

АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ

Туркина Ольга Романовна

студент

Терах Елена Игоревна

кандидат химических наук

Новосибирский государственный медицинский университет
Минздрава России, Новосибирск

Аннотация. Антисмысловые (антисенс) олигонуклеотиды – ценные инструменты для ингибирования экспрессии генов с помощью специфического связывания с мРНК, используются для изучения функции генов или в терапевтических целях. Данный обзор посвящен их строению, механизму действия, химической модификации и доставке в клетки.

Ключевые слова: антисмысловые олигонуклеотиды, синтез белка, антисмысловые технологии.

ANTISENS OLIGONUCLEOTIDES

Turkina Olga Romanovna

student

Terah Elena Igorevna

candidate of chemical sciences

Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk

Abstract. Antisense oligonucleotides is a valuable tool for inhibition of gene expression by specific binding to mRNA and are used to studying of gene function and treatment of diseases. This review is devoted to their structure, mechanism of action, chemical modification and delivery to cells.

Keywords: antisense oligonucleotides, protein synthesis, antisense technology.

Принцип антисмысловых (антисенс) технологий – основа специфического ингибирования нежелательной экспрессии генов путем блокирования активности мРНК [1]. Перспектива использования антисмысловых олигонуклеотидов (АСО) еще в 60-х годах прошлого века стала идеальной стратегией для привлечения новых геномных знаний для открытия и разработки лекарственных средств [2]. В настоящее время АСО превратились в мощные и универсальные инструменты для изучения функций белков в живых клетках, технологии их использования значительно улучшились, наблюдается быстрый рост числа антисмысловых молекул в прогрессирующих клинических испытаниях [3-5]. Антисенс-технологии обеспечивают простой и эффективный подход к лечению целого ряда заболеваний, открытию и разработке нового поколения лекарственных препаратов.

Существует три известных на данный момент варианта антисмысловых технологий: антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы и РНК-интерференция [6]. При всем том, что все они имеют разные механизмы работы, их всех связывает общий принцип: антисмысловый препарат начинает действовать после того, как свяжется с РНК-мишенью с образованием дуплекса.

Рибозимы появились почти одновременно с антисмысловыми олигонуклеотидами, и сразу завоевали внимание ученых, достигли значительных успехов. С помощью них можно достичь ингибирования комплементарных последовательностей РНК вследствие гидролиза или трансэтерификации [1]. Однако из-за нестабильности рибозимов при попадании в кровь их применение не так обширно.

Другой вариант антисмысловых технологий – малые интерферирующие РНК (siRNA – small interfering RNA), в основе которых лежит принцип РНК-интерференции [7]. В сравнении с рибозимами и АСО, siRNA имеют важные преимущества: специфичность действия, эффективность подавления экспрессии генов и возможность работы одновременно с

несколькими генами. Но затруднительная доставка в клетки и разрушение под действием РНКаз являются весомыми недостатками в их использовании. Тем не менее, технологии siRNA достаточно быстро развиваются, в том числе, на базе АСО.

Антисмысловые олигонуклеотиды являются короткими синтетическими аналогами природных нуклеиновых кислот, предназначенными для специфического связывания с мРНК с помощью гибридизации Уотсона-Крика, вызывая селективную деградацию мРНК или запрещая трансляцию выбранной мРНК в белок. Для связывания АСО должны иметь хотя бы 11 оснований, большинство же используемых агентов находятся в базовом диапазоне 15-25 нуклеотидов. Антисмысловая технология обладает способностью ингибировать уникальные мишени с высокой специфичностью и используется для ингибирования синтеза широкого спектра белков [8].

Открытие АСО связано с именами Д.Г. Кнорре и Н.И. Гриневой, сотрудников новосибирского Института органической химии (НИОХ) СО АН СССР [2]. Именно они впервые выдвинули идею о ген-направленном влиянии олигонуклеотидов, которые могли специфически образовывать комплексы с комплементарными им нуклеотидными последовательностями [9]. В 1967 г. была опубликована первая работа сибирских ученых, этот год и считается годом открытия олигонуклеотидов, впоследствии названных антисмысловыми.

