vehicle to deliver the drug into the cell. With regards to the simplicity of the RNA therapeutics design, researchers could overcome the challenges with improvements in synthetic delivery carriers and chemical modifications of the RNA therapeutics. Numerous types of RNA-based drugs are being extensively tested in various stages of clinical trials. This review focuses on therapeutic ribozymes, antisense oligonucleotides, interfering RNAs and aptamers.

Keywords: RNA Interference, Antisense Oligonucleotides, Drug Design

Corresponding Address: Nahid Bakhtiari, Research Institute for Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Sh. Ehsani Rad St., Enqelab St., Parsa Sq., Ahmadabad Mostoufi Rd, Azadegan Highway, Tehran, Iran
Email: nbakhtiari@irost.ir
Tel: +98-912-2812960
Received: 16 Nov 2013
Accepted: 1 Mar 2014

داروهای آنتی‌سنس با پایه RNA: انواع، مکانیسم عمل و کارآزمایی‌های بالینی

دکتر ناهید بختیاری* دکتر گیتا سعادت‌نیا**

* استادیار بیوشیمی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران
** استادیار بیولوژی مولکولی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

آدرس نویسنده مسؤول: تهران، بزرگراه آزادگان، مسیر شمال به جنوب، احمدآباد مستوفی، بعد از میدان پارسا، انتهای خیابان انقلاب، خیابان شهید احسانی‌راد، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری، تلفن۰۹۱۲۲۸۱۲۹۶۰
Email: nbakhtiari@irost.ir

تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۰

چکیده

تا حدود چند دهه پیش، بازار داروهای مورد استفاده برای درمان بیماری‌های مختلف تنها به داروهای شیمیایی، پپتیدها، آنتی‌بادی‌های منوکلونال و پروتئین‌های نوترکیب محدود می‌شد. اما با تأیید اولین داروی دارای ساختار نوکلئوتیدی توسط سازمان غذا و داروی آمریکا، این نسل جدید از داروها نیز مورد توجه محققان و داروسازان قرار گرفتند. اسیدهای ریبونوکلوئیکی از جمله این داروها بودند که مسیر ساخت کاملاً هموواری نداشتند و با مشکلاتی از قبیل ایمونوژن بودن ذاتی، ناپایداری ساختاری و نیاز به یک واسطه جهت انتقال دارو به سلول رو به رو بودند. اما با توجه به سادگی طراحی و ساخت این نوع داروها محققان توانستند با اعمال تغییرات شیمیایی در ساختار آن‌ها و استفاده از حامل‌های مختلف بر این مسایل فایق آیند. هم اکنون دسته‌های گوناگونی از داروهای دارای پایه اسید ریبونوکلوئیک در حال گذراندن مراحل مختلف آزمایش‌های بالینی هستند از جمله ریبوزیم‌های دارویی، عوامل تداخل RNAیی، اولیگونوکلئوتیدهای آنتی‌سنس و آپتامرها که در این مقاله مورد بحث قرار می‌گیرند.

کلیدواژه‌ها: تداخل RNAیی، اولیگونوکلئوتیدهای آنتی‌سنس، طراحی دارو

مقدمه:

پیش از سال ۱۹۸۰ میلادی، به RNA تنها به عنوان واسطه انتقال اطلاعات ژنتیکی از DNA به پروتئین نگاه می‌شد. اما با کشف خاصیت آنزیمی RNA در اوایل سال ۱۹۸۰ و تداخل RNA در اواخر ۱۹۹۰، این نگرش تغییر کرد.[۱-۳] امروزه هر جا به کاهش بیان پروتئین از روی ژن یا ژن‌های خاصی نیاز باشد (به ویژه زمانی که متوقف کردن کامل ژن از لحاظ فیزیولوژیک مطلوب نباشد) مهم‌ترین ابزار موجود و مورد استفاده محققان، RNAی آنتی‌سنس است.[۴-۶] این نتایج همراه با سایر تحقیق‌هایی که افزایش بیان ژن‌های خاص در برخی بیماری‌ها را نشان داده‌اند، در نهایت به ایجاد تفکر استفاده از RNA به عنوان دارو در درمان بیماری‌هایی همچون ناهنجاری‌های ژنتیکی، عفونت‌های ویروسی و انواع سرطان منجر شد.[۷] نسبت به داروهای شیمیایی، پپتیدها، پروتئین‌های نوترکیب و آنتی‌بادی‌های منوکلونال که همگی به پروتئین هدف متصل می‌شوند، داروهای آنتی‌سنس پس از کشف، مسیرکوتاهی را تا رسیدن به درمان طی می‌کنند. در واقع زمانی که کاربرد درمانی و ژن هدف شناسایی شد، تنها با صرف چند ساعت می‌توان الیگونوکلئوتید مهارکننده ژن را طراحی کرد که در واقع ماده مؤثره دارو است و می‌تواند در انجام تحقیق‌ها و مطالعه‌های بالینی استفاده شود. این امر در مقایسه با طراحی داروهای شیمیایی که ممکن است سال‌ها به طول بیانجامد، مزیت بسیار بزرگی محسوب می‌شود. امتیاز مهم دیگری که در مورد داروهای آنتی‌سنس وجود دارد، یکسان بودن روش‌های ساخت، فرمولاسیون و انتقال داروست. تمام این دلایل سبب شده است که این نوع داروها مورد توجه داروسازان قرارگیرند.[۸] انواع این داروها براساس مکانیسم عمل خود عبارتند از: RNAهای کاتالیتیک (ریبوزیم‌ها)، عوامل تداخل RNAیی، RNAی

