

# Antisens Oligonükleotitler ve Antibakteriyel Kullanımları

Yamaç TEKİNTAŞ\*, Devrim DEMİR-DORA\*\*, Mine HOŞGÖR-LİMONCU\*

\*Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

\*\*Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

## ÖZET

Antisens tedavi stratejisi, çeşitli genlerin protein oluşturmada susturulması amacıyla oligodeoksiribonükleotitlerin kullanılmasıdır. Antisens mekanizma, hedef mRNA'ya oligonükleotid dizisinin Watsons-Crick baz eşleşme yoluyla bağlanması sonucu gerçekleşmektedir. Bağlanmadan sonra iki temel yolak, ilgili genin protein oluşumunu engeller. Bunlardan ilki, oligonükleotidin bağlandığı bölgede RNaz H aracılı degradasyon oluşturmaktadır. RNaz enzimi ile parçalanmış gen dizisinden transkripsiyon olası olmadığı için protein oluşumu engellenir. İkincisi ise oligonükleotidin bağlanarak ilgili gen bölgesini kapatmasıyla oluşur. Böylece ribozomun gen dizisini okuması sterik olarak engellenir, posttranskripsiyonel işlemler inhibe edilir ve gen, ürün oluşturamaz.

Bu moleküllerin nükleazlardan korunmaları için çeşitli modifikasyonlar yapılmıştır. Bu modifikasyonlara göre antisens oligonükleotitler (ASO) kuşaklara ayrılabilirler. Modifikasyonlar ile nükleazlardan korunmalarına rağmen, hücre içlerine girişleri sınırlıdır. Bu kısıtlılığı giderebilmek amacıyla konjuge peptidler ve lipid bazlı taşıyıcı sistemler gibi çeşitli yöntemler kullanılması gerekmektedir.

Bakteri için esansiyel olan genlerin inhibisyonuyla ASO dizileri antibakteriyel olarak kullanılabilir. Ayrıca direnç genlerini hedef alan diziler sayesinde bakteriler duyarlı hale getirilebilirler. Antibiyotik direnç mekanizmalarından etkilenmeyen antisens tedavi stratejisinin pek çok bilim insanının ilgisini çekmektedir. Bu moleküllerin genel özellikleri, çalışma prensipleri ve bakteri eradikasyonu amacıyla kullanımını içeren çalışmalar bu derlemede özetlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Antisens oligonükleotitler, gen susturumu, antisens antibakteriyaller

## SUMMARY

### Antisense Oligonucleotids and Antibacterial Use

The antisense treatment strategy is to use oligodeoxyribonucleotides for the purpose of silencing various genes before they start producing proteins. The antisense mechanism is established by binding oligonucleotide strands to the target mRNA by way of Watsons-Crick base pairing. After binding, two basic pathways prevent the relevant gene from producing protein. The first of these is the formation of RNase H-mediated degradation by the oligonucleotide at the site of binding. Production of protein is hindered because translation becomes impossible from the gene strand that was broken down by the RNase enzyme. The second occurs when the oligonucleotide binds and closes the relevant gene site. In this way, ribosome is sterically hindered from reading the gene strand, posttranscriptional procedures are hindered and the gene cannot make production.

Various chemical modifications of these molecules to protect them from nucleases was performed. According to these modifications antisense oligonucleotides (ASO) can be divided into generations. Despite the protection from nucleases with modifications they have limited access to the cell interior. In order to eliminate this restriction it is necessary to use various methods such as peptide conjugates, lipid based carrier systems.

ASO sequences can be used as antibacterials by inhibition of essential genes for bacteria. Besides bacteria can be made susceptible by oligonucleotides targeting the resistance genes. The antisense treatment strategy which is not affected by antibiotic resistance mechanisms, attracts the attention of many scientist. General properties of these molecules, mode of action and studies involving the use of these molecules in bacterial eradication are summarized in this review.

