

REVIEWS

Gene Therapy: New Options for Hypertensive Treatment

Suree Jianmongkol* and Amonrat Khayungarnnawee**

**Department of Pharmacology, **Interdepartment of Pharmacology, Faculty of the Pharmaceutical Sciences; Chulalongkorn University, Bangkok.*

Abstract

Hypertension is a chronic disease, of which patients have to take medication throughout life. The ineffectiveness of blood pressure control partly stems from patient compliance due to several drug uses and intolerable side effects. Recent advances in biotechnology and transgenic medicines make gene therapy a new promising frontier in treatment of hypertension. Two approaches have been under investigation: 1) Sense approach using gain-of-function strategy by inserting a vasodilator gene into host genomes and 2) Antisense approach using loss-of-function strategy by suppressing the expression of vasoconstrictor gene with antisense oligonucleotides. The potential therapeutic targets in antisense gene therapy include genes encoding proteins in the renin-angiotensin-aldosterone system and adrenoceptors, which are the current targets for antihypertensive drugs such as ACEIs and β -blockers. Either nonviral vectors (e.g., liposome) or viral vectors (e.g., retrovirus, adenovirus, and adeno-associated virus) can be used to deliver therapeutic genes to the target cells if they are nonpathogenic, highly selective and specific to the target. The vector delivery system is a crucial factor determining an outcome of the therapy especially its influences on the duration of action. The viral based vectors produce a longer duration than the nonviral vectors do. The results of preclinical studies support the potential of gene therapy for future clinical use in treatment of hypertension.

Key words: hypertension, gene therapy

Gene Therapy: ทางเลือกใหม่ในการรักษาความดันโลหิตสูง

สุรีย์ เจียรณมงคล*, อมรรัตน์ ชัยการณารักษ์**

*ภาควิชาเภสัชวิทยา, **สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ความดันโลหิตสูงเป็นโรคเรื้อรังที่ผู้ป่วยต้องใช้ยาควบคุมระดับความดันโลหิตอย่างสม่ำเสมอตลอดชีวิต ซึ่งปัญหาการควบคุมระดับความดันโลหิตที่ไม่ได้ผลนั้นมีสาเหตุส่วนหนึ่งจากผู้ป่วยลืมนับรับประทานยาเนื่องจากผู้ป่วยอาจต้องใช้ยาหลายชนิดร่วมกันและผลของยามีอยู่ในระยะสั้น หรือไม่สามารถทนต่อผลข้างเคียงที่เกิดขึ้น ด้วยความก้าวหน้าของเทคโนโลยีทางด้านพันธุศาสตร์และการส่งผ่าน gene ทำให้ gene therapy ได้รับความสนใจในการพัฒนาเพื่อใช้ในการป้องกันและรักษาโรคความดันโลหิตสูง โดยอาศัยแนวทางในการเพิ่มหรือกระตุ้น vasodilator gene (sense therapy) หรือ ยับยั้งการทำงานของ vasoconstrictor gene (antisense therapy) ที่เป็นเป้าหมายของยาที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันเช่นยากลุ่ม ACEI และ β -blockers เป็นต้น การเลือกใช้ vector เพื่อนำส่ง gene เข้าสู่เซลล์เป้าหมายจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อประสิทธิภาพและประสิทธิผลของ gene therapy ซึ่ง vector ที่ใช้อาจเป็นได้ทั้ง nonviral system เช่น ในรูปแบบของ liposome และ viral vector mediated system เช่น retrovirus, adenovirus หรือ adeno-associated virus โดยต้องมีความปลอดภัยในการนำมาใช้ นอกจากนี้ vector แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันโดยเฉพาะอย่างยิ่งผลต่อระยะเวลาในการออกฤทธิ์ โดย viral based vector จะให้ผลในการรักษาที่นานกว่า ในปัจจุบันได้มีรายงานการศึกษาในระยะก่อนคลินิกแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนามาใช้ในทางคลินิกในอนาคต

คำสำคัญ: ความดันโลหิตสูง, gene therapy

บทนำ

ความดันโลหิตสูงชนิดปฐมภูมิ (primary หรือ essential hypertension) เป็นโรคเรื้อรังซึ่งถ้าผู้ป่วยไม่ทำการรักษา หรือควบคุมความดันโลหิตให้ได้แล้วจะก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจขาดเลือด โรคหัวใจล้มเหลว โรคหลอดเลือดสมอง (stroke) โรคไตวาย ต้อไปได้ แม้ว่าในปัจจุบันสาเหตุของการเกิด ความดันโลหิตสูงจะยังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัดก็ตาม แต่ก็เป็นที่ยอมรับกันว่าการหลีกเลี่ยงปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องเช่น บุหรี่ แอลกอฮอล์ ความเครียด โรคอ้วน ปริมาณเกลือในอาหาร ร่วมกับการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอจะช่วยป้องกันหรือควบคุมโรคได้ ดังนั้นแนวทางการรักษาความดันโลหิตสูงในปัจจุบันจึงได้มีข้อเสนอแนะให้ผู้ป่วยปรับเปลี่ยนลักษณะการดำเนินชีวิตให้เหมาะสมควบคู่ไปกับการใช้ยาลดความดันโลหิต^{1,2}

ในปัจจุบันได้มีความพยายามที่จะพัฒนาวิธีการรักษาโรคความดันโลหิตสูงให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นเช่นการใช้ยาหลายชนิดร่วมกันเพื่อควบคุมระดับความดันโลหิต การค้นหายาใหม่ที่มีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างจากยาที่มีอยู่ในปัจจุบันเช่นการพัฒนาในกลุ่ม endothelin antagonists หรือการทำ gene therapy โดยหวังผลการควบคุมความดันโลหิตได้ในระยะยาว ไม่ก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการรักษา และมีความปลอดภัยมากกว่าการใช้ยาลดความดันโลหิตที่มีอยู่ในปัจจุบัน ทั้งนี้ในบทความนี้จะกล่าวถึงการพัฒนา gene therapy

เพื่อนำมาใช้ในการรักษาความดันโลหิตสูงซึ่งในขณะนี้ได้มีรายงานผลการศึกษาในระยะก่อนคลินิกว่าสามารถป้องกันและรักษาโรคในระยะยาวได้ แต่ยังคงต้องศึกษาต่อไปเพื่อนำมาใช้ได้จริงในอนาคต