آنتی‌سنس و آپتامرها.[۹]

البته مسیر رسیدن استفاده از RNA به عنوان دارو از مرحله تفکر تا عمل، همانند ایده‌های اولیه دیگر، راهی آسان نبوده و فراز و نشیب‌های بسیاری را پیموده است. ناپایداری ذاتی مولکول‌های RNA، عدم انتقال خود به خودی به سلول و ایمونوژن بودن آن از جمله این ناهمواری‌هاست. اما تلاش برای یافتن راه حل این مسایل، در نهایت به ایجاد تغییرات شیمیایی بر روی ساختار مولکول RNA و استفاده از حامل‌های مختلف برای انتقال آن انجامیده است.[۱۰] به طوری که تعدادی از این داروها، توانسته‌اند طی مدت زمان کوتاهی تأییدیه سازمان غذا و داروی آمریکا را کسب کنند و بیش از ۵۰ داروی دیگر در حال گذراندن مراحل مختلف مطالعه‌های بالینی هستند.[۱۱]

در این مقاله انواع داروهای آنتی‌سنس دارای پایه RNA مورد بحث قرار می‌گیرند.

RNAهای کاتالیتیک (ریبوزیم‌ها)

این دسته از RNAها خاصیت آنزیمی دارند و پیش ماده آن‌ها نیز مولکول RNA است. ریبوزیم‌ها به صورت طبیعی در بدن وجود دارند و بسیاری از آن‌ها فعالیت آنزیمی شکاف و اتصال را بر روی خودشان انجام می‌دهند. با مهندسی واحد ساختاری شناسایی‌کننده پیش ماده در ریبوزیم‌ها، می‌توان به مولکول‌هایی دست یافت که به صورت هدف‌دار، بر روی همان مولکول یا مولکول RNAی دیگر، عمل شکست و بست را انجام دهند.[۱۲] به علاوه، با استفاده از روش‌های انتخابی در شرایط آزمایشگاهی، ریبوزیم‌هایی ساخته شده‌اند که بر روی سوبسترای غیر RNAیی فعالیت بیوشیمیایی دارند.[۱۳] همچنین ریبوزیم‌ها می‌توانند طوری مهندسی شوند که مانند آنزیم‌های آلوستریک تحت تأثیر تنظیم کننده‌های ویژه فعال شوند و این امر به استفاده از آن‌ها به صورت حس‌گرها و ابزارهای زیستی دیگر منجر می‌شود.[۱۴]

ریبوزیم‌ها به دو دسته اصلی تقسیم می‌شوند: یکی ریبوزیم‌های سرچکشی که از حدود ۳۰ نوکلئوتید تشکیل شده‌اند و سادگی ساختار آن‌ها سبب شده است تا به عنوان ریبوزیم‌های عمل‌کننده به صورت ترانس (بر روی مولکول RNAی دیگر) مورد توجه باشند. دوم ریبوزیم‌های سنجاق سری یا گیره کاغذی که علاوه بر واکنش شکاف، واکنش اتصال را نیز انجام می‌دهند و اغلب برای واکنش‌های شکست استفاده می‌شوند.[۱۵] هر دوی این ریبوزیم‌ها برای تنظیم منفی اهداف خاص سلولی یا ویروسی کاربردهای درمانی زیادی دارند.[۱۶-۱۸]

تاکنون هیچ داروی ریبوزیمی توسط سازمان غذا و داروی جهانی مجوز ورود به بازار نگرفته است، ولی داروهای مختلفی از این دسته در حال گذراندن مراحل مختلف مطالعه‌های بالینی هستند. به عنوان مثال، آنژیوزیم یک بازدارنده رگ‌زایی است که برای از بین بردن غده‌های سرطانی کلیه به کار می رود و توسط شرکت sirna therapeutics طراحی و ساخته شده و مرحله دوم مطالعه‌های بالینی را به اتمام رسانده است.[۱۹] داروی دیگر به نام هپاتوزیم از همین شرکت داروسازی بر علیه ویروس هپاتیت سی است که به علت کاهش دید در نمونه حیوانی وارد مرحله سوم مطالعه‌های بالینی نشد[۲۰] (جدول شماره ۱).

جدول ۱- انواع داروهای ریبوزیمی در آزمایش‌های بالینی

نام دارو	ژن مورد هدف دارو	بیماری	مرحله آزمایش‌های بالینی	وضعیت	شرکت سازنده
آنژیوزیم	VEGFR-1	سرطان کلیه	مرحله دوم	تکمیل شده	مرک- سیرنا
هپتازیم	HCV IRES	هپاتیت سی	مرحله دوم	متوقف شده	مرک- سیرنا
MY-2	HIV U5 و pol	ایدز	مرحله اول	تکمیل شده	یو اس دی اس
RRz1	HIV Tat و Vpr	ایدز	مرحله اول	تکمیل شده	جانسون و جانسون، بیمارستان وینسنت
OZ1	HIV Tat و Vpr	ایدز	مرحله دوم	در حال پیشرفت	جانسن- سیلاگ، یو سی ال ای
CCR5 ریبوزیم	CCR5	ایدز	مرحله صفر	در حال پیشرفت	سیتی اف هوپ، بنیتک
TR-L/ تاتئو	HIV Tat و Rev	ایدز	مرحله دوم	تکمیل شده	ریبوزیم، سیتی اف هوپ