**Keywords:** Antisense oligonucleotides, gene silencing, antisense antibacterials

## GİRİŞ

Antibiyotikler ilk keşfedildiği tarihten günümüze kadar geçen süreçte pek çok insanın yaşamını

kurtarmıştır. Ancak bilinen bir gerçek olarak bakteriler bu moleküllere direnç kazanmaktadır. Bu durum halk sağlığı açısından büyük sorunlar oluşturmakta, bu süreçteki en büyük korku ise

**Alındığı tarih:** 07.06.2016

**Kabul tarihi:** 20.07.2016

**Yazışma adresi:** Yamaç Tekintaş, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova / İzmir

**e-posta:** yamactekintas@yahoo.com

tüm moleküllere dirençli, tedavi edilemeyen bakterilerin yaratacağı enfeksiyonlardır. Bu durumun, antibiyotikler öncesi devirlere geri dönülmesine neden olabileceği düşünülmektedir<sup>(1)</sup>. Antibiyotiklere karşı gelişen direnç, ilaç endüstrisindeki yeni sınıf moleküllerin üretim hızının düşüklüğüyle beraber değerlendirildiğinde, antibiyotikler dışında tedavi yöntemlerinin ve potansiyellerinin değerlendirilmesi gerektiğini açıkça ortaya koymaktadır<sup>(2)</sup>. Dolayısıyla antibiyotikten farklı yollar üzerine etki gösteren, direnç mekanizmalarından etkilenmeyen farklı yaklaşımlar bu çerçevede incelenmektedir. Bakteriyel genlerin susturulması bu anlamda öne çıkan seçeneklerden biridir. Santral dogma kavramı 1958 yılında Francis Crick tarafından ortaya atılıp, bilim dünyası tarafından kabul görmüştür. Genotipik özellikten fenotipik özelliğe kadar geçen süreci açıklayan bu kavram sayesinde DNA'dan RNA'ya ve son ürün olan proteine giden mekanizmaların bütünü keşfedilmesi genlere ait baz dizilimini, fonksiyonlarını açıklanabilir hale getirmiştir<sup>(3)</sup>. Bu süreçte elde edilen veriler gen inhibisyonunun temel prensiplerinin oluşturulmasına da yardımcı olmuştur.

### **Antisens mekanizma ve Antisens oligonükleotid çeşitleri**

Hastalıkların çoğu zaman proteinlerin eksik veya fazla üretilmesiyle ortaya çıktığı bilinen bir gerçektir. Aynı zamanda enfeksiyon etkeni olan mikroorganizmalar da yine çeşitli proteinler aracılığı ile enfeksiyon hastalığına yol açmaktadır. Dolayısıyla santral dogma ile açıklanan basamakların bloke edilmesi hastalığa neden olan proteinin oluşmasının inhibisyonuna neden olduğundan, hastalıklara veya hastalık etkenlerine ait mekanizmaların bozulması beklenmektedir<sup>(4)</sup>. 1978 yılında Stephenson ve Zamecnik<sup>(5)</sup> tarafından "Rous Sarcoma Virus" (RSV) ile yapılan çalışmalar bu anlamdaki ilk örneklerdendir. RSV integrasyon genine oligonükleotidler bağlamak suretiyle oluşturulan çalışmada, viral integras-