แนวทางการรักษาโรคความดันโลหิตสูงในปัจจุบัน

แนวทางการรักษาความดันโลหิตสูงที่เป็นที่ยอมรับกันคือการปรับเปลี่ยนลักษณะการดำเนินชีวิตของผู้ป่วยควบคู่กับการใช้ยาตามความเหมาะสมกับผู้ป่วยแต่ละราย ซึ่งการใช้ยาอาจเป็นได้ทั้งในลักษณะของ “stepped care therapy” กล่าวคือเริ่มใช้ยาในขนาดต่ำ ๆ ก่อนแล้วค่อย ๆ เพิ่มขนาดขึ้นถ้าใช้ยาตัวเดียวแล้วไม่ได้ผลในการรักษาตามความต้องการอาจต้องพิจารณาให้ยาชนิดที่ 2 ที่มีการออกฤทธิ์ต่างจากยาตัวแรกร่วมด้วยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการลดความดันโลหิตและลดอาการไม่พึงประสงค์ลง หรือใช้ยาในลักษณะ “Fixed-low-dose combinations” ซึ่งเป็นการใช้ยาหลายตัวร่วมกันในขนาดต่ำ ๆ ตั้งแต่เมื่อเริ่มรักษาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาและลดอาการข้างเคียงที่เกิดจากการใช้ยาขนาดสูง ๆ ลงได้ ซึ่งก็เป็นแนวทางในการรักษาที่ได้ผลดีเช่นกัน^{1,3,4} ทั้งนี้ Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure (JNC) ได้แนะนำใน JNC-VII¹ ให้ใช้ยาขับปัสสาวะกลุ่ม thiazide ในการเริ่มรักษาผู้ป่วยที่ไม่มีโรคหรือภาวะแทรกซ้อนอื่น ๆ แล้วจึงเพิ่มยากลุ่มอื่นเช่นยาในกลุ่ม β -adrenergic receptor blockers, angiotensin converting

enzyme inhibitors (ACEI), angiotensin II receptor antagonists (ARB) และ calcium channel blockers (CCB) เมื่อไม่ได้ผลในการรักษาตามต้องการ และในกรณีที่ผู้ป่วยมีค่าความดันโลหิตสูงกว่า 160/100 มม.ปรอท JNC-VII ได้แนะนำให้เริ่มการรักษาด้วยยา 2 ชนิด ซึ่งโดยมากจะเป็นยาขับปัสสาวะกลุ่ม thiazide ร่วมกับยากลุ่มอื่นๆ ดังกล่าวข้างต้น

ยาในการรักษาความดันโลหิตสูงที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ ยาขับปัสสาวะ, β -adrenergic receptor blockers, ACEIs, ARBs และ CCBs ยาแต่ละชนิดมีคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ เป้าหมายและกลไกการออกฤทธิ์ของยา ตลอดจนอาการไม่พึงประสงค์แตกต่างกันไป การเลือกใช้ยาชนิดใดชนิดหนึ่งนั้นขึ้นกับพยาธิสภาพของผู้ป่วยรวมถึง อายุ ภาวะแทรกซ้อน ความรุนแรงของโรค^{1,2} ทั้งนี้โดยรวมแล้วประสิทธิภาพของการรักษาจะขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น พยาธิสรีรวิทยาของโรคที่ซับซ้อน การเลือกใช้ยาที่เหมาะสม ตลอดจนความร่วมมือของผู้ป่วยในการปฏิบัติตัวและการใช้ยา (patient compliance)^{3,5}

ยาที่มีประสิทธิภาพดีในการควบคุมความดันโลหิตสูงนั้นควรเป็นยาที่ออกฤทธิ์อยู่ยาวนาน 24 ชั่วโมง ผู้ป่วยรับประทานเพียงวันละครั้ง ซึ่งจะช่วยบรรเทาปัญหาการลืมหรือเพื่อการรับประทานยาของผู้ป่วย ทำให้การรักษาประสบความสำเร็จและสามารถรักษาระดับความดันได้คงที่ดีกว่ายาที่มีระยะการออกฤทธิ์สั้น รวมทั้งช่วยลดความเสี่ยงอันตรายจากภาวะแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นในกรณีความดันที่เพิ่มขึ้นเมื่อยาหมดฤทธิ์เช่นการ

เกิดหัวใจวาย เป็นต้น อย่างไรก็ตาม จากรายงานการศึกษาผู้ป่วยความดันโลหิตสูงที่ได้รับการรักษาในประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่า มีผู้ป่วยเพียงร้อยละ 20-35 เท่านั้นที่สามารถควบคุมระดับความดันโลหิตได้ผลเป็นที่น่าพอใจ ทั้งนี้การควบคุมความดันโลหิตที่ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควรสันนิษฐานว่าอาจเกิดจากการขาดความร่วมมือของผู้ป่วย ผู้ป่วยเกิดความรำคาญหรือไม่สามารถทนต่ออาการข้างเคียงของยา ประกอบกับผู้ป่วยความดันโลหิตสูงระยะแรกส่วนใหญ่จะไม่มีอาการปรากฏให้เห็น ผู้ป่วยจึงไม่ใช้อย่างต่อเนื่องทำให้ไม่สามารถควบคุมความดันโลหิตได้อย่างได้ผล^{2,3,6}

แนวคิดการประยุกต์ใช้ gene therapy เพื่อรักษาโรคความดันโลหิตสูง

การพัฒนาการรักษาโรคความดันโลหิตสูงด้วยวิธี gene therapy นั้นมีข้อแตกต่างจากโรคทางพันธุกรรมชนิดอื่น เนื่องจากความดันโลหิตสูงเป็น polygenic disease ที่สมุฏฐานของโรคมีความซับซ้อน โดยอาจเกี่ยวข้องกับความผิดปกติทางพันธุกรรมต่างๆ เช่น polymorphism ของ ACE gene^{7,8,9} หรือ AT II type 1 receptor (AT₁-receptor)^{7,8} ประกอบกับอิทธิพลของปัจจัยเสริมจากภายนอก เช่น อาหาร ลักษณะการดำเนินชีวิตของผู้ป่วย^{3,4,5} การทำ genetic mapping เพื่อหาสาเหตุหรือเพื่อเลือกยาที่จะมาใช้ในการรักษาโรคให้หายขาดนั้นไม่ก่อให้เกิดประโยชน์เท่าใดนัก นอกจากนี้ในปัจจุบันก็มีวิธีการรักษาที่ใช้ควบคุมระดับความดันโลหิตที่ให้ผลดีอยู่แล้ว แต่อย่างไรก็

ตาม การทำ gene therapy ก็เป็นทางเลือกใหม่'ทางหนึ่งในความพยายามที่จะพัฒนาการรักษาให้มีประสิทธิผลมากยิ่งขึ้น และแก้ไขปัญหความร่วมมือในการใช้ยาของผู้ป่วย^{10,11,12} ด้วยเหตุผลดังต่อไปนี้คือ

1. ประสิทธิภาพของ gene therapy ในการควบคุมความดันโลหิตดีกว่าการใช้ยา อาจจะทำ gene therapy เพียงครั้งเดียวเท่านั้นก็สามารถควบคุมความดันโลหิตได้ผลดีตามต้องการ

