

Особенности фармакокинетики АНТИСМЫСЛОВЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ препаратов

Хайтов М.Р., Смирнов В.В.

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, г. Москва

Резюме

В обзоре рассмотрены фармакокинетические особенности различных антисмысловых олигонуклеотидных препаратов. Проведено сравнение фармакокинетики препаратов первого и второго поколения. А так же рассмотрено влияние на фармакокинетику химической модификации молекулы.

Ключевые слова: антисмысловые олигонуклеотиды, фосфотиоатные олигодеоксинуклеотиды, фармакокинетика

Pharmacokinetics of antisense oligonucleotide drugs

Khaitov M.R., Smirnov V.V.

FGBI «Institute of Immunology» FMBA of Russia, Moscow

Summary

This review covers the pharmacokinetic characteristics of the various antisense oligonucleotide drugs. A comparison of the pharmacokinetics of drugs first and second generation. As well as the influence on the pharmacokinetics of the chemical modification of the molecule.

Keywords: antisense oligonucleotides, phosphorothioate oligodeoxynucleotides, pharmacokinetics

Введение

Фармакокинетические свойства антисмысловых олигонуклеотидов (АСО) становятся наиболее понятными при рассмотрении их физических и химических свойств. Такие параметры как заряд, молекулярная масса и амфипатическая природа фосфотиоатных АСО оказывают заметное влияние на их фармакокинетику. Особенно значимое влияние на фармакокинетические свойства АСО оказывает химическая структура, в частности фосфотиоатная группа и 2'-метоксиэтил (МОЭ).

Всасывание, распределение, метаболизм, и выведение фосфотиоатных олигодеоксинуклеотидов (ОДН) первого поколения были тщательно изучены на лабораторных животных и в клинических исследованиях [1, 16, 18, 19, 20, 23, 28, 37, 38, 39, 40, 58]. Особенности фармакокинетики препаратов фосфотиоатных АСО заключаются в следующем: введённые парентерально фосфотиоатные ОДН быстро оказываются в плазме крови, где они связываются с гидрофильными участками белков плазмы и таким образом избегают гломерулярной фильтрации. Эти гидрофильные участки отличны от других гидрофильных участков, с которыми связываются липофильные препараты, и, таким образом, конкуренция за связывание с белками плазмы для АСО невелика. Кинетика в плазме характеризуется короткой фазой распределения (порядка нескольких часов), а затем наступает фаза выведения препарата с

периодом его полувыведения, составляющим дни или недели. Начальная фаза распределения обязательно включает связывание АСО с белками и распределение этих комплексов по тканям печени, почек, лимфатических узлов, костного мозга и селезёнки, которые являются местами наиболее активного связывания и накопления АСО. Совершенно очевидно, что фаза выведения АСО вследствие начального связывания с белками, определяется начальным этапом его распределения. Вследствие возможного насыщения белков, площадь под фармакокинетической кривой (AUC) увеличивается с увеличением дозы, так как АСО уже не связываются с белками после их насыщения, а попадают в свободном виде в кровотоки. После связывания АСО попадают в клетки по градиенту концентрации из внеклеточного пространства через клеточную мембрану во внутриклеточное пространство, вероятно, с помощью белка-переносчика. АСО в клетках связываются с доступными мишенями, но главным образом АСО в клетках, вероятнее всего, связываются с внутриклеточными белками. В клетке убиквитарные нуклеазы, но не ферменты цитохрома P450, метаболизируют препараты АСО. Поскольку ферменты цитохрома P450 обычно метаболизируют низкомолекулярные препараты, АСО не конкурируют в метаболических процессах с обычными низкомолекулярными соединениями, снижая риск развития лекарственных взаимодействий. Выведение АСО с мочой в конечном счёте является ре-

зультатом метаболизма в тканях и установления равновесия метаболитов и нативного вещества вне тканей и в системном кровотоке. Эти процессы у лабораторных животных и человека очень сходны, в силу чего не удаётся выявить межвидовую корреляцию между лабораторными животными и человеком.

В настоящее время конфигурация «второго поколения» АСО, чьей особенностью являются МОЭ группы в положении 2'-нуклеотидов на 3'- и 5'-концах наиболее широко используется в клинических исследованиях. Эта конфигурация представляет собой более совершенную структуру по сравнению с немодифицированными фосфотиоатными ОДН, являющимися антисмысловыми препаратами первого поколения. Это обусловлено её повышенной эффективностью, уменьшенной токсичностью и повышенным периодом полувыведения. Многие факторы, связанные с переходом от первого ко второму поколению АСО, имеют непосредственное отношение к улучшению их фармакокинетики.

Особенности химического строения АСО

Фосфотиоатный скелет

Самые ранние попытки создать препараты с антисмысловой активностью были связаны с использованием немодифицированной ДНК, которая, к сожалению, была очень восприимчива к разрушению нуклеазой. Как оказалось, убиквитарные нуклеазы расщепляют фосфодиэстеразные связи нативной ДНК, в результате чего период полувыведения немодифицированных АСО составлял минуты. Такая быстрая деградация была основной особенностью фармакокинетического профиля немодифицированных антисмысловых ДНК. Изменение фосфодиэфирного скелета ДНК на фосфотиоатный резко изменило фармакокинетический профиль АСО. В этих препаратах фосфотиоатная структура заменяет в фосфодиэфирных связях один атом серы на один немостииковый атом кислорода. Такая структура повышает устойчивость АСО к нуклеазам и, как следствие, улучшает их кинетические свойства.

Фосфотиоатная хиральность

Как показали исследования, тиатион диэфирного скелета АСО не только повышает его устойчивость к нуклеазам, но и способствует возникновению хиральности, то есть возможности существования стереоизомеров, по каждой фосфотиоатной связи, что приводит к тому, что в любой 20-мер АСО существуют 219 Sp или Rp стереоизомеров [14, 15]. Комбинация резистентности к нуклеазам и повышение связывания с белками сильно влияет на фармакокинетику АСО. Повышение стабильности фосфотиоатных АСО приводит к тому, что период полувыведения препарата из плазмы увеличивается до 30–60 минут в сравнении с периодом полувыведения фосфодиэфирных АСО, составляющим 1–2 минуты.

Устойчивость к нуклеазам и хиральность из-за замены фосфодиэфирных на фосфотиоатные связи заслу-

живают обсуждения, потому что физические свойства связанные с этой структурной особенностью важны как для первого-, так и для второго поколений АСО. Устойчивость к нуклеазам фосфотиоатных АСО возникает из-за близости серы на немостииковом кислороде в активном участке экзонуклеазы к иону металла. Эта близость может вызывать смещение иона металла из активного участка. Данный эффект был продемонстрирован на модели 3'–5' экзонуклеазы ДНК-полимеразы. Рентгеновские кристаллографические данные подтверждают эту гипотезу о смещении иона металла. Очевидные различия в чувствительности стереоизомеров к экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы согласуются с предложенной конформацией фосфотиоатных стереоизомеров ОДН в активном участке. Вполне вероятно, что хиральность фосфотиоатных связей может помешать другим нуклеазам таким же образом, то есть смещением иона металла, хотя различные экзонуклеазы могут показать различные предпочтения связей Rp и Sp в зависимости от природы активного центра фермента.