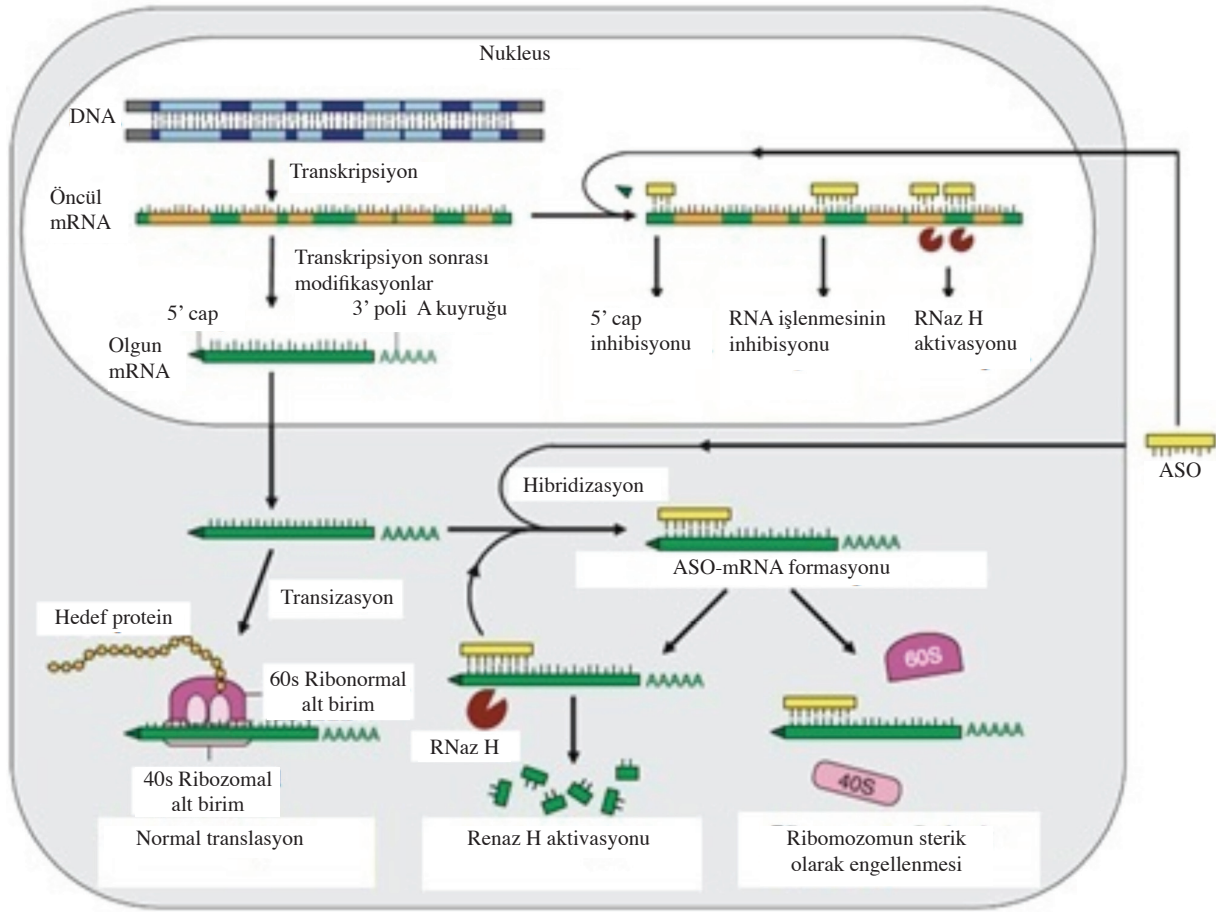
yonun engellenebildiği tespit edilmiştir. Bu ve bunun gibi yaklaşımlar ve çalışmalar aracılığıyla ortaya çıkmış olan antisens (gen susturumu, "knock down") tedavi yaklaşımı genetik şifre akışının protein oluşmadan engellenmesidir. Bu amaçla ilgili gene ait mRNA dizisine Watsons-Crick baz eşleşmesi sistemiyle belirli uzunlukta oligonükleotidler bağlanmaktadır. Bu bağlanmanın gerçekleşmesi protein oluşumunu çeşitli mekanizmalar aracılığıyla inhibe etmektedir. Bunlar Şekil 1'de<sup>(4)</sup> görüldüğü üzere oligonükleotidin bağlanmasıyla;

- Ribozomun mRNA'dan okuma yapmasının sterik olarak engellenmesi,
- Antisens oligonükleotid (ASO) mRNA çift iplikli melez yapısının RNaz H enzimi aracılığıyla degradasyona uğraması,
- Dizilimdeki intron ve ekzonların işleme mekanizmasının ("splicing") engellenmesi,
- Ribozomun okuma yapması için diziyi tanıyacağı bölge olan 5' cap oluşumunun engellenmesi şeklinde açıklanabilir<sup>(4,6)</sup>.

### **Antisens tedavinin avantajları:**

- Uygun oligonükleotidlerin sentezlenmesi kısa sürer, ilgili gene ait DNA diziliminin veya mRNA diziliminin bilinmesi yeterlidir.
- Moleküllerin hedefi tek boyutludur. Proteinle etkileşimlerde proteinin üç boyutlu yapısının da incelenmesi gerekir.
- Oligonükleotid bağlanması için hidrojen bağları yeterlidir, proteinlerde etkileşim için farklı bağ kuvvetlerine de ihtiyaç duyulur.
- Uygun şekilde hazırlanan ASO'lar istenilen dokuya veya etkene hedeflenebilir<sup>(7)</sup>.

Modifiye edilmemiş DNA veya RNA molekülleri nükleaz ataklarına açıktır. Aynı zamanda zayıf farmakokinetik özellikleri nedeniyle bu şekilde kullanımları kısıtlı olduğu için bu dezavantajları gidermek amacıyla çeşitli modifikas-

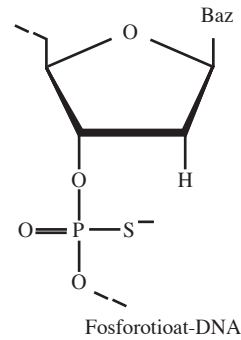


Şekil 1. Antisens oligonükleotitlerin etki mekanizmaları<sup>(4)</sup>.

yonlar yapılması gerekmiştir. Bu değişikliklerde ana hedef bölgeler fosfodiester bağı ve şeker halkasıdır. Yapılan modifikasyonlar sonucu oluşan antisens oligonükleotitler 1., 2., ve 3. kuşak ASO olarak sınıflandırılmıştır<sup>(8,9)</sup>.