2. ระยะเวลาของผลการรักษาด้วย gene therapy นานกว่าการใช้ยา อาจจะทำ gene therapy เพียงปีละ 1-2 ครั้ง ทำให้ลดปัญหาเรื่องความร่วมมือของผู้ป่วยในการใช้ยา

3. ความจำเพาะเจาะจงต่ออวัยวะเป้าหมาย (target tissue) ของการรักษาด้วยวิธี gene therapy สูงกว่ายาโดยทั่วไป ทำให้ลดการเกิดผลไม่พึงประสงค์จากการรักษาที่ทำให้ผู้ป่วยไม่สามารถทนต่อการใช้ยาได้

4. การรักษาหรือแก้ไขภาวะ end-organ-damage ที่เกิดจากความดันโลหิตสูงยังคงเป็นปัญหาสำคัญของการรักษาผู้ป่วย โดยเฉพาะการเกิดพยาธิสภาพที่หัวใจ ไต หรือหลอดเลือด ซึ่งภาวะแทรกซ้อนดังกล่าวเมื่อเกิดขึ้นแล้วยาในปัจจุบันเกือบทั้งหมดยังไม่สามารถรักษาได้ การพัฒนา gene therapy เพื่อรักษาภาวะแทรกซ้อนดังกล่าวจะเป็นส่วนสำคัญในการรักษาโรคความดันโลหิตสูงนอกเหนือจากการลดระดับความดันโลหิตเพียงอย่างเดียว เช่น การเติม gene ที่กระตุ้นการเกิด angiogenesis เป็นต้น

ในปัจจุบันแนวทางการประยุกต์ใช้ gene therapy สำหรับการรักษาความดัน

โลหิตสูงอาศัยพื้นฐานความเข้าใจในเรื่องพยาธิสรีรวิทยาของโรค เช่น การรักษาความสมดุลของเกลือและน้ำของร่างกาย การทำงานของระบบ renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) และระบบประสาทซิมพาเทติกในการควบคุม vascular tone และ peripheral resistance ตลอดจนกลไกการออกฤทธิ์ของยาที่ใช้ในการควบคุมความดันโลหิตที่ได้ผลดี โดยไม่จำเป็นต้องวิเคราะห์หาความผิดปกติทางพันธุกรรมที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในผู้ป่วยแต่ละราย แต่สามารถทำ gene therapy ได้โดยแก้ไขปรับเปลี่ยนรหัสพันธุกรรมที่กำหนดโปรตีนที่เป็นเป้าหมายของการใช้ยาที่มีใช้อยู่อย่างมีประสิทธิภาพในการควบคุมความดันโลหิตเช่นยากลุ่ม ACE Inhibitors หรือ angiotensin II receptor subtype 1 (AT₁-R)-blockers (ARB) ซึ่งลดอิทธิพลของระบบ RAAS ที่มีต่อความดันโลหิต หรือยากลุ่ม β -blockers ซึ่งลดการกระตุ้นของระบบประสาทซิมพาเทติก เป็นต้น

การรักษาความดันโลหิตสูงในระดับพันธุกรรม (Gene therapy)^{10, 13, 14, 15, 16}

แนวทางของการทำ gene therapy เพื่อรักษาโรคความดันโลหิตสูงนั้น อาจแบ่งออกได้เป็น 2 แนวทางคือ (1) การเพิ่ม gene ที่มีผลลดความดันโลหิต เช่น vaso-dilator gene หรือ sense approach และ (2) การยับยั้ง gene ที่มีผลเพิ่มความดันโลหิตเช่น vasoconstrictor gene หรือ antisense approach ซึ่งทั้ง 2 แนวทางจะนำไปสู่เป้าหมายของการรักษาเดียวกัน คือควบคุม

คุม vascular tone ลด peripheral resistance และลดความดันโลหิตลงได้

1. การเติม vasodilator gene ที่มีผลลดความดันโลหิต หรือ sense approach เพื่อเพิ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการคลายตัวของหลอดเลือดโดยเติม vasodilator gene เช่น atrial natriuretic peptide (ANP)¹⁷, kallikrein¹⁸, adrenomedullin¹⁹ และ endothelial nitric oxide synthase (eNOS)²⁰ เป็นต้น ซึ่งการนำส่ง gene เข้าสู่เนื้อเยื่อเป้าหมายอาจจะอยู่ในรูปแบบของ naked DNA หรือ viral delivery system จากการศึกษาในสัตว์ทดลองที่เป็น model ต่างๆของความดันโลหิตสูงเช่น spontaneously hypertensive rat (SHR), Dahl salt-sensitive rat, deoxycorticosterone acetate-treated rat (DOCA) และ Goldblatt hypertensive rat พบว่าการทำ overexpression ของ vasodilator gene ต่างๆเหล่านี้จะสามารถลดความดันโลหิตได้ในช่วง 21-41 มมปรอท เป็นเวลานาน 3-12 สัปดาห์และมีผลลดการเกิดพยาธิสภาพในอวัยวะสำคัญ (end-organ-damage) เช่นไต หัวใจและหลอดเลือด อันเนื่องมาจากความดันโลหิตสูงได้¹¹ เช่นการให้ adenovirus associated kallikrein gene แก่หนูทดลองใน DOCA-salt hypertensive model มีผลลดพยาธิสรีรวิทยาของการเกิด end-organ-damage ที่ไตโดยพบว่า glomerular sclerotic lesions และ urinary protein excretion ลดลง²¹ เป็นต้น อย่างไรก็ตามวิธีการของ sense approach ยังไม่เป็นที่นิยมเท่า antisense approach เนื่องจากผลสนับสนุนทางคลินิกในการใช้ kalli-

krerin หรือ ANP รักษาความดันโลหิตสูงยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร

2. การยับยั้ง vasoconstrictor gene ที่มีผลเพิ่มความดันโลหิตหรือ antisense approach^{11,13,14} หลักการของวิธีนี้คือการให้ recombinant antisense DNA ซึ่งอาจอยู่ในรูปของ antisense oligodeoxynucleotides (AS ODNs) ซึ่งเป็นสาย DNA สายเดี่ยว ขนาดสั้นความยาวประมาณ 15-20 เบสที่สังเคราะห์ให้สามารถเข้าคู่หรือมี complimentary กับ mRNA เป้าหมาย หรืออยู่ในรูปของ antisense DNA ที่สายยาวขึ้นเป็น full-length cDNA ใน viral vector แล้วมีผลยับยั้งการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการหดตัวของหลอดเลือดซึ่งมีมากเกินไปในภาวะความดันโลหิตสูงทั้งในระดับกระบวนการถอดรหัส (transcription) หรือการแปลรหัส (translation) กลไกการออกฤทธิ์ของ AS ODNs เช่นจะไปจับกับ endogenous mRNA เป้าหมายใน cytoplasm ทำให้ยับยั้งการแปลรหัส mRNA หรือยับยั้งการรวมตัว (assembly) ของ ribosome หรืออาจไปกระตุ้นเอนไซม์ RNase H เพื่อไปทำลาย mRNA ที่จับกับ AS ODNs นั้น ซึ่งเมื่อ mRNA ถูกทำลายแล้ว AS ODNs จะถูกปลดปล่อยให้เป็นอิสระและสามารถไปจับกับ mRNA เป้าหมายอื่นต่อไป นอกจากนี้ AS ODNs ที่เข้าสู่ nucleus อาจจับกับ pre-mRNA เป้าหมายและยับยั้งการ splicing ของ pre-mRNA หรือ AS ODNs จะไปจับกับ DNA เป้าหมายเกิดเป็น triplex-forming oligonucleotides มีผลยับยั้งกระบวนการ transcription เป็นต้น สำหรับกลไกการออก

ฤทธิ์ของ antisense full-length cDNA จะแตกต่างจาก AS ODNs โดย antisense full-length cDNA จะถูกถอดรหัสเป็น antisense RNA ก่อนเพื่อไปเข้าคู่กับ endogenous mRNA เป้าหมาย ทำให้ไม่เกิดการแปลรหัส mRNA นั้น ตัวอย่างโปรตีนที่เป็นเป้าหมายของ antisense approach ได้แก่ AT₁-R, β ₁-adrenergic receptor, angiotensin gene-activating elements, calcium channels และ endothelin เป็นต้น

Antisense therapy เป็นวิธีที่ได้รับการความสนใจศึกษามากกว่า sense approach เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำให้สามารถศึกษาประสิทธิภาพและประสิทธิผลในการรักษาเปรียบเทียบกับการใช้ยาที่มีอยู่ในปัจจุบันได้โดยตรง นอกจากนี้การเพิ่มเติม gene จากที่มีอยู่ตามปกติเพื่อให้เกิดผลการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาในร่างกายจนกระทั่งได้ผลการรักษาตามต้องการนั้น ทำได้ยากกว่าการยับยั้งผลของ gene ที่ทำให้เกิดความผิดปกติขึ้น

วิธีการส่งผ่านรหัสพันธุกรรมใน Antisense Therapy

ถึงแม้ว่าความดันโลหิตสูงสามารถเกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมหลายอย่างประกอบกัน แต่รหัสพันธุกรรมที่เป็นเป้าหมายในการรักษานั้นในปัจจุบันจะมุ่งเน้นที่ gene ที่ให้โปรตีนที่เป็นเป้าหมายของการรักษาด้วยยาที่ใช้ได้ผลดีในปัจจุบันได้แก่ β ₁-adrenergic receptor, โปรตีนในระบบ RAAS เช่น ACE, AT₁R และ angiotensinogen (AGT) เป็นต้น ทั้งนี้สิ่งสำคัญประการหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงในแนวทางการรักษาด้วยวิธีนี้คือ การทำให้มี antisense

DNA ในปริมาณที่พอเพียงที่จะกระจายไปถึงอวัยวะเป้าหมาย เช่น หลอดเลือด, หัวใจ เป็นต้น ได้ทั่วถึง ดังนั้นปัจจัยสำคัญของความสำเร็จในการทำ antisense therapy คือ ประสิทธิภาพของตัวนำส่ง antisense DNA เข้าสู่เซลล์ของอวัยวะเป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจง และสามารถควบคุมระยะเวลาการ expression ของ antisense DNA นานตามความต้องการได้

กรรมวิธีในการส่งผ่าน antisense DNA เข้าสู่เซลล์มี 2 วิธี คือ

1. Nonviral vector system เป็นวิธีที่ใช้กับ AS ODNs ทั้งในรูปของ naked DNA หรือ liposome-encapsulated AS ODN ซึ่งข้อดีของการใช้ AS ODNs คือ มีความจำเพาะเจาะจงกับเป้าหมายสูง ผลข้างเคียงน้อย ไม่ก่อให้เกิด tachyphylaxis นอกจากนี้ยังไม่ผ่าน blood brain barrier ทำให้ไม่มีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง เมื่อให้ AS ODNs ทาง peripheral ตลอดจนไม่ผ่านรกไปมีผลต่อทารกในครรภ์มารดาทำให้สามารถใช้ได้ในกรณี preeclampsia และเมื่อเปรียบเทียบกับ viral vector system แล้วการใช้ AS ODNs มีความปลอดภัยสูงกว่าแต่มีระยะเวลาในการออกฤทธิ์ไม่นานเท่า เนื่องจากจะไม่ถูกรวมเข้ากับ genome ของเซลล์เป้าหมาย ทั้งนี้ระยะเวลาในการออกฤทธิ์ของ AS ODNs อยู่ในช่วงวันถึงสัปดาห์เท่านั้น

อุปสรรคประการหนึ่งของการทำ antisense therapy โดยใช้ AS ODNs คือ การออกแบบ AS ODNs ที่เหมาะสมกับการใช้งานอย่างได้ผลในร่างกาย¹⁵ ทั้งนี้ในปัจจุบันองค์ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับการ

folding และ annealing ของสาย nucleotides ยังไม่เพียงพอ ส่วนใหญ่แล้ว AS ODNs จะถูกสังเคราะห์ในรูปของ phosphodiester หรือ phosphorothioate backbone ให้เข้าคู่กับ initiation codon (AUG) หรือ downstream ของ mRNA เป้าหมาย^{22,23,24,25} โดยอาจอยู่ในรูปของ phosphodiester หรือ phosphorothioate backbone ซึ่งในกรณีที่เป็น phosphorothioate oligonucleotides นั้นจะมีระยะเวลาในการออกฤทธิ์ที่ยาวกว่า phosphodiester backbone แต่มีข้อเสียคือ อาจเกิดความเป็นพิษจาก sulfur ได้ อย่างไรก็ตามปัญหาดังกล่าวสามารถหลีกเลี่ยงได้ด้วยการสังเคราะห์สาย nucleotides ให้มีขนาดไม่ยาวนักโดยมีจำนวน oligomers น้อยกว่า 22 ตัว ซึ่งพบว่าเป็นขนาดที่เข้าสู่เซลล์ได้ และมีประสิทธิภาพในการรักษา แต่ทั้งนี้จำนวน oligomers ต้องไม่น้อยกว่า 9 ตัว เพื่อไม่ให้สูญเสียความจำเพาะเจาะจงในการจับกับ mRNA เป้าหมาย และอาจถูกทำลายโดย nucleases¹⁵