Дальнейшее изучение АСО советскими химиками столкнулось со многими проблемами: отсутствие приборов для работы с небольшими количествами нуклеиновых кислот, неспособность синтезировать большое количество олигонуклеотидов и невозможность эффективно определять их последовательность. Благодаря взаимодействию ученых НИОХ с сотрудниками Института ядерной физики (Новосибирск) и Московского государственного университета (МГУ) трудности были решены. Наличие всех необходимых для биологических исследований приборов

и методов позволило провести первые эксперименты на нуклеиновых кислотах. Было доказано специфическое взаимодействие олигонуклеотидов с природными РНК и ДНК, их направленная модификация, выявлена возможность подавления вирусных инфекций [10].

Антисмысловый эффект олигонуклеотидов на биологические мишени был доказан в 1978 г. американскими учеными Stephenson и Zamesnik. В своей работе [11] они рассказали о подавлении развития вируса саркомы Рауса, содержащего РНК. Синтетический олигонуклеотид, содержащий 13 нуклеотидов, комплементарный 3'- и 5'-концевым последовательностям, блокировал стадии, участвующие в вирусном изменении фибробластов в клетки саркомы, тем самым предотвращался инфекционный процесс. Так было доказано, что АСО могут специфично ингибировать экспрессию генов.

После публикаций об эффектах, достигаемых олигонуклеотидами, интерес к АСО возник уже во всем мире. Первый симпозиум по данной проблеме был проведен в Новосибирске 1988 г. [9]. Работой по ген-направленным олигонуклеотидам стали заниматься ученые десятков многих стран, активно начала вестись разработка лекарств на основе АСО.

Однако задачи оказались слишком масштабны. Информации о нуклеотидных последовательностях генов человека было недостаточно. Возможности быстрого синтеза олигонуклеотидов, которые можно было бы применять в лечении заболеваний, не было, еще требовалось провести значительное количество экспериментов для того, чтобы понять механизм их действия и влияние на организм. По этой причине интерес к АСО общественности начал угасать. Только академические лаборатории и крупные фирмы продолжали исследования, постепенно раскрывая химию нуклеиновых кислот.

Понадобилась почти четверть века, чтобы ученые получили исчерпывающие данные о строении, принципе действия, механизмах работы

АСО. Шаг за шагом совершенствовались методы их синтеза, доставки в клетки, продолжились разработки лекарственных средств, началось бурное развитие антисенс-технологий.

В 2006 г. американские ученые Э. Файер и К. Мэллоу были награждены Нобелевской премией по физиологии и медицине «за открытие фундаментального явления РНК-интерференции – подавления экспрессии генов с помощью двуцепочечной РНК», что по своей сути и является антисмысловой технологией [12].

Антисмысловыми (antisens) олигонуклеотиды стали называть потому, что мРНК (основные мишени для АСО) имеют нуклеотидную последовательность, которая соответствует смысловому (т.е. кодирующему белок) участку цепи, а комплементарные им олигонуклеотиды блокируют синтез белка, т.е. имеют «антисмысловую» последовательность.

Синтетические олигонуклеотиды являются чуждыми для клеток, в которые они введены, поэтому они сразу же становятся добычей для эндогенных нуклеаз [1]. Олигонуклеотиды должны быть защищены от них для достижения устойчивости, которая необходима для выполнения их задач, в клетке. Для этого нормальные олигонуклеотиды химически модифицируют. Есть три возможных места на нуклеотиде, в которых могут быть введены защитные модификации. Как в ДНК-, так и РНК-нуклеотидах могут быть изменены основание или основная фосфатная цепь. В РНК-нуклеотидах также может быть модифицирована 2'-гидроксильная группа, отсутствующая в ДНК. «Хитрость» в защитных модификациях нуклеотидов заключается в том, чтобы ввести изменение, которое защищает от деградации нуклеазы и в то же время не устраняет желаемый эффект олигонуклеотидной последовательности, блокируя комплементарную гибридизацию или вредя клетке [13].

