

# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.113.6:615.739.6

© Коллектив авторов

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ И СТАБИЛЬНОСТИ В КРОВИ *IN VIVO* ФОСФОДИЭФИРНЫХ И МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

П. П. ЛАКТИОНОВ, А. В. БРЫКСИН, Е. Ю. РЫКОВА, Н. В. АМИРХАНОВ,  
В. В. ВЛАСОВ

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН

630090 Новосибирск, пр. Лаврентьева 8, факс: (383-2-) 33-36-77, тел.: 32-82-31.

Эл. почта: bryksin@niboch.nsc.ru

Исследована стабильность и распределение по клеточным и сывороточной фракциям крови *in vivo* дезоксирибоолигонуклеотидов и дезоксирибоолигонуклеотидов с модифицированным 3'-концевым фрагментом молекулы. Обнаружено, что замена двух 3'-концевых межнуклеотидных фосфодиэфирных связей фосфоротиоатными значительно увеличивает стабильность олигонуклеотидов в крови. Такие олигонуклеотиды выявляются в сыворотке крови в недеградированном состоянии на протяжении не менее 24 часов. Обнаружено, что лейкоциты крови практически не связывают олигонуклеотиды и продукты их деградации. Показано, что в эритроцитах крови накапливаются короткие продукты деградации олигонуклеотидов: моно-, ди-, три- и тетрануклеотиды.

**Ключевые слова:** олигонуклеотиды, модификация, фармакокинетика.

**ВВЕДЕНИЕ.** Производные олигонуклеотидов и генетические конструкции, способные функционировать в клетках животных, в настоящее время рассматриваются как потенциальные химиотерапевтические препараты [1]. Способность олигонуклеотидов ингибировать экспрессию генов за счет комплементарных взаимодействий *in vitro* и в клетках показана экспериментально [2, 3]. Разработаны подходы к химическому синтезу производных олигонуклеотидов, обладающих повышенной устойчивостью к действию нуклеаз и способных проникать через клеточные мембраны [4].

Согласно литературным данным, распределение олигонуклеотидов при любом способе введения в организм осуществляется через кровоток [5, 6, 7]. Олигонуклеотиды и продукты их деградации контактируют с элементами крови от момента попадания олигонуклеотидов в организм и до момента их экскреции. В современной литературе имеется много публикаций об исследованиях фармакокинетики синтетических и природных олигонуклеотидов в организме и в сыворотке крови, однако, практически ничего не известно о взаимодействии олигонуклеотидов и продуктов их деградации с клеточными компонентами крови *in vivo*. В представленной работе было проведено исследование стабильности и распределения в крови *in vivo* фосфодиэфирных дезоксирибоолигонуклеотидов и олигонуклеотидов с частично модифицированным фосфатным остовом.

**МЕТОДИКА.** Дезоксирибоолигонуклеотиды  $p(T)_2$ ,  $p(GATC)$  и  $pTGACCCCTCTGCCCATT$  ( $p(N)_{16}$ ) были синтезированы фосфотриэфирным методом в растворе по описанному способу [8]. Олигонуклеотиды с частично модифицированным фосфатным остовом  $pTp(TpCp)_6Trpsme$  ( $p(N)_{14}smc$ ) и  $pTp(TpCp)_6TrpsTrpsT$  ( $p(N)_{14}TsT$ ) были синтезированы по методу [9]. Радиоактивную метку [ $^{32}P$ ] вводили в олигонуклеотиды переносом конечного фосфата с [ $\gamma$ - $^{32}P$ ]-АТР ("БИОСАН", "Россия"; удельная активность  $5 \cdot 10^3$  Ки/ммоль) в 5'-положение олигонуклеотида при помощи полинуклеотидкиназы фага Т4 ("Сибэнзим", Россия) [10]. Олигонуклеотиды очищали от продуктов реакции электрофорезом (20 % ПААГ (1/20 бис - акриламид), 8М мочевины, 0,5М ЭДТА, 50 мМ трис-борат pH 8,3) и переносили электроосмоцией из геля на ДЕ-52-целлюлозу ("Whatman", Англия). Затем олигонуклеотид элюировали с ДЕ-52-целлюлозы 2М  $LiClO_4$  в  $H_2O$ . Олигонуклеотид осаждали 10-ю объемами 2 %  $LiClO_4$  в ацетоне (центрифугирование 5 мин, 14000 об/мин на центрифуге Eppendorf 5415 C), промывали осадок ацетоном, высушивали, растворяли в  $H_2O$  и определяли концентрацию олигонуклеотида спектрофотометрически. Молярные коэффициенты поглощения вычисляли по методу [11], исходя из литературных данных  $\epsilon_{260}$  для моно- и динуклеотидов [12]. Удельная радиоактивность полученных олигонуклеотидов составляла 50-100 Ки/ммоль.

Для защиты 5'-концевого фосфата от действия нуклеаз вводили защитную группу присоединением к нему - 4-[(N-2-хлорэтил-N-метил)-амино]бензиламина [13].

Для исследования сохранности и распределения олигонуклеотидов в крови удельную радиоактивность полученных препаратов доводили до 25 Ки/ммоль добавлением "холодного" олигонуклеотида и затем вводили мышам линии BALB/c весом 25-27 г (виварий ИЦиГ СО РАН, Новосибирск) из расчета 0,5 мг на килограмм веса. При внутрибрюшинной инъекции олигонуклеотид вводили в 200 мкл физиологического раствора, при пероральном способе вводили 25 мкл раствора олигонуклеотида в воде.