AS ODNs สามารถให้ในรูปของ naked DNA หรือ plasmids ได้ซึ่งพบว่าให้ผลดีเช่นกัน แต่ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการนำเข้าสู่เซลล์ไม่ดีนักและระยะเวลาในการออกฤทธิ์สั้นเพียงประมาณ 1 สัปดาห์¹¹ จากการให้ plasmid ของ adeno-associated vector สำหรับ AGT antisense (pAAV-AGT-AS) ใน SHR พบ expression ของ AGT antisense ที่หัวใจและปอดของสัตว์ทดลอง และมีผลลดความดันโลหิตลงได้อย่างมีนัยสำคัญเป็นเวลา 6-8 วัน โดยความดันโลหิตที่ลดลงนี้จะสัมพันธ์กับระดับ AGT ในพลาสมาที่ลดลงด้วย²⁶ ซึ่งระยะเวลาในการ

แสดงผลการรักษาจะสั้นกว่าการใช้ viral vector เนื่องจาก plasmids ไม่ทำให้เกิดการรวมตัวเข้ากับ genome ของเซลล์เป้าหมาย จึงได้มีการพัฒนาให้อยู่ในรูปของ cationic liposomes เช่น DOTAP, DOPE ตัวอย่าง antisense therapy ที่ใช้ AS ODNs ใน cationic liposomes ได้แก่ $\beta 1$ -adrenergic receptor AS ODNs ($\beta 1$ -AS-ODNs), AGT-AS-ODNs, AT1R-AS-ODNs เป็นต้น^{11,15}

2. Viral vector mediated system¹¹⁻¹⁵
เนื่องจาก AS ODNs เป็นสาย DNA ที่มีขนาดสั้นจึงอาจมีปัญหาในด้านความจำเพาะต่อ mRNA เป้าหมาย ดังนั้นจึงอาจเพิ่มความยาวของสาย oligonucleotides เพื่อลดปัญหาดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามความยาวที่เพิ่มขึ้นนั้นจะเป็นอุปสรรคในการนำ antisense DNA เข้าสู่เซลล์จึงได้มีการพัฒนาการใช้ replication-defective virus particles ในการนำส่ง antisense DNA ไปยังเซลล์เป้าหมาย ซึ่งในการพัฒนา viral vector เพื่อใช้สำหรับการรักษาความดันโลหิตสูงนั้นต้องทำให้ vector เหล่านี้มีความปลอดภัยสูง ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ป่วยทั้งในแง่การเกิดโรคหรือ กระตุ้นปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันของร่างกาย (less immunogenic) การอักเสบ หรือมีผลข้างเคียงน้อยที่สุด ทั้งนี้ไวรัสที่นำมาใช้จะต้องมีความสามารถในการ infect เซลล์เป้าหมายทั้งชนิด somatic cells ที่ไม่แบ่งตัวและเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว ตลอดจนรวมตัวเข้ากับ DNA ในตำแหน่งบน genome ของเซลล์เป้าหมายที่ต้องการอย่างจำเพาะเจาะจง ไม่รบกวน gene อื่นๆ หรือทำให้เกิด mutagenesis ไวรัสที่เลือกใช้จะ

เป็นชนิดที่ไม่สามารถแบ่งตัวได้เพื่อป้องกันการแพร่กระจายไปที่เนื้อเยื่ออื่น ๆ ที่ไม่ใช่เป้าหมายหรือแพร่ไปในผู้อื่นที่ไม่ใช่ผู้ป่วย โดยทั่วไปรหัสพันธุกรรมที่กำหนดการแบ่งตัว (replication gene) ของเชื้อไวรัสจะถูกแทนที่โดย cassette ที่มี antisense DNA อยู่ เพื่อเพิ่มความปลอดภัยในการรักษา

ตัวอย่างของ viral vector ได้แก่ retrovirus, adenovirus, adeno-associated virus (AAV) เป็นต้น ทั้งนี้ viral vector แต่ละชนิดมีคุณลักษณะที่แตกต่างกันโดยสังเขป ดังต่อไปนี้

- Retrovirus-based vector จะ infect เซลล์ที่กำลังแบ่งตัวและสามารถรวมตัวเข้ากับ DNA ของเซลล์เป้าหมายได้เป็นอย่างดี ทำให้ระยะเวลาในการออกฤทธิ์ของ gene therapy ยาวนานขึ้น จึงเหมาะกับการนำมาใช้ในการรักษามะเร็ง แต่ก็ยังเป็นข้อจำกัดของ vector ชนิดนี้ในการรักษาความดันโลหิตสูงซึ่งโดยมากจะเป็นในผู้ใหญ่ และเซลล์เป้าหมายในการรักษาเป็นเซลล์ที่ไม่แบ่งตัวแล้ว นอกจากนี้ retrovirus อาจก่อให้เกิดปัญหาด้านความปลอดภัยในการใช้เนื่องจาก RNA ของไวรัสอาจรวมตัวเข้าไปใน genome ต่าง ๆ ที่ไม่ใช่เป้าหมายของการรักษาได้

- Adenovirus-based vector มีข้อดีคือสามารถ infect เซลล์ที่ไม่แบ่งตัวได้เป็นอย่างดี vector ชนิดนี้เข้าสู่เซลล์โดยผ่านกระบวนการ receptor-induced endocytosis แล้วจึงเข้าสู่นิวเคลียส อยู่ในรูปของ episomal DNA ซึ่งไม่ถูกรวมตัวเข้ากับ DNA ของเซลล์เป้าหมาย แม้ว่า episomal DNA ดังกล่าวจะมี expression ของโปรตีนอยู่ใน

ระดับที่สูงก็ตาม แต่มีหลายกรณีที่ episomal DNA ดังกล่าวไม่แสดงผลเช่นกัน นอกจากนี้โปรตีนที่ได้จาก gene ของ adenovirus มีเป็นจำนวนมากหลายร้อยชนิด ทำให้มีโอกาสที่จะกระตุ้นปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันของร่างกาย (immunogenic) และก่อให้เกิดการอักเสบของหลอดเลือดได้สูง ทำให้เกิดอันตรายต่อผู้ป่วยได้ ซึ่งได้มีรายงานการเสียชีวิตในผู้ป่วยจาก multiple-organ failure เนื่องจากเชื้อ adenovirus ข้อจำกัดเหล่านี้ทำให้ adenovirus-based vector ไม่เหมาะที่จะถูกพัฒนามาใช้ในการรักษาโรคเรื้อรังเช่นโรคความดันโลหิตสูง ซึ่งต้องใช้การรักษาเป็นระยะเวลานาน อย่างไรก็ตาม vector ดังกล่าวมีประโยชน์อย่างยิ่งในการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของ antisense DNA ชนิดต่าง ๆ ในสัตว์ทดลองเนื่องจากเป็น vector ที่ผลิตได้โดยง่าย และในอนาคตอาจมีการทำพันธุวิศวกรรมเพื่อแก้ไขข้อจำกัดของ vector ชนิดนี้ ก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำ gene therapy

