

核酸医薬の組織分布評価に用いられる手法の分類と特徴

小平 浩史^{*1, *2, #}, 岩崎 紀彦^{*1, *3}, 角辻 賢太^{*1, *4}, 後藤 昭彦^{*1, *5}, 島田 俊介^{*1, *6},
高草 英生^{*1, *7}, 宮澤 憲浩^{*1, *8}, 山中 陽介^{*1, *9}, 今井 峻司^{*1, *10}, 清田 浩平^{*1, *11},
庭山 裕孝^{*1, *12}, 深野 泰史^{*1, *13}, 福原 慶^{*1, *14}, 三好 美佳^{*1, *15}, 吉田 徳幸^{*16},
小比賀 聡^{*17}, 西川 元也^{*18, *19}, 井上 貴雄^{*16, #}

(受付: 令和7年4月2日, 受理: 令和7年9月16日)

Classification and Characteristics of Evaluation Methods for Tissue Distribution of Oligonucleotide Therapeutics

Hiroshi KODAIRA^{*1, *2, #}, Norihiko IWAZAKI^{*1, *3}, Kenta KADOTSUJI^{*1, *4},
Akihiko GOTO^{*1, *5}, Shunsuke SHIMADA^{*1, *6}, Hideo TAKAKUSA^{*1, *7},
Norihiro MIYAZAWA^{*1, *8}, Yosuke YAMANAKA^{*1, *9}, Shunji IMAI^{*1, *10},
Kohei KIYOTA^{*1, *11}, Yutaka NIWAYAMA^{*1, *12}, Yasufumi FUKANO^{*1, *13},
Kei FUKUHARA^{*1, *14}, Mika MIYOSHI^{*1, *15}, Tokuyuki YOSHIDA^{*16},
Satoshi OBIKA^{*17}, Makiya NISHIKAWA^{*18, *19}, and Takao INOUE^{*16, #}

Summary

This review provides a comprehensive survey of analytical methods for evaluating the tissue distribution of approved antisense oligonucleotides and small interfering RNAs, as well as developmental products still in preclinical and clinical trial stages (hereafter referred to as developmental products), based on original research articles, reviews and regulatory application documents from the US, EU and Japan.

The analytical methods employed for evaluation can be classified into imaging-based and non-imaging-based methods. These can be further subdivided based on the detection strategy: whether they utilize direct labeling for detection, employ detection reagents without direct labeling, or detect directly without the use of detection reagents. The imaging-based methods utilized for approved drugs were limited to quantitative whole-body autoradiography and microautoradiography using radiolabeled substances. In contrast, non-imaging-based methods encompassed various quantitative analytical methods, including liquid chromatography (LC) and capillary gel electrophoresis (CGE) coupled with detectors such as ultraviolet, fluorescence and mass spectrometric detection, as well as ligand-binding assays (LBAs) including enzyme-linked immunosorbent assays and electrochemiluminescence. These methods are described and stipulated in bioanalysis guidelines in the US, EU and Japan, enabling an objective demonstration of method validity. For developmental products, the imaging-based methods included radio-imaging, fluorescence imaging, immunohistochemical staining, in situ hybridization and mass spectrometric imaging, in addition to the methods adopted for approved oligonucleotide therapeutics. Non-imaging-based methods encompassed LBAs and analytical separation methods via LC or CGE, in addition to quantitative polymerase chain reaction. While approved oligonucleotide therapeutics typically adhered to stringent analytical method guidelines, employing a limited range of imaging-based methods, developmental products utilized a broader selection of both imaging and non-imaging-based methods tailored to specific objectives.

In case studies utilizing the evaluation methods for tissue distribution, research was undertaken to assess the

relationship between tissue distribution in target tissues and pharmacological activity or toxicity, as well as the changes in overall distribution characteristics due to different drug delivery systems. The selection of evaluation methods was determined based on considerations such as whether the distribution assessment focused on the whole body or specific tissues, the desired locations within the tissues, and whether sufficient information could be obtained from a sensitivity viewpoint.

This review of analytical methods available for evaluation of the tissue distribution of oligonucleotide therapeutics is expected to promote an understanding of the characteristics and limitations of the analytical methods and to assist in the selection of appropriate evaluation methods aligned with particular study objectives.

Key words

Tissue distribution, Analytical method, Antisense oligonucleotide, Small interfering RNA, Oligonucleotides in preclinical and clinical processes

-
- * 1 日本製薬工業協会 医薬品評価委員会 基礎研究部会 核酸医薬動態評価タスクフォース
Task Force for DMPK Evaluation of Oligonucleotide Therapeutics, Non-Clinical Evaluation Expert Committee, Drug Evaluation Committee, Japan Pharmaceutical Manufacturers Association
 - * 2 協和キリン株式会社 静岡県駿東郡長泉町下土狩1188 (〒411-8731)
Kyowa Kirin Co., Ltd., 1188 Shimotogari, Nagaizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka 411-8731, Japan
 - * 3 田辺三菱製薬株式会社 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000 (〒227-0033)
Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, 1000 Kamoshida-cho, Aoba-ku, Yokohama, Kanagawa 227-0033, Japan
 - * 4 住友ファーマ株式会社 大阪府大阪市此花区春日出中3-1-98 (〒554-0022)
Sumitomo Pharma Co., Ltd., 3-1-98 Kasugade-naka, Konohana-ku, Osaka, Osaka 554-0022, Japan
 - * 5 武田薬品工業株式会社 神奈川県藤沢市村岡東2-26-1 (〒251-8555)
Takeda Pharmaceutical Co., Ltd., 26-1 Muraoka-Higashi 2-chome, Fujisawa, Kanagawa 251-8555, Japan
 - * 6 持田製薬株式会社 静岡県御殿場市神場字上ノ原722 (〒412-8524)
Mochida Pharmaceutical Co., Ltd., 722 Uenohara, Jimba, Gotemba, Shizuoka 412-8524, Japan
 - * 7 第一三共株式会社 東京都品川区広町1-2-58 (〒140-8710)
Daiichi Sankyo Co., Ltd., 1-2-58 Hiromachi, Shinagawa-ku, Tokyo 140-8710, Japan
 - * 8 大塚製薬株式会社 徳島県徳島市川内町加賀須野463-10 (〒771-0192)
Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., 463-10 Kagasuno, Kawauchi-cho, Tokushima, Tokushima 771-0192, Japan
 - * 9 アステラス製薬株式会社 茨城県つくば市御幸が丘21 (〒305-8585)
Astellas Pharma Inc., 21 Miyukigaoka, Tsukuba, Ibaraki 305-8585, Japan
 - * 10 日本新薬株式会社 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14 (〒601-8550)
Nippon Shinyaku Co., Ltd., 14 Nishinosho-Monguchi-cho, Kisshoin, Minami-ku, Kyoto, Kyoto 601-8550, Japan
 - * 11 塩野義製薬株式会社 大阪府豊中市二葉町3-1-1 (〒561-0825)
Shionogi & Co., Ltd., 3-1-1 Futaba-cho, Toyonaka, Osaka 561-0825, Japan
 - * 12 杏林製薬株式会社 栃木県下都賀郡野木町野木1848 (〒329-0114)
Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd., 1848 Nogi, Nogi-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 329-0114, Japan
 - * 13 日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社 兵庫県神戸市中央区港島南町6-7-5 (〒650-0047)
Nippon Boehringer Ingelheim Co., Ltd., 6-7-5 Minatojima-Minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan
 - * 14 ファイザーR & D合同会社 東京都渋谷区代々木3-22-7 新宿文化クイントビル (〒151-8589)
Pfizer R & D Japan, Shinjuku Bunka Quint Bldg., 3-22-7 Yoyogi, Shibuya-ku, Tokyo 151-8589, Japan
 - * 15 株式会社三和化学研究所 三重県いなべ市北勢町塩崎363 (〒511-0406)
Sanwa Kagaku Kenkyusho Co., Ltd., 363 Shiosaki, Hokusei-cho, Inabe, Mie 511-0406, Japan
 - * 16 国立医薬品食品衛生研究所 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-26 (〒210-9501)
National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan
 - * 17 大阪大学大学院 薬学研究科 大阪府吹田市山田丘1-6 (〒565-0871)
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
 - * 18 東京理科大学 薬学部 東京都葛飾区新宿6-3-1 (〒125-8585)
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, 6-3-1 Nijuku, Katsushika-ku, Tokyo 125-8585, Japan
 - * 19 東京理科大学 総合研究院 千葉県野田市山崎2641 (〒278-8510)
Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan
- # 責任著者 Corresponding author

略語表

ADRB2: Adrenergic receptor beta2
αASGPR: Anti-asialoglycoprotein receptor antibodies
ASGPR: Asialoglycoprotein receptors
αTfR1: Anti-transferrin receptor 1 antibodies
CFT: Cryo-fluorescence tomography
CGE-UV: Capillary gel electrophoresis-ultraviolet detection
Ct: Cycle threshold
Ctnnb1: Cateninβ1
DDS: Drug delivery system
DIG: Digoxigenin
FITC: Fluorescein isothiocyanate
GalNAc: N-acetylgalactosamine
HPLC-UV: High-performance liquid chromatography-ultraviolet detection
Hyb-ELISA: Hybridization enzyme-linked immune-sorbent assay
Hybridization-LC-FL: Hybridization-liquid chromatography-fluorescence detection
ICH: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
ICP-MS: Inductively coupled plasma mass spectrometer
IHC: Immunohistochemistry
IMS: Imaging mass spectrometry
ISH: *In situ* hybridization
IVFI: *In vivo* fluorescence imaging
LSC: Liquid scintillation counter
LC-FL: Liquid chromatography-fluorescence detection
LC-HRAM: Liquid chromatography-high resolution accurate mass spectrometry
LC-MS: Liquid chromatography-mass spectrometry
LC-MS/MS: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LSFM: Light sheet fluorescence microscopy

MARG: Micro autoradiography
miRNA: microRNA
2'-MOE: 2'-O-(2-methoxy)ethyl
PALSAR: Probe alternation link self-assembly reaction
PET: Positron emission tomography
PLGA: Poly(lactic-co-glycolic acid)
PNA: Peptide nucleic acid
qPCR: Quantitative polymerase chain reaction
QWBA: Quantitative whole-body autoradiography
RISC: RNA-induced silencing complex
siRNA: Small interfering RNA
Sod1: Superoxide dismutase 1
SPECT: Single photon emission computed tomography
SSB: Sjögren syndrome antigen B
TTR: Transthyretin

1. 序論

アンチセンス医薬及びsmall interfering RNA (siRNA) 医薬は、標的遺伝子の発現をRNAレベルで制御することにより有効性を示す核酸医薬であり、近年日米欧での承認品目が増えている。これらの核酸医薬は標的組織の細胞内に到達して機能することから、薬物動態（吸収、分布、代謝、排泄及び薬物相互作用）の特性の理解とその適切な評価が、有効性及び安全性の確保の観点から重要である。これまで、日本製薬工業協会の核酸医薬動態評価タスクフォース^{注)}では、既承認の核酸医薬を対象に調査研究を行い、その薬物動態特性を整理してきた¹⁻³⁾。このうち、「既承認核酸医薬品の組織分布及び血漿/血清タンパク結合評価に関する調査と考察」では、既承認のアンチセンス医薬及びsiRNA医薬の組織分布及び血漿/血清タンパク結合について、日米欧の承認申請資料をもとに評価手法及び評価結果を調査し、その特性を整理するとともに、化学構造との関連を考察してきた¹⁻³⁾。

近年の核酸医薬開発においては、新たな修飾核酸の導入やリガンドの付加、送達キャリアへの搭載な

注) 日本製薬工業協会に設置された核酸医薬の薬物動態評価に関する調査、課題抽出、提言などを行うタスクフォース。2019年に設置され、2024年7月現在、製薬企業12社が参画している。2024年4月以降は、「核酸医薬品及び遺伝子治療用製品等の薬物動態評価タスクフォース」に改称され、調査対象を遺伝子治療製品等に応じて活動を行っている。

Table 1 核酸医薬品の組織分布評価に用いられる分析手法の分類

核酸医薬品への直接標識		検出試薬	分析手法
イメージング法	放射性同位体	不要	QWBA ¹⁾ MARG ¹⁾ PET SPECT
			IVFI CFT 共焦点顕微鏡 多光子励起顕微鏡 LSFM
	蛍光色素	不要	IHC ISH
			IMS
非イメージング法	放射性同位体	不要	LSC ¹⁾
			LBA ¹⁾ Hybridization-LC-FL (PNA assay) ¹⁾ qPCR
	標識無	必要	LC-MS(/MS), LC-HRAM ¹⁾ HPLC-UV ¹⁾ CGE-UV ¹⁾

1) 既承認のアンチセンス医薬品（8品目）及びsiRNA医薬品（5品目）の組織分布評価に用いられた分析手法（2023年3月時点）

ど核酸医薬の高機能化が進んでおり、今後、特定の組織への指向性を持つ核酸医薬の開発が更に活発化すると考えられる。このように薬物動態を制御するデザインが積極的に取り入れられていることから、核酸医薬の体内分布をより正確に把握することが重要と考えられ、その評価手法についても体系的に理解しておくことが望まれる。組織分布や組織中薬物濃度の評価手法については、低分子医薬に用いられる一般的な手法から核酸医薬に特徴的な手法まで幅広い技術が報告されている。先行して実施した調査研究¹⁻³⁾においては、既承認のアンチセンス医薬及びsiRNA医薬の組織分布評価に用いられた手法を調査したが、本稿では臨床試験や前臨床試験の段階にある開発品（承認されていない核酸医薬）に調査対象を広げることとした。具体的には、日米欧の承認申請資料及び核酸医薬開発に関する論文から核酸医薬の組織分布の評価手法を包括的に抽出し、その特徴や課題を概説するとともに、組織分布試験の目的に応じた評価手法の選択やそれらの活用事例について記載した。

以降では、まず組織分布の評価手法を体系的に分類し、各評価法の特徴について解説する。その後、

核酸医薬の全身分布及び組織分布の評価に用いられた手法について実際の適用事例を紹介する。特に組織分布の評価では、組織切片を用いて可視化するイメージング法と標的組織を摘出して薬物濃度を定量する生化学的手法（非イメージング法）の事例に分けて記載する。なお、本稿では評価手法に関連する略語を多く用いるため、初出において「日本語表記（英語のフル表記：英語の略語）」もしくは「英語のフル表記（英語の略語）」で提示し、以降では略語表に記載した略語を用いることを基本とする。

2. 核酸医薬の組織分布評価に用いられる手法の分類

核酸医薬の組織分布の評価手法は、イメージング法と非イメージング法に大別される、いずれの手法についても、核酸医薬に直接標識して検出する手法、標識せずに検出試薬を用いて検出する手法、検出試薬を用いず直接検出する手法がある（Table 1）。

核酸医薬に直接標識するイメージング法には、放射性同位体を核酸医薬（オリゴ核酸）に組み込む手法もしくは付加する手法と蛍光色素をオリゴ核酸の

末端等に付加する手法がある。放射性同位体を用いる手法には、定量的全身オートラジオグラフィ（quantitative whole-body autoradiography：QWBA）、ミクロオートラジオグラフィ（micro autoradiography：MARG）、陽電子放出断層撮影（positron emission tomography：PET）及び単一光子放射断層撮影（single photon emission computed tomography：SPECT）があり、蛍光色素を用いる手法には、*in vivo* 蛍光イメージング（*in vivo* fluorescence imaging：IVFI）、クライオ蛍光トモグラフィ（cryo-fluorescence tomography：CFT）、共焦点顕微鏡、多光子励起顕微鏡及び光シート蛍光顕微鏡（light sheet fluorescence microscopy：LSFM）がある。一方、核酸医薬を直接標識しないイメージング法には、蛍光標識した抗体などで検出する免疫組織化学染色（immunohistochemistry：IHC）及び蛍光標識した核酸で検出する *in situ* ハイブリダイゼーション（*in situ* hybridization：ISH）法があり、また、検出試薬を使用せず質量分析計で直接核酸医薬を検出する質量分析イメージング（imaging mass spectrometry：IMS）がある。上述した中でPET、SPECT、IVFI、共焦点顕微鏡及び多光子励起顕微鏡は生きた動物での組織分布評価が可能なイメージング法である。

非イメージング法は、動物から組織を摘出し、組織内の核酸医薬を生化学的に定量する手法である。核酸医薬に直接標識する手法には、放射性同位体を用いる液体シンチレーション計測法（liquid scintillation counter：LSC）があり、直接標識しない手法には、核酸医薬に対して相補的な配列を持つ核酸プローブを用いて検出するリガンド結合法（ligand binding assay：LBA）、ハイブリダイゼーション-液体クロマトグラフィー-蛍光検出（hybridization-liquid chromatography-fluorescence detection：hybridization-LC-FL）及び定量PCR法（quantitative polymerase chain reaction：qPCR）がある。また、直接核酸医薬を検出する方法には、液体クロマトグラフィー（タンデム）質量分析（LC-(tandem) mass spectrometry：LC-MS(/MS))、液体クロマトグラフィー高分解能精密質量分析（LC-high resolution accurate mass spectrometry：LC-HRAM）、高速液体クロマトグラフィー-紫外吸収検出（high-performance liquid

chromatography-ultraviolet detection：HPLC-UV）やキャピラリーゲル電気泳動-紫外吸収検出（capillary gel electrophoresis-ultra violet detection：CGE-UV）がある。