عوامل تداخل RNAیی

فرآیند تداخل RNAیی نوعی تنظیم پس از رونوشت‌برداری ژن است. در این فرآیند قطعه‌های کوچک RNAی دو رشته‌ای (RNAی کوچک مداخله‌گر یا siRNA و RNAی سنجاق‌سری کوتاه یا shRNA)، mRNAی هدف را در قسمتی که با توالی آن مکمل هستند، تخریب می‌کنند.[۲۱] این قطعه‌های کوتاه حاصل عملکرد آنزیمی به نام دایسر (Dicer) هستند. اعضای خانواده این آنزیم، چند دُمین دارند: دُمین RNase، دُمین PAZ، دُمین متصل شونده به RNAی دو رشته‌ای، دُمین هلیکاز و یک دُمین با عملکرد نامشخص. قطعه‌های حاصل از عملکرد دایسر در ساختار چند زیرواحدی پروتئینی به نام خاموش‌کننده ژن با القای RNA (RNA inducing silencing complex: RISC) وارد می شوند. سپس قطعه RNAی دو رشته‌ای از هم باز می‌شود و رشته آنتی‌سنس را ترک می‌کند. به دنبال آن، این رشته که رشته هادی نامیده می‌شود به ناحیه مکمل خود بر روی mRNAی هدف متصل می‌شود و به این ترتیب ساختار چند زیرواحدی RISC را به روی mRNAی هدف هدایت می‌کند تا عمل اندونوکلئازی را بر روی آن انجام دهد.[۲۲] اما siRNAها در پستانداران مشاهده نمی‌شوند و به جای آن‌ها میکرو RNAها وجود دارند که خود از شکسته شدن مولکول‌های دیگری به نام پیش‌میکرو RNA (pri- miRNA) به وسیله آنزیم RNaseIII یا Drosha در هسته به وجود می‌آیند. پس از این کار، ساختار سنجاق‌سری به سیتوپلاسم راه پیدا می‌کند. در نهایت میکرو RNAی دو رشته‌ای بالغ در نتیجه عملکرد دایسر حاصل می‌شود.

برخلاف siRNAها، مولکول‌های miRNA به طور کامل مکمل mRNAی هدف نیستند و تنها سبب مهار ترجمه mRNA به پروتئین می‌شوند. اما miRNAهای دارای توالی کاملا مکمل با mRNAی هدف می‌توانند سبب القای تجزیه آن شوند. مولکول‌های mRNA در اجسامی به نام پروسسینگ بادی‌ها (P- bodies/GW bodies/DCP bodies) دچار تخریب می‌گردند.[۲۲] نکته مهم این است که رشته siRNAی هادی تا زمانی که در ساختار چند زیر واحدی RISC محافظت می‌شود، می‌تواند به طور مکرر برای تجزیه و تخریب mRNAی هدف به کار رود. این ویژگی‌ها سبب شده است تا siRNAها به عنوان ابزاری برای اهداف درمانی مورد توجه قرار گیرند.[۲۳]

خاموش کردن ژن پس از رونوشت‌برداری به دو روش انجام می‌شود: یا مولکول‌های siRNA به طور مستقیم به شکل RNAی دو رشته‌ای وارد سلول می‌شوند یا مولکول‌های shRNA پس از ورود به سلول، رونوشت‌برداری و به صورت مولکول‌های siRNA پردازش می‌شوند. اغلب siRNAهایی که حدود ۱۹ تا ۲۳ جفت باز و یک بخش تک رشته‌ای دو نوکلئوتیدی در انتهای '۳ دارند، به این منظور استفاده می‌شوند. هر چند این نوع طراحی متقارن این امکان را فراهم می‌آورد که هر کدام از رشته‌های siRNA (رشته هادی یا مسافر)، قابلیت انتخاب توسط ساختار چند زیرواحدی RISC را داشته باشند. برای اجتناب از این موضوع، می‌توان RNAی دو رشته‌ای را طوری طراحی کرد که قسمت تک رشته‌ای تنها در یک انتهای '۳ قرار گیرد و سر دیگر آن صاف باشد.[۲۴] به این ترتیب، siRNAی حاصل دارای دو نوکلئوتید بیش‌تر در رشته هادی نسبت به رشته مسافر خواهد بود و قابلیت عملکرد آن افزایش می‌یابد و اثرات حاصل از هدف گذاری اشتباه کاهش پیدا می‌کند.[۲۵]

برخلاف siRNAها که عملکردشان موقتی و پس از هر بار تیمار با دارو امکان‌پذیر است، عملکرد shRNAها تحت پروموتر خاصی در یک وکتور بیان می‌شود و تأثیر آن طولانی مدت است. اما این امر به علت رقابتی که بین shRNAها با miRNAهای طبیعی داخل سلول برای استفاده از ماشین دایسر–RISC به وجود می‌آید، ممکن است سبب مسمومیت‌های شدید شود[۲۶و۲۷] برای جلوگیری از این موضوع، shRNAهای مختلف می‌توانند به صورت یک رونوشت چند سیسترونی از پروموتر RNA

پلیمراز ۲ بیان شوند یا همراه با سایر درمان‌های غیر RNAi مانند ریبوزیم‌ها استفاده شوند.[۲۸و۲۹]