- Adeno-associated virus (AAV) เป็น viral vector ที่ได้รับความสนใจอย่างมากชนิดหนึ่งในการนำมาใช้สำหรับการรักษาความดันโลหิตสูง AAV เป็น non replicated-parvovirus based vector ที่สามารถแทนที่ rep และ gag gene ของไวรัสด้วย antisense DNA เพื่อนำส่งไปยังนิวเคลียสของเซลล์เป้าหมาย ซึ่งในการนำส่ง gene เข้าสู่เซลล์เป้าหมายนั้น AAV ต้องการเพียง 145-bp inverted terminal repeats หรือประมาณร้อยละ 6 ของ AAV genome ทั้งหมด ดังนั้น vector ชนิดนี้มี genome capacity สำหรับ antisense DNA, promoter

และ reporter gene (เช่น neomycin resistance gene) ประมาณ 4.4 kb เมื่อเข้าสู่เซลล์เป้าหมายแล้วไวรัสสามารถรวมตัวเข้ากับ genome ของเซลล์ดังกล่าวได้ ทั้งนี้ AAV จะสร้าง RNA ในทิศ antisense เพื่อมาจับกับ mRNA เป้าหมายทำให้ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนได้ AAV นี้ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเพราะเป็น nonpathogenic vector ที่มีความปลอดภัยสูง ไม่พบว่าเป็นสาเหตุของโรค ไม่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบ และสามารถ infect เซลล์ที่ไม่แบ่งตัวได้ ระยะเวลาในการออกฤทธิ์นานอยู่ในช่วงสัปดาห์จนถึงเดือนหรือปี เช่นพบ expression ของ AAV-AS ที่กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดอยู่นานกว่า 9 สัปดาห์และที่สมองพบ expression นานกว่า 11 เดือน ข้อจำกัดของ vector ชนิดนี้คือ genome capacity ขนาดเพียง 4 kb อาจไม่เพียงพอในการบรรจุ AS DNA ขนาดใหญ่ได้ นอกจากนี้ในการผลิต vector ดังกล่าวมีความซับซ้อนกว่า vector ชนิดอื่นโดยจะต้องทำให้ปลอดจาก adenovirus เพื่อความปลอดภัยในการใช้

ตัวอย่างการศึกษาในระยะก่อนคลินิกของ Antisense gene therapy

1. Antisense knockdown ของระบบ renin-angiotensin-aldosterone (RAAS)

โปรตีนในระบบ RAAS เป็นเป้าหมายที่ได้รับความสนใจอย่างมากในการทำ antisense gene therapy เนื่องจากบทบาทของระบบ RAAS ในการควบคุมความดันโลหิตเป็นที่เข้าใจเป็นอย่างดี ยาที่ออกฤทธิ์

ต่อระบบนี้ในการควบคุมความดันได้แก่ ACE inhibitors และ AT₁-R blockers ซึ่งเป็นที่ยอมรับว่ามีประสิทธิภาพสูง มีกลไกการออกฤทธิ์หลายด้าน โดยเกี่ยวข้องกับการยับยั้งฤทธิ์ของ angiotensin-2 ทำให้หลอดเลือดคลายตัว ตลอดจนเกี่ยวข้องกับกระบวนการ fibrinolysis และ oxidative stress ซึ่งจากการศึกษาทางคลินิกของ Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE studies) พบว่า ramipril ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม ACE inhibitors แม้ในขนาดที่ลดความดันโลหิตเพียงเล็กน้อยแต่สามารถลดอัตราการตายจากโรคระบบหลอดเลือดและหัวใจได้อย่างมีนัยสำคัญ²⁷ แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการทำงานของระบบ RAAS นอกจากผลในการลดความดันโลหิตแล้ว ยังป้องกันหรือแก้ไขการเกิดพยาธิสภาพของระบบหลอดเลือดและหัวใจที่เกี่ยวข้องกับโรคความดันโลหิตสูงด้วย อีกทั้งโปรตีนในระบบ RAAS นี้มีการกระจายอยู่อย่างกว้างขวางในร่างกาย จัดได้ว่าเป็นเป้าหมายที่เหมาะสมสำหรับการทำ gene delivery

โปรตีนเป้าหมายที่สำคัญในระบบ RAAS ที่ได้มีการศึกษาวิจัยทางด้าน anti-sense gene therapy ได้แก่ AT₁-R, AGT และ ACE โดยมีการใช้ทั้ง nonviral vector system และ viral vector mediated system ในการส่งผ่าน antisense DNA ซึ่งให้ผลคล้ายกันในการลดระดับความดันโลหิตและการเกิดพยาธิสภาพของอวัยวะต่างๆ อันเนื่องมาจากความดันโลหิตสูง เช่น cardiac hypertrophy และ renal dysfunction ซึ่งข้อดีที่เห็นได้ชัดของการทำ antisense therapy ต่อโปรตีนในระบบ RAAS เมื่อเปรียบเทียบกับ

กับการใช้ยาคือระยะเวลาในการออกฤทธิ์ที่นานขึ้นและความจำเพาะต่อเป้าหมายของ AS ODN ดังตัวอย่างการศึกษาผลของ AGT-AS ODN ในรูป liposomes ที่ให้ทางหลอดเลือดดำเพียงครั้งเดียวแก่สัตว์ทดลองที่เป็น model ต่างๆของความดันโลหิตสูง เช่น SHR พบว่าสามารถลดความดันโลหิตได้นาน 7 วัน ในขณะที่ ACE-AS ที่อยู่ในรูป retro-viral-vector มีผลลดความดันโลหิตในหนู SHR ประมาณ 15-18 มม.ปรอท เป็นเวลา 100 วัน^{28,29} หรือผลของ AT₁R-AS ODN ที่ให้แก่ SHR หรือ 2-kidney, 1-clip(2K1C) rat, หรือ cold-induced hyper-tensive rat พบว่าลดความดันโลหิตลงได้ภายใน 24 ชม. เป็นเวลานาน 7 วัน โดยไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจ³⁰ และเมื่อใช้ AAV-based หรือ retroviral vector delivery system เป็นตัวนำส่ง gene ระยะเวลาการออกฤทธิ์นานมากขึ้นเป็นหลายสัปดาห์³¹ ทั้งนี้การกระจายตัวของ AS ODN ดังกล่าวมีอยู่มากที่ไตและตับ นอกจากนี้ยังพบที่หลอดเลือดและหัวใจเช่นกัน ทั้งนี้การออกฤทธิ์ของ AT₁R-AS ODN พบว่าสัมพันธ์กับจำนวน AT₁ receptor ที่ลดลง 20-40% ในอวัยวะเหล่านี้ โดยที่ไม่มีผลต่อจำนวน AT₂ receptor แต่อย่างใด ตลอดจนไม่มีผลเพิ่มระดับ angiotensin II ในพลาสมาดังเช่นการใช้ AT₁R antagonist³²