2023年3月時点における既承認のアンチセンス医薬（8品目：Mipomersen, Eteplirsen, Nusinersen, Inotersen, Volanesorsen, Golodirsen, Viltolarsen, Casimersen）及びsiRNA医薬（5品目：Patisiran, Givosiran, Lumasiran, Inclisiran, Vutrisiran）の組織分布評価に用いられた分析手法は、イメージング法としてはQWBA及びMARGのみであった（Table 1）。一方、非イメージング法については、上記の手法のうち、qPCR以外のすべての手法が用いられており、LBAに加えて分離分析法であるLCもしくはCGEが利用されていた。特に上記の既承認核酸医薬の13品目中8品目において、それら分離分析法により組織中における薬剤由来の成分を分離した後、UV検出器、FL検出器あるいは質量分析計といった非標識体でも検出可能な装置を組み合わせることにより、組織中の医薬品（未変化体）や代謝物の濃度が定量的に評価されていた。

以下の章では、既承認の核酸医薬及び核酸医薬開発品（承認されていない品目）に用いられている代表的な分析手法とその例を示し、原理と応用を解説する。

3. 核酸医薬の組織分布評価に用いられる手法の特徴

3.1 イメージングによる評価手法

3.1.1 標識体を用いた評価手法

3.1.1.1 オートラジオグラフィ（QWBA, MARG）

QWBAは低分子医薬の組織分布評価で標準的に用いられる確立された手法であり、放射性同位体で標識した薬物を用いて、全身の組織分布や各組織の薬物濃度を解析する（Table 2）。具体的には、放射性標識体を動物に投与し、規定時間で安楽死させた後、凍結乾燥させた全身切片を作製する。これを蛍光板の上で露光させて画像化し、既知量の放射性標識体を用いて作製した検量線に基づき定量を行う⁴⁾。本手法は、組織を破碎する必要がないため、組織の構造を維持したまま組織分布の定量情報を得ることができる。MARGはQWBAに比べて解像度

が高く、細胞レベルでの組織内局在を明らかにすることができる手法である⁵⁾ (Table 2)。一般的には、QWBAよりも多量の放射性標識体を投与した動物から採材した臓器をクリオスタットにより切片化する。スライドガラス上の組織切片に核乳剤を塗布し乾燥させた後、冷所遮光下で露光させる。その組織切片を現像液に浸し定着させて、露光中に形成した潜像を銀粒子として可視化する。その後、同組織切片をヘマトキシリン・エオジン染色などで染色し顕微鏡下で観察・撮影する。定量的な評価が可能なQWBAに対してMARGは定性的な評価であるが、使用する核乳剤の粒子径が小さいため、形成する銀粒子も小さく解像度の高い分布像が得られる。核酸医薬の組織内の分布は、毛細血管の内皮細胞の構造や血管周辺的环境、あるいは組織を構成する細胞毎の細胞内取り込み機構の違いなどの要因で不均一であることが知られるが^{6, 7)}、MARGはこのような組織分布の偏在性を評価する手法として有用と考えられる。

核酸医薬の組織分布評価にQWBA及びMARGを用いる欠点としては、一般的に放射性標識体の合成が低分子医薬より難しい点が挙げられる。また、これらの手法では、放射性同位体で標識されたすべての薬物関連物質が検出されるが、それが未変化体なのか代謝物なのかを区別できない欠点を有する。更に、核酸特有の代謝により標識が外れた代謝物が生成し、薬物関連物質を網羅的に検出できない可能性がある。通常、低分子医薬では代謝酵素による代謝を受けにくい部位に放射性同位体を導入するため、未変化体に加えて代謝物を*in vivo*で包括的に検出することが可能である。一方、核酸医薬はヌクレアーゼにより切断されて短鎖化するため、例えば、核酸医薬の末端を放射性標識した場合、放射性標識された末端の核酸が脱離し、未標識の代謝物が生じたとしても、QWBA及びMARGではこれを検出することができない^{8, 9)} (Fig. 1A-1)。オリゴ核酸のどの部位がヌクレアーゼによる代謝を受けやすいかについては、核酸連結部や核酸糖部の化学修飾、あるいはオリゴ核酸に共有結合したりガンドの有無などに依存する。オリゴ核酸に標識する前に代謝プロファイリングを明らかにし、代謝の影響を受けにくいオリゴ核酸の領域に標識することが、より正確なオリゴ核酸の分布情報を得る上で重要となる。既承

認の核酸医薬で使用されている放射性同位体は³H (トリチウム) 及び¹⁴Cであるが、³Hについては、オリゴ核酸に導入された³Hと水分子を構成するHの同位体交換によりトリチウム水が生成する点や、オリゴ核酸への³Hの導入位置により同位体交換が生じる確率が異なる点に留意する必要がある¹⁰⁾。

3.1.1.2 放射性核種イメージング (PET, SPECT)

放射性核種を用いたPETやSPECTに代表されるイメージングは、疾病の診断手法として汎用されるのみならず^{11, 12)}、薬物の組織分布や受容体占有率を評価するための手法としても活用されている (Table 2)¹³⁾。PETは、陽電子放射性同位元素を含む放射性標識体から放出される陽電子が体内の電子と衝突した後に放出される二つのガンマ線をPETスキャナーで検出することにより、放射性標識体の生体内分布及びその経時的变化を定量的に評価する手法である。一方、SPECTは放射性同位元素から放射される単一のガンマ線を複数の角度からガンマカメラで検出し、得られたデータをトモグラフィ技術により生体内分布として3次元で可視化する手法である。PET及びSPECTの利点は、生きた動物、ひいてはヒトにおいて薬物の生体内分布を非侵襲的に評価できる点である。一方で、原理上の弱点としては、1) 放射性標識が必要なため短半減期の核種を用いる場合は評価期間が限られる、2) 標識体 (目的薬物に放射性核種を付加した化合物) から標識部位が部分的に脱離した場合に、目的薬物の分布が正確に評価できない、3) 標識により目的薬物の構造が一部変化するため、目的薬物の分布特性と異なる結果が得られる可能性がある、などの点が挙げられる (Fig. 1A-2)¹⁴⁾。解像度は最高でも1 mm程度であることから、組織の詳細な分布評価は難しい。PETに用いられる核種としては¹⁸F (半減期108.7分、以下同様)、¹¹C (20.4分)、⁶⁸Ga (67.7分)、⁶⁴Cu (12.7時間) などがある^{14, 15)}。これらの核種は通常低分子医薬で用いられる³Hや¹⁴Cなどの放射性核種に比べて半減期が短いため、サイクロトロンなどの放射性同位体合成施設を備えた試験施設で評価する必要がある。SPECTに用いられる放射性核種としては¹²³I (60日)、¹¹¹In (2.8日)、^{99m}Tc (6時間) などがあり^{14, 16, 17)}、PET核種と比較して半減期が長い放射性核種が適用可能であるため、長期間の評価が可能である。SPECT核種は原子量が大きく、特にキ

Table 2 イメージング

分析法	特徴	利点	欠点
QWBA, MARG	<ul style="list-style-type: none"> ・全身切片を作製して専用の露光プレートを用いて放射性物質で標識された被験物質の放射能を可視化する手法 (QWBA) ・組織切片を露光させて可視化させると同時に組織染色を行い顕微鏡下で放射性物質の局在を観察・撮影する手法 (MARG)。一般的にQWBAよりも多量の放射性物質を動物に投与する必要がある 	<ul style="list-style-type: none"> ・低分子医薬品の組織分布試験ではゴールドスタンダードな手法 ・前処理を含め定型化されているため低分子医薬と同じ手法により結果を取得可能 	<ul style="list-style-type: none"> ・一般的に放射性標識体の合成が低分子医薬より難しい ・放射性標識体が核種 (^3H) により同位体交換反応が起こる
PET, SPECT	<ul style="list-style-type: none"> ・放射性物質で標識した被験物質の放射能を生きた状態 (動物, ヒト) で可視化する手法 	<ul style="list-style-type: none"> ・生きた状態 (動物, ヒト) で非侵襲的に分布評価が可能 ・放射性標識体の生体内分布を経時的かつ定量的に評価可能 	<ul style="list-style-type: none"> ・短半減期の核種を使う場合は評価期間が限定される ・放射性標識体から標識部位が部分的に脱離した場合に、被験物質の分布が正確に評価できない ・放射性物質の付加により構造が一部変化するため、目的薬物の分布特性と異なる結果が得られる可能性がある
IVFI, CFT, 共焦点顕微鏡, 多光子励起顕微鏡, LSM	<ul style="list-style-type: none"> ・蛍光物質を付加した被験物質を用いて、全身、臓器、組織切片の蛍光強度から可視化を行う手法。 	<ul style="list-style-type: none"> ・蛍光物質、検出機器の種類が豊富 ・3次元情報を得られる方法に加えリアルタイムの経時変化情報を得ることも可能 	<ul style="list-style-type: none"> ・自家蛍光 (バックグラウンド) による影響を受ける ・蛍光物質の付加により構造が一部変化するため、目的薬物の分布特性と異なる結果が得られる可能性がある
IHC, ISH	<ul style="list-style-type: none"> ・切片を作製し、抗原抗体反応を利用し被験物質を検出する。抗体に付加した蛍光物質等を用いて可視化をする手法 (IHC) ・切片を作製し、蛍光物質を付加した相補鎖プローブを被験物質とハイブリダイズさせ、蛍光顕微鏡を用いて蛍光強度から可視化をする手法 (ISH) 	<ul style="list-style-type: none"> ・組織構造を保持したままの画像データを取得可能 ・検出試薬の標的特異性が高い ・核酸医薬が標的とするRNAやその遺伝子産物 (タンパク質) の分布を同一試料において可視化可能 ・核酸修飾構造等に共通した抗体がある場合は使い回し可能 (IHC) 	<ul style="list-style-type: none"> ・前処理工程が多く煩雑 ・実験条件の最適化が必要 ・定量性が低い ・標的核酸に応じた特殊な抗体が必要 (IHC) ・感度が低い (これを補う方法として、標的核酸を予め増幅する方法や検出時のシグナルを増幅する方法などが考案されている)
IMS	<ul style="list-style-type: none"> ・作製した切片にレーザーを当てイオン化させる。イオン化した試料中の測定対象質のイオン強度から可視化をする手法 	<ul style="list-style-type: none"> ・核酸医薬が標的とするRNAやその遺伝子産物 (タンパク質) の分布を同一試料において可視化可能 ・塩基配列に依存せず検出が可能 	<ul style="list-style-type: none"> ・分解能と感度は課題あり ・スループットが低い ・切片の再利用は不可能

レート剤が必要な場合は目的薬物と標識体の構造の差異が大きくなる点に注意が必要である (ただし、核酸医薬は低分子医薬と比べて分子量が大きいため、放射性核種を付加した際の動態特性に与える影響は低分子医薬と比べると相対的に小さいと考えられる)。核酸医薬ではPETに加え、SPECTを用いた組織分布評価が報告されているが¹⁸⁾、定量性については一般にSPECTよりPETの方が優れているとされる¹⁴⁾。

3.1.1.3 蛍光イメージング (IVFI, CFT, 共焦点顕微鏡, 多光子励起顕微鏡, LSM)

蛍光イメージングは、蛍光物質を付加した核酸医薬を動物に投与した後に動物あるいは組織に励起光を照射し、蛍光強度を測定することで、核酸医薬の生体内分布を把握する手法である (Table 2)。IVFIは麻酔下で行われるため侵襲性は低く、同一個体から経時的に長期間の情報を得ることが可能である。また、機種や動物の大きさによっては複数の動物を

による評価手法

測定対象物	標識、プローブ等の要否	定量性	解像度
<ul style="list-style-type: none"> ・未変化体と代謝物を区別できない ・放射性物質の標識が外れた物質（代謝物等）は検出できない 	必要 <ul style="list-style-type: none"> ・被験物質を構成する放射性核種で置換が必要（核種：^3H, ^{14}C, ^{32}P） ・Oligomerであり一般的に代謝安定部位の特定が難しく放射性標識体の合成が低分子薬より難しい 	有 <ul style="list-style-type: none"> ・QWBAの場合、既知濃度に調製したサンプルをスポットし検量線として定量する（ガイドラインの基準なし）. ・MARGの場合、主に定性的な評価として行われる. 	<ul style="list-style-type: none"> ・QWBAの場合、組織及び臓器レベルの解像度であるが、MARGの場合、細胞（光学顕微鏡）レベルである
<ul style="list-style-type: none"> ・付加した放射性物質の検出であり核酸部位の状態（未変化体、代謝物）が不明である ・付加した放射性物質が外れた物質（代謝物等）は検出できない 	必要 <ul style="list-style-type: none"> ・一般的に以下の放射性物質を被験物質に付加. PET：^{18}F, ^{11}C, ^{68}Ga, ^{64}Cu SPECT：^{125}I, ^{111}In, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 	有 <ul style="list-style-type: none"> ・ドーズキャリブレーションによる機器補正 	<ul style="list-style-type: none"> ・組織レベル（1 mm）が可能. 専用システムで解析して3次元情報が得られる
<ul style="list-style-type: none"> ・付加した蛍光物質の検出であり核酸部位の状態（未変化体、代謝物）が不明である ・付加した蛍光物質が外れた物質（代謝物等）は検出できない 	必要 <ul style="list-style-type: none"> ・被験物質に低分子蛍光物質を付加（励起波長400～1700 nm） 	半定量 <ul style="list-style-type: none"> ・蛍光シグナル強度の比較が可能 ・生体や臓器の場合、臓器の重なりや厚みによる影響を受ける ・切片の場合、切片の厚み、ピンツ調整、励起光強度等による影響を受ける 	<ul style="list-style-type: none"> ・<i>In vivo</i> イメージングは生体、摘出臓器レベル ・蛍光顕微鏡を用いた場合は細胞小器官レベル
<ul style="list-style-type: none"> ・未変化体と代謝物を区別できない ・未変化体と代謝物で反応性が異なる抗体や相補鎖プローブを用いれば分離評価可能 	必要 <ul style="list-style-type: none"> ・検出プローブ（抗体、相補鎖）を用意 ・検出プローブの設計は被験物質ごとに行い、化学修飾や塩基長の影響を受ける（ISH） 	半定量 <ul style="list-style-type: none"> ・蛍光等のシグナル強度の比較 	<ul style="list-style-type: none"> ・組織構造を保持した画像データ取得が可能
<ul style="list-style-type: none"> ・未変化体、代謝物を分けて測定することができる ・複数の代謝物の検索、同定を同時にすることができる 	不要 <ul style="list-style-type: none"> ・現状では内部標準物質（内部標準法）を用いるケースは少ない 	半定量 <ul style="list-style-type: none"> ・組織切片へのマトリックス塗布技術が測定感度、精度向上のために必要 ・マトリックスのイオン化効率の補正が困難 	<ul style="list-style-type: none"> ・組織の微細構造レベルでのイメージングが可能

同時に観察することも可能である。装置は励起光源と光を捉えるためのCCDカメラが備えられており、得られたデータをヒートマップとして個体の画像に重ね、生体内の濃度勾配として示す方法がよく用いられる。代表的な装置として、Revvity社の*in vivo* イメージングシステムが知られており、豊富な使用実績を有する。IVFIで使用される励起光は、主に900 nmまでの近赤外線の波長が用いられる。この波長は可視光と比較すると組織中での光吸収や散乱

が少なく、組織の透過性が高いが、生体深部の組織においては、表面組織に比べて感度、定量性並びに空間分解能が低下する^{19, 20)}。この課題を改善する技術としてCFTがある（Table 2）。これは、全身もしくは組織の凍結薄層切片から蛍光シグナルを検出し、連続切片の情報を統合することで立体画像として情報を得る手法である。従来の手法では、組織内での光の吸収・散乱により深部になるほど画質が低下するが、凍結切片を用いる本手法では画質低下は

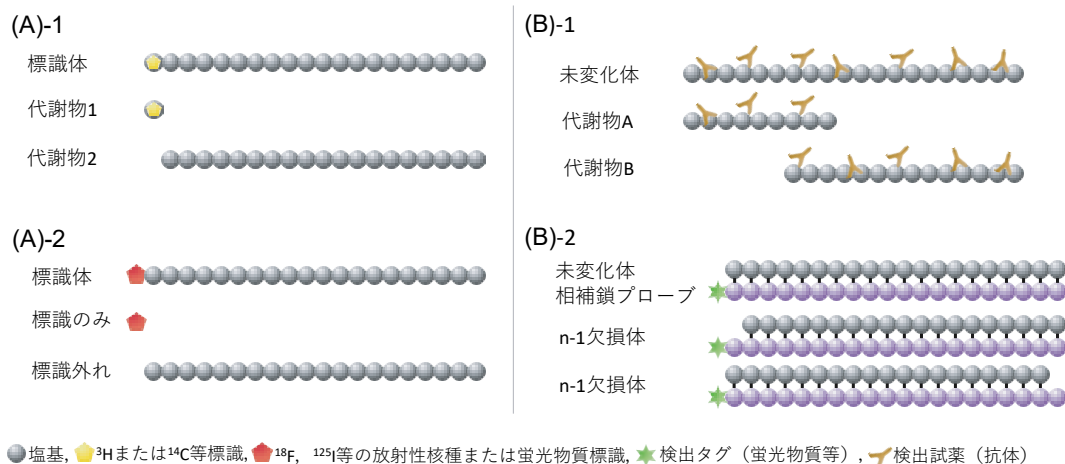


Fig. 1 核酸医薬品の標識と標識体の検出及び検出試薬を利用した測定の特徴

(A) 核酸医薬品の標識及び標識体の検出. (A)-1 ³H, ¹⁴C, 又は³⁵S等の放射性同位元素で標識する場合は一般的に核酸医薬品を構成する原子を置換する. 図は, 標識体の一例として, 核酸医薬品の末端の核酸を放射性標識した構造を示しており, 代謝物1及び2は, その放射性標識された末端の核酸が脱離した構造を示す. 標識された部位のみが検出対象のため, 標識体と代謝物1は区別なく検出し, 代謝物2は検出することができない. (A)-2 ¹⁸F, ¹²⁵I等の放射性同位元素又は蛍光物質で標識する場合は一般的に核酸医薬品に付加する. 図は, 標識体の一例として, 核酸医薬品の末端に放射性同位元素又は蛍光物質を付加した構造, 及び標識のみ脱離した構造を示す. 標識した物質が検出対象のため, 代謝等により標識した物質が脱離した場合, 標識体と「標識のみ」を区別なく検出し, 「標識外れ」は検出することができない.