تاکنون حدود ۲۲ داروی siRNA یا shRNAی مختلف برای درمان حداقل ۱۶ بیماری به مرحله آزمایش بالینی رسیده‌اند (جدول شماره ۲).[۳۰]

اولیگونوکلئوتیدهای آنتی‌سنس

این دسته از داروها، با داشتن ویژگی نسبت به توالی خاصی بر روی mRNAی مورد نظر، از بیان آن به پروتئین جلوگیری می‌کنند و این کار را با تغییر دادن فرآیند شکست و بست mRNA یا جلوگیری از ترجمه آن انجام می‌دهند. مکانیسم مورد استفاده دیگر توسط این نوع داروها، القای تخریب mRNAی هدف توسط آنزیم RNase H است. با توجه به این که ماهیت اندرکنش اتصال RNA با هدف خود مشخص است، طراحی اولیگونوکلئوتید آنتی‌سنس تسهیل می‌شود. اما با توجه به ساختارهای پیچیده و متغیر دوم و سوم RNA و اشغال شدن بخش‌هایی از این ساختار با پروتئین‌ها، تمام قسمت‌های آن در دسترس داروی اولیگونوکلئوتیدی نخواهد بود.[۳۱] با این که پیشرفت‌های اخیر در پیش‌بینی محل‌های اتصال اولیگونوکلئوتید بر روی RNAی هدف، شانس طراحی اولیگونوکلئوتید فعال و مناسب را افزایش داده است، اما هنوز کافی نیست. بنابراین جستجو برای پیدا کردن اولیگونوکلئوتید آنتی سنس فعال در محیط کشت، اجتناب‌ناپذیر است.[۳۲-۳۴] خوشبختانه امروزه دسترسی به دستگاه‌های سازنده اولیگونوکلئوتید، روش‌های کارآمد سنجش RNA و جابه‌جایی رباتیک نمونه، این غربال‌گری‌ها را آسان‌تر کرده است (جدول شماره ۳).[۳۵]

جدول ۲- عوامل تداخل RNAیی در آزمایش‌های بالینی

نام دارو	ژن مورد هدف دارو	بیماری	مرحله آزمایش‌های بالینی	وضعیت	شرکت سازنده
SPC3649 (LNA)	miR-122	هپاتیت سی	مرحله دوم	در حال پیشرفت	سانتاریس
Bevasiranib	VEGF	ادم چشمی مرتبط به سن و ادم چشمی مرتبط با دیابت	مرحله سوم	متوقف شده	اپکو هلث
AGN-745	VEGF-R1	ادم چشمی مرتبط به سن	مرحله دوم	متوقف شده	آلرگان/ سیرنا
PF-655	RTP801	ادم چشمی مرتبط به سن و ادم چشمی مرتبط با دیابت	مرحله دوم	تکمیل شده	کوآرک/ پی فایزر
QPI-1007	Caspase 2	نوروپاتی ایسکمیک قدامی چشم	مرحله اول	در حال پیشرفت	کوآرک فارما
TD101	KRT6A(N171K)	پاکیونیچیا کانجنیتا	مرحله اول	تکمیل شده	ترانس درم/آی‌پی‌سی‌سی
SYL040012	ADRB2	فشار بالای داخل چشمی	مرحله دوم	در حال پیشرفت	سیلنتیس
SYL1001	TRPV1	سندرم چشم خشک	مرحله اول	در حال پیشرفت	سیلنتیس
ExellairTM	Syk کیناز	آسم	مرحله دوم	در حال پیشرفت	زابکور
ALN-RSV01	RSV نوکلئو کپسید	عفونت سنسیشیال تنفسی	مرحله دوم	در حال پیشرفت	آلنیلام/ کوبیست
CEQ508	بتا کاتنین	پولیپ‌های ارثی در روده بزرگ یا سرطان کولون	مرحله اول	در حال پیشرفت	مارینا بیوتک
siG12D LODER	KRASG12D	آدنوکارسینومای مجرای لوزالمعده	مرحله اول	در حال پیشرفت	سایلنسید
TKM-ApoB	Apo B	هایپرکلسترولمیا	مرحله اول	متوقف شده	تکمیرا
TKM-PLK1	PLK1	غده‌های سرطانی جامد	مرحله اول	در حال پیشرفت	تکمیرا
ALN- VSP02	KSP و VEGF	غده‌های سرطانی جامد	مرحله اول	تکمیل شده	آلنیلام/ تکمیرا
ALN-TTR01	TTR	آمیلوئیدوز وابسته به تی‌تی‌آر	مرحله اول	در حال پیشرفت	آلنیلام
Bcr-Ab1 siRNA	Bcr-Ab1	لوسمی مزمن گرانولوسیتی	مرحله اول	تکمیل شده	یونیورسیتی دو ایس برگ
Atu027	PKN3	سرطان جامد پیشرفته	مرحله اول	در حال پیشرفت	سایلنس تراپوتیکز
I5NP	P53	صدمه حاد کلیه و تأخیر عملکرد پس از پیوند	مرحله دوم	در حال پیشرفت	کوآرک فارما
CALAA-01	RRM2	غده‌های سرطانی جامد	مرحله اول	در حال پیشرفت	کالاندو فارما
FANG vaccine	فورین و GM- CSF	غده‌های سرطانی جامد	مرحله دوم	در حال پیشرفت	گرادالیس
iPsiRNA	LMP2,LMP7, MECL1	ملانومای متاستاتیک	مرحله اول	در حال پیشرفت	دوک یونیورسیتی
Tat/Rev shRNA	HIV Tat و Rev	ایدز	مرحله صفر	در حال پیشرفت	سیتی اف هوپ/ بنیتک