Antisense therapy ของโปรตีนระบบ RAAS นั้นไม่มีผลต่อสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุมที่มีความดันปกติ (normotensive animal)²⁹ ข้อที่น่าสนใจอีกประการหนึ่งคือผลในการป้องกันการเกิดภาวะความดันโลหิตสูงในระยะยาวเมื่อใช้ retrovirus vector ใน

การนำส่ง AS ODN ดังที่มีรายงานการศึกษาผลของ AT₁R-AS ในรูปของ retroviral particles ฉีดเข้าสู่หัวใจหนู SHR อายุ 5 วัน โดยพบ expression ของ AT₁R-AS อย่างน้อย 210 วันและมีผลป้องกันการเกิดความดันโลหิตสูงได้ในระยะยาวตลอดช่วงอายุของหนูทดลองนั้น^{29,33} ซึ่งผลทางเภสัชวิทยาจะคล้ายคลึงกับกับการใช้ AT₁R-antagonist ซึ่งนอกจากจะลดความดันโลหิตแล้วยังมีผลในการป้องกันการเกิดความผิดปกติของหลอดเลือด, เซลล์ endothelium, การเคลื่อนที่ของแคลเซียมในเซลล์ และ ion channels ใน renal artery เป็นต้น นอกจากนี้ antihypertensive phenotype จาก AT₁R-AS สามารถส่งผ่านไปแสดงผลในลูกรุ่นต่อไปได้ ดังจะเห็นได้จากผลการศึกษาในลูกรุ่น F1 และ F2 ที่เกิดจากหนู SHR ที่ได้รับ AT₁R-AS จะมีความดันโลหิตที่ต่ำกว่าตลอดจนมีพยาธิสรีรวิทยาของระบบหลอดเลือดและหัวใจที่ดีกว่าลูกหนูที่เกิดจากกลุ่ม SHR ที่ได้รับ virus vector เท่านั้น^{28, 29}

2. Antisense knockdown ของ β 1-adrenergic receptor^{34,35}

β 1-adrenergic receptor เป็นอีกเป้าหมายหนึ่งของการทำ antisense gene therapy ในการรักษาความดันโลหิตสูง เพื่อทดแทนการใช้ยาในกลุ่ม β -blockers เนื่องจากการทำ gene therapy ให้ผลการรักษานานกว่า และมีความจำเพาะสูงต่อ β 1-adrenergic receptor ซึ่งเป็นเป้าหมายที่ต้องการโดยที่ไม่มีผลกระทบต่อ β 2-adrenergic receptor นอกจากนี้ β 1-AS-ODN ไม่สามารถผ่าน blood brain barrier ได้ทำ

ให้ลดผลข้างเคียงที่อาจจะเกิดจากการยับยั้งการทำงานของ β_1 -adrenergic receptor ในระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งผลการศึกษาในหนู SHR ที่ได้รับ β_1 -AS-ODN ใน DOTAP และ DOPE ซึ่งเป็น cationic liposomes โดยการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ หนู เพียงครั้งเดียว พบว่าสามารถลดความดันโลหิตได้ประมาณ 38 มม.ปรอท เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ โดยไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจ ไม่ทำให้เกิด bradycardia ทั้งนี้ความหนาแน่นของ β_1 -receptor ที่หัวใจลดลงประมาณ 30%-50%

บทสรุป

วิธีการรักษาความดันโลหิตสูงด้วยการใช้ยาในปัจจุบันยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควรในการควบคุมความดันโลหิตและแก้ไขพยาธิสภาพของอวัยวะต่างๆ ที่เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากความดันโลหิตสูง gene therapy จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจในการนำมารักษาความดันโลหิตสูง โดยการเติม vasodilator gene (sense approach) หรือยับยั้ง vasoconstrictor gene (antisense approach) เพื่อให้ได้ผลในการควบคุมความดันโลหิตในระยะยาว และมีผลข้างเคียงน้อยกว่ายาลดความดันโลหิตสูงที่มีอยู่ในปัจจุบัน ซึ่ง antisense approach ของโปรตีนในระบบ RAAS และ β -adrenergic receptor ได้รับความสนใจมากเนื่องจากโปรตีนดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการควบคุมระดับความดันโลหิต และสามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพและประสิทธิผลในการรักษากับยาลดความดันโลหิตสูงที่ออกฤทธิ์

ต่อระบบดังกล่าวที่มีอยู่ในปัจจุบันได้โดยตรง

ปัจจัยสำคัญในการรักษาความดันโลหิตสูงด้วยการทำ gene therapy คือการเลือกระบบนำส่ง gene ไปยังเซลล์เป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพทำให้เกิดการ expression ของโปรตีนที่ต้องการในระยะเวลาที่เหมาะสม ตลอดจนมีความปลอดภัยในการใช้ ระบบนำส่งเหล่านี้ อาจแบ่งออกได้เป็น nonviral vector system เช่น liposome หรือ viral vector system เช่น AAV based vector เป็นต้น ซึ่งตัวนำส่งเหล่านี้จะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลที่มีต่อระยะเวลาในการออกฤทธิ์ของ gene ที่นำส่งเข้าสู่เซลล์

แม้ว่าผลการศึกษาในระยะก่อนคลินิกจะแสดงให้เห็นว่า gene therapy สามารถป้องกันและรักษาโรคความดันโลหิตสูงในระยะยาวได้ แต่ก่อนที่จะนำมาใช้ทางคลินิก ยังคงต้องศึกษาในประเด็นต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความปลอดภัย การควบคุม expression ของ gene ในร่างกายซึ่งจะรวมถึงการยุติการทำงานของ gene เมื่อต้องการหรือเกิดผลข้างเคียงขึ้น วิธีทางการนำยาเข้าสู่ร่างกาย และขยายผลการศึกษาใน model ต่างๆ ของความดันโลหิตสูงเป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

1. The seventh report of the Joint Nation Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure The JNC 7 report. *JAMA* 2003; 289:2560-72.
2. WHO/ISH Hypertension Guidelines Sub-Committee 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension guidelines for the management of hypertension. *J Hypertension* 1999;17: 151-185.