В альтернативе, сера может просто занимать место кислорода в диэфирных связях. Различия в способности серы брать на себя отрицательный заряд, по сравнению с кислородом, позволяют прогнозировать изменения активного центра. Это изменение, скорее всего, происходит из-за гидролиза фосфодиэфирных связей, и может осуществляться через формирование переходного пятивалентного фосфора с двумя отрицательно заряженными атомами кислорода. Замена одного из экваториальных атомов кислорода серой будет иметь отрицательные последствия на активность ферментов: (1) снижается связывание воды, которая стабилизирует местный отрицательный заряд на атомах, что приводит к трудностям для получения второго отрицательного заряда серы; и (2) снижение связывания Mg^{2+} с серой. Существует доказательство для последнего эффекта в исследованиях уровня расщепления рибозимами диастереомерных фосфотиоатных включений, когда добавление Mg^{2+} ингибирует расщепляющие эффекты фосфотиоатных рибозимов [51]. Кроме того, было показано, что существует некоторое снижение активности нуклеаз на участках скелета, находящихся дальше от фосфотиоатных связей, что даёт возможность предположить передачу эффекта хиральности [54]. Этот феномен лучше всего объясняется изменениями в расположении молекул воды вокруг фосфотиоатного скелета по сравнению с фосфодиэфирным [60].

Стереоспецифические воздействия на активность нуклеаз заметно влияют на фармакокинетику фосфотиоатных АСО и это наиболее наглядно проявляется в скорости метаболизма фосфотиоатных АСО первого поколения в плазме крови. Скорость полного выведения АСО из плазмы уменьшается, предполагая замедление метаболизма. Эти изменения в скорости не могут быть объяснены исходя только из кинетики первого порядка, но их можно объяснить различиями в восприимчивости связей Rp и Sp.

Стереоспецифические различия в экзонуклеазной активности для АСО второго поколения менее важны. Это обусловлено тем, что АСО второго поколения имеют 2'-модификации на 3'- и 5'-концах, которые предотвращают их расщепление экзонуклеазой. С помощью эндонуклеазы, выделенной из возбудителя *Serratia marcescens*, были изучены эффекты хиральности фосфоротиоатных связей [35]. Сайт воздействия эндонуклеазы так же, как экзонуклеазы — это один из немостиковых кислородов для гидролиза фосфодиэфирных связей. В диастереомере сера локализуется в непосредственной близости от Mg^{2+} , вследствие чего уменьшается активность фермента, в то время как в диастереомере Rр — нет. Поскольку эндонуклеаза *Serratia* имеет значительные сходства с некоторыми эндонуклеазами млекопитающих, следует предположить, что этот механизм может быть широко применим. Каким образом стереохимические особенности фосфоротиоатных связей влияют на действие других эндонуклеаз — не известно. Однако если предположить, что реакция развивается по схеме, аналогичной эндонуклеазе *Serratia*, можно думать, что активный участок будет содержать ион металла (вероятно, Mg^{2+}) и сера будет влиять на действие нуклеаз, когда она будет ориентирована на ион металла. Если эндонуклеазы чувствительны к хиральности, это могло бы иметь важные последствия для развития проблемы создания эффективных препаратов второго поколения. Как и влияние хиральности на препараты первого поколения, так и хиральное воздействие на метаболизм препаратов второго поколения может привести к замедлению их метаболизма. Так, например, можно предположить, что быстро метаболизирующиеся стереоизомеры будут выборочно разрушаться, оставляя функционирующими только медленно метаболизирующиеся изомеры.

Связывание АСО с белками

Было установлено, что в сравнении с АСО с фосфодиэфирным скелетом, на фармакокинетику фосфотиоатных структур оказывает существенное влияние их связывание с белками. Химической основой повышения связывания с белками является повышенная липофильность фосфотиоатных связей по сравнению с фосфодиэфирными. Поскольку молекулярные взаимодействия с водой определяются формой и функцией макромолекул в водном растворе [60], то даже небольшие изменения в липофильности скелета по всей длине АСО могут иметь последствия для взаимодействия олигомера с водой и макромолекулами, такими как белки.

В первом приближении, фосфотиоатные ОДН связываются с клеточными белками более беспорядочно, чем фосфодиэфирные ОДН [5, 6]. Почему фосфотиоатные АСО лучше связываются с белками до конца не выяснено. Возможные объяснения предполагают повышение липофильности и комплексобразование с ионами металлов.

Важность связывания с белками плазмы для фармакологии, фармакокинетики и токсикологии фосфотиоатных АСО (как первого, так и второго поколений) сложно переоценить. На микромолярном уровне концентраций более чем 90% фосфотиоатных ОДН связываются в плазме. Есть особые отличия в проценте и силе связывания с белками, так же как качественные отличия в связывании АСО с особыми белками у разных видов. Связывание фосфотиоатных АСО с циркулирующими белками удерживает эти соединения от фильтрации в почечных клубочках и выведения с мочой. В случае насыщения, например при введении большой дозы АСО, выведение с мочой АСО полной длины усиливается. Вследствие видовых различий, насыщение у различных видов определяется разными концентрациями АСО. Например, белки плазмы мышей имеют меньшее сродство к АСО, по сравнению с таковыми крыс или человека. Поэтому эффект насыщения процесса связывания АСО с белками плазмы у мышей происходит при более низких концентрациях, по сравнению с другими видами. Видовые различия в связывании плазмы с белками являются существенным фактором отличия в межвидовой фармакокинетике.

Устойчивость к нуклеазам и связывание с белками, которые характерны для АСО с фосфотиоатными связями, изменяют и фармакокинетику терапии с применением АСО. Дополнительные химические структуры, характерные для второго поколения создаваемых препаратов, вносят и другие изменения в их фармакокинетику.

Метоксиэтильные производные АСО

АСО второго поколения были разработаны для улучшения некоторых характеристик ОДН первого поколения. Так фосфотиоатные структуры, добавленные к группам МОЭ в позиции 2', повышают их устойчивость к нуклеазам и изменяют эффективность связывания с белками.

Устойчивость МОЭ к нуклеазам

Было показано, что структура МОЭ влияет на устойчивость АСО к нуклеазам. В то время как фосфотиоатные структуры уменьшают активность экзонуклеазы, структура в позиции 2' практически исключает экзонуклеазную активность. Устойчивость к нуклеазам может быть результатом (1) замещения в позиции 2' водорода на МОЭ, (2) стерических эффектов МОЭ или (3) образования жёсткой водной оболочки вокруг скелета АСО [57]. Какими бы не были причины устойчивости к нуклеазам, наличие группы МОЭ делает изменённые в позиции 2' АСО практически невосприимчивыми к воздействию циркулирующих и к большинству клеточных нуклеаз. Центральный участок скелета АСО, состоящий из деоксифосфотиоатов, далеко не так устойчив к опосредованному нуклеазой расщеплению. Различия АСО первого и второго поколений в участках, подверженных метаболизму, определяют и различия метаболических моделей.

При оценке моделей метаболизма с помощью капиллярного гель-электрофореза (КГЭ) или путём жидкостной хроматографии/масс спектрометрии (ЖХ/МС), не было обнаружено метаболитов, которые были бы короче на один нуклеотид. Больше всего было обнаружено метаболитов, расщеплённых в дезокси участке (предположительно эндонуклеазами), дальнейший путь метаболизма заключается в уменьшении размеров продуктов расщепления. Устойчивость к экзонуклеазам и медленный метаболизм под влиянием действующих эндонуклеаз приводит к образованию соединений, характеризующихся большим периодом полувыведения.

Связывание МОЭ с белками

Экспериментальными исследованиями доказано, что фосфотиоатные АСО со структурами 2'-МОЭ имеют меньшее сродство к белкам плазмы, в сравнении с немодифицированными фосфотиоатными АСО. Например, при добавлении пяти структур МОЭ к 3'-концам фосфотиоатных ОДН первого поколения, константы диссоциации для альбуминов повышаются от примерно 18 до примерно 40 мкМ. При этом, в полностью замещённой МОЭ структуре АСО только слегка снижается сродство к белкам плазмы [17, 22]. Почему увеличение количества структур МОЭ в олигонуклеотиде не влияет на дальнейшее уменьшение сродства к белкам плазмы не ясно, но может быть это связано с особенностями вторичной структуры АСО.