جدول ۳- اولیگونوکلئوتیدهای آنتی‌سنس در آزمایش‌های بالینی

نام دارو	ژن مورد هدف دارو	بیماری	مرحله آزمایش‌های بالینی	وضعیت	شرکت سازنده
فومی ویرسن (ویتراون)	IE2	عفونت چشمی مربوط به سیتومگالو ویروس	تأیید شده توسط سازمان غذا و داروی آمریکا	در بازار	ISIS فارما
میپومرسن	ApoB-100	هایپرکلسترولمیای فامیلی	تأیید شده توسط سازمان غذا و داروی آمریکا	در بازار	ISIS فارما/ ژنزیم
$APOCIII_{RX}$	ApoCIII	هایپرتری‌گلیسریدمیا	مرحله دوم	در حال پیشرفت	ISIS فارما
$ISIS\text{-}CRP_{RX}$	crp	بیماری عروق کرونر	مرحله دوم	در حال پیشرفت	ISIS فارما
$ISIS\text{-}FXI_{RX}$	F11	بیماری‌های انعقاد خون	مرحله دوم	در حال پیشرفت	ISIS فارما
$ISIS\text{-}APOA_{RX}$	Apo(a)	بیماری‌های قلبی	مرحله اول	در حال پیشرفت	ISIS فارما
آلیکافورسن	ICAM-1	بیماری التهابی روده	مرحله دوم	متوقف شده	ISISفارما/ آتلانتیک
$ISIS\text{- }TTR_{RX}$	TTR	آمیلوئیدوز وابسته به ترانس تی رتین	مرحله سوم	در حال پیشرفت	گلاکسواسمیت کلین
$ISIS\text{-}SMN_{RX}$	SMN2	آتروفی عضلانی- نخاعی	مرحله دوم	در حال پیشرفت	بیوژن ایدک
$ISIS\text{-}ApoCIII_{RX}$	ApoCIII	هایپرتریگلیسمیا	مرحله دوم	در حال پیشرفت	ISISفارما
ATL-1103	GHr	آکرومگالی	مرحله دوم	در حال پیشرفت	ATL
$ISIS_GCGR_{RX}$	GCGR	دیابت	مرحله دوم	در حال پیشرفت	ISISفارما
کاستیرسن	Clusterin	سرطان پروستات	مرحله سوم	در حال پیشرفت	توا/ انکوژنکس
$ISIS_ELF4E_{RX}$	elf-4E	سرطان‌های مختلف	مرحله دوم	در حال پیشرفت	ISISفارما
OGX-427	HSP27	سرطان‌های مختلف	مرحله دوم	در حال پیشرفت	انکوژنکس
$ISIS\text{-}STAT3_{RX}$	STATt3	سرطان‌های مختلف	مرحله دوم	در حال پیشرفت	آسترازنکا
ATL1102	VLA4	مولتیپل اسکلروزیس	مرحله دوم	در حال پیشرفت	ATL
EXC001	CTGF	فیبروز موضعی	مرحله دوم	در حال پیشرفت	پی فایزر
iCo-007	C-raf kinse	بیماری چشمی	مرحله دوم	در حال پیشرفت	آیکو
پلازومایسین	آمینوگلیکوزید	عفونت‌های باکتریایی شدید	مرحله دوم	در حال پیشرفت	آکوژن

آپتامرها

این دسته از داروها، اسیدهای نوکلوئیک تک رشته‌ای هستند که به علت ساختار سه بُعدی خود به صورت انتخابی به قسمت ویژه‌ای از مولکول هدف خود متصل می‌شوند. مولکول‌های هدف این دسته از داروها برخلاف دسته‌های قبل از جنس پروتئین است و این داروها علاوه بر RNA می‌توانند از جنس DNA باشند.[۳۶] آپتامرهای مناسب برای هدف مورد نظر، با فرآیندی که تحت عنوان تکامل سیستماتیک لیگاندها با غنی‌سازی نمایی (SELEX) شناخته می‌شود، از بین توالی‌های خیلی زیاد (تا حدود 10^{15} توالی) موجود در کتابخانه انتخاب می‌شوند.[۳۷] طول این لیگاندها به طور معمول ۲۰ تا ۱۰۰ نوکلئوتید است.[۳۸] همانند سایر داروهای RNAیی، ساختار آپتامرها نیز با ایجاد تغییرات شیمیایی نسبت به نوکلئازها مقاومت بیش‌تری می‌یابد و ویژگی‌های دارویی آن‌ها بهینه‌سازی می‌شود.[۳۶]

در مقایسه با آنتی‌بادی‌ها، ساخت این نوع داروها از نظر تکرارپذیری و اقتصادی برای استفاده‌های درمانی مقرون به صرفه‌تر است. به علاوه با ایجاد تغییرات شیمیایی، نسبت به آنتی‌بادی‌ها، سیستم ایمنی بدن را خیلی کم‌تر تحریک می‌کنند. به علت اندازه کوچک، انتقال آن‌ها به سلول آسان‌تر است و در صورت نیاز به مهندسی و دست‌ورزی برای استفاده در حوزه‌ای خاص، مانند اتصال به ریبوزیم‌ها و شیمرهای آپتامر-siRNA، قابلیت بالاتری نسبت به آنتی‌بادی‌ها دارند.[۳۷]

تاکنون حداقل ۱۰ داروی آپتامر RNAیی در حال گذراندن مراحل مختلف مطالعه‌های بالینی هستند و یکی از آن‌ها نیز وارد بازار شده است (جدول شماره ۴).