3. Ruzicka M and Leenen FHH. Monotherapy versus combination therapy as first line treatment of uncomplicated arterial hypertension. *Drugs* 2001;61: 943-954.
4. Waeber B and Brunner HR. The multifactorial nature of hypertension: the greatest challenge for its treatment? *J. Hypertens.* 2001; 19 (Suppl 3): S9-S16.
5. Freis E and Papademetriou V. Current drug treatment and treatment patterns with antihypertensive drugs. *Drugs* 1996; 52: 1-16.
6. Burt VL, Whelton P, and Roccella EJ. Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the third national health and nutrition examination survey. 1988-1991. *Hypertension* 1995; 25: 305-313.
7. David ST, Daniel TO, and Robert JP. Molecular genetics essential hypertension recent results and emerging strategies. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2001; 10: 71-79.
8. Castellano M, Muiesan ML, Beschi M, Rizzoni D, Cinelli A, Salvetti M, Pasini G, Porteri E, Bettoni G, Zulli R, Agabiti-Rosei E. Angiotensin II type 1 receptor A/C1166 polymorphism. Relationships with blood pressure and cardiovascular structure. *Hypertension* 1996; 28:1076-80.
9. Benetos A, Gautier S, Ricard S, Topouchian J, Asmar R, Poirier O, Larosa E, Guize L, Safar M, Soubrier F, and Cambien F. Influence of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients. *Circulation.* 1996; 94:698-703.
10. Bernard W and Hans RB. The multifactorial nature of hypertension the greatest challenge for its treatment? *J Hypertens.* 2001;19(suppl 3):s9-s16
11. Phillips MI. Gene therapy for hypertension The preclinical data. *Hypertension* 2001; 38: 543-548.
12. Dominiczak AF, Negrin DC, Clark JS, Brosnan MJ, McBride MW, and Alexander MY. Genes and hypertension from gene mapping in experimental models to vascular gene transfer strategies. *Hypertension* 2000; 35: 164-172.
13. Pachori AS, Huentelman MJ, Francis SC, Gelband CH, Katovich MJ, and Raizada MK. The future of hypertension therapy : sense , antisense ,or nonsense? *Hypertension* 2001; 37: 357-364
14. Gelband CH, Katovich MJ, and Raizada MK. Current perspectives on the use of gene therapy for hypertension. *Circ Res.* 2000; 87: 1118-1122.
15. Phillips MI. Is gene therapy for hypertension possible? *Hypertension* 1999; 33: 8-13.
16. Dzau VJ and Horiuchi M. In Vivo gene transfer and gene modulation in hypertension research. *Hypertension* 1996; 28: 1132-1137.
17. Lin KF, Chao J, and Chao L. Atrial natriuretic peptide gene delivery attenuates hypertension, cardiac hypertrophy and renal injury in salt sensitive rats. *Hum Gene Ther.* 1998, 9: 1429-1438.
18. Yayama k, Wang C, Chao L, and Chao J. Kallikrein gene delivery attenuates hypertension, cardiac hypertrophy and enhances renal function in Goldblatt hypertensive rats. *Hypertension.* 1998; 3: 1104-1110.
19. Chao J, Jim L, Lin KF, and Chao L. Adrenomedullin gene delivery reduces blood pressure in spontaneous hypertensive rats. *Hypertens Res.* 1997; 20: 2692-2677.
20. Lin KF, Chao J, and Chao L. Prolonged reduction of high blood pressure with human nitric oxide synthase gene delivery. *Hypertension.* 1997; 30: 307-313.
21. Dobrzynski E, Yoshida H, Chao J, and Chao L. Adenovirus-mediated kallikrein gene delivery attenuates hypertension and protects against renal injury in deoxycorticosterone-salt rats. *Immunopharmacology.* 1999; 15: 57-65.
22. Phillips MI, Gyurko R. Antisense oligonucleotides: new tools for physiology. *News Physiol Sci.* 1997; 12: 99 -105.
23. Gyurko R, Wielbo D, Phillips MI. Antisense inhibition of AT1 receptor mRNA and angiotensinogen mRNA in the brain of spontaneously hypertensive rats reduces hypertension of neurogenic origin. *Regul Pept.* 1993; 49: 167-174.
24. Stein CA, Cheng Y-C. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents: is the bullet really magical? *Science.* 1993; 261: 1004 -1012.
25. Li B, Hughes JA, Phillips MI. Uptake and efflux of intact antisense phosphorothioate deoxyoligonucleotide

- directed against angiotensin receptors in bovine adrenal cells. *Neurochem Int.* 1996; 31: 393–403.
26. Tang X, Mohuczy D, Zhang CY, Kimura B, Galli SM, and Phillips MI. Intravenous angiotensinogen antisense in AAV-based vector decreases hypertension. *Am J Physiol.* 1999; 277: H2392-H2399.
 27. Hemels ME, Bennett HA, Bonari L, Han D, Traverso ML, and Einarson TR. HOPE study impact on ACE inhibitors use. *Ann Pharmacother.* 2003; 37: 640-5.
 28. Gelband CH, Wang H, Gardon ML, Keene K, Goldberg DS, Reaves PY, Katovich MJ, and Raizada MK. ACE antisense prevents altered renal vascular reactivity, but not high blood pressure, in the SHR. *Hypertension* 2000; 35: 209-213.
 29. Wang H, Reaves PY, Gardon ML, Keene K, Goldberg DS, Gelband CH, Katovich MJ, Raizada MK. Angiotensin I-converting enzyme antisense gene therapy causes permanent antihypertensive effects in the SHR. *Hypertension.* 2000; 35: 202-8.
 30. Pachori AS, Wang H, Gelband CH, Ferrario CM, Katovich MJ, Raizada MK. Inability to induce hypertension in normotensive rat expressing AT(1) receptor antisense. *Circ Res.* 2000; 86: 1167-72.
 31. Phillips MI, Mohuczy-Dominiak D, Coffey M, Galli SM, Ping W, and Zelles T. Prolonged reduction of high blood pressure with an in vivo, non pathogenic adeno-associated viral vector delivery of AT1-R mRNA antisense. *Hypertension* 1997; 29: 374-380.
 32. Lu D, Raizada MK, Iyer S, Reaves P, Yang H, and Katovich MJ. Losartan versus gene therapy: chronic control of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1997; 30: 363-370.
 33. Iyer SN, Lu D, Katovich MJ, and Raizada MK. Chronic control of high blood pressure in the spontaneously hypertensive rat by delivery of angiotensin type 1 receptor antisense. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9960-9965.
 34. Zhang YC, Bui JD, Shen L, and Phillips MI. Antisense inhibition of β 1-adrenergic receptor mRNA in a single dose produced a profound and prolonged reduction in high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 2000; 101: 682-688.
 35. Zhang YC, Kimura B, Shen L, and Phillips MI. New β - blocker: prolonged reduction in high blood pressure with β 1 antisense oligodeoxynucleotides. *Hypertension* 2000; 35:219-224.