Уменьшение сродства к белкам, связанное со структурами МОЭ, можно обосновать некоторыми физическими свойствами. Вероятно наиболее значительным физическим фактором, который отличает модифицированные МОЭ АСО от немодифицированных — это наличие молекулярной оболочки воды, которая возникает из-за боковой цепи МОЭ [57]. Заместители МОЭ в углеводородном скелете «хелатируют» молекулы воды (и, возможно, ионы металлов), образуя водную оболочку, и уменьшая потенциальный контакт между «липкими» молекулами серы и плазменными или клеточными белками. Степень связывания АСО с белками обратно коррелирует с их выведением с мочой. Введение фосфотиоатных связей и заместителей 2'-МОЭ изменяет связывание с белками и в результате изменяет свойства АСО.

Всасывание, распределение, метаболизм и выведение АСО

Всасывание

Парентеральный путь введения АСО

Исследованиями установлено, что вследствие молекулярной массы (около 7000 Д) и отрицательных зарядов АСО, всасывание этих препаратов из ЖКТ ограничено. Именно поэтому, обычно применяется парентеральный путь их введения. Подкожные,

внутривенные инфузии или интравитриальные инъекции используются для введения препаратов первого поколения. Меньшая провоспалительная активность АСО второго поколения делает их более подходящими для подкожного введения. Фармакокинетика этих препаратов в плазме при подкожных инъекциях и внутривенных инфузиях сравнима. Исследования на лабораторных животных показывают, что, в конечном счёте, распределение АСО так же сопоставимо по различным органам, за исключением места введения и лимфатических узлов.

После подкожного введения, АСО как первого, так и второго поколения всасываются быстро из места введения в системный кровоток. В клинических исследованиях после подкожного введения АСО второго поколения время достижения максимальной концентрации (T_{max}), находится в пределах от 1,5 до 4,7 часа в диапазоне доз от 25 до 200 мг при постоянном объёме 1 мл [50]. Биодоступность подкожной дозы лежит в пределах от 36 до 82% от введённой дозы. Доклинические [48] и клинические исследования [50] предполагают, что биодоступность АСО повышается в зависимости от концентрации.

Кинетика АСО в месте введения может повлиять на местный ответ, также как на их системную кинетику и на распределение. Уменьшение концентрации АСО в месте введения гипотетически уменьшает местный ответ на инъекцию. Одним из подходов к снижению концентрации АСО в месте введения является разведение раствора и, как следствие, повышение площади поверхности всасывания из подкожного депо. Теоретически, разведение растворов и большая площадь поверхности всасывания должны уменьшить местную концентрацию и снизить местные реакции. Этих же эффектов можно было бы ожидать и при повышении системного всасывания. Поэтому изменения дозы и объёма можно рассматривать как потенциальные переменные величины. Однако даже на сегодняшний день подкожные инъекции с низкими объёмами и относительно высокими концентрациями демонстрируют высокую биодоступность применяемого материала.

Местное введение АСО

Изучение различных приёмов введения АСО демонстрирует, что их аэрозольные формы, ректальное введение и интравитриальные инъекции используются как средства местного введения. Для лечения лёгочных заболеваний возможно создавать относительно высокие концентрации АСО в лёгких используя аэрозоли [56].

Кинетика ОДН первого поколения была изучена на мышах. Установлено, что кинетика таких препаратов дозозависима, клиренс — лёгочный с периодом полувыведения около 2 часов. В отличие от этого, исследования модифицированных МОЭ АСО второго

поколения, показывают, что период их полувыведения составляет более 4 дней. Так же как и для другого местного лечения, преимущество ингаляций заключается в возможности создать высокие местные концентрации в тканях, которые обычно не накапливают применяемых веществ. В лёгких АСО обычно не накапливаются после парентерального введения. Местное введение так же редко вызывает системные эффекты. Например, при введении АСО обезьянам в дозе 0,1 мг/кг с помощью ингаляций (по три дозы в течение 1 недели) концентрация препарата в лёгких составляла примерно 1 мкг/г. Но у этих же обезьян, концентрация в печени и почках составила примерно 5% от концентрации в лёгких, свидетельствуя о существенно меньшем системном эффекте [65, 66].

Данные литературы свидетельствуют о том, что ректальное введение АСО с успехом используется для лечения язвенных колитов. В отличие от ингаляций, где могут использоваться небольшие количества вводимого вещества, применяемая для лечения клизма может содержать до 240 мг вещества (alicaforsen) первого поколения. В данном случае эпителий прямой кишки подвергается воздействию вводимого вещества, однако из-за плохой проницаемости сильно заряженных ОДН, наблюдается минимальное всасывание препарата, как и общий системный эффект. Расчёты показывают, что концентрация АСО в эпителии кишечника через 12 часов после введения составляет 20 мкг/г. Биодоступность у человека лежит в пределах от 0,03 до 2,14% и максимальная концентрация АСО, определяемая в плазме, составляет только 0,126 мкг/мл [44]. Отсутствие значительного системного всасывания и высокая местная концентрация лечебного препарата положительно сказываются на лечении.

Проведено исследование интравитреальных инъекций препаратов АСО как первого, так и второго поколений. В данном случае вещества вводятся в глаз в очень малых количествах. Вследствие изоляции места введения, системные эффекты препарата снижаются в ещё большей степени. В глазу, в стекловидное тело и сетчатку АСО поступают с разной скоростью: в стекловидное тело быстрее по сравнению с сетчаткой. И местный метаболизм, и диффузия из глаза способствуют выведению препарата. Как уже отмечалось, из-за небольших количеств системный эффект вводимого препарата оказывается минимальным. Однако, при этом механизм системного распределения сходен с большинством других препаратов.

Энтеральное введение АСО

Отмеченная стабильность АСО второго поколения к нуклеазам обеспечивает стабильность препарата в кишечнике, что делает возможным его дальнейшее всасывание. Тем не менее, размер молекулы и заряды АСО ограничивают всасывание препарата. После всасывания из кишечника, кинетика АСО подобна та-

ковой при его парентеральном введении. Хотя печень является одним из главных мест накопления АСО, эффект первого прохождения через печень не является важным фактором, влияющим на кинетику препарата АСО [44, 55].

Распределение АСО в организме

Роль перфузионного и тканевого средства

Распределение АСО и других препаратов зависит от проницаемости, интенсивности кровоснабжения, связывания с белками плазмы, тканей и клеток. Показано, что распределение в тканях фосфотиоатных АСО первого и второго поколения с их множественными отрицательными зарядами и их связыванием с белками в наименьшей степени зависит от кровоснабжения, и гораздо более зависит от факторов, влияющих на их транспорт внутрь клетки.

Внутреннее распределение из плазмы в ткани относительно быстрое, период полувыведения составляет 30-90 минут после в/в введения. Период полувыведения АСО после подкожного введения больше, чем после в/в. Это отличие происходит из-за времени, необходимого для всасывания, а не из-за других отличий фармакокинетики [21, 24, 37, 48].

Изучение кинетики препаратов первого и второго поколения отметило её небольшие отличия. Большая стабильность к нуклеазам АСО второго поколения компенсируется меньшим их связыванием с белками. Наряду с этим, фармакокинетические профили препаратов 1-го и 2-го поколения сходны или почти неотличимы, если сумму нативного АСО и его метаболитов (общие АСО) первого поколения сравнить с интактным препаратом второго поколения (ISIS 13650). В противном случае, более быстрое разрушение АСО экзонуклеазами укорачивало бы период полувыведения препаратов первого поколения в сравнении со вторыми. Распределение препаратов обоих поколений дозозависимо [48].