### 1. Kuşak ASO

Bu grup moleküller fosfortioat (phosphorothioate-PS) modifiye moleküller olarak da tanımlanmaktadır (Şekil 2). Fosfodiester bağında oksijen atomu sülfür atomu ile değiştirilerek elde edilmişlerdir<sup>(10)</sup>. Yapılan bu modifikasyon ile nükleazlara direnç özelliği kazandırılarak molekül daha etkin hâle getirilmiştir. Bu grup oligonükleotitler RNaz H enzimini aktive ederek bağlandığı dizide katlanmalara ve degradasyona yol açarlar. Bununla birlikte, modifi-



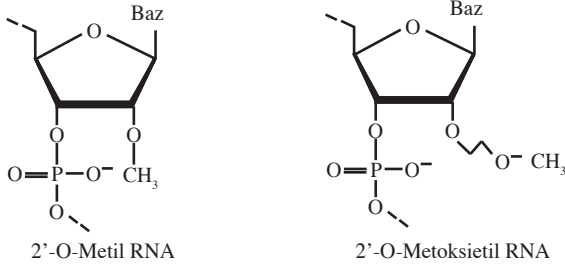
Şekil 2. "1. kuşak ASO" örneği olarak fosfortioat-DNA.

kasyon ASO-mRNA heterodupleksi, nükleotid başına 0.5°C erime derecesi değişikliğine neden olmaktadır. Bu ısı değişikliği moleküllerin afinitelerinde azalmaya neden olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda bu gruba ait moleküllerde spesifik olmayan bağlanmalara rastlansa da en sık olarak kullanılmış olan ASO türevi bu gruptur<sup>(11,12)</sup>.

Yirmi bir bazlık nükleotid dizisi içeren “fomivirsen” piyasa adıyla ruhsatlandırılmış ve klinik kullanıma girmiş bir moleküldür<sup>(4)</sup>.

## 2. Kuşak ASO

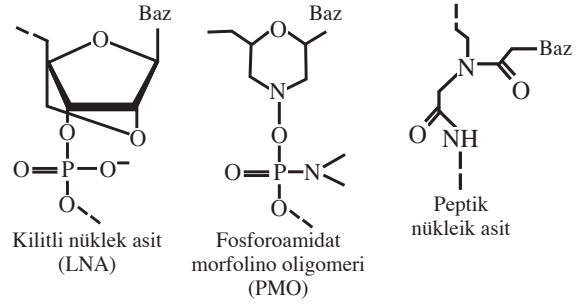
Bu grupta nükleazlara direnç ve mRNA bağlanma afinitesinde artış amacıyla molekülün 2' alkil modifikasyonları yapılmıştır. 2' metil ve 2' metoksietil modifiye edilmiş moleküller en sık çalışılan ikinci ASO grubudur (Şekil 3). Beklenen bir sonuç olarak yapılmış modifikasyonlar sonucu molekül RNaz H etkinliği taşımamaktadırlar. Bunun üstesinden gelebilmek amacıyla melez moleküller tasarlanmıştır. 5' ve 3' uçlarında 2' alkil modifiye 4-5 bazlık, orta kısmında ise yaklaşık 10 bazlık 1. jenerasyon özelliği taşıyan moleküllerin nükleaz direnç özelliği azalmadan RNaz H aracılı etki göstermesi sağlanmıştır<sup>(13-16)</sup>.



Şekil 3. “2. Kuşak ASO” örneği olarak 2'-O-Metil RNA ve 2'-O-metoksietil RNA.

## 3. Kuşak ASO

Bu gruptaki moleküllerde afinite artırımı ve nükleaz direncini sağlayabilmek için furanoz halkasında modifikasyonlar yapılmıştır. Bu grubun üyelerinden peptid nükleik asitler (PNA) fosfodiester belkemiği psödopeptid polimeriyle yer değiştirmiştir (Şekil 3). Nükleazlardan etkilenmeyen, RNaz H etkinliği bulunmayan ancak sterik engellemeyi etkin şekilde yapabilen, oldukça istikrarlı moleküllerdir. Nötr elektriksel yükleri nedeniyle moleküllerin negatif yüklü RNA moleküllerine bağlanma sırasında daha az elektriksel itme kuvvetiyle karşılaşması etkinlikleri artırmıştır<sup>(17)</sup>.