Кровь забирали из ретроорбитального синуса через 20, 40 минут и 1,5, 3, 9, 24 часа после введения олигонуклеотидов. Для получения сывороточной фракции 20-30 мкл крови инкубировали 40 мин при комнатной температуре для формирования тромба, используя после центрифугирования сывороточную фракцию, из которой отбирали аликвоты для определения радиоактивности.

Для выделения эритроцитарной и лейкоцитарной фракций к 200 мкл крови добавляли равный объем среды DMEM, содержащей 20 мМ HEPES, 3 мг/мл ЭДТА и 50 ед/мл гепарина pH 7,4, наслаивали на 1 мл среды для разделения лимфоцитов ("Flow", США). После центрифугирования (1500 об/мин, 15 мин) на центрифуге MPW330 (Польша), клетки лейкоцитарной и эритроцитарной фракций трижды отмывали 10-ю объемами среды DMEM pH 7,4 с 20 мМ HEPES, 3 мг/мл ЭДТА. После этого клетки ресуспендировали в 0,01 М трис/ HCl буфере, pH 7,5, содержащем 0,15 М NaCl, отбирали аликвоты для определения общей радиоактивности, для исследования сохранности олигонуклеотида и для исследования белков, взаимодействующих с олигонуклеотидами. Радиоактивность измеряли на  $\beta$ -счетчике 1211 Rak Beta ("LKB", Финляндия) по Черенкову. Полученные данные оценивали в программе STATISTICA for Windows ("StatSoft", Англия). Характеристические времена полувыведения  $T_{1/2\alpha}$  и  $T_{1/2\beta}$  рассчитывали из уравнения:

$$C(t) = Ae^{\alpha t} + Be^{\beta t},$$

где  $C(t)$  - концентрация олигонуклеотида в плазме во время  $t$ ;  $A$  и  $B$  - термы пересечения;  $\alpha$  - константа распределения олигонуклеотида;  $\beta$  - константа элиминирования олигонуклеотида [14].

Для анализа олигонуклеотидов и их фрагментов в сывороточной и клеточной фракциях крови, осаждали белковые и нуклеотидные компоненты 20-ю объемами 2 %  $LiClO_4$  в ацетоне. Нуклеотидный материал экстрагировали водой и анализировали электрофорезом в 20% ПААГ с 8М мочевиной. В качестве маркерных олигонуклеотидов использовали продукт неполного гидролиза



3'-дезоксизекзонуклеазой Type VI ("Flow", США) предварительно меченого [ $^{32}\text{P}$ ] олигонуклеотида  $\text{p(N)}_{16}$ .

Для исследования связывания нуклеотидного материала эритроцитами *in vitro*, выделяли эритроцитарную фракцию как описано выше, ресуспендировали эритроциты в среде DMEM, предварительно насыщенной до 5 %  $\text{CO}_2$ , в концентрации  $10^7$  и  $10^8$  кл/мл и инкубировали с мечеными олигонуклеотидами и АТР (5 мкМ) в течение 3 часов в  $\text{CO}_2$  инкубаторе EG 110 IR ("Jouan", Франция) при  $37^\circ\text{C}$  и 5 %  $\text{CO}_2$ . После инкубации клетки отмывали от свободного олигонуклеотида тремя сменами по 10 объемов среды. Остаточную радиоактивность измеряли на  $\beta$ -счетчике по Черенкову.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

### Исследование стабильности олигонуклеотидов в крови.

Сохранность модифицированных по 5'-концевому фосфату производных олигонуклеотидов определяли в сывороточной, лейкоцитарной и эритроцитарной фракциях крови. Олигонуклеотидный материал фракций анализировали электрофорезом с последующей радиоавтографией. Оказалось, что в сыворотке крови наблюдается быстрая деградация 5'-защищенных фосфодиэфирных олигонуклеотидов  $\text{Rp(N)}_{16}$  (рис. 1). Через 20 и 40 мин после введения препарата исходный олигонуклеотид уже не выявляется, а продукты его деградации, присутствующие в следовых количествах, представлены 6 - 8 звенными олигонуклеотидами. Через 1,5 часа после введения препарата на радиоавтографе не выявляются также продукты деградации исходного олигонуклеотида. Эти данные согласуются с результатами других работ [15,16], где было показано, что деградация олигонуклеотидов в крови происходит в основном за счет 3'-эксонуклеазной активности и что время полужизни фосфодиэфирных олигонуклеотидов в сыворотке крови составляет не более 5 минут.