По своим поколениям олигонуклеотиды были разделены на три вида [1]:

1. Первое поколение антисмысловых олигонуклеотидов [6] содержит модификации фосфодиэфирной связи: замена атома кислорода серой (фосфотиоаты), метильной группой (метилфосфанаты) [14] или аминами (фосфорамидаты). Наиболее успешными являются фосфотиоаты, они используются для сайлесинга генов из-за их достаточной устойчивости к нуклеазам и способности индуцировать функции РНКазы Н. Первый препарат на основе антисмысловых олионуклеотидов Витравен (vitravene, fomivirsen) представляет собой именно фосфотиоат. Он ориентирован на лечение поврежденной цитомегаловирусом (ЦМВ) сетчатки у больных СПИДом. Также большинство АСО, разрабатывающихся в настоящее время, являются АСО первого поколения.

2. Проблемы, связанные с фосфотиоатами в некоторой степени решаются в олигонуклеотидах второго поколения [14], которые содержат нуклеотиды с алкильными модификациями в 2'-положении рибозы. 2'-О-метил- и 2'-О-метоксиэтил-РНК являются наиболее важными представителями этой группы. Антисмысловые агенты, полученные из этих нуклеотидов, менее токсичны, чем фосфотиоатные АСО, и обладают повышенным сродством к их комплементарным РНК. Однако существуют проблемы, связанные с эффективностью АСО второго поколения индуцировать расщепление РНКазой Н мРНК. Поскольку расщепление РНКазы Н является наиболее желательным механизмом антисмыслового эффекта, и для устойчивости к нуклеазам необходимы 2'-О-алкильные модификации, гибридная олигонуклеотидная конструкция, включающая обе характеристики, появилась в виде так называемого гапмера (олигомера с пропусками). Гапмер содержит центральный блок нуклеотидов, обязательный для индукции расщепления Рназой Н, который граничит с блоками модифицированных 2'-О-метильных рибонуклеозидов, защищающих внутренний блок от деградации нуклеазы [15].

3. Третье поколение антисмысловых олигонуклеотидов представляет собой аналоги нуклеиновых кислот, которые проявляют повышен-

ную термостабильность при гибридизации с комплементарными ДНК или РНК по сравнению с немодифицированными ДНК: ДНК и ДНК:РНК дуплексами [1]. Третье поколение содержит такие структурные элементы, как цвиттер-ионные олигонуклеотиды (обладающие как положительными, так и отрицательными зарядами в молекуле), пептидные нуклеиновые кислоты (PNAs – Peptide Nucleic Acids) (с псевдопептидной основой), блокированные нуклеиновые кислоты (LNAs – Locked Nucleic Acids), мостиковые нуклеиновые кислоты (BNAs – Bridged Nucleic Acids), гексил-нуклеиновые кислоты (HNAs – Hexitol Nucleic Acids) и морфолиновые олигонуклеотиды или морфолино-фосфорамидиты.

Пептидные нуклеиновые кислоты отличаются значительными изменениями, при которых основной фосфат сахара полностью замещается полиамидными связями. Хотя эти конструкции обеспечивают повышенную стабильность и благоприятную кинетику гибридизации, они страдают от недоступности механизма расщепления РНКазой H, от проблематичной растворимостью и трудностей с доставкой. Новейшей и наиболее перспективной модификацией третьего поколения является LNAs, они являются аналогов нуклеиновых кислот, в которых рибозное кольцо «блокировано» метиленовым мостиком, соединяющим 2'-О атом с атомом 4'-С. Блокированные нуклеиновые кислоты проявляют заметно увеличенную термодинамическую стабильность и улучшенное распознавание нуклеиновых кислот. Они являются мощным инструментом для многих молекулярно-биологических целей, в которых стандартные ДНК-олигонуклеотиды или РНК-рибозонды не проявляют достаточного соответствия или специфичности.

В гексил-нуклеиновых кислотах (HNAs – Hexitol Nucleic Acids) фуранозный сахарный фрагмент АСО замещается шестичленным гексильным компонентом. Замещение конформационно гибкой дезоксирибозы ограниченным кольцом ангидрогекситола приводит к структурной преорганизации HNA с образованием спиралей А-типа. Они показали значи-

тельное увеличение соответствия связывания с комплементарной РНК (приблизительно 3° С на модификацию). Кроме того, было обнаружено, что HNA устойчивы к ферментативной деградации. Однако антисмысловой эффект этих модификаций можно объяснить только стерическим блокированием мРНК-мишени, поскольку они не активируют РНКазу H.