(B) 検出試薬を利用した測定の特徴 (B)-1 抗原となる部位 (修飾核酸部位など) が複数存在し, 未変化体 (目的薬物), 代謝物を区別なく検出する. 図は, 未変化体, 及び未変化体がヌクレアーゼにより切断されて生成した代謝物の例 (代謝物A及びB) を示す. (B)-2 塩基欠損した核酸医薬品とも2本鎖を形成し検出することがある. 図は, ヌクレオチド欠損体の一例として, 末端の核酸が1個欠損したn-1欠損体を示している.

抑えられ, マイクロメートルスケールの分解能での解析が可能である. また, 画像のコントラストが明瞭であり, 多色での蛍光検出や切片の明視野画像の取得も可能である²¹⁾. 核酸医薬の実施例としては, 髄腔内に投与されたアンチセンスの脳移行を解析した報告がある²²⁾.

組織及び細胞における局所分布をより詳細に解析する技術として, 共焦点顕微鏡, 多光子励起顕微鏡及びLSFMがある (Table 2). 共焦点顕微鏡は, 組織内部の特定の深さに励起光の焦点を合わせ, そこから発する蛍光を集約 (焦点を結び) し, ピンホールを通して面像を得るものである. 核酸医薬の生体内分布の評価ではIVFIと同様に, 生きた動物を用いてリアルタイムに局所分布を評価する手法と主要な臓器を摘出した後に生化学的手法で評価する手法がある. 多光子励起顕微鏡は, 単一光子で励起させて蛍光を検出するIVFIや共焦点顕微鏡とは異なり, 蛍光物質1分子に対して2個以上の光子が同時に作用 (多光子励起) した際に発せられる蛍光を検出する. 励起光としては主に1300 nmまでの近赤外線領域の波長が用いられる. 多光子励起を惹起するため

には光子密度を非常に高める必要があるため, 光源には焦点面のみに光子を集約することができる超短パルスレーザーが採用される. これにより, 焦点面以外では蛍光を発することはなく, 照射時間はフェムト秒と短いため, 光毒性の影響を受けにくい. この励起光は組織の自家蛍光の影響を受けにくいだけでなく, 組織内での光の散乱や吸収が少ないため, 組織の深部に届きやすい特性を有している. このため, 2 mmを超える深い組織領域^{23, 24)}まで高い時空間分解能で解析が可能である. 多光子励起顕微鏡の実施例としては, 腫瘍周辺リンパ節での免疫細胞²⁵⁾, 肝臓²⁶⁾及び腎臓^{27, 28)}におけるsiRNAの分布を解析した報告がある. LSFMは, シート状の励起光を試料の側面から照射して発せられた蛍光を垂直方向から検出する手法である. この手法では焦点面以外には励起光が照射されないため, バックグラウンドの蛍光が少なく, 退色や光毒性が抑制される. また, 焦点が「面」のため, 1回の観察で得られる情報が多く, 解析時間が短いという特徴がある²⁹⁾. 一方, 励起光は組織中で水と組織の屈折率の差により不規則な方向へ曲げられるため, 透明化された組織

を用いて検討されている。透明化された組織であれば、厚みのある試料でも深部観察が可能であることから、透明化された組織における広視野の高速観察に適している。これまでに核酸医薬に適用した事例は報告されていないが、今後、核酸医薬分野での活用が期待される。

3.1.2 非標識体を用いた評価手法

3.1.2.1 免疫組織化学染色 (IHC, ISH)

IHCは、標的分子を認識する抗体を用いて、抗原抗体反応の原理により標的分子の分布を可視化する手法である (Table 2)³⁰⁾。核酸医薬の組織分布評価については、当該核酸医薬の構成因子を認識する抗体が用いられる。IHCでは、組織をパラフィンで包埋して切片を作製し、脱パラフィン及び内因性ペルオキシダーゼの不活性化処理の後、プロテイナーゼK処理によりヌクレアーゼを不活性化する。更に、一次抗体及び二次抗体で処理した後、発色反応あるいは蛍光反応を経て、光学もしくは蛍光顕微鏡により観察する。ISHについても、IHCと同様に組織切片を作製し前処理を行うが、ISHでは抗体の代わりに核酸医薬と相補的に結合する核酸プローブを用いる (Table 2)³¹⁾。プローブは通常ジゴキシゲニン (Digoxigenin: DIG) などにより標識されており、抗DIG抗体を用いて発色もしくは蛍光で検出する。IHC及びISHはいずれも、組織構造を保持したままの画像データを取得できることが利点であり、抗体や核酸プローブの質にも依存するが、一般的には特異性が高く、高解像度の検出が可能である³²⁾。上述の方法では感度が低い場合があるが、これを補う手法として、標的核酸をあらかじめ増幅する方法や検出時のシグナルを増幅する方法などが考案されている³⁰⁾。IHCやISHでは、組織における核酸医薬の分布、並びに、核酸医薬が標的とするRNAやその遺伝子産物 (タンパク質) の分布を同一試料において可視化することができる。すなわち、核酸医薬が標的組織に到達し、当該部位での標的RNAの発現、ひいては、対応するタンパク質の発現に影響を与えていることを視覚的に把握することができる³³⁾。IHC及びISHの欠点としては、1) 前処理工程が多く煩雑であること、2) 解析条件により検出感度や解像度が大きく変化するため条件の最適化が必要であること、3) 定量性が低いこと、などが挙げられる。

IHC解析において、核酸医薬を構成する修飾核酸

を認識する抗体を用いた場合、当該修飾核酸を有する物質の全てを検出するため、未変化体と代謝物を分離して検出することは困難である。このような抗体の具体例としては、抗ホスホチオアート抗体や抗糖部修飾核酸抗体 [例えば抗2'-O-(2-methoxyethyl)(2'-MOE) 抗体] がある。また、ISHにおいても、核酸プローブが代謝物にも十分に結合する場合は、両者を分離して検出することは一般的には困難である (Fig. 1B-1)。このため、未変化体と代謝物を可能な限り区別して検出する核酸プローブの開発が行われている。IHC及びISHの活用事例としては、がんや中枢などの組織における核酸医薬の分布と標的遺伝子の発現低下をIHCとISHを組み合わせ取得し、核酸医薬の分布と薬効を併せて考察した研究が報告されている³⁴⁾。

3.1.2.2 質量分析イメージング (IMS)

IMSは、組織切片上のイオン化可能な生体分子の分布を質量電荷比に基づいて検出する分子マッピング法である (Table 2)。IMSは、核酸医薬を標識する必要がなく、核酸医薬とその代謝物を同時検出できる。また、核酸医薬の標的RNAやその遺伝子産物であるタンパク質、あるいは薬効に付随するバイオマーカーなどについても同時に検出可能である。このように、核酸医薬とその代謝物並びに内因性物質の複合的イメージングが原理的に可能であるため、病態解析、作用機序解析、薬物動態解析、副作用予測、薬理作用解析などへ活用が期待されている。IMS解析では、組織を切片化し、組織の構造を維持したまま、核酸医薬の分布情報を定性的に得ることが可能である。IMSの利点としては、質量分析を基本原理とするため、未変化体と代謝物を区別し、組織における各分子の局在を解析できる点が挙げられる。現時点で既承認核酸医薬の組織分布評価への活用例はないが、開発段階のアンチセンスの評価への活用例はあり³⁵⁻³⁷⁾、核酸医薬の不均一な組織分布を把握する上で有用な解析手法になると考えられる。

3.2 非イメージングによる評価手法

3.2.1 標識体を用いた評価手法

3.2.1.1 液体シンチレーション計測法 (LSC)

LSCは、放射性同位体で標識した薬物を投与した動物から各組織を採材し、組織を溶解させた後、

Table 3 非イメージング

分析法	特徴	利点	欠点
LSC	・試料を溶解させ放射性物質で標識された被験物質の放射能を定量する手法	・低分子薬の組織分布試験ではゴールドスタンダードな手法 ・前処理を含め定型化されているため低分子医薬と同じ手法により結果を取得できる	・一般的に放射性標識体の合成が低分子医薬より難しい ・放射性標識体が核種 (^3H) により同位体交換反応が起こる ・摘出組織の濃度情報しか得られない
LBA	・相補鎖プローブを作成し被験物質にハイブリダイズさせて、相補鎖プローブに付加した蛍光あるいは化学発光などにより定量する手法 (cutting assay, ligation assay, dual hybridization assay などがある)	・測定法のバリデーションは、ICH-M10のバイオアナリシスにすることができる (申請対応が可能) ・組織ホモジネートなど濁度が高い試料の測定に強い (開発初期に使える) ・LC-MS(/MS) に比べ高感度、高スループットである	・組織ごとに前処理条件の最適化が必要であり、検討に時間がかかる場合がある ・代謝物との分離が難しい ・定量範囲 (dynamic range) が狭い場合がある
Hybridization-LC-FL	・試料中の被験物質に蛍光物質を付加した相補鎖プローブをハイブリダイズさせる。LCを用いて測定対象を分離し、蛍光検出器を用いて蛍光強度から定量する手法	・LC-MS(/MS) に比べ高感度、高スループットであり、前処理が簡便である	・短塩基長の核酸測定は、相補鎖がハイブリダイズしないため、困難となる ・陰イオン交換クロマトグラフィーによる測定のため、代謝物との分離には条件検討が必要となる
qPCR	・被験物質の塩基配列を指数関数的に増幅させる酵素反応を蛍光物質を用いて閾値までモニターする。閾値に達した時のサイクル数 (増幅回数) をもとに定量する手法	・高感度であり、多検体処理が可能 ・定量範囲が広い	・短塩基長の核酸測定は、プライマー・プローブの設計が困難 ・核酸医薬に導入された修飾核酸が核酸増幅反応を阻害する ・各組織でのマトリックス効果により、qPCRの効率やCt値に影響が出る
LC-MS	・LCを用いて試料中の被験物質を分離し、MSを用いてイオン化された測定対象物質のイオン強度から定量する手法 ・MSはタンデム質量分析計、オービトラップ型質量分析計、飛行時間型質量分析計等があり質量分解能が異なる	・測定法のバリデーションはICH-M10のバイオアナリシスにすることができる (申請対応が可能) ・塩基配列に依存せず、定量できる ・メソッド開発に特殊試薬を準備する必要がなく、早期開発品の濃度測定に適している ・質量を検出するため、特異性の高い測定が可能である	・LBAと比較すると測定感度は低い ・測定のスループットが悪い (前処理及び分析が複雑) ・機器への吸着対応、イオンペア試薬の検討など測定対象物質により測定条件の難易度が上がる

必要に応じて脱色させて、放射能を測定する手法である (Table 3)⁵⁾。イメージングで全身分布を解析する前述のQWBA及びMARGに対して、本手法では組織を取り出すため、一般的に組織摘出法と呼ばれている³⁶⁾。QWBAと異なり、濃度情報が対象組織に限定されるものの、定量性が高いという利点を有する。核酸医薬は不均一な組織分布を示すことが知られているが、LSCではこのような組織内の偏在性に関する情報が失われることに注意が必要であ

る。LSCでは放射標識薬物を用いることから、QWBAと同様に、未変化体と代謝物が区別できない点や標識部位が外れた代謝物を検出できない点が欠点として挙げられる (Fig. 1A-1)。また、標識位置や放射性同位体の安定性に注意が必要である。

3.2.2 非標識体を用いた評価手法

3.2.2.1 リガンド結合法 (LBA)

LBAは、被験物質に特異的に結合する試薬を用いて被験物質を検出する手法である (Table 3)。一

による評価手法

測定対象物	標識, プローブ等の要否	定量性
<ul style="list-style-type: none"> ・未変化体と代謝物を区別できない ・放射性物質の標識が外れた物質（代謝物等）は検出できない 	必要 <ul style="list-style-type: none"> ・被験物質を構成する放射性核種で置換が必要（核種：^3H, ^{14}C, ^{32}P） ・Oligomerであり一般的に代謝安定部位の特定が難しく放射性物質標識体の合成が低分子薬より難しい 	有 <ul style="list-style-type: none"> ・LSCでは、臓器・組織中の放射能を測定し、放射性標識体の比放射能を用いて薬物濃度を算出する
<ul style="list-style-type: none"> ・末端が数塩基欠損した代謝物との分離は難しく、代謝物込みの濃度になる場合がある 	必要 <ul style="list-style-type: none"> ・被験物質を検出する相補鎖プローブが必要 ・プローブの設計は被験物質ごとに行い、化学修飾や塩基長の影響を受ける 	有 <ul style="list-style-type: none"> ・既知濃度に調製したサンプルを検量線として定量する
<ul style="list-style-type: none"> ・LC条件によっては代謝物との分離測定が可能 	必要 <ul style="list-style-type: none"> ・被験物質を検出する相補鎖プローブが必要 	有 <ul style="list-style-type: none"> ・既知濃度に調製したサンプルを検量線として定量する
<ul style="list-style-type: none"> ・適切にプライマーとプローブを設計することで未変化体と代謝物をそれぞれ測定可能 	必要 <ul style="list-style-type: none"> ・増幅、検出するプライマー、プローブが必要 ・プライマー、プローブの設計は被験物質ごとに行う、化学修飾や塩基長の影響を受ける 	有 <ul style="list-style-type: none"> ・既知濃度に調製したサンプルを検量線として定量することが可能 ・内標準物質や外部スパイクコントロール遺伝子等を用いて定量する
<ul style="list-style-type: none"> ・未変化体、代謝物を分けて測定することができる（siRNA（2本鎖）はアンチセンス鎖及びセンス鎖に分離して測定する必要がある） ・複数の代謝物の検索、同定を同時に行うことができる 	不要 <ul style="list-style-type: none"> ・内部標準法の場合は内部標準物質（IS）が必要 	有 <ul style="list-style-type: none"> ・内部標準法を用いることで夾雑成分のシグナルと分離が可能

般には抗原抗体反応を利用するが、核酸医薬の場合は相補的な配列を有する核酸プローブを用いて、蛍光あるいは化学発光などにより検出するハイブリダイゼーションELISA法（Hybridization enzyme-linked immune-sorbent assay: Hyb-ELISA）³⁸⁾が広く用いられる。Hyb-ELISAは、プローブの設計方法により、cutting assay, ligation assay及びdual hybridization assayなどに分類される（Fig. 2）³⁹⁾。核酸医薬投与後の組織を採取して破碎し、核酸プ

ローブと核酸医薬を相補結合させた後、その蛍光あるいは化学発光などを測定する。組織を事前に破碎する工程が含まれるため、組織中での薬剤の濃度が不均一であったとしても、得られる結果は組織中の平均濃度となる。測定感度や定量範囲は設計した核酸プローブの結合能や標識方法などに依存するが、一般的には検出感度が高いと考えられる³⁹⁾。また、プローブは核酸医薬の塩基配列に基づいて設計されるため、特異性は高い。一方、核酸医薬は生体内で

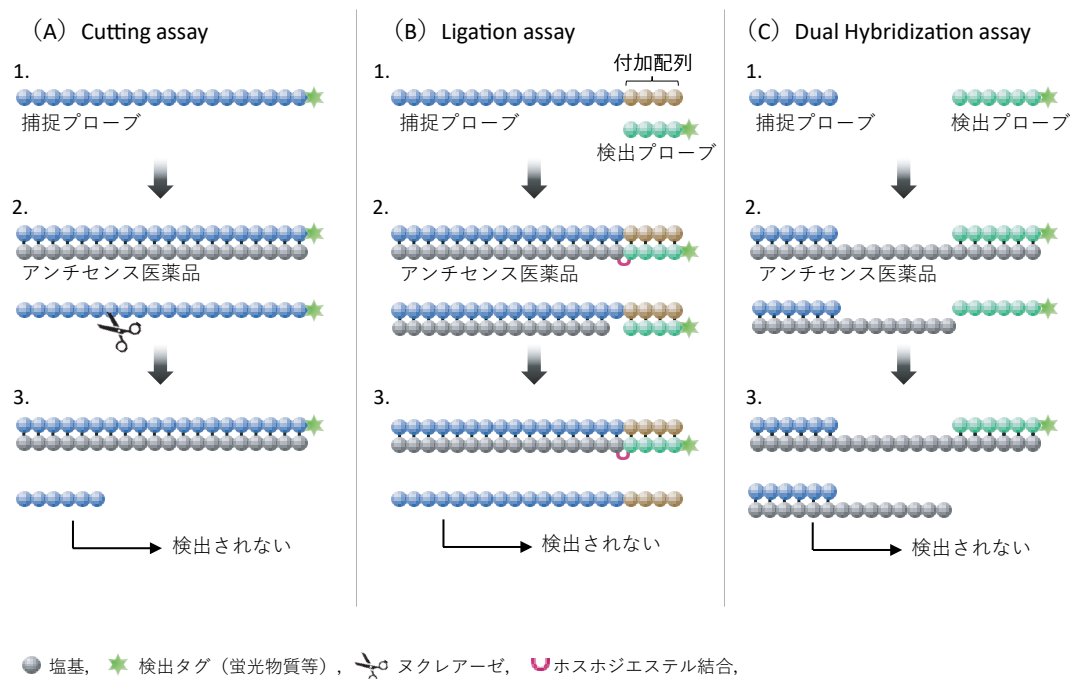


Fig. 2 Hyb-ELISAの分類及びプローブの設計方法

アンチセンス医薬品を例に示す。siRNA等2本鎖の核酸医薬品はガイド鎖が主に測定対象とされる。

(A) 1. 検出タグを付加した相補鎖をプレートに固相する (捕捉プローブ)。2. アンチセンス医薬品とハイブリダイズする。ハイブリダイズしなかった捕捉プローブをヌクレアーゼで切断する。3. 切断された検出タグ付きの捕捉プローブは洗浄工程で除かれる。