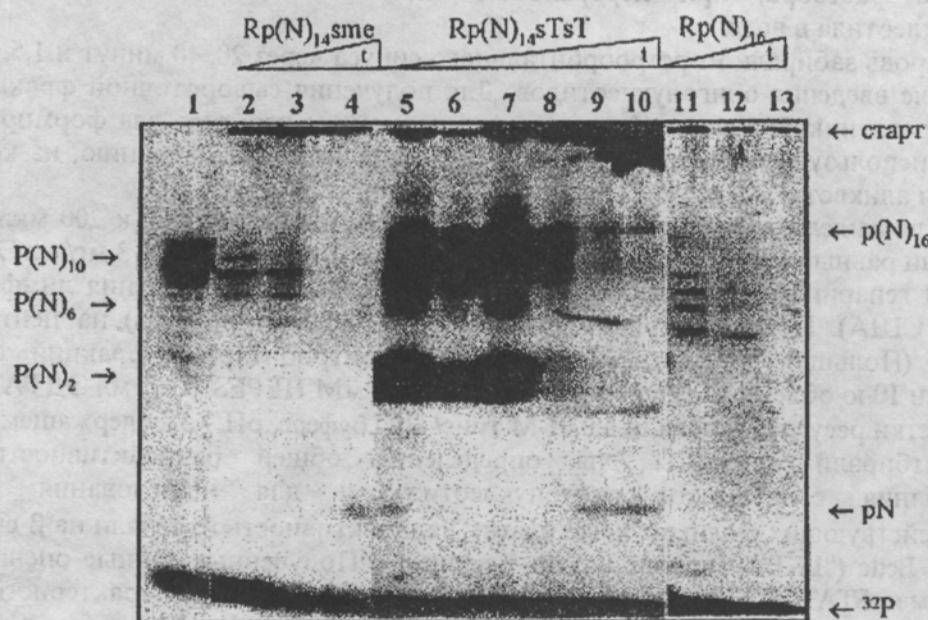


Рисунок 1.

Сохранность  $^{32}\text{P}$ -меченых производных олигонуклеотидов в сыворотке крови мышей после внутрибрюшинного введения (доза 0,5 мг/кг). 1-маркерные олигонуклеотиды, 2, 3, 4- олигонуклеотиды сыворотки через 0,3, 0,7, 1,5 ч после введения  $\text{Rp(N)}_{14}\text{sme}$ , 5, 6, 7, 8, 9, 10- олигонуклеотиды сыворотки через 0,3, 0,7, 1,5, 3, 9 и 24 ч после введения  $\text{Rp(N)}_{14}\text{sTsT}$ , 11, 12, 13- олигонуклеотиды сыворотки через 0,3, 0,7 и 1,5 ч после введения  $\text{Rp(N)}_{16}$ .

Сходные данные были получены для  $\text{Rp(N)}_{14}\text{sme}$  (рис. 1). Защитная тиометильная группа, присоединенная к 5'-концевому фосфату, не оказывает заметного влияния на сохранность олигонуклеотидных производных в сыворотке

крови. Кинетика деградации этого олигонуклеотида совпадала с таковой для фосфодиэфирного олигонуклеотида. Через 20 и 40 мин от момента введения олигонуклеотида в сыворотке выявляются только 8 - 10 звенные продукты деградации исходного олигонуклеотидного производного, и через 1,5 часа после введения препарата продукты деградации исходного олигонуклеотида в сыворотке не обнаруживаются.

Через 1,5 часа после введения мышам  $[^{32}\text{P}]$ -меченного  $\text{Rp}(\text{N})_{14}\text{sTsT}$  в сывороточной фракции обнаруживались олигонуклеотиды, которые по своей электрофоретической подвижности соответствуют 3, 4, 7, 10, 13-14 и 16 - звенным олигонуклеотидам (рис. 1). Полосы, расположенные выше 16 - звенного олигонуклеотида, по-видимому, соответствуют продуктам самоалкилирования используемого реагента. Данный спектр олигонуклеотидов претерпевает незначительные изменения во времени. Так, через 24 часа от момента введения  $\text{Rp}(\text{N})_{14}\text{sTsT}$  основными олигонуклеотидными продуктами в сыворотке крови являются 10, 13-14 и 16 звенный олигонуклеотиды. Таким образом,  $\text{Rp}(\text{N})_{14}\text{sTsT}$  обладает значительно более высокой стабильностью в сыворотке крови по сравнению с двумя другими исследованными олигонуклеотидными производными  $\text{Rp}(\text{N})_{14}\text{sme}$  и  $\text{Rp}(\text{N})_{16}$ . Исходный продукт  $\text{Rp}(\text{N})_{14}\text{sTsT}$  выявляется в циркуляции на протяжении более, чем 24 часов. Этот факт свидетельствует в пользу того, что деградация олигонуклеотидов в организме происходит преимущественно под действием 3'-экзонуклеаз. Наличие одной фосфотиометильной группы на 3'-конце, как оказалось, не является серьезным препятствием для нуклеаз и не предохраняет олигонуклеотид от деградации. Наличие двух межнуклеозидных фосфоротиоатных групп на 3'-конце, по-видимому, мешает нормальному функционированию фермента, обеспечивая сохранность олигонуклеотидному производному в сыворотке крови, сопоставимую с сохранностью фосфоротиоатных олигонуклеотидов [17]. Использование полностью замещенных фосфоротиоатных производных олигонуклеотидов для воздействия на клетки и в организме показало, что они вызывают побочные эффекты за счёт взаимодействия с белками [17,18]. Низкая скорость деградации *in vivo* фосфодиэфирных олигонуклеотидов с двумя фосфоротиоатными межнуклеозидными группами на 3'-конце позволяет надеяться на их успешное использование в работах, связанных с ген - направленной терапией.

Следует отметить, что набор продуктов деградации, обнаруженный в эритроцитарной фракции крови, в отличие от сыворотки, не зависит от типа введённого в организм производного олигонуклеотида (рис. 2). В эритроцитах во всех случаях обнаружены моно-, ди-, три- и тетра-нуклеотиды. Содержание олигонуклеотидного материала в эритроцитарной фракции увеличивается с течением времени.