جدول ٤- آپتامرهای RNAیی در آزمایش‌های بالینی

نام دارو	ژن مورد هدف دارو	بیماری	مرحله آزمایش‌های بالینی	وضعیت	شرکت سازنده
پگپتانیب سدیم (ماکوژن)	VEGF	ادم چشمی مرتبط به سن	تأیید شده توسط سازمان غذا و داروی آمریکا	در بازار	آپتک/ پی فایزر
ARC19499(BAX499)	TFPI	هموفیلی	مرحله دوم	هنوز آغاز نشده	آرکمیکس
REGI(RB006 & RB007)	FactorIXa	سندرم کرونری حاد	مرحله دوم	تکمیل شده	رگادوبیوساینس
ARC1905	C5	ادم چشمی مرتبط به سن	مرحله اول	در حال پیشرفت	افتوتک
TAR decoy	پروتئین tat ویروس ایدز	ایدز	مرحله صفر	در حال پیشرفت	سیتی اف هوپ/ بنیتک
RRE decoy	پروتئین Rev ویروس ایدز	بیماری‌های قلبی	مرحله صفر	در حال پیشرفت	بیمارستان کودکان لس‌آنجلس

طراحی و انتقال داروهای RNAیی آنتی‌سنس

علی‌رغم مطالعه‌های آزمایشگاهی و حیوانی، در آزمایش‌های بالینی این داروها در انسان به موانع زیر برخورد می‌کنیم: بازدهی و ویژگی انتقال این داروها به بیمار، پایداری داروی RNAیی، به حداقل رساندن پاسخ‌های ایمنی از سوی بیمار و مدت زمان طولانی مصرف دارو.[۳۹و۴۰] بنابراین ارتقای روش‌های طراحی داروهای RNAیی و فن‌آوری‌های مربوط به انتقال آن‌ها برای بهینه‌سازی بازده و کاهش عوارض جانبی ضروری است.

محصور کردن اسیدهای نوکلوئیک در پوشش‌های ویژه مصنوعی یا اعمال تغییرات شیمیایی در ساختار اولیگونوکلئوتیدها و یا اتصال آن‌ها به مولکول‌های حامل ویژه، می‌توانند راه حل‌های مناسبی برای حل این مسایل باشند.[۴۱-۴۳] مهم‌ترین مزیت استفاده از حامل‌های مصنوعی برای داروی RNAیی، ایجاد ویژگی بافتی و اختصاصی در انتقال موضعی یا عمومی داروست که در نهایت به ممانعت از انتقال عمومی و غیر ویژه و تخریب و تجزیه آن طی انتقال منجر خواهد شد. پلیمرهای زیست تخریب پذیر مانند سیستم انتقالی لودر (LODER) و حامل کالاندوسیکلودکسترین برای رهاسازی کنترل شده داروهای RNAیی در یک بافت قابل استفاده هستند. حامل‌های لیپوزومی به تجمع در کبد تمایل دارند و برای برخی داروها مناسب هستند.[۴۱]

انتقال ناقل‌های باکتریایی و لنتی ویروسی که shRNAها، ریبوزیم‌ها یا سازه‌های RNAیی مشابه آپتامر را بیان می‌کنند، در ظرف کشت سلول کاملاً پاسخگو و مناسب است. این روش مستقیم‌ترین روش برای القای ژن‌های درمانی است و برحسب نوع ژن و گروه‌های درمانی محدودیت دارد. روش دیگر، ایجاد تغییراتی در حامل‌های مصنوعی است که بتواند داروی RNAیی را به طور اختصاصی به سلول‌ها یا بافت‌های مورد نظر برساند. به عنوان مثال، نانو ذرات لیگاندار و شیمرهای آپتامر- siRNA می‌توانند بدون این‌که عوارض دارو را بیش‌تر کنند، اثر آن را افزایش دهند.[۴۴-۴۶]

❋ بحث و نتیجه‌گیری:

RNA درمانی شامل طیف ویژه‌ای از کاربردها می‌شود که در محدوده ژن درمانی قرار نمی‌گیرند. برخلاف داروهای شیمیایی که پروتئین‌ها را هدف قرار می‌دهند، مولکول هدف داروهای آنتی‌سنس RNAیی، mRNAی ژن مرتبط با بیماری است. از آن جا که در بسیاری از بیماری‌ها مانند سرطان، بیماری‌های التهابی و عفونی و نقایص ژنتیکی، ژن‌های خاصی دچار افزایش بیان می‌شوند، جلوگیری از این امر به وسیله داروهای آنتی‌سنس که از ترجمه mRNA به پروتئین آن جلوگیری می‌کنند، راهکار مناسبی است. در حال حاضر، گروه‌های مختلف این داروها در حال گذراندن مراحل مختلف آزمایش‌های بالینی هستند. تعدادی از آن‌ها نیز وارد بازار شده‌اند؛ از جمله فومی ویرسن که یک RNAی آنتی‌سنس برای عفونت چشمی ناشی از سیتومگالو ویروس است، میپومرسن که یک اولیگوی آنتی‌سنس برای درمان هایپرکلسترولمیای فامیلی است و یک آپتامر RNAیی به نام ماکوژن برای درمان ادم چشمی مرتبط با