(B) 1. アンチセンス医薬品の相補鎖に検出プローブをハイブリダイズさせる任意の配列を数塩基付加したプローブをプレートに固相する (捕捉プローブ)。付加した任意の配列の相補鎖に検出タグを付加した検出プローブを作製する。2. ハイブリダイズしたアンチセンス医薬品と検出プローブをライゲーション (結合) する。3. 結合できなかった検出プローブは、洗浄工程で除かれる。

(C) 1. アンチセンス医薬品の半分程度の相補鎖をプレートに固相する (捕捉プローブ)。捕捉プローブに用いていない配列から検出プローブを作製する。2. アンチセンスとハイブリダイズする。3. ハイブリダイズしなかった検出プローブは、洗浄工程で除かれる。

エキソヌクレアーゼやエンドヌクレアーゼにより段階的に代謝されることが知られており、例えば末端の1塩基が切断された代謝物に対してもプローブが結合しうするため、未変化体と代謝物の分離が困難であることが多い (Fig. 1B-2)。Cutting assayでは、未変化体に加えて3'末端あるいは5'末端が切断された代謝物も検出されるのに対し、ligation assayでは3'末端の塩基が切断された代謝物は検出されないため、ligation assayの方が未変化体に対する選択性が高い。Dual hybridization assayでは3'末端あるいは5'末端が切断された代謝物も検出するが、cutting assayやligation assayとは異なり、ヌクレアーゼやリガーゼなどを用いた酵素反応を必要としない利点がある。

Hyb-ELISAは生体マトリックスの影響を受けるため、組織ごとにminimum required dilutionの設定を含めて前処理法を最適化する必要がある。その

ため、評価組織が多い場合は組織毎の条件設定に時間を要する可能性が考えられる。近年開発されたprobe alternation link self-assembly reaction (PALSAR) 法では、オリゴDNAプローブを用いた自己集合体形成により検出強度が増強されるため、感度が高い (Fig. 3)⁴⁰⁾。一般にマトリックスの影響を低減するため検体は希釈されるが、検出対象も同時に希釈されるため、結果的に核酸医薬の定量下限 (希釈前の核酸医薬濃度に換算した値) は高くなる。従来のHyb-ELISA法に比べて高感度なPALSAR法では、検体を希釈したとしても定量下限が影響を受けにくい可能性がある。

3.2.2.2 ハイブリダイゼーション-液体クロマトグラフィー蛍光検出法 (hybridization-LC-FL)

本法は、蛍光標識体を結合させた相補鎖核酸プローブを用い、イオン交換クロマトグラフィーの原理で分離定量する手法である (Table 3)。ペプチド

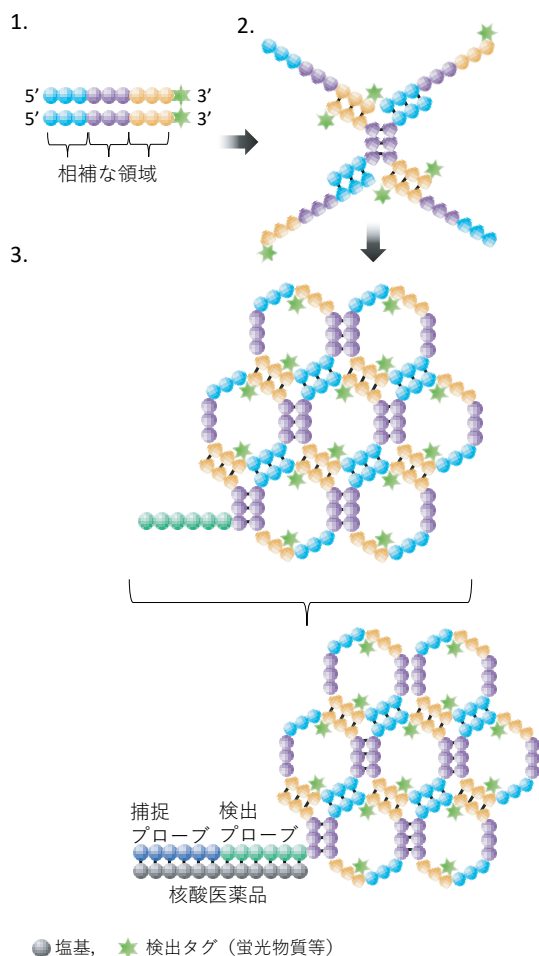


Fig. 3 PALSAR法

1. 検出タグを付加した三つの相補的な領域をもつ1対のDNAプローブを作製する。2. DNAプローブの相補な領域同士をハイブリダイズする。3. 2.の反応を繰り返すことで検出プローブにハニカム構造が複数形成しシグナルを増強する。

核酸 (peptide nucleic acid : PNA) で構成されるプローブを用いる場合は、PNA アッセイと呼ばれている (Fig. 4)。PNA 鎖にはリン酸部位の電荷が存在しないため、静電反発の影響が小さくなり、PNA/DNA の2本鎖はDNA/DNA の2本鎖よりも強い結合性を有する。前処理にて測定対象と核酸プローブを相補的に結合させた後、陰イオン交換クロマトグラフィーで分離測定し、標識した蛍光物質を測定することで核酸医薬を定量する。陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた蛍光測定であるため、生体試料中からの前処理は簡便であり、高感度な測定が可能である⁴¹⁾。また、LC条件を最適化することで、代謝物との分離定量も可能となる。陰イオン交換クロマトグラフィーでは、核酸プローブが結合した核酸医薬とイオン交換体との間のアニオン相互作用が

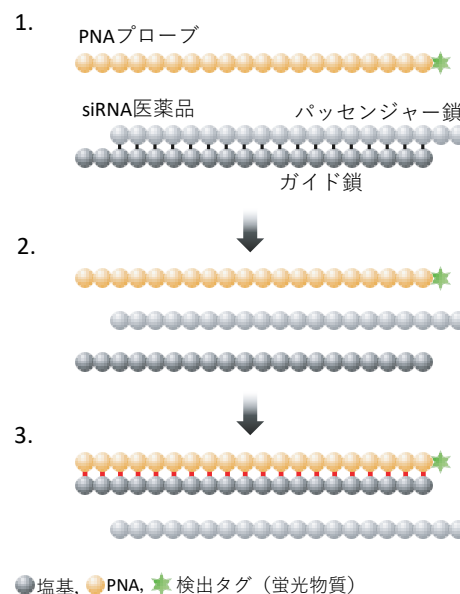


Fig. 4 ペプチド核酸プローブを用いたHybridization-LC-FL法 (PNAアッセイ)

1. siRNA 医薬品のガイド鎖の相補鎖をPNAを用いて作製し蛍光物質を付加する。2. 熱変性させ2本鎖のsiRNA 医薬品を1本鎖に解離させる。3. ハイブリダイズしてイオン交換クロマトグラフィーで測定する。このときPNA/核酸の結合は核酸/核酸よりも強くPNA/ガイド鎖の2本鎖を形成する。

未変化体と代謝物の分離に大きく影響するため、核酸医薬の配列によっては、カラム分離に時間を要する場合がある。既承認siRNA 医薬である patisiran 及び givosiran では蛍光標識を施した核酸プローブを利用した hybridization-LC-FL により、ラット及びサルの肝組織中 siRNA 濃度が定量的に評価されている¹⁻³⁾。既承認薬での報告例はまだ少数ではあるが、簡便で高感度な手法であり、今後の更なる応用の展開が期待される。

3.2.2.3 定量PCR法 (qPCR)

qPCRは、標的DNAを特異的に認識するプライマーを用いて標的DNAを増幅し、その増幅反応を蛍光プローブ等によってリアルタイムに検出する手法である (Table 3)。核酸増幅が指数関数的に起こる領域において一定の増幅産物量になるサイクル数 (Cycle threshold : Ct 値) と初発のDNA濃度の関係から検量線を作成し、標的DNAを定量する。リアルタイムPCRとも呼ばれ、特に感度面で優れている⁴²⁾。

qPCRを核酸医薬の定量に適用しようとした場合、塩基長が十数から数十塩基長であるため、プライマー・プローブの設計が困難である。また、核酸

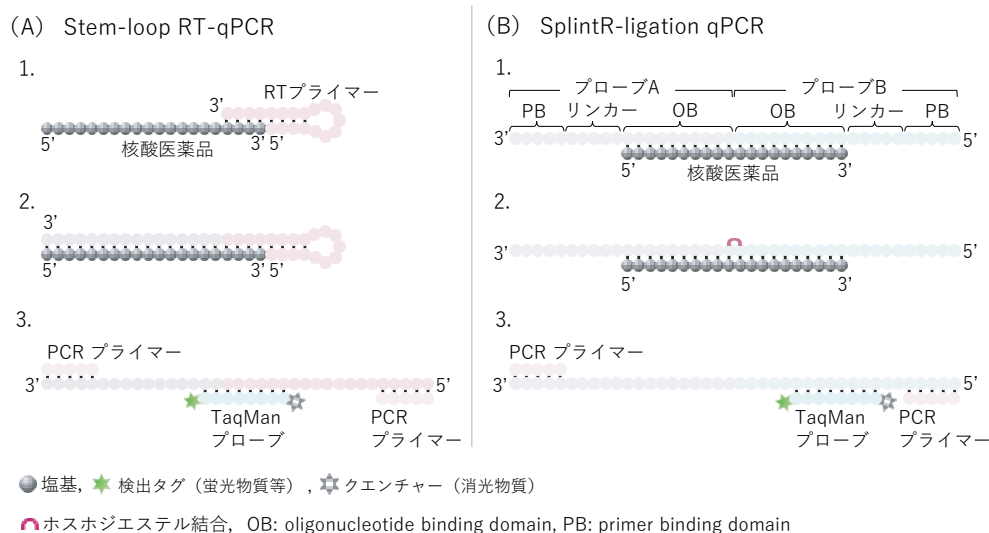


Fig. 5 qPCRを応用した核酸医薬の定量法

- (A) 1. siRNAのガイド鎖の3'末端にRTプライマーがプライミングする。2. 酵素反応により、オリゴ核酸の相補鎖を伸長する。3. qPCR法で定量する。
- (B) 1. OBとアンチセンスをハイブリダイズする。2. プローブAとプローブBをSplintR ligaseでライゲーション（結合）する。3. qPCR法で定量する。

医薬に導入された修飾核酸が核酸増幅反応を阻害すると考えられる。これらの問題を解決するための改良が近年試みられており、qPCRの原理でmicroRNA (miRNA) やsiRNA、あるいはアンチセンスを定量する手法が報告されている⁴³⁾。Stem-loop RT-qPCR法はmiRNAを定量する技術として開発されたもので、siRNAのガイド鎖を定量する手法として応用されている (Fig. 5A)⁴³⁾。siRNAのガイド鎖の3'末側の配列に部分的に相補結合するステムループ型のプライマー (stem-loop primer) を用いて、ガイド鎖に相補的なcDNAを生成し、その後qPCRによって定量する方法である。siRNA投与後の肝臓中及びRNA-induced silencing complex (RISC) 中のガイド鎖の濃度推移を定量した事例などが報告されている⁴⁴⁾。また、Stem-loop primerを用いた逆転写反応では、glycol nucleic acidで化学修飾された核酸を鋳型とした場合にはcDNAの産生効率が低下したとの報告⁴³⁾があり、化学修飾が逆転写反応効率に与える影響についても留意が必要である。

同様にmiRNAの定量技術として開発されたSplintR-ligation qPCR法は、アンチセンスの定量に応用可能との報告がある⁴⁵⁾ (Fig. 5B)。SplintR-ligation qPCR法では、オリゴヌクレオチド結合 (OB) ドメイン、リンカー、プライマー結合 (PB)

ドメインで構成される2種のプローブをアンチセンス上で連結することで、標的アンチセンスと同じ分子数で、かつ、アンチセンスよりも長いDNA鎖を新たに生成し、これをqPCRで測定することによりアンチセンスを定量する。SplintR ligaseはウイルス由来の酵素で、RNAテンプレート上でDNAの3'及び5'末端を連結する機能を有する。SplintR-ligation qPCR法により、マウス組織中の2'-MOE修飾アンチセンスの濃度を定量した事例がある⁴⁵⁾。様々な化学修飾のオリゴ核酸で定量可能であることが確認されている一方で、立体的にかさ高い2'-MOE修飾では連結反応の効率が低下し、検出感度が下がることが報告されている。このことから、連結反応に対する化学修飾の影響を考慮しつつ、検量線の作成等の観点から適切に定量系を構築する必要がある。

また、組織切片上で核酸医薬の濃度を放射能として検出するQWBA等の手法を、qPCRによる核酸検出で代替したwhole-body scanning PCRという手法も報告されている⁴⁶⁾。本手法では、オリゴ核酸の抽出に適した溶解液等を添加した1536ウェルプレートに動物の全身切片をのせて上からシールし、ローラーを用いて切片をプレートに押し付けることで各ウェルに全身切片の断片を分配する。その後、各ウェルの断片に含まれる核酸医薬の量をqPCRで

定量する。Whole-body scanning PCR法でsiRNAの全身分布を評価した事例が報告されており、腎臓や肝臓への分布が認められている。トリチウム体を用いたQWBAとの比較から、一部分布に差が認められており、これは代謝物の検出の有無などによると考察されている。

なお、一般的に組織試料のqPCR測定では、測定対象とする組織間の成分の違いによる核酸抽出法の回収率の低下やCt値のばらつき(マトリックス効果)が問題となることがある。このようなマトリックス効果を回避又は補正するために、内標準物質や外部スパイクコントロール遺伝子が利用されることもある。核酸医薬の定量にqPCR法を適用する場合においても、これらの点に留意することは再現性や頑健性の高いqPCR法を構築する上で非常に重要である。

以上のように、核酸医薬を構成する短鎖のオリゴ核酸を伸長したり、より長鎖の相補的なオリゴ核酸に置き換えたりする等の工夫により、核酸医薬の組織分布評価にqPCRを応用する技術が活用されつつある。従来法との比較や標準化などを含め、今後の更なる応用の展開が期待される。

3.2.2.4 液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS)

LC-MSは、試料中の各成分をカラム固定相と移動相に対する親和性の差によってLCで分離した後、エレクトロスプレーイオン化法にて気相イオンとし、そのイオン強度を相対質量電荷数比 (m/z) に従って検出する手法である。特異性が高い、標識体やプローブなどの特殊試薬を必要としないなどの特徴を有し (Table 3)、低分子医薬や抗体医薬の生体試料中薬物濃度測定に使用されている。核酸医薬の定量分析においてもLC-MSは汎用されており、申請データにも用いられている³⁾。既に上市されている核酸医薬は20塩基長前後の1本鎖あるいは2本鎖のオリゴ核酸で構成されており、モルフォリノオリゴを除いてそれぞれの分子内に負に帯電するリン酸基 (PO_4H) やチオリン酸基 (PSO_3H) を1本鎖あたり20箇所程度有する。このことから核酸医薬では、1)複数箇所脱プロトン化した様々な価数のイオンを持つオリゴ核酸が一連のシリーズとして検出され、そこに2)ナトリウムイオンやカリウムイオンなどのカチオン付加体加わる。更には、3)それらの同位体を含むイオンが検出される。これらの要

因により質量スペクトルが複雑となるため、低分子医薬に比べてイオン強度が分散され、LC-MS分析の検出感度が低くなる傾向がある。しかしながら、近年のタンデム質量分析計の感度向上、飛行時間型質量分析計やオービットラップ型質量分析計といった高分解能質量分析計の使用によるイオン選択性の向上及び生体試料の前処理技術の進歩により、イオン対逆相LC-MS分析を使用した核酸医薬の定量分析において、1 ng/mL以下の高感度で信頼性の高い分析法が報告されるようになってきている⁴⁷⁾。

生体試料中の医薬品の濃度測定では、目的の医薬品 (未変化体) やその代謝物を分離し、生体成分と区別する必要がある。核酸医薬には一般的に修飾核酸が使用されており、チオリン酸基など天然の核酸には存在しない構造が存在することから、これにより核酸医薬を生体試料から選択的に検出することが可能になる。測定の感度を向上させるために、multiple reaction monitoringやmultiple reaction monitoring with high resolutionなどの手法を用い、修飾核酸固有のプロダクトイオン (チオリン酸基の場合 PSO_2^- , m/z 95) を選択することで、S/N比が上がり、より低い定量下限値が期待できる^{48, 49)}。

LC-MS分析は血漿及び尿のみならず組織中の薬物濃度測定も可能であり、既承認核酸医薬の組織分布評価に汎用されている (Table 1)。LC-MS分析は組織中薬物の未変化体及び代謝物を区別して定量することが可能であるため、薬効及び毒性試験において、それらを区別して評価するときには有用な分析法である³⁷⁾。一方、測定試料の作製にあたって一定量の組織を破碎する必要があることから、LC-MS分析は組織中薬物の不均一な局在を把握する方法としては適さないことに留意する必要がある。

3.3 小括

核酸医薬の組織分布の評価に用いられる手法は、イメージング法と非イメージング法に大別され、それぞれについて更に、直接標識して検出する手法、標識せずに検出試薬を用いて検出する手法、検出試薬を用いずに直接検出する手法に分類することができる (Table 1)。イメージングによる評価手法は、組織構造を維持したまま分布の情報を得ることができる (Table 2)。加えてPETやSPECT、並びに一部の蛍光イメージングでは、生きた動物を用いて同