Эритроциты, по-видимому, связывают короткие олигонуклеотиды более эффективно, чем длинные, поскольку при введении  $\text{ClRp}(\text{N})_{14}\text{sTsT}$ , несмотря на наличие в сыворотке исходного олигонуклеотида и фрагментов длиной 7, 10, 13 - 14 нуклеотидов, в эритроцитарной фракции отсутствуют такие фрагменты, а обнаруживаются только моно-, ди-, три- и тетра-нуклеотиды (рис. 2).

Можно предположить, что данные олигонуклеотиды являются результатом внутриэритроцитарной деградации более крупных олигонуклеотидных продуктов сыворотки, либо, результатом включения меченого фосфата при синтезе *de novo*.

Чтобы проверить эти предположения, нами, во-первых, была исследована стабильность олигонуклеотидов в эритроцитах. Было показано, что 2-х часовая инкубация фосфодиэфирных олигонуклеотидов с интактными и лизированными эритроцитами не приводит к появлению продуктов деградации исходных олигонуклеотидов, что свидетельствует о том, что эритроциты не содержат собственных нуклеаз и нуклеаз, ассоциированных с эритроцитарными мембранами (данные не приведены). Во-вторых, олигонуклеотидный материал эритроцитарной фракции крови обрабатывали 5 %  $\text{HClO}_4$ . Такая обработка приводит к гидролизу фосфамидной связи и увеличению электрофоретической подвижности 5'-фосфамидных производных олигонуклеотидов [19]. На рисунке 2 видно, что



электрофоретическая подвижность динуклеотида эритроцитарной фракции увеличивается после обработки  $\text{HClO}_4$ , что свидетельствует о наличии защитной группы на 5'-конце олигонуклеотида, и, следовательно, подтверждает образование фрагментов в результате гидролиза исходного олигонуклеотида.

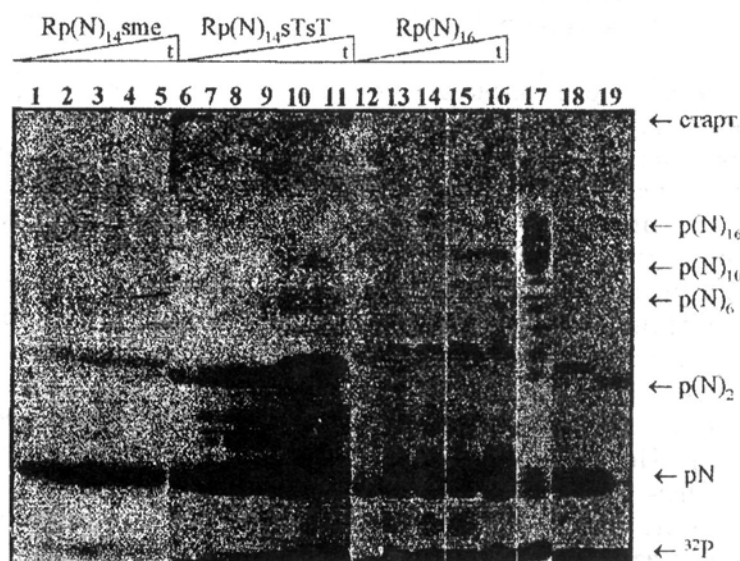


Рисунок 2.

Продукты деградации  $^{32}\text{P}$ -меченых производных олигонуклеотидов в эритроцитах мышей после внутрибрюшинного введения (доза 0,5 мг/кг). 1, 2, 3, 4, 5- олигонуклеотиды через 0,3, 0,7, 1,5, 3, 9 и 24 ч после введения  $\text{Rp}(\text{N})_{14}\text{sme}$ , 6, 7, 8, 9, 10, 11- олигонуклеотиды через 0,3, 0,7, 1,5, 3, 9 и 24 ч после введения  $\text{Rp}(\text{N})_{14}\text{sTsT}$ , 12, 13, 14, 15, 16- олигонуклеотиды через 0,3, 0,7, 1,5, 3, 9 и 24 ч после введения  $\text{Rp}(\text{N})_{16}$ , 17- маркерные олигонуклеотиды. 18- динуклеотид эритроцитарной фракции до обработки хлорной кислотой (3 ч после введения препарата). 19- динуклеотид эритроцитарной фракции после обработки хлорной кислотой (3 ч после введения препарата).

Таким образом, короткие олигонуклеотиды и мононуклеотиды, обнаруживаемые в эритроцитах, являются продуктами деградации исходных олигонуклеотидов, которые появляются в результате гидролиза не связанными с эритроцитами нуклеазами крови и тканей организма. Отсутствие в сыворотке олигонуклеотидов, обнаруживаемых в эритроцитарной фракции, позволяет предположить, что эритроциты связывают короткие олигонуклеотиды с высокой эффективностью.