سن. طراحی این داروها نسبت به داروهای شیمیایی، بسیار آسان‌تر است و برای رسیدن به آزمایش‌های بالینی زمان کوتاهی را طی می‌کنند. به علاوه، فرمولاسیون این داروها نیز آسان است. اما با وجود امیدبخش بودن آینده داروهای آنتی‌سنس و کاربردهای ویژه آن‌ها در درمان بیماری‌های صعب‌العلاج، بازده عملکرد این داروها در آزمایش‌های بالینی هنوز قابل بحث است و موفقیت آن‌ها به عوامل مختلفی بستگی دارد. از جمله می‌توان موانع زیر را برشمرد: انتقال سیستمیک اسیدهای نوکلوئیک به سامانه انتقالی ویژه‌ای نیاز دارد که بازده انتقال دارو را افزایش دهد و بتواند آن‌ها را از اثر تخریب نوکلئازها حفظ کند؛ تأثیر داروی آنتی‌سنس موقت است و برای تمدید اثر به تزریق مجدد نیاز است؛ اتصال به اهداف غیر مورد نظر که سبب ایجاد عوارض جانبی می‌شود؛ بین اولیگوی آنتی‌سنس یا siRNA و مولکول‌های دیگر برای استفاده از ماشین شکست و بست یا اجزای مسیر miRNA رقابت به وجود می‌آید؛ احتمال دارد پاسخ ایمنی اینترفرونی در مقابل RNAi به وجود بیاید.

ایجاد مولکول‌های پایدارتر اسیدهای نوکلوئیک توسط محققان، سبب افزایش چندین برابری نیمه عمر دارو در بدن شده و میزان دوز مورد نیاز این داروها را کاهش داده است. اما، نتایج طولانی مدت حاصل از این داروها هنوز مشخص نیست. استفاده از حامل‌های مختلف جهت انتقال داروهای آنتی‌سنس RNAیی به بدن نیز راه حلی است که توسط محققان به کار برده شده است. علی‌رغم این محدودیت‌ها، امتیازهای زیاد ذکر شده در مورد داروهای مورد نظر، توانسته است تا موانع موجود را تحت‌الشعاع خود قرار دهد و کشف قابلیت این نوع داروها در درمان بیماری‌های ژنتیکی، آینده روشنی را برای آن رقم زده است. با توجه به پیشرفت سریع دنیا در تولید و تأیید این نوع داروها، توجه محققین و شرکت‌های داروسازی کشور ما نیز به آن‌ها کاملاً اجتناب‌ناپذیر است و می‌تواند بازار دارویی بزرگ و پراهمیتی را در آینده‌ای نزدیک به وجود بیاورد.

❋ مراجع:

1. Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, et al. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. Cell 1983 Dec; 35 (3 Pt 2): 849-57
2. Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, et al. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. Cell 1982 Nov; 31 (1): 147-57
3. Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature 1998 Feb 19; 391 (6669): 806-11
4. Bakhtiari N, Mirshahi M, Babaeipour V, et al. Inhibition of ackA and pta genes using two specific antisense RNAs reduced acetate accumulation in batch fermentation of E. coli BL21 (DE3). Iran J Biotech 2010; 8 (4): 243-51
5. Bakhtiari N, Mirshahi M, Babaeipour V, et al. Down regulation of ackA-pta pathway in E.coli Bl21 (DE3): A step towards optimizing recombinant protein expression system. Jundishapur J Microbiol 2014; 7 (2): e8990
6. Bakhtiari N, Babaeipour V, Maghsoudi N, et al. Construction a expression vector harboring antisense RNA cassette for permanent down regulation of acetic acid pathway in E.coli. Biotechnology and Applied Microbiology. 2012; 1: 84-97 [In Persian]
7. Melnikova. RNA-based therapies. Nat Rev Drug Discov 2007; 6: 863-4
8. Yamamoto T, Nakatani M, Narukawa K, Obika S. Antisense drug discovery and development. Future Med Chem 2011 Mar; 3 (3): 339-65
9. Kole R, Krainer AR, Altman S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and