一個体で経時的に分布を評価することが可能である。QWBA, PET 及び SPECT は定量的であり、定量性の担保を目的としたバリデーションは不要である。一方、標識体の合成が必要である、代謝物との区別がつかない、標識が外れたものは追跡できないなどの欠点がある。IHC, ISH 及び IMS は被験物質の標識体を使用せずに組織構造を維持したまま分布情報を得ることができるが、一般的に定量性は高くない。IHC 及び ISH は被験物質と代謝物を必ずしも区別できないが、IMS は質量分析を用いるため、両者を分離評価することが可能である。非イメージングによる評価手法はいずれも高い定量性を有する特徴があるが、組織を採取して溶解又は破碎した試料を用いるため、同一個体における経時的な組織分布を評価することができないだけでなく、組織内の不均一な分布を評価することも困難である (Table 3)。LSC は定型化された定量法であり、医薬品申請における実績は多数存在するが、QWBA と同様に上述の欠点を有する。分離分析手法である HPLC-UV, LC-MS, CGE-UV 及び hybridization-LC-FL は、未変化体と代謝物との分離定量が可能であり、高い特異性を有する。一方、検出器によっては感度が不十分である場合がある。LBA や qPCR は高感度で定量できることが特徴であり、多検体にも対応可能な処理能力を有するが、一般的には代謝物との分離が困難であるなどの欠点を抱えている。

本稿で触れた手法にはそれぞれ利点と欠点があり、2次元の分布情報の有無、解像度、感度、特異性、定量性など評価目的に応じた選択が重要となる。また、標識体の合成難易度や測定法構築の煩雑さなども手法選択の要素になり得る。LC-MS 及び LBA は International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) から発出されたガイドラインが存在するため⁵⁰⁾、この基準を満たす測定法を構築することにより、新薬臨床試験開始申請時あるいは承認申請時において規制要件に沿ったデータを提出することが可能である。本稿で触れた以外にも、UV light after ionic chromatographic separation, 定量 HPLC 法, inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS), X-ray fluorescence microscopy などの手法が核酸医薬の組織分布評価に用いられている。今後、核酸医薬の組織分布評価

への適用事例が増えることによって、産官学での議論が活発化し、ガイドラインの発出等に繋がることが期待される。

4. 組織分布評価の適用事例

本章では前章で述べてきた組織分布評価法の適用事例について、全身分布評価の事例と組織分布評価の事例に分けて紹介する。

4.1 全身分布評価の事例

全身分布評価は医薬品の体内動態を全身レベルで評価するものであり、標的組織を含む主要組織への分布及びその持続性を評価するとともに、想定外の組織への分布の有無等を確認する目的で用いられる。

既承認のアンチセンス医薬及び siRNA 医薬を合わせた13品目中、局所投与される nusinersen を除く12品目で QWBA が用いられており³⁾、低分子医薬と同様に核酸医薬でも QWBA が全身分布評価に標準的に用いられていることがわかる。また、既承認品目だけでなく、アンチセンスの臨床開発品 (renadirsen) や前臨床段階の siRNA 医薬候補品についても QWBA が用いられている^{10, 51, 52)}。一方、前章で述べたように、QWBA は1) 放射性標識体の合成の難易度やコストの観点から探索研究段階では使用しにくい、2) 同一個体での経時変化が評価できない、3) ヒトには適用できないなどの課題がある。そのため、比較的合成が容易な蛍光標識体や PET などの放射性核種を用いた評価も行われている。それらを含めて以下に事例を紹介する。

前述の通り、既承認の全身投与型アンチセンス医薬では、³H もしくは ¹⁴C 標識体を用いた QWBA が行われており、最も高濃度に分布した組織が全ての薬剤で腎臓、次いで肝臓であった。脳への移行性は低く、全身から脳へのアンチセンスの移行が血液脳関門により制限されていると考えられている²⁾。DMD 遺伝子に対するアンチセンスとして臨床開発されていた renadirsen についても同様に、¹⁴C 標識体を用いた QWBA により、中枢・大腸を除く広い組織への分布、特に腎臓と膀胱への高い集積が認められた。化合物が血中から消失した後も標的組織である筋肉への分布は持続し、最終評価時点 (投与後

336時間)まで横隔膜、心臓、骨格筋への分布が確認された。この筋肉組織における長い半減期は、薬効の持続を支持する結果として考察されていた⁵¹⁾。一方、*BCL2*遺伝子を標的としたアンチセンス搭載リボソーム製剤であるBP-1002は、³²P標識リボソーム製剤を投与したマウスでの組織中濃度(心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓、骨髄、血液)をLSCにより解析しており、投与後4時間及び24時間では肝臓と脾臓で、投与後48時間では肺で高い分布が認められたが、腎臓への移行は限定的であった⁵³⁾。これはアンチセンス単独投与の一般的な組織分布とは異なる結果であり、リボソームがアンチセンスの組織分布に大きく影響したと考えられる。また、BP-1002と同様にLSCによりアンチセンス製剤の組織分布を評価した事例として、ATP結合カセットBサブファミリー1(*ABCB1*)のmRNAを標的とした³H標識アンチセンスのナノゲル(ポリエチレングリコールとポリエチレンイミンが共有結合された構成成分からなるナノスケールサイズの陽電荷粒子)⁵⁴⁾や³⁵S標識アンチセンスを含有させた葉酸受容体標的リボソーム⁵⁵⁾が報告されている。

siRNAの全身分布評価においてもアンチセンスと同様にQWBAが用いられている。具体的な事例として、多剤耐性タンパク質4をコードする*ABCC4* mRNAに対するsiRNA(各鎖の3'末端にdTdTのオーバーハング配列を有する)及びシェーグレン症候群抗原Bをコードする*SSB* mRNAに対するsiRNA(ピリミジン核酸の糖部が2'-O-methyl修飾されている)の³H標識体について、マウスにおける全身分布がQWBAで評価されている¹⁰⁾。両者では化学修飾や配列が異なるが、組織分布の違いは少なく、組織中放射能濃度が最も高かったのは腎臓、次いで唾液腺、脾臓、肝臓の順であり、中枢神経系の組織では低濃度であった。また、*SSB*については、このものに対する³H標識siRNAを用いて、それを内包させた脂質ナノ粒子についてのマウス全身分布がQWBAにて評価されている⁵⁶⁾。放射能濃度が高かった組織は脾臓、肝臓、腎臓、唾液腺の順であり、³H標識siRNAのみの組織分布と異なる結果を示し脂質ナノ粒子により組織分布が変化することが示された。N-acetylgalactosamine (GalNAc)-siRNAであるgivosiran, inclisiran, lumasiran及びvutrisiranは、肝実質細胞に特異的に発現するアシ

アロ糖タンパク質受容体(asialoglycoprotein receptors: ASGPR)を介して肝臓選択的に取り込まれるように設計されており、実際ラットやサルを用いたQWBAで肝臓に高い放射能濃度が観察された³⁾。

蛍光イメージングについては、核酸医薬の全身分布を把握する手法としてIVFIが用いられる。IVFIの中でも生きた動物を用いて全身分布を評価する手法と主要な臓器を摘出した後に評価を行う手法がある⁵⁷⁻⁶¹⁾。一例として、インスリン様成長因子1受容体をコードする*IGF1R* mRNAに対するアンチセンス(CT-102)の報告がある⁵⁸⁾。この報告では、Cy5.5標識したCT-102を種々のリボソームに封入し、IVFIによりリボソーム組成の違いが生体内分布に与える影響が評価されている。静脈内投与後の生体マウス全身の蛍光強度の半減期には大きな違いがなかったが、肝臓に高い分布が認められた。更に、摘出した臓器の解析からリボソーム組成の違いによる肝臓の蛍光強度に差が認められ、抗腫瘍試験において肝細胞癌の腫瘍縮小効果にも違いが観察された。

PETを用いて全身分布評価を行った事例としては、バキュロウイルスIAPリピート含有5(*BIRC5*)のmRNAを標的としたアンチセンス(LY2181308)及びトランスフォーミング増殖因子 $\beta 2$ (*TGFB2*)のmRNAを標的としたアンチセンス(trabedersen)の報告がある^{62, 63)}。¹¹Cで標識したLY2181308を固形がん患者へ1 mg未満のマイクロドーズで投与したPET試験では、腎臓及び肝臓へ最も高い分布が認められ、腫瘍には中程度の分布、肺と筋肉で最も分布が低かった。また、750 mgの非標識LY2181308を反復投与後に¹¹C-LY2181308を投与した際には、腫瘍へのより高い分布が認められ、薬効用量では薬効に望ましい薬物動態プロファイルを有することが示唆された⁶²⁾。一方、リボソームに封入された⁶⁴Cu-trabedersenを担癌マウスに静脈内投与したPET試験では、同条件でのLC-MS/MSによる未変化体濃度との比較が行われた。その結果、腎臓や腫瘍中においては投与後48時間まではLC-MS/MSによる未変化体の濃度推移がPETと同様であったのに対し、肝臓においてはLC-MS/MSにより検出される未変化体の方がPETシグナルより早く低下した⁶³⁾。このように、未変化体が消失した後に標識を含む代謝物が組織に残存するケースがあ

ると考えられるため、PETによる分布評価の結果の解釈には注意が必要である。

SPECTを用いた全身分布評価も複数報告されている^{22, 64-67)}。1例として、アミロイド前駆体タンパク質pre-mRNAを標的とする¹¹¹In標識アンチセンスの投与経路の検討事例を挙げる⁶⁴⁾。マウス脳室内投与では、髄腔内投与に比べて大脳皮質や小脳等の脳の各部位での放射活性が高かったのに対し、脊髄では低く、脳や脊髄以外の全身の臓器の放射活性は両投与経路間でほぼ同じであった。SPECTで全身分布を測定する利点は、同じ動物で経時的に繰り返し全身の放射活性を測定できる点である。この研究では、投与後4日間にわたり観察されているが、アンチセンスを脳室内に投与後、トレーサーが中枢神経系にとどまる一方、それ以外の他の臓器からは急速に減少することが示されている。

上記のように核酸医薬の全身分布評価は、標的組織以外の組織を含めた包括的な分布、あるいは、化学修飾や薬物送達システム (drug delivery system: DDS) が組織分布に与える影響を評価するために実施されている。主な手法としては核酸医薬の放射性標識体もしくは蛍光標識体を用いる試験が多く、放射性標識体を用いた評価手法としては、動物の全身切片で評価するQWBA、生きた動物のまま評価可能なIVFIやPET、SPECTなどのイメージング、あるいは、摘出組織の放射能測定を行うLSCが用いられていた。

4.2 組織内分布評価の事例

核酸医薬は一般に組織内での分解や組織外への放出の速度が遅いことから、薬効を保持した核酸医薬が組織内に蓄積しやすいという性質を有する。このことから、核酸医薬の組織分布評価は、その薬効の持続性や毒性を予見する上で慎重な検討が必要である。核酸医薬の開発過程において組織分布評価は、DDS技術の妥当性の確認や薬効の持続性、毒性発現等の考察などの目的に応じ、評価手法が選択されている。上述のとおり、組織分布の評価手法は、分布を可視化するイメージング法と生化学的に薬物濃度の解析する非イメージング法に大別され (Table 1)、いずれについても、核酸医薬に直接標識して検出する手法 (標識体を用いた手法)、標識せずに核酸プローブや抗体などの検出試薬を用いて検出する手

法 (検出試薬を用いた手法)、検出試薬を用いず核酸医薬を直接検出する手法がある。以下では、それぞれのケースに分けて組織内分布の評価事例を紹介する。

4.2.1 イメージング法による分布評価事例

4.2.1.1 イメージング法: 標識体を用いた分布評価事例

標識体を用いた組織分布のイメージングには、QWBAと同様にオートラジオグラフィーを用いるMARGが活用される。サイトメガロウイルス誘発網膜炎に対する¹⁴C標識アンチセンス (GEMI32) の事例では、MARGにより、ウサギの硝子体内に投与したアンチセンスの組織分布が解析された⁶⁸⁾。GEMI32は網膜層全体 (内核層、叢状層、神経節細胞層、視神経線維層) に分布が認められ、特に網膜の外核層と内核層において、高濃度で、かつ斑状の分布が観察された。これらの分布は軽度の網膜変性が認められた部位と一致しており、アンチセンスの局在が毒性発現の原因になっていると推定された。他の事例として、生分解性ポリマーである乳酸グリコール酸共重合体 (poly (lactic-co-glycolic acid): PLGA) に内包された核酸医薬の徐放性の評価にMARGが活用されている⁶⁹⁾。³H標識アンチセンス内包PLGA製剤をマウスに皮下投与し、肝臓及び腎臓における組織分布をMARGで評価した結果、近位尿細管、肝類洞内皮細胞及びクッパー細胞で高い分布が観察された。一方、遠位尿細管及び糸球体、肝実質細胞への分布はわずかであった。アンチセンス単体で投与した場合には24時間以内に組織から消失したのに対し、PLGA製剤では投与後7日でも臓器内及び投与部位に残存しており、PLGAによる製剤化がアンチセンスの持続的送達に有用であることが示された。

研究開発段階においては、蛍光標識体を付加した核酸医薬を用いたイメージングが分布評価に広く用いられている。3.1.1.3で述べたように一般的にCFTは全身分布の評価だけでなく、組織における局所分布を評価する手法として用いられている。具体例としては、髄腔内に投与したアンチセンスの脳内分布をCFTにより経時的に解析した報告がある²⁵⁾。GABA_A受容体 $\alpha 1$ サブユニットをコードするGABRA1 mRNAに対するCy7標識アンチセンスは、髄腔内投与後に脳脊髄液を介して脳実質表面へ

浸透し、時間の経過とともに脳深部に達したが、線条体や小脳深部は他の脳深部領域よりもアンチセンスの蓄積量が少なかった。CFTの特徴は任意の2次元画像と3次元画像が得られることであり、2次元画像からは脳実質表面から深部への浸透が、3次元画像からは投与早期から主要な脳動脈に存在することが明らかになった。他の蛍光イメージング法である共焦点顕微鏡を用いた実施例としては、Cy5標識siRNA搭載ポリマーミセルをマウスに投与した後の腫瘍内の分布を、生きた動物を用いて経時的に解析した報告がある⁷⁰⁾。本薬剤のポリマーには、一部の腫瘍細胞や腫瘍血管に発現することが知られるインテグリンと親和性を有するArg-Gly-Asp (RGD)の環状ペプチドが付加されている。顕微鏡観察は、皮下腫瘍モデルをskin flap法(皮下腫瘍を囲むように切開し腫瘍表面を露出させる手法)で露出させて行われた。皮下腫瘍モデルマウスに投与されたCy5標識siRNAは腫瘍と腫瘍血管に集積していたが、正常組織である耳介皮膚血管には集積していないことから、腫瘍特異的な集積を示すことが示唆された。また、蛍光標識アンチセンスを動物に投与した後、主要な臓器を摘出し、組織切片を用いて分布を解析した事例がある(脈絡叢⁷¹⁾、網膜^{72, 73)}、腫瘍⁷⁴⁾、脳⁷⁵⁾)。一例として、レーバー先天性黒内障に対するアンチセンス(sepofarsen)を6-carboxyfluoresceinで蛍光標識し、硝子体内に投与した際の組織内分布を解析した報告がある⁷²⁾。マウス及びウサギの硝子体に蛍光標識アンチセンスを投与した後、網膜の凍結切片を共焦点顕微鏡によるイメージングの結果、網膜外顆粒層の核内に蛍光シグナルが確認され、薬効を支持する分布が確認された。また、2光子励起顕微鏡によるイメージングではシグナル伝達兼転写活性化因子3 (STAT3) のmRNAを標的としたsiRNAの腫瘍関連ミエロイド細胞への分布を解析した報告がある²⁵⁾。具体的には、Toll様受容体9アゴニストであるCpGオリゴヌクレオチドをリンカーで結合させたsiRNAをfluorescein isothiocyanate (FITC)で蛍光標識し、B16担癌マウスの腫瘍周囲に直接投与した後に2光子励起顕微鏡によるイメージングを実施した。その結果、腫瘍を灌流するリンパ節においてFITC陽性細胞が増加しており、FITC陽性細胞においては、核内小胞周囲でsiRNAの蓄積が観察された。

その他の事例として、金原子で標識されたナノ粒子製剤の分布評価が報告されている。B-cell lymphoma 2-like 12 (*BCL2L12*) のmRNAを標的としたsiRNAの金ナノ粒子製剤 (NU-0129)⁷⁶⁾を膠芽腫患者に静脈内投与し、脳内の腫瘍への金成分の到達及び分布を蛍光X線顕微鏡により評価したところ、金ナノ粒子が腫瘍血管周辺及び腫瘍部位に分布していた。更に銀染色では、金ナノ粒子が腫瘍細胞の核外の領域に存在すること、腫瘍関連内皮細胞及びマクロファージにも分布することが示唆された。ICP-MSにより腫瘍内の金ナノ粒子の濃度が定量されており、腫瘍内へのNU-0129の取り込みが*BCL2L12*のタンパク質の発現低下と関連していた。

4.2.1.2 イメージング法:検出試薬を用いた分布評価事例

次に、抗体や核酸プローブなどの検出試薬を用いた分布評価として、IHC(抗体を使用)やISH(核酸プローブを使用)による分布評価の事例を紹介する。

IHCを用いた分布評価の事例として、siRNAをウサギに免疫して取得した抗siRNAポリクローナル抗体とHRP標識抗ウサギIgG二次抗体を用いて、siRNAの組織内分布を評価した研究が報告されている⁷⁷⁾。具体的には、2'-O-hexadecyl (C16)が付加されたsuperoxide dismutase 1 (*Sod1*)のmRNAを標的としたsiRNAをラットに髄腔内投与し、その脳内分布をIHCにて解析した結果⁷⁷⁾、1) 非修飾siRNAに比べてC16-siRNAは脳に広範に分布すること、2) 細胞種選択的マーカーとの共染色により、C16-siRNAが神経細胞、アストロサイト及びマイクログリア細胞に取り込まれることが示された。また、siRNAが分布する領域において、標的である*Sod1* mRNAの発現低下が確認された。