Как отмечалось выше, после всасывания из места инъекции или кишечника АСО связываются с белками плазмы. Два белка плазмы, которые точно связываются с фосфотиоатными АСО — это альбумин и альфа-2-макроглобулин. Другой распространённый белок, кислый гликопротеин не связывает АСО [59]. Связывание с белками очень важно для распределения АСО в ткани-мишени. Химические структуры, уменьшающие связывание приводят к заметному снижению концентрации препарата в тканях, повышают степень его фильтрации через почечные клубочки и выведения с мочой. Это явление можно наблюдать при использовании АСО с диэфирными связями в скелете препарата или при наличии структуры МОЭ. Уменьшение средства диэфиров и МОЭ-структур (или и то, и то) к белкам позволяет более свободно циркулировать АСО в кровотоке, приводя к интенсификации его выведения с мочой [24, 26].

Во всех исследованиях с парентерально введенными АСО первого и второго поколения, мы не наблюдали линейного клиренса АСО из плазмы. Клиренс уменьшался с увеличением дозы препарата, и, следовательно, его биодоступность была большей, чем можно было предположить исходя из введенной дозы [27, 28, 36, 46, 48, 50, 64]. Поскольку начальный клиренс обусловлен распределением АСО в тканях и при этом наблюдалось поглощение препарата тканями, можно предположить возможность их насыщения АСО. Изучение процесса насыщения в результате введений АСО может проводиться с использованием фагоцитов печени. Когда связывание АСО с клетками Купфера достигнет насыщения, начнется уменьшение сродства. Последующее введение АСО мышам улучшает распределение АСО по не фагоцитарным клеткам печени, и в результате улучшается фармакологическая активность в гепатоцитах в сравнении с контролем. И, наоборот, при концентрации в плазме ниже 1 мкг/мл АСО активнее связываются с клетками Купфера, и меньше накапливаются в гепатоцитах.

Исследование процесса связывания АСО с белками плазмы показало, что этот эффект сопровождается быстрым распределением комплекса в тканях по поверхности клеток. Хотя точные механизмы клеточного связывания не установлены, можно предположить, что АСО связываются с белками плазмы или с клеточными белками, пока есть свободные участки связывания. Затем связанные АСО распределяются по градиенту концентрации через клеточную мембрану путём обмена внеклеточного белка на внутриклеточный.

Таким образом, движущей силой попадания АСО в клетки является градиент концентраций. Было описано челночное движение АСО между цитоплазмой и ядром [33, 34, 43]. В целом, является очевидным, что связывание с белками облегчает движение АСО через барьеры, которые обычно тормозят движение гидрофильных сильно заряженных молекул. Данный челночный механизм движения через мембраны остаётся гипотезой для АСО, но ранее он был описан для металлоорганических соединений [52]. Транспорт АСО из внеклеточного матрикса во внутриклеточное пространство был визуализирован на печени мышей при помощи иммуногистохимических методов [9] и на почках крыс с помощью витальной микроскопии с флуоресцентной меткой для АСО второго поколения (S. Henry, B. Molitoris).

Идентичность белков, контролирующих транспорт АСО из внеклеточного во внутриклеточное пространство не известна, однако считается, что связывание комплекса белок-АСО с клеткой осуществляется при помощи фагоцитарного рецептора [4]. Поскольку высоким сродством к АСО обладают фагоциты, такие как клетки Купфера, тканевые макрофаги и клетки проксимальных канальцев, можно думать о возможности нахождения таких рецепторов на их клеточной поверхности [9].

Тем не менее, клеточное распределение и фармакодинамика АСО у трансгенных мышей, лишённых фаго-

цитарного рецептора SR-A I/II не отличались от таковых показателей контрольных сингенных животных [7]. Таким образом, этот рецептор, известный как «рецептор для уборки мусора» (Scavenger receptor), по-видимому, не ответственен за поглощение комплекса печенью и почками. Роль других акцепторных структур, участвующих в процессах эндоцитоза комплекса АСО-белок, не изучена.

Мембранные белки, функционирующие как переносчики, присутствуют во всех организмах [25]. Основными переносчиками лекарственных средств являются: ABC (ATP-binding cassette transporters) и SLC (solute carrier family). Известно, что скорость переноса веществ через биологические мембраны с помощью процессов, опосредованных транспортёрами, характеризуется насыщаемостью. Описано несколько членов семейства SLC с известными функциями, в основном для переноса нуклеозидов, нуклеозид-сахаров и фосфат-сахаров. Есть мнение, что будущие исследования, скорее всего, будут касаться процессов межмембранного транспорта АСО.

Ясно, что помимо указанных выше отличий в накоплении создаваемых конструкций разными органами и тканями и зависимости клиренса и распределения таких соединений от их дозы, на распределение АСО в тканях оказывают влияние транспортные системы, особенности кровотока особой, возможное время нахождения препарата в организме и, наконец, насыщаемость тканей АСО. Несмотря на существенную роль указанных факторов в процессах тканевого распределения АСО, считается, что начальное связывание АСО с поверхностью клетки является одним из определяющих факторов в анализируемых механизмах. Такое заключение основывается на том, что печень и почки являются начальными участками связывания АСО с некоторым дополнительным накоплением в первые 24 часа после введения АСО [47]. При изучении параметров распределения АСО в печени и почках показано фракционное повышение концентрации препарата в органах в течение первых 24 часов. Это происходит в период клеточного и субклеточного перераспределения АСО [29], но предположительно, первичные органы распределения должны накапливать больше вещества с течением времени [45, 46, 48] из-за большего сродства этих органов к АСО. Белки, ответственные за это сродство могут содержать гепариноподобные участки связывания ламинина и фибриногена, и фактор роста фибробластов (FGF, Fibroblast growth factor) [2, 3, 30, 42]. Раннее взаимодействие АСО с клеткой может быть обусловлено связыванием этих белков, но природа этих белков, как отмечалось выше, изучена мало.

Рассматривая значимость сочетания специфических участков связывания АСО с клетками в распределении препарата в организме, следует отметить и такой важный фактор, как различное кровоснабжение разных органов, возможность которого влиять на различное распределение фосфотиоатных АСО очевидна. По данным разных авторов, работа с десятками серий веществ как первого,

так и второго поколения свидетельствует об их сходном распределении, и заметно подобном распределении у особей различных видов. Почки, печень, лимфатические узлы, селезёнка и костный мозг — это органы, накапливающие самое большое количество АСО и их метаболитов. То, что лёгкие и сердце не накапливают АСО, свидетельствует о том, что для объяснения выраженного накопления АСО в печени и почках недостаточно только одного объяснения об их хорошем кровоснабжении. Например, участки с наилучшим кровообращением в почках — это клубочки, а они не являются участками, содержащими большее количество АСО. Напротив, в проксимальных канальцах кровообращение менее активно. Однако клетки проксимальных канальцев характеризуются большим количеством активно фагоцитирующих клеток, накапливают свободные АСО, а так же АСО, связанные с белками, которые обычно реабсорбируются в проксимальных канальцах [49]. В результате почечная кора и эпителий проксимальных канальцев содержат самую высокую концентрацию фосфотиоатных АСО, как первого, так и второго поколения.

Следует отметить также, что кровоснабжение (мл/г ткани) печени составляет примерно 20% от почечного. 4-5-кратные различия в перфузии между почками и печенью не приводят к 4-5-кратным различиям в концентрации АСО в этих органах. Окончатые капилляры увеличивают площадь соприкосновения АСО с кровотоком и, следовательно, это может компенсировать недостаточную перфузию печени относительно почек.

Связывание АСО с белками плазмы при распределении

Хотя насыщение клеток АСО в конечном счёте влияет на их распределение в органах, связывание АСО с белками плазмы может изменять распределение в почках и печени в различных сериях. Существуют посерийные различия в связывании с белками. При снижении связывания АСО с белками плазмы происходит уменьшение их накопления в печени и повышение их накопления в почках. И, наоборот, при более высоком связывании, концентрация АСО в свободном виде в кровотоке будет находиться в меньшем количестве, меньше накапливаться в почках и больше в других органах. Существует обратная зависимость между степенью связывания АСО с белком и накоплением их в почках крыс и обезьян после повторяющегося внутривенного и подкожного введения.