Şekil 4. “3. Kuşak ASO” yapıları.

Kilitli nükleik asitler (Locked nucleic acid-LNA) bu kuşağın bir başka üyesidir. Modifikasyonlar hedeflerine olan afiniteyi artırmış, nükleazlara direnç katmış ve oluşan heterodupleks yapıya termal stabilite kazandırmıştır. Ancak bu gruba ait moleküllerin de RNaz H aracılı aktivitesi bulunmamaktadır<sup>(18-20)</sup>. Fosforoamidat morfolino oligomerleri (PMO) bu kuşaktaki diğer moleküllerden biridir. Nötr elektrik yükü aktiviteyi artırmıştır. Bu oligomerler de RNaz H aracılı etkinlik göstermezler, gen susturumu işlevlerini sterik engelleme aracılığıyla yaparlar<sup>(21,22)</sup>.

## ASO'ların hücre içine hedeflenmeleri

Çeşitli modifikasyonlarla bağlanma afiniteleri ve nükleazlara dirençleri artırılmış olsa da ASO'ların hücre içinde istenilen seviyelere ulaşamadıkları belirlenmiştir. Çeşitli stratejiler ile bu zaaf giderilmeye çalışılmıştır.

Mikroinjeksiyon ve elektroporasyon gibi mekanik yöntemlerin ASO'ların hücre içerisine alınmasında kullanılabileceği düşünülmüş ve in-vitro koşullarda olumlu sonuçlar alınmıştır. Ancak bu yöntemlerin canlı sistemler üzerine uygulanabilmesi ve in-vivo araştırmaların yapılabilmesi pek olası görünmemektedir. Bu nedenle farklı alternatiflerin daha uygun olduğu düşünülmektedir<sup>(23)</sup>.

Membran penetran peptidler (“cell penetrating peptides”-CPP) ile konjuge edilmek suretiyle ASO'lar hücre içine hedeflenmiştir. Böylece

geçirgenlik ve etkide artış elde edilmeye çalışılmıştır. CPP'ler 30 amino asitten kısa peptid zincirleridir. Bu moleküllerin kullanımında hedeflenecek molekül ile kimyasal konjugasyon yapılabileceği gibi, molekülle stabil bir kompleks oluşturarak da etkinlik sağlanabilir. Amfipatik özellikleri sayesinde membrandan geçiş özelliğine sahip moleküller olan bu peptid zincirlerinin membrandan geçiş mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış olmakla beraber, en sık tercih edilen yöntemlerden biridir. İlk olarak 1998 yılında Good ve ark.<sup>(24)</sup> tarafından denenen peptid modelleri uygulanacak molekül ve bakteri türüne göre değişiklik göstermektedir.

Veziküler taşıyıcı sistemler, uzun yıllardır ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmaktadır. Bu sistemlerin ASO moleküllerinin hedeflenmesinde kullanılabileceği düşünülmüştür. Lipozomlar bu sistemlerin en bilinen örneklerinden biridir. Sferik lipid yapılar olan lipozomların boyutları mikrometre ile nanometre arasında değişkenlik gösterebilir. İstenilen pek çok farklı tipte molekülü hedef bölgeye metabolik yollardan etkilenmeden taşıyabilmesi, hücrel membranları taklit edebilir yapısı, biyolojik sistemlere uyumlu karakter göstermeleri gibi avantajları sayesinde ASO uygulamalarında çalışılmış yöntemlerdendir<sup>(25)</sup>.

Bir başka taşıyıcı sistem olan niozomlar, uzun yıllardır ilaç ve gen taşıyıcı sistem olarak kullanılmakta olan lipozomlar ile kıyaslandığında lipozomların stabilite sorunları ve daha pahalı olması nedeniyle tercih edilmektedir<sup>(26)</sup>. Niozomlar antineoplastik, antiviral, antibakteriyel, antiinflamatuvar ajanlar, kozmetik preparatlar, peptid- proteinler ve antisens oligonükleotidler için taşıyıcı sistem olarak kullanılmıştır<sup>(27)</sup>. Antisens oligonükleotidler sorbiton monoester ve polisorbitat katyonik niozomları ile Cos-7 ve HeLa hücreleri içerisine etkin bir şekilde taşınmış ve istenen gen baskılanması başarıyla sağlanmıştır<sup>(28-31)</sup>.