ISHについても、中枢における組織内分布を評価した事例が報告されている⁷⁸⁾。筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子*C9orf72*の異常伸長リピートを含む転写産物を選択的に抑制するアンチセンス (WVE-004)をマウスの脳室に投与し、アンチセンスに特異的に結合する核酸プローブを用いて脳内の分布を解析したところ、標的組織である脊髄細胞中にWVE-004が検出された。更に、Hyb-ELISAによる解析から、大脳皮質及び脊髄におけるWVE-004

濃度は投与後24週まで持続されることが示された。

Fluorescence *in situ* hybridizationについては、皮膚のVII型コラーゲン遺伝子*COL7A1*を標的としたアンチセンス (QR-313) を搭載したゲル製剤の評価に適用した事例が報告されている⁷⁹⁾。ブタにおいて、QR-313をカルボマー系ハイドロゲル製剤と混合して塗布した後、アンチセンスと相補的に結合する蛍光標識核酸プローブを用いて、アンチセンスの皮膚への浸透を評価した。その結果、QR-313は無傷の表皮には浸透しなかったが、創傷皮膚では、表皮及び隣接する真皮に分布が確認された。また、この分布に従い、創傷床において標的遺伝子に対する目的の薬理作用 (エクソスキップ活性) が確認された。

4.2.1.3 イメージング法:核酸医薬を直接検出する分布評価事例

核酸医薬を組織切片から直接検出する方法として、マウス腎皮質への分布⁸⁰⁾、ラットにおける肝及び腎⁶⁵⁾あるいは網膜への分布³⁵⁾に質量分析イメージングを活用した事例が報告されている。具体的には、腎毒性を示すアンチセンスの腎組織における分布が質量分析イメージングにより評価され、全身投与性のアンチセンスの特徴的な分布とされる腎皮質への蓄積が確認されている³⁷⁾。当該論文では更に、質量分析イメージングを用いた分布評価の結果がLC-MS/MSによる定量結果や免疫染色による解析結果と類似していることを示し、質量分析イメージングを用いた分布評価の妥当性を確認している。また、マウスにLocked Nucleic Acid (LNA)-アンチセンスを静脈内投与した後、腎臓を摘出し、質量分析イメージングを実施した事例では、アンチセンスの未変化体が腎皮質に分布することに加え、3'末端からデオキシグアノシンチオリン酸が外れた代謝物も同時に確認された⁸⁰⁾。このように、質量分析イメージングでは鎖長の異なるアンチセンスの分布を区別して同時に検出可能であることから、代謝物を含めた腎毒性の考察に有用である。

4.2.2 非イメージング法 (生化学的手法) による分布評価事例

本章ではイメージングを用いない分布評価、すなわち、摘出した組織を破碎する生化学的手法で薬物濃度を解析した分布評価の事例を、核酸プローブや抗体などの検出試薬を用いた手法と核酸医薬を直接

検出する手法に分けて紹介する。

4.2.2.1 非イメージング法:検出試薬を用いた分布評価事例

検出試薬を用いて各組織の核酸医薬濃度を生化学的に定量する手法として、qPCR法やハイブリダイゼーション技術を用いた測定法は高感度であり、微量の生体試料から組織濃度を定量することが可能である。具体例としては、特定の組織への送達向上を企図して抗体を結合したsiRNAの組織分布をqPCR法により評価した事例が報告されている。Catenin $\beta 1$ (*Cttnb1*) のmRNAを標的とするsiRNAにanti-transferrin receptor 1 antibodies (α TfR1) もしくは anti-asialoglycoprotein receptor antibodies (α ASGPR) を結合させた薬剤 (α TfR1-siCttnb1 及び α ASGPR-siCttnb1) をマウスに静脈内投与した4日後の腓腹筋、心筋及び肝臓を採取し、組織中のsiRNA濃度をstem-loop qPCR法により定量した。腓腹筋及び心筋における α TfR1-siCttnb1 濃度は α ASGPR-siCttnb1 濃度と比較して8.6倍及び1.6倍高かった。一方、肝臓における α ASGPR-siCttnb1 濃度は α TfR1-siCttnb1 濃度と比較して6.1倍高かった。これらの結果は、筋肉におけるTfR1及び肝臓におけるASGPRの発現に依存する取り込みが寄与していると考察された⁸¹⁾。

更に微小な組織分布として、腫瘍組織、肝細胞や細胞内局所における核酸医薬の分布も評価されている。Kirsten rat sarcomaウイルス癌遺伝子ホモログ (*KRAS*) G12D変異を有するmRNAを標的としたsiRNAを生分解性のポリマーマトリックスに搭載した製剤であるsiG12D-LODERについて、腫瘍におけるsiRNAの分布と薬効の関係を調べた研究が報告されている⁸²⁾。脾臓がん細胞を皮下に移植したマウスモデルの腫瘍中に、siG12D-LODERを埋め込み、投与7日後に腫瘍を採材した。埋め込んだ位置からの距離を1mmごとに腫瘍サンプルを分離採取し、qPCRによってsiRNAのガイド鎖を定量した結果、腫瘍全体にsiRNAが分布したことを確認でき、特に埋め込んだ部位から1mmにおいて最も高濃度であった。siG12D-LODERを埋め込んだエリアを中心に腫瘍の壊死が認められ、siRNAの分布と薬効の関係が評価された。

細胞内のRISCに取り込まれたsiRNAを定量的に評価する事例も報告されている。肝臓を標的とする

GalNAcを付加したリポ蛋白 (a) をコードする *LPA* mRNA を標的とした siRNA (olpasiran) を、カニクイザルに皮下投与し、投与後57日の肝臓中の siRNA 濃度及び RISC に結合したガイド鎖濃度を Hyb-ELISA 及び stem-loop PCR 法により測定した。この結果、RISC に結合した olpasiran 濃度は肝臓中の濃度と比較して微量であることが確認された。一方で、薬力学的マーカーであるリポ蛋白 (a) については、投与後5~8週間 (56日) に渡って強力に血清中濃度を減少させることが示されており、RISC に結合した微量の olpasiran が寄与していると考えられた⁸³⁾。

Adrenergic receptor beta2 (*ADRB2*) の mRNA を標的とする siRNA (SYL040012) をウサギに点眼投与した報告においては、hybridization-LC-FL を用いて、眼内組織及びその他の主要組織中のガイド鎖の濃度が測定された。測定においては、SYL040012 と細胞質で生成する SYL040012 の 5' リン酸化体が分離定量された。SYL040012 は点眼後すぐに前眼部組織である角膜や虹彩及び毛様体に分布が認められた。*ADRB2* は全身に発現しているが、点眼後30分の SYL040012 濃度は角膜組織で約 200 ng/g tissue であるのに対し血漿、腎臓、肝臓及び肺は 1.69 ng/g tissue 以下とほとんど検出されておらず、眼部以外の組織での *ADRB2* の阻害による作用発現の可能性は低いことが示された⁸⁴⁾。

2023年に米国で承認された AKCEA-TTR- L_{RX} (eplontersen) は Transthyretin (*TTR*) の mRNA を標的とし、inotersen に GalNAc を付加した肝実質細胞への指向性が高いアンチセンスである。GalNAc のデリバリー効果を検証する目的で、hTTR-Tg マウスに、AKCEA-TTR- L_{RX} 及び inotersen を 1.4 μ mol/kg 単回投与した後に、肝臓の総細胞、肝実質細胞及び肝非実質細胞における薬物量が Hyb-ELISA 法により測定された。肝臓の総細胞への AKCEA-TTR- L_{RX} と inotersen の分布は同様であったが、肝実質細胞への分布は AKCEA-TTR- L_{RX} が inotersen に比べ約3倍高かった。一方、肝非実質細胞への分布は inotersen が AKCEA-TTR- L_{RX} よりも高かった。これらの結果から、GalNAc の付加によりアンチセンスの肝実質細胞への送達が進められていることが示され、AKCEA-TTR- L_{RX} は inotersen より低用量あるいは低投与頻

度で有効性を示す可能性が示唆された⁸⁵⁾。実際に inotersen は週に1回 284 mg を皮下投与しているのに対して、eplontersen として米国で承認された AKCEA-TTR- L_{RX} の用法及び用量は月に1回 45 mg を皮下投与することとなっており、用量及び投与頻度ともに inotersen よりも低くなっている。

4.2.2.2 非イメージング法：核酸医薬を直接検出する分布評価事例

核酸医薬を組織から直接検出する方法として、HPLC-UV 及び LC-MS/MS の活用事例も報告されている。インスリン受容体基質1 (*IRS-1*) の mRNA を標的とするアンチセンス (aganirsen) では、ウサギに点眼投与後の網膜への分布評価が実施された⁸⁶⁾。薬効発現部位である網膜を摘出したサンプルの UV 検出イオンクロマトグラフィーによる定量の結果、0.83% の網膜移行率が確認された。虚血性網膜症モデルラットに本剤を点眼することにより、網膜血管新生が有意に阻害された。

GalNAc-アンチセンスである ISIS681257 をサルに皮下投与後、血漿、肝臓及び腎臓中の未変化体の ISIS681257 及び GalNAc 部位が消失した非結合型 ISIS681257 を、LC-MS/MS によって定量した。皮下投与後、ISIS681257 は急速に体循環に吸収され、投与後数時間で最高血漿中濃度に達し、肝臓及び腎臓中に速やかに分布した。組織に分布すると ISIS681257 に結合する GalNAc は数分から数時間以内に急速に切断され、投与後48時間の組織においては非結合型 ISIS681257 のみが検出されており、その後、非結合型 ISIS681257 は約30日の半減期で組織からゆっくりと消失することが確認されている⁸⁷⁾。

5. 考察

核酸医薬は低分子医薬と比較して水溶性が高く、受動拡散ではなく複数の細胞膜上受容体を介したエンドサイトーシスにより組織移行する⁶⁾。我々は、以前発表した総説「アンチセンス医薬品の薬物動態評価の現状」において、既承認アンチセンス医薬の薬物動態特性を記載し²⁾、この中で、nusinersen 以外のアンチセンス医薬6品目 (いずれもアンチセンス単独で投与される) が、動物種に関係なく腎臓に最も高濃度に分布することを述べた。これ以外の近

年承認された核酸医薬をみると、lipid nanoparticle-patisiran及びgivosiranなどのGalNAc-siRNAは、それぞれApolipoprotein E受容体やLow density lipoprotein受容体、及びASGPRを介したエンドサイトーシスにより、標的組織である肝細胞に高濃度に取り込まれる特性を持っている⁸⁸⁾。このように現時点では肝臓への送達技術が実用化された段階であるが、核酸医薬はDDSにより分布特性を大きく変えられる可能性があり、送達技術についての研究が世界で盛んになされている^{89, 90)}。これらの送達技術による分布特性の変化や、薬物動態/薬力学的特性、オンターゲット及びオフターゲット毒性を考察する上で、核酸医薬の分布評価は必要不可欠であることは言うまでもない。

規制面をみると、本邦においては「非臨床薬物動態試験ガイドラインについて」(医薬審第496号、平成10年6月26日)において被験物質の各種臓器及び組織への分布、経時的変化並びに必要なに応じて蓄積性を明確にするための分布試験の実施が言及されている。また、「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」(ICH M3(R2))において、通常では第Ⅲ相試験前までに毒性試験の動物種における分布を含む薬物動態情報の取得が求められている。これらは主に低分子医薬を意図して発出されたものであるが、「遺伝子治療製品の非臨床生体内分布の考え方」(ICH S12, Step 5)が示されたように、核酸医薬についても特徴的な分布特性をどのように評価すべきか議論することが望まれる。また、「リポソーム製剤の開発に関するガイドライン」(薬生審査発0328第19号、平成28年3月28日)において、「リポソーム構成成分が安全性に影響を与えると予測されるのであれば、構成成分の分布、代謝及び排泄経路についても必要に応じて評価する」とされており、送達キャリアなど薬物本体以外で薬物動態特性に影響を与える成分についての評価の重要性が言及されている。

本研究では、2023年3月時点における既承認の核酸医薬(アンチセンス医薬及びsiRNA医薬)並びにその開発品(承認されていない品目)の分布評価に着目し、用いられている手法について整理を行った。既承認核酸医薬においてはQWBAがほとんどの場合で用いられ、次いでLCやCGEとUVやFL

検出器、あるいはMS/MSやHRAMなどの質量分析計を組み合わせた分析法、更にnusinersenの場合はHyb-ELISAやElectrochemiluminescenceなどのLBAが用いられていた。QWBA等の放射性標識体を用いた分析法の場合はバリデーションが不要であり、上述の分離分析法やLBAでは「生体試料中薬物濃度分析法バリデーション及び実試料分析に関するガイドライン」(ICH M10)に従って各分析法のバリデーションが実施されていると考えられ、手法の妥当性について客観的な評価が可能である。そのため、核酸医薬品の承認申請用の分布分析法として用いられたと考えられる。

一方で開発品については、既承認薬で用いられる手法であるオートラジオグラフィ(QWBAやMARG)以外にも、全身分布を検討する分析法として蛍光イメージングや放射性核種イメージングが用いられていた。更に、組織分布を検討する分析法としてIHC/ISH、蛍光イメージング、質量分析イメージングなどの画像情報を取得するイメージング法や、LC-MS及びqPCRなどの定量情報を取得する非イメージング法が用いられていた。開発品の分布評価については、標的組織への分布と薬効及び毒性の関連を考察するために検討された例の他、単純にDDSによる全身分布特性の変化などを検討された例も多くみられた。評価手法の選択については、評価対象が全身であるか特定の組織であるかに加え、組織の中でも細胞間あるいは細胞内局在のどのレベルで検出したいか、更には感度面で目的に応じた十分な情報が得られるかが重要な要素と考えられる。

今後、核酸医薬は様々な送達技術が検討され、標的組織や分布特性が多様になっていくと考えられる。しかしながら、既承認核酸医薬で頻用されるイメージング法のQWBAを例に考えると、標識体合成の難易度や標識箇所の設定の問題、感度面での課題(一般的に検出限界は数 $\mu\text{g/g}$ 程度)があり、規制面で受入れられるとはいえ、開発期間を通じて最良の方法とは言い難い。先に述べた「非臨床薬物動態試験ガイドラインについて」では、分布評価における臓器内及び組織内濃度の検討項目において、「定量的全身オートラジオグラフィ等、新しい技法も適切にバリデートされたものであるならば、臓器内及び組織内濃度を測定する方法として利用して

も良い」と注釈に記載されており、規制側がQWBA以外の新しい手法を受け入れる余地があることが示されている。一方で、開発品で用いられていた放射性核種イメージング、蛍光イメージング、IHC/ISH及び質量分析イメージングなどの手法は、現状QWBAと比べて定量性に課題があり、バリデーションの方法論が整備されていないため、規制面での対応が十分とは言えない状況にある。まずは、開発者と規制側がお互いにこれらの新しい評価手法の特徴や限界を理解し、核酸医薬に最適な手法の適用に向けて、必要な規制面での対応を議論していくことが重要と考えられる。

昨今の分析技術の進歩は目まぐるしく、今後登場する新たな分析法も含めて、どのような分布特性を示したいか、そのデータを何に使用したいかなどの「目的」を第一に考え、目的に応じた分析手法を選択すること、及び、その評価の妥当性と結果の合理性を説明し、事例と知識を蓄積していくことが重要になると考えられる。

6. 結論

本稿では、既承認核酸医薬のみならず、臨床開発や前臨床段階で用いられている核酸医薬の開発品の組織分布評価法を網羅的に調査し、その手法の分類と特徴をまとめ、適用事例を示した。既承認薬では規制面を意識し、イメージング法の中でも限られた手法でしか評価されていなかったが、臨床開発品や前臨床段階の開発品では目的に応じて幅広い手法が採用されていた。今後、特定の組織への標的指向性を持つ核酸医薬の臨床開発が盛んになると考えられ、より正確な組織分布を把握することが重要となる。組織分布評価に用いられる手法の特性を理解した上で、目的に応じた手法を選択していくことが重要であるとともに、分析機器の発展に伴い新たに生み出される分析法を核酸医薬の開発に積極的に取り入れる試みも行っていく必要があると考えられる。

文 献

- 1) 高草英生, 岩崎紀彦, 西川元也, 吉田徳幸, 小比賀聡, 井上貴雄. 核酸医薬品の薬物動態特性とその評価. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2021, 52(2), p.76-84.
- 2) 岩崎紀彦, 小平浩史, 後藤昭彦, 山中陽介, 佐藤正延, 宮澤憲浩, 庭山裕孝, 設楽悦久, 関口裕太郎, 田村直美, 高草英生, 角辻賢太, 今井峻司, 深野泰史, 福原慶, 蓼原吉輝, 吉田徳幸, 小比賀聡, 西川元也, 井上貴雄. アンチセンス医薬品の薬物動態評価の現状. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2021, 52(3), p.150-163.
- 3) 今井峻司, 深野泰史, 庭山裕孝, 田村直美, 三好美佳, 福原慶, 小平浩史, 岩崎紀彦, 山中陽介, 宮澤憲浩, 高草英生, 角辻賢太, 後藤昭彦, 島田俊介, 吉田徳幸, 小比賀聡, 西川元也, 井上貴雄. 既承認核酸医薬品の組織分布及び血漿/血清タンパク結合評価に関する調査と考察. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2024, 55(3), p.208-238.
- 4) Coe, R.A. Quantitative whole-body autoradiography. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2000, 31(2 Pt 2), p. S1-3. doi: 10.1006/rtph.2000.1379.
- 5) Stumpf, W.E. Whole-body and microscopic autoradiography to determine tissue distribution of biopharmaceuticals-target discoveries with receptor micro-autoradiography engendered new concepts and therapies for vitamin D. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013, 65(8), p.1086-1097. doi: 10.1016/j.addr.2012.11.008.
- 6) Miller, C. M.; Donner, A. J.; Blank, E. E.; Egger, A. W.; Kellar, B. M.; Østergaard, M. E.; Seth, P. P.; Harris, E. N. Stabilin-1 and Stabilin-2 are specific receptors for the cellular internalization of phosphorothioate-modified antisense oligonucleotides (ASOs) in the liver. *Nucleic Acids Res.* 2016, 44(6), p.2782-2794. doi: 10.1093/nar/gkw112.
- 7) Janssen, M. J.; Nieskens, T. T. G.; Steevens, T. A. M.; Caetano-Pinto, P.; den Braanker, D.; Mulder, M.; Ponstein, Y.; Jones, S.; Masereeuw, R.; den Besten, C.; Wilmer, M. J. Therapy with 2'-O-Me Phosphorothioate Antisense Oligonucleotides Causes Reversible Proteinuria by Inhibiting Renal Protein Reabsorption. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2019, 18, p.298-307. doi: 10.1016/j.omtn.2019.08.025.
- 8) Geary, R. S. Antisense oligonucleotide pharmacokinetics and metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009, 5(4), p.381-391. doi: 10.1517/17425250902877680.
- 9) Baek, M. S.; Yu, R. Z.; Gaus, H.; Grundy, J. S.; Geary, R. S. In vitro metabolic stabilities and metabolism of 2'-O-(methoxyethyl) partially modified phosphorothioate antisense oligonucleotides in preincubated rat or human whole liver homogenates. *Oligonucleotides.* 2010, 20(6), p.309-316. doi: 10.1089/oli.2010.0252.