Свойство эритроцитов более эффективно связывать короткие олигонуклеотиды, обнаруженное при введении олигонуклеотидов в организм, было подтверждено в экспериментах *in vitro* (рис. 3). Из рисунка 3 видно, что в ряду АТР, рТТ, рGATC,  $\text{p}(\text{N})_{16}$  наблюдается уменьшение эффективности связывания с эритроцитами. Известно, что связывание эритроцитами АТР обусловлено наличием на эритроцитарной мембране специфических АТР-связывающих белков [20]. Снижение уровня связывания олигонуклеотидов в 4-5 раз при увеличении концентрации эритроцитов от  $10^7$  до  $10^8$  кл/мл может объясняться склонностью последних к образованию агрегатов и, вследствие этого, уменьшением эффективной поверхности связывания. Следует отметить тот факт, что в этом эксперименте при последующей инкубации эритроцитов в среде, не содержащей олигонуклеотид, 95 % поглощенного эритроцитами тетра нуклеотида рGATC удерживалось в клетках в течение, по крайней мере, 2-х часов (данные не представлены), что сильно отличает эритроциты от других исследованных ранее клеток [21], которые экскретируют до 70 % захваченных олигонуклеотидов в течение того же времени.

Нами так же было показано, что олигонуклеотиды накапливаются в цитоплазме эритроцитов и не ассоциированы с клеточной мембраной. После лизиса

эритроцитов, предварительно инкубированных с  $[^{32}\text{P}]$ -меченным  $\text{Rp(N)}_{16}$ , в гипотонической среде в мембранной фракции радиоактивность не определялась, вся метка обнаруживалась в цитоплазматической фракции (данные не представлены).

Как отмечалось выше, при введении олигонуклеотидов в организм, в эритроцитах накапливаются короткие фрагменты исходных олигонуклеотидов, которые практически отсутствуют в сыворотке (рис. 1, рис. 2). Можно предположить, что некоторые белки эритроцитарной мембраны принимают участие в процессе избирательного захвата коротких олигонуклеотидов (не более, чем тетрамерных).

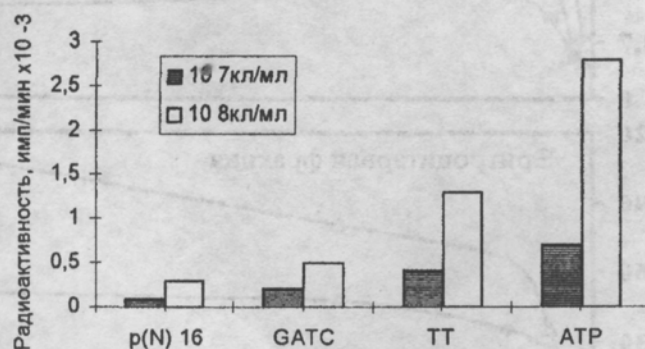


Рисунок 3.

Связывание олигонуклеотидов и АТР эритроцитами *in vitro*. Эритроциты ресуспендировали в среде ДМЕМ в концентрации  $10^7$  и  $10^8$  кл/мл и инкубировали с АТР и олигонуклеотидами (в концентрации 5 мкМ) при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 3 часов.

Известно, например, что эритроцитарный белок-рецептор глюкозы связывает АТР и мононуклеотиды [22]. Полученные данные об избирательности захвата коротких олигонуклеотидов эритроцитами и об отсутствии транспорта олигонуклеотидов из эритроцитов позволяют считать, что эритроциты не участвуют в метаболизме исходного фосфодиэфирного олигонуклеотида, но с высокой эффективностью захватывают продукты его гидролиза, образующиеся в сыворотке крови или в тканях.

#### Исследование фармакокинетики олигонуклеотидов в крови *in vivo*.

Зависимость содержания радиоактивного материала в сыворотке и клетках крови после внутрибрюшинного введения олигонуклеотида представлена двухфазной кривой (рис.4). Первая стадия характеризуется временем полувыведения ( $T_{1/2\alpha}$ ) 30 мин, вторая имеет характеристическое время полувыведения ( $T_{1/2\beta}$ ) равное 48-50 часам. Интересно отметить, что  $T_{1/2\alpha}$  и  $T_{1/2\beta}$  практически не зависят от стабильности олигонуклеотидов и их производных в организме. В работах [6,23] было показано, что при внутривенном введении олигонуклеотида в организм мышей и крыс в сыворотке крови изменение концентрации фосфоротиоатных олигонуклеотидов также описывается двухфазной кривой. Характеристические времена  $T_{1/2\alpha}$  и  $T_{1/2\beta}$  составляли 40-70 мин и 34-45 часов соответственно, что хорошо согласуется с нашими данными.

В эритроцитарной фракции со временем наблюдается накопление радиоактивного материала, причем при введении стабильных аналогов олигонуклеотидов накопление радиоактивного материала в эритроцитарной фракции происходит более интенсивно. Через 24 часа после введения  $\text{p(N)}_{14}\text{sTsT}$  в эритроцитарной фракции содержится почти в 6 раз больше радиоактивного материала, чем после введения дезоксирибоолигонуклеотида  $\text{p(N)}_{16}$ . Через 20 мин после введения олигонуклеотида не менее 95% радиоактивности содержится в сывороточной фракции, однако со временем происходит перераспределение радиоактивности в эритроцитарную фракцию. Через 24 часа после введения  $\text{p(N)}_{16}$  в эритроцитарной фракции содержится около 25% радиоактивности крови, а через 24



часа после введения  $p(N)_{14sTsT}$  радиоактивность эритроцитарной фракции составляет более 80% радиоактивности крови.