Связывание с белками может быть использовано как критерий выбора АСО для клинических исследований. К настоящему времени, определение связывания с белками — это эмпирический процесс без возможности предсказать, какая серия будет связываться с белками больше или меньше.

Распределение АСО по другим органам

Независимо от последовательности распределения фосфотиоатных АСО первого и второго поколения, наблюдается характерная картина локализации этих препаратов в почках и печени, а также в селезёнке и лимфати-

ческих узлах, кости и в цитоплазме адипоцитов [10-12]. Накопление АСО в лимфоидной ткани можно объяснить отчасти фагоцитарной активностью гистиоцитов и других мононуклеарных клеток. Возможно, визуализировать АСО в фаголизосомах гистиоцитов и тканях макрофагов при помощи гематоксилинового окрашивания. Показано, что АСО подвергаются эндоцитозу, локализуются в эндосомах и сохраняются в пределах этих структур. Концентрация АСО в фаголизосомах часто такова, что её возможно определить методом окрашивания гематоксилином (почти как ядерную ДНК). АСО в фаголизосомах вероятно составляет большую часть АСО, накопленных в селезёнке и лимфоидных органах. Кроме того, фагоцитарно активные клетки костей и костного мозга накапливают АСО в этих тканях, что подтверждается наличием базофильных гранул в их клетках.

Мышцы (как скелетные, так и сердечные) не содержат значительного количества АСО. Тем не менее, внимательное изучение мышц с использованием иммуногистохимических или автордиографических методов показывает содержание АСО в фаголизосомах макрофагов стромы мышц и это накопление может частично отразиться и на измерении концентрации АСО в мышцах и сердце.

Накопление АСО в цитоплазме адипоцитов значимо с терапевтической точки зрения. Особенно потому, что в отличие от большинства накапливаемых в адипоцитах веществ, АСО гидрофильны. Иммуногистохимические методы ясно показывают, что АСО находятся в цитоплазматической фракции адипоцитов, при этом АСО почти нет в жировой вакуоли. Интенсивность окрашивания указывает на значительное накопление вещества в цитоплазме. Например, у обезьян после 13 недель лечения препаратом ISIS 113715 в дозе 10 мг/кг/неделя концентрация в печени составила $301 \pm 88,1$ мкг/г, но только $37,3 \pm 14,4$ мкг/г в жировой ткани у тех же животных.

Учитывая, что нежировой компонент составляет 10% от общей жировой массы, коррекция концентрации АСО с учётом этого показателя свидетельствует о сопоставимости его концентрации с таковой в печени. Значительные концентрации АСО в адипоцитах показывают, что их можно использовать для лечения генетических заболеваний клеток этого типа: источников гормонов и цитокинов. Так, установлено, что фармакологически активные концентрации АСО регистрируются в адипоцитах мышей при введении препарата ISIS 113715 в дозе 25 мг/кг дважды в неделю и снижают экспрессию гена-мишени *PTP-1B* как в печени, так и в адипоцитах [68]. Аналогичные наблюдения были сделаны у обезьян, получавших АСО ISIS 113715. Поскольку биопсию подкожного жира можно провести в клинических условиях и так как активные АСО накапливаются в жире, то можно использовать жир для биопсии и непосредственного измерения фармакологических эффектов (снижение мРНК) и тканевой концентрации препарата в тканях человека.

Фосфотиоатные АСО распределяются и в другие ткани. Иммуногистохимические исследования показывают, что эндотелиальные клетки накапливают АСО в концентрациях, значительных для уменьшения уровня мРНК, делая их потенциальной мишенью для фармакологического воздействия [9, 4]. В некоторых тканях их концентрации не достаточно велики для фармакологического эффекта. Например, зрелые лимфоциты не накапливают АСО, а бессмысленная активность проявляется Т-клетками ограниченно.

Костные клетки, особенно фагоцитарно активные остеобласты, могут накапливать АСО и этот эффект может быть использован в терапевтических целях. Кроме того, клетки островков поджелудочной железы также накапливают АСО. АСО как первого, так и второго поколения являются сильно заряженными гидрофильными молекулами, которые не проникают через гемато-энцефалический или гемато-тестикулярный барьеры. Однако, как и в мышцах, в интерстициальном участке яичек локализуются макрофаги, содержащие обнаруживаемые АСО. Яичники не отделены барьером, вследствие этого АСО можно количественно измерить в яичниках и визуализировать иммуногистохимическими методами в строме.

Ограниченное распределение АСО из плазмы крови в клетки мозга и кардиомиоциты делает эти ткани маловероятными мишенями бессмысленного вмешательства, несмотря на то, что селективное ингибирование или экспрессия некоторых белков ионных каналов в головном мозге и мышцах могут быть терапевтически полезны. Тем не менее, ограниченное распределение АСО в этих тканях можно рассматривать как преимущество. Отсутствие значительных концентраций АСО в мозге и сердце уменьшает риск поражения центральной нервной системы (ЦНС) и снижает проявление нежелательных сердечных эффектов. Как отмечалось ранее, прямое введение в структуры ЦНС, в частности, в головной мозг, с помощью интратекальной, внутрижелудочковой инфузии или инъекции вызывает распределение АСО в пределах центральной нервной системы и может быть полезно терапевтически [8, 32].

При беременности плод достаточно хорошо защищен от воздействия бессмысленных препаратов. Изучение трансплацентарной кинетики АСО не выявило его накопления в плоде, отмечен низкий уровень АСО у грызунов в плаценте [13, 31, 53]. Эти результаты были последовательно воспроизведены при исследовании тератогенности различных АСО второго поколения на мышцах, крысах и кроликах. Плацента, несмотря на высокую перфузию, не является органом с высоким накоплением АСО [31, 53, 62].

В целом, представленные факты показывают, что распределение АСО является одним из ключевых факторов, который определяет выраженность активности АСО. Отличия в распределении АСО, как представляется, связаны в значительной степени с тропностью тканей для этих препаратов и, в меньшей степени, с перфузией.

Метаболизм

Антисмысловые препараты первого и второго поколения метаболизируются нуклеазами, а не системами оксидаз типа цитохрома Р450, с помощью которого метаболизируются обычные липофильные низкомолекулярные препараты. АСО не являются ни субстратом изоферментов цитохрома Р450, и не индуцируют или ингибируют его активность в клинически значимых концентрациях. Опосредованное экзонуклеазами расщепление АСО, которое является основным путём метаболизма и клиренса фосфотиоатных ОДН первого поколения, вторично для АСО второго поколения. Ограничивают экзонуклеазную активность два фрагмента: один МОЭ на 3'-конце и другой МОЭ на 5'-конце.

Ферменты, ответственные за метаболизм АСО

Специфические ферменты, метаболизирующие АСО второго поколения не известны. Нуклеазы являются повсеместно распределёнными и есть возможность определить расщеплённые метаболиты АСО в большинстве тканей. Печеночный и почечный гомогенаты — оба способны метаболизировать АСО второго поколения *in vitro* без добавления экзогенных источников энергии, таких как никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADPH) или аденозин-5-трифосфат (АТФ). Начальное расщепление приводит к образованию двух продуктов, каждый из которых характеризуется защищённым МОЭ концом 5' и 3'. Эти метаболиты не связываются с белками, и, таким образом, выводятся из тканей. Поскольку метаболиты удаляются быстрее, чем они образуются, накопление метаболитов в тканях практически не происходит. Таким образом, не представляется возможным использовать определение количества метаболитов в ткани, как индекса метаболизма АСО в тканях.