antisense oligonucleotides. Nat Rev Drug Discov 2012 Jan 20; 11 (2): 125-40
10. Peer D, Lieberman J. Special delivery: targeted therapy with small RNAs. Gene Ther 2011 Dec; 18 (12): 1127-33
11. Burnett JC, Rossi JJ. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. Chem Biol 2012; 19 (1): 60-71
12. Scherer LJ, Rossi JJ. Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. Nat Biotechnol 2003 Dec; 21 (12): 1457-65
13. Wilson DS, Szostak JW. In vitro selection of functional nucleic acids. Annu rev Biochem 1999; 68: 611-47
14. Liang JC, Bloom RJ, Smolke CD. Engineering biological systems with synthetic RNA molecules. Mol Cell 2011 Sep; 43 (6): 915-26
15. Haseloff J, Gerlach WL. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. 1988. Biotechnology 1992; 24: 264-9
16. Opalinska JB, Gewirtz AM. Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications. Nat Rev Drug Discov 2002 Jul; 1 (7): 503-14
17. Sullenger BA, Gilboa E. Emerging clinical applications of RNA. Nature 2002 Jul 11; 418 (6894): 252-8
18. Rossi JJ. The application of ribozymes to HIV infection. Curr Opin Mol Ther 1999 Jun; 1 (3): 316-22
19. Morrow PK, Murthy RK, Ensor JD, et al. An open-label, phase 2 trial of RPI.4610 (Angiozyme) in the treatment of metastatic breast cancer. Cancer 2012 Sep 1; 118 (17): 4098-104
20.Berk P. An editor's look-back. Hepatology 2006 Feb; 43 (2 Suppl 1): S13-S30
21. Liu Q, Lin J, Liu M, et al. Large scale preparation of recombinant human parathyroid hormone 1-84 from Escherichia coli. Protein Expr Purif 2007 Aug; 54 (2): 212-9
22. Heidersbach A, Gaspar-Maia A, McManus MT, Ramalho-Santos M. RNA interference in embryonic stem cells and the prospects for future therapies. Gene Ther 2006 Mar; 13 (6): 478-86
23. Davidson BL, McCray PB Jr. Current prospects for RNA interference-based therapies. Nat Rev Genet 2011 May; 12 (5): 329-40
24. Kim DH, Behlke MA, Rose SD, et al. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. Nat Biotechnol 2005 Feb; 23 (2): 222-6
25. Amarzguioui M, Rossi JJ. Principles of Dicer substrate (D-siRNA) design and function. Methods Mol Biol 2008; 442: 3-10
26. Grimm D, Wang L, Lee JS, et al. Argonaute proteins are key determinants of RNAi efficacy, toxicity, and persistence in the adult mouse liver. J Clin Invest 2010 Sep; 120 (9): 3106-19
27. Castanotto D, Sakurai K, Lingeman R, et al. Combinatorial delivery of small interfering RNAs reduces RNAi efficacy by selective incorporation into RISC. Nucleic Acids Res 2007; 35 (15): 5154-64
28. Zhang J, Rossi JJ. Strategies in designing multigene expression units to downregulate HIV-1. Methods Mol Biol 2010; 623: 123-36
29. Li MJ, Kim J, Li S, et al. Long-term inhibition of HIV-1 infection in primary hematopoietic cells by lentiviral vector delivery of a triple combination of anti-HIV shRNA, anti-CCR5 ribozyme, and a nucleolar-localizing TAR decoy. Mol Ther 2005 Nov; 12 (5): 900-9
30. Burnett JC, Rossi JJ, Tiemann K. Current progress of siRNA/shRNA therapeutics in

clinical trials. Biotech J 2011 Sep; 6 (9): 1130-46
31. Bennett CF, Swayze EE. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2010; 50: 259-93
32. Matveeva O, Nechipurenko Y, Rossi L, et al. Comparison of approaches for rational siRNA design leading to a new efficient and transparent method. Nucleic Acids Res 2007; 35 (8): e63
33. Patzel V. In silico selection of active siRNA. Drug Discov Today 2007 Feb; 12 (3-4): 139-48
34. Sipes TB, Freier SM. Prediction of antisense oligonucleotide efficacy using aggregate motifs. J Bioinform Comput Biol 2008 Oct; 6 (5): 919-32
35. Castanotto D, Rossi JJ. The promises and pitfalls of RNA - interference - based therapeutics. Nature 2009 Jan 22; 457 (7228): 426-33
36. Zhou J, Bobbin ML, Burnett JC, Rossi JJ. Current progress of RNA aptamer-based therapeutics. Front Genet 2012 Nov 2; 3: 234
37. Germer K, Leonard M, Zhang X. RNA aptamers and their therapeutic and diagnostic applications. Int J Biochem Mol Biol 2013 Mar 31; 4 (1): 27-40
38. Keefe AD, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics. Nat Rev Drug Discov 2010 Jul; 9 (7): 537-50
39. Samuel-Abraham S, Leonard JN. Staying on message: design principles for controlling nonspecific responses to siRNA. FEBS J 2010 Dec; 277 (23): 4828-36
40. Du G, Yonekubo J, Zeng Y, et al. Design of expression vectors for RNA interference based on miRNAs and RNA splicing. FEBS J 2006 Dec; 273 (23): 5421-7
41. Margus H, Padari K, Pooga M. Cell-penetrating peptides as versatile vehicles for oligonucleotide delivery. Mol Ther 2012 Mar; 20 (3): 525-33
42. Prakash TP. An overview of sugar-modified oligonucleotides for antisense therapeutics. Chem Biodivers 2011 Sep; 8 (9): 1616-41
43. Zhao X, Pan F, Holt CM, et al. Controlled delivery of antisense oligonucleotides: a brief review of current strategies. Expert Opin Drug Deliv 2009 Jul; 6 (7): 673-86
44. Davis ME, Zuckerman JE, Choi CH, et al. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. Nature 2010 Apr 15; 464 (7291): 1067-70
45. Zhou J, Shum KT, Burnett JC, Rossi JJ. Nanoparticle-based delivery of RNAi therapeutics: progress and challenges. Pharmaceuticals (Basel) 2013; 6 (1): 85-107
46. Brown PK, Qureshi AT, Moll AN, et al. Silver nanoscale antisense drug delivery system for photoactivated gene silencing. ACS Nano 2013 Apr 23; 7 (4): 2948-59