## Antibakteriyel ASO'lar

ASO'lar ile genlerin susturulması ve çeşitli proteinlerin oluşumlarının engellenmesi sayesinde bu moleküllerin mikrobiyolojide etkenin eradikasyonu için kullanılabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla bakteri üreme ve gelişmesi için gerekli olan biyokimyasal yollardaki esansiyel genlerin inhibisyonu yapılarak, antibakteriyel etki gösterebilecek ASO molekülleri üzerine araştırmalar yapılmıştır<sup>(9)</sup>.

Greenberg ve ark.<sup>(32)</sup> tarafından yapılan çalışmada, *Burkholderia cepacia* complex bakterisinde, açıl taşıyıcı protein geni antisens hedef olarak belirlenmiş ve lipid biyosentezi için esansiyel proteini kodlayan bu genin antisens mekanizmayla susturulmasıyla bakteri üremesi engellenmeye çalışılmıştır. Kontrol amaçlı olarak hiçbir geni hedef almayan diziler kullanılmıştır. ASO'ların peptid konjugasyonu ile yapılan denemelerde MİK değerlerinde anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca konjuge edilen peptidin de etkinlikte değişiklik yaratabileceği saptanmıştır.

2014 yılında çoklu ilaç direnci (ÇİD) gösteren *Acinetobacter baumannii* kökenlerinde 3. kuşak ASO olan PNA dizileri peptid ile konjuge edilerek kullanılmış ve DNA giraz A (*gyrA*) geni hedef alınmıştır. Çalışma sonucunda anti-*gyrA* PNA'ların gen ifadesini etkili şekilde inhibe ettiği ve bakterinin büyümesini engellediği tespit edilmiştir. Yine PNA yapısındaki antisens oligonükleotitler kullanılarak yapılan bir başka çalışmada, *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinde esansiyel genler hedef alınmıştır. Oldukça az konsantrasyonda bile bakterisidal etkinlik gösteren diziler tespit edilmiştir. mRNA ifadesindeki azalma düzeyleri ile veriler desteklenmiştir<sup>(33)</sup>. Mellbye ve ark.<sup>(34)</sup> yaptığı bir başka çalışmada, ise katyonik karakter göstermesi sağlanan PMO molekülleri, CPP ile *Escherichia coli* üzerine hedeflenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda *acpP*

geni hedefleyen diziler ile kontrol amaçlı olarak kullanılan ampisiline yakın MİK değerleri elde edilmiştir. Ayrıca dizilerin katyonik hâle getirilmesinin negatif yük karakteri gösteren RNA moleküllerine bağlanmayı artırabileceği de ortaya konmuştur.

Wang ve ark.<sup>(35)</sup> tarafından yapılmış, direnç mekanizmalarının gen susturma yöntemi ile araştırıldığı bir çalışmada, fosforotioat oligonükleotidler, lipozomal formülasyon ile bakterilere uygulanmış ve gen ifade düzeyleri moleküler tekniklerle araştırılmıştır. Direnç sağlayan genin inhibisyonu başarıyla sağlanmış, kökenlerin daha önce direnç gösterdikleri antibiyotiklere karşı MİK değerlerinde anlamlı düşüşler saptanmıştır. Meng ve ark.<sup>(36)</sup> yaptığı çalışmada, lipozom içerisinde taşınan fosforotioate oligomerleri ile *mecA* geni susturulmaya çalışılmıştır. Yüksek derece korunmuş bir bölge olan ve metisilin direncinden sorumlu olan bu genin hedef alınmasıyla, izolatların beta laktam antibiyotiklere daha duyarlı hâle gelmesi, oksasilinle tamamen inhibe edilebilmesi sağlanmıştır.

ASO'ların esansiyel bakteriyel genlerin susturulması sayesinde antibakteriyel etkinliklerini araştırarak ve ortaya koyan pek çok çalışma bulunmaktadır. Bununla beraber, farklı hastalıklarda etkin olan proteinlerin inhibe edilmesini olası kılması, bu moleküllerin antiviral, immünojenik hastalıklar ve kanser<sup>(37,38)</sup> gibi pek çok alanda etkinliklerini inceleyen çalışmaların ortaya çıkmasına katkıda bulunmuştur.