Поскольку скорость выведения АСО из тканей зависит от их метаболизма, то различия в метаболизме АСО в различных тканях могут быть оценены на основе периода полувыведения этих препаратов из характеризующихся тканей. На основе данных для четырёх АСО второго поколения, заключено, что поведение членов этого класса сходно, однако прослеживаются небольшие различия в периоде их полувыведения из печени и почек обезьян, получавших препарат в течение 4-13 недель. Показано, что период полувыведения препаратов АСО ISIS 104838 и 112989 из печени и почек весьма сходен. Эти данные дают возможность предположить, что для некоторых серий АСО не существует значительных различий в скорости метаболизма в различных органах. Однако различия в тканевом периоде полувыведения выявлены для препаратов ISIS 107248, 113715, а также 301012. Обнаруженные различия в скорости метаболизма препаратов АСО в печени и почках показывают, что в разных тканях могут быть различия в скорости метаболизма, или имеет место более сложная кинетика для некоторых серий препарата, или полученные результаты просто отража-

ют небольшое количество образцов, взятых в течение ограниченного времени.

Детальное исследование процесса выведения АСО второго поколения показывает наличие разных темпов их выведения из различных типов клеток печени [63, 67]. Поскольку некоторые типы клеток, такие как клетки проксимальных канальцев коркового слоя почки, как правило, содержат АСО в фаголизосомах, этот тип поглощения, вероятно, определяет различия в метаболических скоростях препарата в разных тканях. Кроме того, вполне вероятно, что специфические последовательности в строении скелета АСО могут характеризоваться различной чувствительностью к расщеплению эндонуклеазами.

Бактериальные экзонуклеазы проявляют высокую степень специфичности к последовательности нуклеотидов в скелете АСО предположительно для защиты от вирусов. Большая часть активности нуклеаз в клетках млекопитающих связана с механизмами транскрипции и репарации ДНК, и, таким образом, видовая специфичность млекопитающих может отличаться от таковых бактериальных эндонуклеаз. Не известно, одинаково ли ответственны за катаболизм этих синтетических АСО процессы репликации и действие ферментов, связанных с явлением репарации. При высоких концентрациях оцДНК [61], АСО могут эффективно конкурировать с природным субстратом. Множество ферментов семейства нуклеаз способны катаболизировать АСО. Определение специфических ферментов, участвующих в метаболизме АСО не критично для развития антисмысловых препаратов, но, более глубокое понимание метаболических путей будет полезно для развития новых технологий.

Метаболиты АСО

Различия в метаболизме АСО первого и второго поколений весьма очевидны при сравнении метаболического профиля с КГЭ. Когда образцы ткани или мочи анализируются в детекторе LC/MS, характер метаболических процессов становится более ясным [24]. Как правило, фосфоротиоатные ОДН первого поколения метаболизируются в каскад метаболитов АСО, каждый из которых отличается на один нуклеотид в результате однонуклеотидных расщеплений экзонуклеазой. Так, после введения 20-мер, то есть состоящего из 20 нуклеотидов, ОДН первого поколения плазма и ткани содержат семейства последовательно сокращенных АСО, начиная с 19-мер и далее вплоть до короткого АСО.

Исходное расщепление в метаболизме АСО второго поколения, опосредованное эндонуклеазами, приводит к образованию двух АСО, один с 3'-концом МОЭ и другой с 5'-концом МОЭ. Расщепление продуктов с незащищенными концами, может проводиться либо 5'-эксонуклеазой или 3'-эксонуклеазой. Результаты комбинированной эндо- и экзонуклеазной активности — это каскад цепочечно сокращенных продуктов расщепления, многие, если не все, из которых могут быть выявлены в моче, собранной у обследуемых животных

или людей. Моча животных, принимавших препарат, или пациентов, лечившихся АСО второго поколения, может содержать метаболиты, которые варьируются от двух возможных 15-мер до двух возможных МОЭ 5-мер и множественных комбинаций каждого из промежуточных метаболитов [24].

Метаболиты короче, чем длина концов МОЭ будут присутствовать в тканях, если концы МОЭ сами являются субстратами для нуклеаз. Эти метаболиты обычно не определяются при масс-спектральном анализе, что наводит на мысль, что как правило, нет мононуклеотидов МОЭ, выделяющихся в процессе метаболизма. Тем не менее, некоторые исключения из этого обобщения имеют место. Для ограниченного числа последовательностей нуклеотидов, наблюдаются однонуклеотидные обрезки АСО второго поколения в тканях и плазме — либо КГЭ или LC/MS: метаболиты, по-видимому, были результатом экзонуклеазного расщепления. Эти метаболиты могут наблюдаться в начальном распределении. Предполагается, что они быстро появляются в плазме крови. МОЭ-мононуклеотиды, которые образуются в процессе метаболизма, не являются субстратами для фосфорилирования, и таким образом, вряд ли будут включены в нуклеотидтрифосфаты и, в конечном счёте, в эндогенные нуклеотиды. МОЭ-мононуклеотиды не ингибируют ферменты, ответственные за синтез ДНК. Таким образом, МОЭ-мононуклеотиды, если они образовались, не должны встраиваться в эндогенные нуклеотиды.

Центральная часть дезоксинуклеотидов АСО второго поколения подлежит экзонуклеазному расщеплению, что приводит к высвобождению одного нуклеотида. Монодезоксинуклеотиды, которые получают путём экзонуклеазного расщепления, идентичны эндогенным нуклеотидам, за исключением тиофосфатной группы, которая может теоретически присутствовать. Тем не менее, тиофосфатная группа лабильна к окислению и к утрате серы, что делает группу концевой фосфата идентичной эндогенным нуклеотидам. Поэтому, в отличие от МОЭ-мононуклеотидов, любой высвобожденный дезоксинуклеотид будет естественно включён во внутриклеточное депо эндогенных нуклеотидов. Нуклеотиды, которые сохраняют тиофосфатные группы, будут субстратами для добавления одной или двух фосфатных групп, в результате чего получают смешанные тиофосфатные ди- или трифосфаты нуклеотида. Фосфорилирование возможно, но присутствие альфа тиофосфата делает реакции термодинамически неблагоприятными [41].

Заключение

Очевидна актуальность исследования фармакокинетики данных и схожих с описанными препаратов, а так же создание моделей на различных видах животных для полного понимания процессов протекающих в организме после приема препаратов. В России так же ведутся исследования подобных препаратов.