В морфолино-фосфорамидитах рибоза заменена морфолиновым фрагментом, и используются фосфородиамидатные связи. Подобно RNAs эти модификации не активируют РНКазу H и могут быть использованы только в качестве стерических блокаторов для ингибирования экспрессии генов в биологической системе. Они устойчивы к нуклеазам и имеют схожее сродство к мишеням немодифицированных АСО.

Антисмысловые олигонуклеотиды изменяют нормальный синтез белка [8], который представляет собой обработку генетического сообщения для образования белков. На первом этапе смысловая цепь ДНК транскрибируется в пре-мРНК. На второй стадии пре-мРНК превращается в зрелую мРНК под действием трех отдельных процессов, которые включают 5'-упаковку, интронное удаление и полиаденилирование. На последней стадии мРНК переносится в цитоплазму из ядра к рибосомам для трансляции в соответствующую полипептидную цепь с образованием белков. Все эти шаги строго регулируются и играют важную роль в синтезе и функционировании мРНК.

Антисмысловые олигонуклеотиды сконструированы таким образом, что они связываются и интерферируют с любой из стадий обработки целевой мРНК, тем самым ингибируя синтез белка. Основные механизмы АСО [8] описаны ниже.

1. РНКазы H-опосредованная деградация.

Антисмысловые олигонуклеотиды могут проявлять свое действие в ядре или в цитоплазме. В ядре они направляются в 5'-, 3'-положения, участок сплайсинга или любую другую область на пре-мРНК. Когда АСО связывается с целевой мРНК, он образует гетеродуплекс мРНК-АСО.

Это приводит к пополнению фермента РНКазы Н. Это эндонуклеаза, которая является повсеместной и ответственна за распознавание и гидролиз РНК-цепи гетеродуплексной мРНК-АСО. Она служит мощным механизмом ингибирования экспрессии белка. Однако расщепление позволяет АСО быть неповрежденным, так что он может связываться с другими копиями мРНК и вызывать их подавление. Это позволяет вернуть олигонуклеотид, что приводит к длительному эффекту. Таким образом, его можно использовать в микро- или наномолярных концентрациях. Распознавание олигонуклеотида РНКазой Н зависит от его химической структуры.

2. Стерические препятствия.

Помимо деградации, вызванной РНКазой Н, уровни белка также могут быть снижены путем ингибирования трансляции, которая происходит в цитоплазме. Этот тип механизма показан теми АСО, где сахарная группа была модифицирована и, таким образом, они не способны активировать РНКазу Н. Для активации РНКазы Н 2'-положение нуклеотида должно быть немодифицировано. Олигонуклеотиды действуют путем связывания с целевой мРНК на месте начала трансляции и ингибируют процесс трансляции. Они также могут связаться с любой другой областью целевой мРНК, обеспечивающей стерическое затруднение для рибосом. В результате рибосомы не могут перемещаться вдоль мРНК и, следовательно, синтез белка изменяется

Для того, чтобы антисмысловый олигонуклеотид подавлял экспрессию гена, он должен проникать в клетки-мишени [16]. На сегодняшний день неясны точные механизмы проникновения олигонуклеотидов. Поглощение происходит через активный транспорт, который, в свою очередь, зависит от температуры, структуры и концентрации олигонуклеотида и клеточной линии. В настоящее время считается, что адсорбционный эндоцитоз и пиноцитоз в жидкой фазе являются основными механизмами интернализации олигонуклеотидов с относительными пропор-

циями интернализированного материала в зависимости от концентрации олигонуклеотидов. При относительно низкой концентрации олигонуклеотида, вероятно, интернализация происходит путем взаимодействия с рецептором, связанным с мембраной. При относительно высокой концентрации олигонуклеотида эти рецепторы насыщаются, и пиноцитотический процесс принимает большее значение

Многочисленные исследования показали [16], что обнаженные олигонуклеотиды плохо усваиваются клетками, независимо от того, заряжены они отрицательно или нет. Они, как правило, локализуются в эндосомах /лизосомах, где они недоступны для антисмысловых целей. Непременным условием антисмысловой деятельности является ядерная локализация. Для того, чтобы улучшить клеточное поглощение и пространственную и временную активность олигонуклеотида, был разработан ряд методов и транспортеров. Одновременное использование их повышает стабильность олигонуклеотидов против расщепления нуклеазой и позволяет использовать гораздо меньшие (~10-кратные) концентрации олигонуклеотидов.