## Sonuç

Antibiyotik direncini giderek arttığı günümüzde farklı alternatiflerin enfeksiyon tedavisindeki potansiyelleri pek çok araştırmacının ilgisini çekmektedir. Farklı mekanizmalar ile etki gösterebilmeleri nedeniyle antibiyotik direnç mekanizmalarından etkilenmeyen bu yöntemlerden birinin antisens antibakteriyel moleküller olaca-

ğı düşünülmektedir. Uygun genleri hedef alan, doğru yöntemlerle hücre içine aktarımı sağlanan ASO'ların bakterilerin üremesini inhibe eden, direnç genlerini susturmaya yönelik çalışmalar bulunmakla birlikte, enfeksiyon tedavisindeki potansiyellerini, farmakokinetik, farmakodinamik ve toksikolojik açıdan da değerlendirecek multidisipliner çalışmalara gereksinim olduğu düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. **Livermore DM.** Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother* 2009; 64(Suppl 1):S29-36.  
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkp255>
2. **Johnsen PJ, Townsend JP, Bøhn T, Simonsen GS, Sundsfjord A, Nielsen KM.** Factors affecting the reversal of antimicrobiol-drug resistance. *Lancet Infect Dis* 2009; 9:357-64.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70105-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70105-7)
3. **Watson JD, Crick FHC.** A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953; 171:737-8.  
<http://dx.doi.org/10.1038/171737a0>
4. **Chan JH, Lim S, Wong WS.** Antisense oligonucleotides: From design to therapeutic application. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33:533-40.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04403.x>
5. **Stephenson ML, Zamecnik PC.** Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75:285-8.  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.75.1.285>
6. **Warren TK, Shurtleff AC, Bavari S.** Advanced morpholino oligomers: A novel approach to antiviral therapy. *Antiviral Res* 2012; 94:80-8.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.02.004>
7. **Singh J, Kaur H, Kaushik A, Peer S.** A review of antisense therapeutic interventions for molecular biological targets in various diseases. *Int J Pharmacol* 2011; 7:294-15.  
<http://dx.doi.org/10.3923/ijp.2011.294.315>
8. **Kurreck J.** Antisense technologies. Improvement through novel chemical modification. *J Biochem* 2003; 270:1628-44.  
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03555.x>
9. **Bai H, Luo X.** Antisense Antibacterials: From Proof-Of-Concept to Therapeutic Perspectives. In: Bobbarala V. ed. *A Search for Antibacterial Agents*. 1th ed. Rijeka, InTech, 2012: 319-44.  
<http://dx.doi.org/10.5772/33347>
10. **Eckstein F.** Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: what is their origin and what is unique about them? *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2000; 10:117-21.  
<http://dx.doi.org/10.1089/oli.1.2000.10.117>
11. **Crooke ST.** Progress in antisense technology: The end of beginning. *Methods Enzymol* 2003; 313:3-45.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)13003-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(00)13003-4)
12. **Chen X, Dudgeon N, Shen L, Wang JH.** Chemical