Литература

1. Adjei A.A., Dy G.K., Erlichman C. et al. A phase I trial of ISIS 2503, an antisense inhibitor of H-ras, in combination with gemcitabine in patients with advanced cancer. // Clin. Cancer Res. 2003. Vol. 9, №1. P. 115.
2. Benimetskaya L., Loike J.D., Loike G. et al. Mac-1 (CD11b/CD18) is an ODN-binding protein. // Nat. Med. 1997. Vol. 3, №4. P. 414.
3. Benimetskaya L., Tonkinson J.L., Koziolkiewicz M. et al. Binding of phosphorothioate ODNs to basic fibroblast growth factor, recombinant soluble CD4, laminin and fibronectin in P-chirality independent. // Nucl. Acids Res. 1995. Vol. 23, №21. P. 4239.
4. Bijsterbosch M.K., Manoharan M., Rump E.T. et al. In vitro fate of phosphorothioate antisense ODNs: predominant uptake by scavenger receptors on endothelial cells. // Nucl. Acids Res. 1997. Vol. 25, №16. P. 3290.
5. Bijsterbosch M.K., Rump E.T., De Vruhe R.L. et al. Modulation of plasma protein binding and in vitro liver cell uptake of phosphorothioate ODNs by cholesterol conjugation. // Nucl. Acids Res. 2000. Vol. 28, № 14. P. 2717.
6. Brown D.A., Kang S.H., Gryaznov S.M. et al. Effect of phosphorothioate modification of ODNs on specific protein binding. // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269, №43. P. 26801.
7. Butler M., Crooke R.M., Graham M.J. et al. Phosphorothioate ODNs distribute similarly in class A scavenger receptor knockout and wild-type mice. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2000. Vol. 292, №2. P. 489.
8. Butler M., Hayes C.S., Chappell A., Murray S.F., Yaksh T.L., Hua X.Y. Spinal distribution and metabolism of 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified ASOs after intrathecal administration in rats. // Neuroscience. 2005. Vol. 131, №3. P. 705.
9. Butler M., Stecker K., Bennett C.F. Cellular distribution of phosphorothioate ODNs in normal rodent tissues. // Lab. Invest. 1997. Vol. 77, №4. P. 379.
10. Cossum P.A., Sasmor H., Dellinger D. et al. Disposition of the 14C-labeled phosphorothioate ASO ISIS 2105 after intravenous administration to rats. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1993. Vol. 267, №3. P. 1181.
11. Cossum P.A., Troung L., Owens S.R. et al. Pharmacokinetics of a 14C-labeled phosphorothioate ASO, ISIS 2105, after intradermal administration to rats. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1994. Vol. 269, №1. P. 89.
12. Crooke S.T., Graham M.J., Zuckerman J.E. et al. Pharmacokinetic properties of several novel ASO analogs in mice. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1996. Vol. 277, №2. P. 923.
13. Driver S.E., Robinson G.S., Flanagan J., Shen W., Smith L.E.H., Thomas D.W., Roberts P.C. ASO-based inhibition of embryonic gene expression. // Nat. Biotechnol. 1999. Vol. 17. P. 1184.
14. Eckstein F. Phosphorothioate ODNs: what is their origin and what is unique about them? // Antisense Nucl. Acid Drug Dev. 2000. Vol. 10, №2. P. 117.
15. Gaus H.J., Owens S.R., Winniman M., Cooper S., Cummins L.L. On-line HPLC electrospray mass spectrometry of phosphorothioate ASO metabolites. // Anal. Chem. 1997. Vol. 69, №3. P. 313.
16. Geary R.S. Current assessment of PK/PD relationships for antisense therapeutics. // World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Nice, France, 2002.
17. Geary R.S., Bradley J.D., Watanabe T. et al. Lack of pharmacokinetic interaction for ISIS 113715, a 2'-O-methoxyethyl modified antisense oligonucleotide targeting protein tyrosine phosphatase 1B messenger RNA, with oral antidiabetic compounds metformin, glipizide or rosiglitazone. // Clin. Pharmacokinet. 2006. Vol. 45, №8. P. 789.
18. Geary R.S., Leeds J.M., Fitchett J. et al. Pharmacokinetics and metabolism in mice of a phosphorothioate ASO antisense inhibitor of C-raf-1 kinase expression. // Drug Metab. Dispos. 1997. Vol. 25, №11. P. 1272.
19. Geary R.S., Leeds J.M., Henry S.P., Monteith D.K., Levin A.A. Antisense oligonucleotide inhibitors for the treatment of cancer: 1. Pharmacokinetic properties of phosphorothioate ODNs. // Anticancer Drug Des. 1997. Vol. 12, №5. P. 383.
20. Geary R.S., Leeds J.M., Shanahan W. et al. Sequence independent plasma and tissue pharmacokinetics for 3 antisense phosphorothioate ASOs: mouse to man. // in American Association of Pharmaceutical Scientists, Pharm. Research, Plenum Press, Seattle, Washington. 1996. P. S.
21. Geary R.S., Teng C.L., Truong L. et al. First pass hepatic extraction of a partially modified chimeric antisense oligonucleotides in Beagle dogs. // in Annual Meeting of the American Association of Pharmaceutical Scientists, Indianapolis, IN, 2000. P. 216.
22. Geary R.S., Ushiro-Watanabe T., Truong L. et al. Pharmacokinetic properties of 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified ASO analogs in rats. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2001. Vol. 296, №3. P. 890.
23. Geary R.S., Yu R.Z., Levin A.A. Pharmacokinetics of phosphorothioate antisense ODNs. // Curr. Opin. Invest. Drugs. 2001. Vol. 2, №4. P. 562.
24. Geary R.S., Yu R.Z., Watanabe T. et al. Pharmacokinetics of a tumor necrosis factor-alpha phosphorothioate 2'-O-(2-methoxyethyl) modified antisense oligonucleotides: comparison across species. // Drug Metab. Dispos. 2003. Vol. 31, №11. P. 1419.
25. Giacomini K.M., Sugiyama Y. Membrane transporters and drug response, in Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th ed., Brunton, L.L., ed., McGraw-Hill, New York, 2006. P. 41.
26. Gleave M., Chi K.N. Knock-down of the cytoprotective gene, clusterin, to enhance hormone and chemosensitivity in prostate and other cancers. // Ann. NY Acad. Sci. 2005. Vol. 1058. P. 1.
27. Gleave M., Miyake H. Use of antisense oligonucleotides targeting the cytoprotective gene, clusterin, to enhance androgen- and chemo-sensitivity in prostate cancer. // World J. Urol. 23. 2005. №1. P. 38.
28. Glover J.M., Leeds J.M., Mant T.G. et al. Phase I safety and pharmacokinetic profile of an intercellular adhesion molecule-1 antisense ODN (ISIS 2302). // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997. Vol. 282, №3. P. 1173.
29. Graham M.J., Crooke S.T., Monteith D.K. et al. In vitro distribution and metabolism of a phosphorothioate ASO within rat liver after intravenous administration. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1998. Vol. 286, №1. P. 447.
30. Guvakova M.A., Yakubov L.A., Vlodayvsky I., Tonkinson J.L., Stein C.A. Phosphorothioate ODNs bind to basic fibroblast growth factor, inhibit its binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity binding sites on extracellular matrix. // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. P. 2620.
31. Henry S.P., Denny K.H., Templin M.V., Yu R.Z., Levin A.A. Effects of human and murine antisense oligonucleotide inhibitors of ICAM-1 on reproductive performance, fetal development, and post-natal development in mice. // Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol. 2004. Vol. 71, №6. P. 359.
32. Hua X.Y., Moore A., Malkmus S. et al. Inhibition of spinal protein kinase C alpha expression by an antisense oligonucleotide attenuates morphine infusion-induced tolerance. // Neuroscience. 2002. Vol. 113, №1. P. 99.
33. Jackson J.K., Gleave M.E., Gleave J., Burt H.M. The inhibition of angiogenesis by antisense oligonucleotides to clusterin. // Angiogenesis. 2005. Vol. 8, №3. P. 229.
34. Kastelein J.J.P., Wedel M.K., Baker B.F. et al. Potent reduction of apolipoprotein B and Low-density lipoprotein cholesterol by short-term administration of an antisense inhibitor of apolipoprotein B. // Circulation. 2006. Vol. 114, №16. P. 1729.