- 10) Christensen, J.; Litherland, K.; Faller, T.; van de Kerkhof, E.; Natt, F.; Hunziker, J.; Krauser, J.; Swart, P. Metabolism studies of unformulated internally [3H]-labeled short interfering RNAs in mice. *Drug Metab Dispos.* 2013, 41(6), p.1211-1219. doi: 10.1124/dmd.112.050666.
- 11) Valotassiou, V.; Malamitsi, J.; Papatriantafyllou, J.; Dardiotis, E.; Tsougos, I.; Psimadas, D.; Alexiou, S.; Hadjigeorgiou, G.; Georgoulas, P. SPECT and PET imaging in Alzheimer's disease. *Ann Nucl Med.* 2018, 32(9), p.583-593. doi: 10.1007/s12149-018-1292-6.
- 12) Jamali, A. M.; Kethamreddy, M.; Burkett, B. J.; Port, J. D.; Pandey, M. K. PET and SPECT Imaging of ALS: An Educational Review. *Mol Imaging.* 2023, 2023, p.5864391. doi: 10.1155/2023/5864391.
- 13) Okubo, Y.; Suhara, T. [Receptor occupancy and antipsychotic drug action measured by PET and SPECT]. *Seishin Shinkeigaku Zasshi.* 2001, 103(4), p.329-340
- 14) Crişan, G.; Moldovean-Cioroianu, N. S.; Timaru, D. G.; Andrieş, G.; Căinap, C.; Chiş, V. Radiopharmaceuticals for PET and SPECT Imaging: A Literature Review over the Last Decade. *Int J Mol Sci.* 2022, 23(9). doi: 10.3390/ijms23095023.
- 15) Krasnovskaya, O. O.; Abramchuck, D.; Erofeev, A.; Gorelkin, P.; Kuznetsov, A.; Shemukhin, A.; Beloglazkina, E. K. Recent Advances in (64)Cu/(67)Cu-Based Radiopharmaceuticals. *Int J Mol Sci.* 2023, 24(11). doi: 10.3390/ijms24119154.
- 16) Ishikawa, E. Development and clinical application of sensitive enzyme immunoassay for macromolecular antigens—a review. *Clin Biochem.* 1987, 20(6), p.375-385. doi: 10.1016/0009-9120(87)90002-6.
- 17) Coyne, C. P.; Kelly, A. B.; Hornof, W. J.; O'Brien, T. R.; Philp, M. S.; Lamb, J. F. Radiolabeling of equine platelets in plasma with ¹¹¹In-(2-mercaptopyridine-N-oxide) and their in vivo survival. *Am J Vet Res.* 1987, 48(3), p.385-391.
- 18) Liu, D.; Xia, Q.; Ding, D.; Tan, W. Radiolabeling of functional oligonucleotides for molecular imaging. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022, 10, p.986412. doi: 10.3389/fbioe.2022.986412.
- 19) Refaat, A.; Yap, M. L.; Pietersz, G.; Walsh, A. P. G.; Zeller, J.; Del Rosal, B.; Wang, X.; Peter, K. In vivo fluorescence imaging: success in preclinical imaging paves the way for clinical applications. *J Nanobiotechnology.* 2022, 20(1), p.450. doi: 10.1186/s12951-022-01648-7.
- 20) Li, C.; Chen, G.; Zhang, Y.; Wu, F.; Wang, Q. Advanced Fluorescence Imaging Technology in the Near-Infrared-II Window for Biomedical Applications. *J Am Chem Soc.* 2020, 142(35), p.14789-14804. doi: 10.1021/jacs.0c07022.
- 21) Roy, D.; Steyer, G. J.; Gargasha, M.; Stone, M. E.; Wilson, D. L. 3D cryo-imaging: a very high-resolution view of the whole mouse. *Anat Rec (Hoboken).* 2009, 292(3), p.342-351. doi: 10.1002/ar.20849.
- 22) Mazur, C.; Powers, B.; Zasadny, K.; Sullivan, J. M.; Dimant, H.; Kamme, F.; Hesterman, J.; Matson, J.; Oestergaard, M.; Seaman, M.; Holt, R. W.; Qutaish, M.; Polyak, I.; Coelho, R.; Gottumukkala, V.; Gaut, C. M.; Berridge, M.; Albargothy, N. J.; Kelly, L.; Carare, R. O.; Hoppin, J.; Kordasiewicz, H.; Swayze, E. E.; Verma, A. Brain pharmacology of intrathecal antisense oligonucleotides revealed through multimodal imaging. *JCI Insight.* 2019, 4(20). doi: 10.1172/jci.insight.129240.
- 23) Feng, L.; Cai, S.; Zhang, J.; Lou, K.; Yang, Z.; Qu, J.; Wen, W. NIR-II multifocal structured illumination microscopy. *Opt Lett.* 2022, 47(18), p.4656-4659. doi: 10.1364/OL.469259.
- 24) Benninger, R. K. P.; Piston, D. W. Two-photon excitation microscopy for the study of living cells and tissues. *Curr Protoc Cell Biol.* 2013, Chapter 4, 4.11.1-4.11.24. doi: 10.1002/0471143030.cb0411s59.
- 25) Kortylewski, M.; Swiderski, P.; Herrmann, A.; Wang, L.; Kowolik, C.; Kujawski, M.; Lee, H.; Scuto, A.; Liu, Y.; Yang, C.; Deng, J.; Soifer, H. S.; Raubitschek, A.; Forman, S.; Rossi, J. J.; Pardoll, D. M.; Jove, R.; Yu, H. In vivo delivery of siRNA to immune cells by conjugation to a TLR9 agonist enhances antitumor immune responses. *Nat Biotechnol.* 2009, 27(10), p.925-932. doi: 10.1038/nbt.1564.
- 26) Chen, A.; Dogdas, B.; Mehta, S.; Haskell, K.; Ng, B.; Keough, E.; Howell, B.; Meacham, D. A.; Aslamkhan, A. G.; Davide, J.; Stanton, M.; Bagchi, A.; Sepp-Lorenzino, L.; Tao, W. Quantification of Cy-5 siRNA signal in the intra-vital multi-photon microscopy images. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc.* 2012, 2012, p.3712-3715. doi: 10.1109/EMBC.2012.6346773.
- 27) Peti-Peterdi, J.; Toma, I.; Sipos, A.; Vargas, S. L.; Multiphoton imaging of renal regulatory mechanisms. *Physiology (Bethesda).* 2009, 24, p.88-96. doi: 10.1152/physiol.00001.2009.
- 28) Molitoris, B. A.; Sandoval, R. M. Pharmacophotonics: utilizing multi-photon microscopy to quantify drug delivery and intracellular trafficking in the kidney. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006, 58(7), p.809-823. doi: 10.1016/j.addr.2006.07.017.

- 29) Olarte, O. E.; Andilla, J.; Gualda, E. J.; Loza-Alvarez, P. Light-sheet microscopy: a tutorial. *Adv Opt Photonics*. 2018, 10(1), p.111-179. doi: 10.1364/AOP.10.000111.
- 30) Pant, S. D.; March, L. D.; Famulski, J. K.; French, C. R.; Lehmann, O. J.; Waskiewicz, A. J. Molecular mechanisms regulating ocular apoptosis in zebrafish gdf6a mutants. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013, 54(8), p.5871-5879. doi: 10.1167/iovs.12-11315.
- 31) Jensen, E. Technical review: In situ hybridization. *Anat Rec (Hoboken)*. 2014, 297(8), p.1349-1353. doi: 10.1002/ar.22944.
- 32) Menezes, R. C.; Figueiredo, F. B.; Wise, A. G.; Madeira, M. F.; Oliveira, R. V.; Schubach, T. M.; Kiupel, M.; Langohr, I. M. Sensitivity and specificity of in situ hybridization for diagnosis of cutaneous infection by *Leishmania infantum* in dogs. *J Clin Microbiol*. 2013, 51(1), p.206-211. doi: 10.1128/JCM.02123-12.
- 33) Spencer-Dene, B.; Mukherjee, P.; Alex, A.; Bera, K.; Tseng, W. J.; Shi, J.; Chaney, E. J.; Spillman, D. R.; Marjanovic, M.; Miranda, E.; Boppart, S.A.; Hood, S.R. Localization of unlabeled bepirovirsen antisense oligonucleotide in murine tissues using in situ hybridization and CARS imaging. *RNA*. 2023, 29(10), p.1575-1590. doi: 10.1261/rna.079699.123.
- 34) Cheetham, J.E.; Coleman, P.D.; Chow, N. Isolation of single immunohistochemically identified whole neuronal cell bodies from post-mortem human brain for simultaneous analysis of multiple gene expression. *J Neurosci Methods*. 1997, 77(1), p.43-48. doi: 10.1016/s0165-0270(97) 00109-x.
- 35) Nakashima, Y.; Setou, M. Distribution of Antisense Oligonucleotides in Rat Eyeballs Using MALDI Imaging Mass Spectrometry. *Mass Spectrom (Tokyo)*. 2018, 7(1), p. A0070. doi: 10.5702/massspectrometry. A0070.
- 36) Chay, S.H.; Pohland, R.C. Comparison of quantitative whole-body autoradiographic and tissue dissection techniques in the evaluation of the tissue distribution of [¹⁴C] daptomycin in rats. *J Pharm Sci*. 1994, 83(9), p.1294-1299. doi: 10.1002/jps.2600830921.
- 37) Romero-Palomo, F.; Festag, M.; Lenz, B.; Schadt, S.; Brink, A.; Kipar, A.; Steinhuber, B.; Husser, C.; Koller, E.; Sewing, S.; Tessier, Y.; Dzygiel, P.; Fischer, G.; Winter, M.; Hetzel, U.; Mihatsch, M.J.; Braendli-Baiocco, A. Safety, Tissue Distribution, and Metabolism of LNA-Containing Antisense Oligonucleotides in Rats. *Toxicol Pathol*. 2021, 49(6), p.1174-1192. doi: 10.1177/01926233211011615.
- 38) Mahajan, S.; Zhao, H.; Kovacina, K.; Lachacz, E.; Hoxha, S.; Chan, J.; Liang, M. High-sensitivity quantification of antisense oligonucleotides for pharmacokinetic characterization. *Bioanalysis*. 2022, 14(9), p.603-613. doi: 10.4155/bio-2022-0035.
- 39) 葛西康之, 才原良子, 辻野好美, 羽成優, 早田洋平, 山本卓, 村越かおり, 渡辺恭子. Hybridization assayによる核酸医薬品の定量. 12th JBF Symposium. 2021, DG2020-48.
- 40) Osawa, M.; Akiya, T.; Ogawa, F.; Suzuki, T.; Yamagami, M.; Umemoto, T.; Ideno, A. Sensitive and specific quantification of antisense oligonucleotides using probe alteration-linked self-assembly reaction technology. *Biotechniques*. 2023, 75(1), p.353-362. doi: 10.2144/btn-2023-0005.
- 41) Tian, Q.; Rogness, J.; Meng, M.; Li, Z. Quantitative determination of a siRNA (AD00370) in rat plasma using peptide nucleic acid probe and HPLC with fluorescence detection. *Bioanalysis*. 2017, 9(11), p.861-872. doi: 10.4155/bio-2017-0017.
- 42) Vervaeke, P.; Borgos, S. E.; Sanders, N. N.; Combes, F. Regulatory guidelines and preclinical tools to study the biodistribution of RNA therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2022, 184, p.114236. doi: 10.1016/j.addr.2022.114236.
- 43) Castellanos-Rizaldos, E.; Brown, C. R.; Dennin, S.; Kim, J.; Gupta, S.; Najarian, D.; Gu, Y.; Aluri, K.; Enders, J.; Brown, K.; Xu, Y. RT-qPCR Methods to Support Pharmacokinetics and Drug Mechanism of Action to Advance Development of RNAi Therapeutics. *Nucleic Acid Ther*. 2020, 30(3), p.133-142. doi: 10.1089/nat.2019.0840.
- 44) Angart, P. A.; Adu-Berchie, K.; Carlson, R. J.; Vocelle, D. B.; Chan, C.; Walton, S. P. Relative Quantification of siRNA Strand Loading into Ago2 for Design of Highly Active siRNAs. *Methods Mol Biol*. 2019, 1974, p.41-56. doi: 10.1007/978-1-4939-9220-1_4.
- 45) Shin, M.; Meda Krishnamurthy, P.; Devi, G.; Watts, J. K. Quantification of Antisense Oligonucleotides by Splint Ligation and Quantitative Polymerase Chain Reaction. *Nucleic Acid Ther*. 2022, 32(1), p.66-73. doi: 10.1089/nat.2021.0040.
- 46) Boos, J. A.; Kirk, D. W.; Piccolotto, M. L.; Zuercher, W.; Gfeller, S.; Neuner, P.; Dattler, A.; Wishart, W. L.; Von Arx, F.; Beverly, M.; Christensen, J.; Litherland, K.; van de Kerkhof, E.; Swart, P. J.; Faller, T.; Beyersbach, A.; Morrissey, D.; Hunziker, J.; Beuvink, I. Whole-body scanning PCR; a highly sensitive method to study the biodistribution of mRNAs, noncoding RNAs and therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*. 2013, 41(15), p. e145. doi: 10.1093/nar/gkt515.