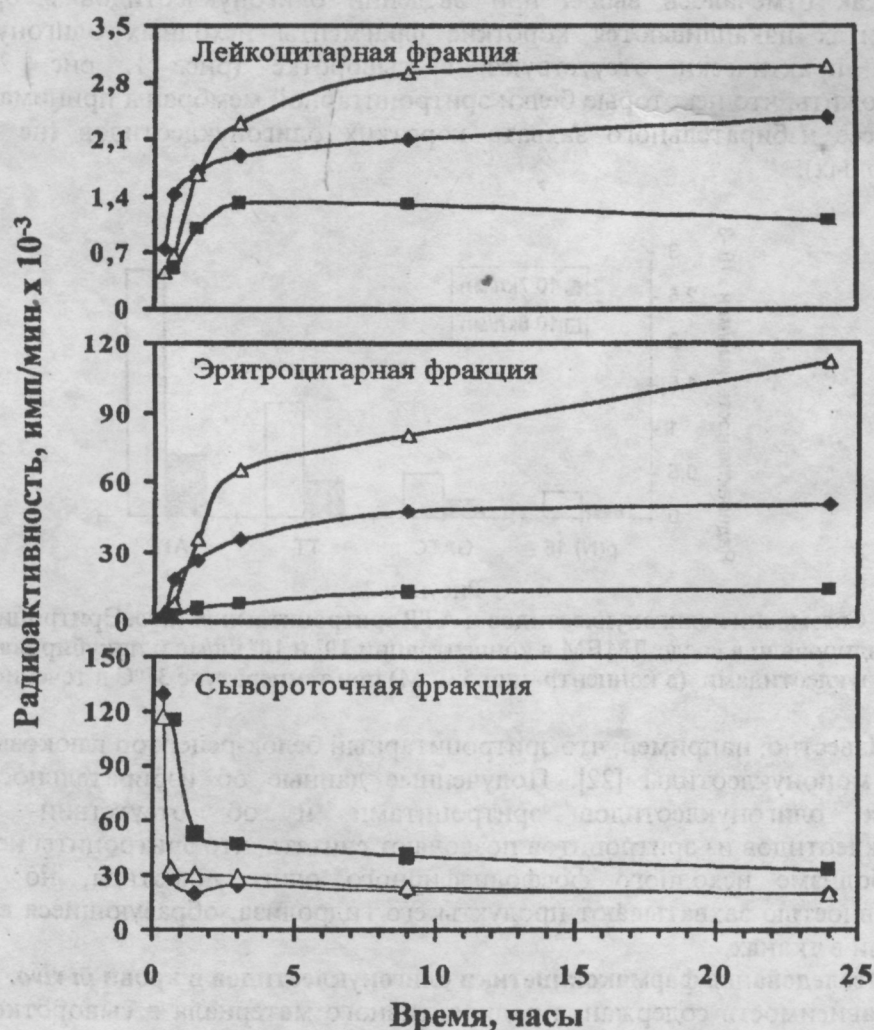


Рисунок 4.

Временная зависимость содержания радиоактивного материала в лейкоцитарной, эритроцитарной и сывороточной фракциях крови после внутрибрюшинного введения мышам BALB/c производных олигонуклеотидов, доза 0.5мг/кг:  $Rp(N)_{16}$  (■);  $Rp(N)_{14sme}$  (◆);  $Rp(N)_{14sTsT}$  (Δ).

За счет связывания коротких олигонуклеотидов и мононуклеотидов эритроцитами временная зависимость суммарной радиоактивности крови (рис.5) в значительной степени отличается от временной зависимости радиоактивности сыворотки (рис.4). Накопление радиоактивности эритроцитарной фракцией крови увеличивает характеристическое время  $T_{1/2\beta}$  для олигонуклеотида  $p(N)_{16}$  до 76-82 часов, а после введения олигонуклеотидов  $p(N)_{14sTsT}$  и  $p(N)_{14sme}$  через 1,5 часа наблюдается рост суммарной радиоактивности крови. Так как ранее нами было показано, что эритроциты эффективно и практически необратимо связывают короткие олигонуклеотиды, а время рециркуляции эритроцитов в организме достигает 60-ти суток, кровь со временем превращается в депо продуктов деградации олигонуклеотидов.

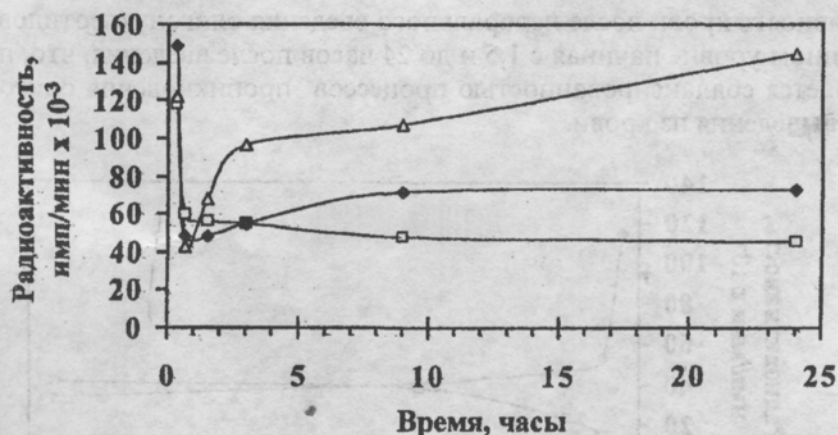


Рисунок 5.

Содержание радиоактивного материала в крови после внутрибрюшинного введения мышам BALB/c  $^{32}\text{P}$ -меченых производных олигонуклеотидов:  $\text{Rp}(\text{N})_{16}$  (□);  $\text{Rp}(\text{N})_{14\text{sme}}$  (◆);  $\text{Rp}(\text{N})_{14\text{sTsT}}$  (Δ); доза 0,5 мг/кг.