Первым поколением разработанных векторов были липосомы [17], которые являются коллоидными везикулами, обычно состоящими из бислоев фосфолипидов и холестерина. Липосомы могут быть нейтральными или положительными (катионными), в зависимости от природы фосфолипидов. Нуклеиновую кислоту можно легко инкапсулировать во внутреннюю липосому, которая содержит водную часть, или связать с поверхностью липосомы посредством электростатических взаимодействий. Эти векторы, из-за их положительного заряда, имеют высокое сродство к клеточным мембранам, которые в физиологических условиях отрицательно заряжены. Поскольку эти векторы используют эндосомальный путь для доставки олигонуклеотидов в клетки, некоторые «вспомогательные» молекулы добавляются в липосомы, чтобы позволить олигонуклеотидам покинуть эндосомы. Эти «вспомогательные» мо-

лекулы в конечном счете индуцируют дестабилизацию эндосомной мембраны, позволяя просочиться олигонуклеотиду, который затем в высокой концентрации активно транспортируется к ядру. Многие коммерческие векторы (липофектин и соединения, известные под общим названием зуфектин, цитофектин, липофектамин и др) широко используются в лабораторных исследованиях.

Использование других катионных полимеров (например, поли-L-лизин, полиалкилцианакрилатные наночастицы и полиэтиленимин) также используется для доставки лекарственных средств [18, 19]. Нуклеиновые кислоты взаимодействуют с этими векторами через электростатические взаимодействия. Активность их была продемонстрирована в различных клеточных линиях и моделях голых мышей, но, к сожалению, эти полиамины, которые, как представляется, вызывают эндосомальный разрыв через механизм «молекулярной губки», токсичны и используются реже катионных липосомов.

Все эти системы катионной доставки [16] усваивают олигонуклеотиды посредством эндоцитозного механизма. Во избежание проблем в результате компартиментализации, рассматривается вопрос о моделировании проницаемости плазматической мембраны. Используя основные пептиды, можно увеличить прохождение олигонуклеотида через плазматическую мембрану с помощью механизма, независимого от рецептора и переносчика. Поскольку эти пептиды обладают свойством мембранной транслокации, ковалентное связывание с олигонуклеотидом может увеличить проникновение последнего в клетку, доставляя их непосредственно в цитоплазму и, следовательно, в конечном счете, ядро.

Дополнительный подход к интернализации олигонуклеотидов состоит в том, чтобы создать временную пермеабиллизацию плазматической мембраны и позволить обнаженным олигонуклеотидам проникать в клетки путем диффузии [20]. Такой подход включает в себя образование переходных пор в мембране, индуцированных химическим путем перме-

абилизацией стрептолизина-О, механическим путем микроинъекцией или получаемой электропорацией. Все эти способы в определенных обстоятельствах могут позволить заряженным или незаряженным олигонуклеотидам быстро проникать в клетки и локализоваться в ядре, где они производят антисмысловое ингибирование функции гена. Однако, они не полезны в естественных условиях, и их значение для целей проверки функции гена также должно быть поставлено под сомнение.

Применение векторов при доставке антисмысловых лекарств в естественных условиях остается на данный момент открытым вопросом. В отличие от исследований в пробирке, все клинические испытания антисмысловых олигонуклеотидов проводятся с обнаженными олигонуклеотидами. Переносчик в качестве эндосомального / лизосомального отвержения не нужен, и отсутствие ядерной локализации не является проблемой.