- 47) Sun, Y.; Nitta, S. I.; Saito, K.; Hosogai, R.; Nakai, K.; Goda, R.; Kakehi, M.; Murata, K.; Yamaguchi, T.; Okuzono, T.; Yamane, S.; Enoki, Y.; Kawabata, M.; Takahara, K.; Sato, S.; Yoshida, T.; Inoue, T.; Saito, Y. Development of a bioanalytical method for an antisense therapeutic using high-resolution mass spectrometry. *Bioanalysis*. 2020, 12(24), p.1739–1756. doi: 10.4155/bio-2020-0225.
- 48) Liu, A.; Cheng, M.; Zhou, Y.; Deng, P. Bioanalysis of Oligonucleotide by LC-MS: Effects of Ion Pairing Regents and Recent Advances in Ion-Pairing-Free Analytical Strategies. *Int J Mol Sci*. 2022, 23(24). doi: 10.3390/ijms232415474.
- 49) Wheller, R.; Summerfield, S.; Barfield, M. Comparison of accurate mass LC-MS and MRM LC-MS/MS for the quantification of a therapeutic small interfering RNA. *Int j mass spectrom*. 2013, 345–347(1), p.45–53. doi: 10.1016/j.ijms.2012.09.012
- 50) International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis M10. <https://www.pmda.go.jp/files/000246792.pdf> (accessed 2025-03-24).
- 51) Ito, K.; Takakusa, H.; Kakuta, M.; Kanda, A.; Takagi, N.; Nagase, H.; Watanabe, N.; Asano, D.; Goda, R.; Masuda, T.; Nakamura, A.; Onishi, Y.; Onoda, T.; Koizumi, M.; Takeshima, Y.; Matsuo, M.; Takaishi, K. Renadirsen, a Novel 2'OMeRNA/ENA((R))Chimera Antisense Oligonucleotide, Induces Robust Exon 45 Skipping for Dystrophin In Vivo. *Curr Issues Mol Biol*. 2021, 43(3), p.1267–1281. doi: 10.3390/cimb43030090.
- 52) Lozac'h, F.; Christensen, J.; Faller, T.; van de Kerkhof, E.; Krauser, J.; Garnier, M.; Litherland, K.; Catoire, A.; Natt, F.; Hunziker, J.; Swart, P. ADME studies of [5-(3) H]-2'-O-methyluridine nucleoside in mice: a building block in siRNA therapeutics. *Pharmacol Res Perspect*. 2016, 4(1), p. e00209. doi: 10.1002/prp2.209.
- 53) Gutiérrez-Puente, Y.; Tari, A. M.; Stephens, C.; Rosenblum, M.; Guerra, R. T.; Lopez-Berestein, G. Safety, pharmacokinetics, and tissue distribution of liposomal P-ethoxy antisense oligonucleotides targeted to Bcl-2. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999, 291(2), p.865–869. doi: 10.1016/s0022-3565(24) 35177-8
- 54) Vinogradov, S. V.; Batrakova, E. V.; Kabanov, A. V. Nanogels for oligonucleotide delivery to the brain. *Bioconjug Chem*. 2004, 15(1), p.50–60. doi: 10.1021/bc034164r.
- 55) Leamon, C. P.; Cooper, S. R.; Hardee, G. E. Folate-liposome-mediated antisense oligodeoxynucleotide targeting to cancer cells: evaluation in vitro and in vivo. *Bioconjug Chem*. 2003, 14(4), p.738–747. doi: 10.1021/bc020089t.
- 56) Christensen, J.; Litherland, K.; Faller, T.; van de Kerkhof, E.; Natt, F.; Hunziker, J.; Boos, J.; Beuvink, I.; Bowman, K.; Baryza, J.; Beverly, M.; Vargeese, C.; Heudi, O.; Stoeckli, M.; Krauser, J.; Swart, P. Biodistribution and metabolism studies of lipid nanoparticle-formulated internally [3H]-labeled siRNA in mice. *Drug Metab Dispos*. 2014, 42(3), p.431–440. doi: 10.1124/dmd.113.055434.
- 57) Wang, D.; Wang, Q.; Wang, Y.; Chen, P.; Lu, X.; Jia, F.; Sun, Y.; Sun, T.; Zhang, L.; Che, F.; He, J.; Lian, L.; Morano, G.; Shen, M.; Ren, M.; Dong, SS.; Zhao, JJ.; Zhang, K. Targeting oncogenic KRAS with molecular brush-conjugated antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2022, 119(29), p. e2113180119. doi: 10.1073/pnas.2113180119.
- 58) Pan, Y.; Guan, J.; Gao, Y.; Zhu, Y.; Li, H.; Guo, H.; He, Q.; Guan, Z.; Yang, Z. Modified ASO conjugates encapsulated with cytidinyl/cationic lipids exhibit more potent and longer-lasting anti-HCC effects. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2023, 32, p.807–821. doi: 10.1016/j.omtn.2023.04.028.
- 59) Garbuzenko, O. B.; Saad, M.; Betigeri, S.; Zhang, M.; Vetcher, A. A.; Soldatenkov, V. A.; Reimer, D. C.; Pozharov, V. P.; Minko, T. Intratracheal versus intravenous liposomal delivery of siRNA, antisense oligonucleotides and anticancer drug. *Pharm Res*. 2009, 26(2), p.382–394. doi: 10.1007/s11095-008-9755-4.
- 60) Okuda, T.; Toyoda, Y.; Murakami, T.; Okamoto, H. Biodistribution/biostability assessment of siRNA after intravenous and intratracheal administration to mice, based on comprehensive analysis of in vivo/ex vivo/polyacrylamide gel electrophoresis fluorescence imaging. *Int J Pharm*. 2019, 565, p.294–305. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.05.016.
- 61) Liao, H.; Wang, S.; Wang, X.; Dai, D. Z.; Zhang, Y.; Zhu, C.; Li, J. Imaging-Assisted Antisense Oligonucleotide Delivery for Tumor-Targeted Gene Therapy. *Chem Biomed Imaging*. 2024, 2(5), p.313–330. doi: 10.1021/cbmi.4c00012.
- 62) Saleem, A.; Matthews, J. C.; Ranson, M.; Callies, S.; André, V.; Lahn, M.; Dickinson, C.; Prenant, C.; Brown, G.; McMahon, A.; Talbot, D. C.; Jones, T.; Price, P. M. Molecular Imaging and Pharmacokinetic Analysis of Carbon-11 Labeled Antisense Oligonucleotide LY2181308 in Cancer Patients. *Theranostics*. 2011, 1, p.290–301. doi: 10.7150/thno.v01p0290.
- 63) Mukai, H.; Hatanaka, K.; Yagi, N.; Warashina, S.; Zouda,

- M.; Takahashi, M.; Narushima, K.; Yabuuchi, H.; Iwano, J.; Kuboyama, T.; Enokizono, J.; Wada, Y.; Watanabe, Y. Pharmacokinetic evaluation of liposomal nanoparticle-encapsulated nucleic acid drug: A combined study of dynamic PET imaging and LC/MS/MS analysis. *J Control Release*. 2019, 294, p.185-194. doi: 10.1016/j.jconrel.2018.12.006.
- 64) Metz, T.; Welling, M. M.; Suidgeest, E.; Nieuwenhuize, E.; de Vlaam, T.; Curtis, D.; Hailu, T. T.; van der Weerd, L.; van Roon-Mom, W. M. C. Biodistribution of Radioactively Labeled Splice Modulating Antisense Oligonucleotides After Intracerebroventricular and Intrathecal Injection in Mice. *Nucleic Acid Ther*. 2024, 34(1), p.26-34. doi: 10.1089/nat.2023.0018.
- 65) Sullivan, J. M.; Mazur, C.; Wolf, D. A.; Horky, L.; Currier, N.; Fitzsimmons, B.; Hesterman, J.; Pauplis, R.; Haller, S.; Powers, B.; Tayefeh, L.; DeBrosse-Serra, B.; Hoppin, J.; Kordasiewicz, H.; Swayze, EE.; Verma, A. Convective forces increase rostral delivery of intrathecal radiotracers and antisense oligonucleotides in the cynomolgus monkey nervous system. *J Transl Med*. 2020, 18(1), p.309. doi: 10.1186/s12967-020-02461-2.
- 66) van de Steeg, E.; Läppchen, T.; Aguilera, B.; Jansen, H. T.; Muilwijk, D.; Vermue, R.; van der Hoorn, J. W.; Donato, K.; Rossin, R.; de Visser, P. C.; Vlamming, MLH. Feasibility of SPECT-CT Imaging to Study the Pharmacokinetics of Antisense Oligonucleotides in a Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Nucleic Acid Ther*. 2017, 27(4), p.221-231. doi: 10.1089/nat.2016.0649.
- 67) Liu, M.; Wang, R. F.; Yan, P.; Zhang, C. L.; Cui, Y. G. Molecular imaging and pharmacokinetics of (99 m) Tc-hTERT antisense oligonucleotide as a potential tumor imaging probe. *J Labelled Comp Radiopharm*. 2014, 57(2), p.97-101. doi: 10.1002/jlcr.3171.
- 68) Dvorchik, BH.; Marquis, JK. Disposition and toxicity of a mixed backbone antisense oligonucleotide, targeted against human cytomegalovirus, after intravitreal injection of escalating single doses in the rabbit. *Drug Metab Dispos*. 2000, 28(10), p.1255-1261. doi: 10.1016/S0026-895X(24)12058-5.
- 69) Khan, A.; Benboubetra, M.; Sayyed, P. Z.; Ng, K. W.; Fox, S.; Beck, G.; Benter, I. F.; Akhtar, S. Sustained polymeric delivery of gene silencing antisense ODNs, siRNA, DNazymes and ribozymes: in vitro and in vivo studies. *J Drug Target*. 2004, 12(6), p.393-404. doi: 10.1080/10611860400003858.
- 70) Christie, R. J.; Matsumoto, Y.; Miyata, K.; Nomoto, T.; Fukushima, S.; Osada, K.; Halnaut, J.; Pittella, F.; Kim, H. J.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. Targeted polymeric micelles for siRNA treatment of experimental cancer by intravenous injection. *ACS Nano*. 2012, 6(6), p.5174-5189. doi: 10.1021/nn300942b.
- 71) Piao, W.; Nishina, K.; Yoshida-Tanaka, K.; Kuwahara, H.; Nishina, T.; Sakata, M.; Mizusawa, H.; Yokota, T. Efficient in vivo delivery of antisense oligonucleotide to choroid plexus. *J Med Dent Sci*. 2013, 60(1), p.9-16. doi: 10.11480/jmds.600102.
- 72) Dulla, K.; Aguila, M.; Lane, A.; Jovanovic, K.; Parfitt, D. A.; Schulkens, I.; Chan, H. L.; Schmidt, I.; Beumer, W.; Vorthoren, L.; Collin, RWJ.; Garanto, A.; Duijkers, L.; Brugulat-Panes, A.; Semo, M.; Vugler, AA.; Biasutto, P.; Adamson, P.; Cheetham, ME.; Splice-Modulating Oligonucleotide QR-110 Restores CEP290 mRNA and Function in Human c. 2991 + 1655A>G LCA10 Models. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2018, 12, p.730-740. doi: 10.1016/j.omtn.2018.07.010.
- 73) Rakoczy, P. E.; Lai, M. C.; Watson, M.; Seydel, U.; Constable, I. Targeted delivery of an antisense oligonucleotide in the retina: uptake, distribution, stability, and effect. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 1996, 6(3), p.207-213. doi: 10.1089/oli.1.1996.6.207.
- 74) Zhou, T.; Jia, X.; Li, H.; Wang, J.; Zhang, H.; A, Y.; Zhang, Z. New tumor-targeted nanosized delivery carrier for oligonucleotides: characteristics in vitro and in vivo. *Int J Nanomedicine*. 2011, 6, p.1527-1534. doi: 10.2147/IJN.S15239.
- 75) Nagata, T.; Dwyer, C. A.; Yoshida-Tanaka, K.; Ihara, K.; Ohyagi, M.; Kaburagi, H.; Miyata, H.; Ebihara, S.; Yoshioka, K.; Ishii, T.; Miyata, K.; Miyata, K.; Powers, B.; Igari, T.; Yamamoto, S.; Arimura, N.; Hirabayashi, H.; Uchihara, T.; Hara, RL; Wada, T.; Bennett, CF.; Seth, PP.; Rigo, F.; Yokota, T. Cholesterol-functionalized DNA/RNA heteroduplexes cross the blood-brain barrier and knock down genes in the rodent CNS. *Nat Biotechnol*. 2021, 39(12), p.1529-1536. doi: 10.1038/s41587-021-00972-x.
- 76) Kumthekar, P.; Ko, C. H.; Paunesku, T.; Dixit, K.; Sonabend, A. M.; Bloch, O.; Tate, M.; Schwartz, M.; Zuckerman, L.; Lezon, R.; Lukas, RV.; Jovanovic, B.; McCortney, K.; Colman, H.; Chen, S.; Lai, B.; Antipova, O.; Deng, J.; Li, L.; Tommasini-Ghelfi, S.; Hurley, LA.; Unruh, D.; Sharma, NV.; Kandpal, M.; Kouri, FM.; Davuluri, RV.; Brat, DJ.; Muzzio, M.; Glass, M.; Vijayakumar, V.; Heidel, J.; Giles, FJ.; Adams, AK.; James, CD.; Woloschak, GE.; Horbinski, C.; Stegh, AH. A first-in-human phase 0 clinical study of RNA interference-based spherical nucleic acids in patients

- with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med*. 2021, 13 (584). doi: 10.1126/scitranslmed.abb3945.
- 77) Brown, KM.; Nair, JK.; Janas, MM.; Anglero-Rodriguez, YI.; Dang, LTH.; Peng, H.; Theile, CS.; Castellanos-Rizaldos, E.; Brown, C.; Foster, D.; Kurz, J.; Allen, J.; Maganti, R.; Li, J.; Matsuda, S.; Stricos, M.; Chickering, T.; Jung, M.; Wassarman, K.; Rollins, J.; Woods, L.; Kelin, A.; Guenther, DC.; Mobley, MW.; Petrulis, J.; McDougall, R.; Racie, T.; Bombardier, J.; Cha, D.; Agarwal, S.; Johnson, L.; Jiang, Y.; Lentini, S.; Gilbert, J.; Nguyen, T.; Chigas, S.; LeBlanc, S.; Poreci, U.; Kasper, A.; Rogers, AB.; Chong, S.; Davis, W.; Sutherland, JE.; Castoreno, A.; Milstein, S.; Schlegel, MK.; Zlatev, I.; Charisse, K.; Keating, M.; Manoharan, M.; Fitzgerald, K.; Wu, JT.; Maier, MA.; Jadhav, V. Expanding RNAi therapeutics to extrahepatic tissues with lipophilic conjugates. *Nat Biotechnol*. 2022, 40, p.1500–1508. doi: 10.1038/s41587-022-01334-x.
 - 78) Liu, Y.; Andreucci, A.; Iwamoto, N.; Yin, Y.; Yang, H.; Liu, F.; Bulychev, A.; Hu, XS.; Lin, X.; Lamore, S.; Patil, S.; Mohapatra, S.; Purcell-Estabrook, E.; Taborn, K.; Dale, E.; Vargeese, C. Preclinical evaluation of WVE-004, an investigational stereopure oligonucleotide for the treatment of C9orf72-associated ALS or FTD. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2022, 28, p.558–570. doi: 10.1016/j.omtn.2022.04.007.
 - 79) Bornert, O.; Hogervorst, M.; Nauroy, P.; Bischof, J.; Swildens, J.; Athanasiou, I.; Tufa, SF.; Keene, DR.; Kiritsi, D.; Hainzl, S.; Murauer, EM.; Marinkovich, MP.; Platenburg, G.; Hausser, I.; Wally, V.; Ritsema, T.; Koller, U.; Haisma, EM.; Nystrom, A. QR-313, an Antisense Oligonucleotide, Shows Therapeutic Efficacy for Treatment of Dominant and Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa: A Preclinical Study. *J Invest Dermatol*. 2021, 141 (4), p.883–893. e6. doi: 10.1016/j.jid.2020.08.018.
 - 80) Yokoi, H.; Kasahara, Y.; Obika, S.; Doi, T.; Kamada H. Development of a detection method for antisense oligonucleotides in mouse kidneys by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2018, 32 (23), p.1984–1990. doi.org/10.1002/rcm.8274.
 - 81) Malecova, B.; Burke, RS.; Cochran, M.; Hood, MD.; Johns, R.; Kovach PR.; Doppalapudi, VR.; Erdogan, G.; Arias, JD.; Darimont, B.; Miller, CD.; Huang H.; Geall, A.; Younis, HS.; Levin, AA. Targeted tissue delivery of RNA therapeutics using antibody-oligonucleotide conjugates (AOCs). *Nucleic Acids Res*. 2023, 51 (12), p.5901–5910. doi: 10.1093/nar/gkad415.
 - 82) Golan, T.; Khvalevsky, EZ.; Hubert, A.; Gabai, RM.; Hen, N.; Segal, A.; Domb, A.; Harari, G.; David, EB.; Raskin, S.; Goldes, Y.; Goldin, E.; Eliakim, R.; Lahav, M.; Kopleman, Y.; Dancour, A.; Shemi, A.; Galun, E. RNAi therapy targeting KRAS in combination with chemotherapy for locally advanced pancreatic cancer patients. *Oncotarget*. 2015, 6 (27), p.24560–24570. doi: 10.18632/oncotarget.4183.
 - 83) Koren, MJ.; Moriarty, PM.; Baum, SJ.; Neutel, J.; Hernandez-Illas, M.; Weintraub, HS.; Florio, M.; Kassahun, H.; Melquist, S.; Varrieur, T.; Haldar, SM.; Sohn, W.; Wang, H.; Elliott-Davey, M.; Rock, BM.; Pei, T.; Homann, O.; Hellawell, J.; Watts, GF. Preclinical development and phase 1 trial of a novel siRNA targeting lipoprotein(a). *Nat Med*. 2022, 28 (1), p.96–103. doi: 10.1038/s41591-021-01634-w.
 - 84) Martinez, T.; Gonzalez, MV.; Roehl, I.; Wright, N.; Paneda, C.; Jimenez, AI. In vitro and in vivo efficacy of SYL040012, a novel siRNA compound for treatment of glaucoma. *Mol Ther*. 2014, 22 (1), p.81–91. doi: 10.1038/mt.2013.216.
 - 85) Viney, NJ.; Guo, S.; Tai, LJ.; Baker, BF.; Aghajan, M.; Jung, SW.; Yu, RZ.; Booten, S.; Murray, H.; Machemer, T.; Burel, S.; Murray, S.; Buchele, G.; Tsimikas, S.; Schneider, E.; Geary, RS.; Benson, MD.; Monia, BP. Ligand conjugated antisense oligonucleotide for the treatment of transthyretin amyloidosis: preclinical and phase 1 data. *ESC Heart Fail*. 2021, 8 (1), p.652–661. doi: 10.1002/ehf2.13154.
 - 86) Cloutier, F.; Lawrence, M.; Goody, R.; Lamoureux, S.; Al-Mahmood, S.; Colin, S.; Ferry, A.; Conduzorgues, JP.; Hadri, A.; Cursiefen, C.; Udaondo, P.; Viaud, E.; Thorin, E.; Chemtob, S. Antiangiogenic activity of aganirsen in nonhuman primate and rodent models of retinal neovascular disease after topical administration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012, 53 (3), p.1195–1203. doi: 10.1167/iovs.11-9064.
 - 87) Yu, RZ.; Gunawan, R.; Post, N.; Zanardi, T.; Hall, S.; Burkey, J.; Kim, TW.; Graham, MJ.; Prakash, TP.; Seth, PP.; Swayze, EE.; Geary, RS.; Henry, SP.; Wang, Y. Disposition and Pharmacokinetics of a GalNAc3-Conjugated Antisense Oligonucleotide Targeting Human Lipoprotein (a) in Monkeys. *Nucleic Acid Ther*. 2016, 26 (6), p.372–380. doi: 10.1089/nat.2016.0623.
 - 88) Zhang, Y.; Sun, C.; Wang, C.; Jankovic, KE.; Dong, Y. Lipids and Lipid Derivatives for RNA Delivery. *Chem Rev*. 2021, 121 (20), p.12181–12277. doi: 10.1021/acs.chemrev.1c00244.
 - 89) Asami, Y.; Yoshioka, K.; Nishina, K.; Nagata, T.; Yokota,

- T. Drug delivery system of therapeutic oligonucleotides. *Drug Discov Ther.* 2016, 10(5), p.256-262. doi: 10.5582/ddt.2016.01065.
- 90) Zhang, J.; Chen, B.; Gan, C.; Sun, H.; Zhang, J.; Feng, L. A Comprehensive Review of Small Interfering RNAs (siRNAs): Mechanism, Therapeutic Targets, and Delivery Strategies for Cancer Therapy. *Int J Nanomedicine.* 2023, 18, p.7605-7635. doi: 10.2147/IJN.S436038.