Авторами ряда работ [6,23] было показано, что содержание олигонуклеотидов в сыворотке или плазме крови после введения быстро уменьшается. Было выдвинуто предположение о том, что эритроциты не связывают олигонуклеотиды, поскольку на коротких временах инкубации (30 мин) в плазме наблюдалось 90% суммарной радиоактивности крови [23]. В работах с использованием фосфоротиоатных олигонуклеотидов, равномерно меченных [ $^{35}\text{S}$ ] [6], было показано, что олигонуклеотиды медленно деградируют в крови, однако на электрофореграммах образцов сыворотки выявляются только длинные олигонуклеотиды и не выявляются короткие фрагменты. Как следует из результатов представленной работы, короткие олигонуклеотиды и мононуклеотиды действительно практически не выявляются в сыворотке крови, так как накапливаются в эритроцитарной фракции (рис.1, рис.4). В работе Агравала и соавт. [16] показано, что концентрация фосфоротиоатных олигонуклеотидов в эритроцитарной фракции в 2,5-3 раза меньше, чем в сыворотке. Эти результаты не противоречат полученным данным, так как авторы получили такое распределение концентраций со стабильным 25-звенным фосфоротиоатным олигонуклеотидом после ежедневного введения олигонуклеотида, а, как следует из проведенных экспериментов, длинные олигонуклеотиды плохо накапливаются в эритроцитах. Более того, вполне вероятно, что такое распределение олигонуклеотидов между эритроцитарной и сывороточной фракциями является косвенной характеристикой стабильности использованного авторами олигонуклеотида.

Как было показано ранее, основным путем выведения олигонуклеотидов является экскреция олигонуклеотидов и продуктов их деградации с мочой [23]. При этом по данным разных авторов за 6-10 суток с мочой выводится 65-75% исходной радиоактивности и в экскретированном материале представлены в основном продукты деградации олигонуклеотидов [24,25]. Деградация олигонуклеотидов в крови и тканях может приводить к перераспределению радиоактивности в эритроцитарную фракцию, что при условии практически необратимого связывания и длительной рециркуляции эритроцитов (до 60 суток) приводит к длительной рециркуляции продуктов деградации олигонуклеотидов в организме.

При пероральном способе введения (рис.6) характер кривой накопления олигонуклеотидов в эритроцитарной фракции крови сохраняется практически таким же, как и при внутрибрюшинном введении. В сывороточной фракции крови в этом случае отсутствует стадия быстрого выведения радиоактивности с  $T_{1/2\alpha}=30$  минут, а первая фаза имеет характеристическое время  $T_{1/2\alpha}=3$  часа. Это, по-видимому, связано с более медленным, по сравнению с внутрибрюшинным введением, проникновением олигонуклеотидов в кровь. Интересно отметить, что суммарная



радиоактивность крови после перорального введения олигонуклеотидов сохраняется на постоянном уровне начиная с 1,5 и до 24 часов после введения, что, по-видимому, обеспечивается сбалансированностью процессов проникновения олигонуклеотидов в кровь и выведения из крови.

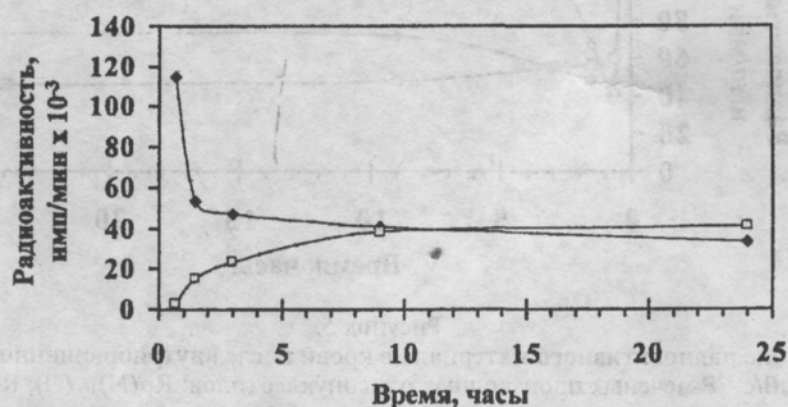


Рисунок 6.

Временная зависимость содержания радиоактивного материала в эритроцитарной (□) и сывороточной (◆) фракциях крови, после перорального введения мышам BALB/c производного олигонуклеотида Rp(N)<sub>16</sub> (доза 0,5 мг/кг).

В лейкоцитарной фракции со временем также наблюдается накопление радиоактивности. Однако, если через 20 и 40 минут после внутрибрюшинного введения олигонуклеотида суммарная радиоактивность лейкоцитов составляет 5-8% от суммарной радиоактивности эритроцитов, то к 24 часам этот показатель составляет всего 2,5% (рис.4). Введение мышам более стабильных производных олигонуклеотидов приводит к увеличению радиоактивности лейкоцитарной фракции, однако, эти отличия не так выражены, как в эритроцитарной фракции.