- modification of gene silencing oligonucleotides for drug discovery and development. *Drug Discov Today* 2005; 10:587-93.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03426-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03426-4)
13. **Altmann KH, Fabbro D, Dean NM, et al.** Second-generation antisense oligonucleotides: Structure-activity relationships and design of improved signal-transduction inhibitors. *Biochem Soc Trans* 1996; 24:630-7.  
<http://dx.doi.org/10.1042/bst0240630>
  14. **Dean NM, Bennet CF.** Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer. *Oncogene* 2003; 22:9087-96.  
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1207231>
  15. **Crooke ST.** Progress in antisense technology. *Annu Rev Med* 2004; 55:61-95.  
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.med.55.091902.104408>
  16. **Turner JJ, Fabani M, Arzumanov AA, Ivanova G, Gait MJ.** Targeting the HIV-1 RNA leader sequence with synthetic oligonucleotides and siRNA: chemistry and cell delivery. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758, 290-300
  17. **Nielsen PE.** PNA technology. *Mol Biotechnol* 2003; 26:233-48.  
<http://dx.doi.org/10.1385/MB:26:3:233>
  18. **Simões-Wüst AP, Hopkins-Donaldson S, Sigrist B, Belyanskaya L, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U.** A functionally improved locked nucleic acid antisense oligonucleotide inhibits Bel-2 and Bel-xL expression and facilitates tumor cell apoptosis. *Oligonucleotides* 2004; 14:199-209.  
<http://dx.doi.org/10.1089/1545457042258297>
  19. **Fluiter K, Frieden Ö, Vreijling J, et al.** On the in vitro and in vivo properties of four locked nucleic acid nucleotides incorporated into an anti-H-Ras antisense oligonucleotide. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 16:959-66.  
<http://dx.doi.org/10.1002/cbic.200400419>
  20. **Stein CA, Hansen JB, Lai J, et al.** Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents. *Nucleic Acids Res* 2010; 38:e3.  
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkp841>
  21. **Arora V, Devi GR, Iversen PL.** Neutrally charged phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers: uptake, efficacy and pharmacokinetics. *Curr Pharm Biotechnol* 2004; 5:431-9.  
<http://dx.doi.org/10.2174/1389201043376706>
  22. **Iversen P.** Morpholinos. In: Crooke ST eds. Antisense drug technology: principles, strategies, and applications. 2nd ed. Boca Raton FL CRC Press, 2008:375-88.
  23. **Gupta S, Singh RP, Rabadia N, Patel G, Panchal H.** Antisense technology. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2011; 7:38-45.
  24. **Good L, Nielsen PE.** Inhibition of translation and bacterial growth by peptide nucleic acid targeted to ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:2073-6.  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.5.2073>
  25. **Alhariri M, Azghani A, Omri A.** Liposomal antibiotics for the treatment of infectious disease. *Expert Opin Drug Deliv* 2013; 10:1515-32.  
<http://dx.doi.org/10.1517/17425247.2013.822860>
  26. **Vyas SP, Khar RK.** Targeted and Controlled Drug Delivery Novel Carrier Systems. 1th ed. New Delhi; CBS Publishers and Distributors 2011: 249-79.
  27. **Sankhyan A, Pawar P.** Recent trends in niosome as vesicular drug delivery system. *JAPHAC* 2012; 2:20-32.
  28. **Huang YZ, Gao JQ, Chen JL, Liang WQ.** Cationic liposomes modified with non-ionic surfactants as effective non-viral carrier for gene transfer. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2006; 49:158-64.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.03.014>
  29. **Huang YZ, Han G, Wang H, Liang WQ.** Cationic niosomes as gene carriers: preparation and cellular uptake in vitro. *Pharmazie* 2005; 60:473-4.
  30. **Huang YZ, Rao Y, Chen JL, Yang VC, Liang W.** Polysorbate cationic synthetic vesicle for gene delivery. *J Biomed Mater Res A* 2011; 96:513-9.  
<http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.32999>
  31. **Huang Y, Chen J, Chen X, Gao J, Liang W.** PEGylated synthetic surfactant vesicles (Niosomes): novel carriers for oligonucleotides. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19:607-14.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s10856-007-3193-4>
  32. **Greenberg DE, Marshall-Batty KR, Brinster LR, et al.** Antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers targeted to an essential gene inhibit *Burkholderia cepacia* complex. *J Infect Dis* 2010; 201:1822-30.  
<http://dx.doi.org/10.1086/652807>
  33. **Wang H, He Y, Xia Y, Wang L, Liang S.** Inhibition of gene expression and growth of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* by antisense peptide nucleic acids. *Mol Biol Rep* 2014; 41:7535-41.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11033-014-3643-2>
  34. **Mellbye BL, Weller DD, Hassinger JN, et al.** Cationic phosphorodiamidate morpholino oligomers efficiently prevent growth of *Escherichia coli* in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:98-106.  
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkp392>
  35. **Wang H, Meng J, Jia M, et al.** oprM as a new target for reversion of multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; 60:275-82.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00742.x>
  36. **Meng J, Wang H, Hou Z, et al.** Novel anion liposome-encapsulated antisense oligonucleotide restores susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and rescues mice from lethal sepsis by targeting mecA. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:2871-8.  
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01542-08>
  37. **Galletti R, Masciarelli S, Conti C, et al.** Inhibition of Epstein Barr Virus LMP1 gene expression in B lymphocytes by antisense oligonucleotides: Uptake and efficacy of lipid-based and receptor-mediated delivery systems. *Antiviral Res* 2007; 74:102-10.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.09.001>
  38. **Orfanelli U, Jachetti E, Chiacchiera F, et al.** Antisense transcription at the TRPM2 locus as a novel prognostic marker and therapeutic target in prostate cancer. *Oncogene* 2015; 34:2094-102.  
<http://dx.doi.org/10.1038/onc.2014.144>