35. *Kozjolkiewicz M., Krakoviak A., Kwinkowski M., Boczkowska M., Stec W.J.* Stereodifferentiation — the effect of P chirality of oligo(nucleoside phosphorothioates) on the activity of bacterial RNase H. // *Nucl. Acids Res.* 1995. Vol.23, №24. P. 5000.
36. *Leeds J.M., Geary R.S.* Pharmacokinetic properties of phosphorothioate ASOs in humans, in *Antisense Research and Applications*, 1st ed., Crooke, S. T., ed., Springer, Heidelberg, 1998. P. 217.
37. *Leeds J.M., Henry S.P., Geary R.S., Burckin T.A., Levin A.A.* Comparison of the pharmacokinetics of subcutaneous and intravenous administration of a phosphorothioate oligodeoxynucleotide in cynomolgus monkeys. // *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* 2000. Vol.10, №6. P. 435.
38. *Levin A.A.* A review of issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. Vol.1489, №1. P. 69.
39. *Levin A.A., Geary R.S., Leeds J.M. et al.* The pharmacokinetics and toxicity of phosphorothioate ASOs, in *Biotechnology and Safety Assessment*, 2nd ed., Thomas, J. A., ed., Taylor & Francis, Philadelphia, PA, 1998. P. 151.
40. *Levin A.A., Henry S.P., Bennett C.F. et al.* Preclinical development of antisense therapeutics, in *Novel Therapeutics from Modern Biotechnology: From Laboratory to Human Testing*, 1st ed., Oxender D.L. and Post L.E., eds., Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 1998. P. 131.
41. *Levin A.A., Henry S.P., Monteith D., Templin M.* Toxicity of antisense oligonucleotides. // in *Antisense Drug Technology*, Crooke, S. T., ed., Marcel Dekker, New York, 2001. P. 201.
42. *Loke S.L., Stein C.A., Zhang X.H. et al.* Characterization of ASO transport into living cells. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. Vol. 86. P. 3474.
43. *Lorenz P., Misteli T., Baker B.F., Bennett C.F., Spector D.L.* Nucleocytoplasmic shuttling: a novel in vitro property of antisense phosphorothioate ODNs. // *Nucl. Acids Res.* 2000. Vol. 28, №2. P. 582.
44. *Miner P.B., Geary R.S., Matson J. et al.* Bioavailability and therapeutic activity of alicaforsen (ISIS 2302) administered as a rectal retention enema to subjects with active ulcerative colitis. // *Ailment Pharmacol. Ther.* 2006. Vol. 23, №10. P. 1427.
45. *Mou T.C., Gray D.M.* The high binding affinity of phosphorothioate-modified oligomers for Ff gene 5 protein is moderated by the addition of C-5 propyne or 2'-O-methyl modifications. // *Nucl. Acids Res.* 2002. Vol. 30, №3. P. 749.
46. *Nicklin P.L., Craig S.J., Phillips J.A.* Pharmacokinetic properties of phosphorothioates in animals—absorption, distribution, metabolism and elimination, in *Antisense Research and Applications*, 1st ed., Crooke, S. T., ed., Springer, Berlin, 1998. P. 141.
47. *Peng B., Andrews J., Nestorov I. et al.* Tissue distribution and physiologically based pharmacokinetics of antisense phosphorothioate ASO ISIS 1082 in rat. // *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* 2001. Vol. 11, №1. P. 15.
48. *Phillips J.A., Craig S.J., Bayley D. et al.* Pharmacokinetics, metabolism and elimination of a 20-mer phosphorothioate ODN (CGP 69846A) after intravenous and subcutaneous administration. // *Biochem. Pharmacol.* 1997. Vol. 54, №6. P. 657.
49. *Sawai K., Mahato R.I., Oka Y., Takakura Y., Hashida M.* Disposition of ASOs in isolated perfused rat kidney: involvement of scavenger receptors in their renal uptake. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996. Vol. 279, №1. P. 284.
50. *Sewell L.K., Geary R.S., Baker B.F. et al.* Phase I trial of ISIS 104838, a 2'-methoxyethyl modified antisense oligonucleotides targeting tumor necrosis factor- α . // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002. Vol. 303, №3. P. 1334.
51. *Slim G., Gait M.J.* Configurationally defined phosphorothioate-containing oligoribonucleotides in the study of the mechanism of cleavage of hammerhead ribozymes. // *Nucl. Acids Res.* 1991. Vol. 19, №6. P. 1183.
52. *Snyder R.M., Mirabelli C.K., Crooke S.T.* Cellular association, intracellular distribution, and efflux of auranofin via sequential ligand exchange reactions. // *Biochem. Pharmacol.* 1986. Vol. 35, №6. P. 923.
53. *Soucy N.V., Riley J.P., Templin M.V. et al.* Maternal and fetal distribution of a phosphorothioate ASO in rats after intravenous infusion. // *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 2006. Vol. 77, №1. P. 22.
54. *Spitzer S., Eckstein F.* Inhibition of deoxyribonucleases by phosphorothioate groups in oligodeoxyribonucleotides. // *Nucl. Acids Res.* 1988. Vol. 16, №24. P. 11691.
55. *Stavchansky S., Geary R.S., Cho M.* Pharmacokinetics and hepatic first pass effect of an antisense oligonucleotide (ISIS 2302) in rats. // in *Annual Meeting of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, Indianapolis, IN, 2000. P. 216.
56. *Templin M.V., Levin A.A., Graham M.J. et al.* Pharmacokinetic and toxicity profile of a phosphorothioate ASO following inhalation delivery to lung in mice. // *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* 2000. Vol. 10, №5. P. 359.
57. *Teplova M., Minasov G., Tereshko V. et al.* Crystal structure and improved antisense properties of 2'-O-(2-methoxyethyl)-RNA. // *Nat. Struct. Biol.* 1999. Vol.6, №6. P.535.
58. *Villalona-Calero M.A., Ritch P., Figueroa J.A. et al.* A phase I/II study of LY900003, an antisense inhibitor of protein kinase C- α , in combination with cisplatin and gemcitabine in patients with advanced non-small cell lung cancer. // *Clin. Cancer Res.* 2004. Vol. 10, №18 Pt 1. P. 6086.
59. *Watanabe T.A., Geary R.S., Levin A.A.* Plasma protein binding of an antisense oligonucleotide targeting human ICAM-1 (ISIS 2302). // *ASOs.* 2006. Vol. 16, №2. P. 169.
60. *White A.P., Reeves K.K., Snyder E. et al.* Hydration of single-stranded phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides. // *Nucl. Acids Res.* 1996. Vol. 24, №16. P. 3261.
61. *Wilson D.M.* 3rd, Ape1 abasic endonuclease activity is regulated by magnesium and potassium concentrations and is robust on alternative DNA structures. // *J. Mol. Biol.* 2005. Vol. 345, №5. P. 1003.
62. *Yu D., Kandimalla E.R., Roskey A. et al.* Stereo-enriched phosphorothioate ODNs: synthesis, biophysical and biological properties. // *Bioorg. Med. Chem.* 2000. Vol.8, №1. P. 275.
63. *Yu R.Z., Baer B., Chappel A. et al.* Development of an ultrasensitive noncompetitive hybridization-ligation enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of phosphorothioate ODN in plasma. // *Anal. Biochem.* 2002. Vol. 304, №1. P. 19.
64. *Yu R.Z., Geary R.S., Leeds J.M. et al.* Comparison of pharmacokinetics and tissue disposition of an antisense phosphorothioate ASO targeting human Ha-ras mRNA in mouse and monkey. // *J. Pharm. Sci.* 2001. Vol. 90, №2. P. 182.
65. *Yu R.Z., Geary R.S., Levin A.A.* Application of novel quantitative bioanalytical methods for pharmacokinetic and pharmacokinetic/pharmacodynamic assessments of antisense oligonucleotides. // *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 2004. Vol. 7, №2. P. 195.
66. *Yu R.Z., Kim T.W., Hong A. et al.* Cross species pharmacokinetic comparison from mouse to man of a second generation antisense oligonucleotide ISIS 301012, targeting human apolipoprotein B-100. // *Drug Metab. Dispos.* 2007. Vol. 35. P. 460.
67. *Yu R.Z., Zhang H., Geary R.S. et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of an antisense phosphorothioate ASO targeting Fas mRNA in mice. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001. Vol. 296, №2. P. 388.
68. *Zinker B.A., Rondinone C.M., Trevillyan J.M. et al.* PTP1B antisense oligonucleotide lowers PTP1B protein, normalizes blood glucose, and improves insulin sensitivity in diabetic mice. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. Vol. 99, №17. P. 1137.