Таким образом в представленной работе исследованы стабильность и распределение по клеточным и сывороточной фракции в крови *in vivo* дезоксирибоолигонуклеотидов и дезоксирибоолигонуклеотидов с модифицированным 3'-концевым фрагментом молекулы. Обнаружено, что модификация 3'-концевого фосфата практически не влияет на стабильность олигонуклеотидов, а введение двух 3'-концевых межнуклеозидных фосфоротиоатных групп значительно увеличивает стабильность олигонуклеотидов. Обнаружено, что лейкоциты крови практически не связывают олигонуклеотиды и продукты их деградации. Показано, что эритроциты не связывают длинные олигонуклеотиды, однако эффективно и практически необратимо захватывают продукты деградации исходных олигонуклеотидов: моно-, ди-, три- и тетрануклеотиды.

Работа была выполнена при поддержке гранта школы РФФИ № 96-15-97732, гранта "Ген-направленные биологически активные вещества" ГКНТ 06.03.5 и международного гранта INTAS № 94-3214.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Knorre D. G., Vlassov V. V., and Zarytova V. F. (Cohen, J.S., ed.) (1989) Oligodeoxynucleotides: Antisense inhibitors of gene expression (Cohen, J.S., ed) Press. pp. 173-196.
2. Matsucura M., Zon G., Shinozuka K., Robert-Guroff M., Shimada T., Stein C. A., Mitsuya H., Wong-Staal F., Cohen J. S., and Broder S. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 86, 4244-4248.
3. Watson P. H., Pon R. T., and Shin R. P. S. (1991) Cancer Res., 51, 3996-4000.
4. Wickstrom E. (1992) TIBS, 10, 281-287.

5. Zendegui J. G., Vasquez K. M., Tinsley J. H., Kessler D. G., and Hogan M. E. (1992) Nucl. Acids. Res. **20**, 307-314.
6. Agrawal S., Temsamani J., Tang J. Y. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**, 7595-7599.
7. Карамышев В. Н., Власов В. В., Зон Д., Иванова Е. М., Якубов Л. А. (1993) Биохимия, **8**, 590-598.
8. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Кутявин И. В. (1982) Биоорган. химия, **8**, 224-230.
9. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. (1983) Биоорган. химия, **9**, 516-521.
10. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. (1984) Молекулярное клонирование М. "Мир".
11. Cantor C. R., Tinoco I. (1965) J. Mol. Biol., **13**, 65-77.
12. Fasman T. E. (Ed) // CRC Press. - 1975. - V.1. Cleveland.
13. Амирханов Н. В., Зарытова В. Ф. (1995) Биоорган. Химия, **21**, 365-375.
14. Perrier D., Gibaldi M. (1982) J. Pharm. Sci. **71**, 474-475.
15. Shaw J-P., Kent K., Bird J., Fishback J., Froehler B. (1991) Nucl. Acids. Res., **19**, 747-750.
16. Agrawal S., Temsamani J., Galbraith W., Tang J. Y. (1995) Clin. Pharmacokin., **28**, 7-16.
17. Iversen P. (1993) In vivo studies with phosphorothioate oligonucleotides: Rationale for systemic therapy. In Antisense Research and Applications, CRC Press., pp. 461-469.
18. Freier S. M. (1993) Hybridization: Considerations affecting antisense drugs. Antisense Research and Applications. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 67-73.
19. Бабкина И. В., Буторин А. С., Иванова Е. М., Райт А. С. (1988) Биохимия, **53**, 384-393.
20. Azim A. C., Shirin M. M., Korsgren C., Dotimas E., Cohen C. M., and Chishti A. H. (1996) Biochemistry, **35**, 3001-3006.
21. Власов В. В., Иванова Е. М., Кутявин И. В., Райт А. С., Юрченко Л. В., Якубов Л. А., Абдукаюмов М. Н., Скоблов Ю. С. (1989) Мол. Биология, **23**, 93-100.
22. Carrutgers A., and Helgersson A. L. (1989) Biochemistry, **28**, 8337-8346.
23. Iversen P. L., Mata J., Tracewell W. G., Zon G. (1994) Antisense Res. Dev., **4**, 43-52.
24. Zhang R., Diasio R. B., Lu Z., Liu T., Jiang Z., Galbraith W. M., and Agrawal S. (1995) Biochem. Pharmacol. **49**, 929-939.
25. Zhang R., Lu Z., Zhang X., Diasio R., Liu T., Jiang Z., and Agrawal S. (1995) Clin. Chem. **41**, 836-843.

Поступила 27.07.98.

# **PHARMACOKINETICS AND STABILITY OF PHOSPHODIESTER AND PHOSPHOROTHIOATE 3'-END MODIFIED OLIGONUCLEOTIDES IN THE BLOOD IN VIVO: A COMPARATIVE STUDY**

P.P. LAKTIONOV, A.V. BRYKSIN, E. YU. RYKOVA, N. V. AMIRCHANOV  
AND V. V. VLASSOV

Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Pr.  
Lavrentjeva 8. Novosibirsk 630090, fax: (3832) 33-36-77, e-mail: bryksin@niboch.nsc.ru

*In vivo* stability and distribution of deoxyribooligonucleotides and 3'-end modified oligodeoxyribooligonucleotides were studied in blood serum and cells. Substitution of two 3'-end internucleotide phosphodiester bonds increased the stability of modified oligonucleotides. Modified oligonucleotides were shown to be stable in blood serum for up to 24 hours. Leukocytes did not bind oligonucleotides significantly, whereas erythrocytes accumulate mono-, di-, three-, tetranucleotides appeared in the blood stream as degradation products of the parent oligonucleotide.

**Key Words:** oligodeoxynucleotides, derivatives, pharmacokinetics, stability.