Таким образом, технология антисмысловых олигонуклеотидов является эффективным подходом избирательному моделированию экспрессии гена. При соблюдении строгого набора конкретных правил продолжающиеся «в пробирке» исследования с использованием АСО позволяют характеризовать новые мишени и потенциальные терапевтические соединения. Количество экспериментов *in vitro* непрерывно возрастало, и это привело к многочисленным терапевтическим исследованиям, многие из которых в настоящее время появляются предварительно положительными. Однако, оптимальное использование антисмысловых олигонуклеотидов в лечении заболеваний требует решений проблем, связанных с повышенной биологической активностью и эффективной направленной доставкой. С разрешением этих препятствий, антисмысловые олигонуклеотиды послужат прорывом для лечения угрожающих жизни людей заболеваний в ближайшем будущем.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Jasbir Singh J., Kaur H., Kaushik A. et al. A Review of Antisense Therapeutic Interventions for Molecular Biological Targets in Various Diseases // *Int. J. of Pharmacology*. 2011. V. 7. P. 294-315.
2. Власов В.В. Лекарство для генов // *Наука из первых рук*. 2007. Т. 14. № 2. С. 55-59.
3. Резник О.Н., Скворцов А.Е., Кузьмин Д.О., Тутин А.П., Резник А.О. Перспективы применения антисмысловой генной терапии при трансплантации органов // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2013. Т. 15. № 1. С. 106-117.
4. Афанасьева О.И., Покровский С.Н. Коррекция липидного обмена с использованием антисенс-технологий // *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2013. № 5. С. 532-545.
5. Visser M.E., Witztum J.L., Stroes E.S et al. Antisense oligonucleotides for the treatment of dyslipidaemia // *European Heart J*. 2012. V. 33. P. 1451-1458.
6. Скоблов М.Ю. Перспективы технологий антисмысловой терапии // *Молекулярная биология*. 2009. Т. 43. № 6. С. 984-998.
7. Jia-Hui W., Hendry B.M., Sharpe C.C. Silencing genes in the kidney: antisense or RNA interference? // *Nephrol Dial Transplant*. 2008. V. 23. P. 2115-2118.
8. Bhagyashree G., Srinivasan G. Antisense oligonucleotides as therapeutics and their delivery // *Current science*. 2017. V. 112. P. 490-498.
9. Власов В.В., Пышный Д.В, Зенкова М.А., Воробьев П.Е. Комплементарные здоровью. Прошлое, настоящее и будущее антисмысловых технологий // *Наука из первых рук*. 2014. Т. 15. № 1. С. 38-49.
10. Власов В.В, Горн В.В, Кутявин И.В и др. Возможность блокирования вирусной инфекции алкилирующими производными олигонуклеотидов // *Молекулярная генетика, микробиология, вирусология*. 1984. Т. 11. С. 36-41.
11. Zamecnik P.C., Stephenson M.L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide // *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 1978. V. 75. P. 280-284.
12. Fire A.Z., Mello C.C, Montgomery M.K et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // *Nature*. 1998. V. 391. P. 806-811.

13. Kurreck J. Antisense technologies: Improvement through novel chemical modifications // Euro. J. of Biochemistry. 2003. V. 270. P. 1628-1644.
14. Miller P.S., McParland K.B., Jayaraman K., Ts'o P.O. Biochemical and biological effects of nonionic nucleic acid methylphosphonates // Biochemistry. 1981. V. 20. P. 1874-1880.
15. Monia B.P., Johnston J.F., Geiger T. et al. Antitumor activity of a phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotide targeted against C-raf kinase // Natural Medicine. 1996. V. 2. P. 668-675.
16. Dias N., Stein C.A. Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms // Molecular Cancer Therapeutics. 2002. V. 1. P. 347-355.
17. Bennett C.F., Chiang M.Y., Chan H. et al. Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides // Molecular Pharmacology. 1992. V 41. P. 1023-1033.
18. Stewart A.J., Pichon C., Meunier L. et al. Enhanced biological activity of antisense oligonucleotides complexed with glycosylated poly-L-lysine // Molecular Pharmacology. 1996. V. 50. P. 1487-1494.
19. Zobel H.P., Kreuter J., Werner D. et al. Cationic polyhexylcyanoacrylate nanoparticles as carriers for antisense oligonucleotides // Antisense Nucleic Acid Drug Development. 1997. V. 7. P. 483-493.
20. Juliano R.L., Alahari S., Kole R. et al. Antisense pharmacodynamics: critical issues in the transport and delivery of antisense oligonucleotides // Pharmaceutical Research. 1999. V. 16. P. 494-502.